



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA MEDICA**

**XX CICLO**

**R-spondina1 e il suo ruolo nella determinazione  
e differenziazione sessuale**

**Dottoranda**

*Dott.ssa Sara Tomaselli*

**Relatore**

*Prof.ssa P. Grammatico*

**Coordinatore**

*Prof. B. Dallapiccola*

# INDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	Pag. 4
<b>Capitolo 1 – INTRODUZIONE</b> .....	Pag. 5
1.1) Lo sviluppo sessuale	
1.1.1) Il sesso cromosomico	
1.1.2) Il sesso gonadico	
1.1.3) Il sesso fenotipico	
1.2) Difetti dello Sviluppo Sessuale (DSS)	
1.2.1) DSS del sesso cromosomico	
1.2.2) DSS del sesso gonadico	
1.2.3) DSS del sesso fenotipico	
1.3) La genetica della determinazione e differenziazione sessuale	
1.3.1) Promotori specifici dello sviluppo testicolare	
1.3.2) Promotori specifici dello sviluppo ovarico	
1.4) R-spondina1	
<b>Capitolo 2 – SCOPO DEL LAVORO</b> .....	Pag. 50
<b>Capitolo 3 – MATERIALI E METODI</b> .....	Pag. 52
3.1) Materiali	
3.1.1) Pazienti e controlli	
3.1.2) Colture cellulari	
3.2) Tecniche di genetica molecolare	
3.2.1) Estrazione e quantificazione di DNA genomico	
3.2.2) Amplificazione genica	
3.2.3) Elettroforesi ed estrazione di DNA da gel di agarosio	
3.2.4) Sequenziamento genico	
3.3) Tecniche di clonaggio	
3.3.1) Plasmidi e mezzi di coltura	
3.3.2) Costruzione dei vettori pRSPO1, pRSPO1-HA, pRSPO1-GFP	
3.3.3) Digestione di DNA con enzimi di restrizione	
3.3.4) Clonaggio di cDNA dentro vettori plasmidici mediante ligazione	
3.3.5) Trasformazione di DNA plasmidico in cellule <i>E. Coli</i>	
3.3.6) Verifica delle colonie batteriche trasformate	
3.3.7) Costruzione del vettore pRSPO1-IRES2-GFP mediante <i>Topo TA Cloning</i>	
3.3.8) Vettori di espressione per la $\beta$ -catenina e il promotore TCF	
3.3.9) Conservazione dei cloni ricombinanti	
3.4) Tecniche biochimiche	
3.4.1) Estrazione e quantificazione di proteine	
3.4.2) Elettroforesi di proteine mediante gel di SDS-poliacrilammide	
3.4.3) Western blotting	

- 3.5) Immunoistochimica cellulare
  - 3.5.1) Immunofluorescenza indiretta
- 3.6) Trasfezione e studi funzionali
  - 3.6.1) Trasfezione transiente mediante lipofezione
  - 3.6.2) Trasfezione transiente mediante nucleofezione
  - 3.6.3) Saggio luciferasi
- 3.7) Citofluorimetria
  - 3.7.1) FACS (*Fluorescence Activated Cells Sorter*)
- 3.8) Analisi di espressione genica
  - 3.8.1) Estrazione e quantificazione di RNA totale
  - 3.8.2) RT-PCR
  - 3.8.3) Analisi di *microarray*

**Capitolo 4 – RISULTATI**.....Pag. 91

- 4.1) Dati clinici e istologici della paziente
- 4.2) Analisi genica molecolare
- 4.3) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sul trascritto *RSPO1*
- 4.4) Plasmidi ricombinanti
- 4.5) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sulla proteina RSPO1
- 4.6) Studio dello stato di glicosilazione della proteina R-spondina1
- 4.7) Analisi degli effetti della mutazione *RSPO1* c.286+1G>A sull'espressione di *CTNNB1*, *WNT4* e *SOX9*
- 4.8) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sull'attività funzionale di RSPO1
- 4.9) Studio dell'interazione RSPO1/ $\beta$ -catenina in linee cellulari umane
- 4.10) Effetto della proteina ricombinante RSPO1 sull'attivazione trascrizionale TCF-dipendente
- 4.11) Effetto di Dkk1 sulla interazione RSPO1/ $\beta$ -catenina
- 4.12) Localizzazione cellulare di RSPO1
- 4.13) Analisi di geni *target* mediante *over*-espressione di *RSPO1*

**Capitolo 5 – DISCUSSIONE**.....Pag. 124

**BIBLIOGRAFIA** .....Pag. 137

**APPENDICE**.....Pag. 146

## ABSTRACT

Sex development comprises a series of sequential events that act under strong genetic control. This complex process is responsible for the achievement of sexual dimorphism and functionality, necessary for reproduction and maintenance of the species. Sex development is the result of the interactions of multiple time and dose-sensitive genes. Although in the last 15 years important scientific progress has been made in our knowledge of the molecular pathways and genes underlying sex development, many factors still remain unknown. Any dysregulation of the mechanisms responsible for sex development may lead to “Disorders of Sex Development” (DSDs), comprising a large group of congenital conditions characterized by “atypical development of chromosomal, gonadal or phenotypic sex”. Due to the complex clinical considerations associated with DSD patients, a precise and well-timed diagnosis is absolutely indispensable. A correct diagnosis is essential to make decisions regarding correct gender assignment and is the basis for appropriate short- and long-term management of DSD patients, to optimise future quality of life. Development of appropriate diagnostic and therapeutic protocols is strongly linked to a deeper understanding of the complex molecular/genetic pathways at the basis of sex development. The purpose of this research has been to improve our understanding of sex development and to provide new insights into the causes of DSDs by studying *RSPO1*, a new gene we demonstrated to be involved in gonadal development. R-spondin1, a member of a new protein family involved in Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, is a gene we discovered to be mutated in a patient with a syndromic form of XX “true hermaphroditism”. The effects of this mutation on mRNA and protein production have been investigated. Moreover, differences between wild-type and mutant protein found in our patient have been evaluated, by investigating RSPO1 cellular expression, localization and secretion. To clarify the mechanism of action of RSPO1, functional analysis has been performed using luciferase assays. Preliminary data about identification of RSPO1 target pathways and genes have been achieved by overexpression and microarray approaches. The work of this thesis has led to further elucidate the role of R-spondin1 in gonadal determination and to expand the spectrum of DSD phenotypes related to *RSPO1* mutations. Our studies to define the role of R-spondin1 might lead to the development of new tools in the diagnosis and treatment of DSD pathologies.



*Ai miei genitori*

# **Capitolo 1**

## **INTRODUZIONE**

### **“E’ un maschietto o una femminuccia?”**

Questa è la prima domanda che generalmente viene posta da genitori, parenti e amici, al momento della nascita di una nuova vita. Qualche volta, però, non è possibile dare loro una risposta. E’ questo il caso di neonati che presentano ambiguità dei genitali esterni che non permette un’immediata attribuzione del sesso: uno degli esempi più tipici e allo stesso tempo drammatici di “Difetti dello Sviluppo Sessuale” (DSS). Queste patologie mostrano un’estrema eterogeneità eziologica e si associano a particolari problematiche psico-sociali e medico-chirurgiche a breve e lungo termine che fanno sì che la gestione dei pazienti con DSS preveda percorsi diagnostici/terapeutici particolarmente articolati. Per una migliore organizzazione del processo assistenziale di tali pazienti è necessaria la cooperazione di diverse figure professionali, quali il chirurgo pediatra, il neonatologo, il genetista medico, l’endocrinologo pediatra, lo psicologo. Altre forme di DSS possono manifestarsi più tardi nella vita, per esempio quando una ragazza con amenorrea primaria scoprirà di avere un cariotipo 46,XY e non potrà mai essere fertile, o quando una ragazza nella fase della pubertà inizierà improvvisamente a mostrare segni di virilizzazione. Anche queste sono situazioni critiche per la famiglia e particolarmente complesse per il medico curante, che richiedono l’intervento di un *team* specializzato. Purtroppo, a causa delle ancora limitate conoscenze dei difetti genetici alla base dei DSS, spesso non è possibile giungere a una precisa definizione eziologica della patologia. Qualsiasi approfondimento clinico o trattamento ormonale-chirurgico richiede una conoscenza approfondita del normale sviluppo sessuale e dei meccanismi genetici che ne sono alla base, che vengono quindi descritti nei paragrafi successivi.

## 1.1) Lo sviluppo sessuale

Lo sviluppo del sistema riproduttivo comincia intorno alla 4°-5° settimana di gestazione nella specie umana e può essere considerato completo solo dopo lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e dopo lo stabilirsi della fertilità (con la produzione di gameti vitali), al termine del periodo puberale.

Lo sviluppo sessuale è un processo dinamico che richiede la corretta interazione dose e tempo-dipendente di numerosi geni, proteine, fattori paracrini e stimoli endocrini (Brennan and Capel, 2004; Wilhelm and Koopman, 2006). Il termine “sviluppo sessuale” si riferisce a due processi distinti ma sequenziali: la “determinazione sessuale” e la “differenziazione sessuale” (Hughes, 2002). Il primo processo è relativo alla formazione delle gonadi; dipende dall’assetto dei cromosomi sessuali dell’embrione e da eventi molecolari multipli che dirigono lo sviluppo delle cellule germinali, la loro migrazione alle creste urogenitali, e lo sviluppo di un ovaio o di un testicolo a partire da una gonade bipotente. La differenziazione sessuale si riferisce alla formazione dei genitali interni ed esterni, stabilendo la funzionalità sessuale, il dimorfismo sessuale e le caratteristiche sessuali secondarie necessarie per la riproduzione e il mantenimento della specie. Questo processo dipende dalla risposta sesso-specifica dei tessuti agli ormoni prodotti dalle gonadi.

La determinazione e la differenziazione sessuale avvengono in tre fasi fondamentali (Fig. 1):

- a) la determinazione del “sesso cromosomico” dello zigote (46,XX o 46,XY) che avviene al momento della fecondazione;
- b) la determinazione del “sesso gonadico” quando la gonade bipotente si sviluppa in ovaio o testicolo a partire dalla sesta/settimana nella specie umana;
- c) il differenziamento del “sesso fenotipico” attraverso la formazione dei genitali interni ed esterni e dei caratteri sessuali secondari ad opera degli ormoni steroidei e dei peptidi secreti dalle gonadi (MacLaughlin and Donahoe, 2004).

## Determinazione Sessuale

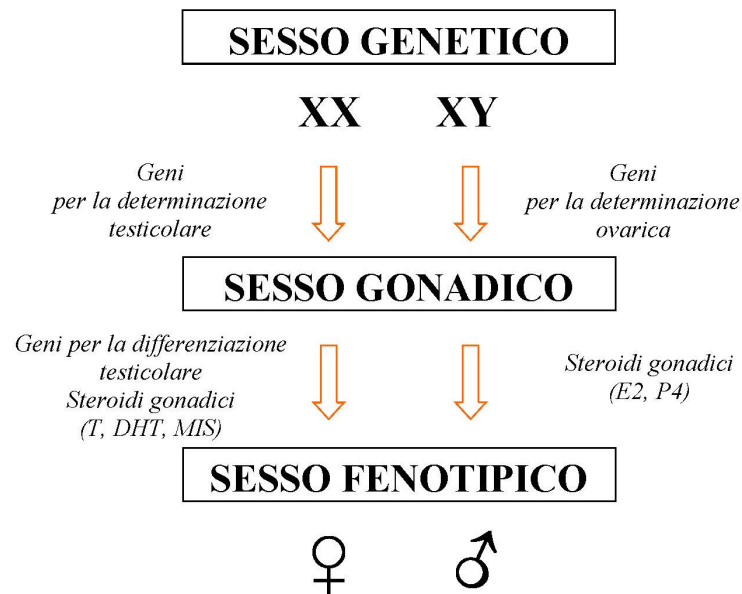


Fig. 1: **Passaggi della determinazione sessuale.** T, testosterone; DHT, diidrotestosterone; MIS, Sostanza Inibitrice Mülleriana, E2, estradiolo, P4, progesterone.

### 1.1.1) Sesso cromosomico

La nozione primaria su cui si basa storicamente lo studio della determinazione del sesso è il differente corredo cromosomico che caratterizza i due sessi. Negli animali, infatti, il sesso è frequentemente associato con una coppia di cromosomi che mostra caratteristiche differenti nel maschio e nella femmina. Il corredo cromosomico diploide nella specie umana è costituito da 22 coppie di autosomi e da una coppia di cromosomi sessuali, XY nel sesso maschile (sesso eterogametico) e XX in quello femminile (sesso omogametico). La determinazione del sesso cromosomico è un evento casuale che dipende dal gamete maschile fecondante, a seconda che contenga nel proprio corredo cromosomico aploide, un cromosoma X o un cromosoma Y. I cromosomi umani X e Y sono stati descritti per la prima volta da Painter (Fig. 2) (Painter, 1923). Il cromosoma X è un grosso metacentrico di circa 160 Mb di DNA genomico, contenente più di 1000 geni espressi (Ross *et al.*, 2006), che gioca un ruolo importante nello sviluppo sessuale in entrambi i sessi, sia a livello gonadico e della gametogenesi, sia a livello dell'asse ipotalamico-pituitario. Il cromosoma Y è molto più piccolo (circa 60 Mb) e contiene

pochi geni, tra i quali il gene coinvolto nella determinazione sessuale (*SRY*, *sex-determining region*) e i geni implicati nella spermatogenesi (come la regione AZFc) (Ross *et al.*, 2006). La presenza del cromosoma sessuale Y fornisce il segnale per lo sviluppo della gonade in senso maschile, indipendentemente dal numero dei cromosomi X presenti. L'assenza dell'Y orienta lo sviluppo fenotipico dell'individuo in senso femminile.

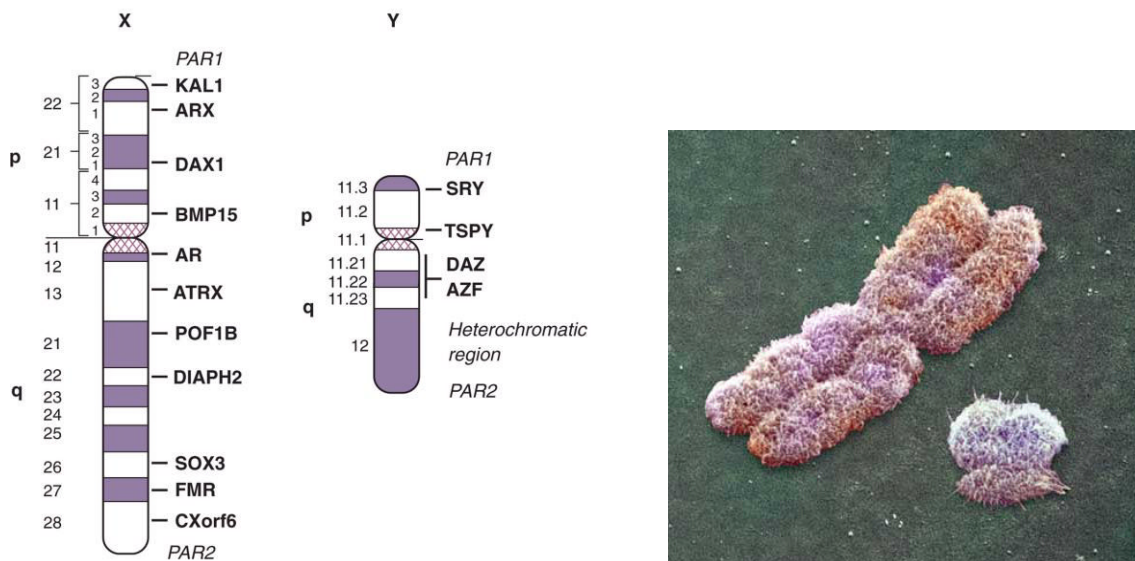


Fig. 2: **Cromosomi sessuali.** Diagramma schematico dei cromosomi X e Y che mostra le regioni e i geni chiave implicati nello sviluppo sessuale e nella riproduzione (*lato sinistro*) (Kronenberg *et al.*, 2007). Immagine tridimensionale dei cromosomi sessuali (*lato destro*).

### 1.1.2) Sesso gonadico

Il primo passo dello sviluppo sessuale è la differenziazione della gonade fetale bipotente in testicolo (in caso di un assetto cromosomico 46,XY) o in ovaio (in caso di un cariotipo 46,XX), alla 6°-7° settimana di sviluppo nell'uomo.

Nel corso dello sviluppo embrionale, alla fine della terza settimana, le cellule germinali primordiali (PGC) sono localizzate nell'endoderma dorsale del sacco vitellino, vicino all'origine dell'allantoide. Tra la quarta e la sesta settimana, sotto l'influenza di molecole segnale, recettori e proteine della matrice extracellulare, le PGC migrano fino a raggiungere la loro destinazione finale, le creste gonadiche, in via di formazione, sulla parete posteriore dell'embrione (Fig. 3).

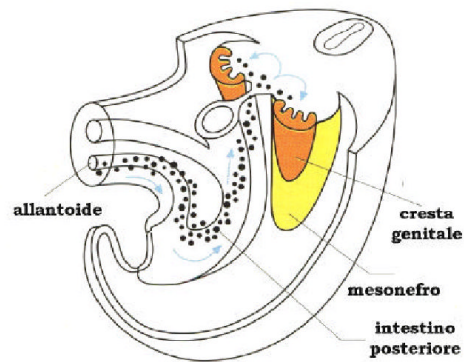


Fig. 3: **Rappresentazione schematica del percorso migratorio effettuato dalle PGC.** Le cellule germinali primordiali migrano dall'allantoide fino alla cresta genitale (modificato da Barbieri and Carinci, 1997).

Durante la 5° settimana, l'epitelio delle creste genitali s'ispessisce e la cresta sporge nella cavità celomatica, lasciando nella parte dorsale una cavità che si riempie di mesenchima indifferenziato. Successivamente migrano in questa regione cellule provenienti dal vicino abbozzo del mesonefro, formando cordoni compatti che prendono il nome di cordoni sessuali primari. A questo punto nella gonade in differenziamento si distinguono uno strato epiteliale superficiale, detto corteccia o *cortex*, che contiene anche i protogoni o cellule germinali, e una regione interna detta medulla, costituita dai cordoni sessuali primari immersi nel mesenchima in cui si formeranno i vasi sanguigni. Dal punto di vista morfologico questi processi sono caratterizzati da un identico sviluppo iniziale delle gonadi in embrioni XX e XY (tra la 4° settimana e approssimativamente i 42 giorni di gestazione, nella specie umana). Il destino dei protogoni non è intrinsecamente stabilito: l'evento decisivo è rappresentato dalla migrazione nella medulla, che porterà irrimediabilmente allo sviluppo degli spermatozoi, mentre la permanenza nel *cortex* determinerà lo sviluppo degli oociti.

A partire dalla sesta settimana, nell'embrione XY, si compie rapidamente la differenziazione della gonade bipotente in testicolo: i protogoni migrano dal *cortex* della gonade verso i cordoni sessuali primari della medulla, che assumono l'aspetto di strutture cave e si trasformano nei tubuli seminiferi. Quattro tipi cellulari sono presenti nella gonade indifferenziata: cellule di supporto, steroidogeniche, germinali e del connettivo. Nel testicolo queste cellule si differenzieranno rispettivamente in cellule del

Sertoli, cellule del Leydig, spermatogoni e cellule mioidi peritubulari. Le cellule del Sertoli sono il primo tipo cellulare a differenziare, a seguito dell'espressione del fattore di determinazione testicolare SRY (Sinclair *et al.*, 1990) nelle cellule pre-Sertoli, tra il 41° e il 44° giorno di gestazione nell'uomo. Le cellule del Sertoli producono un importante ormone peptidico, l'ormone anti Mülleriano (AMH, anche conosciuto come MIS, *Müllerian-inhibiting substance*) e hanno inoltre la funzione di nutrire le cellule germinali. Le cellule del Leydig sono delle cellule steroidogeniche interstiziali che, verso l'ottava settimana, cominciano a secernere gli ormoni androgeni (testosterone e androstenedione) a partire dal colesterolo. Le cellule germinali non sono indispensabili per l'organogenesi testicolare; gli prospermatogoni, che si localizzano nella parte centrale dei cordoni, daranno origine agli spermatogoni e poi agli spermatozoi. I prospermatogoni incorporati nei tubuli seminiferi cessano di proliferare ed entrano in uno stadio di quiescenza fino all'inizio della pubertà (McLaren, 1995). Intorno ai cordoni si differenziano delle cellule muscolari lisce, le cellule mioidi peritubulari, che delineano il cordone ed avranno il compito di favorire la progressione degli spermatozoi nel lume dei tubuli seminiferi (Fig. 4B).

La differenziazione ovarica avviene una settimana più tardi rispetto a quella testicolare. Anche nell'ovaio sono presenti quattro tipi di cellule: le cellule follicolari/della granulosa (le quali producono progesterone), le cellule della teca che producono androgeni (che vengono convertiti in estrogeni nelle cellule della granulosa), gli oociti e le cellule stromali. Negli embrioni di sesso femminile la medulla si riduce, i cordoni sessuali primari degenerano e scompaiono e la parte interna della gonade si riempie di mesenchima lasso permeato di vasi sanguigni. Le cellule germinali primordiali restano nel *cortex*, che s'ispessisce notevolmente. Durante l'accrescimento del *cortex*, le cellule epiteliali si organizzano in cordoni sessuali secondari che circondano una o più cellule germinali, costituendo i follicoli. Nelle gonadi XX, al contrario delle gonadi XY, le cellule germinali sono necessarie per la formazione ed il mantenimento dei follicoli. Gli oogoni proliferano formando ponti citoplasmatici; successivamente entrano nell'ultima divisione mitotica (a 24 settimane di gestazione nell'uomo) e vanno incontro a meiosi, bloccandosi allo stadio di diplotene. Nel periodo perinatale e prima della formazione dei follicoli primordiali, tali ponti citoplasmatici si rompono e molti oociti vanno incontro ad apoptosi (Fig. 4A).



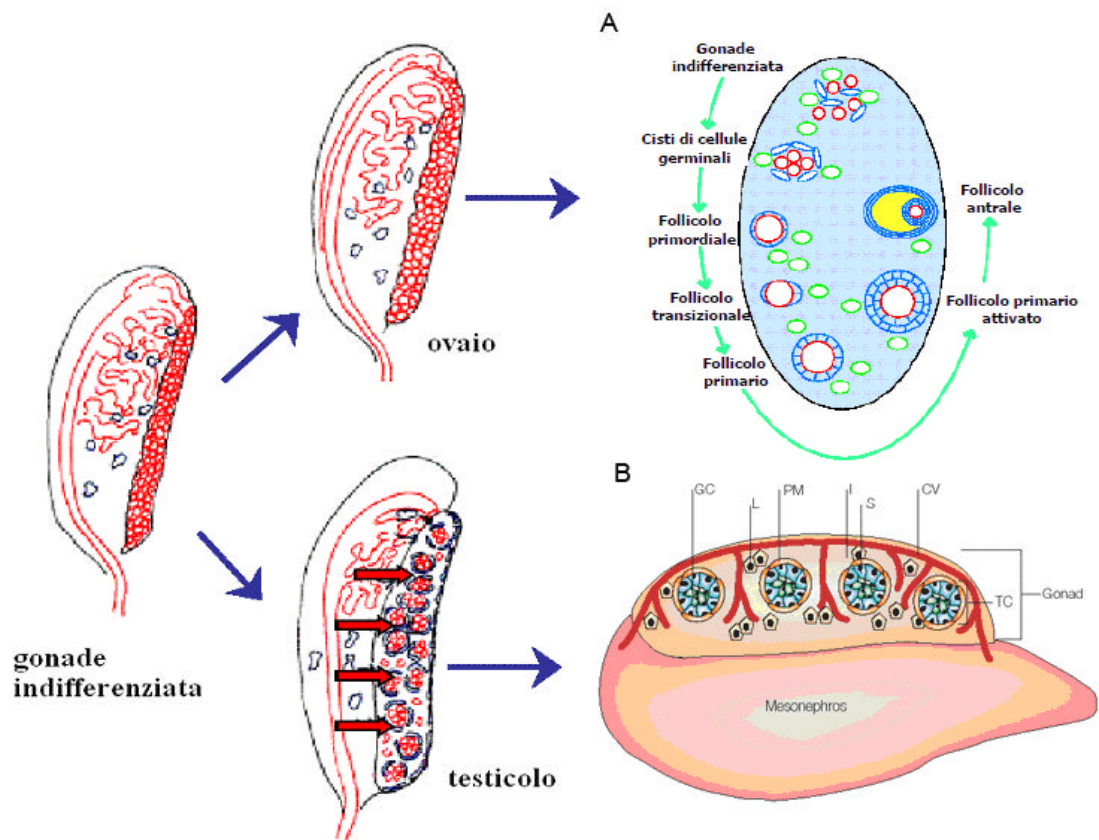


Fig. 4: **Rappresentazione schematica dei cambiamenti morfologici che avvengono nella gonade al momento della differenziazione dei sessi.** A, Rappresentazione schematica dell'organizzazione cellulare dell'ovaio negli stadi fetale e post-natale e formazione del follicolo primordiale, primario e antrale. Gli oociti sono mostrati in rosso, le cellule di sostegno della pregranulosa sono in blu, le cellule della teca in verde e il liquido antrale in giallo (modificato da Wilhelm *et al.*, 2007).

B, Il testicolo comincia il processo di formazione dei cordoni grazie alla migrazione delle cellule mesenchimali del mesonefro (frecche rosse), mentre l'ovaio embrionale non subisce modificazioni di rilievo nella sua organizzazione cellulare (modificato da Martineau *et al.*, 1997). Organizzazione delle cellule del testicolo in due compartimenti funzionali: i cordoni testicolari (TC) e lo spazio interstiziale tra i cordoni (I). Nei cordoni le cellule del Sertoli (S) circondano le cellule germinali (GC). Una lamina basale è depositata tra le cellule del Sertoli e le cellule mioidi peritubulari (PM). Il compartimento interstiziale contiene le cellule di Leydig (L) e il vaso celomatico (CV) con i rami che si estendono tra i cordoni (modificato da Brennan and Capel, 2004).

### 1.1.3) Sesso fenotipico

Le gonadi in sviluppo producono una serie di ormoni peptidici e steroidei che mediano la differenziazione sessuale e portano allo stabilirsi del sesso fenotipico (o anatomico).

I dotti genitali (o gonodotti) sono le strutture attraverso le quali i gameti vengono portati verso il sito dove avverrà la fecondazione. Il differenziamento delle vie genitali maschili e femminili avviene a partire dal mesonefro. All'interno del mesonefro durante il suo differenziamento si formano, sia negli embrioni femminili sia negli embrioni maschili, due dotti paralleli: il dotto mesonefridico (o dotto di Wolff) e il dotto paramesonefridico (o dotto di Müller) (Fig. 5). I dotti Mülleriani sono il primordio dei genitali interni femminili (tube di Fallopio, utero e parte superiore della vagina), mentre i dotti Wolffiani danno origine ai genitali interni maschili (l'epididimo, vasi deferenti e vescichette seminali).

Il progressivo sviluppo dei dotti genitali caratteristici del sesso dell'embrione e la regressione dei dotti del sesso opposto sono dovuti all'azione degli ormoni sessuali prodotti dalle gonadi una volta differenziate in testicoli o ovaie. Per molto tempo si è pensato che gli ormoni sessuali non fossero richiesti per il *pathway* di differenziazione femminile e, sulla base di tali convinzioni, si suppose che lo sviluppo sessuale maschile rappresentasse lo stato indotto, mentre lo sviluppo sessuale femminile lo stato di *default* che s'innescava in assenza dello sviluppo maschile. Recentemente tale visione è stata abbandonata: sia lo sviluppo sessuale femminile sia quello maschile rappresentano degli stati attivi che richiedono la secrezione di specifici ormoni (Blecher and Erickson, 2007).

Durante lo sviluppo embrionale del testicolo le cellule del Sertoli, sotto la regolazione di fattori di trascrizione chiave, cominciano a produrre l'ormone anti-Mülleriano (AMH), che causa la regressione dei dotti di Müller (Arango *et al.*, 1999), mentre i dotti di Wolff differenziano in risposta alla produzione di testosterone da parte delle cellule del Leydig tra la 9<sup>o</sup> e la 13<sup>o</sup> settimana di gestazione.

Durante lo sviluppo femminile, al contrario, non viene prodotto ormone anti-Mülleriano, quindi il dotto paramesonefridico permane. Inoltre a causa dell'assenza di produzione di androgeni da parte della gonade femminile, il dotto mesonefridico regredisce.

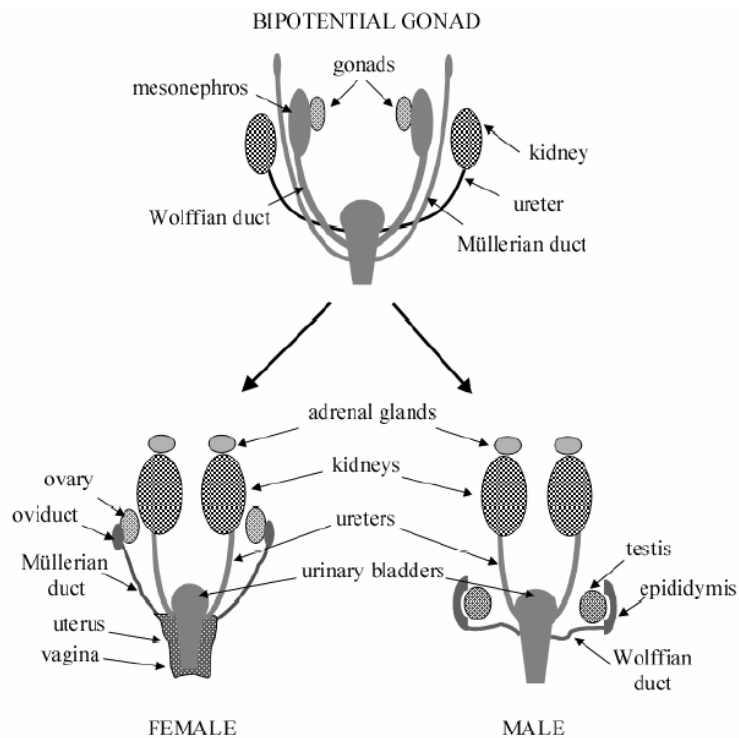


Fig. 5: **Schema riassuntivo del differenziamento delle vie genitali maschili e femminili.** Nel pannello superiore è possibile osservare la struttura dei dotti mesonefridico e paramesonefridico durante le prime fasi dello sviluppo sessuale maschile e femminile. Originariamente sia i dotti Mülleriani che Wolffiani sono presenti contemporaneamente. Nel pannello inferiore sono descritti gli organi derivati dal differenziamento del dotto di Müller durante il successivo sviluppo embrionale femminile (a sinistra), quando i dotti di Wolff regrediscono in assenza di testosterone, e gli organi derivati dal dotto di Wolff durante il successivo sviluppo embrionale maschile (a destra), quando i dotti di Müller degenerano grazie all'azione dell'AMH (modificato da Behringer, 1994).

Come le gonadi bipotenti, anche i genitali esterni sono inizialmente identici in tutti i feti, indipendentemente dal sesso cromosomico o gonadico. Inizialmente questi sono costituiti dal tubercolo genitale (GT), dalle pieghe urogenitali e dai rigonfiamenti genitali (labioscrotali). Queste strutture indifferenziate possono svilupparsi o in senso femminile o in senso maschile. Se il deidrotestosterone (DHT) viene prodotto in quantità sufficienti, dalla 7°-8° settimana gestazionale fino al momento della nascita, e se il feto risponde correttamente agli androgeni, i genitali bipotenti si svilupperanno in senso maschile: il GT si trasformerà nel pene, le pieghe urogenitali si fonderanno per formare l'uretra tubulare peniena, con l'apertura localizzata all'estremità del pene, e i rigonfiamenti genitali si fonderanno per formare lo scroto.

In assenza dell'effetto degli androgeni, il tubercolo genitale si trasformerà nel clitoride, le pieghe urogenitali si svilupperanno nelle piccole labbra, l'apertura uretrale sarà localizzata nel perineo e i rigonfiamenti genitali formeranno le grandi labbra. Infine, in assenza dell'ormone AMH, si formerà la vagina.

Sebbene gli esatti meccanismi molecolari alla base della formazione dei genitali esterni non siano conosciuti in dettaglio, è chiaro che le interazioni epitelio-mesenchima sono fondamentali per una coordinata ed appropriata differenziazione dei genitali esterni.

## **1.2) Difetti dello Sviluppo Sessuale (DSS)**

Un'alterazione in uno dei meccanismi alla base dello sviluppo sessuale può portare a "Difetti dello Sviluppo Sessuale" (DSS) (MacLaughlin and Donahoe, 2004; Wilhelm *et al.*, 2007), definizione che comprende un vasto gruppo di condizioni ad eziopatogenesi estremamente eterogenea.

La complessità dei diversi quadri clinici che si presentano nei pazienti con DSS impone una diagnosi corretta e tempestiva, così da permettere l'assegnazione del sesso più idoneo al paziente. I fattori che influenzano tale scelta sono, innanzi tutto, una precisa diagnosi eziologica e la morfologia dei genitali, le possibili opzioni chirurgiche, l'eventuale fabbisogno di una terapia sostitutiva a vita, la potenziale fertilità e il rischio neoplastico. L'approccio clinico del paziente con DSS deve coinvolgere un *team* multidisciplinare e implica accurati approfondimenti clinici, genetici e strumentali che consentono di classificare il tipo di DSS e di giungere, in una percentuale dei casi, alla corretta diagnosi della patologia che comprenda anche l'identificazione del difetto molecolare che ne è alla base.

La diagnosi eziologica di un DSS, oltre ad essere di grande ausilio ai fini dell'assegnazione del sesso, fornisce informazioni preziose sulla prognosi, sul rischio di ricorrenza della patologia e permette la prevenzione di possibili complicanze mediche, chirurgiche e neoplastiche. Tuttavia, poiché fenotipi clinici sovrapponibili possono essere espressione di differenti cause, la formulazione di una diagnosi può essere molto difficile. I progressi effettuati nell'ambito della genetica molecolare ci hanno fornito strumenti diagnostici di indubbia utilità, ma nonostante ciò la percentuale di pazienti che può essere diagnosticata a livello molecolare rimane bassa (circa 20%) e la maggior parte dei DSS viene tuttora definita come "idiopatica".

Nel 2006 è stato proposto dalla *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* (LWPES) e dall'*European Society for Pediatric Endocrinology* (ESPE) un nuovo sistema di nomenclatura (*Consensus Statement on Management of Intersex Disorders*) (Hughes *et al.*, 2006), per quelli che venivano precedentemente definiti come “difetti intersessuali” (*intersex disorders*). E' stato proposto il termine *Disorders of Sexual Development* (DSDs), per indicare tutte le condizioni congenite nelle quali lo sviluppo del sesso cromosomico, gonadico o fenotipico è atipico (Tab. 1).

PREVIOUS	PROPOSED
Intersex	Disorders of Sex Development (DSD)
Male pseudohermaphrodite Undervirilisation of an XY male Undermasculinisation of an XY male	46,XY DSD
Female pseudohermaphrodite Overvirilisation of an XX female Masculinisation of an XX female	46,XX DSD
True hermaphrodite	Ovotesticular DSD
XX male or XX sex reversal	46,XX testicular DSD
XY sex reversal	46, XY complete gonadal dysgenesis

Tab.1: **Nuova nomenclatura rivista e proposta a seguito del *Consensus Meeting on Management of Intersex Disorders*** (modificato da Hughes *et al.*, 2006).

L'incidenza alla nascita delle anomalie congenite dei genitali, in presenza delle quali l'assegnazione del genere risulta difficile, è stimata intorno a 1:4500 (Sax, 2002), ma la prevalenza sale a circa 1:300 se si considerano anche le anomalie dei genitali che non comportano dubbi sull'assegnazione del sesso, quali l'ipospadia (Ahmed *et al.*, 2004). Le anomalie dei genitali possono presentarsi isolatamente o essere parte di un quadro sindromico più complesso.

Le forme con genitali ambigui possono essere classificate a seconda della fase dello sviluppo sessuale in cui il difetto genetico ha avuto effetto e, secondo la nuova nomenclatura, i DSS vengono divisi in:

1. DSS del sesso cromosomico;
2. DSS del sesso gonadico;
3. DSS del sesso fenotipico.

La Tabella 2 riassume schematicamente le diverse forme di DSS e la loro classificazione.

Sex Chromosome DSD	46,XY DSD	46,XX DSD
A. 45,X (Turner syndrome and variants)	<b>A. Disorders of gonadal (testicular) development</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ complete or partial gonadal dysgenesis (SRY, SOX9, SF1, WT1, DAX1 dupl, WNT4 dupl)</li> <li>▪ gonadal/testis regression</li> <li>▪ ovotesticular DSD</li> </ul>	<b>A. Disorders of gonadal (ovarian) development</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ gonadal dysgenesis</li> <li>▪ testicular DSD (SRY<sup>+</sup>, SOX9 dupl, RSP01,)</li> <li>▪ ovotesticular DSD</li> </ul>
B. 47,XXY (Klinefelter syndrome and variants)	<b>B. Disorders of androgen synthesis and action</b>	<b>B. Androgen excess</b>
	<b>1. Disorders in androgen synthesis</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Leydig cell hypoplasia, aplasia (LHCGR defects)</li> <li>▪ Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia (STAR)</li> <li>▪ Cholesterol side-chain cleavage deficiency (CYP11A1)</li> <li>▪ 17<math>\alpha</math>-hydroxylase/17,20-lyase deficiency (CYP17A1)</li> <li>▪ 3<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (HSD3B2)</li> <li>▪ 17<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency (HSD17B3)</li> <li>▪ 5<math>\alpha</math>-reductase 2 deficiency (SRD5A2)</li> <li>▪ P450 oxidoreductase deficiency (POR)</li> <li>▪ Smith-Lemli-Opitz syndrome (DHCR7)</li> </ul>	<b>1. Foetal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 21-hydroxylase deficiency (CYP21A2)</li> <li>▪ 3<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase 2 (HSD3B2)</li> <li>▪ 11<math>\beta</math>-hydroxylase deficiency (CYP11B1)</li> <li>▪ P450 oxidoreductase deficiency (POR)</li> </ul>
	<b>2. Disorders of androgen action</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Androgen insensitivity syndrome (AR receptor mutation)</li> <li>▪ Drugs and environmental modulators</li> </ul>	<b>2. Foetoplacental</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aromatase deficiency (CYP19)</li> <li>▪ Oxidoreductase deficiency (POR)</li> </ul>
		<b>3. Maternal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Maternal virilising tumours (e.g. luteomas)</li> <li>▪ Androgenic drugs</li> </ul>
C. 45,X0/46,XY (Mixed gonadal dysgenesis, ovotesticular DSD)	<b>C. Other</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Persistent Müllerian duct syndrome (AMH and AMHR)</li> <li>▪ Vanishing testis syndrome</li> <li>▪ Congenital hypogonadotropic hypogonadism (DAX1)</li> <li>▪ Cryptorchidism (INSL3, GREAT)</li> <li>▪ Isolated hypospadias (CXorf6)</li> <li>▪ Syndromic associations of male genital development (e.g. cloacal anomalies, Robinow, Aarskog, hand-foot-genital, popliteal pterygium)</li> </ul>	<b>C. Other</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Müllerian agenesis / hypoplasia (e.g. MURCS) (WNT4)</li> <li>▪ Vaginal atresia (eg KcKusick-Kaufman)</li> <li>▪ Uterine abnormalities (e.g. MODY5)</li> <li>▪ Labial adhesions</li> <li>▪ Syndromic associations (e.g. cloacal anomalies)</li> </ul>
D. 46,XX/46,XY (chimeric, ovotesticular DSD)		

Tab. 2: Classificazione dei Disordini dello Sviluppo Sessuale (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

### 1.2.1) DSS del sesso cromosomico

Risulta evidente, in prima analisi, che un assetto cromosomico normale (46,XX o 46,XY) è essenziale per una corretta determinazione sessuale e un'esatta differenziazione gonadica. La presenza della "regione determinante il sesso" sul cromosoma Y, il cosiddetto gene *SRY*, è responsabile della differenziazione iniziale della gonade fetale verso il testicolo, mentre la presenza di due cromosomi X normali induce la gonade indifferenziata a svilupparsi in ovaio. I DSS del sesso cromosomico includono la sindrome di Klinefelter (47,XXY e le sue varianti più complesse 48,XXXXY e 49,XXXXXY), la sindrome di Turner o la disgenesia gonadica con bassa statura (45,X o monosomia X e sue varianti), la disgenesia gonadica mista (mosaicismo 45,X/46,XY e sue varianti) e il chimerismo dei cromosomi sessuali (46,XY/46,XX). La sindrome di Klinefelter, la forma più comune di aneuploidia dei cromosomi sessuali [con un'incidenza di circa 1:500-1:1000 nati vivi, (Lanfranco *et al.*, 2004)] è dovuta a una nondisgiunzione meiotica dei cromosomi sessuali durante la gametogenesi e dà origine ad un fenotipo maschile sterile. La presenza di un cariotipo 45,X nella sindrome di Turner [incidenza alla nascita di circa 1:2500, (Elsheikh *et al.*, 2002)] può essere conseguenza di una nondisgiunzione o della perdita del cromosoma X durante la gametogenesi e dà origine a una femmina sterile.

Il mosaicismo (la presenza di due o più linee cellulari geneticamente diverse originate da un singolo zigote) 45,X/46,XY si verifica in seguito alla perdita, durante lo sviluppo embrionale, di un cromosoma Y. Altre volte, una linea cellulare 45,X è invece affiancata ad un'altra linea cellulare nella quale è presente un cromosoma Y anomalo, spesso un isocromosoma del braccio lungo o del braccio corto, [46,X,i(Yp)] oppure [46,X,i(Yq)]. Il fenotipo gonadico e anatomico associato a questa condizione è estremamente variabile, tra il maschio ipofertile o sterile (quando prevale la linea 46,XY) e la sindrome di Turner (quando prevale la linea 45,X), con quadri intermedi di disgenesia gonadica e ambiguità dei genitali (DiNapoli and Capel, 2008).

L'anomalia della determinazione del sesso cromosomico che può dare origine ad ermafroditismo vero è il chimerismo (la presenza, in uno stesso individuo, di due linee cellulari originate da due zigoti) dei cromosomi sessuali. Il complemento sessuale 46,XX/46,XY origina dalla doppia fecondazione di un ovulo binucleato o dalla fusione di due zigoti indipendentemente fecondati. La diagnosi di DSS ovotesticolare (anche conosciuto come "ermafroditismo vero") richiede la presenza sia di tessuto ovarico



(contenete follicoli) sia testicolare, in forma separata oppure, più frequentemente, nella stessa gonade (*ovotestis*). L'ermafroditismo vero è una condizione estremamente rara, ed è stata riportata in circa 500 individui nel mondo. Sebbene il chimerismo 46,XX/46,XY è presente in una parte di questi pazienti, la maggior parte degli individui con assetto cromosomico 46,XX/46,XY non presenta questa condizione. La maggior parte dei pazienti con DSS ovotesticolare ha infatti un cariotipo 46,XX (Krob *et al.*, 1994) (vedi paragrafo 1.2.2). Gli ermafroditi veri hanno nei 2/3 dei casi genitali esterni di tipo maschile, nei restanti casi, genitali esterni ambigui o prevalentemente femminili. Il tessuto gonadico è localizzato in sede ovarica, inguinale o scrotale. In un *ovotestis*, maggiore è la quantità di tessuto testicolare, maggiore è la probabilità della sua discesa.

### 1.2.2) DSS del sesso gonadico

Difetti nello sviluppo sessuale possono manifestarsi anche come anomalie nella formazione della gonade indifferenziata o nella differenziazione di quest'ultima in testicolo (46,XY DSS) o in ovaio (46,XX DSS).

I difetti dello sviluppo testicolare possono avere un ampio spettro di fenotipi clinici. Le cause per queste anomalie sono da ricercarsi in alterazioni di geni, alcuni ben caratterizzati (*SFI*, *SRY*, *SOX9*, *WT1*) (Tab. 3), altri non ancora identificati: una diagnosi genetica viene raggiunta solo nel 20% dei casi di disgenesia testicolare 46,XY. Alcuni di questi fattori, espressi durante una fase precoce dell'embriogenesi, sono alla base di forme sindromiche di stati intersessuali. A seconda del gene in causa e del tipo di mutazione, può conseguire la completa assenza di differenziazione in senso maschile della gonade (disgenesia testicolare completa) o la sua parziale differenziazione in testicolo (disgenesia testicolare parziale). Nei casi più estremi la disgenesia testicolare completa è associata con una totale mancanza di androgenizzazione dei genitali esterni e persistenza delle strutture mülleriane dovute a un'insufficiente produzione di MIS/AMH. La condizione caratterizzata da cariotipo maschile 46,XY, fenotipo femminile e gonadi *streak*, con predisposizione allo sviluppo di gonadoblastoma, è anche denominata sindrome di Swyer, e nel 15-20% dei casi è dovuta alla delezione o alla mutazione puntiforme del gene *SRY*. La causa di questa condizione resta quindi sconosciuta nell'80% dei casi. La disgenesia testicolare parziale si associa invece, in un

soggetto con corredo cromosomico maschile, a una condizione di ambiguità dei genitali non accompagnata a deviato sviluppo della gonade.

Gene	Cytogenetic band	Protein type	Inheritance	Gonad	Müllerian structures	External genitalia	Other associated features	OMIM no.
SRY	Yp11.3	TF	Y	Dysgenetic testis or ovotestis	+/-	Female or ambiguous		480000
SOX9	17q24-25	TF	AD	Dysgenetic testis or ovotestis	+/-	Female or ambiguous	+ Campptometric dysplasia	608160
WT1	11p13	TF	AD	Dysgenetic testis	+/-	Female or ambiguous	Wilms' tumor, nephropaties, gonadoblastoma (WAGR, Denys-Drash and Frasier syndromes)	607102
SF1 (NR5A1)	9q33	TF (NR)	AD/AR	Dysgenetic testis	+/-	Female or ambiguous	+/- primary adrenal failure	184757
DHH	12q13.1	Signalling molecule	AD/AR	Dysgenetic testis	+	Female	+/- minifascicular neuropathy (1 case)	605423
ATRX	Xq13.3	Helicase	X	Dysgenetic testis	-	Female, ambiguous, or male	α-Thalassaemia, mental retardation	300032
ARX	Xp22.13	TF	X	Dysgenetic testis	-	Ambiguous	+ lissencephaly, epilepsy, temperature instability	300382

Candidate gene	Cytogenetic band	Protein	Inheritance	Gonad	Müllerian structures	External genitalia	Other associated features	OMIM no.
DAX1 (NR0B1)	Xp21	TF (NR)	Dupl Xp21	Dysgenetic testis or ovary	+/-	Female or ambiguous		300018
DMRTs	9p24.3	TF	Del 9p24.3 Reduced penetrance	Dysgenetic testis Normal testis	+/-	Female or ambiguous	Mental retardation	602424
WNT4	1p35	Signalling molecule	Dupl 1p35	Dysgenetic testis	+	Ambiguous	Mental retardation	603490

Tab. 3: **Geni (lato sinistro) e riarrangiamenti cromosomici (lato destro) coinvolti nei DSS gonadici 46,XY** (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

I difetti dello sviluppo ovarico non si manifestano di solito fino alla pubertà, quando diventa evidente il fallimento del processo di estrogenizzazione. La disgenesia ovarica è più frequentemente associata a una condizione di aneuploidia dei cromosomi sessuali (Sindrome di Turner; 45,X e sue varianti) caratterizzata da apoptosi ovarica progressiva. Mutazioni nel recettore FSH (recettore per l'ormone follicolo stimolante) sono causa di alcune forme di resistenza gonadica che si manifestano alla pubertà.

Raramente, l'ovaio in sviluppo può contenere strutture di tessuto testicolare (46,XX DSS ovotesticolare o "vero ermafroditismo") o può addirittura svilupparsi come testicolo funzionante (46,XX DSS testicolare o "maschio 46,XX").

La patologia "maschio 46,XX" è una delle forme più rare di DSS, con un'incidenza di 1:20.000-30.000 nati vivi (McElreavey *et al.*, 1995). Fu riportata per la prima volta nel 1964 con il nome di "sindrome de la Chapelle" (de la Chapelle *et al.*, 1964). I maschi XX mostrano normalmente un fenotipo maschile normale, e l'assenza di strutture mülleriane (de la Chapelle, 1981). Un'alta percentuale dei casi (80-85%) è dovuta alla traslocazione della porzione del cromosoma Y contenete il gene *SRY* sul cromosoma X o su un altro autosoma durante la meiosi paterna (Fechner *et al.*, 1993; Kolon *et al.*, 1998; Page *et al.*, 1987). Casi di DSS testicolare 46,XX *SRY* indipendenti sono estremamente rari (approssimativamente 1:200000 nati vivi), con alcuni casi familiari.

Ancora più raramente le strutture gonadiche in un individuo 46,XX possono differenziarsi sia in strutture ovariche sia testicolari (DSS ovotesticolare 46,XX). Come discusso nel paragrafo precedente, sono possibili diversi *pattern* gonadici: *a*) un ovaio da un lato e un testicolo dall'altro (30-40%), *b*) un ovotestis unilaterale e un ovaio dall'altro lato (30-40%), *c*) ovotestis bilaterale (20%) (van Niekerk and Retief, 1981). Questa patologia è rara in Europa, in Sud e Nord America, ma in Africa è presente con una maggiore frequenza (Guerra *et al.*, 1998). La maggior parte dei pazienti riportati ha un cariotipo 46,XX (71%), più raramente si riscontra un cariotipo a mosaico 46,XX/46,XY (20%). Il DSS ovotesticolare associato a un cariotipo 46,XY è raro (7%) e può rappresentare un mosaicismo gonadico criptico per un cromosoma Y deleto o con mutazioni a carico di *SRY* (Hadjiathanasiou *et al.*, 1994; Krob *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 2000). Il neonato presenta generalmente genitali ambigui alla nascita e progressiva virilizzazione alla pubertà (Torres *et al.*, 1996). Gli eventi molecolari che portano a questa condizione sono ancora poco conosciuti e, al contrario dei casi di DSS testicolare 46,XX, solo il 10% dei casi di 46,XX DSS ovotesticolare possono essere attribuiti alla

traslocazione di *SRY* su un altro cromosoma (Berkovitz *et al.*, 1992; Boucekkine *et al.*, 1994; Damiani *et al.*, 1997; McElreavey *et al.*, 1992). Nel restante 90% dei pazienti l'eziologia resta indefinita ed è stata proposta l'implicazione di nuovi loci sconosciuti, autosomici o sul cromosoma X (McElreavey *et al.*, 1993; Ramsay *et al.*, 1988; Slaney *et al.*, 1998) (Tab. 4).

Gene	Cytogenetic band	Protein type	Inheritance	Gonad	Müllerian structures	External genitalia	Other associated features	OMIM no.
<i>SRY</i>	Yp11.3	TF	Translocation	Testis or ovotestis	-	Male or ambiguous	Infertility	480000
<i>SOX9</i>	17q24	TF	Dup17q24	Not investigated	-	Male or ambiguous		608160
<i>RSP01</i>	1p34.3	Signalling molecules	AR	Testis or ovotestis	-	Male	+ palmoplantar hyperkeratosis and predisposition to squamous cell carcinoma of the skin. +/- congenital bilateral corneal opacities, onychodystrophy, and hearing impairment	609595

Tab. 4: **Geni coinvolti nei DSS gonadici 46,XX con sviluppo testicolare** (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

### 1.2.3) DSS del sesso fenotipico

#### ➤ IN SOGGETTI CON SESSO CROMOSOMICO MASCHILE

Rientrano in questo gruppo di patologie tutti gli stati intersessuali presenti nei soggetti a corredo cromosomico maschile normale (46,XY), nei quali è avvenuta una normale differenziazione del testicolo, ma uno sviluppo ambiguo o di tipo femminile dei genitali esterni, del seno urogenitale e/o un'incompleta formazione dei dotti genitali maschili a causa di un'incompleta virilizzazione in utero (46,XY DSS o "pseudoermafroditismo maschile non disgenetico"). Quelli che venivano denominati "pseudoermafroditismi maschili non disgenetici" rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie causate da:

- a) alterazioni in geni coinvolti nella steroidogenesi surrenalica e testicolare che causano difetti nella sintesi del testosterone (*StAR*, *CYP11A*, *HSD3B2*, *CYP17*);
- b) difetti nel metabolismo del testosterone che bloccano la conversione del testosterone in diidrotestosterone (*SRD5A2*);
- c) difetti nell'azione degli androgeni dovuti a una completa o parziale insensibilità agli androgeni (*AR*).

In Tabella 5 sono riassunti schematicamente i geni più importanti implicati nei casi di DSS 46,XY, attualmente conosciuti.

Gene	Cytogenetic band	Protein type	Inheritance	Gonad	Müllerian Structures	External genitalia	Other associated features	OMIM no.
LHCGR	2p21	G-protein receptor	AR	Testis, Leydig cell hypoplasia	-	Female, ambiguous, or micropenis		152790
STAR	8p11.2	Shuttle protein in the mitochondrial membrane	AR	Testis	-	Female	Congenital lipoid adrenal hyperplasia, primary adrenal failure	600617
CYP11A1	15q23-24	Enzyme	AR	Testis	-	Female or ambiguous	adrenal failure, pubertal failure	118485
CYP17	10q24.3	Enzyme	AR	Testis	-	Female, ambiguous, or micropenis	CAH, +/- hypertension Hypocortisolism, pubertal failure	202110
HSD3B2	1p13.1	Enzyme	AR	Testis	-	Female or ambiguous	CAH, primary adrenal failure	201810
HSD17B3	9q22	Enzyme	AR	Testis	-	Female or ambiguous	Partial androgenisation at puberty	605573
SRD5A2	2p23	Enzyme	AR	Testis	-	Female, ambiguous or micropenis	Partial androgenisation at puberty	607306
POR	7q11.2	CYP electron donor	AR	Testis	-	Male or ambiguous	Mixed features of 21-hydroxylase deficiency, 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and aromatase deficiency; +/- Antley Bixler skeletal manifestations	124015
DHCR7	11q12-13	Enzyme	AR	Testis	-	Variable	Smith-Lemli-Opitz syndrome: coarse facies, second-third toe syndactyly, failure to thrive, developmental delay, cardiac and visceral abnormalities	602858
AR	Xq11-12	TF (NR)	X	Testis	-	Female, ambiguous, micropenis or normal male	CAIS, PAIS, MAIS (infertility)	313700

Tab. 5: **Geni coinvolti nei DSS 46,XY dovuti a difetti nella sintesi o nell'azione degli ormoni** (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

➤ IN SOGGETTI CON SESSO CROMOSOMICO FEMMINILE

Poiché lo sviluppo in senso femminile dei genitali interni ed esterni avviene indipendentemente dalla presenza dell'ovaio, in individui con complemento cromosomico femminile, in cui siano presenti alterazioni strutturali o aneuploidie del cromosoma X, la differenziazione sessuale avviene normalmente. Alterazioni durante la fase della differenziazione del sesso fenotipico in senso femminile sono causate da un eccesso di androgeni. Questo eccesso può essere conseguenza dell'azione di androgeni a produzione extragonadica che provocano un'abnorme mascolinizzazione dei genitali. Le anomalie più frequenti sono legate a difetti enzimatici della sintesi degli ormoni surrenalici. Tumori materni secernenti o assunzione materna di steroidi possono causare, anche se raramente, condizioni di DSS 46,XX ("pseudoermafroditismo femminile"). Le iperplasie surrenaliche congenite (CAH) o sindromi adrenogenitali (AGS) sono un gruppo di patologie genetiche autosomiche recessive, che contribuiscono al 50% circa dei casi di DSS 46,XX. Il gene *CYP21A2*, localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, codifica per l'enzima 21-idrossilasi, che catalizza la conversione del progesterone a desossicorticosterone nella via metabolica dell'aldosterone e del 17-OH-progesterone a 11-deossicortisolo nella via biosintetica del cortisolo. Questo gene risulta mutato nel 90% circa dei pazienti con CAH.

Gene	Cytogenetic band	Protein type	Inheritance	Gonad	Müllerian structures	External genitalia	Other associated features	OMIM no.
HSD3B2	1p13	Enzyme	AR	Ovary	+	Female or ambiguous	CAH, primary adrenal failure, partial androgenisation	201810
CYP21A2	6p21-23	Enzyme	AR	Ovary	+	Female or ambiguous	CAH, +/- adrenal failure	201910
CYP11B1	8q21-22	Enzyme	AR	Ovary	+	Female or ambiguous	CAH, hypertension	202010
POR	7q11.2	CYP electron donor	AR	Ovary	+	Female or ambiguous	Mixed features of 21-hydroxylase deficiency, 17-hydroxylase/17,20-lyase deficiency and aromatase deficiency; Antley Bixler skeletal manifestations	124015
CYP19	15q21	Enzyme	AR	Ovary	+	Ambiguous	Maternal androgenisation during pregnancy, absent breast development at puberty, except in partial cases	107910

Tab. 6: Geni coinvolti nei DSS 46,XX dovuti a eccesso di androgeni (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).



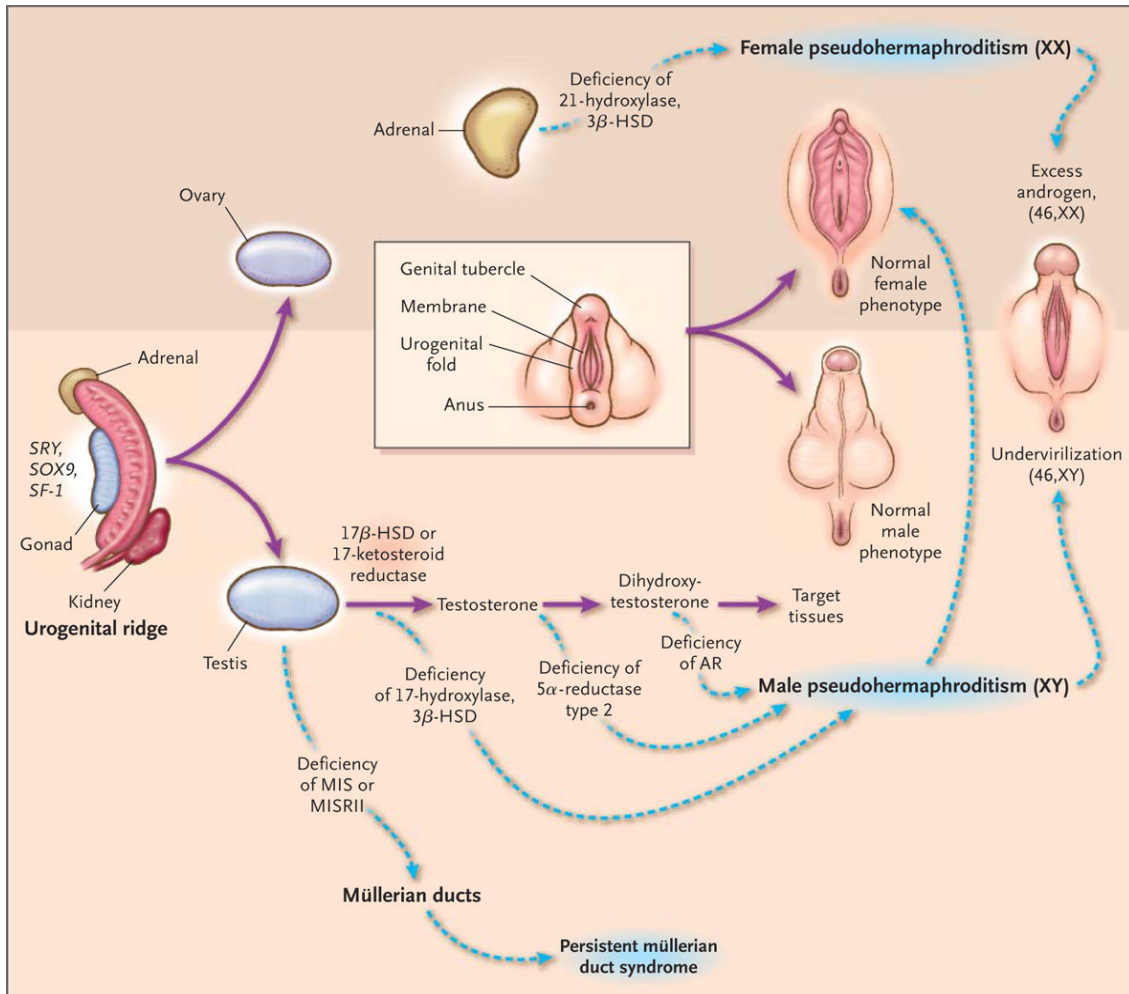


Fig. 6: **Anomalie funzionali della sintesi e dell'azione degli ormoni.** Dopo la completa formazione delle gonadi, una riduzione dell'attività ormonale o dei recettori specifici del segnale può causare delle anomalie nella funzionalità del sistema riproduttivo, quali la sindrome della persistenza del dotto Mülleriano, lo pseudoermafroditismo maschile, che causa una ridotta virilizzazione, e l'agenesia Mülleriana. In seguito allo sviluppo del surrene, una ridotta attività enzimatica può portare, invece, allo pseudoermafroditismo femminile con una eccessiva virilizzazione (modificato da MacLaughlin and Donahoe, 2004).

### 1.3) La genetica della determinazione e differenziazione sessuale

Lo sviluppo sessuale è sotto stretto controllo genetico e vede, nella sua attuazione, l'interazione di molti geni, ad espressione quantitativamente e qualitativamente dimorfica, grazie ad un raffinato e complesso controllo nella regolazione dell'espressione genica. Geni importanti per lo sviluppo gonadico umano sono stati inizialmente identificati studiando i difetti cromosomici in pazienti con DSS e i processi

della determinazione sessuale in modelli animali, in particolare in quello murino. Dopo l'identificazione nel 1990 del gene *SRY*, quale "fattore della determinazione sessuale" nei mammiferi, sono stati compiuti importanti progressi scientifici che hanno permesso l'identificazione di un numero consistente di geni che partecipano sia alle fase iniziali sia a quelle tardive del processo di determinazione e differenziazione sessuale. Inoltre, nuovi geni candidati continuano ad emergere, permettendo di far luce su alcuni dei meccanismi molecolari che sottendono la determinazione e la differenziazione del sesso. Nonostante ciò, la cascata di segnali regolatori non è stata ancora del tutto chiarita e molti dei fattori genetici implicati rimangono ancora sconosciuti. In Figura 7 sono riassunti schematicamente i fattori genetici implicati nelle diverse fasi dello sviluppo sessuale.

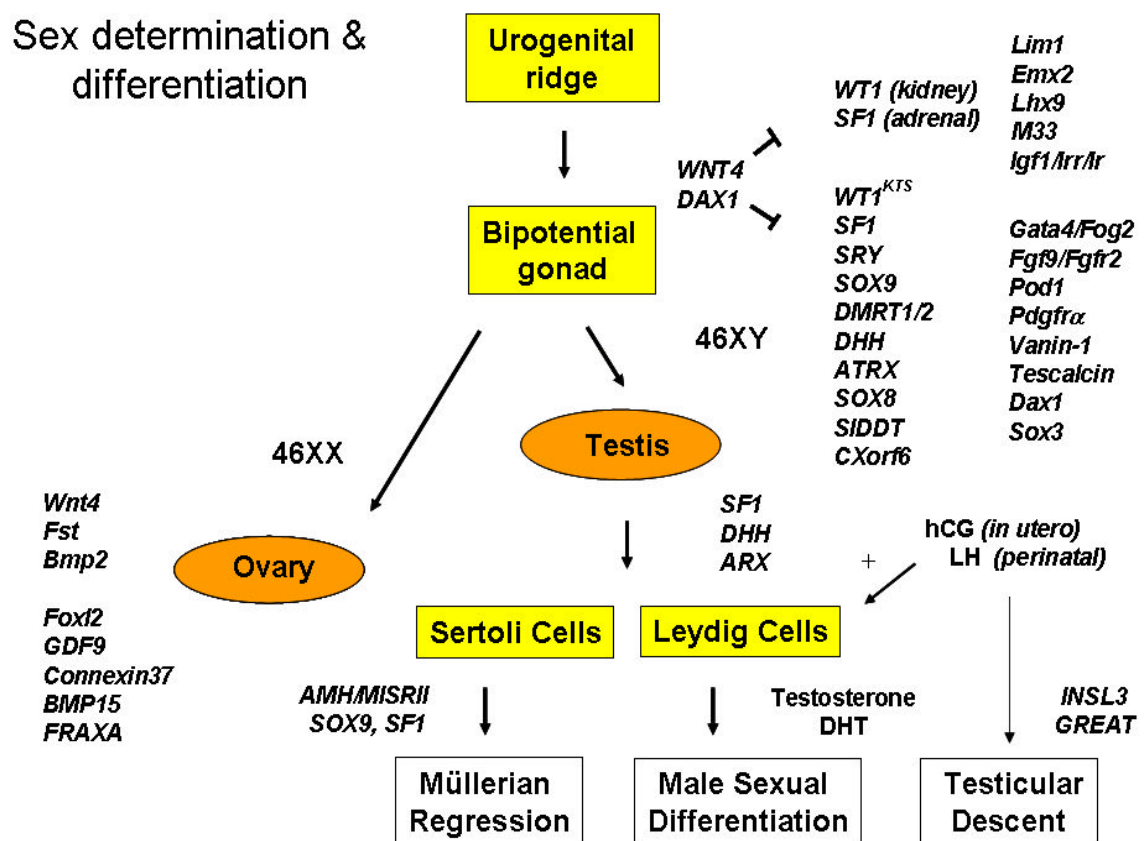


Fig. 7: Schema riassuntivo dei maggiori eventi e geni implicati nello sviluppo sessuale (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

### 1.3.1) Promotori specifici dello sviluppo testicolare

#### *SF1*

Il fattore steroidogenico 1 (SF1/Ad4BP, *NR5A1*) (9q33) è un membro della superfamiglia di recettori nucleari che regola la trascrizione di almeno 30 geni coinvolti nello sviluppo gonadico e adrenale, nella steroidogenesi e nella riproduzione (Parker *et al.*, 2002). Studi riguardanti l'espressione di SF1 nel topo hanno mostrato che Sf1 è presente, durante lo sviluppo embrionale, nelle regioni associate a funzioni endocrine, come le gonadi, le ghiandole surrenali, la ghiandola pituitaria e l'ipotalamo (Hatano *et al.*, 1994; Ingraham *et al.*, 1994; Morohashi *et al.*, 1994). SF1 svolge sicuramente un ruolo nella differenziazione delle gonadi, in quanto la sua espressione nelle gonadi primordiali assume caratteristiche dimorfiche, nel maschio e nella femmina, in corrispondenza con la divergenza dello sviluppo del testicolo da quello dell'ovaio. Inoltre *SF1* agisce a stadi più tardivi dello sviluppo del testicolo nel controllo delle vie di sintesi degli androgeni nelle cellule di Leydig e nell'attivazione di AMH nelle cellule del Sertoli. Topi di entrambi i sessi in cui sono state indotte mutazioni che aboliscono completamente l'espressione del gene nascono con genitali interni ed esterni femminili, sono privi di ghiandole surrenali e di gonadi e muoiono poco dopo la nascita; la cresta urogenitale dei topi mutati sembra svilupparsi correttamente e le gonadi vengono colonizzate dalle cellule germinali, ma, sia le gonadi sia le ghiandole surrenali, degenerano andando incontro ad apoptosi intorno all'undicesimo giorno *post coitum* (Luo *et al.*, 1994). Mutazioni in *SF1* nell'uomo, che causano difetti nel legame con il DNA, sono state riportate per la prima volta in 2 individui 46,XY con genitali esterni femminili, strutture Mülleriane persistenti e ipoplasia del surrene (Achermann *et al.*, 1999). Si tratta pertanto di un gene importante nella formazione delle gonadi e del surrene (Wilhelm *et al.*, 2007). Più recentemente un numero di mutazioni in eterozigosi nonsense, missenso e di *frameshift* sono state riportate nel gene *SF1* in associazione con DSS 46,XY (Lin *et al.*, 2007).

L'interruzione precoce dello sviluppo delle gonadi nei topi nullisomici per *Sf1* fa supporre che *Sf1* possa agire a monte di *SRY*. Inoltre, poiché *Sf1* continua ad essere espresso anche quando l'mRNA di *SRY* scompare e poiché è stato dimostrato, in esperimenti di *binding* in vitro (Shen *et al.*, 1994), che SF1 può legarsi ad una sequenza del promotore dell'ormone anti-Mülleriano, è stato ipotizzato che SF1 possa essere un

candidato al ruolo di intermediario tra SRY e AMH e possa quindi intervenire in almeno due momenti dello sviluppo.

### ***WT1***

Il gene *WT1* (*Wilms' Tumor-related Gene-1*), un importante fattore di trascrizione critico per la formazione dei reni e delle gonadi, è espresso durante lo sviluppo precoce della cresta urogenitale. L'espressione, in seguito, risulta confinata alle sole cellule del Sertoli e della granulosa dopo la determinazione del sesso (Armstrong *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 1992). Il gene *WT1* è stato isolato come gene oncosoppressore associato ad un tipo di tumore infantile del rene. Il gene è stato mappato sul cromosoma 11p13 grazie allo studio di pazienti con delezioni del braccio corto del cromosoma 11 associate a sindrome di WAGR (tumore di *Wilms*, aniridia, anomalie del tratto genitourinario, gonadoblastoma e ritardo mentale) (Fischbach *et al.*, 2005). Si pensa che questa complessa associazione fenotipica sia la conseguenza dell'aploinsufficienza di *WT1*, oltre che della perdita del gene *PAX6*, importante per lo sviluppo dell'occhio, e di quella di altri due geni, situati nella stessa regione, che sono espressi nel cervello dell'embrione. Mutazioni in *WT1* sono state identificate anche in pazienti affetti da sindrome di Denys-Drash (Denys *et al.*, 1967; Drash *et al.*, 1970), caratterizzata da tumore di *Wilms*, anomalie renali e urogenitali e disgenesia gonadica (Pelletier *et al.*, 1991). La maggior parte dei pazienti 46,XY affetti da sindrome di Denys-Drash presenta, oltre ad una precoce nefropatia, genitali ambigui e gradi variabili di disgenesia testicolare o DSS ovotesticolare. Altre mutazioni in *WT1* causano la sindrome di Frasier, caratterizzata da nefropatia ad insorgenza tardiva, disgenesia gonadica XY, in assenza del tumore di *Wilms*, ma in presenza di un tumore gonadico (gonadoblastoma). Le femmine XX mutate nel gene *WT1* mostrano, di solito, solo la patologia renale (Wilhelm *et al.*, 2007; Zanaria *et al.*, 1994).

Il gene *WT1* codifica per una proteina nucleare con quattro domini *zinc-finger*, che viene espressa come 4 isoforme principali, derivate da eventi di *splicing* alternativo dell'esone 5 e dall'inserzione di tre aminoacidi [+KTS e -KTS: lisina (K), treonina (T) e serina (S)] codificati all'estremità 3' dell'esone 9 (Haber *et al.*, 1991). Sono inoltre state descritte numerose altre isoforme (almeno 24), che usano come inizio di traduzione anche codoni diversi da "AUG".

Nella sindrome di Frasier si verificano mutazioni nel sito di *splicing* dell'esone 9 che causano uno sbilanciamento delle isoforme WT1 +/-KTS. Le gonadi risultanti presentano una diminuita produzione di SRY e del fattore MIS, fondamentali per lo sviluppo del testicolo (Teixeira *et al.*, 2001). Questi dati fanno supporre che l'isoforma WT1 +KTS debba essere sintetizzata contemporaneamente, o addirittura precedentemente, alla sintesi di SRY, che indurrà poi la differenziazione gonadica. I pazienti affetti dalla sindrome di Denys-Drash, che comporta una differenziazione gonadica più completa e un difetto di funzionalità meno grave rispetto a quelli associati alla sindrome di Frasier, presentano invece mutazioni che cadono fuori dalla regione KTS: ad esempio, le gonadi maschili sono sufficientemente sviluppate da produrre ormone anti-Mülleriano, ma la sintesi di testosterone risulta compromessa. Hammes e collaboratori hanno dimostrato che l'alterazione dell'espressione di KTS nel topo influenza sia la funzione renale che quella testicolare (Hammes *et al.*, 2001). Topi mancanti dell'isoforma -KTS presentano gonadi *streak* in entrambi i sessi, a sottolineare il fatto che questa isoforma è necessaria per la sopravvivenza della gonade bipotente. Topi che mancano solo dell'isoforma +KTS mostrano un completo *sex reverse XY* causato da una drammatica riduzione dell'espressione di *Sry*, mentre lo sviluppo ovarico risulta non compromesso.

Il gene *WT1* agisce quindi come regolatore della trascrizione (Wilhelm *et al.*, 2007).

### ***SRY***

Sin dal 1959 è noto che nei mammiferi il cromosoma Y contiene un gene determinante per lo sviluppo del testicolo (TDF). Lo studio di pazienti con aneuploidie dei cromosomi sessuali ha dimostrato che la presenza di un cromosoma Y è necessaria per la determinazione del sesso gonadico in senso maschile. In seguito, mediante l'analisi del fenotipo associato a vari tipi di riarrangiamenti cromosomici, è stato possibile circoscrivere la minima porzione del cromosoma Y necessaria per il differenziamento testicolare. Un'alta percentuale dei casi di DSS testicolare 46,XX ("maschio 46,XX") è dovuta alla traslocazione di TDF sul cromosoma X a causa di una non corretta ricombinazione X-Y durante la meiosi maschile. Le femmine normalmente presentano una coppia di cromosomi X che possono ricombinare durante la meiosi lungo la loro intera lunghezza, in modo simile a quanto accade per gli autosomi; nei maschi la ricombinazione tra i cromosomi X e Y è ristretta a particolari regioni di omologia (PAR,

regioni pseudoautosomiche). In circostanze anomale, l'appaiamento può estendersi alle regioni adiacenti non omologhe e può verificarsi uno scambio non appropriato che trasferisce DNA specifico del cromosoma Y sul cromosoma X (Wilhelm *et al.*, 2007). Nel 1990 il gene che codifica per il fattore determinante lo sviluppo del testicolo è stato mappato e identificato nell'uomo in seguito all'analisi di quattro "maschi 46,XX", che portavano circa 60 kb di DNA proveniente dal cromosoma Y (Sinclair *et al.*, 1990). Il gene umano è stato chiamato *SRY* (*Sex determining Region of the Y chromosome*) e mappa in Yp11.3. In seguito, sono state trovate mutazioni in *SRY* in pazienti 46,XY con disgenesia gonadica (Berta *et al.*, 1990); inoltre è stato mostrato come topi XX transgenici per *Sry* hanno uno sviluppo sessuale maschile (Koopman *et al.*, 1991).

Questo gene, al quale è stato attribuito il ruolo di interruttore molecolare dello sviluppo testicolare, è stato trovato in tutti i mammiferi finora esaminati e si presenta molto conservato. Sia nell'uomo sia nel topo, l'espressione di *SRY* avviene poco prima della differenziazione della gonade bipotente in testicolo (Hanley *et al.*, 2000). La sequenza codificante (ORF, *Open Reading Frame*) di *SRY* è costituita da un singolo esone, codificante per una proteina nucleare di 204 amminoacidi caratterizzata dalla presenza di un dominio di legame al DNA di 79 amminoacidi conosciuto come HMG (*High Mobility Group*) (Fig. 8). Si pensa che la proteina si leghi alle regioni regolatorie di altri geni che intervengono nel differenziamento gonadico a valle di *SRY*, e nei confronti dei quali *SRY* svolgerebbe la funzione di regolatore trascrizionale (attivatore o repressore) (Capel, 1998).

Mutazioni missenso e nonsense sono state trovate lungo tutto il gene, sebbene con una maggiore frequenza nell'HMG-box (DiNapoli and Capel, 2008; Wilhelm *et al.*, 2007). I pazienti con mutazione in *SRY* presentano una disgenesia gonadica completa o, più raramente, parziale. Mutazioni in *SRY* sono state anche descritte in alcuni pazienti con DSS ovotesticolare 46,XY (Maier *et al.*, 2003). L'HMG-box contiene due segnali di localizzazione nucleare (NLS), che legano calmodulina e importina B (Harley *et al.*, 2003a): mutazioni in questi domini causano il mancato trasporto della proteina *SRY* nel nucleo, con conseguente disgenesia gonadica XY (Sim *et al.*, 2005).

Sebbene sia stato identificato più di 15 anni fa, il meccanismo di azione di *SRY* come fattore trascrizionale è ancora poco conosciuto, così come sono ancora da identificare la maggior parte dei suoi geni *target* e dei suoi geni regolatori. Alcuni studi suggeriscono che il livello di espressione di *SRY* debba raggiungere un certo valore soglia per indurre

la determinazione del sesso che quindi sarebbe altamente sensibile ad effetti dose. Infatti, in topi con una delezione della regione cromosomica compresa tra *SRY* e il centromero, l'espressione di *SRY* è più bassa ed è presente reversione del sesso (Nagamine *et al.*, 1999). *SRY* è in grado, attraverso il suo dominio HMG, di alterare la struttura della cromatina e regolare la trascrizione (Ferrari *et al.*, 1992). Alcuni potenziali bersagli di *SRY* sono stati identificati nei promotori di numerosi geni, tra cui *SOX9* (Kanai and Koopman, 1999).

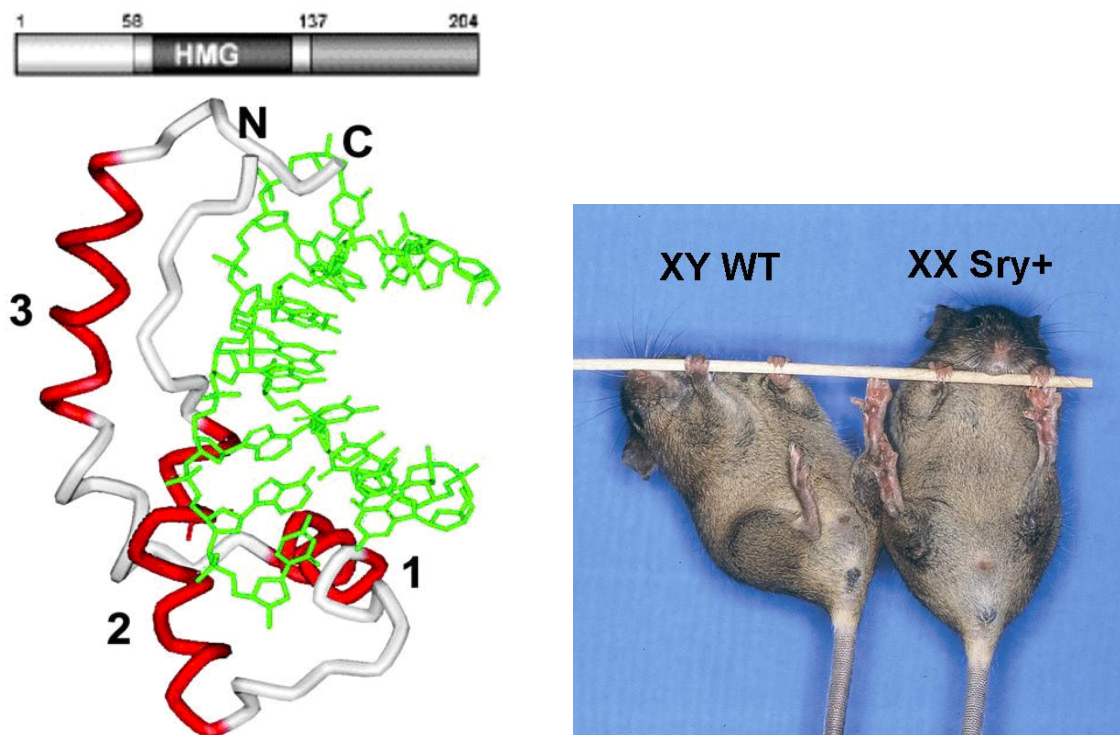


Fig. 8: **SRY**. *A*, Un modello della struttura della proteina SRY (*Sex determining Region of the Y chromosome*). Il dominio HMG (*High Mobility Group*) contiene 3  $\alpha$ -eliche (rosse) con una conformazione ad L. La proteina SRY lega il DNA (verde) in maniera sequenza-specifica attraverso questo dominio (modificato da Harley *et al.*, 2003b). *B*, Il topo XX, *Sry*<sup>+</sup> presenta sviluppo testicolare e fenotipo maschile, a dimostrazione che *Sry* è un gene per la determinazione testicolare (modificato da Kronenberg *et al.*, 2007).

### **SOX9**

Ulteriori geni, oltre a *SRY*, hanno mostrato di essere di grande rilevanza per lo sviluppo del testicolo. Molti di questi codificano per proteine solubili. Tra i geni identificati negli

ultimi anni, *SOX9*, probabile bersaglio di *SRY*, si è rilevato essenziale per la testicologenesi.

La *displasia campomelica* (CD), una malattia che determina gravi anomalie scheletriche e cartilaginee, si verifica in pazienti con mutazioni in eterozigosi in *SOX9* o riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione del gene *SOX9* (Wagner *et al.*, 1994). Tale patologia è associata, per pazienti 46,XY, ad una elevata incidenza (75%) di disgenesia gonadica completa o parziale (Foster *et al.*, 1994): è evidente quindi che *SOX9*, oltre ad avere un ruolo nella morfogenesi delle ossa, contribuisce allo sviluppo del testicolo.

Studi sul gene *Sox9* nel topo hanno mostrato che il livello di espressione si mantiene basso nelle creste genitali di entrambi i sessi durante i primi stadi di sviluppo della gonade; successivamente, a partire dal giorno 11.5 *post coitum*, si verifica un incremento dell'espressione nel maschio e una totale inibizione nella femmina. Dal giorno 12.5, subito dopo l'inizio dell'espressione di *Sry*, trascritti di *Sox9* sono evidenti nelle cellule del Sertoli, mentre sono del tutto assenti nell'ovaio (Kent *et al.*, 1996; Morais *et al.*, 1996).

Il gene *SOX9* (*SRY-Box 9*), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q24.3-q25.1), ha 3 esoni e codifica per un fattore che contiene un *HMG-box* altamente omologo (71%) a quello presente in *SRY*. La proteina SOX9, di 509 amminoacidi, è presente nel citoplasma delle cellule della cresta genitale di entrambi i sessi, ma nella gonade XY, in seguito all'espressione di *SRY*, viene fosforilata e traslocata nel nucleo dove regola l'espressione genica. Al contrario, nella gonade XX la localizzazione di SOX9 rimane citoplasmatica e la sua espressione si estingue. Per specificare la precisa funzione della proteina SOX9 nella gonade, sono stati effettuati studi su topi transgenici per *Sox9* (Vidal *et al.*, 2001). I topi transgenici XX sviluppano testicoli con cellule del Sertoli e cellule di Leydig apparentemente normali. Invece, topi XY *knockout* per *Sox9* mostrano assenza di differenziazione della gonade e mancata regressione dei dotti di Müller. Questi studi hanno fornito una spiegazione logica allo sviluppo di individui maschi con cariotipo 46,XX che presentano una duplicazione di *SOX9* (Huang *et al.*, 1999); inoltre, hanno suggerito che il gene *SOX9* possa sostituire *SRY* nell'indurre la differenziazione delle cellule del Sertoli, conferendo a *SRY* la sola funzione di regolatore positivo del gene *SOX9*. SOX9 insieme con SF1, è responsabile della regolazione dell'espressione del gene *AMH* che codifica per l'ormone anti-Mülleriano



(Wilhelm *et al.*, 2007). *SOX9* è anche espresso nelle cellule mesenchimali embrionali dove attiva il gene del collagene *COL2A1* e contribuisce alla loro differenziazione in condrociti.

Queste scoperte sono state utili nella costruzione di un *pathway* specifico per la determinazione sessuale maschile che prevede quindi un ruolo chiave di *SOX9*, espresso molto probabilmente a valle di *SRY*, il cui prodotto proteico risulta implicato nell'attivazione di altri due geni espressi nella gonade dei soggetti XY: *SFI* e *AMH* (Fig. 9).

### ***DHH***

*Desert hedgehog Homolog* (DHH), appartiene alla famiglia dei geni *hedgehog*, che producono molecole segnale importanti nelle fasi iniziali dello sviluppo. DHH è secreto dalle cellule del Sertoli, è coinvolto nella formazione dei cordoni testicolari ed è necessario per il differenziamento delle cellule di Leydig. DHH è la prima molecola segnale riportata come mutata in pazienti con disgenesia gonadica 46,XY (Canto *et al.*, 2004).

### ***FGF9***

Un altro fattore implicato nella specificazione delle cellule del Sertoli è codificato dal gene *FGF9* (*Fibroblast Growth Factor 9*), espresso in entrambe le gonadi XX e XY nella fase bipotente e solo nelle gonadi XY poco prima della differenziazione del testicolo. Topi omozigoti mutanti per *FGF9* mostrano una reversione del sesso XY, mentre la gonade femminile sviluppa normalmente. Nella gonade XY l'espressione di *SRY* determina l'*up*-regolazione di *SOX9*, che a sua volta attiva *FGF9*. *SOX9* e *FGF9* probabilmente formano un *loop* positivo per promuovere e mantenere la loro espressione durante la differenziazione maschile (Wilhelm *et al.*, 2007).

### ***ATRX***

Il gene *ATRX* (*Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked*) appartiene al gruppo di geni coinvolti nello sviluppo sessuale: mutazioni in *ATRX* sono causa di DSS, ma il suo ruolo preciso rimane poco conosciuto (Tang *et al.*, 2004). Mutazioni in *ATRX* sono associate alla sindrome ATRX, una condizione X-linked recessiva caratterizzata da ritardo mentale,  $\alpha$ -talassemia, bassa statura, microcefalia, facies caratteristica, ipotonia

muscolare, epilessia. Lo sviluppo genitale può essere compromesso in vario grado fino alla completa reversione del sesso. Il gene *ATRX*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq13.3), è lungo 300 kb e comprende 36 esoni. La proteina ha tre regioni principali: una N-terminale idrofilica contenente un motivo *zinc-finger*, una centrale con funzione di ATPasi e di elicasi e una C-terminale ricca in glutammine.

La funzione della proteina è quella di regolatore della trascrizione, attraverso il legame con il DNA e la maggior parte delle mutazioni è concentrata nella porzione del gene che codifica il motivo *zinc-finger*, mentre le mutazioni che causano la perdita del dominio C-terminale sono quelle che si associano al fenotipo con ambiguità genitale. *ATRX* è implicato nella differenziazione sessuale piuttosto che nella determinazione del sesso. L'iposviluppo dei genitali esterni nei pazienti *ATRX* e la disgenesia testicolare presente in alcuni soggetti, suggeriscono che il gene *ATRX* agisca sulla differenziazione sessuale precocemente, subito dopo l'indirizzamento della gonade indifferenziata verso il testicolo (Tang *et al.*, 2004).

### ***AMH***

Uno dei geni direttamente regolati da *SOX9* sembra essere *AMH*, un gene di 2,27 kb contenente 5 esoni, mappato in 19p13.3, avente un ruolo fondamentale nella differenziazione sessuale maschile. Il gene codifica per una glicoproteina (l'ormone anti-Mülleriano, AMH), secreta dalle cellule del Sertoli, responsabile della regressione dei dotti di Müller, caratteristici del sistema riproduttivo femminile (De Santa Barbara *et al.*, 1998). La sindrome dei dotti persistenti di Müller (PMDS) è una condizione nella quale maschi 46,XY hanno testicoli ben sviluppati e dotti e genitali esterni maschili normali, ma mantengono le strutture mülleriane. L'attivazione di *AMH* da parte di *SOX9* sembra coinvolgere altri co-fattori, anch'essi espressi nelle cellule del Sertoli durante la formazione del testicolo. Questi sono SF1, già regolato positivamente da *SOX9* in un momento precedente dello sviluppo testicolare, WT1 e GATA4 (De Santa Barbara *et al.*, 1998; Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay and Viger, 2001; Viger *et al.*, 1998). La regione del promotore di *AMH* contiene un sito di legame per Sfl e mutazioni in questo sito portano alla mancata espressione di AMH nei testicoli embrionali di topi transgenici, suggerendo che il ruolo di Sfl sia quello di legare il promotore di *AMH*, attivando di conseguenza la trascrizione del gene (Shen *et al.*, 1994). Il promotore di *AMH* contiene, inoltre, un sito di legame specifico per le proteine aventi un dominio

*HMG box* ed il candidato per il legame a questo sito sembra essere proprio Sox9. È stato ipotizzato che Sf1 e Sox9 svolgano un'azione sinergica nell'attivazione di AMH, contribuendo entrambi all'espressione tessuto-specifica dell'ormone anti-Mülleriano. Studi *in vitro* hanno dimostrato che anche l'azione di WT1 (in particolare l'isoforma -KTS) e quella di GATA4 sono necessarie per l'attivazione di AMH (Nachtigal *et al.*, 1998; Viger *et al.*, 1998) suggerendo l'ipotesi che queste proteine formino, insieme a Sox9 e a Sf1, un complesso multi proteico sul promotore di *AMH* ed agiscano di concerto per regolare l'espressione tessuto specifica di questo ormone (Fig. 9).

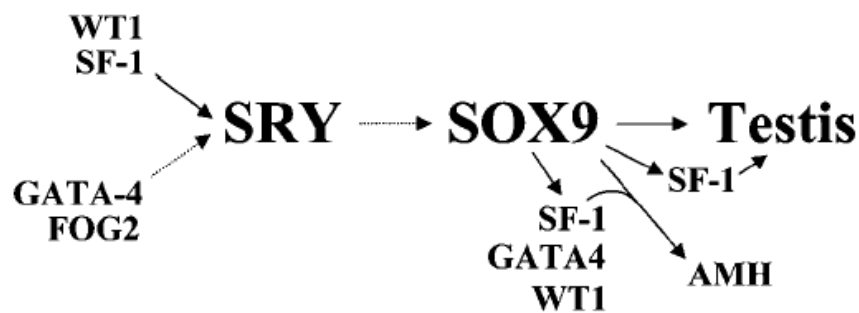


Fig. 9: **Rappresentazione schematica del *pathway* genetico della determinazione sessuale dei mammiferi, caratteristico della gonade maschile** (modificato da Knowler *et al.*, 2003).

### 1.3.2) Promotori specifici dello sviluppo ovarico

La scoperta che le gonadi indifferenziate, in assenza del cromosoma Y, o più in particolare del gene *SRY*, si sviluppano in ovaie ha portato a credere che solo lo sviluppo del testicolo sia un processo fondamentale attivo nella differenziazione delle gonadi. In realtà, come è stato messo in evidenza negli ultimi anni, anche il meccanismo di sviluppo dell'ovaio è caratterizzato da un attivo *pathway* genetico (Nef *et al.*, 2005).

#### ***DAX1***

Le duplicazioni della regione cromosomica Xp21 sono associate a un quadro clinico complesso che include dismorfismi facciali, ritardo mentale e *sex reversal XY*.

Mediante comparazione di più pazienti con riarrangiamenti cromosomici diversi in Xp, è stata individuata una regione minima in comune di 160 kb che, se duplicata, causa *sex reversal*. Questa regione contiene il gene *DAX1* (*Dosage sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenita, critical region of the X, gene 1*), ufficialmente chiamato *NR0B1*, poiché codifica per un recettore nucleare orfano.

Delezioni o mutazioni di *DAX1* in soggetti 46,XY causano ipoplasia adrenale congenita e ipogonadismo ipogonadotropico (Muscatelli *et al.*, 1994). Mentre sono stati riportati molti pazienti con mutazioni in *DAX1*, non è stato ancora identificato nessun paziente con una duplicazione isolata del gene. *DAX1* resta comunque il gene candidato per il *sex reversal*, tra quelli presenti nella regione “*dosage-sensitive sex reversal*” del locus Xp21, per diverse ragioni. La sua espressione durante lo sviluppo embrionale nel topo è compatibile con un suo ruolo sia nella determinazione sessuale, sia nella funzione ipotalamica e adrenale (Swain *et al.*, 1996). Diverse proprietà funzionali di *DAX1* sono consistenti con la sua abilità a inibire lo sviluppo gonadico se presente ad alte dosi. Il prodotto del gene *DAX1* è un recettore nucleare che esercita una azione di repressione sui geni coinvolti nella cascata dei segnali che inducono la differenziazione maschile. Il suo ruolo di gene “anti-testis” è stato supportato sia da studi *in vitro* sia mostrano come *DAX1* possa inibire SF1, causando una riduzione degli enzimi steroidogenici e dell’espressione di AMH, sia da studi sui topi, dove l’*over*-espressione di *Dax1* causa uno sviluppo maschile incompleto in presenza di un locus *Sry* “debole” (Swain *et al.*, 1998). Tuttavia, anche la delezione mirata di *Dax1* nello stesso ceppo murino causa sviluppo testicolare parziale o *ovotestis*, e pazienti con ipoplasia adrenale congenita *X-linked*, dovuta a mutazioni in *DAX1*, hanno un’architettura testicolare anormale e infertilità, suggerendo che dosi critiche di questo fattore hanno ruoli importanti. Quindi, sia l’ipoattività sia l’*over*-attività di *DAX1* hanno effetti deleteri a diversi stadi dello sviluppo gonadico (Meeks *et al.*, 2003).

#### ***WNT4***

Il gene *WNT4* (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*), localizzato sul braccio corto del cromosoma 1, appartiene ad una famiglia genica di fattori di crescita (WNT) attiva nella trasduzione del segnale, responsabili dei processi di sviluppo. *WNT4* è stata la prima molecola segnale identificata ad essere coinvolta nello sviluppo sessuale. *Wnt4* è espresso in entrambi i sessi nelle gonadi bipotenti, ma diventa

fortemente *up*-regolato nelle gonadi XX a partire dal giorno 11.5 *post coitum* (E11.5). Topi XX mutanti per *Wnt4* mostrano una parziale inversione del sesso (assenza di dotti Mülleriani, mascolinizzazione, presenza di dotti di Wolff, produzione di androgeni) (Vainio *et al.*, 1999), suggerendo che *WNT4* agisca per regolare positivamente la differenziazione ovarica.

Il gene *WNT4* è stato clonato nell'uomo nel 2001 da Jordan *et al.* (Jordan *et al.*, 2001), grazie alla caratterizzazione di pazienti con duplicazione 1p35 e un ampio spettro di DSS. Nell'uomo, la sua mutazione è stata associata ad una patologia rara caratterizzata da amenorrea primaria, assenza delle strutture mülleriane (utero e vagina) e agenesia monolaterale del rene (sindrome di Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser). *WNT4* sembra avere un ruolo cruciale nella via di determinazione ovarica, dove regola la formazione dei dotti di Müller, sopprimendo la produzione di testosterone nei precursori delle cellule di Leydig della cresta genitale e, probabilmente, supportando lo sviluppo degli oociti. Inoltre *WNT4* inibisce la formazione della vascolarizzazione maschio-specifica nell'ovaio (Wilhelm *et al.*, 2007). Un gene bersaglio di *WNT4*, che viene *up*-regolato mediante il *pathway* Wnt/ $\beta$ -catenina, è *DAX1* (Mizusaki *et al.*, 2003; Wieacker and Volleth, 2007). Questa ipotesi è supportata dal fatto che la disgenesia gonadica causata dalla duplicazione di *WNT4* presenta un fenotipo che ricorda quello presente nei pazienti che hanno la duplicazione di *DAX1*.

Riassumendo, i geni *WT1* e *SFI* agiscono in sinergia e sono essenziali nella regolazione dei primi stadi dello sviluppo della gonade indifferenziata (Fig. 10). Mutazioni con perdita di funzione in geni che codificano per questi fattori portano ad una degenerazione delle gonadi prima del periodo di determinazione del sesso.

Nella gonade XY, *SRY* normalmente inizia un *loop a feedback* positivo tra *SOX9* e *FGF9* che reprime *WNT4* per stabilire il *pathway* del testicolo (Kim Y. *et al.*, 2006; Wieacker and Volleth, 2007) e porta ad una nuova espressione di *WT1* e *SFI* (Fig. 10).

Nella gonade XX, l'espressione di *WNT4* e di *DAX1* viene *up*-regolata e il *loop* tra *SOX9* e *FGF9* viene bloccato (Fig. 11). La perdita di *WNT4* nelle gonadi XX è sufficiente per *up*-regolare *FGF9* e *SOX9* in assenza di *SRY*. I segnali opposti di *WNT4* e *FGF9* agiscono perciò come un ago della bilancia rispettivamente verso la differenziazione femminile o maschile; il ruolo di *SRY* è di inclinare il bilancio tra questi due segnali. Dal momento che il gene *SRY* non è presente in tutti gli organismi, il

segnale antagonista tra i fattori FGF e WNT potrebbe essere il meccanismo conservato che bilancia la gonade tra destino testicolare o ovarico nei vertebrati (Kim Y. *et al.*, 2006).

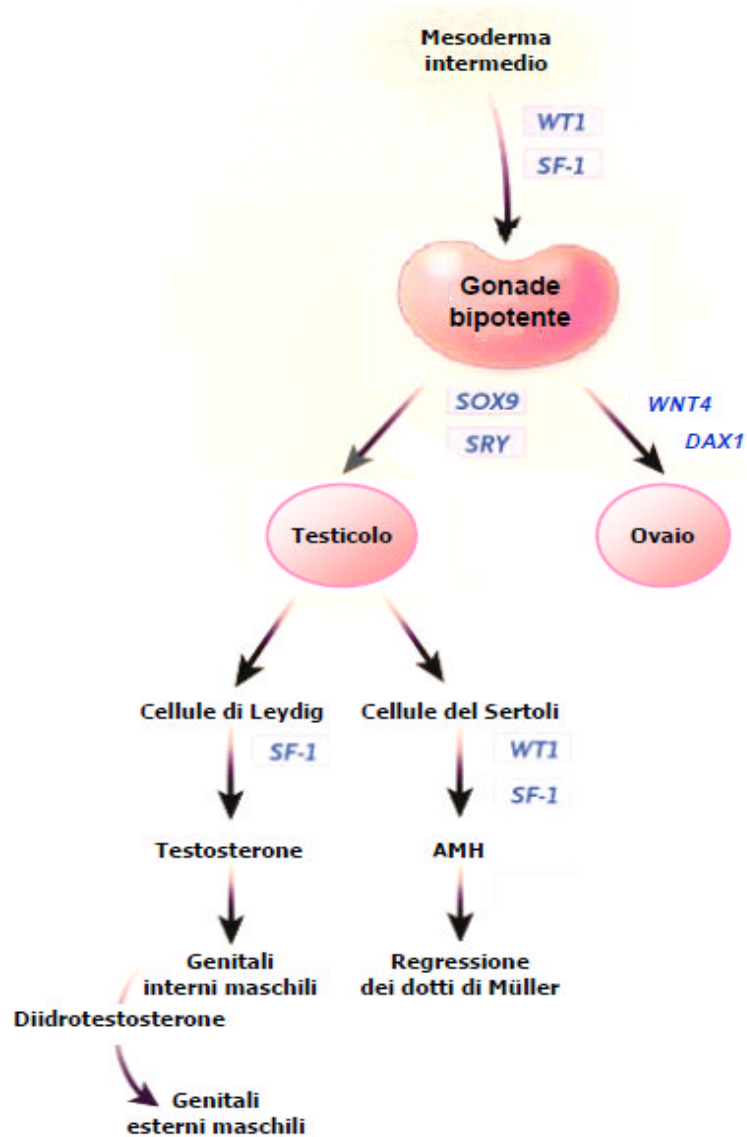


Fig. 10: **Pathway** molecolari che indirizzano lo sviluppo della gonade bipotente in testicolo o ovaio. Nello schema sono anche evidenziati i vari componenti che portano alla formazione dei genitali esterni maschili.

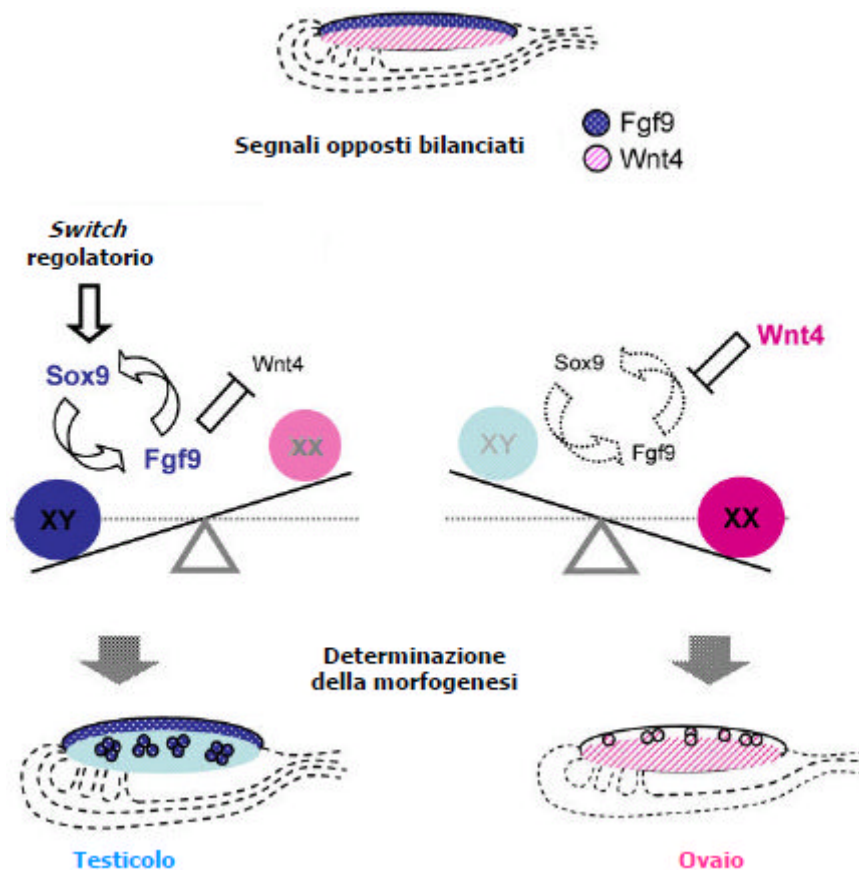


Fig. 11: **Segnali opposti regolano la determinazione del sesso nella gonade bipotente.** Un interruttore genetico o ambientale inizia il *pathway* maschile creando uno sbilanciamento tra segnali opposti attraverso l'*up*-regolazione di SOX9. SOX9 *up*-regola FGF9, che a sua volta mantiene l'espressione di SOX9, formando un *loop* positivo nelle gonadi XY. In assenza di un segnale positivo per il *loop* tra SOX9 e FGF9 (ad esempio nelle gonadi XX), WNT4 blocca FGF9 iniziando il *pathway* femminile (modificata da Kim Y. *et al.*, 2006).

#### 1.4) R-spondina1

Per molto tempo si è pensato che la differenziazione sessuale maschile fosse un processo attivo e dominante, indotto solo in presenza del gene *SRY*, il quale determina poi la secrezione di specifici ormoni, e che la differenziazione sessuale femminile fosse un processo passivo, uno stato di *default* che si stabilisce in assenza di *SRY* (Wilhelm *et al.*, 2007). Successivamente questa visione è stata modificata, anche in seguito alla scoperta di individui 46,XX che si sviluppano in senso maschile in assenza di *SRY*. L'esistenza di questi individui ha fatto ipotizzare che *SRY* possa agire da repressore

dell'attività di un fattore (Z), collocato probabilmente all'inizio del *pathway* specifico per la differenziazione testicolare, che a sua volta funge da repressore dello sviluppo in senso maschile. Perciò, individui 46,XX che presentano una mutazione in Z sarebbero in grado di annullare la repressione dell'intera cascata di eventi tipica dello sviluppo maschile, anche in assenza del gene *SRY* (Eicher and Washburn, 1986; Goodfellow and Lovell-Badge, 1993; Jimenez *et al.*, 1996; McElreavey *et al.*, 1993).

R-spondina1 dovrebbe ora essere aggiunto alla lista dei geni coinvolti nella determinazione gonadica, quale fattore che contribuisce indirettamente alla differenziazione ovarica, agendo presumibilmente come antagonista dello sviluppo della gonade in testicolo, nei soggetti a cariotipo femminile. Il gene *RSPO1* [*R-spondin homolog (Xenopus laevis); roof plate-specific spondin*], codificante per la proteina R-spondina1, è il primo gene identificato che, se mutato, porta allo sviluppo maschile in soggetti 46,XX in assenza di *SRY*. Il gene è stato identificato mediante analisi di *linkage* in una larga famiglia con una sindrome caratterizzata da DSS testicolare 46,XX, ipercheratosi palmo plantare e predisposizione a carcinoma di cellule squamose della pelle. E' stato il 90° gene sequenziato in una regione candidata di 15 Mb (Parma *et al.*, 2006).

RSPO1 è un membro delle R-spondine (1, 2, 3, 4), una piccola famiglia di fattori di crescita che attivano il segnale delle  $\beta$ -catenine mediante il *pathway* Wnt. La struttura dei 4 paraloghi è molto simile: tutte le R-spondine contengono un peptide segnale (PS) nella regione N-terminale (codificato da parte dell'esone 4), due domini furinici (FU) ricchi di cisteine (codificati dagli esoni 5 e 6), un dominio trombospondinico (TSP-1) (codificato dall'esone 7) e un putativo segnale di localizzazione nucleare (NLS) (codificato dall'esone 8) in una regione ricca di amminoacidi carichi positivamente, all'estremità C-terminale (Fig. 12). È inoltre presente un potenziale sito di N-glicosilazione in corrispondenza dell'amminoacido Asparagina in posizione 137 (Kim K.A. *et al.*, 2006; Kamata *et al.*, 2004).



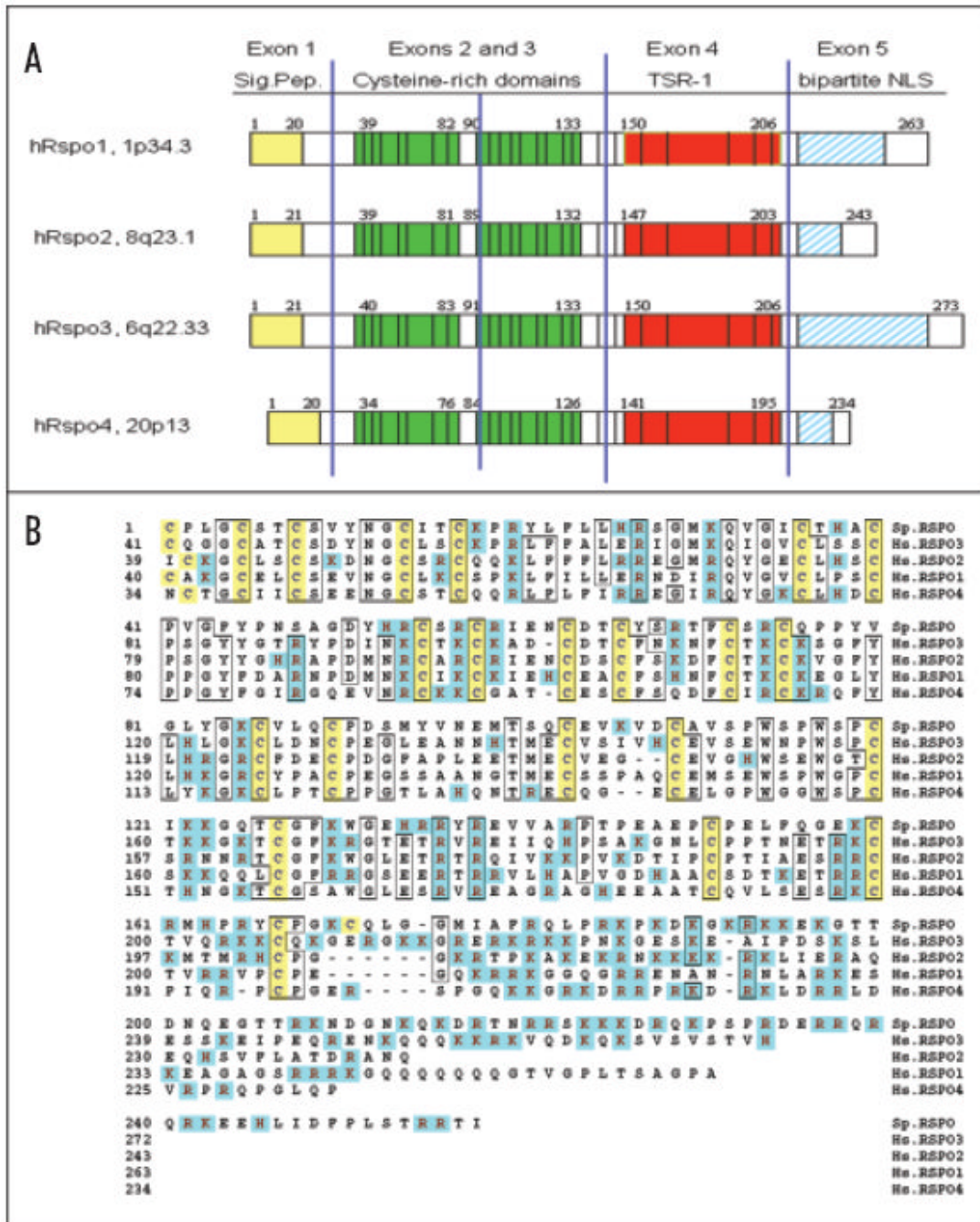


Fig. 12: **A, Organizzazione degli esoni e dei domini strutturali delle R-spondine umane.** I quattro geni codificanti per le R-spondine mostrano una comune organizzazione, costituita da cinque esoni codificanti (4-5-6-7-8) corrispondenti a specifici domini strutturali: un peptide segnale (PS), due domini furinici ricchi in Cisteina (FU1 e FU2), un dominio trombospondinico di tipo 1 (TSP-1) e una regione basica C-terminale che agisce da segnale di localizzazione nucleare (NLS). I residui di Cisteina conservati sono indicati da linee verticali nere.

**B, Allineamento delle R-spondine.** Le quattro proteine Rspo umane (Hs) sono comparate alla proteina dell'invertebrato *S. purpuratus* (Sp). I residui racchiusi in un riquadro sono conservati in quattro delle cinque sequenze, le Cisteine (in giallo) e i residui carichi basici (in blu) sono conservati in almeno tre delle cinque sequenze (modificato da Kim K.A. *et al.*, 2006).

Le proteine TSP1 e FU sono coinvolte in diversi *pathway* molecolari. I domini furinici nelle R-spondine sembrano essere essenziali per la stabilizzazione della  $\beta$ -catenina (Kim K.A. *et al.*, 2006), mentre la funzione del dominio TSP-1 resta ancora da chiarire. Analisi di ibridazioni *in situ* dei 4 geni RSPO hanno evidenziato domini di espressione sovrapponibili in alcuni siti (Nam *et al.*, 2007). Le proteine R-spondine agiscono come potenti attivatori del *pathway* Wnt/ $\beta$ -catenina, che svolge un ruolo critico in vari processi biologici quali lo sviluppo, il differenziamento e la proliferazione cellulare. Infatti, mutazioni in questi geni sono associate a fenotipi clinici gravi (Tab. 7)

Gene	Human diseases	Mouse phenotype
<i>Rspo1</i>	Sex reversal, palmoplantar hyperkeratosis, squamous cell carcinoma, upregulated in ovarian and stomach tumor samples	Sex reversal ( <i>Rspo1</i> KO); intestinal crypt cell proliferation ( <i>Rspo1</i> ectopic expression)
<i>Rspo2</i>	Downregulated in colon, rectum, small intestine, lung and breast tumor samples	Malformations of laryngeal-tracheal cartilages, limbs, kidney and palate Lung hypoplasia ( <i>Rspo2</i> KO)
<i>Rspo3</i>	Downregulated in many tumor samples, upregulated in breast cancer	Placental defects ( <i>Rspo3</i> KO)
<i>Rspo4</i>	Anonychia	

Tab. 7: **Difetti clinici legati a mutazioni nei geni delle R-spondine in pazienti e loro corrispondenti nei modelli murini** (modificato da Chassot *et al.*, 2008a)

Il gene *RSPO1* umano mappa nella regione 1p34.3, ha una lunghezza di 23.541 bp (NC\_000001.9), è costituito da 9 esoni ed è trascrizionalmente orientato dal centromero verso il telomero. L'RNA messaggero è lungo 2.995 bp (NM\_001038633) e contiene una CDS di 792 bp tradotta nella sequenza proteica di 263 amminoacidi (NP\_001033722) con un peso molecolare presunto di 29 kDa (Fig. 13).

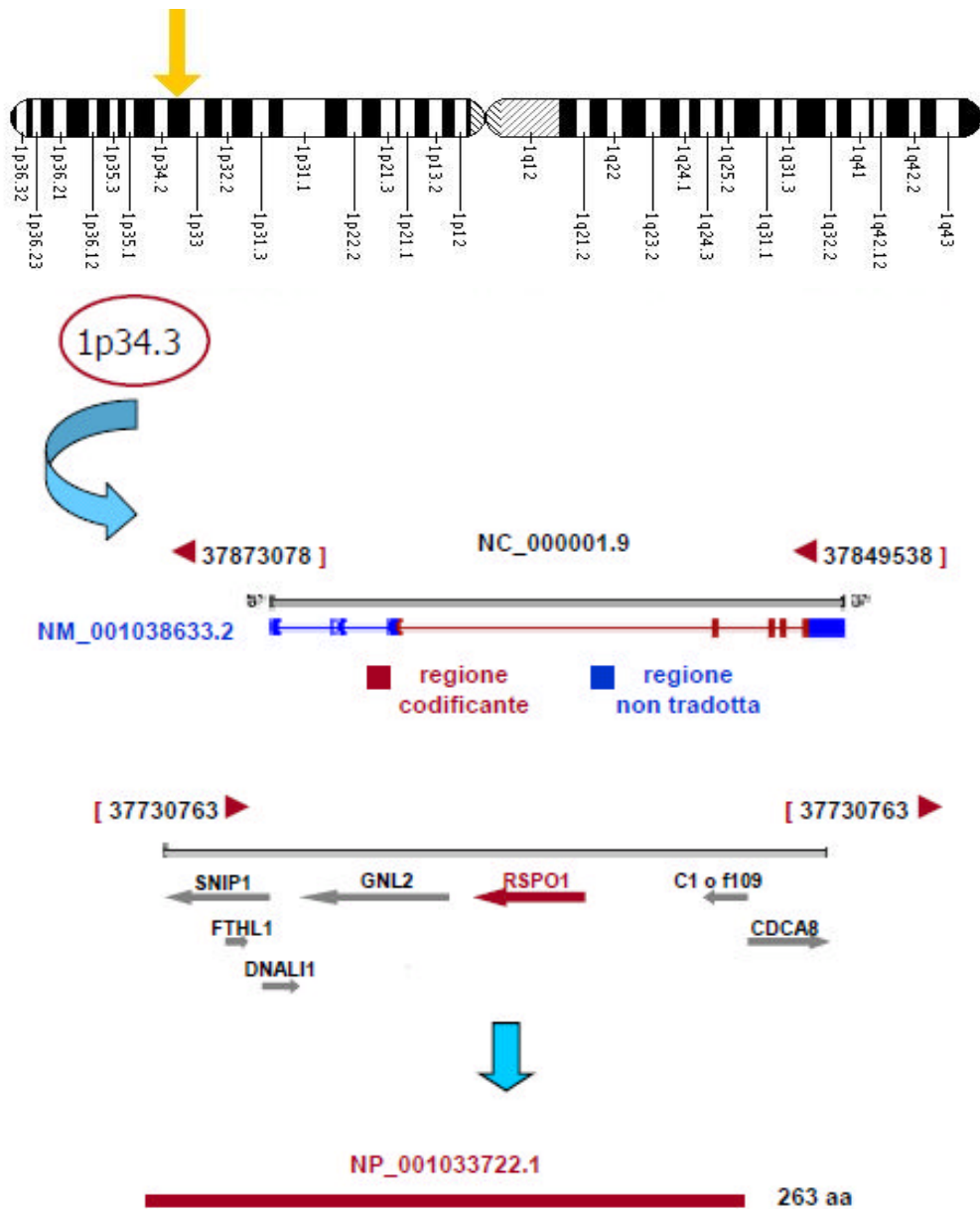


Fig. 13: Il gene *RSP01* umano. Il gene è localizzato sul cromosoma 1 nella regione 1p34.3, è costituito da 4 esoni non tradotti e 5 esoni codificanti per una proteina di 263 amminoacidi.

Il trascritto *RSP01* può andare incontro a *splicing* alternativo con tre differenti isoforme: l'isoforma 1 (NM\_001038633), la classica e maggiormente espressa in tutti i tessuti esaminati; l'isoforma 2 (NM\_001038633), priva dell'esone 7 di 189 bp; l'isoforma 3 (AK098225), che manca di una parte dell'esone 4, contenente il codone di inizio canonico, e che viene trascritta a partire da un codone AUG più debole (Fig. 14).

Esperimenti di RT-PCR e successivo sequenziamento hanno dimostrato che nei tessuti epiteliale, ovarico e testicolare non è mai presente il terzo esone non tradotto della sequenza NM\_001038633 (Parma *et al.*, 2006).

Il gene *RSPO1* è espresso in: ghiandole adrenali, ovaio, utero, testicoli, muscoli, paratiroidi, occhi, cuore, intestino, prostata, cervello, tessuto connettivo e pancreas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.135015>) (Kim K.A. *et al.*, 2005; Nam *et al.*, 2007).

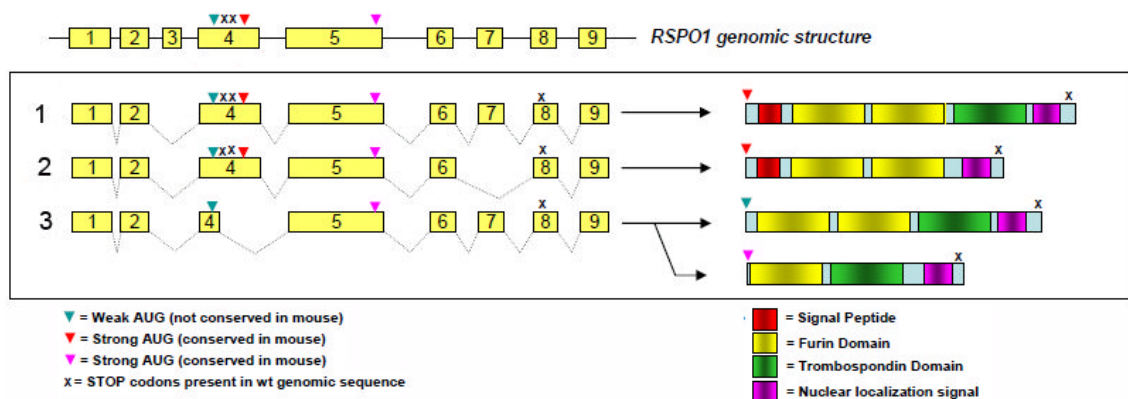


Fig. 14: **Le tre isoforme di RSPO1.** L'isoforma 1 sembra essere quella predominante, l'isoforma 2 è priva dell'esone 7 (che codifica per il dominio TSP-1), l'isoforma 3 non contiene il peptide segnale nella regione N-terminale (modificato da Parma *et al.*, 2006).

R-spondina1 è stata identificata per la prima volta come un gene espresso nella parte dorsale del tubo neurale nel topo ed è risultata *down-regolata* in topi doppi *knockout* *Wnt1/3a* (Kamata *et al.*, 2004). Studi successivi hanno mostrato che *RSPO1* agisce come potente e specifico mitogeno per le cellule delle cripte intestinali (Kim K.A. *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007).

Il ruolo di R-spondina1 nella determinazione sessuale può essere spiegato attraverso il suo coinvolgimento nel *pathway* di trasduzione del segnale *Wnt/β-catenina* (Kim K.A. *et al.*, 2005). Il segnale *Wnt* induce una risposta molecolare regolando i livelli citosolici di  $\beta$ -catenina (Fodde and Brabletz, 2007; Katoh and Katoh, 2007): in assenza di *Wnt*, la  $\beta$ -catenina viene fosforilata dal complesso APC (*Adenomatous Polyposis Coli*)/Axina e poi rapidamente degradata dal proteasoma. Invece, il legame di un ligando *Wnt* al recettore Frizzled e al corecettore LRP6/5 (*low density lipoprotein receptor-related*

*protein 6/5*) porta all'inattivazione di questo complesso con la stabilizzazione della  $\beta$ -catenina nel citosol. La  $\beta$ -catenina entra quindi nel nucleo dove forma un complesso con il fattore trascrizionale TCF, portando all'attivazione trascrizionale di geni *target* (Kim K.A. *et al.*, 2006) (Fig. 14).

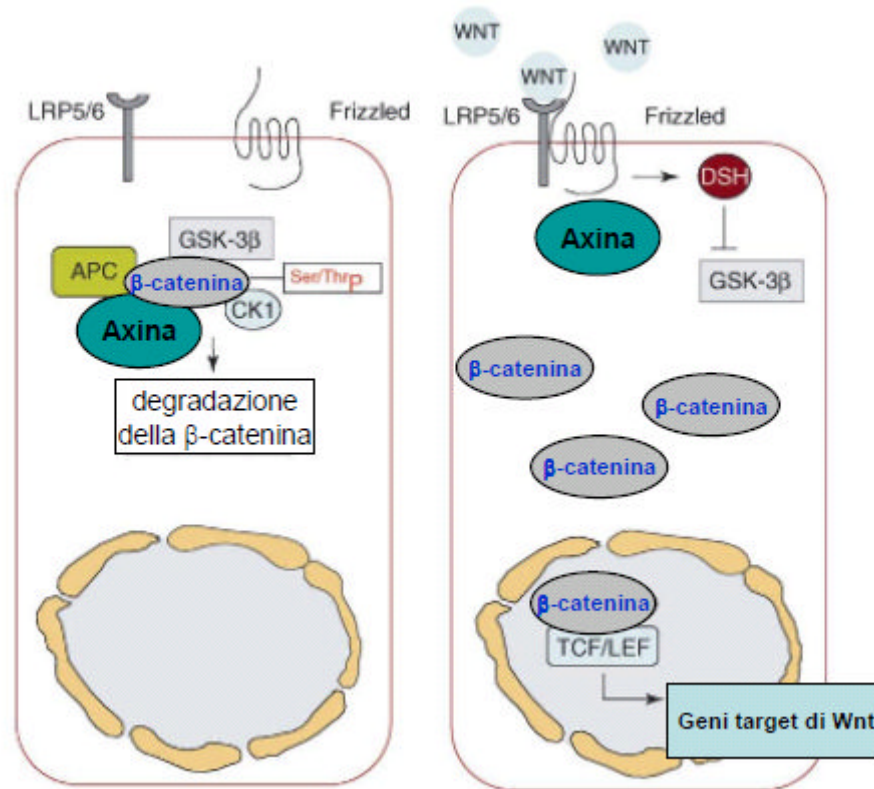


Fig. 15: **Il pathway Wnt/β-catenina.** In assenza dei ligandi Wnt si forma un complesso costituito da APC, Axina 1/2, GSK-3β e CK1, che porta alla fosforilazione della β-catenina e alla sua successiva ubiquitinazione e degradazione. In presenza dei ligandi Wnt, questi si legano ai recettori LRP5/6 e ai corecettori Frizzled inibendo la formazione del complesso APC-Axina 1/2-GSK-3β-CK1. Tale inibizione determina l'accumulo intracellulare della β-catenina che viene poi traslocata nel nucleo dove attiva la trascrizione di specifici geni *target* (modificato da Fodde and Brabletz, 2007).

E' stato recentemente mostrato che R-spondina1 è in grado di regolare il segnale Wnt modulando i livelli di LRP6 sulla superficie cellulare. La quantità di recettore LRP6 presente sulla membrana cellulare viene mantenuta bassa dal macchinario di internalizzazione Dkk1/Kremen. La proteina R-spondina1 agisce da antagonista della formazione di questo macchinario, causando un aumento della quantità di recettore presente sulla superficie cellulare, un evento chiave coinvolto nell'attivazione del segnale Wnt/β-catenina (Binnerts *et al.*, 2007).



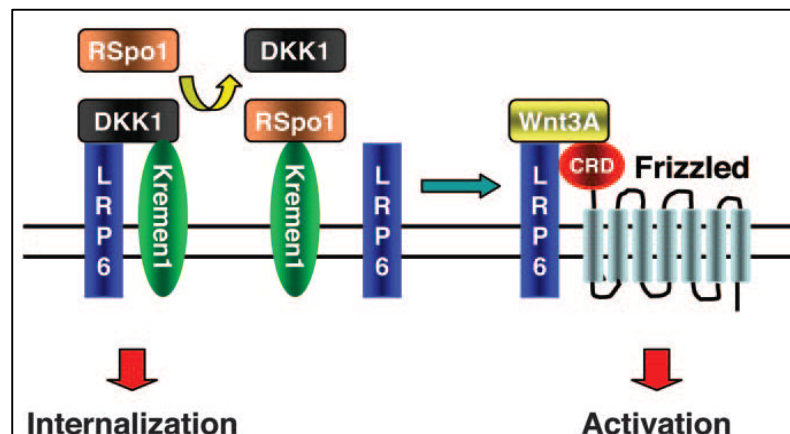


Fig. 16: **Modello del meccanismo d'azione di RSPO1.** RSPO1 potenzia il segnale indotto da Wnt, agendo da antagonista dell'internalizzazione di LRP6 (mediata da Dkk1/Kremen), causando un aumento dei livelli di LRP6 sulla superficie cellulare (modificato da Binnerts *et al.*, 2007).

Due gruppi di ricerca hanno recentemente dimostrato un ruolo diretto della proteina Respondina1 nello sviluppo sessuale femminile (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008). In particolare, è stato mostrato che il differenziamento dell'ovaio nei mammiferi richiede l'attivazione del segnale della  $\beta$ -catenina da parte del gene *RSPO1* nelle gonadi XX. I topi XX *RSPO1*<sup>-/-</sup> hanno una ridotta espressione del gene *WNT4* e sviluppano come pseudoermafroditi con persistenza di dotti di Wolff e di Müller (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008). Dal momento che tali topi presentano caratteristiche fenotipiche simili a quelle dei topi *WNT4*<sup>-/-</sup>, è possibile supporre l'esistenza di un'interazione fisiologica tra questi due fattori solubili nel sopprimere il programma di differenziazione maschile e nel mantenere lo sviluppo degli oociti durante l'organogenesi delle gonadi XX (Tomizuka *et al.*, 2008). La cooperazione tra *RSPO1* e *WNT4* potrebbe, quindi, contribuire a sopprimere la differenziazione maschile e ad agire da regolatore positivo della funzione ovarica durante lo sviluppo femminile attraverso l'attivazione trascrizionale mediata dalla  $\beta$ -catenina (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008). Nell'ipotesi di un bilanciamento tra *FGF9* e *WNT4* per la determinazione del sesso maschile e femminile, *SRY* da una parte e *RSPO1* dall'altra potrebbero essere i due geni capaci di influenzare questi due segnali.

# **Capitolo 2**

## **SCOPO DEL LAVORO**

La determinazione e la differenziazione sessuale avvengono attraverso diverse tappe: al momento della fecondazione si determina il  *sesso cromosomico* (46,XX o 46,XY), l'assetto cromosomico condiziona il  *sesso gonadico*, infine ormoni sessuali e peptidi secreti dalle gonadi concorrono a determinare il  *sesso fenotipico*.

L'obiettivo principale del progetto di ricerca è stato quello di apportare un contributo alle conoscenze dei meccanismi genetici alla base dello sviluppo sessuale e all'individuazione di nuovi geni coinvolti nell'etiopatogenesi dei Difetti dello Sviluppo Sessuale (DSS).

L'U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica della "Sapienza - Università di Roma", c/o l'Azienda Ospedaliera "S. Camillo-Forlanini", ha istituito dal 2003 un "Ambulatorio per la diagnosi e la cura dei difetti dello sviluppo sessuale"; ciò ha consentito di avere a disposizione un'ampia casistica su cui, previo consenso informato, sono state effettuate le ricerche.

Durante lo svolgimento del progetto, rivolto allo studio di alcuni processi implicati nelle anomalie della determinazione del sesso cromosomico, gonadico e fenotipico, la ricerca si è focalizzata in modo prevalente sul DSS ovotesticolare ("ermafroditismo vero"). La ricerca ha preso spunto dallo studio di un soggetto adulto con cariotipo 46,XX, *SRY*-negativo, affetto da DSS ovotesticolare, che ha costituito il primo caso descritto in letteratura di ermafroditismo vero "XX" associato a mutazione puntiforme in un singolo gene. In questa paziente infatti è stata identificata una variante patogenetica a carico di un nuovo gene, *RSPO1* (R-spondina1), implicato nei processi della determinazione gonadica. Tale gene appartiene a una famiglia di fattori che risultano coinvolti nel  *pathway* di trasduzione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina. I successivi studi di espressione, di localizzazione e di analisi funzionale condotti sul  *wild-type* e sul mutato hanno permesso sia di valutare gli effetti qualitativi e quantitativi della mutazione sul trascritto e sulla proteina RSPO1, sia di far luce su nuovi aspetti del meccanismo d'azione e del ruolo di R-spondina1 nella determinazione sessuale. Studi preliminari di espressione sono stati condotti per individuare possibili geni  *target* di RSPO1 coinvolti nello sviluppo sessuale.

La profonda conoscenza delle molecole che regolano il corretto sviluppo delle gonadi è un prerequisito necessario per la comprensione dei complessi fenomeni molecolari che determinano i difetti della morfogenesi genitale, che può avere un'importante ricaduta nel miglioramento della diagnostica e del trattamento dei DSS.



# **Capitolo 3**

# **MATERIALI E METODI**

## 3.1) MATERIALI

### 3.1.1) Pazienti

Lo studio ha avuto inizio da un individuo affetto da una forma sindromica caratterizzata da difetti dello sviluppo sessuale, anomalie cutanee e sordità. In particolare, la nostra paziente, figlia di cugini primi, presentava la seguente associazione di segni clinici: ambiguità dei genitali esterni, cheratodermia palmoplantare, opacità corneale bilaterale congenita, oncodistrofia e ipoacusia bilaterale neurosensoriale.

Una coorte di 8 individui, con cariotipo 46,XX e *SRY* negativi, affetti da DSS ovotesticolare o da disgenesia gonadica non sindromici, sono stati inclusi nella presente ricerca.

### 3.1.2) Colture cellulari

Per gli esperimenti condotti nel progetto di ricerca, sono stati impiegati diversi tipi di linee cellulari.

Le HEK293T e le tsa201 (cellule umane embrionali di rene), le NT2/D1 (NTERA2/cloneD1, cellule umane di carcinoma testicolare embrionale) e le CHO (cellule di ovaio di *hamster* cinese) sono state mantenute in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 1% L-glutammina e gli antibiotici Penicillina (10000 U/mL) e Streptomicina (10 mg/mL).

Le NCI-H295R (cellule umane di carcinoma adrenale) sono state coltivate in terreno DMEM/F12 1:1 supplementato con 2.5% Nu-Serum, ITS+ Premix (1X) (BD Biosciences), Penicillina (10000 U/mL) e Streptomicina (10 mg/mL).

Sono inoltre state allestite colture primarie di fibroblasti ottenuti da biopsie di cute della paziente e di un controllo sano, previa raccolta del consenso informato. I fibroblasti sono stati mantenuti in terreno di coltura RPMI-1640 implementato con 20% FBS, L-glutammina (2mM), Penicillina (10000 U/mL) e Streptomicina (10 mg/mL).

Tutte le linee cellulari impiegate negli esperimenti sono state coltivate in bottiglie per coltura sterili (*flask*) da 75 cm<sup>2</sup> e tenute in incubatore ad atmosfera controllata e umidificata in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> (10% di CO<sub>2</sub> per le NT2/D1), alla temperatura di 37°C. Le operazioni necessarie sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare per garantire le condizioni di sterilità necessarie.

Al raggiungimento della confluenza desiderata, le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura mediante tripsina. Il protocollo utilizzato prevedeva di rimuovere il terreno di coltura, lavare le cellule con un opportuno volume di 1x PBS senza Calcio e Magnesio (*CMF-PBS, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free-PBS*) per eliminare ogni traccia di terreno, incubare le cellule in una soluzione di Tripsina (0.05%) e EDTA (0.02%) per 5 minuti a 37°C, aggiungere nuovo terreno con siero fetale per neutralizzare la tripsina.

Tale procedura non è stata utilizzata per le cellule NT2/D1, che sono state staccate, invece, meccanicamente con l'utilizzo di *cell scraper* (tale procedura è preferibile poiché l'uso continuato della tripsina può favorire il processo di differenziamento delle NT1/D2 in cellule neuronali).

Le diverse cellule sono state seminate in diluizioni opportune (1:5-1:10-1:20, v/v) a seconda della linea cellulare, in modo da mantenere la coltura nella sua fase esponenziale di crescita.

Periodicamente, parte delle cellule sono state congelate in azoto liquido per garantire una conservazione a lungo termine. Una volta giunte a confluenza (95%-100%), le cellule sono state raccolte ed il *pellet* è stato risospeso in FBS con 10% DMSO (dimetilsolfossido) come agente crioprotettivo. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in tubi criogenici, incubata in ghiaccio secco (-78°C) per circa 15 minuti e successivamente trasferita in bidoni contenenti azoto liquido.

## **3.2) TECNICHE DI GENETICA MOLECOLARE**

### **3.2.1) Estrazione e quantificazione di DNA genomico**

Il DNA genomico è stato isolato da sangue periferico mediante *kit* commerciale di estrazione (*QIAamp DNA Blood Mini Kit*, QIAGEN). La resa media, partendo da un volume di sangue pari a 200 µl, è di 3-5 µg di DNA. Il protocollo d'utilizzo del *kit* prevede l'impiego di una proteasi K e di un tampone contenente guanidina che consentono la linearizzazione e la degradazione delle proteine di membrana leucocitarie. Tale reazione ha avuto luogo durante un'incubazione di 20 minuti in bagno termostato alla temperatura di 56°C, valore ottimale per l'attivazione enzimatica. Il prodotto della digestione è stato quindi trattato con etanolo assoluto e stratificato sulla colonna di silico-gel, fornita dal *kit*. La soluzione è stata filtrata mediante centrifugazione: la presenza del filtro consente di raccogliere il DNA, permettendo

invece il passaggio di sali, proteine ed altri contaminanti che potrebbero inibire la PCR. L'acido nucleico è stato quindi purificato usando due soluzioni di lavaggio a base di etanolo (AW1 e AW2) ed è poi stato eluito con tampone AE. Usando il tampone compreso nel *kit* è possibile la conservazione del DNA per lungo tempo a temperature inferiori ai 10°C. L'eluizione con H<sub>2</sub>O distillata è sconsigliata in quanto i frequenti scongelamenti, necessari alla lavorazione, favoriscono l'idrolisi acida del DNA.

La concentrazione dei vari campioni di DNA è stata calcolata mediante spettrofotometro UV (Eppendorf BioPhotometer), misurando la sua assorbanza a 260 nm (OD<sub>260</sub>), sapendo che un OD<sub>260</sub> = 1 è equivalente a 50 µg/ml di DNA a doppio filamento (Sambrook *et al.*, 1989). La purezza dei campioni di DNA è stata verificata mediante il rapporto tra le misure di assorbanza a 260 e 280 nm. Per essere considerati puri, i campioni devono presentare un OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> maggiore o uguale a 1.7 (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.2.2) Amplificazione genica

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica sviluppata da Kary Mullis (1986) (premio Nobel nel 1993), che consente l'amplificazione in vitro di specifiche sequenze di DNA. La tecnica si basa sulla capacità di una DNA polimerasi termostabile di estendere una coppia di oligonucleotidi (*primer*) complementari alle regioni fiancheggianti il frammento da amplificare. I componenti essenziali in una reazione di amplificazione standard includono il DNA *target*, una DNA polimerasi (la più usata è la *Taq* DNA polimerasi, prodotta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*), una soluzione tampone, una coppia di *primer* (*forward* e *reverse*), desossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs), e un'opportuna concentrazione di ioni magnesio (Mg<sup>2+</sup>).

Un tipico ciclo di PCR comprende tre passaggi:

- 1) Denaturazione: per separare il dsDNA *target* in due singoli filamenti (ssDNA) (94-95°C);
- 2) *Annealing*: per permettere ai *primer* di ibridizzare alle loro sequenze complementari [50-65°C, a seconda della T<sub>m</sub> (*melting temperature*) della doppia elica in corrispondenza delle sequenze riconosciute dai *primer*];
- 3) Estensione: per permettere la sintesi, da parte di una DNA Polimerasi termoresistente, di un nuovo filamento di dsDNA a partire dai *primer*, incorporando nucleotidi complementari in direzione 5'-3' (65-72°C).

Le condizioni operative del ciclo (tempo e temperatura) vengono scelte dall'operatore in base a prove empiriche. Dopo ciascun ciclo, la quantità di sequenza *target* presente nella reazione risulta raddoppiata. Una PCR standard richiede 25-30 cicli, seguiti da una reazione finale di estensione di 10 minuti, per consentire il completamento dei prodotti di PCR parzialmente estesi.

Per tutti i programmi di PCR è stato utilizzato il termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) con un *ramping* uguale a 1°C/1s. *Primer* in grado di amplificare e sequenziare tutti gli esoni ed almeno 20 nt delle sequenze introniche ai confini esone-introne, se non specificato diversamente, sono stati disegnati con il *software* Primer3 disponibile *online* ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)), (Rozen and Skaletsky, 2000).

Le reazioni di PCR sono state allestite in microtubi da 200 µl. I programmi e le miscele di reazione usati per ciascuna amplificazione variano a seconda dei *primer* e del template utilizzato e sono riportati di seguito:

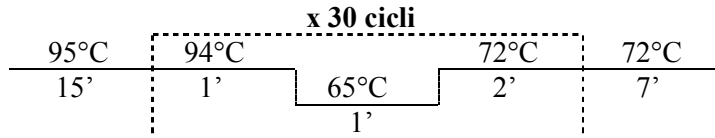
➤ Amplificazione in vitro del gene SRY

L'amplificazione in vitro della sequenza genica di *SRY* (MIM# 480000), effettuata per verificare la presenza o l'assenza del gene, è stata condotta utilizzando una miscela di reazione contenente come template 100 ng di DNA in presenza di: 5 µl Buffer 10x (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9), 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 7 µl dNTPs 2mM, 2 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.25 µl *Taq Gold* (5 U/µl) (Applied Biosystems), in un volume finale di 50 µl. L'amplificazione del gene *SRY* prevede anche l'amplificazione di un ulteriore gene, *ZP<sub>3</sub>*, localizzato sul cromosoma 7, utilizzato come controllo. Questo gene codifica per una glicoproteina presente nella zona pellucida dell'ovocita umano, che funge da recettore per gli spermatozoi.

Per la reazione di PCR sono state utilizzate le seguenti coppie di *primer* (Cui *et al.*, 1994):

<i>Primer</i>	Sequenza nucleotidica	Dimensione banda (bp)
SRY Y2(F) SRY Y3(R)	5'- CAT GAA CGC ATT CAT CGT GTG GTC - 3' 5'- CTG CGG GAA GCA AAC TGC AAT TCT T - 3'	254
ZP3(F) ZP4(R)	5'- AGC CAT CCT GAG ACG TCC GTA CA - 3' 5'- CCT GAC CAC ATC TTC TGT GTC CAT - 3'	177

Programma di PCR utilizzato per il gene *SRY*:



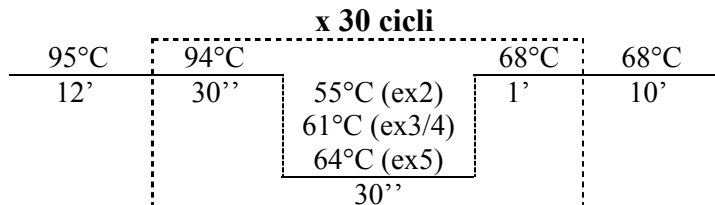
➤ Amplificazione in vitro del gene *WNT4*

La ricerca di mutazioni nel gene *WNT4* (MIM# 603490) è stata effettuata mediante PCR e sequenziamento automatico. Gli esoni 1, 2, 3, 4 e 5 sono stati amplificati usando oligo per le regioni introniche fiancheggianti del gene. Per gli esoni 2, 3/4 e 5 le PCR sono state eseguite in un volume finale di 50 µl con 100 ng di DNA, 5 µl Buffer 10x, 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5 µl dNTPs 2mM, 0.5 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.4 µl *Taq Gold* (5 U/µl, Applied Biosystems). La reazione di PCR dell'esone 1 conteneva: 100 ng di DNA, 25 µl Buffer II 2x, 8 µl dNTPs 2mM, 0.4 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.5 µl *Taq TAKARA LA* (5 U/µl, TAKARA BIO INC.), in un volume finale di 50 µl.

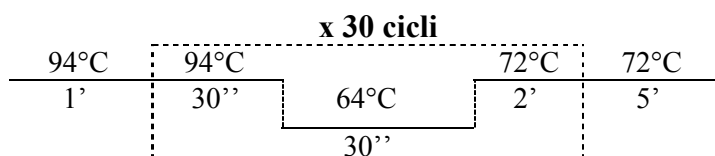
Le coppie di *primer* utilizzate nel processo sono state le seguenti:

<i>Primer</i>	Sequenza nucleotidica	Dimensione banda (bp)
WNT4-1(F)	5' – CGG CGG CAC CAT GAG TCC C – 3'	227
WNT4-1(R)	5' –AGC GAG CGA GCC TCC GGT CCC –3'	
WNT4-2(F)	5' – TGG ATC CAG AGA GAA GTC GG – 3'	461
WNT4-2(R)	5' –GTT GCT CAC GAG CGT CTC ATT –3'	
WNT4-3/4(F)	5' –CCA GCT CTG CCC TCC CTC TGC –3'	482
WNT4-3/4(R)	5' –TCT GAG TGG CCG TGT GGG T –3'	
WNT4-5(F)	5' –TCC CTT GCC ATC TCC TGA T –3'	595
WNT4-5(R)	5' –GGT AGG TGG TGG GAG ACT GT –3'	

Programma di PCR utilizzato per gli esoni 2, 3/4, 5:



Programma di PCR utilizzato per l'esone 1:



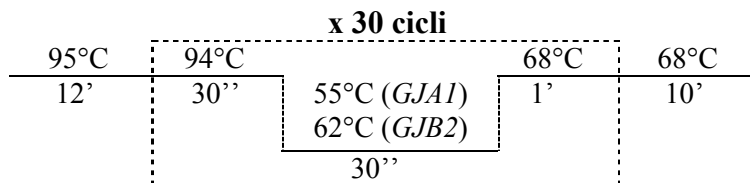
➤ Amplificazione in vitro dei geni GJB2 (connessina 26) e GJA1 (connessina 43)

L'amplificazione in vitro delle regioni tradotte dei geni *GJB2* (MIM# 121011) e *GJA1* (MIM# 121014) è stata condotta utilizzando una miscela di reazione contenente come template 100 ng di DNA in presenza di: 5 µl Buffer 10x, 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5 µl dNTPs 2mM, 1 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.3 µl *Taq Gold* (5 U/µl, Applied Biosystems) in un volume finale di 50 µl.

Le coppie di *primer* utilizzate nel processo sono state le seguenti:

<i>Primer</i>	Sequenza nucleotidica	Dimensione banda (bp)
GJA1-A(F) GJA1-A(R)	5' – GAT CTT TTC TTC GTT GGC – 3' 5' – CTC TTT CCC TTA ACC CG – 3'	925
GJA1-B(F) GJA1-B(R)	5' – TTC CTC TCT CGC CCC AC – 3' 5' – GGC CTA GAA AGC TTA CCT T – 3'	1079
GJB2-A(F) GJB2-A(R)	5' – CAT TCG TCT TTT CCA GAG CA – 3' 5' – AGC CTT CGA TGC GGA CCT T – 3'	430
GJB2-B(F) GJB2-B(R)	5' – ACC GGA GAC ATG AGA AGA AG – 3' 5' – GTT GCA TTT AAG GTC AGA ATC – 3'	515

Programma di PCR utilizzato per i geni *GJA1* e *GJB2*:

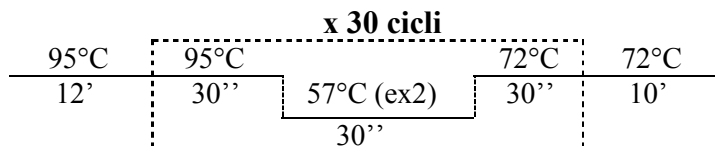


➤ Amplificazione in vitro del gene RSPO1

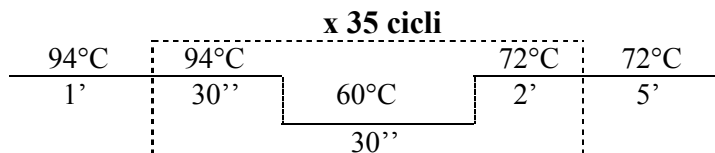
L'analisi mutazionale del gene *RSPO1* (MIM# 609595) è stata effettuata mediante PCR e successivo sequenziamento automatico. Gli esoni 1, 2, 3, 4 e 5 sono stati amplificati usando oligonucleotidi per le regioni introniche fiancheggianti del gene. Per gli esoni 1, 2, 3 e 5 le PCR sono state eseguite in un volume finale di 50 µl con 100 ng di DNA, 5 µl Buffer 10x, 3 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5 µl dNTPs 2mM, 0.5 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.3 µl *Taq Gold* (5 U/µl, Applied Biosystems). La reazione di PCR dell'esone 4 conteneva: 100 ng di DNA, 25 µl Buffer I 2x, 8 µl dNTPs 2mM, 0.4 µl *primer forward* e *reverse* 25µM, 0.3 µl *Taq TAKARA LA* (5 U/µl, TAKARA BIO INC.), in un volume finale di 50 µl. Le coppie di *primer* utilizzate nel processo sono state le seguenti:

Primer	Sequenza nucleotidica	Dimensione banda (bp)
RSPO1-1F RSPO1-1R	5' – CCC CAG AGG TGT TAG CAA GA – 3' 5' – CCC ACC ATG CTC CAT TAC TC – 3'	221
RSPO1-2F RSPO1-2R	5' – GGT GAG GTT CTC TCC ACA GC – 3' 5' – CAA AGC ACT CTC CCC CAG T – 3'	309
RSPO1-3F RSPO1-3R	5' – TGT GGA CAG AAG GGA GGG TA – 3' 5' – GCT CTC TTG CCA GAC CCT TA – 3'	319
RSPO1-4F RSPO1-4R	5' – AGA CAT GAT CCC CTC CTC CT – 3' 5' – GAA GCA GAG GTG GCA GGA C – 3'	317
RSPO1-5F RSPO1-5R	5' – CCT CCC TGC ACA TCC TTT GT – 3' 5' – CCC GAC GTT CCA GTT CAG – 3'	301

Programma di PCR utilizzato per gli esoni 1, 2, 3, 5:



Programma di PCR utilizzato l'esone 4:



### 3.2.3) Elettroforesi ed estrazione di DNA da gel di agarosio

La migrazione elettroforetica attraverso gel di agarosio permette di identificare la presenza e la grandezza dei frammenti di DNA. È stato utilizzato il metodo descritto da Sambrook *et al.* (1989). L'elettroforesi si basa sul principio che, in presenza di un campo elettrico applicato al tampone in cui è immerso il gel, il DNA, carico negativamente, tende a migrare verso il polo positivo spostandosi lungo le maglie del gel. La velocità di migrazione è inversamente proporzionale al peso molecolare del DNA e alla concentrazione del gel.

L'agarosio in polvere viene unito al tampone TAE (composto da 0.04 M Tris-acetato e 0.001M NaEDTA) alla concentrazione di 1-2% (p/v) a seconda della grandezza dei frammenti da correre. Alla soluzione di agarosio viene aggiunto il bromuro di etidio (un colorante capace di intercalarsi tra le basi della doppia elica di DNA e di emettere luce in fluorescenza una volta illuminato con luce UV) a una concentrazione finale di 0.5 µg/ml. In questo caso il gel è stato successivamente posizionato in una cella per



elettroforesi orizzontale dove è stato generato campo elettrico in presenza di tampone TAE 1x (100-150 V per 30-60 minuti). Ogni campione è stato caricato come miscela PCR:loading dye in rapporto 5:1. Il loading dye (0.25 % blu di bromofenolo; 0.25 % xilene cianolo; 30% glicerolo in acqua) contiene coloranti che corrono a differente velocità, utili per monitorare la corsa, e glicerolo, che favorisce la precipitazione di DNA nel pozzetto. I frammenti di DNA sono stati visualizzati mediante irradiazione con luce UV (250 nm) al transilluminatore e fotografati con un'apposita camera Polaroid al fine di studiare il loro *pattern* di migrazione in confronto con un marcatore di riferimento standard.

In alcuni casi, una volta avvenuta la corsa elettroforetica, è stato necessario recuperare un particolare frammento di DNA, per poi analizzarlo o utilizzarlo in esperimenti successivi. Sotto transilluminazione con luce UV, la porzione di gel di agarosio contenente il prodotto di DNA di interesse è stato escisso usando un bisturi sterile. Il DNA è stato quindi liberato dall'agarosio e da altre eventuali impurità seguendo il protocollo del *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN). Brevemente, il tampone QG è stato aggiunto al frammento di gel in un rapporto tampone:gel di 3:1 (v/v) ed è poi stato incubato a 50°C per 10 minuti. Una volta che il gel si è solubilizzato, è stato aggiunto isopropanolo 100% in rapporto 1:1 e la soluzione è stata prima "vortexata" e poi trasferita in una provetta con filtro fornita dal *kit*. Sono seguiti una centrifugazione a 13.000 rpm per un minuto, l'aggiunta di 500 µl di tampone QG e un'ulteriore centrifugazione a massima velocità per 1 minuto. Dopo l'aggiunta di 750 µl di buffer PE, un'incubazione a temperatura ambiente di 5 minuti e una centrifugazione sempre a 13.000 rpm per 1 minuto, il DNA rimasto legato alla matrice del filtro è stato eluito in 30 µl di tampone EB e conservato a -20°C.

#### **3.2.4) Sequenziamento genico**

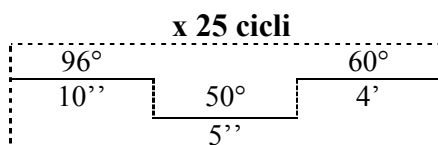
Dopo aver effettuato il controllo in gel d'agarosio, i prodotti di PCR sono stati sottoposti a purificazione post-PCR, che permette di eliminare sali, nucleotidi non incorporati e *primer* in eccesso, mediante un sistema di piastre filtranti (*MultiScreen PCR<sub>µ96</sub> Plate*, Millipore).

Eseguita la purificazione dell'amplificato, si è proceduto con il sequenziamento del prodotto di PCR, mediante una variante del metodo di Sanger che utilizza ddNTPs coniugati con fluorocromi anziché con radioattivo. Con questa tecnica, la sequenza di

basi del prodotto di amplificazione viene resa riconoscibile al momento della lettura al sequenziatore.

Nella reazione di marcatura sono essenziali i seguenti reagenti: H<sub>2</sub>O distillata sterile, un *primer* (*forward* o *reverse*), il prodotto di PCR che funge da stampo, e una miscela composta da deossinucleotidi (dNTPs), dideossinucleotidi (ddNTPs) marcati con quattro diversi fluorofori corrispondenti alle quattro basi (A, C, G, T), e una polimerasi termoresistente (AmpliTaq FS). I ddNTPs sono analoghi dei normali dNTPs ma sono privi del gruppo ossidrilico sul carbonio in 3'. Tali dideossinucleotidi possono essere incorporati in una catena di DNA in crescita, mediante la formazione di un legame fosfodiesterico tra il loro atomo di carbonio in 5' e il carbonio in 3' del nucleotide precedentemente incorporato; tuttavia, essendo privi del gruppo ossidrilico in 3', non possono partecipare alla formazione del legame fosfodiesterico 3'-5' con il dNTP successivo, provocando in questo modo la repentina interruzione della sintesi della catena in crescita. Considerando la casualità nell'impiego dei dNTPs/ddNTPs durante la sintesi è altamente probabile la formazione di frammenti di DNA, complementari allo stampo, di dimensioni diverse a seconda del momento in cui si inserisce il ddNTP durante la sintesi. Essendo i quattro ddNTPs coniugati con fluorocromi diversi a seconda del tipo di base associata, la successiva separazione dei frammenti mediante elettroforesi capillare permette di ricostruire la sequenza delle basi nel frammento studiato.

La reazione di marcatura è stata eseguita usando l'*ABI Prism Big Dye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), attenendosi al protocollo consigliato dalla casa produttrice e utilizzando il seguente programma:



La miscela di riferimento per la reazione di marcatura era la seguente: 8 µl di RR mix, 1.6 µl di *primer* 25µM, 1 µl di prodotto di PCR, 9.4 µl di H<sub>2</sub>O.

Dopo la marcatura è stata eseguita una purificazione utilizzando il kit *Montage SEQ<sub>96</sub> Sequencing Reaction Cleanup* (Millipore), secondo le istruzioni della casa produttrice. In questa fase la purificazione è indispensabile per ottenere un prodotto di

amplificazione privo di ddNTPs marcati e di *primer* che influenzerebbero negativamente il sequenziamento.

Quest'ultimo è avvenuto mediante sequenziatore automatico *ABI PRISM 310 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) ed i campioni sono stati sequenziati bidirezionalmente, utilizzando gli stessi *primer* usati per le reazioni di PCR. La metodica si fonda sui principi della migrazione elettroforetica capillare e sulla diversa emissione dei fluorocromi eccitati a lunghezze d'onda ( $\lambda$ ) specifiche. I prodotti della reazione di marcatura purificati vengono denaturati al calore in presenza di TSR (*Template Suppression Reagent*), reagente a base di formamide che consente di mantenere la denaturazione ottenuta a 94°C. La reazione viene poi bloccata a -20°C, i campioni vengono quindi caricati sul sequenziatore e sottoposti ad elettroforesi capillare. La differenza di potenziale applicata agli estremi del capillare permette la migrazione sequenziale dei frammenti di DNA di lunghezze crescenti. Ogni frammento è costituito dal *primer* e da un numero variabile di basi fino al dideossinucleotide all'estremità 3' marcato con fluorocromo base-specifico. Durante la migrazione una finestra nel capillare permette l'eccitazione del fluorocromo da parte del laser dello strumento. La luce riemessa dal marcatore viene rilevata da un *detector* che la mette in relazione anche alla velocità di migrazione per poter risalire alla posizione di quel fluorocromo e quindi di quella specifica base sul frammento. La rilevazione si ripete per ogni frammento sottoposto a migrazione. Il dato "grezzo" così raccolto è stato sottoposto a processamento automatico attraverso un *software* specifico (*Sequencing Analysis 5.2*, Applied Biosystems) che rende facilmente interpretabile il tracciato elettroforetico (elettroferogramma).

### 3.3) TECNICHE DI CLONAGGIO

Il termine "clonaggio genico" descrive una serie di tecniche ricombinanti con le quali è possibile ottenere più copie di una determinata sequenza genica. Il processo del clonaggio è composto da più fasi: costruzione di molecole ricombinanti, trasformazione, propagazione selettiva dei cloni, isolamento dei cloni contenenti il DNA ricombinante voluto. Per generare vettori plasmidici ricombinanti contenenti una sequenza genica di interesse è necessario che il plasmide e l'inserito abbiano delle estremità complementari. A tale scopo la sequenza genica di interesse viene amplificata utilizzando coppie di *primer* specifici in grado di creare nel frammento amplificato dei siti di riconoscimento

per enzimi di restrizione (enzimi con attività endonucleasica specifica, capaci di riconoscere sul DNA brevi sequenze bersaglio palindromiche), necessari per inserire la sequenza desiderata all'interno di specifici plasmidi di espressione. A seguito della digestione enzimatica, la sequenza di DNA dell'inserto potrà essere legata al DNA vettore, in quanto entrambi presenteranno delle estremità compatibili dette coesive (*sticky ends*). Questo metodo è una modificazione del metodo pubblicato da Brown (1991) e Sambrook *et al.* (1989). La successiva reazione di ligazione, durante la quale le estremità complementari del vettore e dell'inserto digeriti si legano tra di loro, viene catalizzata dall'enzima T4 DNA ligasi, che permette la formazione di legami fosfodiesterici tra le estremità 3'-OH e 5'-P di nucleotidi adiacenti, in un'apposita miscela di reazione contenente ATP,  $Mg^{2+}$ , soluzione tampone (Sambrook *et al.*, 1989). In Figura 17 sono riassunti schematicamente i passaggi per la preparazione di vettori plasmidici ricombinanti.

La trasformazione è un processo durante il quale una molecola di DNA ricombinante viene acquisita da una cellula ospite capace di replicarlo, ad esempio quando del DNA plasmidico estraneo viene introdotto all'interno di cellule batteriche. I batteri che hanno acquisito il plasmide vengono selezionati facendo crescere le cellule in terreno supplementato con un antibiotico specifico (Fig. 18).

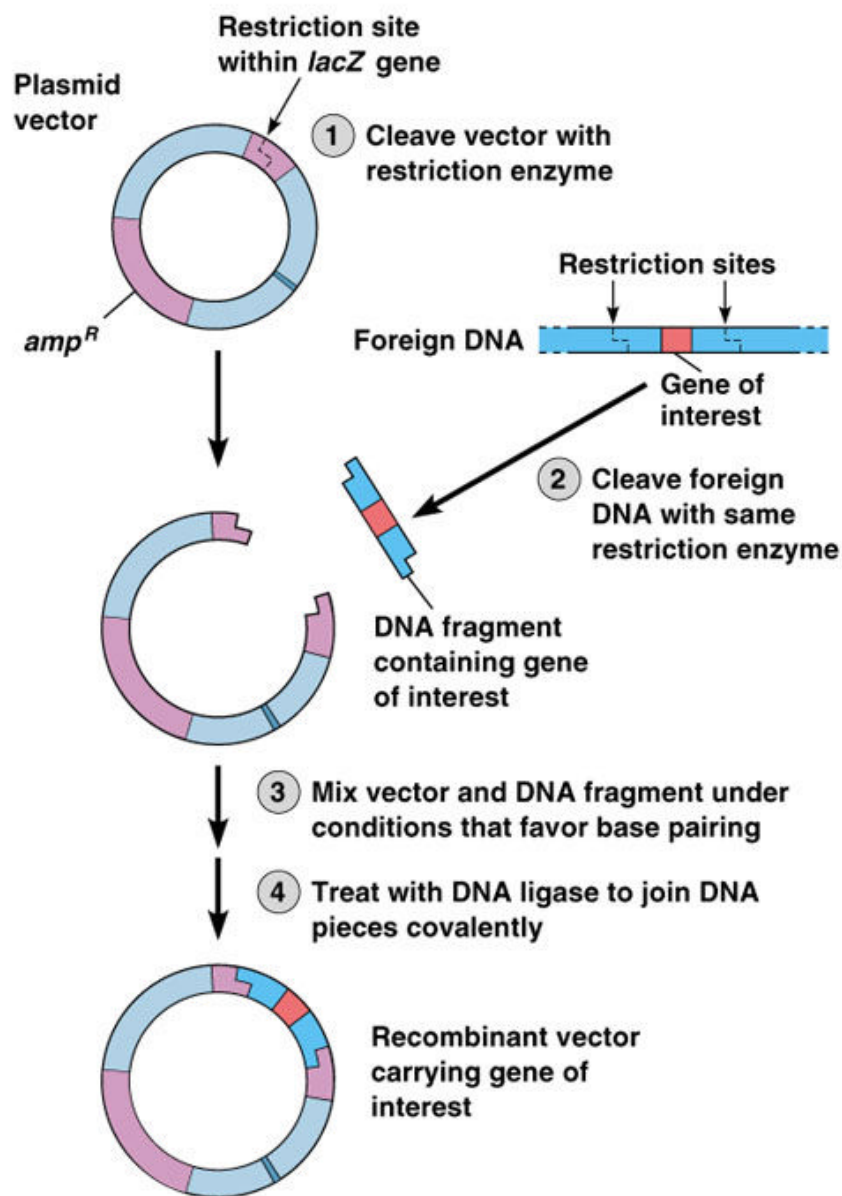


Fig. 17 : **Preparazione di un vettore plasmidico ricombinante.** 1) Il plasmide viene tagliato con uno specifico enzima di restrizione che riconosce un singolo sito;  
 2) Lo stesso enzima viene usato per tagliare una molecola di DNA estraneo contenente il gene di interesse, generando quindi frammenti lineari che hanno le stesse estremità coesive;  
 3) Il frammento di DNA estraneo viene incubato con il plasmide linearizzato sotto specifiche condizioni che favoriscono l'appaiamento delle basi tra le estremità coesive. Tra i prodotti attesi ci saranno molecole di plasmide ricircolizzato, alcuni dei quali conterranno il gene di interesse;  
 4) L'incubazione con la DNA ligasi legherà covalentemente le estremità unite, generando molecole di plasmide ricombinante (modificata da [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/CB18\\_28B.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL4900/CB18_28B.html)).

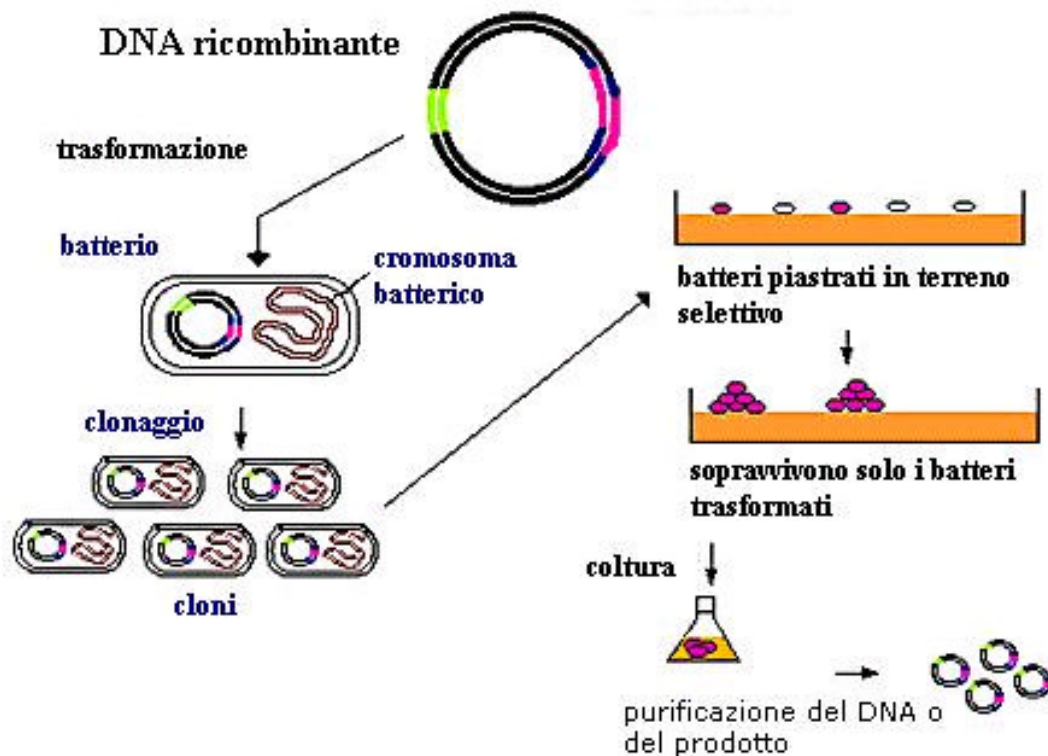


Fig. 18: **Processo di trasformazione delle cellule batteriche.** Una volta ottenuta la molecola di DNA ricombinante, si procede alla trasformazione dei batteri, che vengono successivamente piastrati su terreno selettivo contenente l'antibiotico specifico. Solo le cellule batteriche trasformate, che hanno incorporato il plasmide e quindi possiedono anche il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico, sono in grado di sopravvivere. Varie colonie vengono raccolte e poste a crescere in terreno selettivo prima di procedere alla purificazione del DNA plasmidico (modificato da <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html>).

### 3.3.1) Plasmidi e mezzi di coltura

Per gli esperimenti di clonaggio ed espressione di proteine ricombinanti sono stati utilizzati i plasmidi riportati in Tabella 8. Tutti questi plasmidi contenevano un gene per la resistenza ad un antibiotico, un'origine di replicazione batterica, necessaria per la propagazione nelle cellule di *E. coli*, il gene *lac I*, codificante per il repressore dell'operone del lattosio, e un *polilinker* clonato a valle del promotore di T7 (Fig. 19). Le mappe dei plasmidi sono riportate in Appendice. Come mezzo di coltura per le cellule batteriche è stato utilizzato il terreno LB (Luria-Bertani). Il mezzo di coltura liquido è stato preparato sciogliendo in 1 litro di acqua deionizzata: 10 g di triptone, 5 g di estratto di lievito e 10 g di cloruro di sodio. Il terreno solido per le piastre è stato

ottenuto dal mezzo liquido attraverso l'aggiunta di agar, quale agente gelificante, alla concentrazione finale di 1.5% (Sambrook, *et al.*, 1989).

Nome	Utilizzo	Principali caratteristiche	Ditta produttrice
pcDNA3.1(+)	Costruzione dei vettori pRSPO1 e pRSPO1-HA (wt e mut)	Ampicillina e neomicina resistente	Invitrogen
pEGFP-N1	Costruzione del vettore pRSPO1-GFP (wt e mut)	Kanamicina e neomicina resistente; GFP-tag	Clontech
pIRES2-AcGFP1-Nuc	Costruzione del vettore pRSPO1-IRES2-GFP (wt e mut)	Kanamicina e neomicina resistente; GFP-tag	Clontech
PCR2.1-TOPO Vector	TOPO TA Cloning Kit	Ampicillina e kanamicina resistente	Invitrogen
pCMV·SPORT6	espressione di <i>CTNNB1</i>	Ampicillina resistente	Dr. Achermann (UCL-ICH, Londra)
TOPFLASH	TCF promotore	Ampicillina resistente; basso numero di copie	Dr. Achermann (UCL-ICH, Londra)

Tab. 8: Elenco e breve descrizione dei vettori plasmidici utilizzati per la ricerca.

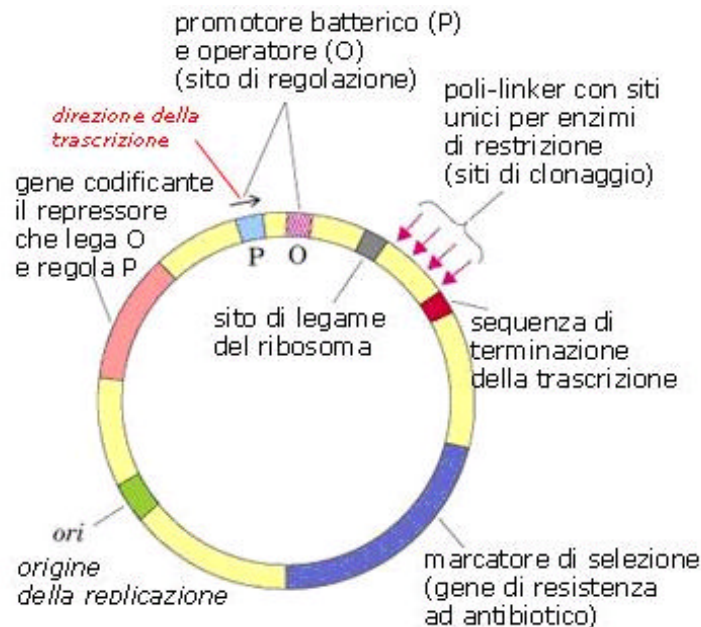


Fig. 19: Rappresentazione schematica di un vettore plasmidico generico.

### 3.3.2) Costruzione dei vettori pRSPO1, pRSPO1-HA, pRSPO1-GFP

La CDS di *RSPO1 wild-type* e mutata (r.95\_286del) è stata ottenuta mediante amplificazione del cDNA, retrotrascritto da RNA estratto rispettivamente dal tessuto gonadico di una donna sana e della paziente. Per l'amplificazione sono state utilizzate le coppie di *primer* specifici riportate in Tabella 9. Per ottenere la proteina di fusione RSPO1-HA, la sequenza di 27 nt codificante per il peptide HA (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) è stata inclusa nel *primer* RSPO1-HA(R) a valle della CDS per la proteina R-spondina1, mantenendo il corretto schema di lettura. Per la reazione di PCR è stata usata una DNA polimerasi termostabile ad alta fedeltà, la *Platinum Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), in quanto, possedendo un'attività di *proofreading* 3' → 5' esonucleasica, è in grado di copiare il DNA con maggiore fedeltà rispetto alle normali *Taq*. Le condizioni di PCR adottate sono: 94°C/2 minuti, 35 cicli composti da 94°C/30 secondi, 58°C/30 secondi e 68°C/1 minuto 30 secondi, seguita da una fase di estensione finale di 10 minuti a 68°C. La miscela di reazione comprendeva: 5 µl di 10x *Pfx Amplification Buffer*, 1.5 µl di dNTPs 10mM, 1 µl di MgSO<sub>4</sub> 50mM, la coppia di *primer* specifica alla concentrazione finale di 0.3 µM ciascuno, 150 ng di cDNA e 2.5 U di *Pfx*, in un volume finale di 50 µl. La migrazione elettroforetica su gel di agarosio all'1.2% dell'amplificato ha consentito di isolare l'isoforma 1 di *RSPO1* (wt e mut). L'estrazione del DNA dalla banda corrispondente è stata eseguita mediante *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).



Primer	Sequenza nucleotidica	Caratteristiche
RSPO1cDNA-KpnI(F)	5'-GAC GGG <b>GTA</b> CCC GTG ACT <b>ATG</b> CGG CTT GGG CTG TG -3'	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>KpnI</i> (in grassetto)
RSPO1cDNA-XhoI(R)	5'-GAC CGC <b>TCG</b> AGT GTC <b>CCT</b> AGG CAG GCC CTG CAG ATG-3'	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>XhoI</i> (in grassetto), mantenendo il codone di STOP (in blu)
RSPO1-HA(F)	5'-GCA <b>AGC TTA TG</b> CGG CTT GGG CTG TGT GTG- 3'	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>HindIII</i> (in grassetto)
RSPO1-HA(R)	5-CCG <b>GAA TTC CTA TTA</b> <u><b>AGC GTA ATC TGG AAC</b></u> <u><b>ATC GTA TGG GTA</b></u> GGC AGG CCC TGC AGA TGT G-3'	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>EcoRI</i> (in grassetto), due codoni di STOP (in blu) e la sequenza codificante per il peptide HA (sottolineata in verde)
RSPO1cDNA-GFP-XhoI(F)	5'-GAC CGC <b>TCG</b> AGC GTG ACT <b>ATG</b> CGG CTT GGG CTG TG -3'	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>XhoI</i> (in grassetto)
RSPO1cDNA-GFP-KpnI(R)	5'-CCG <b>CGG TAC CGT</b> GGC AGG CCC TGC AGA TGT GAG TG -3'	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima <i>KpnI</i> (in grassetto), elimina il codone di STOP e aggiunge due basi (in rosa) per mantenere il corretto <i>ORF</i>

Tab. 9: Elenco dei *primer* utilizzati per la costruzione dei vettori pRSPO1, pRSPO1-HA, pRSPO1-GFP.

### 3.3.3) Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Tutti gli enzimi di restrizione e i relativi tamponi utilizzati (Tab. 10) sono stati acquistati dalla *New England Biolabs* ed utilizzati secondo i dettagli sperimentali indicati dalla casa produttrice. La miscela di reazione per la digestione enzimatica conteneva: 5 µg di DNA plasmidico o tutta la reazione di purificazione dei prodotti di PCR *RSPO1 wild-type* e mutata (circa 30 µl); 20 unità di ciascun enzima, 1x tampone di reazione, 1x BSA (0.1 mg/ml, tranne che per la reazione con *EcoRI* e *HindIII*), H<sub>2</sub>O distillata per portare la reazione a un volume finale di 50 µl. La reazione è stata incubata in un bagnetto termostato a 37°C per 1-2 ore. I prodotti della digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%, successivamente escissi dal gel, purificati come descritto precedentemente e conservati a -20°C fino al momento di essere utilizzati.

Enzima di restrizione	Sequenza bersaglio	Plasmide	Costrutto
<i>KpnI</i>	5'...GGTACC...3' 3'...CCATGG...5'	pcDNA3.1(+); pEGF-N1	pRSPO1; pRSPO1-GFP
<i>XhoI</i>	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'	pcDNA3.1(+); pEGF-N1	pRSPO1; pRSPO1-GFP
<i>EcoRI</i>	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'	pIRES2-AcGFP1-Nuc; pcDNA3.1(+)	pRSPO1-IRES2-GFP; pRSPO1-HA
<i>HindIII</i>	5'...AAGCTT...3' 3'...TTCGAA...5'	pcDNA3.1(+)	pRSPO1-HA
<i>SacI</i>	5'...GAGCTC...3' 3'...CTCGAG...5'	pIRES2-AcGFP1-Nuc	pRSPO1-IRES2-GFP

Tab. 10: Elenco degli enzimi di restrizione utilizzati per le reazioni di clonaggio.

### 3.3.4) Clonaggio di cDNA dentro vettori plasmidici mediante ligazione

La reazione di ligazione è stata effettuata utilizzando la *T4 DNA Ligase High Concentration* (NewEngland Biolabs). La miscela di reazione conteneva i seguenti reagenti: 50 ng di DNA plasmidico; DNA dell'inserto secondo il rapporto molare inserto:vettore di 3:1; 2 µl di 10x *T4 DNA Ligase Reaction Buffer*; 1 µl di enzima (2000 U/µl); H<sub>2</sub>O distillata per portare il volume finale a 20 µl. Prima di aggiungere la ligasi e il buffer, la miscela è stata incubata per 5 minuti a 45°C, in modo da rompere eventuali legami intra-molecolari formatesi (inserto-inserto o vettore-vettore). La reazione è stata incubata a T.A. (25°C) per un'ora, poi raffreddata in ghiaccio e conservata a -20°C o usata immediatamente per la reazione di trasformazione.

### 3.3.5) Trasformazione di DNA plasmidico in cellule *E. coli*.

*E. coli* DH5α è un particolare ceppo batterico di *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizzato per l'amplificazione di plasmidi. Tutte le trasformazioni sono state effettuate usando cellule di *E. coli* DH5α previamente rese competenti (*Subcloning Efficiency DH5α Competent Cells*, Invitrogen). Le cellule competenti DH5α vengono conservate in glicerolo alla temperatura di -80°C. 50 µl di cellule sono stati incubati 30 minuti in ghiaccio con 5 µl di miscela di ligazione. Le cellule sono state quindi sottoposte a *shock* termico (che rende i batteri più permeabili al DNA plasmidico) mediante incubazione a 42°C per 45 secondi seguita da un'incubazione di 2 minuti in ghiaccio. 900 µl di terreno S.O.C. (Invitrogen) sono stati aggiunti alla miscela ed incubati a 37°C per 1 ora in agitazione a

225 rpm, per consentire ai batteri trasformati di esprimere il gene per la resistenza all'antibiotico prima di esercitare la pressione selettiva. In seguito sono stati piastrati 50-200 µl di sospensione batterica su piastre di LB Agar supplementate con l'antibiotico di selezione [ampicillina (50 µg/ml, Sigma) per i plasmidi pcDNA3.1(+) e pIRES2-AcGFP1-Nuc; kanamicina (50 µg/ml, Sigma) per pEGFP-N1]. Le piastre sono state incubate a 37°C per 16-18 ore. Il giorno seguente, per verificare l'esito del clonaggio, sono state prelevate alcune colonie dalla piastra e coltivate in terreno liquido.

### 3.3.6) Verifica delle colonie batteriche trasformate

Ciascuna singola colonia prelevata da una piastra (non più vecchia di un mese) è stata inoculata in 3 ml di terreno LB supplementato con l'antibiotico appropriato (50 µg/ml) e le colture sono state incubate a 37°C per 16-18 ore in agitazione a 225 rpm.

#### a) Estrazione di DNA plasmidico

Per l'estrazione del DNA plasmidico è stato utilizzato il *QIAprep Spin Plasmid Miniprep kit* (QIAGEN), secondo il protocollo consigliato dalla ditta. La procedura prevede la lisi in ambiente alcalino dei batteri, seguita dalla neutralizzazione e precipitazione del DNA ad alto peso molecolare mediante centrifugazione in condizioni di elevata concentrazione salina. Il DNA plasmidico, rimasto in soluzione e carico negativamente, si lega a gruppi carichi positivamente e fissati su una membrana di resina e viene poi eluito in un volume adeguato di acqua priva di enzimi degradanti il DNA o di tampone.

Brevemente, il protocollo prevede di centrifugare la coltura batterica per 1 minuto a 13000 rpm, eliminare il sovrantante e risospingere il *pellet* in 250 µl di tampone P1 (*resuspension buffer*: 50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNasiA) che permette la digestione di tutti gli RNA presenti nelle cellule. Vengono quindi aggiunti 250 µl di tampone P2 [*lysis buffer*: 200mM NaOH, 1% SDS (p/v)] e la soluzione viene miscelata capovolgendo per 3-4 volte la provetta, evitando il vortex per non frammentare il DNA cromosomale. Questo passaggio provoca la denaturazione di DNA e proteine e la solubilizzazione delle membrane.

Si procede con l'aggiunta di 350 µl di tampone N3 (*neutralization buffer*: 3M potassio acetato, pH 5.5), che consente la rinaturazione selettiva del solo DNA plasmidico, si centrifuga per 10 minuti alla massima velocità (13000 rpm) e il sovrantante

(contenente il DNA plasmidico) viene trasferito in una micro colonna QIAprep. Dopo una centrifugazione di un minuto, un lavaggio con 750 µl di tampone PE ed un'ulteriore centrifugazione, la micro colonna viene trasferita su una provetta da 1.5 ml e il DNA plasmidico viene eluito aggiungendo 35 µl di tampone EB (*elution buffer*: 10mM Tris·Cl, pH 8.5) e centrifugando per 1 minuto.

Al fine di ottenere quantità più elevate di DNA plasmidico, in alcuni casi è stato adoperato il *QUIAGEN Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN). I batteri contenenti il plasmide di interesse sono stati inoculati in 500 ml di terreno LB (addizionato dell'appropriato antibiotico) e lasciati crescere per tutta la notte a 37°C in agitazione. Il giorno successivo la coltura è stata centrifugata per 20 minuti a una velocità di 10000 rpm, e il DNA plasmidico è stato poi estratto dal *pellet*, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice del *kit*.

Il plasmide pIRES2-AcGFP1-Nuc è stato preparato in larga scala mediante il sistema *Endofree Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. L'utilizzo di tale *kit* consente di ottenere un DNA plasmidico privo di endotossine, condizione necessaria per la trasfezione cellulare mediante il sistema Amaxa. L'assorbanza di ciascuna preparazione plasmidica è stata misurata allo spettrofotometro, seguendo la procedura descritta precedentemente.

### ***b) Digestione e sequenziamento degli inserti***

Il DNA plasmidico (3 µl di miniprep) è stato digerito per 1 ora a 37°C con gli opportuni enzimi di restrizione (Tab. 10). La reazione di digestione è stata quindi analizzata su gel di agarosio all'1%, per verificare la presenza o meno dell'inserto nelle diverse colonie batteriche. Il finale sequenziamento diretto ha permesso di controllare che non siano state inserite mutazioni puntiformi durante la reazione di amplificazione del frammento clonato e che i tag siano stati inseriti *in frame*.

Per il sequenziamento dei costrutti pRSPO1, pRSPO1-IRES2-GFP e pRSPO1-HA (wt e mut) sono stati utilizzati i seguenti *primer* interni al plasmide pcDNA3.1(+):

T7 (F): 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

SP6 (R): 5' - ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA - 3'

Per il sequenziamento del costrutto pRSPO1-GFP (wt e mut) sono stati invece usati i seguenti *primer*:

RSPO1cDNA-GFP-XhoI(F) e RSPO1cDNA-GFP-KpnI(R): vedi Tabella 9

RSPO1-RT 6/7(R): vedi Tabella 15

RSPO1-oligo6(F): 5' – ATG CAA GAT CGA GCA CTG TG – 3'

EGFP-1(R): 5' – TGA ACT TCA GGG TCA GCT TG – 3'

### 3.3.7) Costruzione del vettore pRSPO1-IRES2-GFP mediante *Topo TA Cloning*

La tecnica del *Topo TA Cloning* sfrutta l'azione di una topoisomerasi legata covalentemente alle due estremità del vettore aperto. Quando il DNA proveniente da una PCR, con delle estremità di Adenina, si appaia al vettore con delle estremità di Timina, la topoisomerasi lega le due estremità e si allontana dal vettore, in modo tale che la reazione sia praticamente irreversibile (Fig. 20). Il plasmide *pCR2.1-TOPO vector* è stato utilizzato nella strategia di clonaggio adottata per creare i costrutti pRSPO1-IRES-GFP (wt e mut).

La CDS di *RSPO1* wt e mut è stata ottenuta come riportato nel paragrafo 3.3, utilizzando i *primer* RSPO1cDNA-KpnI(F) e RSPO1cDNA-XhoI(R). Poiché le polimerasi *proofreading*, a differenza delle *Taq* polimerasi, non possiedono attività adenilante in 3', prima di procedere con la reazione di clonaggio è stata effettuata una reazione di 3' *A-overhangs*, per permettere l'aggiunta di una singola deossiadenosina (A) all'estremità 3' del prodotto di PCR. La reazione prevedeva l'aggiunta di 1 µl di *Taq* polimerasi al prodotto finale di PCR e un'incubazione di 10 minuti a 72°C. È stata poi effettuata una reazione di purificazione del prodotto di PCR utilizzando il sistema *microCLEAN* (Microzone Ltd) seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Il prodotto di PCR purificato è stato quindi clonato nel vettore plasmidico pCR2.1-TOPO, utilizzando il TOPO-TA *cloning kit* (Invitrogen), secondo le istruzioni della casa produttrice. Per la trasformazione del costrutto sono state utilizzate le cellule competenti TOP10 fornite dal *kit*, come descritto nel paragrafo 3.6. Per tagliare l'inserto (wt e mut) dal vettore pCR2.1-TOPO e inserirlo in pIRES2-AcGFP1-Nuc è stato utilizzato l'unico enzima di restrizione compatibile tra i due plasmidi, *EcoRI*, e la stessa ligasi utilizzata in precedenza (vedi paragrafo 3.5). Una volta selezionate le colonie ricombinanti positive per l'inserto, per individuare i cloni contenenti l'inserto nel giusto orientamento è stato utilizzato l'enzima di restrizione *SacI*.

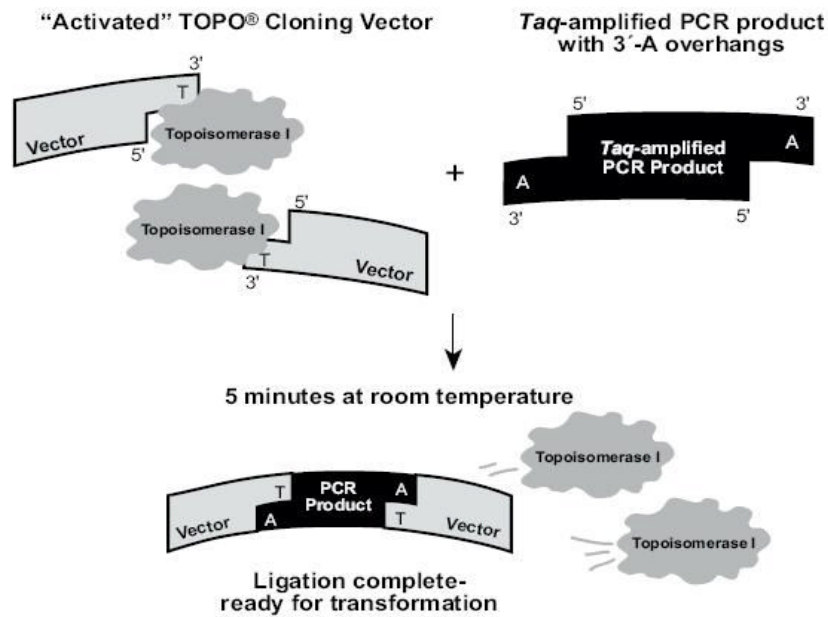


Fig. 20: Reazione di ligazione tra il prodotto di PCR e il vettore TOPO.

### 3.3.8) Vettori di espressione per la $\beta$ -catenina e il promotore TCF

Il vettore di espressione pCMV·SPORT6, contenete la sequenza codificante del gene *CNNTB1* ( $\beta$ -catenina) (IMAGE Consortium CloneID 6151332), ed il vettore TOPFLASH, contenente la sequenza promotore TCF (*Transfection grade T-cell factor*) a monte della sequenza del gene luciferasi, sono stati gentilmente forniti dal prof. John Achermann (Institute of Child Health - UCL, Londra, Inghilterra).

### 3.3.9) Conservazione dei cloni ricombinanti

Dopo aver individuato i cloni ricombinanti contenenti l'inserto *wild-type* o mutato, questi sono stati piastrati nuovamente su piastre LB Agar supplementate con l'antibiotico di selezione ed incubate una notte a 37°C. Il giorno dopo sono state allestite un minimo di 2 colture liquide per ciascun clone selezionato. Dopo le 16-18 ore di incubazione, per la conservazione a lungo termine di colture di *E.coli*, 2 ml di coltura sono stati centrifugati a 13000 rpm per 1 minuto. Il *pellet* è stato risospeso in 1 ml di LB supplementato con 7% (v/v) DMSO (dimetilsolfossido), vortexato e conservato immediatamente a -80°C.

### 3.4) TECNICHE BIOCHIMICHE

#### 3.4.1) Estrazione e quantificazione di proteine

Per l'estrazione delle proteine totali, le cellule sono state lavate due volte in 1x CMF-PBS ( $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  free-PBS) freddo e lisate con RIPA buffer [150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-HCl pH 8, 0.5% deossicolato di sodio, 0.1% SDS, 0.2mM PMSF e 1x inibitori delle proteasi (*CompleteMini EDTA free*, Roche)] per 15 minuti in ghiaccio. La quantità di RIPA buffer utilizzata era pari a tre volte il volume del *pellet* cellulare. I lisati sono stati centrifugati a 14000 g per 10 minuti a 4°C ed il supernatante recuperato conservato a -80°C.

Per l'estrazione separata delle proteine citoplasmatiche e nucleari, circa  $10^7$  cellule sono state lavate in 1x CMF-PBS freddo, centrifugate ed il *pellet* cellulare (circa 100 µl) è stato lisato in 1 ml buffer A freddo (10mM Hepes pH 7.9, 10mM KCl, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 0.5mM PMSF, 1x inibitori delle proteasi) per 20 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 12000 g per 45 secondi a 4°C, il soprannatante (frazione citoplasmatica) è stato rimosso ed il *pellet* di nuclei lavato in 500 µl di buffer A freddo + 0.6% NP-40. I nuclei sono stati centrifugati a 12000 g per 45 secondi a 4°C e risospesi in 100 µl di buffer C freddo (soluzione ad alta concentrazione salina costituita da 20mM Hepes pH 7.9, 420mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 1x inibitori delle proteasi) per 30 minuti in ghiaccio, agitando il campione sul *vortex* per 15 secondi ogni 10 minuti in modo da rompere bene le membrane nucleari. Durante questa fase la frazione citoplasmatica è stata centrifugata a 12000 g per 20 minuti a 4°C: in questo modo le membrane, che vanno sul fondo, sono state eliminate, e si è recuperato l'estratto citoplasmatico (soprannatante). L'estratto nucleare è stato ottenuto dopo un'ultima centrifugazione della soluzione C/nuclei a 12000 g per 30 minuti a 4°C. Entrambe le frazioni sono state conservate a -80°C per un massimo di 4 mesi.

La concentrazione delle proteine è stata determinata attraverso il metodo Bradford (1976). Questo è un test colorimetrico standard, nel quale il legame del colorante alle proteine produce un prodotto colorato che assorbe luce ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione dei campioni proteici viene determinata comparando le assorbanze dei campioni con quelle di proteine standard, tipicamente BSA (albumina di siero bovino). Sono state preparate 6 soluzioni standard di BSA (100, 250, 500, 750,

1000, 1500 µg/ml), un “bianco” di riferimento e 2 diluizioni di ciascun estratto proteico (1:10, 1:50, v/v). 20 µl di ciascuna soluzione e 1 ml di *BioRad Protein Assay Buffer* (Bio-Rad) vengono aggiunti in ciascuna cuvetta. Il buffer si lega alle proteine, a livello dei residui di arginina, triptofano, tirosina, istidina e fenilalanina, in forma anionica, con un'assorbanza massima registrabile a 595 nm (blu). Il colorante libero in soluzione rimane in forma cationica, con una assorbanza massima a 470 nm (rosso). Dopo una incubazione di 5 min, per ciascun campione è stata misurata l'assorbanza a 595 nm, usando uno spettrofotometro. La concentrazione proteica degli estratti è stata estrapolata dalla curva standard ( $y = mx + c$ ), costruita ponendo in ordinata i valori di assorbanza registrati e in ascissa i relativi microgrammi di BSA.

### 3.4.2) Elettroforesi di proteine mediante gel di SDS-poliacrilammide

L'elettroforesi mediante gel di SDS-poliacrilammide (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) è una tecnica, originalmente descritta da Davis (1964), Ornstein (1964) e Laemmli (1970), che permette la risoluzione delle proteine denaturate secondo il loro peso molecolare.

Le proteine vengono separate su un gel di tipo discontinuo, costituito cioè da due regioni:

- *Stacking gel* (gel di caricamento): la parte superiore del gel, che permette di concentrare le proteine in una stretta banda, ha una concentrazione di poliaccrilammide del 5% ed un pH 6.8;
- *Resolving* (o *running*) *gel* (gel di corsa): la parte inferiore del gel, che permette la separazione delle diverse specie proteiche in singole bande, ha un pH di 8.8 ed una concentrazione di poliaccrilammide variabile in base al peso molecolare delle proteine da separare e analizzare.

In questo caso è stato utilizzato un *resolving gel* a due differenti concentrazioni: 9% (per individuare proteine con un peso molecolare di 30-80kDa) e 11% (per proteine con un peso molecolare di 20-60kDa).

Componenti	9% Gel	11% Gel
soluzione di acrilammide/bioacrilammide al 30%	9 %	11 %
Tris pH 8.8	375mM	375mM
SDS	0.1 %	0.1 %
TEMED	0.1 %	0.1 %



Tutti i reagenti per il *resolving gel* sono stati mescolati e versati in una vasca verticale per elettroforesi per minigel (1.5 mm di profondità, 6 cm di altezza e 8 cm di larghezza). Una soluzione di metanolo al 50% è stata poi aggiunta per eliminare l'ossigeno ed il gel è stato lasciato per 20 minuti a polimerizzare. Rimosso il metanolo, i reagenti per lo *stacking gel* al 5 % (4.95% acrilammide, 125mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% TEMED, 0.1% APS, ddH<sub>2</sub>O per portare a volume di 10ml) sono stati mescolati e caricati sopra il *resolving gel* ed è stato inserito un pettine. Avvenuta la polimerizzazione dello *stacking gel*, il pettine è stato rimosso e i pozzetti sono stati lavati con il *running buffer* (25mM Tris, 190mM glicina e 0,1% SDS).

Un'aliquota (20-100 µg) di ciascun estratto proteico è stata diluita 9:1 (v/v) con ZAP 10x (0.25M Tris-HCl pH 6.8, 36% glicerolo, 8% SDS, 0.2% blu di bromofenolo, 20% β-mercaptoetanololo). Il β-mercaptoetanololo serve a ridurre i ponti disolfuro intermolecolari, mentre l'SDS conferisce una carica negativa alle proteine, garantendo loro una migrazione anionica. I campioni e 3 µl di marcatore di pesi molecolari (*ColorBrust Electrophoresis Marker*, Sigma Aldrich) sono stati denaturati a 100°C per 4 min, trasferiti in ghiaccio, caricati nei pozzetti del gel e fatti correre nel *running buffer* (tampone di corsa) per circa 3 ore a 70 V utilizzando un mini-apparato elettroforetico (Hofer Mighty Small SE 250).

### 3.4.3) Western blotting

Il Western blotting è una tecnica biochimica che viene utilizzata per determinare la presenza di specifiche proteine in un estratto cellulare o di tessuto e per studi sull'espressione genica. La strategia su cui si basa questo metodo è di separare fra di loro le varie classi di proteine soltanto in base alle dimensioni (o peso molecolare) tramite SDS-PAGE. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, come una membrana di nitrocellulosa o di polivinilidene difluoruro (PVDF), e riconosciute mediante l'utilizzo di un anticorpo primario specifico (Sambrook *et al.*, 1989). Le membrane di nitrocellulosa, o di PVDF, legano le proteine per interazioni elettrostatiche e idrofobiche. Inoltre, presentano dei pori che hanno un diametro che diminuisce progressivamente nell'attraversamento della membrana: il diametro è maggiore nella parte esposta al gel e minore nella parte esposta all'anodo favorendo il blocco delle proteine all'interno della membrana. La presenza della proteina di interesse viene evidenziata mediante l'uso di un anticorpo primario, che riconosce e lega solo il

suo antigene specifico, e di un anticorpo secondario, che lega l'anticorpo primario e che è coniugato con la perossidasi (HRP). La reazione con un substrato chemiluminescente (ECL) porta all'emissione di luce che impressiona una lastra fotografica (Fig. 21).

In particolare, dopo aver separato le proteine mediante SDS-PAGE, queste sono state trasferite su una membrana di PDVF (Millipore) mediante un apparato per l'elettroblotting (Mini Trans-Blot Bio-Rad) applicando una corrente costante di 230 mA per 90 minuti a 4°C. La membrana di PDVF e 6 pezzi di carta umida 3MM Whatman sono stati tagliati con le stesse dimensioni del *running gel*. La membrana di PDVF è stata immersa in 100% metanolo; successivamente il *running gel*, la membrana ed i pezzi di carta umida sono stati immersi in *transfer buffer* (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanolo) freddo per 5 minuti. La membrana di PDVF è stata posizionata sopra a tre strati di carta umida 3MM Whatman; è stato poi aggiunto il gel, seguito da altri tre strati di carta umida. Normalmente il gel viene posto al catodo e la membrana all'anodo. Le proteine trasferite sono state colorate reversibilmente ponendo la membrana nella soluzione *Ponceau S* (Sigma Aldrich) a T.A. per 5 min al fine di controllare la quantità dei campioni. La colorazione è stata rimossa lavando la membrana in tampone TBS-T [*Tris Buffer of Sodium with Tween* (100mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)]. La membrana è stata posta in 5% latte non grasso/TBS-T (p/v) per 1 ora a T.A., al fine di bloccare i siti aspecifici. Dopo un breve lavaggio in TBS-T, la membrana è stata incubata con latte al 2% contenente l'anticorpo primario specifico, a T.A. per 1-2 ore, o in camera fredda *overnight* (o.n.), in costante *shaking* (100 rpm). Ogni anticorpo primario è stato utilizzato ad una specifica diluizione (Tab. 11), testata preliminarmente con diluizioni seriali dello stesso. Dopo tre lavaggi da 10 minuti in TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 ora a T.A. a 100rpm, con l'appropriato anticorpo secondario, coniugato all'enzima HRP [Perossidasi di Rafano (Jackson Laboratories)], diluito 1:5000-1:10000 in latte all'1%. Dopo sei lavaggi da 5 minuti a 100 rpm in TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 minuto con il substrato chemiluminescente necessario per la rilevazione (*ECL Solution*, GE Healthcare). La presenza della proteina è rilevata in modo indiretto con il sistema ECL che contiene luminolo, il quale è convertito dall'enzima perossidasi, in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in un composto luminescente. La membrana è stata esposta a tempi differenti (da pochi secondi a 5 minuti) e le lastre (CL-XPosure Film, Pierce) sono state opportunamente sviluppate.

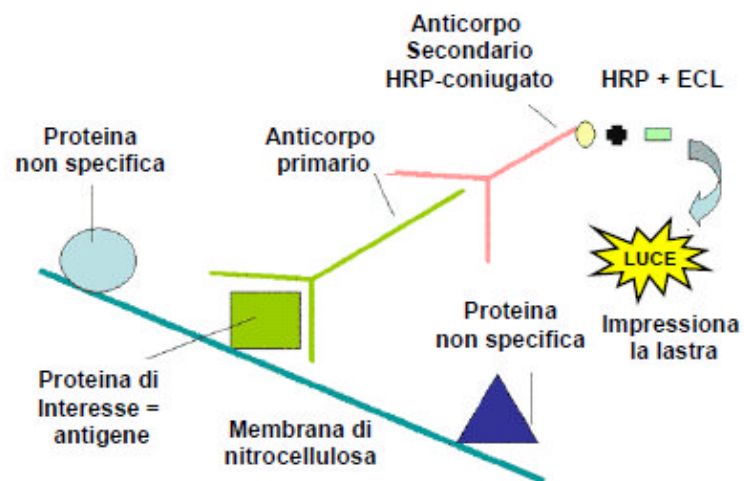


Fig. 21: Schema rappresentativo del Western blotting.

Anticorpo primario	Ditta produttrice	Diluizione WB
Anti HA monoclonale di topo, F-7	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Anti $\beta$ -catenina monoclonale di topo, E-5	Chemicon	1:300
Anti CMW policlonale	Ihara et al., 2005	1:5000
Anti R-spondinal policlonale di capra	R&D System	1:300
Anti $\beta$ -actina monoclonale di topo, AC-15	Sigma Aldrich	1:6500
Anti fascina monoclonale di topo, 55K-2	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

Tab. 11: Elenco degli anticorpi primari utilizzati per gli esperimenti di Western blotting.

### 3.5) IMMUNOISTOCHEMICA CELLULARE

#### 3.5.1) Immunofluorescenza indiretta

La tecnica dell'immunofluorescenza permette di evidenziare la distribuzione di una proteina in cellule in coltura o in tessuti mediante riconoscimento di un epitopo della molecola da parte di un anticorpo specifico. L'anticorpo primario viene poi rilevato da un altro anticorpo che può essere coniugato con un tracciante. I traccianti utilizzati nella

metodica dell'immunofluorescenza sono i fluorocromi, molecole in grado di assorbire la luce di una certa lunghezza d'onda e di riemetterla a lunghezza d'onda superiore e contenuto energetico minore. Ogni fluorocromo è caratterizzato da un suo specifico spettro di assorbimento e di emissione che dipendono dalla struttura delle molecole di cui è costituito. Se il tracciante è legato direttamente all'anticorpo specifico per l'antigene studiato, si parla di immunofluorescenza diretta; se invece esso è legato a un secondo anticorpo diretto contro quello che si lega specificamente all'antigene in esame, si parla di immunofluorescenza indiretta. L'uso combinato di due o tre differenti fluorocromi simultaneamente permette di osservare diverse proteine colorate in maniera differente che possono essere viste separatamente o simultaneamente usando speciali filtri.

Le cellule (HEK293T, CHO, NCI-H295R, NT2/D1) che dovevano essere analizzate al microscopio a fluorescenza sono state piastrate in *8-chamber CultureSlide* (BD Falcon) e trasfettate secondo il protocollo stabilito. Dopo 24-48 ore dalla trasfezione, il terreno è stato rimosso, le cellule sono state lavate due volte con PBS 1x e fissate con una soluzione al 4% formaldeide in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente (T.A.). Dopo 3 lavaggi in PBS 1x di 5 minuti ciascuno, le cellule sono state trattate per 20 minuti con una soluzione allo 0.3% Triton X-100/PBS, una sostanza che permette di permeabilizzare le cellule eucariotiche, consentendo l'ingresso intracellulare dell'anticorpo. Sono seguiti un lavaggio in PBS 1x ed una incubazione con *blocking buffer* (una soluzione all'1% BSA in PBS) per 30 minuti, che blocca i siti antigenici aspecifici. 100 µl dell'anticorpo primario specifico, opportunamente diluito (Tab. 12) in *blocking buffer*, sono stati posti in ciascuna *chamber* e lasciati per 2 ore (o *overnight*) a T.A. Le cellule sono state lavate tre volte in 1% BSA ed incubate al buio per un'ora, con un opportuno anticorpo secondario [coniugato al fluorocromo *Texas Red* o alla fluoresceina isotiocianato (FITC)] diluito in 1% BSA/PBS. Sono stati quindi effettuati 3 lavaggi in *blocking buffer*, cui ha seguito l'apposizione di 7 µl per *chamber* di *Vectashield* (Vector Laboratories), contenente il colorante fluorescente DAPI; i preparati sono poi stati coperti da un vetrino copri-oggetto. I vetrini sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza *Zeiss Axioskop*, e le immagini acquisite mediante uso di fotocamera digitale collegata ad un computer e al microscopio (*ZeissAxiocam*).

<b>Anticorpo primario</b>	<b>Ditta produttrice</b>	<b>Diluizione IF</b>
Anti HA policlonale di coniglio	Sigma	1:25
Anti RSPO1 monoclonale di topo/uomo	R&D System	1:200
Anti nucleolina policlonale di coniglio $\alpha$ -C23	Santa Cruz Biotechnology	1:100
<b>Anticorpo secondario</b>	<b>Ditta produttrice</b>	<b>Diluizione IF</b>
Anti Ig di topo FITC policlonale	Dako Cytomation	1:100
Anti Ig di coniglio TRITC policlonale	Dako Cytomation	1:100

Tab. 12: Elenco degli anticorpi primari e secondari utilizzati per gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta.

### 3.6) TRASFEZIONE DI LINEE CELLULARI E STUDI FUNZIONALI

#### 3.6.1) Trasfezione transiente mediante lipofezione

La lipofezione è un metodo che prevede l'incorporazione del DNA in vescicole lipidiche artificiali, i liposomi, che si fondono poi con la membrana cellulare riversando il loro contenuto direttamente nel citoplasma. La trasfezione delle linee cellulari tsa201, HEK293T, CHO, o NCI-H295R è stata effettuata utilizzando il reagente *Lipofectamine2000* (Invitrogen) secondo il protocollo specifico. Tutte le trasfezioni degli esperimenti riguardanti i saggi luciferasi sono state condotte in piastre petri da 96 pozzetti (TPP), le trasfezione per ottenere RNA totale e/o proteine sono state effettuate in piastre petri da 24 pozzetti (TPP), mentre per le trasfezioni degli esperimenti di immunofluorescenza indiretta sono state utilizzate le *8-chamber CultureSlide* (BD Falcon). In Tabella 13 sono riportate le quantità di plasmidi, terreno e reagente *Lipofectamine2000* utilizzate nei diversi casi. Nel caso di trasfezioni con più di un plasmide, la quantità di DNA totale è stata mantenuta costante. Il protocollo generale prevede di seminare le cellule 24 ore prima della trasfezione in terreno DMEM supplementato con 10% FBS e senza antibiotici, in numero adeguato ad ottenere il giorno seguente una confluenza dell'80%. Un quantitativo opportuno di plasmidi specifici è stato diluito in terreno Opti-MEM (GIBCO); opportune quantità di Opti-MEM e del reagente *Lipofectamine 2000* sono state mescolate in un tubo da 1.5 ml e poi incubate 5 minuti a T.A. Le due soluzioni sono state unite, mescolate lentamente ed incubate 20 minuti a T.A., per permettere la formazione dei liposomi contenenti il DNA. Infine la soluzione di trasfezione è stata aggiunta nei pozzetti contenenti le

cellule, e queste sono state incubate a 37°C. Le cellule sono state poi raccolte a 24-48 ore dalla trasfezione ed utilizzate per i diversi tipi di esperimenti.

Piastra	Area del pozzetto (cm <sup>2</sup> )	DMEM (µl)	Opti-MEM (µl)	DNA (µg)	Lipofectamine2000 (µl)
24 pozzetti	2	500	50	0.8	2
8-chamber	0.7	500	50	0.8	2
96 pozzetti	0.3	150	25	0.2	0.5

Tab. 13: **Quantità utilizzate di ciascun reagente per i diversi esperimenti di lipofezione.**

### 3.6.2) Trasfezione transiente mediante nucleofezione

Le cellule NT2/D1 sono state trasfettate con il plasmide pIRES2-AcGFP1-Nuc contenente l'inserto RSPO1 (wt o mut) mediante nucleofezione utilizzando il sistema Amaxa (Amaxa Biosystems), che consente di ottenere un'efficienza di trasfezione notevolmente superiore ai metodi classici. La nucleofezione è un metodo non virale, basato su una combinazione unica di parametri elettrici e soluzioni specifiche per i diversi tipi cellulari. Le condizioni di nucleofezione sono state precedentemente ottimizzate (Tab. 14). Dopo averle staccate e contate mediante ematocitometro, le cellule sono state centrifugate a 90g per 10 minuti, il terreno è stato rimosso, il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 100 µl di reagente di nucleofezione e miscelato con il corrispondente DNA plasmidico. La soluzione è stata trasferita in una cuvetta, inserita nell'elettroporatore (*Amaxa Nucleofector Device II*) e le cellule sono state nucleofettate. 0.5 ml di terreno DMEM preriscaldato sono stati aggiunti all'interno della cuvetta e gli 0.6 ml totali sono stati trasferiti in una piastra petri da 6 pozzetti contenente 3 ml di terreno per pozzetto. Le cellule trasfettate sono state incubate a 37°C per 18-24 ore.

Numero di cellule	1x10 <sup>6</sup> per trasfezione
Concentrazione DNA plasmidico	3.5 µg per trasfezione
Reagente	soluzione L
Programma di nucleofezione	X-001
Condizioni di incubazione	3ml DMEM, 37°C, 10% CO <sub>2</sub>
Tempo di incubazione	24 ore

Tab. 14: **Parametri della reazione di nucleofezione.**

### 3.6.3) Saggio luciferasi

Il saggio di attività della luciferasi è un *reported-based assay* che utilizza come gene *reporter* la luciferasi di Lucciola (*Firefly luciferase*). I geni *reporter* codificano per proteine che possiedono una particolare attività enzimatica o che emettono luce in fluorescenza se vengono eccitate ad una certa lunghezza d'onda. Essi sono inseriti in costrutti che possono avere diverse caratteristiche ed essere finalizzati a diversi scopi (localizzare una proteina in diversi compartimenti cellulari; verificare la trasfezione di cellule; saggiare una possibile attività regolatoria di un frammento di DNA).

I sistemi *reporter* più comuni sono la luciferasi di Lucciola, la fosfatasi alcalina secreta (SEAP), la Cloramfenicolo Acetiltransferasi (CAT), la  $\beta$ -galattosidasi e la *Green Fluorescent Protein* (GFP). La luciferasi di Lucciola è un monomero di 61 kDa che catalizza la mono-ossigenazione della luciferina di coleottero (Fig. 22).

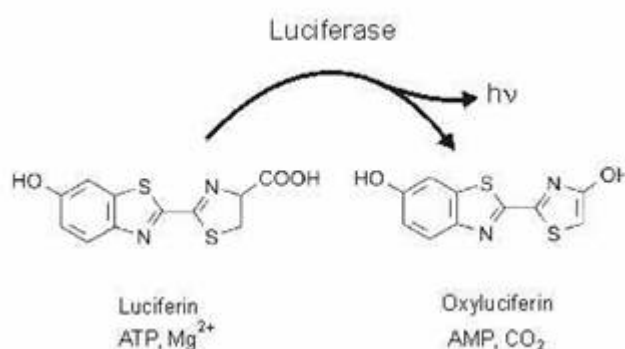


Fig. 22: **Reazione catalizzata dalla luciferasi.** La mono-ossigenazione della luciferina è catalizzata dalla luciferasi in presenza di  $Mg^{2+}$ , ATP e ossigeno molecolare.

Il vettore contenente il gene *reporter* viene trasfettato nelle cellule. Dopo un certo tempo le cellule sono lisate e nell'estratto cellulare si introducono: luciferina (il substrato della luciferasi),  $Mg^{2+}$  e un eccesso di ATP. L'enzima luciferasi, eventualmente espresso, catalizza la carbossilazione ossidativa della luciferina causando luminescenza. L'efficienza di transattivazione viene misurata come luminescenza ottenuta: l'entità dell'espressione dell'enzima è direttamente proporzionale alla luminescenza.

Negli esperimenti effettuati, la miscela di co-trasfezione conteneva due vettori *reporter*: il vettore TOPFLASH ed il plasmide della luciferasi di Renilla, pRLSV40 (Promega), la quale emette luminescenza a partire da un substrato differente da quello della luciferasi

di Lucciola. Il vettore TOPFLASH possiede la luciferasi di Lucciola sotto il promotore TCF; ciò consente di saggiare l'attività del promotore valutando l'intensità dell'attività luciferasica in diverse condizioni di trasfezione cellulare. Il costrutto *reporter* ad espressione costitutiva pRLSV40 Renilla, invece, funge da controllo interno per normalizzare i valori rilevati, in quanto sotto il controllo di un promotore virale costitutivo (CMV).

Per effettuare i saggi di attività del *reporter* è stato usato il *kit* commerciale *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) che contiene i substrati per i due *reporter*: luciferina e celenterazina. Il saggio luciferasi è stato effettuato 24 ore dopo la trasfezione, in accordo con il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Le cellule tsa201, precedentemente seminate in piastre da 96 pozzetti (TPP) e trasfettate con il reagente *Lipofectamine2000* (Invitrogen), sono state lisate in 25  $\mu$ l di *Passive Lysis Buffer* 1x (fornito dal kit Promega) per ciascun pozzetto, a temperatura ambiente e in costante agitazione per 30 minuti. 20  $\mu$ l del lisato sono stati trasferiti in una piastra di lettura. La piastra e i reagenti (luciferina e soluzione *Stop&Glo*, che blocca la reazione precedente e fornisce il substrato per la Renilla) sono stati inseriti nel luminometro, che aggiunge i reagenti a ciascun campione in maniera automatizzata; quindi le attività della luciferasi di Lucciola e di Renilla sono state misurate utilizzando il luminometro *FLUOstar Optima fluorescence microplate reader* (BMG Labtech). Il rapporto tra l'attività della luciferasi e quella della Renilla è stato espresso come Unità Luciferasi Relative (RLU).

### 3.7) CITOFLUORIMETRIA

#### 3.7.1) FACS (*Fluorescence Activated Cells Sorter*)

La citofluorimetria, o citofluorimetria a flusso, è una tecnica che analizza singole cellule mediante la rilevazione della luce emessa da fluorocromi coniugati ad antigeni cellulari o proteine sovraespresse. L'analisi mediante FACS è un tipo particolare di citometria di flusso. Si tratta di un metodo che permette di discriminare le caratteristiche delle singole cellule in una popolazione eterogenea, sulla base della deviazione della luce ed emissione in fluorescenza (Fig. 23). Poiché la proteina GFP (*Green Fluorescent Protein*) ha la peculiare caratteristica di assorbire la luce nel campo del blu ( $\lambda=395$ ) e



riemetterla nel campo del verde ( $\lambda=509$ ), le cellule che esprimono la proteina, irradiate dai raggi UV, appaiono di colore verde fluorescente.

Per selezionare le cellule NT2/D1 efficacemente trasfettate con i plasmidi RSPO1 pIRES2-AcGFP1-Nuc *wild-type* o mutato (+GFP), 18-24 ore dopo la nucleofezione le cellule sono state lavate in PBS 1x, raccolte, risospese in 350  $\mu$ l di terreno DMEM ed acquisite al citofluorimetro (Beckman Coulter MoFloXDP Cell Sorter). In questo modo sono state escluse le cellule che non esprimevano GFP (-GFP), i detriti cellulari e le cellule morte o morenti a causa della nucleofezione.

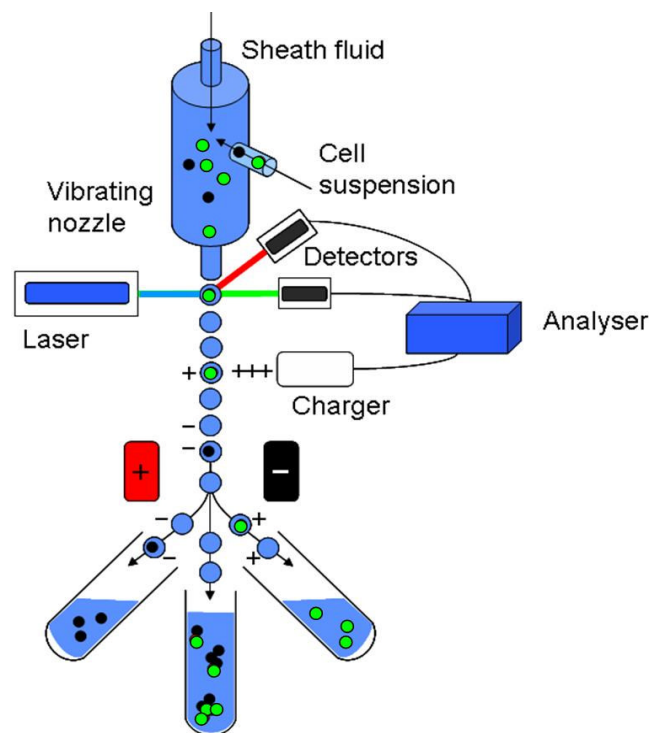


Fig. 23: Rappresentazione schematica della tecnica del FACS.

### 3.8) ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

La RT-PCR e i *microarray* sono tra i più comuni metodi utilizzati per la caratterizzazione dei *pattern* di espressione genica. L'RNA messaggero (mRNA) può essere estratto da cellule o da tessuti e utilizzato come template per la sintesi di DNA complementare (cDNA) mediante l'enzima trascrittasi inversa. Il cDNA può quindi essere utilizzato per le diverse metodiche.

### 3.8.1) Estrazione e quantificazione di RNA totale

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata con il reagente TRIzol (Invitrogen), una soluzione monofasica di fenolo e guanidinio isotiocianato, seguendo il protocollo consigliato e utilizzando tutti i reagenti in condizioni *RNase-free*. L'isotiocianato di guanidina è in grado di provocare simultaneamente la distruzione delle cellule e l'inattivazione delle RNasi che si liberano durante la lisi cellulare; questo composto ha infatti forte azione denaturante su tutte le proteine e causa la loro dissociazione dagli acidi nucleici e la distruzione delle strutture cellulari.

Per cellule che crescevano in monostrato, 1 ml di TRIzol/10 cm<sup>2</sup> è stato aggiunto direttamente sulla piastra di coltura dopo aver rimosso il terreno; per cellule in sospensione, 1 ml di TRIzol è stato aggiunto su un *pellet* di 5-10x10<sup>6</sup> cellule. Dopo aver lisato le cellule mediante ripetuti passaggi nella pipetta, il lisato è stato trasferito in tubi da 2 ml e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente (T.A.). Dopo avere aggiunto 200 µl di cloroformio/1 ml di TRIzol, i tubi sono stati agitati per 15 secondi sul vortex, incubati per 3 minuti a T.A. e centrifugati a 12000 g per 15 minuti a 4°C. Mediante centrifugazione si ottiene la separazione della soluzione in una fase acquosa soprastante contenente l'RNA, un'interfase contenente DNA, ed una fase organica sottostante di colore rossastro contenente fenolo, cloroformio e la componente proteica cellulare.

Dopo aver trasferito la fase superiore in un nuovo tubo, l'RNA è stato precipitato aggiungendo 500 µl di isopropanolo/1 ml di TRIzol utilizzato inizialmente. I campioni sono stati incubati per 10 minuti a T.A., centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C ed il *pellet* lavato con 1 ml di etanolo al 75%. Questo lavaggio aumenta la purezza dell'RNA, diminuendo la contaminazione salina. Dopo aver centrifugato a 12000 g per 5 minuti a 4°C, il *pellet* di RNA è stato lasciato asciugare brevemente, risospeso in 10-30 µl di H<sub>2</sub>O *RNasi-free* (a seconda della grandezza del *pellet*) ed incubato per 10 minuti a 55-60°C. L'RNA è stato conservato a -80°C.

Per l'estrazione dell'RNA totale da tessuto è stata utilizzata la metodica di Chomczynski e Sacchi (1987). I tessuti sono stati velocemente rimossi e incubati in ghiaccio secco per preservare l'integrità dell'RNA. Il tessuto è stato poi finemente sminuzzato con una lametta e risospeso in 1 ml di soluzione D denaturante (4M isotiocianato di guanidina, 25mM citrato di sodio pH 7.0, 0.5% *sarcosyl* e 0.1M β-mercaptoetanol). Il β-mercaptoetanol è un agente riducente che inibisce ulteriormente le RNasi. Alla soluzione è stato aggiunto un uguale volume di fenolo saturato con H<sub>2</sub>O,

1/10 di volume di sodio acetato 3M pH 6.8 e 1/5 di volume di cloroformio isoamilico 49:1. I campioni sono stati agitati sul *vortex*, lasciati in ghiaccio per 10 minuti e centrifugati a 10000 g per 20 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata trasferita in un nuovo tubo e l'RNA è stato precipitato aggiungendo un uguale volume di isopropanolo e lasciandolo tutta la notte a -20°C. Il giorno successivo, la soluzione è stata centrifugata a 10000 g per 20 minuti a 4°C in modo da ottenere il *pellet* di RNA, al quale sono stati aggiunti 400 µl di soluzione D e 400 µl di isopropanolo per 1 ora a -20°C. I campioni sono stati centrifugati a 10000 g per 20 minuti a 4°C ed il *pellet* lavato con 500 µl di etanolo freddo al 75%. Dopo aver centrifugato a 10000 g per 20 minuti a 4°C, il *pellet* è stato asciugato sotto cappa, risospeso in 25 µl di H<sub>2</sub>O priva di RNasi e incubato per 10 minuti a 55- 60°C. L'RNA è stato poi conservato a -80°C.

La quantificazione dell'RNA è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione a 260 nm utilizzando lo spettrofotometro *Nanodrop ND-1000* (Thermo Scientific), utilizzando 1 µl di campione per la lettura. Questo spettrofotometro permette di utilizzare meno materiale per l'esperimento e non necessita dell'uso di cuvette o capillari, perché il campione viene pipettato direttamente sulla superficie di misura. Non sono nemmeno necessarie diluizioni del campione e ciò consente di eseguire misure più rapide e in modo più semplice.

La concentrazione dell'RNA viene ricavata considerando che una soluzione con un valore della concentrazione pari a 40 µg/ml ha un assorbimento a 260 nm pari a 1. La purezza dell'RNA è stata determinata calcolando il rapporto tra le misure di assorbanza a 260 e 280 nm. Per essere considerati puri, i campioni devono presentare un OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> maggiore o uguale a 1.7 (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.8.2) RT-PCR

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) è un tipo di amplificazione che consente di ottenere molecole di DNA complementare a singolo filamento (cDNA) a partire da RNA messaggero, sfruttando l'azione dell'enzima trascrittasi inversa. Tale enzima, prodotto dai retrovirus, è capace di polimerizzare un filamento di DNA usandone uno di RNA come stampo. Questa tecnica può essere usata per verificare l'espressione di un gene in un specifico tessuto o linea cellulare. La sintesi del DNA può essere iniziata a

partire da *random hexamers* che si legano casualmente alle molecole di RNA, o da *primer poly(T)*, corti oligonucleotidi costituiti solo da desossitimidine, che si legano alle code 3' di poli(A) degli mRNA. Il prodotto della reazione è rappresentato da ibridi RNA-DNA, ed il cDNA prodotto viene usato come target per la successiva reazione di PCR.

Dopo l'estrazione dell'RNA, per eliminare possibili contaminazioni di DNA genomico è stata effettuata una digestione con Desossiribonucleasi I (Dnasi I), utilizzando il kit *Amplification Grade* (Invitrogen). La reazione conteneva 1 µg di RNA, 1 µl di enzima (1 U di enzima per g di RNA), 1 µl di tampone 10x (200mM Tris-HCl pH 8.4, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl), H<sub>2</sub>O *RNasi free* per portare a volume. Dopo un'incubazione di 15 minuti a T.A., l'enzima è stato inattivato aggiungendo 1 µl di EDTA 25mM e incubando la reazione a 65°C per 10 minuti.

Per la trascrizione inversa dell'RNA e l'amplificazione del cDNA sono stati utilizzati i reagenti inclusi nel *GeneAmp Gold RNA PCR Core Kit* (Applied Biosystems). La sintesi del cDNA è stata effettuata in una miscela di reazione composta da 1 µg di RNA, 4 µl di MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µl di 10x PCR Buffer II, 2 µl della miscela di dNTPs (10mM), 1 µl di RNase Inhibitor (20 U/µl), 1 µl di MuLV Reverse Transcriptase (50 U/µl), 1 µl di Oligo d(T)16 (50 µM) e H<sub>2</sub>O priva di RNasi fino a portare il volume a 20 µl. La miscela è stata incubata a 42°C per 15 minuti, 99°C per 5 minuti e 5°C per 5 minuti in una macchina termostata (*GeneAmp 9700*, Applied Biosystems).

Per l'amplificazione di specifici cDNA, la miscela di reazione era costituita da 2 µl di cDNA, 5 µl di 10x PCR Buffer II, 3 µl di MgCl<sub>2</sub> (25mM), 5 µl di dNTPs (10mM), 1.25 µl di ciascun *primer* specifico (20 µM), 0.2 µl di *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (5U/µl), 32.3 µl di H<sub>2</sub>O (volume totale della reazione pari a 50 µl). Le condizioni di PCR adottate erano: 95°C per 5 minuti, un numero di cicli caratteristico per ciascuna coppia di oligonucleotidi composto da 95°C per 1 minuto, temperatura di *annealing* (T<sub>m</sub>) specifica per i diversi *primer* per 1 minuto e 72°C per 2 minuti. È seguita una fase di estensione finale di 10 minuti a 72°C. Un'identica reazione senza l'enzima (-RT) è stata condotta per verificare la presenza di DNA genomico nel campione di RNA. I *primer*, disegnati sulle sequenze dei geni *RSPO1*, *CTNNB1*, *WNT4*, *SOX9*, *GAPDH*, e le rispettive temperature di *annealing* sono riportati nella Tabella 15. Le coppie di *primer* sono state disegnate per legarsi a sequenze all'interno di diversi esoni o alla giunzione tra due esoni, in modo da poter distinguere amplificazioni da DNA genomico e

molecole di cDNA. Al termine della reazione, 10 µl di prodotto di PCR sono stati caricati su gel di agarosio all'1.5 % per studiare il *pattern* di migrazione.

Primer	Sequenza nucleotidica	Tm
RSPO1-RT 4(F)	5'-CCT GCT GAC GTG ACA AAA AG-3'	55°C
RSPO1-RT 5(R)	5'-ACT TGT TCA TGT CGG GGT TG-3'	55°C
RSPO1-RT 6-7(R)	5'-TCA CAT TGC GCA GGA CTA CT-3'	55°C
RSPO1-RT 8(R)	5' -TGT ATG CAT GGA TGG ATT GG- 3'	53°C
CTNNB1 (F)	5'-TCT TGG CTA TTA CGA CAG-3'	52°C
CTNNB1 (R)	5'-CCT CTA TAC CAC CCA CTT-3'	52°C
GAPDH (F)	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	60°C
GAPDH (R)	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'	60°C
WNT4 (F)	5'-CTG AAG GAG AAG TTT GAT GGT GCC-3'	60°C
WNT4 (R)	5'-GTG GAA TTT GCA GCT GCA GCG TTC-3'	60°C
SOX9 (F)	5'-GAA CGC ACA TCA AGA CGG GAG-3'	60°C
SOX9 (R)	5'-TCT CGT TGA TTT CGC TGC TC-3'	60°C

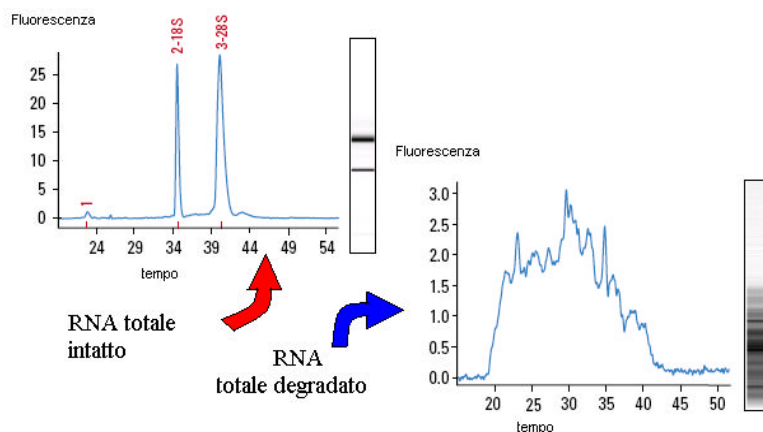
Tab. 15: Elenco dei *primer* utilizzati per gli esperimenti di RT-PCR.

### 3.8.3) Analisi di *microarray*

Il *microarray* è uno strumento per l'analisi dell'espressione genica che permette di confrontare migliaia di geni contemporaneamente.

RNA totale è stato prima estratto dalle cellule NT2/D1, positivamente trasfettate con i costrutti pRSPO1-IRES-GFP1 (*wild-type* o mutato) e selezionate mediante FACS, e poi quantificato allo spettrofotometro (Nanodrop) come descritto precedentemente. La qualità dell'RNA è uno dei fattori più importanti della qualità e attendibilità dei risultati di *microarray* e pertanto deve essere intatto e privo di contaminanti quali proteine, polisaccaridi o DNA.

La qualità di ogni campione di RNA è stata testata misurando il rapporto delle assorbanze A260/A280 e A260/A230 utilizzando il Nanodrop, mentre la loro integrità è stata valutata mediante elettroforesi usando il *chip RNA 6000 nano assay* associato allo strumento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), un dispositivo che sfrutta una corsa elettroforetica per separare le diverse parti dell'RNA totale (Fig. 24).



**Fig. 24: Rappresentazione schematica degli elettroferogrammi di RNA totale intatto e degradato, analizzato mediante lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer.**

Solo i campioni di RNA con un RIN (*RNA Integrity Number*) maggiore di 8 sono stati utilizzati per l'esperimento. Per l'analisi di *microarray*, i campioni sono stati analizzati presso l'*ICH Gene Microarray Centre* (UCL, London, UK) diretto dal Dr. Mike Hubank, utilizzando il sistema *Affy GeneChip Whole Transcript (WT) Sense Target (ST) arrays* (Affymetrix). Il *GeneChip Human Gene 1.0 ST array* offre una copertura dell'intero trascritto (28869 geni; 764885 differenti sonde, circa 26 sonde per ogni gene). Brevemente, il protocollo prevede la sintesi di una molecola a doppio filamento di cDNA a partire da 100 ng di RNA, mediante utilizzo di *random hexamers* "taggati" con la sequenza del promotore T7. La molecola di cDNA viene successivamente usata come template e amplificata dalla T7 RNA polimerasi, producendo molte copie di cRNA antisense. Nel secondo ciclo di sintesi del cDNA, i *random hexamers* sono utilizzati per innescare la trascrizione inversa del cRNA, ottenuto nel primo ciclo, al fine di produrre una molecola di DNA a singolo filamento con orientamento senso. Durante questo secondo ciclo di trascrizione del cDNA (*first-strand reverse transcription*), residui di dUTP vengono incorporati nel DNA. Questo campione di DNA a singola elica viene poi trattato con una combinazione di DNA uracil glicosilasi (UDG) ed endonucleasi 1 apurinica/apirimidinica (APE 1), che riconoscono in modo specifico i residui innaturali dUTP e causano la frammentazione della molecola di DNA. I frammenti di DNA così ottenuti vengono poi marcati con un apposito reagente (*DNA Labeling Reagent*, Affymetrix) legato covalentemente alla biotina, mediante la transferasi deossinucleotidica terminale (TdT). Il cDNA marcato è stato poi ibridizzato

sul vetrino array e le immagini sono state acquisite mediante scanner. Il protocollo della reazione è schematizzato in Figura 25. I dati ottenuti sono stati analizzati dalla Dr. Sonia Shah, presso il *Bloomsbury Centre for Bioinformatics* (UCL, London, UK) ([http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/bcb/support\\_microarray.html](http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/bcb/support_microarray.html)).

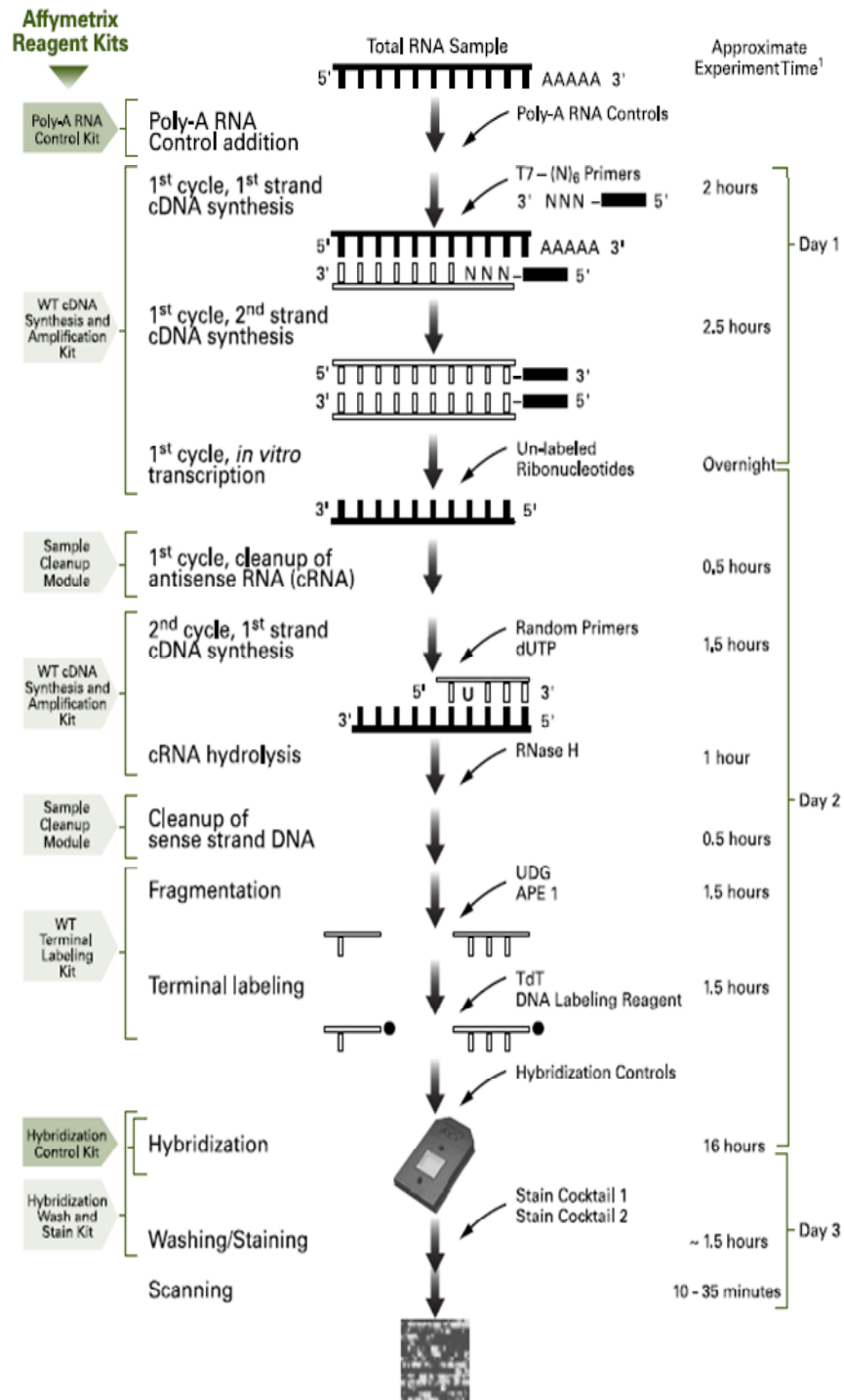


Fig. 25: Schema riassuntivo del protocollo di reazione *microarray* effettuata.

# **Capitolo 4**

## **RISULTATI**



#### 4.1) Dati clinici ed istologici della paziente

La paziente è stata inviata per inquadramento diagnostico all'Ambulatorio per "la diagnosi e la cura dei difetti dello sviluppo sessuale", c/o l'Azienda Ospedaliera "S. Camillo-Forlanini", dopo essere stata sottoposta ad un intervento di vaginoplastica e clitoridoplastica. Figlia di genitori consanguinei (cugini primi), la paziente è stata cresciuta come femmina, mostrava soddisfazione per la propria assegnazione di genere e dichiarava un orientamento di tipo eterosessuale.

L'anamnesi individuale indicava uno sviluppo puberale in senso femminile, iniziato intorno all'età di 9-10 anni, quando sono comparsi i peli pubici, seguiti da un normale sviluppo mammario. Il menarca si è presentato spontaneamente all'età di 11 anni ed è stato ciclicamente regolare fino ai 27 anni. A quest'età la paziente, a seguito del riscontro di una massa inguinale destra, è stata sottoposta ad un intervento chirurgico con asportazione della gonade destra che sporgeva attraverso la porta erniaria. Il successivo esame istologico ha poi portato alla diagnosi di seminoma. La paziente riporta il suo ultimo ciclo mestruale a due mesi dopo l'intervento. Uno studio ormonale effettuato in tale occasione mostrava un quadro indicativo di un ovaio funzionante (normali livelli di FSH e LH, livelli di 17- $\beta$ -estradiolo entro la norma e bassi livelli di testosterone). Un anno dopo il profilo endocrino dava, invece, valori indicativi di una menopausa precoce (Tab. 16).

Dalla documentazione clinica e fotografica messa a nostra disposizione era evidente che la paziente presentava, prima della correzione chirurgica, genitali esterni ambigui (Fig. 26A), prevalentemente di tipo femminile, con notevole ipertrofia clitoridea e stenosi vaginale, e presenza di un utero normale. Un esame audiometrico rivelava la presenza d'ipoacusia neurosensoriale bilaterale di grado medio. All'esame obiettivo era evidente oncodistrofia (Fig. 26B), cheratodermia palmoplantare (Fig. 26C), opacità corneale bilaterale congenita e strabismo.

Sulla base della storia clinica e dell'esame obiettivo, abbiamo ritenuto opportuno eseguire alcuni accertamenti clinici e strumentali al fine di un migliore inquadramento clinico e allo scopo di escludere la presenza di un ulteriore seminoma. Tra questi, l'esame istologico da prelievo bioptico, fatto in laparoscopia esplorativa, ha rilevato che la gonade sinistra era in realtà un *ovotestis*. Nel 2006 la paziente è stata quindi sottoposta ad un secondo intervento di gonadectomia, con asportazione della gonade sinistra, il cui esame istologico ha confermato la contemporanea presenza di

componenti testicolari e ovariche. In particolare, erano evidenti tubuli seminiferi frammentati alla componente ovarica, rappresentata da stroma formato dalle tipiche cellule fusiformi che s'intrecciano "a vortice" e dal *corpo albicans*, un'area biancastra cicatriziale che si riscontra sulla superficie dell'ovaio dopo la regressione del corpo luteo (Fig. 27A). Inoltre, i tubuli seminiferi e lo stroma erano infiltrati da cellule neoplastiche, alcune delle quali intratubulari (ITGCN), e da numerosi linfociti reattivi (Fig. 27D-F). E' stata per cui formulata diagnosi di *ovotestis* e di seminoma.

Gli studi immunohistochimici hanno rivelato il seguente fenotipo delle cellule neoplastiche: c117+, PLAP+, TCL1+, pan-keratina AE1/AE3, CEA-,  $\alpha$ FP-,  $\beta$ HCG- (Fig. 27G-I).

La paziente riferisce che il suo unico fratello, padre di tre bambini, presentava lo stesso tipo di lesione dermatologica a livello palmoplantare. Tale soggetto, però, non ha dato il consenso per l'analisi clinica e genetica.

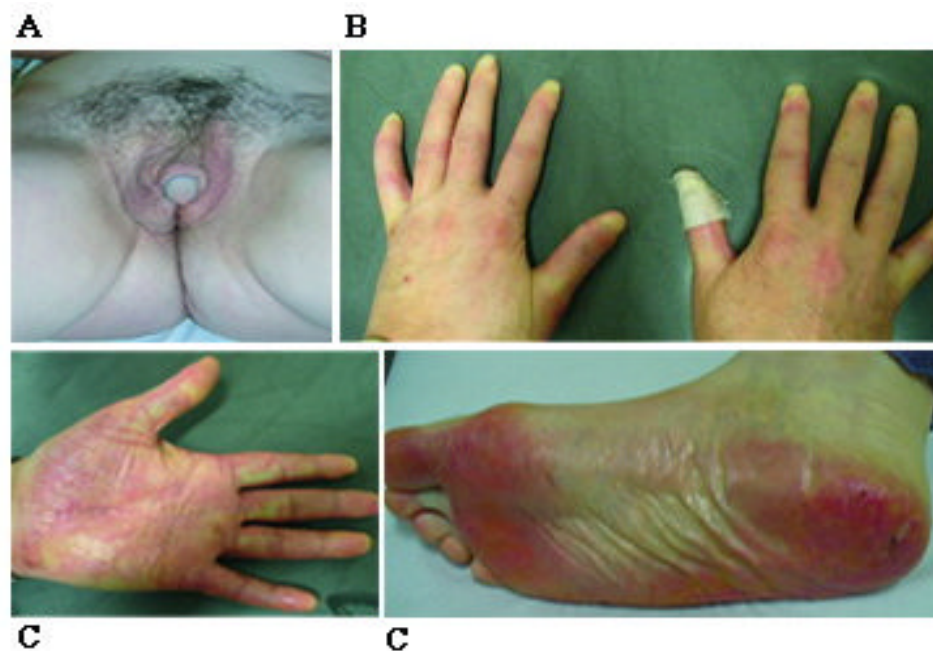


Fig. 26: **Caratteristiche cliniche della paziente.** A, Ambiguità dei genitali esterni, con ipertrofia del clitoride. B, Onicodistrofia, condizione caratterizzata da scolorimento e malformazione delle unghie delle dita. C, Cheratodermia palmoplantare (malattia caratterizzata da anomala cheratinizzazione e da ispessimento cutaneo sia uniforme sia diffuso, localizzato sul palmo della mano e sulla pianta dei piedi) ed eritema.

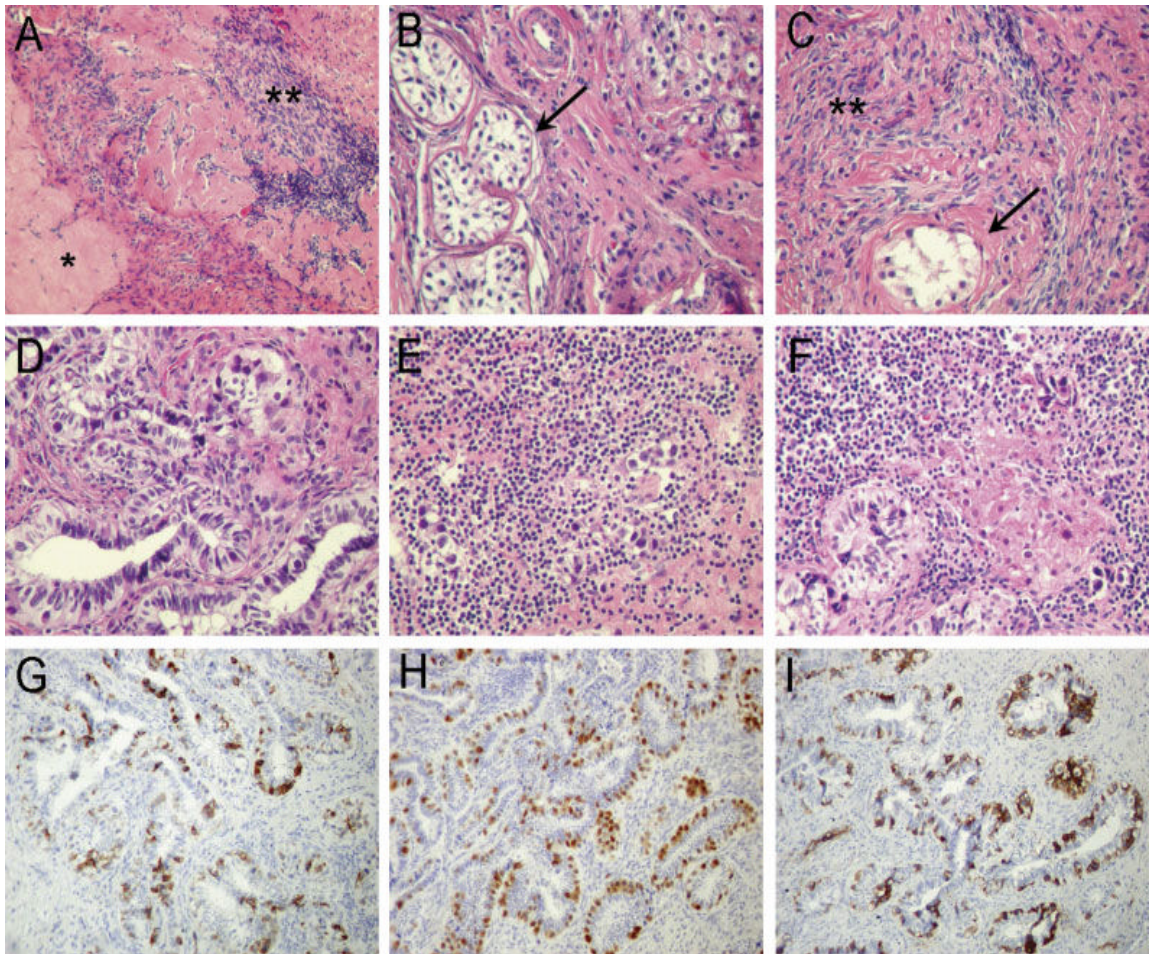


Fig. 27: **Analisi istologica della gonade sinistra (ovotestis) della paziente.** *A*, Strutture ovariche: corpo albicans (\*) e stroma ovarico (\*\*). *B*, Tubuli seminiferi (freccia nera) con aplasia germinale e contenenti solo cellule del Sertoli. *C*, Tubuli seminiferi circondati da stroma ovarico (\*\*). *D*, Tubuli seminiferi con cellule germinali intratubulari neoplastiche (ITGCN). *E-F*, Stroma infiltrato da cellule tumorali e numerosi linfociti reattivi. *G-H-I*, ITGCN immunoreattivi con PLAP, TCL-1, CD117.

Ormoni e <i>marker</i> tumorali analizzati	Valori (età 27)*	Valori (età 28)§	Valori (età 42)°	Valori normali (donna fertile)	Valori normali (donna in menopausa)	Valori normali (uomo)
Ormone Follicolo Stimolante (FSH) mIU/ml	14.8	79.9	102.6	1.04-24.16	25.8-134.8	1.37-13.6
Ormone Luteinizzante (LH) mIU/ml	0.7	39.7	21.3	0.35-95.6	10.24-58.1	1.26-10.1
Testosterone Totale (T) ng/ml	0.68	0.63	0.78	0.15-1.1	0.15-0.56	3.5-10.8
Estradiolo pg/ml	74.7	18.4	10.2	20-375	0-14	11-44.0
Diidroepiandrosterone (DHEA) ng/ml	N.A.	12.4	14.0	1.3-12	1.3-12	1.3-12.0
Diidroepiandrosterone solfato (DHEAS) µg/ml	2.43	2.06	2.12	1.2-3.6	0.1-0.8	2.0-3.5
Delta 4-Androstenedione ng/ml	2.01	N.A.	N.A.	0.5-3	0.5-3	0.6-2.7
Progesterone ng/ml	1.8	0.27	0.45	0.2-30	0.1-0.6	0.3-1.0
Prolattina ng/ml	28.0	15.7	9.4	1.3-25	0.7-19	3-15
β-Gonadotropina Corionica umana (βHCG) mIU/ml	Non rilevato	0.9	Non rilevato		0-5	0-3
α-Fetoproteina (αFP) IU/ml	2.30	N.D.	2.19		0-15	0-15
Lattato Deidrogenasi (LDH) U/l	N.D.	N.D.	474		313-618	313-618
Antigene Carcinoembrionale (CEA) ng/ml	2.3	0.5	0.2		0-4	0-4

\* Valori ottenuti due mesi dopo la gonadectomia a destra

§ Valori ottenuti un anno dopo la gonadectomia a destra

° Valori ottenuti prima della gonadectomia a sinistra

N.D. = Non disponibile

Tab. 16: Valori degli ormoni e dei *marker* tumorali analizzati nella paziente.



#### 4.2) Analisi genica molecolare

L'analisi molecolare del DNA della paziente per la ricerca di *SRY* ha rivelato l'assenza di questo gene. Lo *screening* mutazionale dei geni *GJB2*, *GJA1* e *WNT4* non ha evidenziato nessuna mutazione nella nostra paziente.

L'amplificazione e il sequenziamento diretto degli esoni codificanti (4-8) del gene *RSPO1* (GeneBank NC\_000001.9) e delle sequenze introniche fiancheggianti hanno permesso d'identificare una mutazione puntiforme in omozigosi. Tale mutazione consiste nella transizione di una guanina con un'adenina, in posizione c.286+1, che alterava la sequenza consenso GT altamente conservata al sito donatore di *splicing* dell'introne 5 (Fig. 28). La stessa mutazione è stata riscontrata in eterozigosi nel DNA materno. Non è stato possibile confermare lo stato di portatore anche nel padre, poiché si è rifiutato di sottoporsi all'indagine genetica. Per escludere che la variante trovata nella paziente potesse essere un polimorfismo, è stato eseguito un controllo di popolazione per il gene *RSPO1*: la mutazione c.286+1G>A non è stata individuata in un pannello di 200 alleli di controllo.

L'analisi mutazionale dei 5 esoni codificanti del gene *RSPO1* eseguita su 8 pazienti con cariotipo 46,XX, *SRY* negativi, affetti da DSS ovotesticolare (ermafroditismo vero) o DSS testicolare (maschi XX) isolati, non ha evidenziato alcuna mutazione.

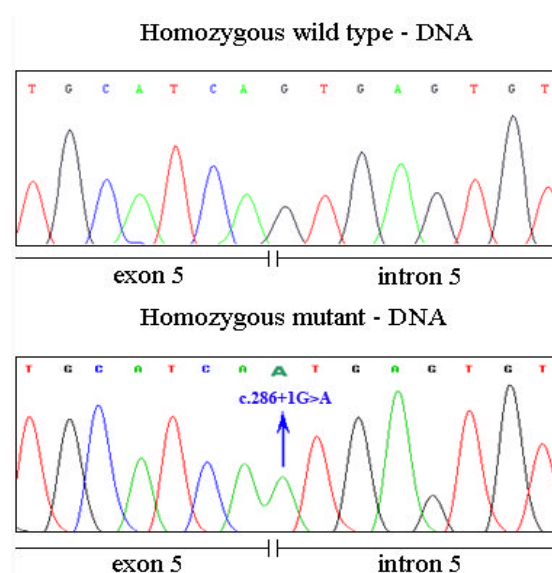
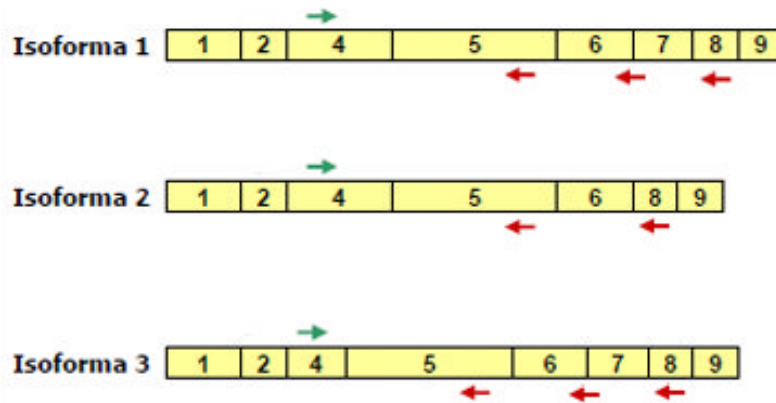


Fig. 28: **Elettroferogramma parziale del gene *RSPO1***. L'analisi di sequenza ha permesso di identificare una mutazione omozigote: la sostituzione della guanina con l'adenina in posizione c.286+1: questa transizione altera la sequenza consenso altamente conservata GT al sito donatore di *splicing* presente nell'introne 5 del gene *RSPO1*.

### 4.3) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sul trascritto *RSPO1*

Sono stati effettuati esperimenti di RT-PCR su RNA totale estratto da culture cellulari di fibroblasti o da tessuto gonadico della paziente e su RNA di controllo ottenuto da fibroblasti e tessuto ovarico di una donna in età menopausale apparentemente sana, utilizzando *primer* specifici disegnati sulle sequenze esoniche del gene *RSPO1* (Fig. 29). Usando la coppia di *primer* RSPO1-RT 4(F) e 8(R) il campione di controllo mostrava 3 bande, corrispondenti alle 3 diverse isoforme di *RSPO1*, della grandezza attesa (1187 bp, 998 bp e 866 bp), mentre il campione della paziente presentava solamente bande di dimensioni aberranti, di lunghezza inferiore (Fig. 30A). Bande delle dimensioni attese sono state ottenute, nel controllo, anche usando la coppia di *primer* RT 4(F)-5(R), mentre nessun prodotto di amplificazione è stato ottenuto per l'RNA estratto dalla gonade e dai fibroblasti della paziente utilizzando gli stessi *primer* (Fig. 30B). L'assenza di prodotti di PCR utilizzando il *primer* 5R ha portato ad ipotizzare la presenza di una delezione parziale o totale dell'esone 5 nell'mRNA *RSPO1* della paziente. Il sequenziamento diretto delle bande di 523bp e 202 bp (corrispondenti rispettivamente all'isoforma 1 e 2), ottenuti usando i *primer* RT 4(F)-6/7(R), ha confermato che la transizione c.286+1G>A porta alla formazione di un trascritto aberrante privo dell'esone 5 (r.95\_286del). Il sequenziamento ha evidenziato inoltre il mantenimento del corretto *open reading frame* del trascritto mutato (aberrante) (Fig. 31). Amplificati addizionali di maggiore lunghezza, indicativi di ulteriori *splicing* alternativi, non sono stati individuati nella paziente, neanche effettuando una doppia amplificazione (dati non mostrati).

Il controllo dei cDNA utilizzati è stato effettuato con esperimenti di RT-PCR del trascritto *GAPDH* (gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi): in tutti i campioni era presente una banda di 455 bp e di uguale intensità (Fig. 30C).



Coppie primer	Isoforma RSPOI	Amplificato <i>wild-type</i>	Amplificato paziente
4F/5R	1	549 bp	No amp
	2	549 bp	No amp
	3	228 bp	No amp
4F/8R	1	1187 bp	995 bp
	2	998 bp	806 bp
	3	866 bp	674 bp
4F/6-7R	1	715 bp	523 bp
	2	No amp	No amp
	3	394 bp	202 bp

Fig. 29: **Posizione dei primer utilizzati negli esperimenti di RT-PCR.** Nello schema in alto è mostrata la posizione dei *primer forward* (in verde) e *reverse* (in rosso) utilizzati negli esperimenti di RT-PCR sulle sequenze codificanti del gene *RSPOI* (isoforme 1, 2 e 3). Nella tabella sono riportate le lunghezze degli amplificati ottenuti con le diverse coppie di primer sull'mRNA *wild-type* e su quello della paziente. (No amp = nessun amplificato, bp = paia di basi, F = *forward*, R = *reverse*).

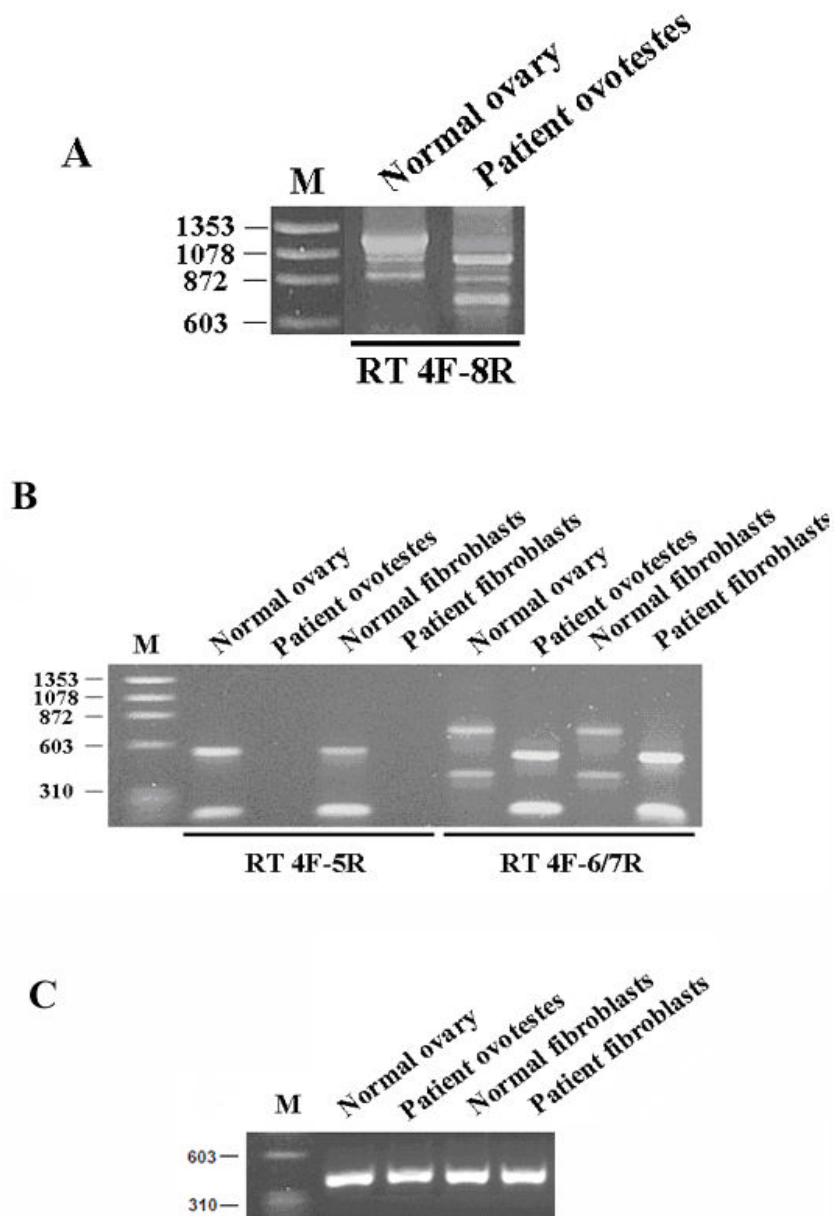


Fig. 30: **RT-PCR dell'mRNA *RSPO1***. *A*, Tutte le 3 isoforme delle dimensioni attese (1187, 998, e 866 bp) sono presenti dopo RT-PCR su mRNA estratto da un ovaio normale (usato come controllo), usando la coppia di *primer* RT 4F-8R. Le stesse isoforme di dimensioni minori (995, 806, e 674 bp), compatibilmente con l'assenza dell'esone 5, sono evidenti nel tessuto della paziente. *B*, RT-PCR dell'mRNA *RSPO1* proveniente dalla paziente e da una donna non affetta usato come controllo (tessuto gonadico e cultura di fibroblasti). Due bande sono state ottenute nei campioni controllo con le coppie di *primer* RT 4F/5R e RT 4F/6-7R. L'assenza di prodotti di amplificazione usando il *primer* RT 5R, posto all'interno dell'esone 5, conferma l'assenza di tale esone nei trascritti della paziente. Solamente bande di dimensioni aberranti sono presenti nei campioni della paziente in seguito ad amplificazione con la coppia di *primer* 4F/6-7R. *C*, Un amplificato di 455 bp specifico per il trascritto *GAPDH* è presente in tutti i campioni. M = DNA *marker*.



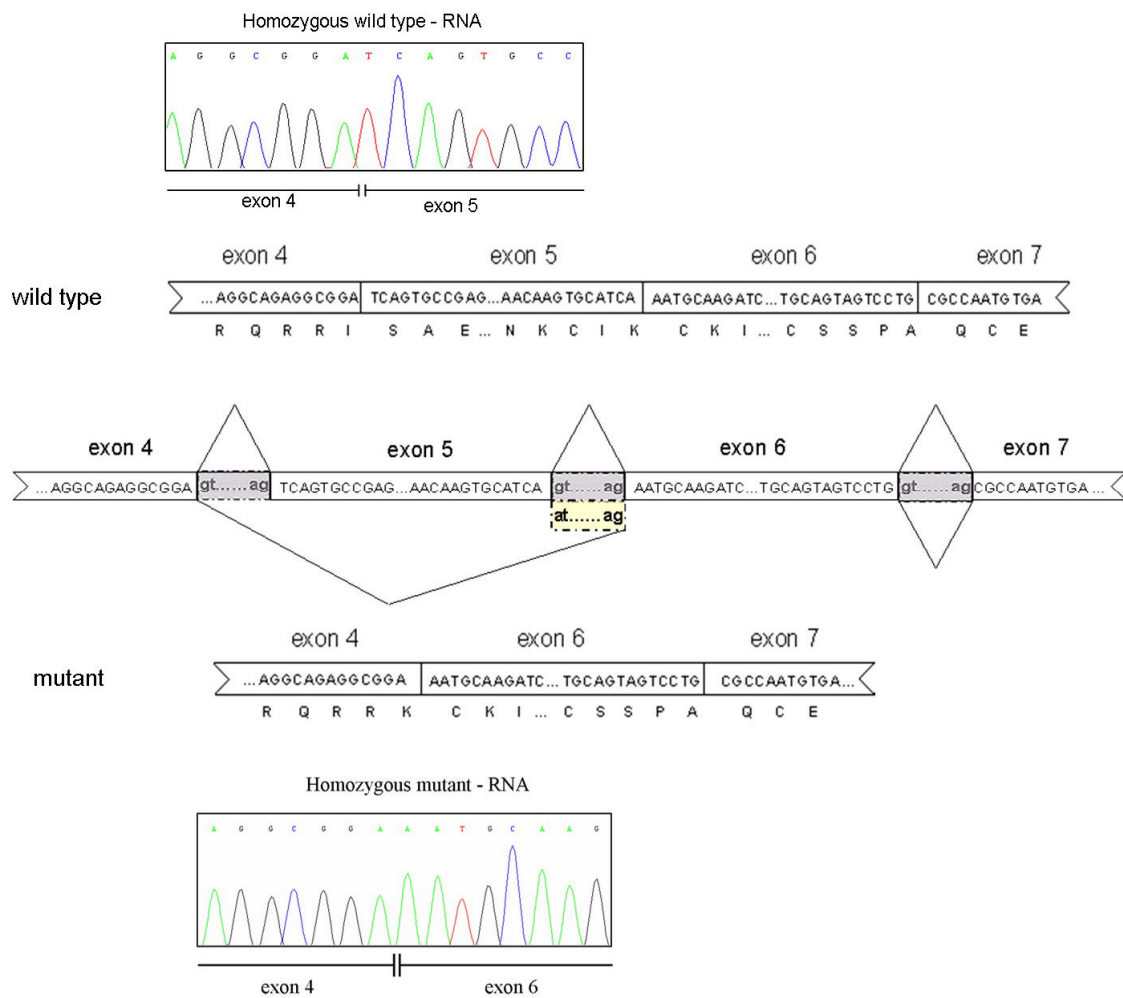


Fig. 31: **Rappresentazione schematica del meccanismo di *splicing* nell'mRNA *RSPO1* *wild-type* e in quello *mutato*.** La mutazione omozigote c.286+1G>A interessa la sequenza consenso GT presente al sito donatore di *splicing* dell'introne 5 e porta alla delezione dell'esone. Gli elettroferogrammi mostrano la sequenza nucleotidica parziale dei prodotti dell'RT-PCR *wild-type* e *mutato* (sequenza *forward*).

#### 4.4) Plasmidi ricombinanti

L'intera sequenza codificante (CDS) del gene *RSPO1* (corrispondente all'isoforma 1 *wild-type* di 792 bp e all'isoforma 1 mutata di 600 bp) è stata amplificata mediante RT-PCR e clonata all'interno del plasmide pcDNA3.1(+) (pRSPO1), per l'espressione in cellule di mammifero.

Per generare la proteina *RSPO1 wild-type* (wt) e mutata (mut) fusa all'estremità carbossi-terminale con l'epitopo dell'emoagglutinina HA (27 bp) (pRSPO1-HA) è stato utilizzato lo stesso plasmide pcDNA3.1(+) (Fig. 32A).

Il cDNA di *RSPO1* (wt e mut) è stato clonato anche all'interno del plasmide di espressione per la *Green Fluorescent Protein* (GFP), pEGFP-N1, per creare una proteina di fusione con il *tag* GFP all'estremità C-terminale di *RSPO1* (pRSPO1-GFP). In entrambi i casi, la sequenza è stata inserita *in frame* con le sequenze codificanti i *tag* HA o GFP.

Il plasmide pIRES2-AcGFP1-Nuc contiene la sequenza IRES (*internal ribosome entry site*) del virus ECMV che permette al gene inserito e al *tag* GFP di essere tradotti da un singolo mRNA bicistronico. In questo modo la proteina d'interesse non sarà fusa a nessun *tag* che potrebbe interferire con la sua normale attività funzionale (a differenza delle proteine di fusione *RSPO1-HA* e *RSPO1-GFP*), ma sarà comunque possibile individuare le cellule che esprimono il gene d'interesse, poiché fluorescentemente marcate (Fig. 32B).

Per verificare l'esito del clonaggio, i costrutti sono stati digeriti con specifici enzimi di restrizione ed il prodotto della digestione è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio. Il costrutto pRSPO1-HA è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII*, dando origine a un frammento di 852 bp per la sequenza *wild-type* e di 660 bp per quella mutata (Fig. 32C). La digestione con gli enzimi di restrizione *KpnI* e *XhoI* dei costrutti pRSPO1 e pRSPO1-GFP ha confermato la presenza della sequenza codificante nei cloni selezionati (banda di 825 bp per la sequenza wt e banda di 633 bp per la sequenza mut) (dati non mostrati). La presenza dell'inserito *RSPO1* nel costrutto pRSPO1-IRES2-GFP è stato verificato con l'enzima di restrizione *EcoRI* (bande di 850 bp e 658 bp per le sequenze wt e mut, rispettivamente). Il corretto orientamento dell'inserito è stato verificato utilizzando l'enzima *SacI*, che produce due tagli all'interno del vettore che contiene l'inserito wt o mut, dando origine a due frammenti di dimensione diversa a seconda dell'orientamento (dati non mostrati).

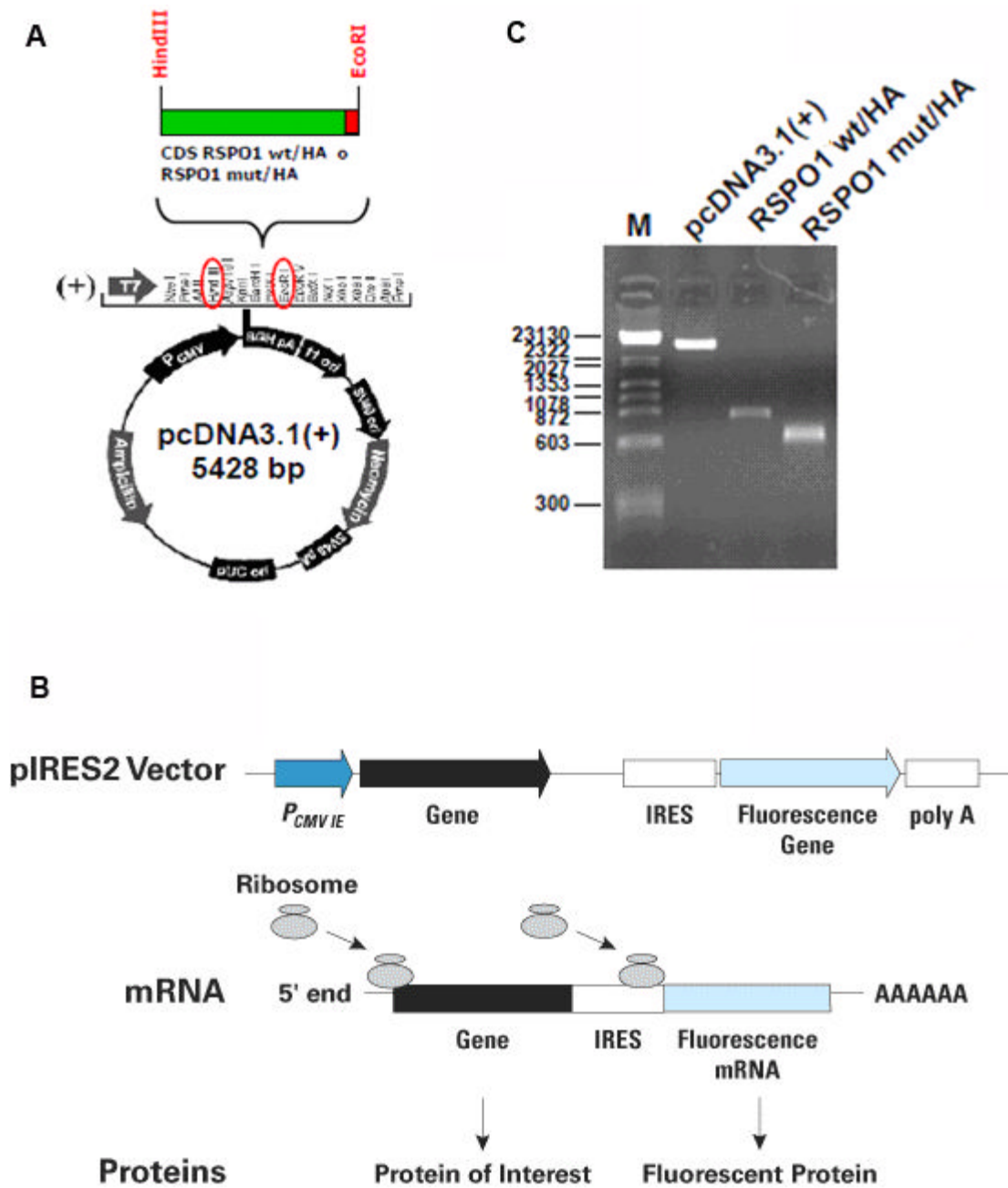


Fig. 32: **Costruzione dei plasmidi ricombinanti.** *A*, La sequenza codificante (CDS) l'isoforma 1 *wild-type* o mutata del gene *RSP01*, con a valle il tag HA (in rosso) è stata clonata nel vettore di espressione pcDNA3.1(+). L'inserto è stato inserito tra i siti *HindIII* e *EcoRI* del plasmide. *B*, Rappresentazione schematica del plasmide pIRES2-AcGFP1-Nuc, dell'mRNA bicistronico trascritto e delle proteine tradotte. *C*, Controllo su gel di agarosio del plasmide pcDNA3.1(+), del costrutto pRSP01-HA *wild-type* e mutato dopo taglio con gli enzimi di restrizione *HindIII* e *EcoRI*.

#### 4.5) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sulla proteina RSPO1

I costrutti pRSPO1-HA *wild-type* e mutato sono stati trasfettati in modo transiente in cellule HEK293T mediante lipofezione; cellule trasfettate con il plasmide pcDNA3.1(+) vuoto sono state utilizzate come controllo. Estratti di RNA e di proteine totali sono stati effettuati 48-72 ore dopo la trasfezione. L'RNA retrotrascritto in cDNA è stato amplificato mediante PCR a differenti cicli (25-30-35) per verificare la presenza del trascritto *RSPO1*. La Figura 33 mostra un prodotto delle dimensioni attese e di forte intensità a tutti i cicli nelle cellule trasfettate con il plasmide RSPO1-HA (wt e mut), ad indicare una forte espressione per il gene *RSPO1* nelle cellule trasfettate. Gli estratti proteici totali sono stati analizzati mediante esperimenti di Western blotting: l'ibridazione con un anticorpo diretto contro il tag HA ha permesso di evidenziare due bande specifiche di circa 20 e 30 kDa in cellule trasfettate con il plasmide pRSPO1-HA wt e due bande di minore intensità e a minore altezza in campioni trattati con il vettore pRSPO1-HA mut (Fig. 34A-B). Nessuna banda specifica per la proteina R-spondina1 era invece presente nella corsia delle cellule trasfettate con il solo vettore vuoto usato come controllo. La stessa membrana è stata re-ibridata con l'anticorpo monoclonale diretto contro la  $\beta$ -actina: per tutti i campioni si sono osservate bande di simile intensità (Fig. 34C).

Lo stesso esperimento è stato eseguito su cellule HEK293T trasfettate con pRSPO1 wt e mut, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la proteina R-spondina1: soltanto due bande corrispondenti alla proteina *wild-type* erano visibili, mentre nessun segnale specifico era presente per la forma mutata (Fig. 34D).

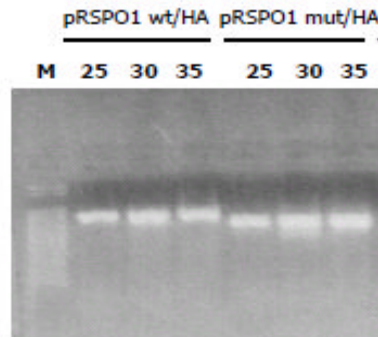


Fig. 33: Analisi del trascritto *RSP01* su RNA estratto da cellule trasfettate con i plasmidi pRSP01-HA wt o mut e da cellule non trasfettate. L'RT-PCR a 25, 30 e 35 cicli utilizzando *primer* per *RSP01* ha dato bande di lunghezza specifica e di forte intensità nelle cellule trasfettate con entrambi i plasmidi.

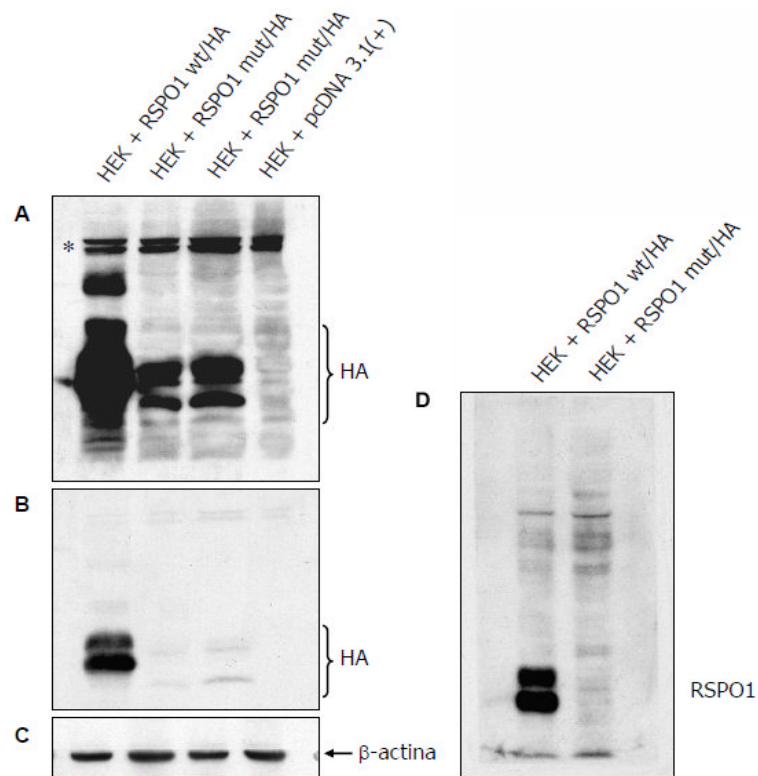


Fig. 34: Western blot su estratti proteici di cellule trasfettate con pRSP01-HA wt e mut, o pcDNA3.1(+). *A-B*, WB con anticorpo contro il tag HA. Due bande di maggiore intensità e altezza sono presenti nelle HEK293T trasfettate con pRSP01-HA wt rispetto alle cellule trasfettate con pRSP01-HA mut. Nessuna banda specifica è evidente nelle cellule trasfettate con il solo vettore pcDNA3.1(+). L'asterisco indica bande aspecifiche presenti in tutti i campioni. Lastra esposta 5 minuti (*A*) o pochi secondi (*B*). *C*, WB con anticorpo diretto contro la  $\beta$ -actina. Bande di simile intensità sono presenti in tutti i campioni analizzati. *D*, WB con anticorpo policlonale diretto contro RSP01. Due bande specifiche sono presenti nelle HEK293T trasfettate con pRSP01-HA wt, nessuna banda è rilevata nelle cellule trasfettate con pRSP01-HA mut.

#### 4.6) Studio dello stato di glicosilazione della proteina R-spondina1

Estratti proteici totali di cellule HEK293T trasfettate con i plasmidi pRSPO1-HA (wt o mut) sono stati ibridati con l'anticorpo policlonale anti-CMW, che riconosce in modo specifico il Triptofano-C-mannosilato della sequenza Trp-X-X-Trp (gentilmente fornito dal Dott. Ihara). Poiché tale ibridazione non ha evidenziato bande specifiche, ma solamente un *pattern* di bande aspecifiche (Fig. 35), sembra che la proteina R-spondina1 non venga mannosilata.

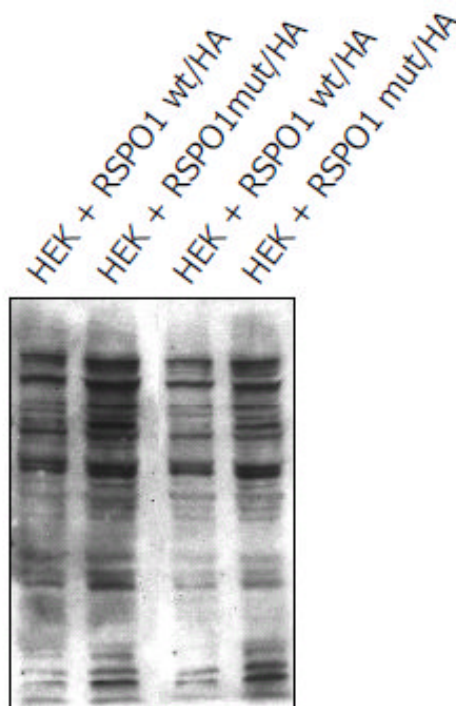


Fig.35: **Western blot con anticorpo anti-CMW.** WB su estratti proteici di cellule trasfettate con i plasmidi pRSPO1-HA wt o mut e ibridati con l'anticorpo policlonale anti-CMW. L'ibridazione ha mostrato solamente un pattern di bande aspecifiche. I campioni sono caricati in doppio.

#### 4.7) Analisi degli effetti della mutazione *RSPO1* c.286+1G>A sull'espressione di *CTNNB1*, *WNT4* e *SOX9*

Allo scopo di analizzare l'effetto della mancanza del primo dominio furinico nella proteina RSPO1 mutata sulla stabilizzazione della  $\beta$ -catenina, abbiamo eseguito degli esperimenti di RT-PCR e Western blotting. Tali esperimenti sono stati condotti su mRNA e su proteine totali estratte dall'*ovotestis* della paziente e da un campione di controllo (tessuto ovarico di una donna sana).

L'amplificazione del cDNA mediante *primer* specifici per il gene *CTNNB1*, che codifica per la  $\beta$ -catenina, non ha mostrato alcuna differenza di espressione a livello di mRNA tra i differenti campioni analizzati (Fig. 36A).

L'ibridazione con un anticorpo monoclonale diretto contro la  $\beta$ -catenina ha invece evidenziato una ridotta espressione della proteina nel tessuto gonadico della paziente rispetto al tessuto ovarico di controllo (Fig. 36B). La quantità di estratto proteico è stata controllata mediante ibridazione con anticorpo monoclonale specifico per la  $\beta$ -actina, una proteina del citoscheletro cellulare: bande di simile intensità erano presenti in tutti i campioni.

L'espressione dei geni *WNT4* e *SOX9* è stata esaminata mediante analisi di RT-PCR: i livelli dell'mRNA *WNT4* erano decisamente diminuiti nell'*ovotestis* della paziente rispetto a tessuto di controllo ovarico, mentre l'espressione di *SOX9* era appena visibile sia nel tessuto ovarico *wild-type* sia nel tessuto gonadico mutato, rispetto al tessuto di controllo testicolare (Fig. 36C).

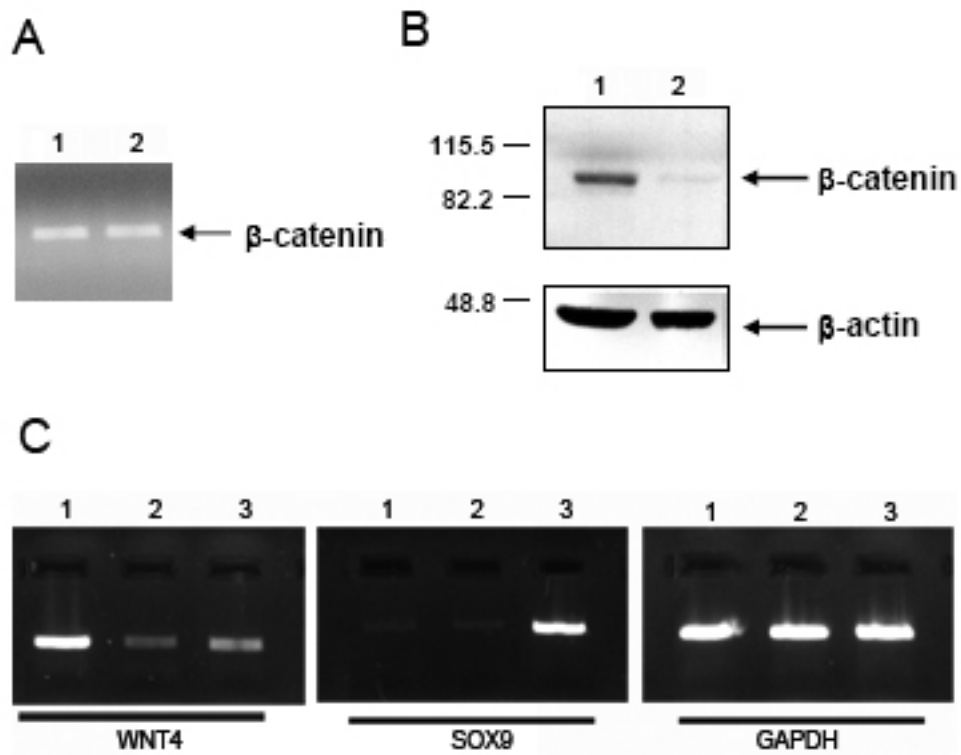


Fig.36: **Analisi di espressione di *CTNNB1*, *WNT4* e *SOX9* sulla gonade della paziente portatrice di una mutazione nel gene *RSP01*.** *A*, RT-PCR dell'mRNA *CTNNB1*. Un amplificato specifico per la  $\beta$ -catenina di uguale intensità è presente nell'RNA estratto da tessuto ovarico di una donna non affetta usato come controllo (corsia 1) e nell'RNA estratto da tessuto gonadico della paziente (corsia 2). *B*, Western blot su proteine estratte da tessuto gonadico di una donna sana e dall'*ovotestis* della paziente. Una marcata riduzione nella quantità di proteina  $\beta$ -catenina è presente nell'*ovotestis* della paziente (corsia 2) rispetto all'ovaio *wild-type* (corsia 1). L'ibridazione con l'anticorpo diretto contro la proteina  $\beta$ -actina ha dato bande di uguale intensità per tutti i campioni. *C*, RT-PCR dell'mRNA *WNT4* e *SOX9*. L'RNA estratto dall'*ovotestis* della paziente, da tessuto ovarico e testicolare di controllo è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando *primer* specifici. Una notevole diminuzione del trascritto *WNT4* è presente nell'*ovotestis* della paziente (corsia 2) in confronto al tessuto ovarico di controllo (corsia 1). La presenza del trascritto *SOX9* è appena visibile nel tessuto ovarico di controllo e nell'*ovotestis* della paziente, in confronto al tessuto testicolare di controllo (corsia 3). I livelli di *GAPDH* sono uguali tra i tre campioni.



#### 4.8) Analisi degli effetti della mutazione c.286+1G>A sull'attività funzionale di RSPO1

Per analizzare gli effetti della proteina mutata (p.Ile32\_Ile95del) sul *pathway* di segnale canonico di Wnt, sono stati condotti studi funzionali mediante saggi luciferasi, utilizzando un plasmide TOPFLASH che contiene le sequenze di riconoscimento per il complesso trascrizionalmente attivo TCF/ $\beta$ -catenina legate alla sequenza per il gene luciferasi. Diverse linee cellulari sono state testate ed un vettore di espressione contenente la sequenza codificante della  $\beta$ -catenina (pCTNNB1) è stato usato come controllo positivo per verificare la risposta cellulare, così da identificare il sistema ottimale da utilizzare. La linea cellulare tsa201 è quella che ha mostrato una migliore risposta, ed è stata quindi utilizzata in tutti i saggi funzionali condotti in questa ricerca. Di seguito sono riassunte schematicamente le combinazioni di plasmidi utilizzate in ciascuna trasfezione.

<b>VECTOR</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>
<b>pRSPO1 wt o mut</b>	-	5	10	20	50	100
<b>Empty vector pcDNA3.1(+)</b>	100	95	90	80	50	-
<b>TOPFLASH (TCF promoter + Luciferase)</b>	100	100	100	100	100	100
<b>pRLSV40 (Renilla)</b>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<b>TOTAL</b>	207,5	207,5	207,5	207,5	207,5	207,5

<b>VECTOR</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>
<b>pCTNNB1 (<math>\beta</math>-catenin)</b>	-	2	5	10
<b>Empty vector</b>	100	98	95	90
<b>TOPFLASH (TCF promoter + Luciferase)</b>	100	100	100	100
<b>pRLSV40 (Renilla)</b>	7,5	7,5	7,5	7,5
<b>TOTAL</b>	207,5	207,5	207,5	207,5

Dosi crescenti del plasmide pRSPO1 *wild-type* o mutato (0-100 ng/pozzetto) sono state trasfettate, mediante lipofezione, insieme al vettore *reporter* TOPFLASH (100 ng/pozzetto), per testare l'attivazione di geni *target*. La co-trasfezione del plasmide pRLSV40 *Renilla luciferase* (7,5 ng/pozzetto) è stata utilizzata come *marker* per l'efficienza di trasfezione.

La trasfezione transiente delle cellule tsa201 con pRSPO1 *wild-type* ha avuto come risultato un moderato incremento (valore massimo di attivazione = 1,8-*fold*) dell'attività luciferasica del vettore TOPFLASH. Le cellule trasfettate con il plasmide codificante la

proteina RSPO1 p.Ile32\_Ile95del hanno invece mostrato una completa mancanza di attivazione del promotore TCF (Fig. 37A). Comunque, il grado di transattivazione indotto dal plasmide pRSPO1 wt risulta notevolmente minore se paragonato all'attivazione da parte del vettore di espressione per la  $\beta$ -catenina (valore massimo di attivazione = 7,8-fold) (Fig. 37B).

I risultati ottenuti con il dosaggio della luciferasi sono stati normalizzati con quelli ottenuti misurando l'attività del gene indicatore del plasmide di normalizzazione, in questo caso la luciferasi di Renilla, per annullare le differenze tra diversi campioni dovute a eventuali variazioni nell'efficienza di trasfezione. I risultati riportati in Fig. 37 sono mostrati come la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

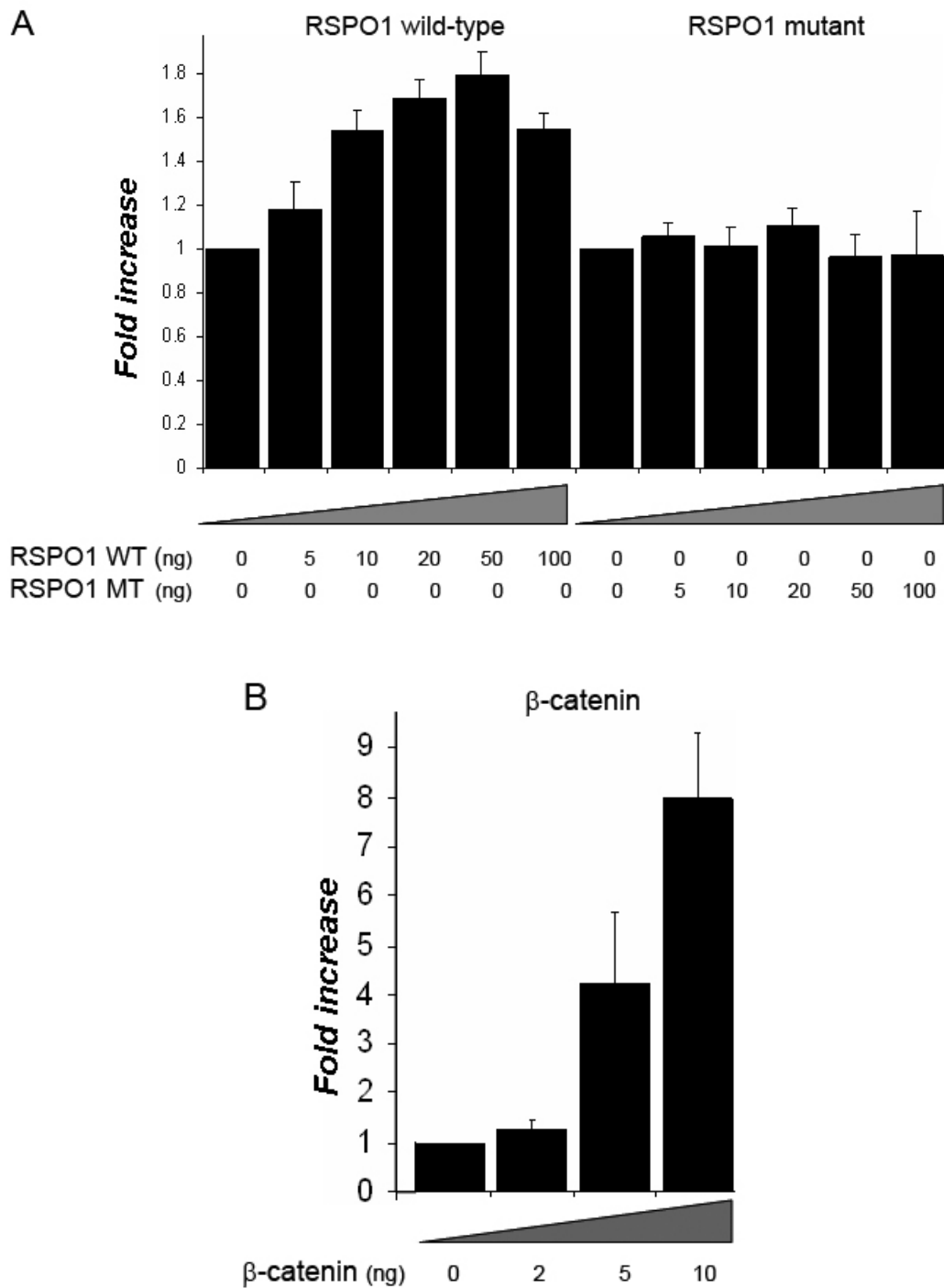


Fig. 37: Effetto di R-spondina1 (*wild-type* e *mutata*) e  $\beta$ -catenina sull'attivazione trascrizionale TCF-dipendente. *A*, L'attività funzionale di RSP01 wt è stata comparata con quella della proteina mutata mancante del primo dominio furinico, usando cellule tsa201 ed il vettore *reporter* TOPFLAFH. Il saggio di espressione genica transiente con concentrazioni crescenti del plasmide pRSP01 wt o mut (0-100 ng/pozzetto) ha mostrato una moderata attivazione (1,8-fold) del vettore TOPFLASH per il costrutto wt e una completa mancanza di attività per il mutato. *B*, Attivazione dose-dipendente del *reporter* TOPFLASH con dosi crescenti del plasmide  $\beta$ -catenina (0-10 ng/pozzetto).

#### 4.9) Studio dell'interazione RSPO1/ $\beta$ -catenina in linee cellulari

Come precedentemente riportato in letteratura, le R-spondine sono in grado di interagire con altri membri del *pathway* Wnt, in modo sinergico (Lu *et al.*, 2008; Nam *et al.*, 2007). Si è ritenuto opportuno quindi allestire un nuovo saggio luciferasi per testare l'ipotesi che RSPO1 possa interagire più direttamente con  $\beta$ -catenina. Cellule tsa201 sono state co-trasfettate, utilizzando le stesse condizioni, con quantità scalari (0-100 ng/pozzetto) del plasmide ricombinante pRSPO1 (wt o mut), con dosi crescenti (0-10 ng/pozzetto) del vettore di espressione per la  $\beta$ -catenina e con una quantità fissa (100 ng/pozzetto) del *reporter* TOPFLASH. Il plasmide pRLSV40 è sempre stato utilizzato come plasmide normalizzatore. Di seguito sono riportate le quantità dei plasmidi utilizzate in ciascuna transfezione.

<b>VECTOR</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>
<b>pcDNA3.1(+) RSPO1 wt o mut</b>	-	5	10	20	50	100
<b>pCTNNB1 (<math>\beta</math>-catenin)</b>	0-2-5	0-2-5	0-2-5	0-2-5	0-2-5	0-2-5
<b>Empty vector pcDNA3.1(+)</b>	100	95	90	80	50	-
<b>TOPFLASH (TCF promoter + Luciferase)</b>	100	100	100	100	100	100
<b>pRLSV40 (Renilla)</b>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<b>TOTAL</b>	207,5	207,5	207,5	207,5	207,5	207,5
	209,5	209,5	209,5	209,5	209,5	209,5
	212,5	212,5	212,5	212,5	212,5	212,5

L'effetto della trasfezione di pCTNNB1 (2 e 5 ng/pozzetto), sull'attivazione trascrizionale TCF-dipendente, è stato un incremento pari a 1,7-fold e 5,3-fold, rispettivamente. Il successivo saggio di espressione genica transiente di cellule co-trasfettate con i plasmidi pCTNNB1 e pRSPO1 wt ha mostrato un notevole aumento (valore massimo di attivazione = 4,5-fold e 10-fold) dell'attivazione del *reporter* TOPFLASH, indicando la presenza di un'amplificazione dose-dipendente dell'attività della  $\beta$ -catenina ad opera di R-spondina1. Questa amplificazione non è stata ottenuta usando la forma mutata del plasmide pRSPO1, confermando che la delezione dell'esone 5 è responsabile della mancata attivazione del promotore TCF.

I risultati riportati in Figura 38 rappresentano la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti eseguiti in triplicato.

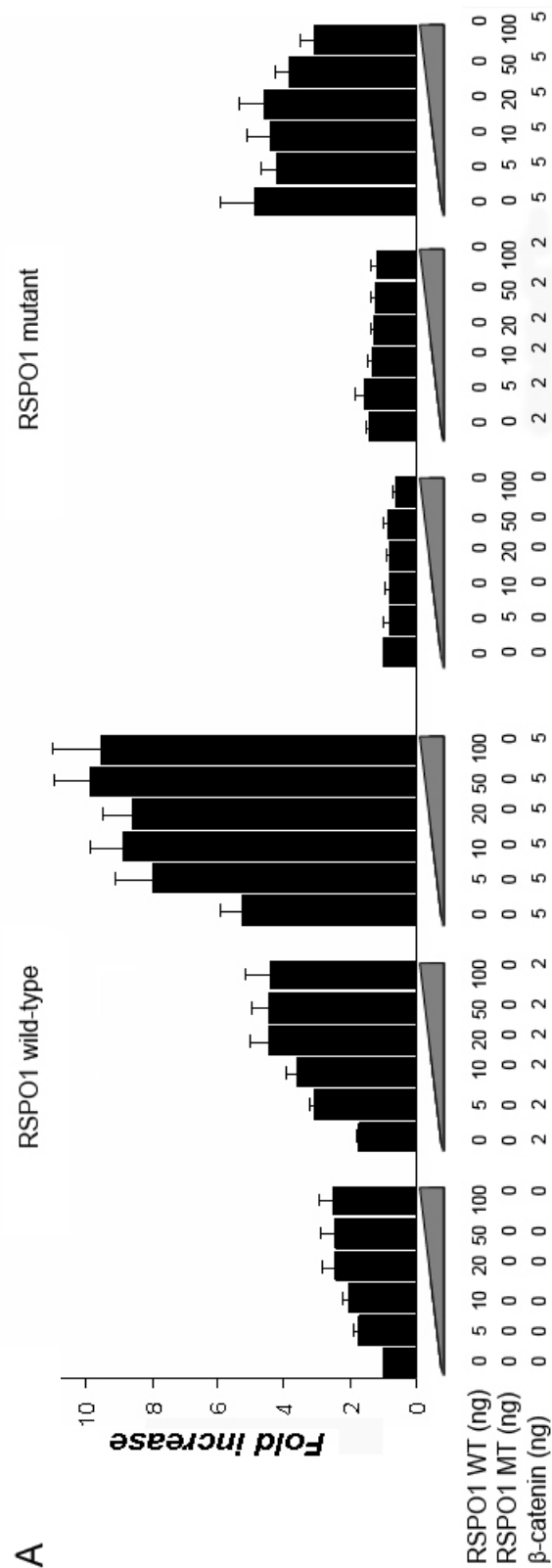


Fig. 38: **RSP01 amplifica l'attivazione trascrizionale TCF-dipendente di β-catenina.** Cellule tsa201 sono state co-trasfettate con dosi crescenti del plasmide pRSP01 wt e mut e dosi crescenti di pCTNNB1. L'attività di RSP01 e β-catenina è stata misurata mediante saggio luciferasi con il *reporter* TOPFLASH.

#### 4.10) Effetto della proteina ricombinante RSPO1 sull'attivazione trascrizionale TCF-dipendente

I membri della famiglia delle R-spondine sono delle proteine secrete (Kim *et al.*, 2008). Precedenti studi hanno dimostrato come la proteina secreta nel mezzo di coltura sia poi in grado di attivare il *pathway* Wnt e promuovere l'attività di fattori di trascrizione, quali TCF (*T-cell factor*) (Binnerts *et al.*, 2007). Poiché dagli esperimenti di co-trasfezione RSPO1/ $\beta$ -catenina sembra esistere un moderato effetto sinergico tra le due proteine, abbiamo deciso di testare se anche il peptide RSPO1 fosse in grado di interagire con la  $\beta$ -catenina, amplificando la sua attività transattivante su TCF.

Sono stati quindi allestiti nuovi saggi luciferasi nei quali, invece di trasfettare con DNA plasmidico pRSPO1 wt, al mezzo di coltura è stato aggiunto il peptide ricombinante R-spondina1 (R&D System) in concentrazione finale 0-3000 ng/ml, 24 ore prima di effettuare la lisi cellulare.

Una volta trovate le quantità ottimali del peptide per avere una risposta adeguata del promotore TCF, è stato condotto un ulteriore saggio luciferasi, trasfettando le cellule con il plasmide pCTNNB1 e aggiungendo il peptide al mezzo di coltura. Di seguito sono riportate le quantità utilizzate di plasmidi e peptide.

<b>VECTOR</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>	<b>ng</b>
<b>RSPO1 peptide</b>	-	100 (500ng/ $\mu$ l)	200 (1000ng/ $\mu$ l)	400 (2000ng/ $\mu$ l)	600 (3000ng/ $\mu$ l)
<b>Empty vector pcDNA3.1(+)</b>	100	100	100	100	100
<b>TOPFLASH (TCF promoter + Luciferase)</b>	100	100	100	100	100
<b>pCTNNB1 (<math>\beta</math>-catenin)</b>	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5
<b>Renilla</b>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
<b>TOTAL</b>	207,5 212,5	207,5 212,5	207,5 212,5	207,5 212,5	207,5 212,5

L'aggiunta del peptide ricombinante (3000 ng/ml) al terreno di coltura delle cellule ts201 ha determinato un'attivazione del vettore *reporter* TOPFLAH di 3,8-fold. Quando la stessa quantità di peptide è stata aggiunta al mezzo di coltura di cellule trasfettate con il plasmide che esprime per la  $\beta$ -catenina (5 ng/pozzetto), l'incremento dell'attivazione trascrizionale TCF-dipendente per effetto della  $\beta$ -catenina è passato da

3,1-fold a 9,7-fold (Figa 39). Questo dato conferma l'abilità che ha la proteina RSPO1 di amplificare il segnale della  $\beta$ -catenina.

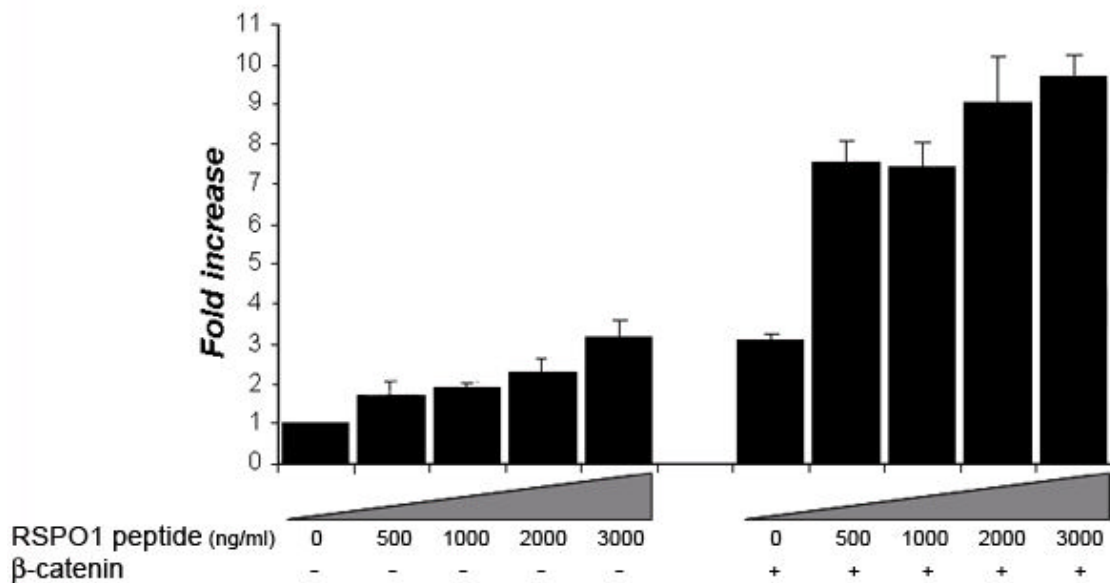


Fig. 39: **Saggio luciferasi per testare l'attività funzionale della proteina ricombinante RSPO1.** Cellule tsa201 stimulate con quantità crescenti del peptide RSPO1 mostrano un'attivazione di TCF dose-dipendente (pannello sinistro). Cellule trasfettate con 5 ng/pozzetto di pCTNNB1 e stimulate con il peptide RSPO1 mostrano un'amplificazione dell'attività trascrizionale TCF-mediata di  $\beta$ -catenina.

#### 4.11) Effetto di Dkk1 sulla interazione RSPO1/ $\beta$ -catenina

Dati recenti in letteratura hanno dimostrato come R-spondina1 sia in grado di regolare il *pathway* di trasduzione del segnale Wnt/ $\beta$ -catenina modulando i livelli del co-recettore Wnt, LRP6, sulla superficie cellulare (Wei *et al.*, 2007).

Allo scopo di capire se il moderato effetto sinergico visto tra RSPO1 e  $\beta$ -catenina potesse essere collegato ai livelli di LRP6, regolati da RSPO1, presenti sulla superficie cellulare, abbiamo utilizzato un potente inibitore di LRP6, la proteina umana Dickkopf1 (Dkk1).

Cellule tsa201 transientemente trasfettate con pRSPO1 wt (0-50 ng/pozzetto) e pCTNNB1 (5 ng/pozzetto) sono state trattate con dosi crescenti della proteina ricombinante Dkk1 (R&D Systems) (0-400 ng/ml), per bloccare l'attività di LRP6. Questo peptide è stato aggiunto al terreno di coltura 2 ore prima della reazione di transfezione. I livelli di attività luciferasica esaminati nelle diverse condizioni hanno mostrato come Dkk1 sia in grado di inibire solo parzialmente l'amplificazione del segnale  $\beta$ -catenina, indotto dall'espressione del vettore RSPO1 (da 2,6 a 2,3-*fold* per le cellule trasfettate con 10 ng di pRSPO1 wt e 5 ng di pCTNNB1; da 3,4 a 2,4-*fold* per le cellule trasfettate con 50 ng di pRSPO1 wt e 5 ng di pCTBNN1) (Fig. 40A). Anche quando le cellule sono state trattate con alte dosi (1000 ng/ml) di Dkk1 l'inibizione è stata solo parziale (dati non mostrati).

Lo stesso tipo di esperimento è stato condotto stimolando questa volta le cellule con dosi crescenti del peptide ricombinate RSPO1 (0-2000 ng/ml) e trattandole con l'inibitore Dkk1 (0-1000 ng/ml). Dkk1, pur inibendo notevolmente l'attivazione del reporter TOPFLASH da parte del peptide RSPO1, non riesce ad inibirla totalmente (da 3,2 a 1,3-*fold* per cellule stimulate con 500 ng/ml di peptide RSPO1; da 5,3 a 2,2-*fold* per cellule stimulate con 2000 ng/ml di peptide RSPO1) (Fig. 40B).



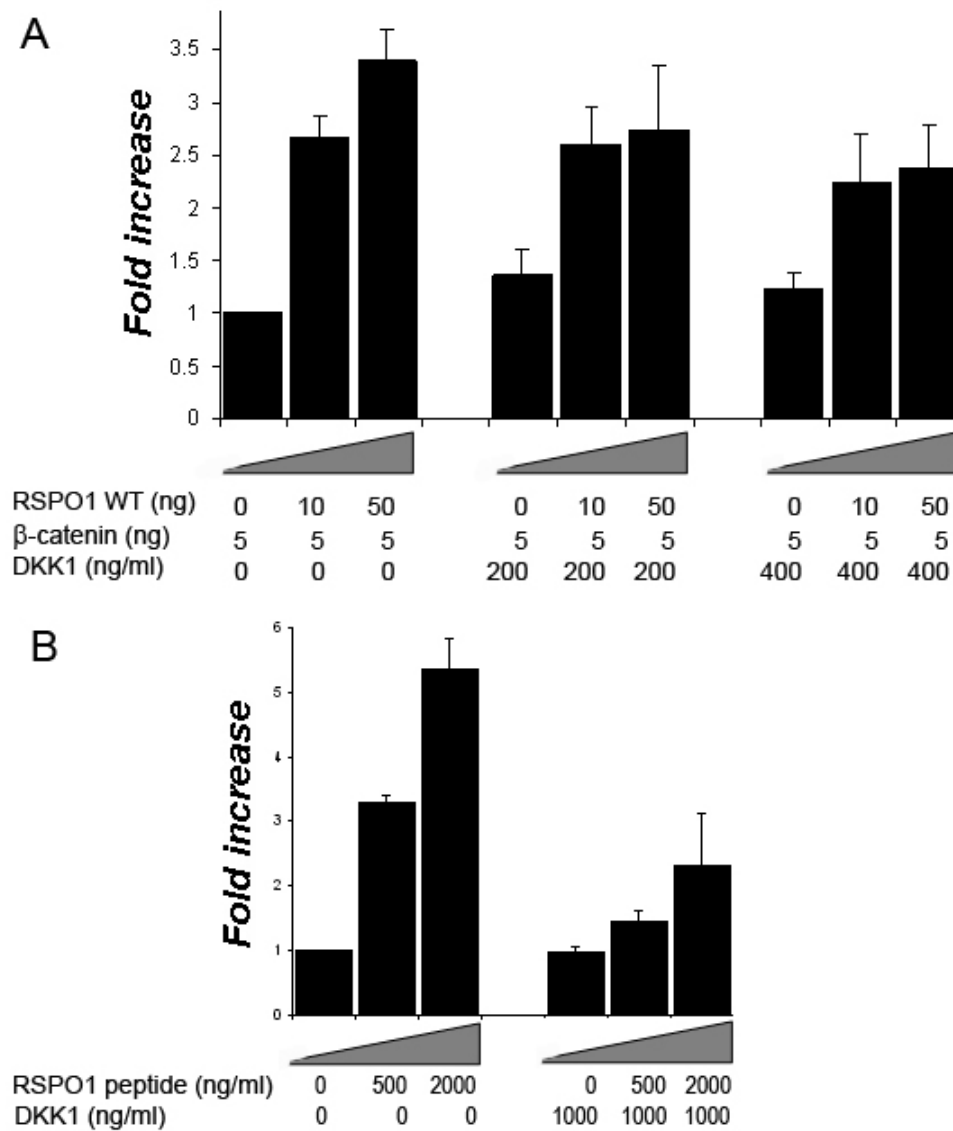


Fig. 40: Saggio luciferasi per testare la capacità inibitoria di Dkk1 sul plasmide pRSP01 e sulla proteina ricombinante RSP01. *A*, cellule tsa201 co-trasfettate con dosi crescenti di pRSP01 wt e con quantità fissa di  $\beta$ -catenina e trattate con dosi crescenti del peptide Dkk1. *B*, cellule stimulate con dosi crescenti del peptide ricombinante RSP01 e trattate con Dkk1.

#### 4.12) Localizzazione cellulare di RSPO1

Studi d'immunoistochimica cellulare hanno permesso di osservare l'espressione e la localizzazione della proteina RSPO1 in cellule trasfettate transientemente con la forma *wild-type* o mutata di R-spondina1. Un primo esperimento condotto su cellule H295R trasfettate con il plasmide pEGFP-N1 (usato come controllo) e con il costrutto pRSPO1-GFP wt ha mostrato una distribuzione uniforme della proteina fluorescente GFP per il plasmide vuoto e una localizzazione prevalentemente a livello nucleare e parzialmente a livello citoplasmatico per il plasmide pRSPO1 wt (Fig. 41A). Lo stesso esperimento è stato ripetuto utilizzando differenti tipi cellulari (CHO, HEK293T, NT2/D1) e diversi vettori (pRSPO1-GFP, pRSPO1-HA e pRSPO1), per essere sicuri che i risultati ottenuti non fossero stati alterati da possibili effetti secondari legati al tipo di linea cellulare o di costrutto plasmidico utilizzato (Fig. 41B). Tutti gli esperimenti condotti hanno confermato una localizzazione prevalentemente nucleare, con un "dotted spot pattern" simili a nucleoli, e una minore distribuzione citoplasmatica di R-spondina1.

Tramite l'utilizzo di un anticorpo primario diretto contro una proteina nucleolare ( $\alpha$ -C23 nucleolina) e di un anticorpo secondario coniugato con fluorocromo *Texas Red* è stato possibile confermare che gli *spot* visibili all'interno dei nuclei corrispondevano a dei nucleoli (Fig. 41C).

Allo scopo di confermare ulteriormente questi risultati, la localizzazione subcellulare di RSPO1 è stata studiata anche mediante esperimenti di Western blotting, analizzando estratti frazionati nucleo-citosol di cellule HEK293T trasfettate con pRSPO1-HA wt o mut. L'espressione della proteina R-spondina1 risulta essere prevalentemente nucleare: in cellule trasfettate con il plasmide pRSPO1-HA wt sono evidenti due bande di maggiore intensità nel nucleo rispetto al citosol. La stessa membrana è stata sottoposta ad ibridazione con l'anticorpo monoclonale diretto contro la  $\beta$ -actina e per tutti i campioni si sono osservate bande di simile intensità (Fig. 42A).

Abbiamo inoltre esaminato la distribuzione cellulare della proteina RSPO1 mutata, utilizzando costrutti contenenti un *tag* (l'anticorpo monoclonale diretto contro RSPO1 non era in grado di riconoscere la proteina mutata) e diverse linee cellulari (H295R, HEK293T). La tecnica della immunofluorescenza ha mostrato che la mutazione c.286+1G>A non sembra influire sulla localizzazione subcellulare della proteina in un sistema *in vitro*: stessa distribuzione prevalentemente nucleare con aspetto granulare mostrata dalla proteina wt (Fig. 42B). Come mostrato dall'esperimento di WB, la

maggior espressione nucleare è presente anche nelle cellule trasfettate con il plasmide pRSPO1-HA mut, ma la proteina p.Ile32\_Ile95del mutata mostra un *pattern* di espressione ridotto rispetto alla proteina wt (le due bande presentano minore intensità e altezza rispetto a quelle presenti nelle cellule che esprimono la forma *wild-type*) (Fig. 42A).

A seguito dei risultati dei saggi luciferasi ottenuti con l'utilizzo del peptide ricombinante RSPO1, abbiamo ritenuto opportuno provare a verificare un ipotetico ingresso del peptide all'interno delle cellule e studiarne l'eventuale localizzazione subcellulare.

Cellule tsa201 sono state cresciute nel terreno di coltura adeguato, supplementato con il peptide ricombinate RSPO1 (3000ng/ml). 48 ore dopo il terreno è stato rimosso e le cellule sono state ibridate con l'anticorpo monoclonale anti-RSPO1. Alcune delle cellule trattate con il peptide RSPO1, e sottoposti a permeabilizzazione, mostravano la presenza del peptide all'interno della cellula, con la stessa distribuzione subcellulare vista in precedenza (prevalentemente nucleare con aspetto granulare) (Fig. 42C). Nessuna delle cellule trattate con il peptide RSPO1, ma non permeabilizzate, mostrava tale tipo di distribuzione all'interno della cellula (dati non mostrati).

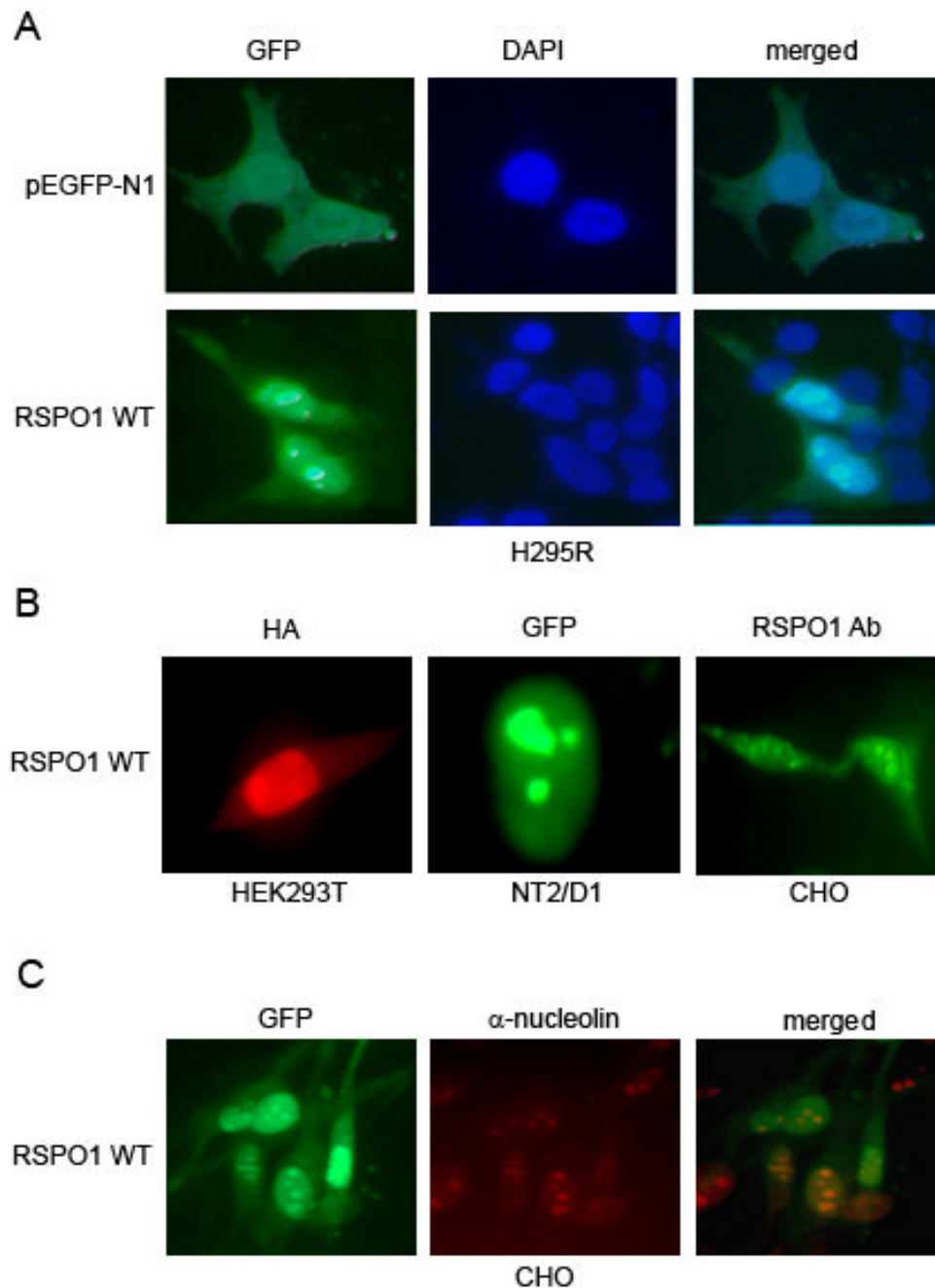


Fig. 41: **Immunofluorescenza per lo studio della localizzazione di RSP01 wt.** *A*, La trasfezione di H295R con pEGFP-N1 e pRSP01-GFP wt ha evidenziato una distribuzione uniforme di GFP per il plasmide vuoto, usato come controllo, e una localizzazione prevalentemente nucleare per il plasmide con l'inserto. La colorazione con DAPI è stata utilizzata per marcare i nuclei delle singole cellule. Il *merged* deriva dalla sovrapposizione delle due immagini GFP e DAPI. *B*, L'immunofluorescenza di HEK293T trasfettate con pRSP01-HA wt e ibridate con l'anticorpo anti HA, di NT2/D1 trasfettate con pRSP01-GFP e di CHO trasfettate con pRSP01 e ibridate con l'anticorpo diretto contro R-spondinal ha confermato una localizzazione prevalentemente nucleare e nucleolare per RSP01. *C*, CHO trasfettate con pRSP01-GFP wt. L'ibridazione con l'anticorpo diretto contro l' $\alpha$ -C23 nucleolina e con l'anticorpo secondario coniugato con *Texas Red* ha evidenziato che gli *spot* visibili all'interno dei nuclei corrispondevano a dei nucleoli.

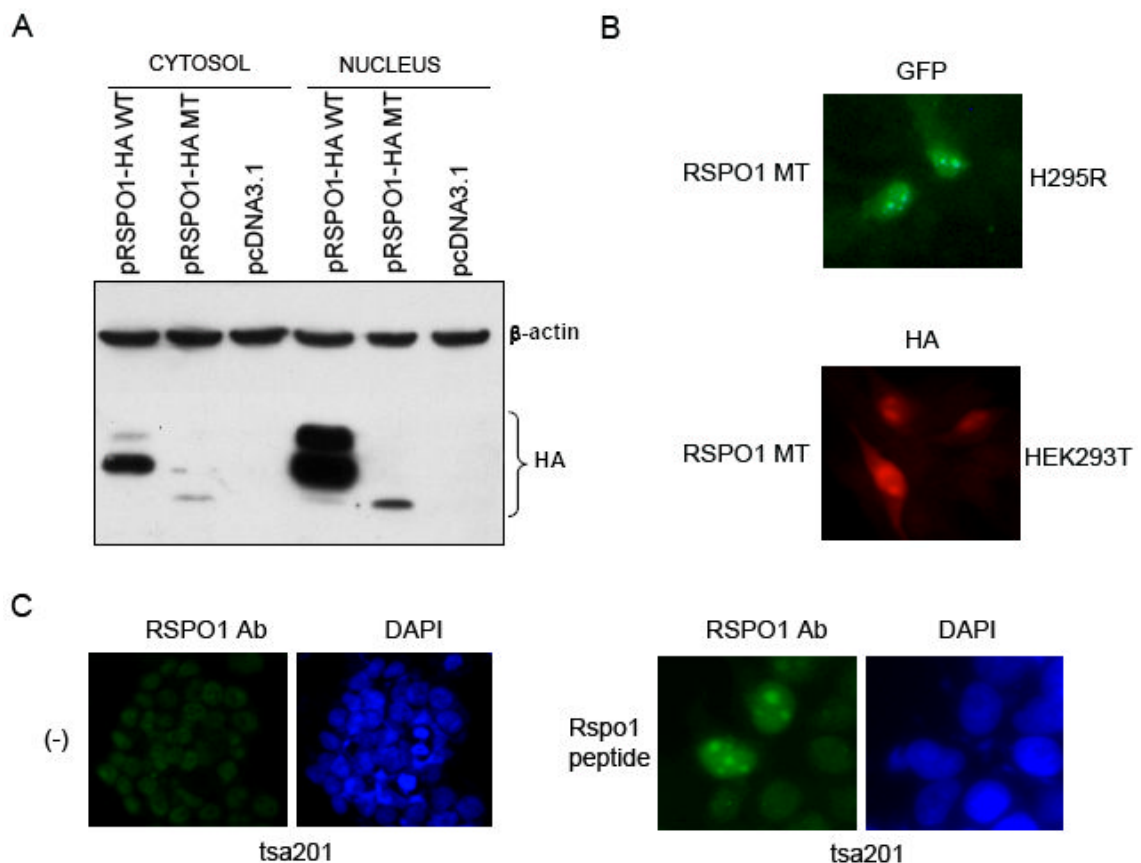


Fig. 42: **A**, Western blot su estratti proteici frazionati nucleo/citosol con l'anticorpo contro il tag HA e con l'anticorpo diretto contro la  $\beta$ -actina. L'analisi ha evidenziato che l'espressione della proteina R-spondinal è maggiore nel nucleo rispetto al citosol sia nelle cellule HEK293T trasfettate con il plasmide pRSP01-HA wt sia in quelle trasfettate con il plasmide mutato. L'analisi ha confermato che la forma *wild-type* presenta due bande di maggiore intensità e altezza rispetto a quella mutata. Non si osserva nessuna banda specifica per la proteina R-spondinal nelle cellule trasfettate con il pGFP. La stessa membrana è stata ibridata anche con l'anticorpo diretto contro la  $\beta$ -actina: bande di simile intensità sono presenti per tutti i campioni analizzati. **B**, **Immunofluorescenza su cellule trasfettate con la forma mutata di RSP01**. L'analisi d'immunofluorescenza su cellule H295R trasfettate con pRSP01-GFP mut (in verde) e cellule CHO trasfettate con pRSP01-HA mut (in rosso) ha mostrato lo stesso tipo di distribuzione cellulare di RSP01 wt. **C**, **Immunofluorescenza su cellule stimulate con il peptide RSP01**. Cellule tsa201 sono state fatte crescere in assenza (-) o in presenza (RSP01 peptide) della proteina ricombinante RSP01 per 48 ore e successivamente ibridate con l'anticorpo monoclonale anti-RSP01. Alcune delle cellule stimulate con il peptide mostravano la presenza della proteina all'interno del nucleo cellulare e dei nucleoli.

#### 4.13) Analisi di geni *target* mediante *over*-espressione di *RSPO1*

Al fine di analizzare l'interazione di R-spondinal *wild-type* (wt) e mutata (mut) con geni chiave nei meccanismi molecolari dello sviluppo sessuale, abbiamo deciso di condurre esperimenti di *over*-espressione di *RSPO1* per valutare la presenza di alterazioni nell'espressione di un ampio numero di geni utilizzando la tecnologia dei *microarray*.

Abbiamo scelto di utilizzare la linea cellulare NT2/D1 per testare se l'*over*-espressione di *RSPO1* possa causare un'alterazione dei livelli di trascritto genico, e, in modo particolare, per valutare gli effetti sui livelli di mRNA di alcuni fattori testicolari, quali *SRY*, *SOX9* e *SF-1*. Tramite PCR quantitativa abbiamo inizialmente confermato un'alta espressione endogena dei geni *SOX9* e *SRY* in questa particolare linea cellulare (dati non mostrati), che la rende particolarmente adatta al nostro tipo di studio. Successivamente le cellule NT2/D1 sono state trasfettate con il vettore pRSPO1-IRES2-GFP (wt o mut) mediante nucleofezione (Amaxa), tecnica che consente di ottenere un'elevata efficienza di trasfezione. Dopo 24 ore, le cellule che esprimevano la proteina GFP (GFP+), e quindi RSPO1, sono state separate tramite FACS (57% GFP+ RSPO1 wt; 36% GFP+ RSPO1 mut) (Fig. 43). L'mRNA totale è stato estratto per le successive analisi ed è stato eseguito un controllo quantitativo e qualitativo per tutti i campioni (Fig. 44). Solo i campioni con un RIN (*RNA Integrity Number*) superiore ad 8 (3 campioni per RSPO1 wt e 3 campioni per RSPO1 mut) sono stati utilizzati per la successiva ibridizzazione.

Come *array* è stato scelto il sistema *GeneChip Human Gene 1.0 ST array* (Affymetrics), che usa come sonde degli oligonucleotidi di 25bp e che offre una copertura dell'intero trascritto (28869 geni umani). Tutti e 6 i campioni, dopo essere stati sottoposti ad un'analisi di pre-processamento, hanno superato il controllo qualità (QC) e sono stati quindi considerati attendibili per le successive analisi. Per valutare eventuali differenze di espressione genica è stato utilizzato il metodo LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*). I dati sono poi stati corretti con il Benjamin-Hochberg (FDR) test per la correzione multipla e filtrati per  $p < 0.05$ . Poiché nessuno dei geni analizzati ha passato questo valore corretto di *cut-off*, sono stati selezionati i geni con un valore non corretto  $p < 0.01$ . In Tabella 17 sono riportati il numero dei geni *up*-regolati, *down*-regolati o che non mostrano cambiamenti dei livelli di espressione tra le due condizioni (wt e mut) analizzate. La lista completa dei geni *up*-regolati e *down*-regolati è riportata in Appendice.

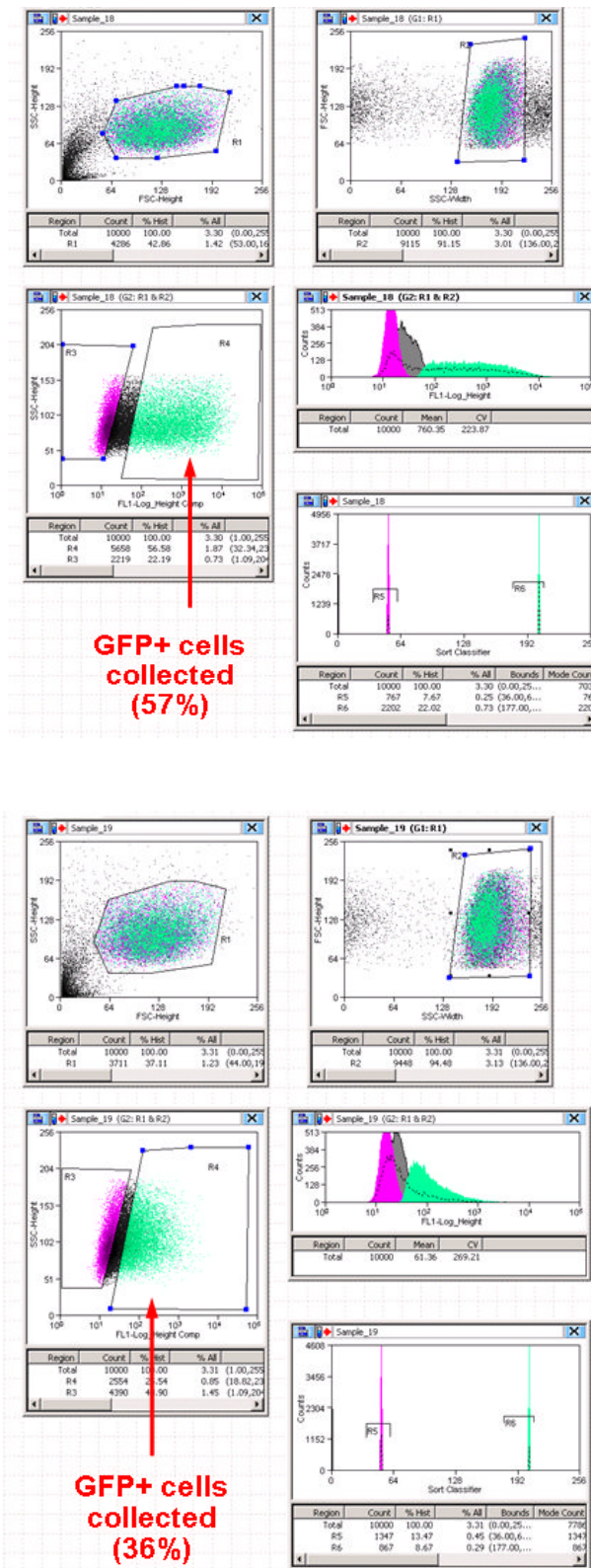


Fig. 43: **Selezione tramite FACS.** Le cellule NT2/D1 risultate positive alla trasfezione con il plasmide pRSP01-IRES2-GFP (wt e mut) sono state selezionate ed isolate per la successiva estrazione dell'RNA.

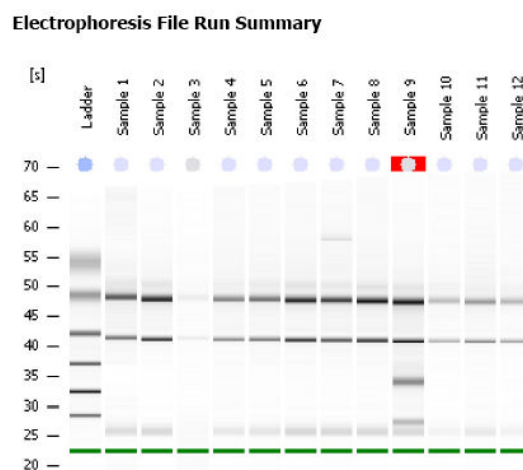


Fig. 44: **Controllo di qualità dell'RNA estratto.** Se l'RNA è di buona qualità, devono essere ben visibili le due bande corrispondenti all'rRNA e la banda dell'rRNA 28S deve avere un'intensità circa doppia di quella del 18S. Solo i campioni con un RIN (*RNA Integrity Number*) superiore a 8 sono stati utilizzati per le successive analisi di *microarray*.

uncorrected p-value 0.001	MUT_vs_WT
down-regulated	114
no change	24513
up-regulated	47

Tab. 17: **Risultati dei *microarray*.** Schema riassuntivo del cambiamento dei livelli di espressione genica dopo confronto tra cellule over-esprimenti il plasmide ricombinante pRSPO1-IRES2-GFP mutato e quelle over-esprimenti il plasmide ricombinante *wild-type*.



# **Capitolo 5**

## **DISCUSSIONE**

Lo sviluppo sessuale in senso maschile o femminile è determinato dall'azione coordinata di una serie di geni che, in condizioni normali, portano allo sviluppo dell'ovaio, quando non è presente il gene *SRY*, o verso lo sviluppo dei testicoli, se *SRY* funziona correttamente (Wilhelm *et al.*, 2007). Ad oggi, i *pathway* molecolari tempo e dose-dipendenti alla base della determinazione e differenziazione sessuale non sono stati completamente chiariti e molti fattori genetici devono essere ancora identificati. In particolare, mentre i meccanismi molecolari alla base della determinazione maschile nei mammiferi sono in gran parte noti, le basi molecolari della determinazione sessuale femminile rimangono ancora da scoprire.

Per molto tempo si è pensato che solo la differenziazione sessuale maschile fosse un processo attivo e dominante, indotto dall'espressione del gene *SRY* e seguito dall'*up*-regolazione di diversi geni a valle e da una precisa e distinta serie di eventi morfologici, paracrini ed endocrini, mentre si credeva che la differenziazione sessuale femminile fosse semplicemente un processo passivo (Wilhelm *et al.*, 2007). In realtà, sebbene i cambiamenti anatomici che avvengono nell'ovaio siano meno evidenti, un distinto gruppo di geni ovaio-specifici sono espressi durante lo sviluppo embrionale. La visione dello sviluppo ovarico come uno stato di *default*, che si stabilisce in assenza di *SRY*, è stata oramai modificata, anche grazie alla scoperta di individui 46,XX che presentano sviluppo di tessuto testicolare (DSS ovotesticolari 46,XX e DSS testicolari). La "reversione del sesso" in soggetti con cariotipo 46,XX è dovuta, nell'80-85% dei casi, alla traslocazione del gene *SRY* sul cromosoma X o su un autosoma, mentre quella indipendente da *SRY* è estremamente rara e si pensa possa essere causata dall'espressione di geni che determinano lo sviluppo testicolare, localizzati in cromosomi autosomici o sul cromosoma X, o dalla mancata funzione di geni che determinano lo sviluppo ovarico.

Nell'ambito dei nostri studi rivolti all'inquadramento clinico e genetico di numerosi casi con Difetti dello Sviluppo Sessuale (DSS), è giunto alla nostra attenzione il caso di un individuo 46,XX affetto da una forma sindromica caratterizzata da difetti dello sviluppo sessuale, anomalie cutanee e sordità. In particolare la nostra paziente, figlia di cugini primi, presentava i seguenti segni clinici: ambiguità dei genitali esterni, cheratodermia palmoplantare, opacità corneale bilaterale congenita, oncodistrofia e ipoacusia bilaterale neurosensoriale. La paziente è stata sottoposta a due diversi interventi di

gonadectomia che hanno portato, in entrambi i casi, ad una diagnosi di seminoma. L'esame istologico ha inoltre evidenziato, a livello gonadico, la presenza di componenti testicolari ed ovariche (*ovotestis*).

L'analisi molecolare del DNA, estratto da sangue periferico di questa paziente, ha rivelato l'assenza del gene *SRY*. L'ipotesi che una mutazione in omozigosi in un singolo gene potesse essere responsabile per il fenotipo clinico della nostra paziente era supportata dalla consanguineità dei genitori e rafforzata dalla presenza di due casi riportati in letteratura di individui 46,XX, *SRY*-negativi, con reversione completa del sesso, che presentavano alcuni segni clinici in comune con la nostra paziente (Radi *et al.*, 2005; Vernole *et al.*, 2000).

Per identificare le cause molecolari alla base del fenotipo clinico della paziente, abbiamo dapprima effettuato uno *screening* mutazionale dei geni *GJB2* (implicato in alcune forme sindromiche di sordità neurosensoriale, a volte associata a cheratodermia palmoplantare), *GJA1* (gene responsabile della displasia oculo-dento-digitale, una patologia caratterizzata tra l'altro da ipoacusia, anomalie oculari e ipercheratosi palmoplantare) e *WNT4* (implicato nello sviluppo sessuale femminile). Tali studi non hanno portato al rilevamento di alcuna mutazione nella nostra paziente.

Successivamente, le nostre indagini si sono indirizzate verso una nuova famiglia di geni, le R-spondine (*RSPO*), dal momento che risultano coinvolti nel *pathway* di trasduzione del segnale intracellulare Wnt/ $\beta$ -catenina (Kim K.A. *et al.*, 2006). Inoltre, mutazioni a carico di *RSPO1* erano state individuate negli individui 46,XX, *SRY*-negativi con reversione completa del sesso (Parma *et al.*, 2006).

Il ruolo della R-spondina1 nella determinazione del sesso può essere spiegato attraverso l'attivazione del *pathway* di trasduzione Wnt/ $\beta$ -catenina, che determina l'accumulo della  $\beta$ -catenina nel citosol e la conseguente traslocazione della proteina nel nucleo, dove forma il complesso trascrizionalmente attivo  $\beta$ -catenina/TCF (Fig. 45) (Kim K.A. *et al.*, 2008). In particolare, la  $\beta$ -catenina sembra rappresentare un punto nodale nella regolazione d'importanti geni implicati nello sviluppo sessuale. E' stato infatti dimostrato che, durante il differenziamento dei condrociti, esistono interazioni fisiche e funzionali tra SOX9 e  $\beta$ -catenina, che portano alla loro reciproca degradazione (Fig. 46) (Akiyama *et al.*, 2004). Un'alterata attività di R-spondina1 potrebbe, quindi, portare a una *down*-regolazione del *pathway* Wnt/ $\beta$ -catenina e a un conseguente incremento

dell'attività di SOX9, fattore che induce lo sviluppo della gonade in testicolo. Allo stesso tempo, mutazioni in *RSPO1* potrebbero ridurre i livelli di espressione del gene *NR0B1* (*DAX1*), il cui prodotto svolge un ruolo chiave nella determinazione ovarica (Mizusaki *et al.*, 2003). Tuttavia, il preciso meccanismo d'azione attraverso il quale le R-spondine regolano l'attivazione della  $\beta$ -catenina non è stato ancora completamente chiarito.

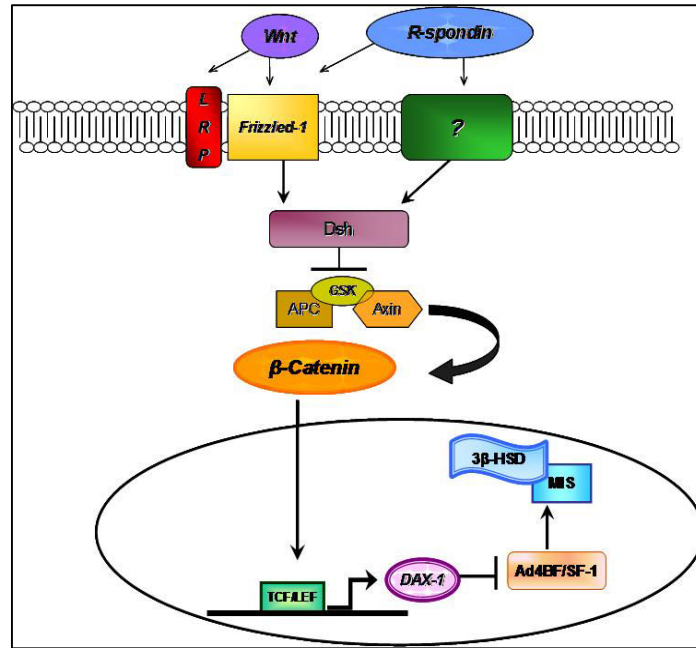


Fig. 45: Ipotetico meccanismo d'azione di RSPO1 nel pathway Wnt/b-catenina.

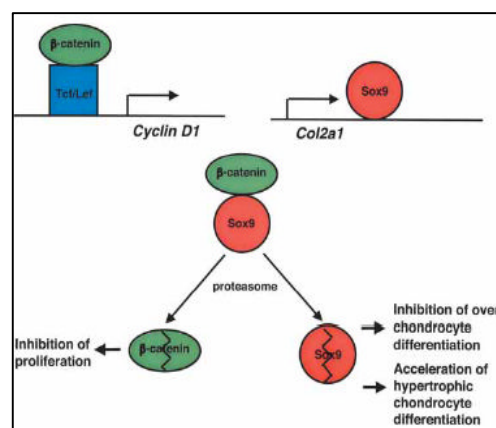


Fig. 46: **Interazione SOX9/ $\beta$ -catenina durante la differenziazione dei condrociti.** La formazione di un complesso proteico SOX9/ $\beta$ -catenina ne promuove la degradazione proteasoma-mediata (modificato da Akiyama *et al.*, 2004).

L'analisi di sequenza del gene *RSPO1* nella nostra paziente ci ha permesso di identificare una variante patogenetica in omozigosi (c.205+1G>A) che abolisce il sito donatore di *splicing* dell'introne 5 (Tomaselli *et al.*, 2008). Al fine di valutare i possibili effetti qualitativi della mutazione responsabile del fenotipo della nostra paziente, abbiamo ritenuto opportuno procedere con studi di espressione del trascritto *RSPO1*. La prevedibile conseguenza della mutazione c.286+1G>A era uno *splicing* non corretto dell'mRNA, che poteva portare a un inappropriato *skipping* dell'esone 5 o alla ritenzione dell'introne 5 nel trascritto maturo. Abbiamo quindi effettuato esperimenti di RT-PCR con varie combinazioni di *primer* specifici su RNA estratto da colture di fibroblasti e da tessuto gonadico della paziente e di un controllo. Tra le mutazioni geniche che causano una patologia nell'uomo, circa il 9% sono mutazioni del sito donatore di *splicing* che possono determinare la distruzione dell'*open reading frame*, portando all'introduzione di un codone di stop prematuro e quindi alla formazione di una proteina tronca (Krawczak *et al.*, 1992). I nostri studi hanno permesso di dimostrare che, nella paziente, la transizione c.286+1G>A porta alla produzione di un mRNA aberrante (r.94\_205del) privo dell'esone 5. Poiché la delezione di questo esone non comporta uno slittamento del modulo di lettura in nessuna delle 3 isoforme del gene, tale mRNA è presumibilmente tradotto in una proteina parzialmente funzionante di dimensioni minori rispetto a quella *wild-type* (p.Ile32\_Ile95del). In particolare, dovrebbero mancare il primo dominio furinico e i primi due residui del secondo dominio furinico (p.Ile32\_Ile295del). La Figura 47 mostra uno schema della sequenza amminoacidica della R-spondina1 *wild-type* e mutata.

1	11	21	31	41	51		
1	MRIGLCVVAL	VLSWTHLTIS	SRGIKGRQR	RISAEGSQAC	AKGCELCSEV	NGCLKCSPKL	60
61	FILLERNDIR	QVGVCLPSCP	PGYFDARNPD	MNKCICKCKIE	HCEACFSHNF	CTKCKEGLYL	120
121	HKGRCPACP	EGSSAANGTM	ECSSPAQCEM	SEWSPWGPCS	KKQQLCGFRR	GSEERTRRVL	180
181	HAPVGDHAAC	SDTKETRRCT	VRRVPCPEGQ	KRRKGGQGRR	ENANRNLRK	ESKEAGAGSR	240
241	RRKGGQQQQQ	QGTVGPLTSA	GPA	263			
1	11	21	31	41	51		
1	MRIGLCVVAL	VLSWTHLTIS	SRGIKGRQR	RKCKIEHCEA	CFSHNFCTKC	KEGLYLHKGR	60
61	CYPACPEGSS	AANGTMECSS	PAQCEMSEWS	PWGPCSKKQQ	LCGFRRGSEE	RTRRVLHAPV	120
121	GDHAACSDTK	ETRRCTVRRV	PCPEGQKRRK	GGQGRRENAN	RNLARKESKE	AGAGSRRRKG	180
181	QQQQQQQGTV	GPLTSAGPA	199				
SIGNAL	1-20	Potential					
CHAIN	21-263	R-spondin-1					
REPEAT	34-85	FU 1					
REPEAT	91-135	FU 2					
DOMAIN	147-207	TSP type-1					
CARBOHYD	137	N-linked (GlcNAc...)(Potential)					
DISULFID	148 and 190	By similarity					
DISULFID	159 and 166	By similarity					
DISULFID	199 and 206	By similarity					

Fig. 47: **Sequenza amminoacidiche.** Sequenze amminoacidiche (NCBI accession number NP\_001033722) della proteina R-spondina1 *wild-type* e mutata (p.Ile32\_Ile95del).

Al fine di valutare l'eventuale espressione e le dimensioni della proteina mutata, abbiamo adottato una strategia di clonaggio inserendo l'intera sequenza codificante del gene *RSPO1* (*wild-type* e mutata) in diversi vettori di espressione per cellule di mammifero. I successivi esperimenti di Western blotting hanno permesso di confermare che l'mRNA mutato veniva effettivamente tradotto in una proteina di dimensioni inferiori, anche se espressa in quantità minore rispetto alla proteina *wild-type*.

I due domini furinici della proteina RSPO1 sembrano essere essenziali per la stabilizzazione della  $\beta$ -catenina (Kazanskaya *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2007). Allo scopo di analizzare l'effetto della nostra proteina mutata (p.Ile32\_Ile295del), priva del primo dominio furinico, sull'attività della  $\beta$ -catenina, abbiamo deciso di eseguire degli esperimenti di RT-PCR e di Western blotting utilizzando mRNA ed estratti proteici totali dall'*ovotestis* della paziente e da un tessuto ovarico usato come controllo. Mentre dagli esperimenti di RT-PCR risulta evidente che la mutazione non ha effetti sull'espressione della  $\beta$ -catenina, l'ibridazione con un anticorpo anti- $\beta$ -catenina ha evidenziato ridotti livelli della proteina nel tessuto gonadico della paziente rispetto al controllo.

Inoltre, in accordo con i dati ottenuti da topi *knockout* per *Rspo1* (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008), dalle analisi condotte è emersa una forte *down*-regolazione dell'espressione del gene *WNT4* nel tessuto umano gonadico *RSPO1*-mutato in confronto al tessuto ovarico normale, mentre *SOX9* era appena individuabile in entrambi i tessuti. Questi risultati confermano, per la prima volta nell'uomo, l'ipotesi che *RSPO1* utilizza la  $\beta$ -catenina come mediatore per la stimolazione dell'espressione di *WNT4* durante il normale sviluppo ovarico, piuttosto che agire come attivatore del *pathway* testicolare (Buscara *et al.*, 2009; Chassot *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2009; Tomizuka *et al.*, 2008).

I dati ottenuti indicano fortemente che alla base del fenotipo della nostra paziente (DSS ovotesticolare, cheratodermia palmoplantare e sordità) vi sia la mutazione c.286+1G>A in *RSPO1*. Fino ad oggi, il DSS ovotesticolare 46,XX, non correlato alla presenza del gene *SRY*, non era mai stato associato all'alterazione di un singolo gene.

Mutazioni nel gene *RSPO1* sono state individuate in soggetti 46,XX affetti da DSS testicolare ("reversione completa del sesso") associato a ipercheratosi palmoplantare e predisposizione allo sviluppo del carcinoma squamoso della pelle (OMIM \*609595) (Parma *et al.*, 2006); i nostri dati dimostrano che mutazioni nello stesso gene sono in grado di causare anche DSS ovotesticolare 46,XX ("ermafroditismo vero"). In letteratura sono riportate famiglie in cui coesistono individui affetti da DSS ovotesticolare 46,XX e soggetti con DSS testicolare. Il nostro rilevamento di una mutazione recessiva, in grado di causare DSS ovotesticolare, nello stesso gene trovato mutato in soggetti 46,XX affetti da reversione completa del sesso, supporta l'ipotesi che alla base di queste due patologie vi possa essere un meccanismo genetico comune (Jarrah *et al.*, 2000; Sarafoglou and Ostrer, 2000). Questa tesi non era mai stata confermata a livello molecolare prima d'ora.

Le mutazioni nel gene *RSPO1*, precedentemente individuate da Parma *et al.* in due diverse famiglie che presentavano casi di DSS testicolare, sono responsabili, verosimilmente, di una completa mancanza di attività della proteina *RSPO1*. Nei membri affetti della prima famiglia descritta da questi autori, è riportata l'inserzione in omozigosi di un singolo nucleotide, che genera un *frameshift* con la creazione di un codone di stop 10 amminoacidi a valle. La seconda mutazione, rilevata in una famiglia con un unico caso affetto, consiste invece in una parziale delezione genica di 2752 bp.

Tale alterazione porterebbe alla produzione di una ipotetica proteina non funzionale, priva della sequenza peptide segnale e del primo dominio furinico.

Per definire meglio le caratteristiche della proteina R-spondina1, abbiamo inizialmente valutato il suo eventuale stato di glicosilazione. RSPO1 presenta, infatti, un putativo sito specifico, a livello dell'Asparagina 137, al quale può essere aggiunta una catena di zuccheri, e un dominio trombospondinico solitamente glicosilato nel motivo Trp-X-X-Trp in molte proteine. Esperimenti di Western blotting, effettuati utilizzando un anticorpo che riconosce un particolare residuo saccaridico, il C-mannosio, sembrano indicare che R-spondina1 non sia mannosilata.

Per capire meglio il ruolo e il meccanismo d'azione di RSPO1 durante lo sviluppo gonadico umano, abbiamo inizialmente esaminato l'abilità della forma mutata della proteina di attivare il *pathway* del segnale canonico Wnt. Come detto in precedenza, R-spondina1 stabilizza e attiva direttamente la  $\beta$ -catenina presente nel citosol attraverso i due domini furinici. Per valutare l'effetto della delezione dell'esone 5 del gene *RSPO1*, abbiamo comparato l'attivazione trascrizionale di TCF della proteina mutata con quella della proteina *wild-type*, mediante saggio luciferasi e il gene *reporter* TOPFLASH: mentre RSPO1 *wild-type* mostrava una moderata attivazione del vettore *reporter*, la forma mutata mostrava una totale assenza di attività.

Le R-spondine sembrano interagire con alcuni membri del *pathway* Wnt in modo sinergico. Per esempio, è stato riportato che la proteina secreta hRspo1 sinergizza con Wnt3a per stabilizzare la  $\beta$ -catenina, e che questa sinergia avviene nell'ambiente extracellulare (Lu *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2007). Per valutare se RSPO1 sia in grado di interagire non soltanto con i componenti extracellulari del segnale Wnt, ma anche con quelli intracellulari, abbiamo effettuato un secondo saggio luciferasi, co-trasfettando le cellule tsa-201 con dosi costanti del plasmide codificante la  $\beta$ -catenina e con dosi crescenti dei plasmidi codificanti le proteine RSPO1 *wild-type* e mutata. Di notevole interesse è il fatto che questo saggio sembra mostrare che RSPO1 *wild-type* sia in grado di potenziare l'attività della  $\beta$ -catenina con modalità dose-dipendente. Al contrario, nessuna amplificazione del segnale è stata ottenuta utilizzando la proteina mutata, confermando quindi la sua inattività funzionale. Inoltre, i risultati ottenuti da un successivo saggio luciferasico, effettuato utilizzando cellule trasfettate solo con  $\beta$ -



catenina e successivamente stimulate con dosi crescenti del peptide ricombinante R-spondina1, hanno confermato l'abilità di RSPO1 di amplificare il segnale di  $\beta$ -catenina. Recentemente è stato riportato che RSPO1 modula il segnale canonico Wnt, inibendo l'internalizzazione del co-recettore di Wnt, LRP6, per opera del complesso proteico Dkk1/Kremen. In particolare, sembra che RSPO1 competa con DKK1 per il legame a Kremen, permettendo al recettore LRP6 di essere presente sulla superficie cellulare e quindi disponibile per mediare il segnale Wnt (Binnerts et al., 2007). Allo scopo di capire se il moderato effetto sinergico tra R-spondina1 *wild-type* e  $\beta$ -catenina potesse essere correlato ai livelli di LRP6, regolati da RSPO1, presenti sulla superficie cellulare, abbiamo trattato le cellule tsa-201, trasfettate con RSPO1 e  $\beta$ -catenina, con dosi crescenti del peptide Dickkopf-1 (Dkk1), un potente inibitore del recettore LRP6. È stato riportato che la sinergia tra Wnt3a e la proteina secreta hRspo1 veniva completamente abolita dalla presenza di Dkk1 (Wei, 2008). Stranamente, abbiamo trovato che, nel nostro caso, Dkk1 è in grado di inibire solo parzialmente l'amplificazione del segnale della  $\beta$ -catenina, indotta da RSPO1.

Questi risultati suggeriscono che la rimanente attivazione trascrizionale di TCF possa essere correlata all'esistenza di un meccanismo addizionale e alternativo di RSPO1, indipendente dall'inibizione dell'internalizzazione di LRP6.

Consistentemente con la presenza di un putativo peptide segnale nella regione N-terminale, è stato dimostrato che R-spondina1 è una proteina secreta (Kim K.A. *et al.*, 2006), così come la maggior parte delle altre proteine contenenti il dominio trombospondinico (TSP) di tipo 1. Allo stesso tempo, il dominio C-terminale di questa proteina è caratterizzato dalla presenza di una regione contenente un putativo segnale di localizzazione nucleare (Kamata *et al.*, 2004; Kim K.A. *et al.*, 2006).

Poiché dai nostri esperimenti è emerso che la proteina R-spondina1 è in grado di amplificare l'attività di  $\beta$ -catenina sul promotore TCF a seguito della co-trasfezione  $\beta$ -catenina/RSPO1, abbiamo deciso di indagare se questo moderato effetto sinergico di RSPO1 potesse essere correlato alla presenza della proteina all'interno della cellula. Tutti gli esperimenti di immunofluorescenza condotti su diverse linee cellulari e utilizzando vettori con *tag* diversi hanno evidenziato la presenza della proteina RSPO1 (*wild-type* e mutata) all'interno della cellula, con una localizzazione maggiore nel nucleo rispetto al citoplasma e con una caratteristica concentrazione all'interno dei

nucleoli. Esperimenti di Western blotting hanno permesso di confermare questi risultati, sia per la proteina *wild-type* sia per la mutata. Inoltre, aggiungendo il peptide ricombinante R-spondina1 al mezzo di coltura, abbiamo visto che in alcune cellule la proteina era presente a livello nucleare e mostrava il tipico *spot* nucleolare, a suggerire quindi che la proteina presente all'esterno della cellula è in grado di entrare al suo interno.

La presenza della proteina all'interno del nucleo e dei nucleoli cellulari potrebbe indicare un ruolo di RSPO1 in meccanismi d'azione alternativi a quello precedentemente già descritto da altri autori. RSPO1 potrebbe quindi non agire esclusivamente come proteina secreta a livello della membrana cellulare (il che spiegherebbe i risultati ottenuti dai nostri studi funzionali sulla proteina), ma potrebbe agire anche a livello nucleare, magari a livello di regolazione dell'espressione genica. È importante sottolineare, infatti, che la proteina RSPO1 è caratterizzata da una coda poliglutamminica (polyQ), tipica di molti fattori di trascrizione, quali SP1 e CBP (Gerber *et al.*, 1994).

L'analisi mutazionale del gene *RSPO1* che abbiamo condotto su 8 pazienti con cariotipo 46,XX, *SRY* negativi, affetti da DSS ovotesticolare o da disgenesi gonadica non sindromica non ha evidenziato alcuna mutazione. Questo dato sembra suggerire che mutazioni in questo gene sono da ricercare in pazienti XX che, oltre a un Difetto dello Sviluppo Sessuale, presentano anche cheratodermia palmoplantare, o comunque lesioni di tipo dermatologiche simili.

Al fine di analizzare l'interazione di R-spondina1 *wild-type* e mutata con geni chiave nei meccanismi molecolari alla base della determinazione e differenziazione sessuale, sono stati condotti esperimenti di *over*-espressione genica. Purtroppo, i dati preliminari ottenuti dalle analisi di *microarray* non hanno evidenziato, tra i fattori ad oggi noti implicati nello sviluppo sessuale, possibili geni *target* di RSPO1. Questo potrebbe essere dovuto a un errore nella scelta del sistema cellulare utilizzato (le cellule NT2/D1 potrebbero essere non responsive a RSPO1), o ad altre scelte del protocollo sperimentale. Dovranno, ovviamente, essere analizzati in modo più dettagliato i geni il cui livello di espressione è risultato alterato, allo scopo di individuare nuovi geni con un possibile ruolo nello sviluppo sessuale. Sarebbe stato sicuramente interessante valutare

eventuali geni *target* di *RSPO1* mediante esperimenti di silenziamento genico. Ciò non è stato possibile, poiché non abbiamo trovato una linea cellulare che esprimesse alti livelli endogeni di *RSPO1* da utilizzare a tale scopo.

Il quadro clinico e molecolare della paziente, che ha avuto cicli mestruali spontanei e regolari fino all'età di 27 anni, ci ha permesso di ipotizzare che fisiologicamente la proteina R-spondina1 agisca da repressore dello sviluppo in senso maschile della gonade. Negli individui XY il gene *SRY* potrebbe agire quale repressore di R-spondina1 portando a un differenziamento testicolare, mentre mutazioni in *RSPO1* in soggetti XX porterebbero alla derepressione parziale o totale dello sviluppo maschile. Tale meccanismo sembra essere in accordo con il caso qui descritto in cui la proteina R-spondina1, parzialmente funzionante e poco espressa, determina un fenotipo “più lieve” portando a DSS ovotesticolare 46,XX, invece che alla “reversione completa del sesso” riportata nel lavoro di Parma et al. (2006), in cui le mutazioni *RSPO1* individuate causavano una completa assenza dell'attività proteica.

Gli esperimenti condotti in questo studio hanno dimostrato che nella nostra paziente la proteina mutata viene prodotta, seppur in quantità inferiori rispetto alla proteina *wild-type* ed è responsabile dei minori livelli di  $\beta$ -catenina presenti nella gonade. Gli studi funzionali da noi effettuati sembrano inoltre indicare che la mancanza del primo dominio furinico risulti nella totale incapacità della proteina mutata ad attivare trascrizionalmente il promotore TCF.

Il fenotipo “attenuato” riscontrato nella nostra paziente potrebbe quindi derivare da una conservata attività funzionale della proteina *RSPO1* mutata in *pathway* alternativi a quello preso in esame. Infatti, gli esperimenti che hanno vagliato l'interazione tra R-spondina1 *wild-type* e  $\beta$ -catenina, insieme ai risultati degli studi volti a valutare la localizzazione cellulare della proteina, fanno ipotizzare che R-spondina1 possa regolare il segnale Wnt attraverso meccanismi o componenti non ancora identificati (Binnerts et al., 2007).

Va inoltre ricordato che topi XX *knockout* per *Rspo1* non presentano reversione completa del sesso ma un fenotipo parzialmente *sex-reversed* caratterizzato da gonadi contenente sia tubuli seminiferi sia pochi follicoli ovarici (*ovotestis*), e persistenza dei dotti di Wolff e dei dotti di Müller (Chassot et al., 2008; Tomizuka et al., 2008).

Questi riscontri rendono evidente che *RSPO1* appartiene a un circuito regolativo estremamente complesso in cui sono coinvolti numerosi *pathway* molecolari dose-dipendenti e con funzione spesso complementare .

I risultati ottenuti fino ad oggi pongono senza dubbio *RSPO1* nella particolare posizione di gene necessario per la determinazione sessuale femminile nei mammiferi (Fig. 48). L'individuazione di ulteriori casi con mutazioni in *RSPO1* potrà sicuramente contribuire a una migliore definizione dello spettro fenotipico ad esse associate.

Le evidenze emerse dalla presente ricerca e da altre recenti acquisizioni potranno inoltre essere affiancate da ulteriori studi volti all'identificazione dei geni *target* di *RSPO1* e dei suoi geni regolatori. L'integrazione dei risultati di questa e di future ricerche potrà verosimilmente far luce sull'esatto meccanismo di azione della proteina migliorando le nostre conoscenze sui meccanismi, ritenuti fino a poco tempo fa misteriosi, che conducono al dimorfismo sessuale.

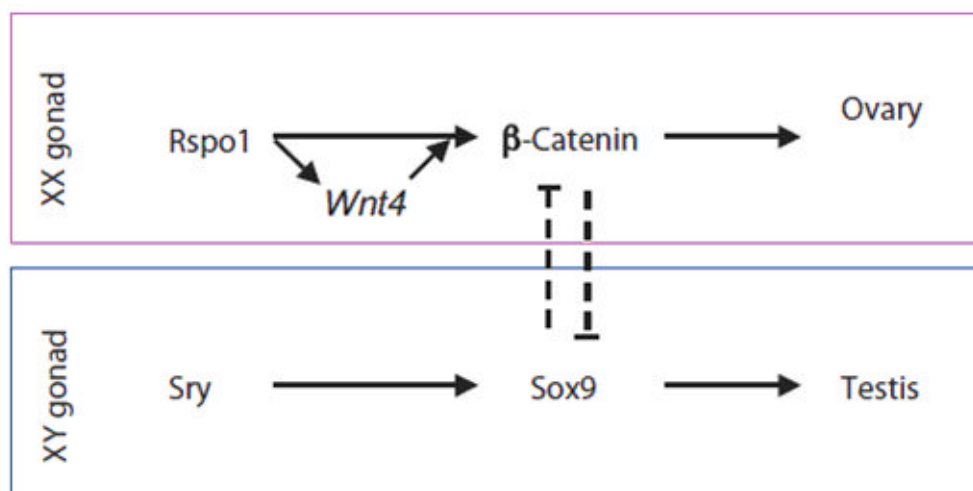


Fig. 48: **Ipotetico meccanismo d'azione di *RSPO1***. La determinazione sessuale è controllata da una bilancia tra due *pathway* antagonisti: mentre *SRY* stimola l'espressione di *SOX9* portando alla differenziazione maschile, *RSPO1* induce l'espressione di *WNT4* e il segnale  $\beta$ -catenina, spostando la bilancia verso il lato femminile (modificato da Chassot *et al.*, 2008)



## BIBLIOGRAFIA

- Achermann J.C., Ito M., Ito M., Hindmarsh P.C., & Jameson J.L. (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat.Genet.* **22**, 125-126.
- Ahmed S.F., Morrison S., & Hughes I.A. (2004) Intersex and gender assignment; the third way? *Arch.Dis.Child* **89**, 847-850.
- Akiyama H., Kamitani T., Yang X., Kandyil R., Bridgewater L.C., Fellous M., Mori-Akiyama Y., & de C.B. (2005) The transcription factor Sox9 is degraded by the ubiquitin-proteasome system and stabilized by a mutation in a ubiquitin-target site. *Matrix Biol.* **23**, 499-505.
- Arango N.A., Lovell-Badge R., & Behringer R.R. (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* **99**, 409-419.
- Armstrong J.F., Pritchard-Jones K., Bickmore W.A., Hastie N.D., & Bard J.B. (1993) The expression of the Wilms' tumour gene, *WT1*, in the developing mammalian embryo. *Mech.Dev.* **40**, 85-97.
- Barbieri M & Carinci P (1997) *Embriologia*, 2nd edn.
- Behringer R.R. (1994) The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance. *Curr.Top.Dev.Biol.* **29**, 171-187.
- Berkovitz G.D., Fechner P.Y., Marcantonio S.M., Bland G., Stetten G., Goodfellow P.N., Smith K.D., & Migeon C.J. (1992) The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum.Genet.* **88**, 411-416.
- Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N., & Fellous M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* **348**, 448-450.
- Binnerts M.E., Kim K.A., Bright J.M., Patel S.M., Tran K., Zhou M., Leung J.M., Liu Y., Lomas W.E., III, Dixon M., Hazell S.A., Wagle M., Nie W.S., Tomasevic N., Williams J., Zhan X., Levy M.D., Funk W.D., & Abo A. (2007) R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 14700-14705.
- Blecher S.R. & Erickson R.P. (2007) Genetics of sexual development: a new paradigm. *Am.J.Med.Genet.A* **143A**, 3054-3068.
- Boucekkine C., Vilain E., McElreavey K., Jaubert F., Brauner R., Thibaud E., Battin J., Toubanc J.E., Kucheria K., Chaabouni S., & . (1994) [Study of sex determination gene (SRY) in 46,XY gonadal dysgenesis]. *Ann.Endocrinol.(Paris)* **54**, 315-321.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Brennan J. & Capel B. (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat.Rev.Genet.* **5**, 509-521.
- Brown T.A. (1991) *Essential molecular biology : a practical approach*. Oxford University Press.

- Buscara L., Montazer-Torbati F., Chadi S., Auguste A., Laubier J., Chassot A.A., Renault L., Passet B., Costa J., Pannetier M., Vilotte M., Chaboissier M.C., Vilotte J.L., Pailhoux E., & Le P.F. (2009) Goat RSP01 over-expression rescues sex-reversal in Rspo1-knockout XX mice but does not perturb testis differentiation in XY or sex-reversed XX mice. *Transgenic Res.*
- Canto P., Soderlund D., Reyes E., & Mendez J.P. (2004) Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89**, 4480-4483.
- Capel B. (1998) Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu.Rev.Physiol* **60**, 497-523.
- Chassot A.A., Gregoire E.P., Magliano M., Lavery R., & Chaboissier M.C. (2008a) Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. *Sex Dev.* **2**, 219-227.
- Chassot A.A., Ranc F., Gregoire E.P., Roepers-Gajadien H.L., Taketo M.M., Camerino G., de Rooij D.G., Schedl A., & Chaboissier M.C. (2008b) Activation of beta-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum.Mol.Genet.* **17**, 1264-1277.
- Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**, 156-159.
- Cui K.H., Warnes G.M., Jeffrey R., & Matthews C.D. (1994) Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* **343**, 79-82.
- Damiani D., Fellous M., McElreavey K., Barbaux S., Barreto E.S., Dichtchekian V., & Setian N. (1997) True hermaphroditism: clinical aspects and molecular studies in 16 cases. *Eur.J.Endocrinol.* **136**, 201-204.
- Davis B.J. (1964) Disc Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **121**, 404-427.
- de la Chapelle A., Hortling H., Niemi M., & Wennstrom J. (1964) XX sex chromosomes in a human male: first case. *Acta Med Scand Suppl* **412**, 25-38.
- de la Chapelle A. (1981) The etiology of maleness in XX men. *Hum.Genet.* **58**, 105-116.
- de la Chapelle A., Tippett P.A., Wetterstrand G., & Page D. (1984) Genetic evidence of X-Y interchange in a human XX male. *Nature* **307**, 170-171.
- De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F., & Berta P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol.Cell Biol.* **18**, 6653-6665.
- Denys P., Malvaux P., Van Den B.H., Tanghe W., & Proesmans W. (1967) [Association of an anatomopathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]. *Arch.Fr.Pediatr.* **24**, 729-739.
- DiNapoli L. & Capel B. (2008) SRY and the standoff in sex determination. *Mol.Endocrinol.* **22**, 1-9.
- Drash A., Sherman F., Hartmann W.H., & Blizzard R.M. (1970) A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J.Pediatr.* **76**, 585-593.

- Eicher E.M. & Washburn L.L. (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu.Rev.Genet.* **20**, 327-360.
- Elsheikh M., Dunger D.B., Conway G.S., & Wass J.A. (2002) Turner's syndrome in adulthood. *Endocr.Rev.* **23**, 120-140.
- Fechner P.Y., Marcantonio S.M., Jaswaney V., Stetten G., Goodfellow P.N., Migeon C.J., Smith K.D., Berkovitz G.D., Amrhein J.A., Bard P.A., & . (1993) The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **76**, 690-695.
- Ferrari S., Harley V.R., Pontiggia A., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R., & Bianchi M.E. (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* **11**, 4497-4506.
- Fischbach B.V., Trout K.L., Lewis J., Luis C.A., & Sika M. (2005) WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases. *Pediatrics* **116**, 984-988.
- Fodde R. & Brabletz T. (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr.Opin.Cell Biol.* **19**, 150-158.
- Foster J.W., Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N., & . (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525-530.
- Gerber H.P., Seipel K., Georgiev O., Hofferer M., Hug M., Rusconi S., & Schaffner W. (1994) Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**, 808-811.
- Goodfellow P.N. & Lovell-Badge R. (1993) SRY and sex determination in mammals. *Annu.Rev.Genet.* **27**, 71-92.
- Guellaen G., Casanova M., Bishop C., Geldwerth D., Andre G., Fellous M., & Weissenbach J. (1984) Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* **307**, 172-173.
- Guerra J.G., de Mello M.P., Assumpcao J.G., Morcillo A.M., Marini S.H., Baptista M.T., Paiva e Silva RB, Marques-de-Faria A.P., & iel-Guerra A.T. (1998) True hermaphrodites in the southeastern region of Brazil: a different cytogenetic and gonadal profile. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **11**, 519-524.
- Haber D.A., Sohn R.L., Buckler A.J., Pelletier J., Call K.M., & Housman D.E. (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 9618-9622.
- Hadjiathanasiou C.G., Brauner R., Lortat-Jacob S., Nivot S., Jaubert F., Fellous M., Nihoul-Fekete C., & Rappaport R. (1994) True hermaphroditism: genetic variants and clinical management. *J.Pediatr.* **125**, 738-744.
- Hammes A., Guo J.K., Lutsch G., Leheste J.R., Landrock D., Ziegler U., Gubler M.C., & Schedl A. (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* **106**, 319-329.
- Hanley N.A., Hagan D.M., Clement-Jones M., Ball S.G., Strachan T., Salas-Cortes L., McElreavey K., Lindsay S., Robson S., Bullen P., Ostrer H., & Wilson D.I. (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech.Dev.* **91**, 403-407.



- Harley V.R., Layfield S., Mitchell C.L., Forwood J.K., John A.P., Briggs L.J., McDowall S.G., & Jans D.A. (2003a) Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 7045-7050.
- Harley V.R., Clarkson M.J., & Argentaro A. (2003b) The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr.Rev.* **24**, 466-487.
- Hatano O., Takayama K., Imai T., Waterman M.R., Takakusu A., Omura T., & Morohashi K. (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* **120**, 2787-2797.
- Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A.N., & Bartley J. (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am.J.Med.Genet.* **87**, 349-353.
- Hughes I.A. (2002) Intersex. *BJU.Int.* **90**, 769-776.
- Hughes I.A., Houk C., Ahmed S.F., & Lee P.A. (2006) Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch.Dis.Child* **91**, 554-563.
- Ingraham H.A., Lala D.S., Ikeda Y., Luo X., Shen W.H., Nachtigal M.W., Abbud R., Nilson J.H., & Parker K.L. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* **8**, 2302-2312.
- Jarrah N., El-Shanti H., Khier A., Obeidat F.N., Haddidi A., & Ajlouni K. (2000) Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. *Eur.J.Pediatr.* **159**, 912-918.
- Jimenez R., Sanchez A., Burgos M., & az De la G.R. (1996) Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.* **12**, 164-166.
- Jordan B.K., Mohammed M., Ching S.T., Delot E., Chen X.N., Dewing P., Swain A., Rao P.N., Elejalde B.R., & Vilain E. (2001) Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am.J.Hum.Genet.* **68**, 1102-1109.
- Kamata T., Katsube K., Michikawa M., Yamada M., Takada S., & Mizusawa H. (2004) R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim.Biophys.Acta* **1676**, 51-62.
- Kanai Y. & Koopman P. (1999) Structural and functional characterization of the mouse Sox9 promoter: implications for campomelic dysplasia. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 691-696.
- Katoh M. & Katoh M. (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin.Cancer Res.* **13**, 4042-4045.
- Kazanskaya O., Glinka A., del B.B., I, Stannek P., Niehrs C., & Wu W. (2004) R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev.Cell* **7**, 525-534.
- Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H., & Koopman P. (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* **122**, 2813-2822.
- Kim K.A., Kakitani M., Zhao J., Oshima T., Tang T., Binnerts M., Liu Y., Boyle B., Park E., Emtage P., Funk W.D., & Tomizuka K. (2005) Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* **309**, 1256-1259.

- Kim K.A., Zhao J., Andarmani S., Kakitani M., Oshima T., Binnerts M.E., Abo A., Tomizuka K., & Funk W.D. (2006) R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* **5**, 23-26.
- Kim K.A., Wagle M., Tran K., Zhan X., Dixon M.A., Liu S., Gros D., Korver W., Yonkovich S., Tomasevic N., Binnerts M., & Abo A. (2008) R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol.Biol.Cell* **19**, 2588-2596.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M.C., Poulat F., Behringer R.R., Lovell-Badge R., & Capel B. (2006) Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS.Biol.* **4**, e187.
- Knower K.C., Kelly S., & Harley V.R. (2003) Turning on the male--SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet.Genome Res.* **101**, 185-198.
- Kolon T.F., Ferrer F.A., & McKenna P.H. (1998) Clinical and molecular analysis of XX sex reversed patients. *J.Urol.* **160**, 1169-1172.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., & Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* **351**, 117-121.
- Krawczak M., Reiss J., & Cooper D.N. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum.Genet.* **90**, 41-54.
- Krob G., Braun A., & Kuhnle U. (1994) True hermaphroditism: geographical distribution, clinical findings, chromosomes and gonadal histology. *Eur.J.Pediatr.* **153**, 2-10.
- Kronenberg H, Melmed S, Polonsky K.S., & Larsen P.R (2007) Williams Textbook of Endocrinology, 11th edn.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanfranco F., Kamischke A., Zitzmann M., & Nieschlag E. (2004) Klinefelter's syndrome. *Lancet* **364**, 273-283.
- Lin L., Philibert P., Ferraz-de-Souza B., Kelberman D., Homfray T., Albanese A., Molini V., Sebire N.J., Einaudi S., Conway G.S., Hughes I.A., Jameson J.L., Sultan C., Dattani M.T., & Achermann J.C. (2007) Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **92**, 991-999.
- Liu C.F., Bingham N., Parker K., & Yao H.H. (2009) Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum.Mol.Genet.* **18**, 405-417.
- Lu W., Kim K.A., Liu J., Abo A., Feng X., Cao X., & Li Y. (2008) R-spondin1 synergizes with Wnt3A in inducing osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression. *FEBS Lett.* **582**, 643-650.
- Luo X., Ikeda Y., & Parker K.L. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**, 481-490.
- MacLaughlin D.T. & Donahoe P.K. (2004) Sex determination and differentiation. *N.Engl.J.Med.* **350**, 367-378.

- Maier E.M., Leitner C., Lohrs U., & Kuhnle U. (2003) True hermaphroditism in an XY individual due to a familial point mutation of the SRY gene. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **16**, 575-580.
- Martineau J., Nordqvist K., Tilmann C., Lovell-Badge R., & Capel B. (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr.Biol.* **7**, 958-968.
- McElreavey K., Rappaport R., Vilain E., Abbas N., Richaud F., Lortat-Jacob S., Berger R., Le C.M., Boucekkine C., Kucheria K., & . (1992) A minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum.Genet.* **90**, 121-125.
- McElreavey K., Vilain E., Abbas N., Herskowitz I., & Fellous M. (1993) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 3368-3372.
- McElreavey K., Barbaux S., Ion A., & Fellous M. (1995) The genetic basis of murine and human sex determination: a review. *Heredity* **75 ( Pt 6)**, 599-611.
- McLaren A. (1995) Germ cells and germ cell sex. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **350**, 229-233.
- Meeks J.J., Weiss J., & Jameson J.L. (2003) Dax1 is required for testis determination. *Nat.Genet.* **34**, 32-33.
- Mizusaki H., Kawabe K., Mukai T., Ariyoshi E., Kasahara M., Yoshioka H., Swain A., & Morohashi K. (2003) Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol.Endocrinol.* **17**, 507-519.
- Morais da S.S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., & Lovell-Badge R. (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat.Genet.* **14**, 62-68.
- Morohashi K., Iida H., Nomura M., Hatano O., Honda S., Tsukiyama T., Niwa O., Hara T., Takakusu A., Shibata Y., & . (1994) Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol.Endocrinol.* **8**, 643-653.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., & Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **51 Pt 1**, 263-273.
- Muscатели F., Strom T.M., Walker A.P., Zanaria E., Recan D., Meindl A., Bardoni B., Guioli S., Zehetner G., Rabl W., & . (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* **372**, 672-676.
- Nachtigal M.W., Hirokawa Y., Enyeart-VanHouten D.L., Flanagan J.N., Hammer G.D., & Ingraham H.A. (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* **93**, 445-454.
- Nagamine C.M., Morohashi K., Carlisle C., & Chang D.K. (1999) Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene Sry. *Dev.Biol.* **216**, 182-194.
- Nam J.S., Turcotte T.J., Smith P.F., Choi S., & Yoon J.K. (2006) Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J.Biol.Chem.* **281**, 13247-13257.

- Nam J.S., Turcotte T.J., & Yoon J.K. (2007) Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr.Patterns*. **7**, 306-312.
- Nef S., Schaad O., Stallings N.R., Cederroth C.R., Pitetti J.L., Schaer G., Malki S., Dubois-Dauphin M., Boizet-Bonhoure B., Descombes P., Parker K.L., & Vassalli J.D. (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev.Biol.* **287**, 361-377.
- Ornstein L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **121**, 321-349.
- Page D.C., Brown L.G., & de la C.A. (1987) Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XX males. *Nature* **328**, 437-440.
- Painter T.S. (1923) Further observations on the sex chromosomes of mammals. *Science* **58**, 247-248.
- Parker K.L., Rice D.A., Lala D.S., Ikeda Y., Luo X., Wong M., Bakke M., Zhao L., Frigeri C., Hanley N.A., Stallings N., & Schimmer B.P. (2002) Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog.Horm.Res.* **57**, 19-36.
- Parma P., Radi O., Vidal V., Chaboissier M.C., Dellambra E., Valentini S., Guerra L., Schedl A., & Camerino G. (2006) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat.Genet.* **38**, 1304-1309.
- Pelletier J., Bruening W., Kashtan C.E., Mauer S.M., Manivel J.C., Striegel J.E., Houghton D.C., Junien C., Habib R., Fouser L., & . (1991) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* **67**, 437-447.
- Radi O., Parma P., Imbeaud S., Nasca M.R., Uccellatore F., Maraschio P., Tiepolo L., Micali G., & Camerino G. (2005) XX sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am.J.Med.Genet.A* **138A**, 241-246.
- Ramsay M., Bernstein R., Zwane E., Page D.C., & Jenkins T. (1988) XX true hermaphroditism in southern African blacks: an enigma of primary sexual differentiation. *Am.J.Hum.Genet.* **43**, 4-13.
- Ross M.T., Bentley D.R., & Tyler-Smith C. (2006) The sequences of the human sex chromosomes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **16**, 213-218.
- Rozen S. & Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol.Biol.* **132**, 365-386.
- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Sarafoglou K. & Ostrer H. (2000) Clinical review 111: familial sex reversal: a review. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 483-493.
- Sax L. (2002) How common is intersex? a response to Anne Fausto-Sterling. *J.Sex Res.* **39**, 174-178.
- Sharma P.M., Yang X., Bowman M., Roberts V., & Sukumar S. (1992) Molecular cloning of rat Wilms' tumor complementary DNA and a study of messenger RNA expression in the urogenital system and the brain. *Cancer Res.* **52**, 6407-6412.

- Shen W.H., Moore C.C., Ikeda Y., Parker K.L., & Ingraham H.A. (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77**, 651-661.
- Sim H., Rimmer K., Kelly S., Ludbrook L.M., Clayton A.H., & Harley V.R. (2005) Defective calmodulin-mediated nuclear transport of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in XY sex reversal. *Mol.Endocrinol.* **19**, 1884-1892.
- Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., & Goodfellow P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244.
- Slaney S.F., Chalmers I.J., Affara N.A., & Chitty L.S. (1998) An autosomal or X linked mutation results in true hermaphrodites and 46,XX males in the same family. *J.Med.Genet.* **35**, 17-22.
- Swain A., Zanaria E., Hacker A., Lovell-Badge R., & Camerino G. (1996) Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat.Genet.* **12**, 404-409.
- Swain A., Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G., & Lovell-Badge R. (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* **391**, 761-767.
- Tang P., Park D.J., Marshall Graves J.A., & Harley V.R. (2004) ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol.Metab* **15**, 339-344.
- Teixeira J., Maheswaran S., & Donahoe P.K. (2001) Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr.Rev.* **22**, 657-674.
- Tomaselli S., Megiorni F., De B.C., Felici A., Marrocco G., Maggiulli G., Grammatico B., Remotti D., Saccucci P., Valentini F., Mazzilli M.C., Majore S., & Grammatico P. (2008) Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. *Hum.Mutat.* **29**, 220-226.
- Tomizuka K., Horikoshi K., Kitada R., Sugawara Y., Iba Y., Kojima A., Yoshitome A., Yamawaki K., Amagai M., Inoue A., Oshima T., & Kakitani M. (2008) R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum.Mol.Genet.* **17**, 1278-1291.
- Torres L., Lopez M., Mendez J.P., Canto P., Cervantes A., Alfaro G., Perez-Palacios G., Erickson R.P., & Kofman-Alfaro S. (1996) Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am.J.Med.Genet.* **63**, 348-355.
- Tremblay J.J. & Viger R.S. (2001) Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol.Reprod.* **64**, 1191-1199.
- Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N., & McMahon A.P. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* **397**, 405-409.
- van Niekerk W.A. & Retief A.E. (1981) The gonads of human true hermaphrodites. *Hum.Genet.* **58**, 117-122.
- Vernole P., Terrinoni A., Didona B., De L., V, Rossi P., Melino G., & Grimaldi P. (2000) An SRY-negative XX male with Huriez syndrome. *Clin.Genet.* **57**, 61-66.

- Vidal V.P., Chaboissier M.C., de Rooij D.G., & Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat.Genet.* **28**, 216-217.
- Viger R.S., Mertineit C., Trasler J.M., & Nemer M. (1998) Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* **125**, 2665-2675.
- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F.D., Keutel J., Hustert E., & . (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**, 1111-1120.
- Walker A.M., Walker J.L., Adams S., Shi E., McGlynn M., & Verge C.F. (2000) True hermaphroditism. *J.Paediatr.Child Health* **36**, 69-73.
- Wei Q., Yokota C., Semenov M.V., Doble B., Woodgett J., & He X. (2007) R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. *J.Biol.Chem.* **282**, 15903-15911.
- Wieacker P. & Volleth M. (2007) WNT4 and RSPO1 are not involved in a case of male-to-female sex reversal with partial duplication of 1p. *Sex Dev.* **1**, 111-113.
- Wilhelm D. & Koopman P. (2006) The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat.Rev.Genet.* **7**, 620-631.
- Wilhelm D., Palmer S., & Koopman P. (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev.* **87**, 1-28.
- Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B., Strom T.M., Guioli S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker A.P., McCabe E.R., & . (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**, 635-641.
- Zhao J., de V.J., Narushima S., Beck E.X., Palencia S., Shinkawa P., Kim K.A., Liu Y., Levy M.D., Berg D.J., Abo A., & Funk W.D. (2007) R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. *Gastroenterology* **132**, 1331-1343.

# APPENDICE

## Pubblicazioni

**Tomaselli S.**, Megiorni F., De Bernardo C., Felici A., Marrocco G., Maggiulli G., Grammatico B., Remotti D., Saccucci P., Valentini F., Mazzilli M.C., Majore S. and Grammatico P. “Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (*RSPO1*) homozygous mutation”. *Hum Mutat.* 2008 Feb;29(2):220-6.

**Tomaselli S.**, Megiorni F., Lin L., Majore S., Mazzilli M.C., Grammatico P. and Achermann J. “RSPO1 is expressed during early human ovarian development and augments beta-catenin signaling”. *Submitted for publication.*

## Lavori presentati a congressi

Fusco M.A., Santarelli S., **Tomaselli S.** “Proteine e vita”. XVI Congresso Nazionale ADI – La nutrizione Clinica dal territorio all’ospedale (Giardini Naxos, Novembre 23-25, 2004). *Lettura introduttiva.*

**Tomaselli S.**, De Bernardo C., Maggiulli G., Remotti D., Inzana F., Felici A., Marrocco G., Majore S., and Grammatico P. “c. 205+1G>A homozygous mutation in R-SPO1 gene in a patient with a syndromic true hermaphroditism”. International Meeting on Anomalies of Sex Differentiation (Roma, Aprile 24-26, 2006). *Comunicazione orale.*

Majore S., Grammatico B., Grillo R., Cancellaro D’Alena F., **Tomaselli S.**, De Bernardo C., Rinaldi R., Boscherini B., Scommegna S., Binni F., Rapone A.M., Marrocco G. and Grammatico P. “Cytogenetic and molecular characterization of idic(Yp) in four patients with heterogeneous sex phenotype”. International Meeting on Anomalies of Sex Differentiation (Roma, Aprile 24-26, 2006). *Poster.*

Majore S., De Bernardo C., Laino L., Mancini B., Martinelli E., **Tomaselli S.**, Radio C. and Grammatico P. “Duplicazione 16q in una neonata portatrice di una traslocazione X;16 de novo”. IX Congresso Nazionale SIGU (Lido di Venezia, Novembre 8-10, 2006). *Poster.*

Majore S., Radio F.C., Binni F., De Bernardo C., **Tomaselli S.**, Martinelli E., Barboni L. and Grammatico P. “Emocromatosi ereditaria di tipo IV. Identificazione di una nuova mutazione nel gene SLC40A1 in una genealogia italiana”. IX Congresso Nazionale SIGU (Lido di Venezia, Novembre 8-10, 2006). *Poster.*

**Tomaselli S.**, Megiorni F., Lin L., De Bernardo C., Marrocco GA., Grammatico B., Mazzilli M.C., Majore S., Grammatico P. and Achermann J. “Syndromic true hermaphroditism due to R-spondin1 (*RSPO1*) gene homozygous mutation”. II World Congress on Hypospadias and Disorders of Sex Development (Roma, Novembre 16-18, 2007). *Comunicazione orale.*

## RAPID COMMUNICATION

Syndromic True Hermaphroditism Due to an R-spondin1 (*RSPO1*) Homozygous Mutation

Sara Tomaselli,<sup>1,2</sup> Francesca Megiorni,<sup>1</sup> Carmelilia De Bernardo,<sup>1,2</sup> Aldo Felici,<sup>3</sup> Giacinto Marrocco,<sup>5</sup> Giorgio Maggiulli,<sup>3</sup> Barbara Grammatico,<sup>1,2</sup> Daniele Remotti,<sup>4</sup> Pietro Saccucci,<sup>6</sup> Ferdinando Valentini,<sup>7</sup> Maria Cristina Mazzilli,<sup>1</sup> Silvia Majore,<sup>1,2</sup> and Paola Grammatico<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, Experimental Medicine Department, “Sapienza” - University of Rome, Rome, Italy; <sup>2</sup>Medical Genetics Lab, S. Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy; <sup>3</sup>Plastic and Reconstructive Surgery, S. Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy; <sup>4</sup>Pathology, Forlanini Hospital, Rome, Italy; <sup>5</sup>Pediatric Surgery, S. Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy; <sup>6</sup>Obstetrics and Gynecology, S. Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy; <sup>7</sup>Endocrinology, S. Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy

Communicated by Andrew O.M. Wilkie

XX true hermaphroditism, also known as ovotesticular disorder of sexual development (DSD), is a disorder of gonadal development characterized by the presence of both ovarian and testicular tissue in a 46,XX individual. The genetic basis for XX true hermaphroditism and sex reversal syndromes unrelated to *SRY* translocation is still mostly unclear. We report mutational analysis of the *RSPO1* gene in a 46,XX woman with true hermaphroditism, palmoplantar keratoderma, congenital bilateral corneal opacities, onychodystrophy, and hearing impairment. R-spondin1 is a member of the R-spondin protein family and its pivotal role in sex determination has been recently described. We identified a homozygous splice-donor-site mutation in the *RSPO1* gene in our patient. We found that the c.286+1G>A mutation led to an aberrantly spliced mRNA (r.95\_286del), which is presumably translated into a partially functional protein (p.Ile32\_Ile95del). Our case demonstrates for the first time, to our knowledge, that XX true hermaphroditism can be caused by a single gene mutation. The reported findings represent a further step toward a complete understanding of the complex mechanisms leading to DSDs. *Hum Mutat* 29(2), 220–226, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: development; hermaphroditism; XX sex reversal; R-spondin1; *RSPO1*;  $\beta$ -catenin; splicing mutation

## INTRODUCTION

XX sex reversal (46,XX testicular disorder of sexual development [DSD]) and true hermaphroditism (TH, ovotesticular DSD) are unusual forms of DSD. XX sex reversal affects about one in 20,000 to 30,000 newborns with testes and male genitalia [Guellaen et al., 1984]. In a high percentage of cases (80–90%), a male phenotype develops due to translocation of key testis determining gene *SRY* to the “X” or an autosomal chromosome. Seldom, a hidden, low-level “XXY/XX” mosaicism may be detected in these patients [Fechner et al., 1993]. In a small percentage of remaining cases, the *SRY* gene is not found suggesting that other testis-determining factors are involved in this process.

In contrast, the molecular basis of TH, characterized by the coexistence of both male and female gonadal structures, is often not understood. In fact, only 10% of TH cases with a 46,XX karyotype can be attributed to *SRY* translocations [Berkovitz et al., 1992]. In the other 90%, the etiology is undefined and unknown autosomal or X-linked loci are thought to be implicated. Several pedigrees showing both 46,XX THs and 46,XX males have been described to date. These familial cases suggest that the two disorders may represent a continuum of the same pathogenetic mechanism and provide an opportunity to identify new genes involved in sex development [Jarrah et al., 2000; Sarafoglou and Ostrer, 2000].

After the identification of *SRY*, important progress has been made in understanding of sexual determination thanks to the discovery of

several other genes involved in gonadal development (e.g., *SOX9*, *FGF9*, *NR0B1*, *WNT4*, *WT1*, and *SF1*). Among these, *SOX9* (MIM# 608160) is believed to be essential in the activation of the testis pathway, while *WNT4* (MIM# 603490) seems to play an antagonistic role in this process. *WNT4* action is probably accomplished through the Wnt/ $\beta$ -catenin circuitry. This signaling pathway includes Wnt family members that bind the Frizzled/LRP receptor complex, resulting in the cytosolic accumulation of  $\beta$ -catenin [Dale, 1998].

R-spondin1 (*RSPO1*; MIM# 609595) should now be added to the list of key genes whose study has contributed a number of pieces to the jigsaw puzzle of human sexual development. It has

The Supplementary Material referred to in this article can be accessed at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>.

Received 12 April 2007; accepted revised manuscript 18 September 2007.

\*Correspondence to: Paola Grammatico, U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, “Sapienza” - Università di Roma, Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Circ.ne Gianicolense n. 87, 00152 Rome, Italy. E-mail: [paola.grammatico@uniroma1.it](mailto:paola.grammatico@uniroma1.it)

Grant sponsor: Sapienza - University of Rome; Progetto Auriga ONLUS.

DOI 10.1002/humu.20665

Published online 17 December 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).



been clearly proved that R-spondin1 and the other members of the small R-spondin protein family are soluble activators of  $\beta$ -catenin signaling.  $\beta$ -Catenin represents a key nodal point in the complex regulation of both SOX9 and NR0B1 (also known as DAX1; MIM# 300473) [Mizusaki et al., 2003; Akiyama et al., 2004]. In addition, recessive *RSPO1* mutations have been recently found in individuals with complete XX sex reversal [Parma et al., 2006].

In this report we describe the molecular studies performed in a 46,XX SRY-negative true hermaphrodite, in whom we hypothesized that a *RSPO1* mutation might account for her phenotype.

## PATIENT AND METHODS

### Clinical Evaluation

The patient, a 40-year-old subject whose parents were first cousins, was reared as a female, stating gender assignment satisfaction and heterosexual orientation. Clitoral enlargement was noted at birth. Later, she was found to have bilateral corneal opacities, strabismus, and bilateral sensorineural hypoacusis. Onset of pubertal changes was noticed at age 9 to 10 years, when pubic hair followed by normal breast development took place. Without any hormonal treatment, her menarche spontaneously occurred at age 11 years and was cyclically regular until the age of 27 years, when she underwent surgical treatment due to the appearance of a right groin mass, which was found to be a classical seminoma (histological data not shown).

The first available endocrinological data of the patient were performed 2 months after surgery, when she experienced her last menstrual cycle. Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) values were in accordance with the existence of a functional gonad; moreover 17- $\beta$ -estradiol levels were within normal female ranges, while low levels of testosterone were detectable. This specific hormonal profile was indicative of a functional ovary. One year later, the endocrine profile was consistent with premature menopause. The plasma hormone and tumor marker values of the patient are shown in Supplementary Table S1 (available online at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/1059-7794/suppmat>).

She was first brought to our attention at age 35 because she required vaginoplasty and clitoroplasty. Before undergoing surgery, vaginography showed a vagina of normal width and length, with

only a reduced-size introitus. She had ambiguous external genitalia (Fig. 1A) and at laparoscopy had an apparently normal uterus, left fallopian tube, and left gonad located in a normal position and appearing morphologically as an ovary. Histology from the biopsied gonad, however, showed the presence of both testicular and ovarian structures (ovotestis; Fig. 2A–C). Following left gonadectomy, the ovotesticular structure was confirmed and the occurrence of another seminoma was diagnosed (Fig. 2E–I). Endocrine evaluation prior to left gonadectomy was consistent with an atrophic gonad, while the serum concentrations of  $\beta$ -human chorionic gonadotropin ( $\beta$ HCG),  $\alpha$ -fetoprotein ( $\alpha$ FP), and lactic dehydrogenase (LDH) tumor markers were in the normal range.

At clinical examination, the patient also presented with dystrophic nails (Fig. 1B) and palmoplantar keratoderma (Fig. 1C), but the age of onset of these features was not easily determined. Her brother, father of three children, was reported to be affected by the same dermatological lesions. Unfortunately, he was not available for clinical evaluation and genetic analysis.

### Immunohistological Analysis

Sections from the biopsied gonad were fixed in buffered formalin 10%, paraffin embedded, and stained with hematoxylin-eosin (H&E).

Immunohistochemical studies were carried out on paraffin sections using monoclonal antibodies against the following tissue tumor markers: CD117, placental alkaline phosphatase (PLAP), T-cell lymphoma breakpoint 1 (TCL1), pan-keratin AE1/AE3 carcinoembryonic antigen (CEA),  $\alpha$ FP, and  $\beta$ HCG (Supplementary Table S2).

### DNA Analysis

We obtained blood samples for genetic studies after receiving informed consent from our patient. Genomic DNA was isolated from peripheral blood using a QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Presence or absence of the *SRY* (MIM# 480000) coding sequence was assessed by PCR using primers described by Cui et al. [1994]. The sequences corresponding to the coding exons and the intron–exon flanking sequences of the *GJB2* (MIM# 121011), *GJA1* (MIM# 121014), *WNT4*, and *RSPO1* genes were amplified by PCR to perform DNA mutational

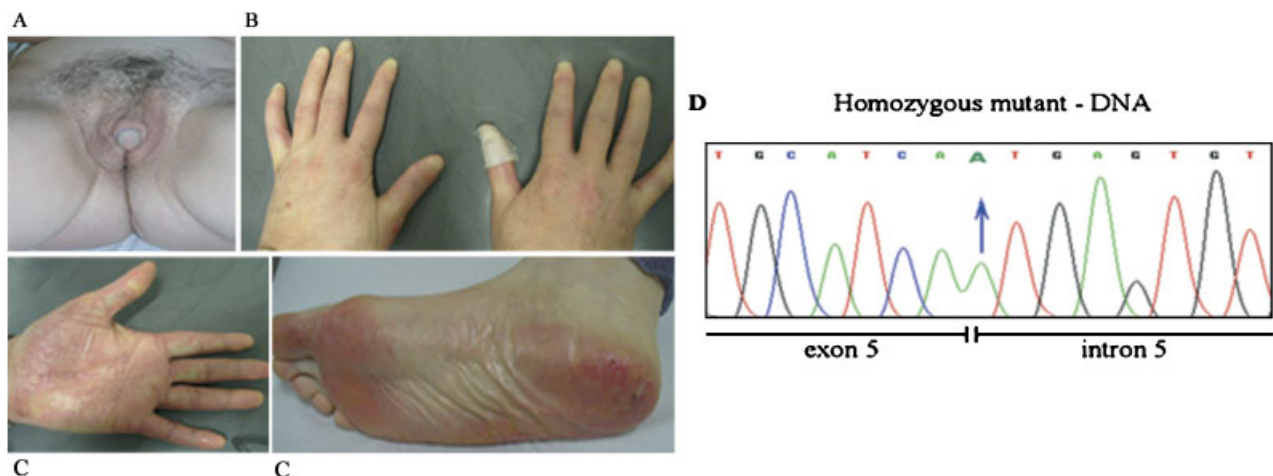
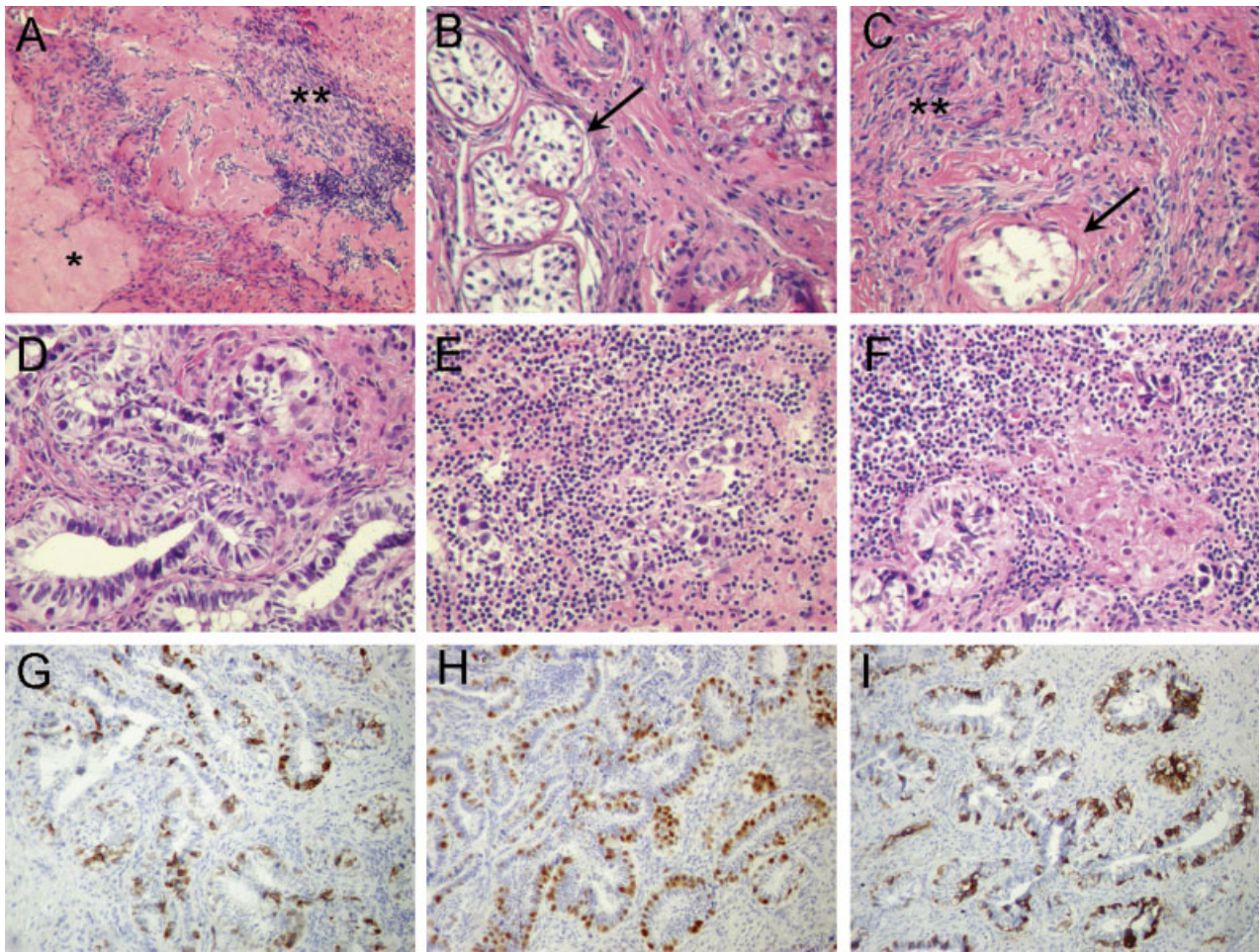


FIGURE 1. Patient's clinical findings and *RSPO1* point mutation. **A:** Ambiguous external genitalia. **B:** Dystrophic nails. **C:** Palmoplantar keratoderma. **D:** Chromatograms showing the partial genomic nucleotide sequence of *RSPO1* mutant (forwards sequence shown). The patient is homozygous for the c.286+1G>A mutation (indicated by the blue arrow) in intron 5.



**FIGURE 2.** Histological analysis of the left gonad (ovotestis), H&E staining. **A:** Ovarian structures: corpora albicans (\*) and ovarian-type specialized stroma (\*\*) (magnification 40 ×). **B:** Seminiferous tubules (arrow) showing germinal aplasia and containing only Sertoli cells (magnification 40 ×). **C:** Seminiferous tubules (arrow) surrounded by ovarian-type stroma (\*\*) (magnification 40 ×). **D:** ITGCN of seminomatous type (magnification 40 ×). **E:** Classical seminoma infiltrating stroma with prominent lymphocytic infiltrate (magnification 40 ×). **F:** Classical seminoma infiltrating stroma with lymphocytic infiltrate and epithelioid microgranuloma (magnification 40 ×). **G:** ITGCN immunoreactive with PLAP (magnification 20 ×). **H:** ITGCN immunoreactive with TCL-1 (magnification 20 ×). **I:** ITGCN immunoreactive with CD117 (magnification 20 ×).

analysis. Primers used for PCR amplification and subsequent sequencing of these genes were designed using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Amplification was performed following the manufacturer's instructions (AmpliTaQ Gold; Applied Biosystems, Foster City, CA). Direct sequencing of PCR fragments was carried out using the ABI Prism Big Dye Terminator v3 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) on an automated sequencer (ABI PRISM 310 DNA Sequencer). Primer sequences and amplification conditions used for genomic DNA analysis are available on request.

RSPO1 DNA mutations are numbered based on the cDNA reference sequence under GenBank accession number NM\_001038633.2. The number +1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon of RSPO1.

### RNA Analysis

A skin biopsy was taken from the patient and fibroblast cultures were set up for expression studies. Fibroblast cell lines were grown in RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 20% fetal bovine serum, 4 mM glutamine, and 1% penicillin/streptomycin solution

at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Total RNA was isolated from patient's fibroblasts and left gonadal tissue following TRIzol (Invitrogen) or Chomczynski and Sacchi extraction protocols [Chomczynski and Sacchi, 1987]. mRNA from normal human fibroblasts and ovarian and testicular tissue were also extracted and used as controls.

A total of 1 μg of wild-type and mutant RNA was reverse transcribed using a GeneAmp<sup>®</sup> Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems). Subsequent PCR reactions were performed with gene-specific primers, designed from the RSPO1 exonic sequence complementary to sequences in exons 4, 5, 6/7, and 8. Primer sequences and amplification conditions used for cDNA analysis are available from the authors. RT-PCR products were resolved on a 1.5% agarose/ethidium bromide gel and each single band was purified by QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), before being sequenced in both forward and reverse directions.

### Western Blot Analysis

Total protein extracts were obtained from the patient's ovotestis and fibroblast cultures, and from a healthy woman's ovary tissue using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1%



NP-40, 0.5% deoxycholic sodium salt, 0.1% SDS, 0.2 mM phenylmethanesulphonylfluoride or phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 × protease inhibitor mixture [Complete Mini, EDTA free; Roche, Basel, Switzerland]) for 45 min on ice. Proteins were collected after centrifugation at maximum speed and the concentration was determined using Bio-Rad dye (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). A total of 80 µg of each sample were separated onto a 9% SDS-polyacrylamide gel and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Protran; Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell, Keene, NH). Hybridization was performed with 1:300 mouse monoclonal anti-β-catenin antibody (β-catenin Ab E-5; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 3 hr at room temperature and with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA). Specific bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfon, Buckinghamshire, UK).

## RESULTS

### Immunohistological Data

Sections obtained from the left gonad showed the presence of both testicular and ovarian structures. In particular, seminiferous tubules with intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) and stroma infiltrated by tumor cells and containing reactive lymphocytes were clearly evident (Fig. 2B–F). The ovarian component was represented by ovarian stroma, consisting of peculiar spindle-shaped cells arranged into the characteristic whorled texture, and by corpora albicans, a hyaline scar resulting from the degeneration of the corpus luteum and normally present in the aging or postmenopausal ovary (Fig. 2A).

Immunohistochemical studies revealed the following phenotype in the neoplastic cells: C117+, PLAP+, TCL1+, pan-keratin AE1/AE3, CEA–, αFP–, βHCG– (Fig. 2G–I).

### DNA Analysis

Molecular analysis revealed the absence of *SRY* in our patient's DNA. Screening of the *GJB2*, *GJA1*, and *WNT4* genes from the patient was negative. Sequence analysis of all *RSPO1* coding exons (4–8) and flanking intronic sequences (GenBank accession number NC\_000001.9) resulted in the identification of a homozygous mutation (Fig. 1D) consisting of a single-base

substitution of guanine for adenine at position c.286+1. The observed transition alters the highly conserved GT consensus sequence at the 5' splice-donor site of *RSPO1* intron 5. The *RSPO1* c.286+1G>A variant was not detected in a panel of 200 control alleles.

### RNA Analysis

The predicted consequence of the *RSPO1* c.286+1G>A mutation detected in our patient is aberrant splicing of mRNA, which might produce a variety of possible consequences, including inappropriate exon 5 skipping or intron 5 retention in the mature transcript due to the activation of alternative or cryptic donor splice sequences, respectively.

RT-PCR performed on control samples showed all the expected mRNA isoforms of the human *RSPO1* gene (confirmed by direct sequencing of the three isoforms, data not shown) but only aberrantly sized bands from the patient samples (Fig. 3). These shorter bands were gel purified and sequenced to characterize the exact splice junctions. Direct sequencing of the 523-bp and 202-bp bands (corresponding to isoform 1 and 2, respectively), produced using primers encompassing exon 5 (RT 4F and RT 6/7R; Fig. 3B, lanes 5–8), revealed that they represented the mRNA r.95\_286del. In fact, the aberrant transcripts appeared to read from *RSPO1* exon 4 to exon 6, thereby skipping exon 5 (Fig. 4) in all *RSPO1* isoforms. We did not detect any PCR product in the homozygous mutant mRNA when using a reverse primer located in exon 5, confirming the absence of this coding sequence in our patient's mRNA r.95\_286del (Fig. 3B, lanes 1–4). Furthermore, no additional bands, indicating the presence of alternative novel mRNA splice variants, were detected. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; GenBank NM\_0020463) RT-PCR was used to ensure the quality and quantity of cDNA samples (data not shown).

### Western Blot Analysis

To analyze the effect of the mutated R-spondin1 protein on β-catenin expression, we performed Western blotting experiments using total proteins extracted from normal and patient gonadal tissues. Hybridization with an anti-β-catenin antibody showed a specific band in the control sample and only a weak signal in the patient's gonad (similar results were obtained in two independent experiments). Equal loading was confirmed by β-actin (Fig. 5B).

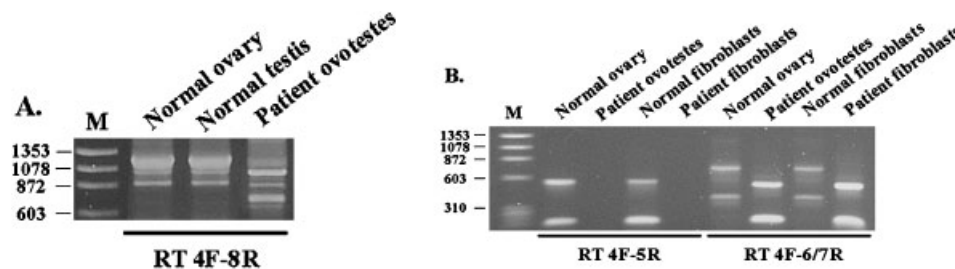


FIGURE 3. RT-PCR analysis of *RSPO1* mRNA in control individuals and patient. **A:** All of the three expected size isoforms (1187, 998, and 866 bp) were present in normal ovary and testis using RT 4F-8R primers. The same isoforms of a lower size (995, 806, and 674 bp), compatible with the lack of exon 5, were evident in the patient's tissue. **B:** Absence of amplification when using reverse RT-5R confirmed the absence of exon 5 in the patient's transcripts (both in ovotestes and in fibroblasts). Two wild-type bands were obtained in a control ovary with RT 4F-5R (549 and 228 bp) and with RT 4F-6/7R (715 and 394 bp) PCRs. Only aberrantly-sized bands (523 and 202 bp) were present in patient samples with RT 4F-6/7R amplification. Forward primer RT 4F was located in exon 4. Reverse primers RT 8R and 5R were positioned in exon 8 and 5, respectively. Reverse primer RT 6/7R annealed at the junction between exon 6 and 7. *RSPO1* RT-PCRs from fibroblasts were performed by two consecutive amplifications. M = DNA marker.

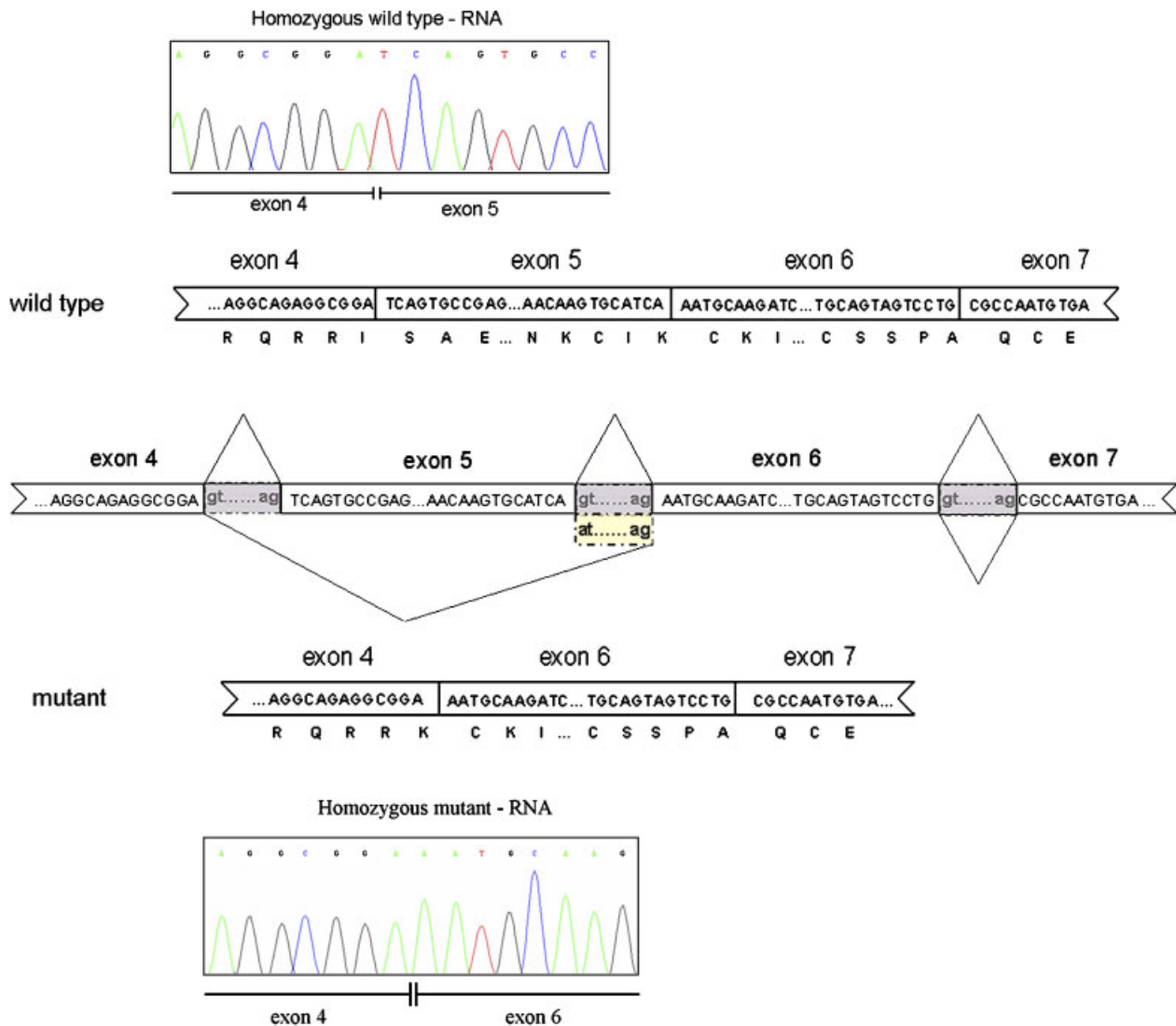


FIGURE 4. Schematic representation of the splicing mechanism in normal and mutant *RSPO1*. The *RSPO1* c.286+1G>A mutation affects the GT consensus sequence at the splice-donor site of intron 5 and leads to the exon five deletion. Chromatograms show the partial nucleotide sequence of cloned wild-type and mutant RT-PCR products (forward sequences shown) [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)].

## DISCUSSION

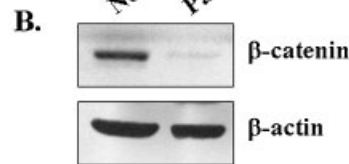
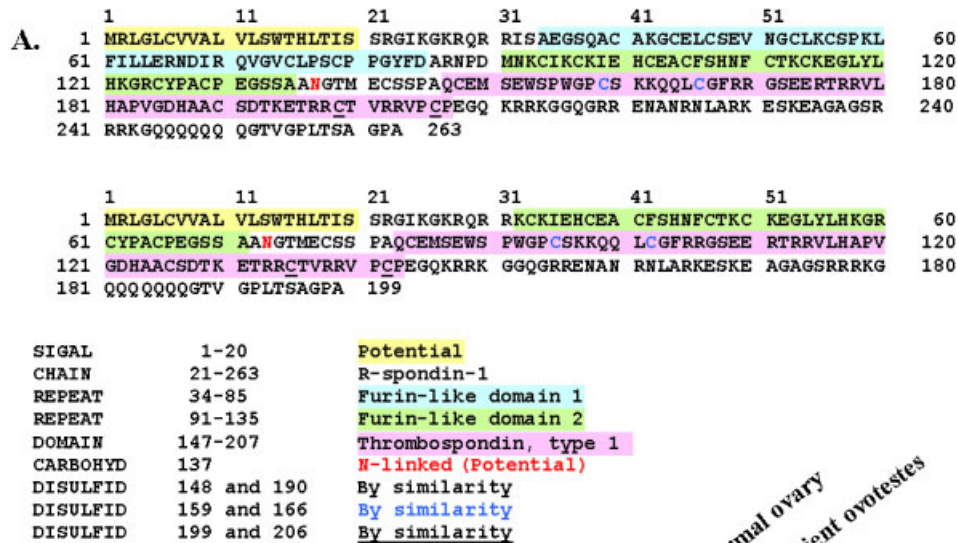
Normal male sex determination usually requires the action of the *SRY* gene, a key player in the complex cascade of events of testicular differentiation [Sinclair et al., 1990]. However, several disorders of sex determination involve the development of testicular tissue in an individual lacking the *SRY* gene, such as XX males and XX true hermaphroditism [Jarrah et al., 2000], suggesting that in some cases the *SRY* gene is not necessary to promote testis development. Time and gene dosage-dependent genetic pathways implicated in human sex determination are not fully elucidated, and several genetic factors involved in the development of gonads remain to be identified. To date, XX true hermaphroditism has never been associated to any single gene alteration, except for the presence of *SRY*.

We report the molecular investigations performed in a 46,XX *SRY* negative, syndromic true hermaphrodite, in whom we hypothesized that a *RSPO1* mutation might account for her phenotype.

The hypothesis that a homozygous mutation in a single gene could be responsible for our patient's clinical phenotype was supported by the parents' consanguinity and reinforced by two cases reported in the literature with syndromic XX sex reversal who shared some clinical features with our patient [Vernole et al., 2000; Radi et al., 2005] and a following report of *RSPO1* gene mutations in these patients [Parma et al., 2006].

*RSPO1* gene sequencing analysis revealed the presence of a homozygous single-base substitution of guanine for adenine, abolishing the splice-acceptor site in intron 5. The predicted consequence of this mutation is aberrant splicing of the mRNA.

To further investigate the effect of the c.286+1G>A mutation on RNA splicing, we analyzed *RSPO1* transcripts from the patient's fibroblasts and left gonadal tissue using RT-PCR methods. Mutations affecting consensus splice sites have been identified in different genes and have been estimated to account for 15% of all disease-causing mutations in humans [Krawczak et al., 1992]. Most splicing mutations lead to disruption of the open reading frame, introducing a premature termination codon. Nevertheless,



**FIGURE 5. A:** Amino acid sequence (NCBI accession number NP\_001033722) of wild-type and mutant R-spondin1 (p.Ile32\_Ile95del) (Schematic is adapted from <http://ca.expasy.org/uniprot/Q2MKA7>). **B:**  $\beta$ -Catenin levels were reduced in crude extracts from patient's ovotestes compared with normal tissue. The membrane was reprobbed with a  $\beta$ -actin antibody, as a control for protein loading.

in our patient the correct open reading frame of the mutant mRNA (r.95\_286del) was revealed to be preserved in all the transcript isoforms by direct sequencing of cDNA. The predicted shortened R-spondin1 protein in our patient (p.Ile32\_Ile95del) lacks the entire first furin-like domain amino and the initial two residues of the second furin-like repeat (Fig. 5A), both of which have been demonstrated to be essential in  $\beta$ -catenin stabilization [Kazanskaya et al., 2004]. To analyze the effect of the mutated R-spondin1 protein on  $\beta$ -catenin activation, we performed Western blotting experiments using total proteins extracted from normal ovary and patient ovotestis. Hybridization with an anti- $\beta$ -catenin antibody showed a reduced level of  $\beta$ -catenin in patient's gonadal tissue with respect to normal ovary used as control (Fig. 5B).

Our results strongly suggest that our patient's phenotype is caused by the novel *RSPO1* c.286+1G>A mutation. *RSPO1* gene mutations have been described recently in two families with syndromic XX sex reversal [Parma et al., 2006]. Our data show that mutations in the same gene are also able to cause true XX hermaphroditism (ovotesticular DSD). Of note, reports of familial cases of XX true hermaphroditism and XX sex reversal coexisting in different members of the same family support our hypothesis for a possible common genetic basis for these conditions in some cases [Jarrah et al., 2000; Sarafoglou and Ostrer, 2000]. Nevertheless, this hypothesis has never been demonstrated at the molecular level, to date.

The role of R-spondin1 in sex determination can be explained through its involvement in the Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction pathway [Kim et al., 2005]. The canonical Wnt/ $\beta$ -catenin circuitry results in the cytosolic accumulation of  $\beta$ -catenin. The subsequent formation of a complex between  $\beta$ -catenin and ternary complex factor (TCF), a transcription factor, leads to the active transcription of target genes [Kim et al., 2006] (Supplementary

Fig. S1). In particular,  $\beta$ -catenin represents a nodal point in the regulation of both SOX9 and NR0B1 [Mizusaki et al., 2003; Akiyama et al., 2004]. All members of the R-spondin family share a common organization in five coding exons, producing secreted proteins characterized by a N-terminal signal peptide, two adjacent highly conserved cysteine rich furin-like domains, a thrombospondin-type domain, and a C-terminal basic region. R-spondin members are able to activate and stabilize the Wnt and  $\beta$ -catenin signaling pathway. The two furin-like repeats, encoded by the second and the third coding exons, respectively, are believed to be essential for this stabilization by R-spondin proteins [Kazanskaya et al., 2004]. Recent data have shown interactions between SOX9 and  $\beta$ -catenin during chondrocyte differentiation, which results in their mutual degradation [Akiyama et al., 2004]. The disruption of R-spondin1 activity could lead to downregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and to the consequent increase in SOX9 expression. At the same time, *RSPO1* mutations may reduce NR0B1 levels. In the two families with complete female-to-male sex reversal recently reported by Parma et al. [2006], two different *RSPO1* homozygous mutations were identified. The first one resulted in a putative null protein, due to a frameshift and premature termination of translation, while the second one produced a hypothetical nonfunctional shortened protein, missing the signal peptide leader sequence and the first furin-like region, due to a partial gene deletion. It is likely that these mutations caused a complete lack of protein activity in both cases.

The predicted shortened R-spondin1 protein detected in our patient lacks amino acids 32 to 95, encoded by the second coding exon (exon 5), which constitutes the first furin-like domain (amino acids 34 to 85) and the beginning of the second furin-like repeat (amino acids 91 to 135) of the protein (NCBI accession number NP\_001033722) (Fig. 5A). Although the structure of the functionally important furin-like domain of R-spondin1 was likely

considerably altered as a consequence of the c.286+1G>A mutation, we assume that in our patient the R-spondin1 protein p.Ile32\_Ile95del might have limited residual activity. We speculate that our novel *RSPO1* mutation reduces  $\beta$ -catenin activation (Fig. 5B) but retains residual protein function that is responsible for a milder phenotype, leading to XX true hermaphroditism instead of complete XX sex reversal. Indeed, the regular menstrual cycles observed for 16 years in our patient supports the hypothesis that R-spondin1 could have a pivotal role in the suppression or antagonism of testicular determination and differentiation, rather than acting primarily as an ovarian determining gene. A possible mechanism of action of R-spondin1 is shown in Supplementary Figure S1.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patient and her mother for their long-term cooperation in this study.

### REFERENCES

- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B. 2004. Interactions between Sox9 and  $\beta$ -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18:1072–1087.
- Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ. 1992. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet* 88:411–416.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Cui KH, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews CD. 1994. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* 343:79–82.
- Dale TC. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329:209–223.
- Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD, Amrhein JA, Bard PA. 1993. The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness. *J Clin Endocrinol Metab* 76:690–695.
- Guellaen G, Casanova M, Bishop C, Geldwerth D, Andre G, Fellous M, Weissenbach J. 1984. Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* 307:172–173.
- Jarrah N, El-Shanti H, Khier A, Obeidat FN, Haddidi A, Ajlouni K. 2000. Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. *Eur J Pediatr* 159:912–918.
- Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stanek P, Niehrs C, Wu W. 2004. R-spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* 7:525–534.
- Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T, Tang T, Binnerts M, Liu Y, Boyle B, Park E, Emtage P, Funk WD, Tomizuka K. 2005. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309:1256–1259.
- Kim KA, Ahaio J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD. 2006. R-spondin proteins: a novel link to beta-catenin. *Cell Cycle* 5:23–26.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41–54.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K. 2003. Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 17:507–519.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dell'ambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino C. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38:1304–1309.
- Radi O, Parma P, Imbeaud S, Nasca MR, Uccellatore F, Maraschio P, Tiepolo L, Micali G, Camerino G. 2005. XX sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am J Med Genet* 138:241–246.
- Sarafoglou K, Ostrer H. 2000. Clinical review 111: familial sex reversal: a review. *J Clin Endocrinol Metab* 85:483–493.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Vernole P, Terrinoni A, Didona B, De Laurenzi V, Rossi P, Melino G, Grimaldi P. 2000. An SRY-negative XX male with Hurler syndrome. *Clin Genet* 57:61–66.

# Bioconductor Affymetrix Probe Listing

ID	logFC	FC	P.Value	adj. P.Val	affyprobe	gene_level_plot	symbols	names	chr	strand	start	stop	biolprocess	cellcomp	molfunction	pathway
8160769	-0.627	-1.54	7.5e-05	0.842	<a href="#">8160769</a>	<a href="#">8160769 plot</a>	---	---	chr9	-	34196155	34196239				
7947421	1.09	2.13	7.57e-05	0.842	<a href="#">7947421</a>	<a href="#">7947421 plot</a>	---	---	chr11	-	33149505	33149612				
8094068	-0.65	-1.57	0.000114	0.842	<a href="#">8094068</a>	<a href="#">8094068 plot</a>	---	---	chr4	+	8445642	8445751				
8143710	-0.943	-1.92	0.000157	0.842	<a href="#">8143710</a>	<a href="#">8143710 plot</a>	---	---	chr7	-	148684678	148684753				
8027437	-0.52	-1.43	0.000358	0.842	<a href="#">8027437</a>	<a href="#">8027437 plot</a>	---	---	chr19	+	36332202	36332597				
8035939	-0.48	-1.39	0.000419	0.842	<a href="#">8035939</a>	<a href="#">8035939 plot</a>	---	---	chr19	-	37837829	37838054				
8064098	0.877	1.84	0.000443	0.842	<a href="#">8064098</a>	<a href="#">8064098 plot</a>	---	---	chr20	+	61439147	61439220				
8091809	-0.53	-1.44	0.000533	0.842	<a href="#">8091809</a>	<a href="#">8091809 plot</a>	---	---	chr3	-	162669666	162669747				
8124689	-0.52	-1.43	0.000712	0.842	<a href="#">8124689</a>	<a href="#">8124689 plot</a>	<a href="#">HCG4</a>	HLA complex group 4	chr6	-	29867509	29868506				
8061562	0.487	1.4	0.000969	0.842	<a href="#">8061562</a>	<a href="#">8061562 plot</a>	---	---	chr20	+	29632553	29632668				
8156706	-0.42	-1.34	0.00108	0.842	<a href="#">8156706</a>	<a href="#">8156706 plot</a>	<a href="#">TMOD1</a>	tropomodulin 1	chr9	+	99303742	99403357	cytoskeleton organization and biogenesis	cytoplasm, cytoskeleton	actin binding, tropomyosin binding	Striated_muscle_contraction
8020630	0.463	1.38	0.00124	0.842	<a href="#">8020630</a>	<a href="#">8020630 plot</a>	<a href="#">C18orf17</a>	chromosome 18 open reading frame 17	chr18	+	19826735	19966989				
7951091	-0.587	-1.5	0.00146	0.842	<a href="#">7951091</a>	<a href="#">7951091 plot</a>	---	---	chr11	-	94896842	94896946				
8167887	0.39	1.31	0.00181	0.842	<a href="#">8167887</a>	<a href="#">8167887 plot</a>	<a href="#">MAGEH1</a>	melanoma antigen family H, 1	chrX	+	55495263	55496724	apoptosis			
8040338	-0.513	-1.43	0.00187	0.842	<a href="#">8040338</a>	<a href="#">8040338 plot</a>	---	---	chr2	+	11642350	11642549				
8139943	-0.51	-1.42	0.00213	0.842	<a href="#">8139943</a>	<a href="#">8139943 plot</a>	---	---	chr7	-	71971255	71977592				
8005657	0.523	1.44	0.00219	0.842	<a href="#">8005657</a>	<a href="#">8005657 plot</a>	---	---	chr17	+	19841594	19841705				
8150489	-0.403	-1.32	0.00241	0.842	<a href="#">8150489</a>	<a href="#">8150489 plot</a>	---	---	chr8	-	41816736	41817020				
8123884	0.453	1.37	0.00258	0.842	<a href="#">8123884</a>	<a href="#">8123884 plot</a>	<a href="#">C6orf52</a>	chromosome 6 open reading frame 52	chr6	-	10779641	10802828				
7972251	-0.44	-1.36	0.00262	0.842	<a href="#">7972251</a>	<a href="#">7972251 plot</a>	---	---	chr13	-	89283565	89283762				
8120460	0.393	1.31	0.00272	0.842	<a href="#">8120460</a>	<a href="#">8120460 plot</a>	<a href="#">LOC442229</a>	similar to mitochondrial carrier triple repeat 1	chr6	+	66554493	66555922	transport	membrane	binding	
8022606	-0.877	-1.84	0.00277	0.842	<a href="#">8022606</a>	<a href="#">8022606 plot</a>	---	---	chr18	-	20004467	20004585				

8157446	0.5	1.41	0.00286	0.842	<a href="#">8157446</a>	<a href="#">8157446 plot</a>	<a href="#">ORM1</a>	orosomucoid 1	chr9	+	116125157	116128578	acute-phase response, inflammatory response	extracellular region, extracellular space	protein binding	
8163271	0.397	1.32	0.00291	0.842	<a href="#">8163271</a>	<a href="#">8163271 plot</a>	---	---	chr9	-	112899428	112899514				
7944716	-0.54	1.45	0.00295	0.842	<a href="#">7944716</a>	<a href="#">7944716 plot</a>	---	---	chr11	+	121380309	121380366				
8121275	-0.56	1.47	0.00297	0.842	<a href="#">8121275</a>	<a href="#">8121275 plot</a>	---	---	chr6	+	107009396	107009495				
8100941	0.523	1.44	0.00297	0.842	<a href="#">8100941</a>	<a href="#">8100941 plot</a>	---	---	chr4	-	74188425	74188511				
7983910	-0.45	1.37	0.003	0.842	<a href="#">7983910</a>	<a href="#">7983910 plot</a>	<a href="#">AQP9</a>	aquaporin 9	chr15	+	56217771	56265401	water transport, purine transport, immune response, response to osmotic stress, excretion, metabolic process, nutrient import, response to organic substance, polyol transport, amine transport, pyrimidine transport, water homeostasis, response to mercury ion, carboxylic acid transport	integral to plasma membrane, membrane	transporter activity, amine transmembrane transporter activity, purine transmembrane transporter activity, pyrimidine transmembrane transporter activity, polyol transmembrane transporter activity, water channel activity, porin activity, carboxylic acid transmembrane transporter activity	
7915202	-0.363	1.29	0.00329	0.842	<a href="#">7915202</a>	<a href="#">7915202 plot</a>	---	---	chr1	-	39392466	39392555				
7972546	-0.357	1.28	0.00334	0.842	<a href="#">7972546</a>	<a href="#">7972546 plot</a>	<a href="#">LOC390421</a>	similar to Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	chr13	-	98641031	98641240				
8168115	-0.553	1.47	0.0035	0.842	<a href="#">8168115</a>	<a href="#">8168115 plot</a>	---	---	chrX	+	69389617	69389737				
8130522	-0.373	1.3	0.00354	0.842	<a href="#">8130522</a>	<a href="#">8130522 plot</a>	---	---	chr6	-	159182137	159198652				
7965322	0.57	1.48	0.00358	0.842	<a href="#">7965322</a>	<a href="#">7965322 plot</a>	<a href="#">KITLG</a>	KIT ligand	chr12	-	87410697	87498369	cell adhesion, signal transduction, cell proliferation, organ morphogenesis, hemopoiesis	plasma membrane, membrane, integral to membrane	stem cell factor receptor binding, protein binding, growth factor activity	
8151929	-0.497	1.41	0.00358	0.842	<a href="#">8151929</a>	<a href="#">8151929 plot</a>	---	---	chr8	-	97512459	97512564				
8055247	-0.373	1.3	0.00362	0.842	<a href="#">8055247</a>	<a href="#">8055247 plot</a>	---	---	chr2	-	131403805	131403927				
8176253	-0.367	1.29	0.00364	0.842	<a href="#">8176253</a>	<a href="#">8176253 plot</a>	<a href="#">LOC401622</a>	similar to LINE-1 reverse transcriptase homolog	chrX	-	154365853	154366569	RNA-dependent DNA replication		RNA binding, RNA-directed DNA polymerase activity	
8156112	-0.433	1.35	0.0037	0.842	<a href="#">8156112</a>	<a href="#">8156112 plot</a>	---	---	chr9	+	85257008	85257108				



7967089	-0.387	1.31	0.00373	0.842	<a href="#">7967089</a>	<a href="#">7967089 plot</a>	---	---	chr12	-	119516198	119516542				
8089723	-0.357	1.28	0.00379	0.842	<a href="#">8089723</a>	<a href="#">8089723 plot</a>	---	---	chr3	-	117784147	117784367				
7912585	-0.407	1.33	0.00389	0.842	<a href="#">7912585</a>	<a href="#">7912585 plot</a>	<a href="#">PRAMEF3</a>	PRAME family member 3	chr1	-	13200783	13204279				
7939738	0.51	1.42	0.00391	0.842	<a href="#">7939738</a>	<a href="#">7939738 plot</a>	<a href="#">DDB2</a>	damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	chr11	+	47193089	47217344	nucleotide-excision repair		damaged DNA binding, protein binding	
8098877	-0.393	1.31	0.00394	0.842	<a href="#">8098877</a>	<a href="#">8098877 plot</a>	---	---	chr4	-	1179609	1185204				
7938074	-0.343	1.27	0.0041	0.842	<a href="#">7938074</a>	<a href="#">7938074 plot</a>	---	---	chr11	+	6106416	6107282				
8021478	-0.37	1.29	0.00428	0.842	<a href="#">8021478</a>	<a href="#">8021478 plot</a>	---	---	chr18	+	55791126	55791419				
8173238	-0.353	1.28	0.00429	0.842	<a href="#">8173238</a>	<a href="#">8173238 plot</a>	<a href="#">ASB12</a>	ankyrin repeat and SOCS box-containing 12	chrX	-	63360801	63367212	intracellular signaling cascade			
8070169	-0.39	1.31	0.00431	0.842	<a href="#">8070169</a>	<a href="#">8070169 plot</a>	---	---	chr21	-	34212885	34212967				
8008702	-0.44	1.36	0.00437	0.842	<a href="#">8008702</a>	<a href="#">8008702 plot</a>	---	---	chr17	+	53050468	53050740				
8105267	0.497	1.41	0.00455	0.842	<a href="#">8105267</a>	<a href="#">8105267 plot</a>	<a href="#">ITGA2</a>	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	chr5	+	52320913	52426366	cell adhesion, cell-matrix adhesion, integrin-mediated signaling pathway, blood coagulation, organ morphogenesis	plasma membrane, integrin complex, external side of plasma membrane, integral to membrane	magnesium ion binding, receptor activity, calcium ion binding, collagen binding, identical protein binding	Integrin-mediated_cell_adhesion_KEGG
8074880	-0.313	1.24	0.00464	0.842	<a href="#">8074880</a>	<a href="#">8074880 plot</a>	---	---	chr22	-	21832120	21833394				
8008868	-0.43	1.35	0.00466	0.842	<a href="#">8008868</a>	<a href="#">8008868 plot</a>	---	---	chr17	+	55062213	55064128				
7927775	0.557	1.47	0.00475	0.842	<a href="#">7927775</a>	<a href="#">7927775 plot</a>	<a href="#">NRBF2</a>	nuclear receptor binding factor 2	chr10	+	64563056	64584790	transcription, regulation of transcription, DNA-dependent	cytoplasm		
7915466	-0.407	1.33	0.00475	0.842	<a href="#">7915466</a>	<a href="#">7915466 plot</a>	---	---	chr1	-	42988051	42988230				
8035146	-0.34	1.27	0.00477	0.842	<a href="#">8035146</a>	<a href="#">8035146 plot</a>	<a href="#">CALR3</a>	calreticulin 3	chr19	-	16450887	16468253	protein folding	endoplasmic reticulum	calcium ion binding, sugar binding, zinc ion binding, unfolded protein binding	
8073511	0.343	1.27	0.00477	0.842	<a href="#">8073511</a>	<a href="#">8073511 plot</a>	---	---	chr22	+	40473262	40473361				
7936798	-0.387	1.31	0.00478	0.842	<a href="#">7936798</a>	<a href="#">7936798 plot</a>	<a href="#">CUZD1</a>	CUB and zona pellucida-like domains 1	chr10	-	124581655	124595726	substrate-bound cell migration, cell attachment to substrate, cell cycle, cell adhesion, cell proliferation, trypsinogen activation, cell division	membrane, integral to membrane, zymogen granule membrane	protein binding	

8174648	-0.43	-1.35	0.0048	0.842	<a href="#">8174648</a>	<a href="#">8174648 plot</a>	<a href="#">CXorf61</a>	chromosome X open reading frame 61	chrX	-	115506877	115508192		membrane, integral to membrane		
7921358	-0.463	-1.38	0.00482	0.842	<a href="#">7921358</a>	<a href="#">7921358 plot</a>	<a href="#">LOC646289</a>	similar to Olfactory receptor 10R2	chr1	-	156681493	156682428				
8136235	-0.4	-1.32	0.00484	0.842	<a href="#">8136235</a>	<a href="#">8136235 plot</a>	<a href="#">CPA1</a>	carboxypeptidase A1 (pancreatic)	chr7	+	129807468	129815185	proteolysis	extracellular space	carboxypeptidase activity, carboxypeptidase A activity, metallopeptidase activity, zinc ion binding, metal ion binding	
8135587	0.423	1.34	0.00487	0.842	<a href="#">8135587</a>	<a href="#">8135587 plot</a>	<a href="#">CAV2</a>	caveolin 2	chr7	+	115926680	115935831		plasma membrane, integral to plasma membrane, caveolar membrane, transport vesicle, lipid raft, perinuclear region of cytoplasm	protein binding, protein homodimerization activity	Integrin- mediated_cell_adhesion_KEGG
8175585	0.493	1.41	0.00496	0.842	<a href="#">8175585</a>	<a href="#">8175585 plot</a>	<a href="#">LOC653103</a>	similar to Ankyrin repeat domain- containing protein 11 (Ankyrin repeat- containing cofactor 1)	chrX	-	145508797	145509513				
7953934	-0.337	-1.26	0.00498	0.842	<a href="#">7953934</a>	<a href="#">7953934 plot</a>	---	---	chr12	+	10128052	10128374				
7985930	-0.403	-1.32	0.00498	0.842	<a href="#">7985930</a>	<a href="#">7985930 plot</a>	---	---	chr15	+	88474653	88474951				
8003857	-0.437	-1.35	0.00505	0.842	<a href="#">8003857</a>	<a href="#">8003857 plot</a>	---	---	chr17	+	4036370	4036466				
8171295	-0.323	-1.25	0.00528	0.842	<a href="#">8171295</a>	<a href="#">8171295 plot</a>	---	---	chrX	-	9802643	9802741				
7909888	0.36	1.28	0.00532	0.842	<a href="#">7909888</a>	<a href="#">7909888 plot</a>	---	---	chr1	+	219065741	219065856				
7921930	-0.36	-1.28	0.00542	0.842	<a href="#">7921930</a>	<a href="#">7921930 plot</a>	---	---	chr1	-	161704915	161705019				
8121269	-0.323	-1.25	0.00545	0.842	<a href="#">8121269</a>	<a href="#">8121269 plot</a>	---	---	chr6	+	106858744	106858854				
8012218	-0.537	-1.45	0.00545	0.842	<a href="#">8012218</a>	<a href="#">8012218 plot</a>	---	---	chr17	-	7381139	7381237				
7970735	-0.35	-1.27	0.00547	0.842	<a href="#">7970735</a>	<a href="#">7970735 plot</a>	---	---	chr13	-	27461434	27461715				
7976804	-0.453	-1.37	0.00547	0.842	<a href="#">7976804</a>	<a href="#">7976804 plot</a>	---	---	chr14	+	100419069	100419165				
8103875	-0.453	-1.37	0.00564	0.842	<a href="#">8103875</a>	<a href="#">8103875 plot</a>	---	---	chr4	-	184432610	184432711				
8019962	-0.317	-1.25	0.00568	0.842	<a href="#">8019962</a>	<a href="#">8019962 plot</a>	---	---	chr18	+	6591539	6591828				

8049243	-0.347	-1.27	0.0057	0.842	<a href="#">8049243</a>	<a href="#">8049243 plot</a>	<a href="#">NEU2</a>	sialidase 2 (cytosolic sialidase)	chr2	+	233605626	233608011	metabolic process	cytoplasm	exo-alpha-sialidase activity, hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
7969058	-0.387	-1.31	0.00574	0.842	<a href="#">7969058</a>	<a href="#">7969058 plot</a>	---	---	chr13	+	48237029	48237137			
8123446	-0.4	-1.32	0.00587	0.842	<a href="#">8123446</a>	<a href="#">8123446 plot</a>	<a href="#">SMOC2</a>	SPARC related modular calcium binding 2	chr6	+	168584680	168810599		proteinaceous extracellular matrix	calcium ion binding
7996239	0.403	1.32	0.0059	0.842	<a href="#">7996239</a>	<a href="#">7996239 plot</a>	---	---	chr16	+	57088313	57088419			
7961887	-0.37	-1.29	0.00594	0.842	<a href="#">7961887</a>	<a href="#">7961887 plot</a>	---	---	chr12	-	25647507	25647593			
8154563	0.3	1.23	0.00595	0.842	<a href="#">8154563</a>	<a href="#">8154563 plot</a>	<a href="#">ASAH3L</a>	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like	chr9	+	19398925	19442500	lipid metabolic process, ceramide metabolic process	Golgi membrane, endoplasmic reticulum membrane, membrane, integral to membrane	hydrolase activity, ceramidase activity
8088550	0.297	1.23	0.00596	0.842	<a href="#">8088550</a>	<a href="#">8088550 plot</a>	<a href="#">PRICKLE2</a>	prickle homolog 2 (Drosophila)	chr3	-	64054587	64186171		cytoplasm, membrane	zinc ion binding, metal ion binding
8098157	-0.357	-1.28	0.006	0.842	<a href="#">8098157</a>	<a href="#">8098157 plot</a>	<a href="#">LOC646954</a>	similar to 14-3-3 protein theta (14-3-3 protein tau) (14-3-3 protein T-cell) (HS1 protein)	chr4	+	165073128	165073766			
8142171	0.437	1.35	0.00601	0.842	<a href="#">8142171</a>	<a href="#">8142171 plot</a>	<a href="#">SLC26A3</a>	solute carrier family 26, member 3	chr7	-	107193150	107230906	transport, anion transport, excretion, sulfate transport	membrane fraction, membrane, integral to membrane	transcription factor activity, transcription cofactor activity, transporter activity, secondary active sulfate transmembrane transporter activity, antiporter activity, chloride ion binding
8163666	-0.347	-1.27	0.00614	0.842	<a href="#">8163666</a>	<a href="#">8163666 plot</a>	---	---	chr9	-	117690266	117727307			
7934838	-0.347	-1.27	0.00617	0.842	<a href="#">7934838</a>	<a href="#">7934838 plot</a>	---	---	chr10	-	88380562	88381347			
7952382	-0.33	-1.26	0.00623	0.842	<a href="#">7952382</a>	<a href="#">7952382 plot</a>	<a href="#">OR6T1</a>	olfactory receptor, family 6, subfamily T, member 1	chr11	-	123318784	123319755	signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, sensory perception of smell, response to stimulus	membrane, integral to membrane	receptor activity, olfactory receptor activity
8096955	-0.533	-1.45	0.00625	0.842	<a href="#">8096955</a>	<a href="#">8096955 plot</a>	---	---	chr4	+	113795301	113795375			

8170520	-0.437	-1.35	0.00627	0.842	<a href="#">8170520</a>	<a href="#">8170520 plot</a>	<a href="#">CNGA2</a>	cyclic nucleotide gated channel alpha 2	chrX	+	150653874	150664692	ion transport, sensory perception of smell, response to stimulus	membrane, intracellular cyclic nucleotide activated cation channel complex	nucleotide binding, ion channel activity, intracellular cAMP activated cation channel activity, cAMP binding	
8038668	-0.387	-1.31	0.00629	0.842	<a href="#">8038668</a>	<a href="#">8038668 plot</a>	---	---	chr19	-	56122146	56122640				
7942061	-0.807	-1.75	0.00631	0.842	<a href="#">7942061</a>	<a href="#">7942061 plot</a>	---	---	chr11	+	68147267	68163193				
8104392	-0.453	-1.37	0.00644	0.842	<a href="#">8104392</a>	<a href="#">8104392 plot</a>	---	---	chr5	+	7100340	7100450				
8156848	0.347	1.27	0.00645	0.842	<a href="#">8156848</a>	<a href="#">8156848 plot</a>	<a href="#">NR4A3</a>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	chr9	+	101623958	101668994	mesoderm formation, transcription, regulation of transcription, DNA-dependent, biological_process	nucleus	transcription factor activity, steroid hormone receptor activity, ligand-dependent nuclear receptor activity, thyroid hormone receptor activity, binding, zinc ion binding, sequence-specific DNA binding, metal ion binding	Hypertrophy_model
8091515	0.767	1.7	0.00655	0.842	<a href="#">8091515</a>	<a href="#">8091515 plot</a>	<a href="#">GPR87</a>	G protein-coupled receptor 87	chr3	-	152494581	152517326	signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, biological_process	membrane, integral to membrane	rhodopsin-like receptor activity, receptor activity, purinergic nucleotide receptor activity, G-protein coupled	GPCRDB_Class_A_Rhodopsin-like
8077779	-0.4	-1.32	0.00661	0.842	<a href="#">8077779</a>	<a href="#">8077779 plot</a>	---	---	chr3	+	10157836	10157929				
8121416	-0.497	-1.41	0.00666	0.842	<a href="#">8121416</a>	<a href="#">8121416 plot</a>	---	---	chr6	+	109733390	109733489				
7975457	-0.45	-1.37	0.00674	0.842	<a href="#">7975457</a>	<a href="#">7975457 plot</a>	---	---	chr14	+	71000626	71007491				
8149358	-0.473	-1.39	0.00675	0.842	<a href="#">8149358</a>	<a href="#">8149358 plot</a>	---	---	chr8	-	12045806	12052951				
8113467	-0.437	-1.35	0.00679	0.842	<a href="#">8113467</a>	<a href="#">8113467 plot</a>	---	---	chr5	-	108414912	108416057				
7903854	0.337	1.26	0.00684	0.842	<a href="#">7903854</a>	<a href="#">7903854 plot</a>	<a href="#">SLC6A17</a>	solute carrier family 6, member 17	chr1	+	110494631	110546347	neurotransmitter transport	integral to plasma membrane, membrane	neurotransmitter: sodium symporter activity, symporter activity	
8019541	-0.333	-1.26	0.00685	0.842	<a href="#">8019541</a>	<a href="#">8019541 plot</a>	<a href="#">ZNF750</a>	zinc finger protein 750	chr17	-	78380599	78391220		intracellular	zinc ion binding	
8088090	0.44	1.36	0.00685	0.842	<a href="#">8088090</a>	<a href="#">8088090 plot</a>	<a href="#">LOC285398</a>	hypothetical locus LOC285398	chr3	-	53099055	53099429				
7897997	-0.4	-1.32	0.00686	0.842	<a href="#">7897997</a>	<a href="#">7897997 plot</a>	<a href="#">PRAMEF3</a>	PRAME family member 3	chr1	+	12958130	12960968				

8052798	0.357	1.28	0.00698	0.842	<a href="#">8052798</a>	<a href="#">8052798 plot</a>	<a href="#">AAK1</a>	AP2 associated kinase 1	chr2	-	69539918	69547168	protein amino acid phosphorylation	membrane	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity, ATP binding, transferase activity
8171890	-0.497	-1.41	0.00712	0.842	<a href="#">8171890</a>	<a href="#">8171890 plot</a>	---	---	chrX	-	28910890	28911008			
7933071	-0.343	-1.27	0.00727	0.842	<a href="#">7933071</a>	<a href="#">7933071 plot</a>	---	---	chr10	-	35579893	35580002			
8103736	-0.323	-1.25	0.00738	0.842	<a href="#">8103736</a>	<a href="#">8103736 plot</a>	<a href="#">SCRG1</a>	scrapie responsive protein 1	chr4	-	174545432	174557192	nervous system development	extracellular space	
8001231	0.46	1.38	0.00743	0.842	<a href="#">8001231</a>	<a href="#">8001231 plot</a>	---	---	chr16	-	45904441	45904533			
7948369	-0.387	-1.31	0.00747	0.842	<a href="#">7948369</a>	<a href="#">7948369 plot</a>	---	---	chr11	-	58815102	58815382			
8104129	-0.373	-1.3	0.00754	0.842	<a href="#">8104129</a>	<a href="#">8104129 plot</a>	---	---	chr4_random	+	175230	175353			
7994265	-0.6	-1.52	0.00762	0.842	<a href="#">7994265</a>	<a href="#">7994265 plot</a>	---	---	chr16	+	25947734	25947847			
7972711	-0.44	-1.36	0.00766	0.842	<a href="#">7972711</a>	<a href="#">7972711 plot</a>	---	---	chr13	-	105605751	105605840			
8104035	0.38	1.3	0.00781	0.842	<a href="#">8104035</a>	<a href="#">8104035 plot</a>	<a href="#">SORBS2</a>	sorbin and SH3 domain containing 2	chr4	-	186743592	187114516	biological_process	nucleus, actin cytoskeleton, Z disc	structural constituent of cytoskeleton, protein binding, cytoskeletal adaptor activity, structural constituent of muscle
8109528	0.42	1.34	0.00783	0.842	<a href="#">8109528</a>	<a href="#">8109528 plot</a>	<a href="#">CYFIP2</a>	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	chr5	+	156625669	156755184	apoptosis, cell-cell adhesion	cytoplasm, synaptosome, cell junction, synapse, perinuclear region of cytoplasm	protein binding
8020844	-0.44	-1.36	0.00787	0.842	<a href="#">8020844</a>	<a href="#">8020844 plot</a>	<a href="#">ASXL3</a>	additional sex combs like 3 (Drosophila)	chr18	+	29565930	29581375			
7909954	0.37	1.29	0.00788	0.842	<a href="#">7909954</a>	<a href="#">7909954 plot</a>	<a href="#">DISP1</a>	dispatched homolog 1 (Drosophila)	chr1	+	221112236	221245960			
7958600	0.323	1.25	0.00795	0.842	<a href="#">7958600</a>	<a href="#">7958600 plot</a>	<a href="#">ANKRD13A</a>	ankyrin repeat domain 13A	chr12	+	108921618	108961620			
8093074	-0.38	-1.3	0.00796	0.842	<a href="#">8093074</a>	<a href="#">8093074 plot</a>	<a href="#">ZDHHC19</a>	zinc finger, DHHC-type containing 19	chr3	-	197408239	197422697		membrane, integral to membrane	zinc ion binding, acyltransferase activity, transferase activity, metal ion binding
8176427	-0.293	-1.23	0.00796	0.842	<a href="#">8176427</a>	<a href="#">8176427 plot</a>	---	---	chrY	+	6266809	6266934			
8177114	-0.293	-1.23	0.00796	0.842	<a href="#">8177114</a>	<a href="#">8177114 plot</a>	---	---	chrY	-	10283457	10283582			

8107408	-0.3	-1.23	0.00798	0.842	<a href="#">8107408</a>	<a href="#">8107408 plot</a>	<a href="#">KCNN2</a>	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	chr5	+	113725565	113860096	ion transport, potassium ion transport	membrane, integral to membrane	ion channel activity, calmodulin binding, calcium-activated potassium channel activity, small conductance calcium-activated potassium channel activity
8173299	0.54	1.45	0.00798	0.842	<a href="#">8173299</a>	<a href="#">8173299 plot</a>	<a href="#">EDA2R</a>	ectodysplasin A2 receptor	chrX	-	65732204	65775608	epidermis development, embryonic development, cell differentiation, positive regulation of JNK cascade, activation of NF-kappaB transcription factor	membrane, integral to membrane	receptor activity, tumor necrosis factor receptor activity, protein binding
7964846	-0.43	-1.35	0.00802	0.842	<a href="#">7964846</a>	<a href="#">7964846 plot</a>	<a href="#">LRRC10</a>	leucine rich repeat containing 10	chr12	-	68288611	68291209		nucleus, mitochondrion, cytoskeleton	protein binding
7986407	-0.41	-1.33	0.00821	0.842	<a href="#">7986407</a>	<a href="#">7986407 plot</a>	<a href="#">HSP90B2P</a>	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 2 (pseudogene)	chr15	+	97616372	97617748	protein folding		unfolded protein binding
7909494	0.373	1.3	0.00822	0.842	<a href="#">7909494</a>	<a href="#">7909494 plot</a>	<a href="#">SYT14</a>	synaptotagmin XIV	chr1	+	208178199	208404259		membrane, integral to membrane	
8023708	0.323	1.25	0.00823	0.842	<a href="#">8023708</a>	<a href="#">8023708 plot</a>	---	---	chr18	-	60187790	60187913			
7937711	-0.417	-1.34	0.00827	0.842	<a href="#">7937711</a>	<a href="#">7937711 plot</a>	---	---	chr11	+	1770359	1770676			
7956856	0.577	1.49	0.00828	0.842	<a href="#">7956856</a>	<a href="#">7956856 plot</a>	<a href="#">MSRB3</a>	methionine sulfoxide reductase B3	chr12	+	63958755	64146954	protein repair	mitochondrion, endoplasmic reticulum	protein-methionine-R-oxide reductase activity, protein-methionine-S-oxide reductase activity, zinc ion binding
8088369	-0.353	-1.28	0.00829	0.842	<a href="#">8088369</a>	<a href="#">8088369 plot</a>	---	---	chr3	-	57974321	57974601			
8025850	-0.297	-1.23	0.00834	0.842	<a href="#">8025850</a>	<a href="#">8025850 plot</a>	<a href="#">LOC55908</a>	hepatocellular carcinoma-associated gene TD26	chr19	+	11209126	11213619			

8094901	-0.343	-1.27	0.00835	0.842	<a href="#">8094901</a>	<a href="#">8094901 plot</a>	<a href="#">GABRB1</a>	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	chr4	+	46728134	47123218	ion transport, signal transduction	integral to plasma membrane, cell junction, synapse, postsynaptic membrane	GABA-A receptor activity, ion channel activity, extracellular ligand-gated ion channel activity, chloride channel activity, neurotransmitter receptor activity, chloride ion binding
8110604	-0.293	-1.23	0.00839	0.842	<a href="#">8110604</a>	<a href="#">8110604 plot</a>	---	---	chr5	+	180089192	180089326			
8042109	0.337	1.26	0.00842	0.842	<a href="#">8042109</a>	<a href="#">8042109 plot</a>	---	---	chr2	+	59728260	59728360			
7990054	0.283	1.22	0.00843	0.842	<a href="#">7990054</a>	<a href="#">7990054 plot</a>	<a href="#">UACA</a>	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats	chr15	-	68733947	68842904	viral reproduction	extracellular region, cytoplasm, cytoskeleton	molecular_function
8158212	-0.403	-1.32	0.00848	0.842	<a href="#">8158212</a>	<a href="#">8158212 plot</a>	---	---	chr9	+	130102188	130104052			
7956759	0.58	1.49	0.00855	0.842	<a href="#">7956759</a>	<a href="#">7956759 plot</a>	<a href="#">SRGAP1</a>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	chr12	+	62524808	62823841	signal transduction	intracellular	GTPase activator activity
8126853	0.547	1.46	0.00863	0.842	<a href="#">8126853</a>	<a href="#">8126853 plot</a>	<a href="#">C6orf138</a>	chromosome 6 open reading frame 138	chr6	-	47953998	47955530		membrane	hedgehog receptor activity
7989628	0.35	1.27	0.00871	0.842	<a href="#">7989628</a>	<a href="#">7989628 plot</a>	<a href="#">CSNK1G1</a>	casein kinase 1, gamma 1	chr15	-	62244769	62435495	protein amino acid phosphorylation, Wnt receptor signaling pathway	cytoplasm	nucleotide binding, protein serine/threonine kinase activity, ATP binding, transferase activity
8170235	-0.487	-1.4	0.00888	0.842	<a href="#">8170235</a>	<a href="#">8170235 plot</a>	---	---	chrX	+	138995683	138995975			
7987636	-0.31	-1.24	0.00888	0.842	<a href="#">7987636</a>	<a href="#">7987636 plot</a>	<a href="#">OIP5</a>	Opa interacting protein 5	chr15	-	39388758	39412111	cell communication	chromatin, cellular_component, nucleus, Cajal body	protein binding
8063011	-0.3	-1.23	0.00892	0.842	<a href="#">8063011</a>	<a href="#">8063011 plot</a>	<a href="#">WFDC10A</a>	WAP four-disulfide core domain 10A	chr20	+	43691579	43693249			serine-type endopeptidase inhibitor activity
7907962	-0.363	-1.29	0.00894	0.842	<a href="#">7907962</a>	<a href="#">7907962 plot</a>	---	---	chr1	+	179658608	179658666			
7919598	-0.337	-1.26	0.00895	0.842	<a href="#">7919598</a>	<a href="#">7919598 plot</a>	<a href="#">LOC729135</a>	hypothetical protein LOC729135	chr1	-	147939529	147939600			
7958726	-0.353	-1.28	0.00907	0.842	<a href="#">7958726</a>	<a href="#">7958726 plot</a>	<a href="#">CUTL2</a>	cut-like 2 (Drosophila)	chr12	+	109956212	110272739	negative regulation of transcription, DNA-dependent	nucleus	transcription factor activity, transcription repressor activity, sequence-specific DNA binding
8091595	-0.367	-1.29	0.0091	0.842	<a href="#">8091595</a>	<a href="#">8091595 plot</a>	<a href="#">FLJ46120</a>	hypothetical LOC647008	chr3	-	156438260	156441340			

7901913	-0.323	-1.25	0.00919	0.842	<a href="#">7901913</a>	<a href="#">7901913 plot</a>	<a href="#">FOXD3</a>	forkhead box D3	chr1	+	63561300	63563385	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, trophectodermal cell differentiation, embryonic placenta development, transcription, regulation of transcription, DNA-dependent, multicellular organismal development, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	nucleus	transcription factor activity, protein binding, sequence-specific DNA binding
7986001	-0.303	-1.23	0.0092	0.842	<a href="#">7986001</a>	<a href="#">7986001 plot</a>	<a href="#">LOC728477</a>	similar to Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	chr15	+	88638600	88639085			
8090503	-0.343	-1.27	0.00926	0.842	<a href="#">8090503</a>	<a href="#">8090503 plot</a>	---	---	chr3	-	129875215	129875554			
7989309	-0.463	-1.38	0.0093	0.842	<a href="#">7989309</a>	<a href="#">7989309 plot</a>	---	---	chr15	-	57420811	57420908			
7911047	-0.34	-1.27	0.00932	0.842	<a href="#">7911047</a>	<a href="#">7911047 plot</a>	---	---	chr1	+	242333857	242334135			
7921332	-0.297	-1.23	0.00932	0.842	<a href="#">7921332</a>	<a href="#">7921332 plot</a>	<a href="#">CD5L</a>	CD5 molecule-like	chr1	-	156063485	156078212	apoptosis, cellular defense response	extracellular region, extracellular space, membrane	scavenger receptor activity
7954645	0.457	1.37	0.00938	0.842	<a href="#">7954645</a>	<a href="#">7954645 plot</a>	<a href="#">TSPAN11</a>	tetraspanin 11 (TSPAN11), mRNA	chr12	+	30998193	31036117			
8153937	-0.343	-1.27	0.00944	0.842	<a href="#">8153937</a>	<a href="#">8153937 plot</a>	<a href="#">SCRT1</a>	scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila)	chr8_random	+	404366	404849	transcription, regulation of transcription, DNA-dependent	intracellular, nucleus	transcription factor activity, zinc ion binding, metal ion binding
7986536	-0.423	-1.34	0.00951	0.842	<a href="#">7986536</a>	<a href="#">7986536 plot</a>	---	---	chr15	+	100200644	100208050			
8122756	0.393	1.31	0.00958	0.842	<a href="#">8122756</a>	<a href="#">8122756 plot</a>	<a href="#">PLEKHG1</a>	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1	chr6	+	150962692	151206492	regulation of Rho protein signal transduction	intracellular	guanyl-nucleotide exchange factor activity, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity
8113234	-0.307	-1.24	0.00959	0.842	<a href="#">8113234</a>	<a href="#">8113234 plot</a>	<a href="#">PCSK1</a>	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	chr5	-	95751875	95794740	proteolysis, cell-cell signaling, metabolic process	cytoplasmic vesicle	proprotein convertase 1 activity, subtilase activity, calcium ion binding, peptidase activity
8053797	0.51	1.42	0.00959	0.842	<a href="#">8053797</a>	<a href="#">8053797 plot</a>	---	---	chr2	-	95878404	95884969			



7925759	-0.537	-1.45	0.00972	0.842	<a href="#">7925759</a>	<a href="#">7925759 plot</a>	<a href="#">OR2T27</a>	olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 27	chr1	-	246879855	246880808	signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, sensory perception of smell, response to stimulus	membrane, integral to membrane	receptor activity, olfactory receptor activity	
8153037	-0.47	-1.39	0.00979	0.842	<a href="#">8153037</a>	<a href="#">8153037 plot</a>	---	---	chr8	-	134836956	134837024				
8070171	-0.317	-1.25	0.00982	0.842	<a href="#">8070171</a>	<a href="#">8070171 plot</a>	---	---	chr21	-	34213291	34213511				
8111960	0.423	1.34	0.00986	0.842	<a href="#">8111960</a>	<a href="#">8111960 plot</a>	---	---	chr5	-	43522561	43550944				
8039520	-0.32	-1.25	0.00987	0.842	<a href="#">8039520</a>	<a href="#">8039520 plot</a>	---	---	chr19	-	60733344	60739323				
8087545	-0.38	-1.3	0.00989	0.842	<a href="#">8087545</a>	<a href="#">8087545 plot</a>	---	---	chr3	-	49875812	49876097				
8043995	0.277	1.21	0.00993	0.842	<a href="#">8043995</a>	<a href="#">8043995 plot</a>	<a href="#">IL1R1</a>	interleukin 1 receptor, type I	chr2	+	102125678	102162766	inflammatory response, immune response, cytokine and chemokine mediated signaling pathway	integral to plasma membrane, membrane	transmembrane receptor activity, interleukin-1, Type I, activating receptor activity, protein binding	Hypertrophy_model

161 Genes