

MALATTIA DI FABRY E NUOVE VARIANTI DEL GENE GLA: L'IMPORTANZA DEGLI STUDI FUNZIONALI

Duccio Malesci¹, Lorenzo Ferri¹, Antonella Fioravanti², Armando Filippini³, Anna Ficcadenti⁴, Raffaele Manna⁵, Daniela Antuzzi⁵, Catia Cavicchi¹, Ilaria Donati⁶, Renzo Mignani⁷, Renzo Guerrini¹, Amelia Morrone¹

¹ Clinica di Neurologia Pediatrica e Laboratori, AOU Meyer, Firenze - Italy, ² Structural Biology Brussels, Vrije Universiteit Brussel, Brussel - Belgium, ³ Unità di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Policlinico Casilino, Roma - Italy, ⁴ Istituto di Scienze Materno-Infantili, Politecnico Universitario delle Marche, Ancona - Italy, ⁵ Università Cattolica, Roma - Italy, ⁶ Unità di Genetica Medica, AUSL di Romagna, Cesena - Italy, ⁷ Unità di Nefrologia e Dialisi, Ospedale degli Infermi, Rimini - Italy

Background: La malattia di Fabry (FD) è un disordine da accumulo lisosomiale X-linked causato dal deficit dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A (α -GAL A), codificato dal gene *GLA*. La FD è eterogenea sia dal punto di vista clinico che molecolare. L'enzima α -Gal A è costituito da 429 AA (398 AA nella forma matura) e quasi 800 varianti sono ad oggi note. Molte varianti sono patogenetiche, ma esistono anche varianti polimorfiche che causano pseudodeficienza e che invece non sono patogenetiche. Recentemente alcune varianti missenso del gene *GLA*, precedentemente considerate causative sulla base dei sintomi clinici, dell'analisi di sequenza e della ridotta attività enzimatica, sono state ri-classificate come polimorfismi grazie a studi istologici, funzionali e di popolazione.

L'identificazione di una nuova variante del gene *GLA* non sempre garantisce la conferma diagnostica di FD, in particolare nelle femmine probande o nei pazienti affetti da forme lievi. In questi casi gli studi funzionali diventano fondamentali per capire il significato clinico e l'eventuale responsività alla terapia chaperonica (DGJ) delle nuove varianti.

Scopo: Analizzare dal punto di vista funzionale 6 nuove mutazioni del gene *GLA*, identificate in pazienti con manifestazioni tipiche della FD.

Risultati: In 6 probandi non correlati (4 maschi con attività enzimatica ridotta dell' α -GAL A e 2 femmine) abbiamo identificato le seguenti 6 nuove varianti del gene *GLA*: c.159C>G p.(Asn53Lys), c.400T>C p.(Tyr134His), c.680G>C (p.Arg227Pro), c.815A>T p.(Asn272Ile), c.907A>T p.(Ile303Phe) e c.1163_1165delTCC (p.Leu388del). L'analisi bioinformatica e di homology modeling ha predetto un ruolo patogenetico per tutte e 6 le varianti. Per confermare tali predizioni, abbiamo effettuato studi di mutagenesi sito-diretta, introducendo le mutazioni nel cDNA del gene *GLA*. In tutti i costrutti generati ed espressi *in vitro* abbiamo riscontrato una riduzione dell'attività enzimatica dell' α -Gal A che rispecchia la severità di tali mutazioni sulla struttura 3D della proteina osservata tramite homology modelling. Le varianti p.Tyr134His, p.Arg227Pro, p.Asn272Ile e p.Leu388del causavano l'assenza di attività enzimatica e non erano responsive al DGJ. Le varianti p.Asn53Lys e p.Ile303Phe correlavano invece con attività enzimatica residua ed erano responsive al DGJ (incremento dell'attività dell' α -Gal A del 21% per p.Asn53Lys e del 36% per p.Ile303Phe).

Conclusioni: I nostri dati mostrano un ruolo causativo delle nuove varianti del gene *GLA* esaminate. Gli studi funzionali sono importanti e dovrebbero essere eseguiti quando si identificano nuove varianti del gene *GLA*, in particolare alla luce degli emergenti programmi di screening neonatale per le malattie da accumulo lisosomiale.