

La mutazione Q109X del gene SDHD causa tumori ereditari cromaffini caratterizzati da un'alta variabilità fenotipica*

Lisa Simi¹, Pietro Ferruzzi², Roberta Sestini³, Pamela Pinzani¹, Maurizio Genuardi³, Mario Pazzagli¹, Mario Serio², Massimo Mannelli², Claudio Orlando¹

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica¹, di Endocrinologia² e di Genetica Medica³, Università degli Studi di Firenze

ABSTRACT

The Q109X mutation in SDHD gene causes hereditary chromaffin tumors characterized by a high phenotypic variability

Familial chromaffin tumors are caused by mutations in VHL, RET, NF1 or in mitochondrial complex genes SDHB, SDHC, SDHD. We studied three families (negative for VHL, RET, NF1 mutations) and affected by chromaffin tumors with a high clinical variability, presenting carotid tumors, paragangliomas and pheochromocytomas. In each family a nonsense germline mutation (Q109X) was found in exon 4 of the SDHD gene, that causes a stop codon and the synthesis of a truncated protein. In affected patients, the heterozygous mutation was in germline as well as in tumor DNA and was always inherited through fathers. This study shows that this germline mutation is associated to different clinical pictures and suggests that genomic analysis should be performed in patient affected by a chromaffin tumor especially if present in young age, with multiple or extraadrenal localization.

RIASSUNTO

I tumori cromaffini familiari sono causati da mutazioni in VHL, RET, NEF1 o nei geni del complesso mitocondriale SDHB, SDHC, SDHD. Abbiamo studiato tre famiglie (negative per mutazioni di VHL, RET, NF1) e affette da tumori cromaffini caratterizzati da ampia variabilità clinica e che presentavano tumori carotidei, paragangliomi e feocromocitomi. In ciascuna famiglia è stata individuata una mutazione germinale (Q109X) nell'esone 4 del gene SDHD, che genera uno stop codon e la sintesi di una proteina troncata. Nei pazienti affetti, la mutazione eterozigote era dimostrabile nel DNA costituzionale e nel tumore ed era sempre ereditata dal padre. Questo studio dimostra che questa mutazione germinale è associata a differenti quadri clinici e suggerisce l'importanza di questa valutazione nei pazienti affetti da tumori cromaffini, con particolare attenzione ai tumori in giovane età, a quelli multipli e con localizzazione non surrenalica.

INTRODUZIONE

Il complesso mitocondriale II, succinato/ubiquinone ossidoreduttasi, è il più piccolo complesso della catena respiratoria ed è composto di quattro subunità codificate dai geni nucleari SDHA, SDHB, SDHC e SDHD. Tale complesso mitocondriale è responsabile delle ossidazione del succinato in fumarato durante ciclo di Krebs ed è quindi coinvolto nel trasporto degli elettroni. Mentre SDHA e SDHB codificano per le flavoproteine e le Fe-S proteine, gli altri due geni sintetizzano le subunità idrofobiche responsabili dell'ancoraggio del complesso alle creste mitocondriali (1). Mutazioni a carico dei geni SDHB, SDHC e SDHD causano paragangliomi ereditari: tumori vascolarizzati a lenta crescita del tessuto paraganglionico. Recentemente è stato dimostrato che tali mutazioni possono accompagnarsi anche a espressioni fenotipiche estremamente variabili caratterizzate sia da paragangliomi addominali o toracici (2) che da feocromocitomi variamente associati fra

di loro (3). Per quanto riguarda i feocromocitomi familiari sono circa nel 50% dei casi legati ad una mutazione germinale del gene VHL, mentre nell'altra metà la causa è sconosciuta. La variabilità fenotipica di queste sindromi familiari è tale che spesso, come dimostrato da un recente lavoro di Neumann e coll. (4), pazienti portatori di mutazioni germinali responsabili di tumori cromaffini, vengono erroneamente etichettati come sporadici, con importanti conseguenze negative sia per i pazienti che per i loro familiari.

MATERIALI E METODI

In questo studio abbiamo effettuato un'indagine su quattro famiglie al fine di individuare la presenza di specifiche mutazioni a carico del DNA genomico in pazienti affetti da forme ereditarie di tumori cromaffini risultati privi di mutazioni a carico dei geni VHL, RET e NF-1, che

*Lavoro vincitore del premio Ghin assegnato in occasione di "SIBioC 2003, 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze 14-17 Ottobre 2003

caratterizzano frequentemente tali patologie. Un particolare interesse è stato rivolto verso le sequenze codificanti del gene SDHD, costituito da quattro esoni, che codifica per una proteina di 159 aminoacidi. La caratterizzazione del genotipo è stata effettuata anche in campioni di DNA estratti direttamente dal tessuto tumorale.

Estrazione del DNA

I campioni di DNA genomico sono stati estratti dai prelievi di sangue intero mediante utilizzo di kit commerciali NucleoSpin Blood L (Macherey-Nagel, Düren, Germany), e da tessuto tumorale, tramite specifico kit QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen S.p.A., Milan, Italy) seguendo i protocolli allegati. La lisi del materiale in esame è stata effettuata dopo incubazione di 2ml di sangue o 25-50 mg di tessuto, in una soluzione contenente proteinasi K.

Sequenziamento del DNA

Le reazioni di PCR e di marcatura per il sequenziamento sono state condotte mediante utilizzo di primers appropriati per tutti gli esoni dei geni SDHB, SDHC e SDHD. Trecento nanogrammi di DNA totale sono stati sottoposti alla reazione di amplificazione in un volume finale di reazione di 50 µl. Il mix è stato sottoposto al seguente protocollo di PCR: fase iniziale di 9' a 94°C e 35 cicli di amplificazione a 94°C per 1', annealing per 1' a 55°C per SDHB e SDHC e 60°C per SDHD, e 72°C per 90" in Gene Amp 9700 Thermal Cycler (PE Applied Biosystems).

Il prodotto di PCR, purificato mediante Qiagen PCR purification kit, è stato quantificato in gel di agarosio 2% utilizzando il marker di peso molecolare XIV (Roche). La reazione di marcatura è stata effettuata utilizzando venti ng di DNA, 0,8 µM di ciascun primer per reazione e 2 µl di Terminator Ready Reaction Mix contenente Big Dye Terminators (Applied Biosystems), e sottoposto a Cycle-sequencing secondo il seguente protocollo: 25 cicli a 96°C per 10", 50°C per 5", 60°C per 4". Una purificazione finale si è resa necessaria per la rimozione dei Big Dye Terminators non incorporati tramite il kit DyeEx 2.0 Spin Kit (Quiagen). Cinque microlitri di prodotto marcato e purificato sono stati miscelati con 10 µl di Template Suppressor Reagent e analizzati con ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

RISULTATI

In tre famiglie è stata individuata la presenza di una mutazione germinale in eterozigosi Q109X a livello dell'esone 4 del gene SDHD. Tale mutazione è caratterizzata dalla sostituzione C→T nella tripletta CAA con conseguente introduzione di un precoce codone di stop che genera una proteina troncata di 108 aminoacidi incapace di legarsi al substrato (Fig.1).

Nei pazienti affetti da tumori cromaffini tale mutazione in eterozigosi è presente anche nel DNA estratto dal tessuto tumorale, escludendo di conseguenza fenomeni di perdita di eterozigoti (LOH) a tale livello. Inoltre, nei

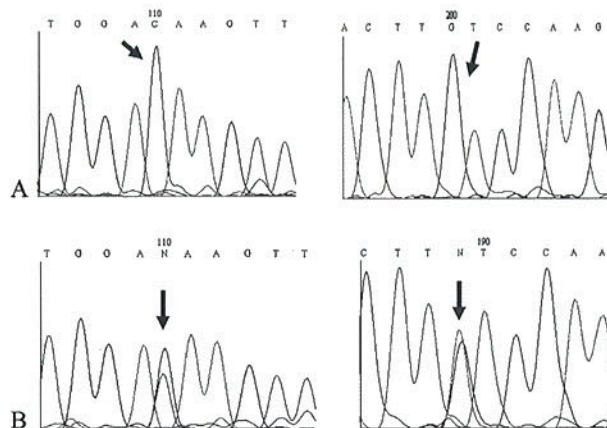


Figura 1

Esempio di risultati ottenuti dal sequenziamento diretto dell'esone 4 del gene SDHD effettuato su DNA estratto da leucociti di pazienti con genotipo normale (A) e con genotipo mutato in eterozigosi (B). Elettroferogramma risultante dal sequenziamento dell'esone 4 del gene SDHD effettuato con primer forward (sinistra) e primer reverse (destra)

pazienti affetti da neoplasia la presenza dell'allele mutato è sempre di derivazione paterna, confermando la presenza di un meccanismo di imprinting materno. Secondo tale ipotesi il gene SDHD risulta essere ipermetilato, quindi inattivo, quando è di derivazione materna e di conseguenza solo gli alleli mutati che derivano dal padre sono responsabili di una espressione fenotipica tumorale. I pazienti affetti mostrano inoltre un'alta variabilità clinica che va da tumori dei corpi carotidei a feocromocitomi mono o bilaterali, alcuni dei quali non-secernenti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo studio indica che analoghe mutazioni germinali possono essere causa di differenti quadri clinici suggerendo un'indagine genetica in tutti i pazienti con tumori cromaffini apparentemente sporadici, specie se di giovane età o affetti da tumori multipli.

La possibilità di diagnosticare correttamente la familiarità della sindrome è di grande rilevanza clinica sia per il paziente che per i familiari. Infatti il paziente affetto dovrà essere sottoposto a follow up per tutta la vita potendo sviluppare più di un tumore anche in tempi diversi mentre ai familiari affetti viene garantita una diagnosi precoce con riduzione del rischio cardiovascolare legato ai tumori cromaffini.

BIBLIOGRAFIA

1. Baysal B.E., Rubinstein W. S., Taschner P. E.M. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorder. *J Mol Med* 79 : 495-503 (2001).
2. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosh A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW,3rd, Cornelisse CJ, De-

- vilee P, Devlin B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000; 287: 848-851.
3. Astuti D, Douglas F, Lennard TWJ, Aligianis IA, Woodward ER, Evans DGR, Eng C, Latif F, Maher ER. Germline SDHD mutations in familial pheochromocytoma. *Lancet* 2001; 357: 1181-1182.
 4. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C, Smith WM, Munk R, Manz T, Glaesker S, Apel TW, Treier M, Reineke M, Walz MK, Hoang-Vu C, Brauckhoff M, Klein-Franke A, Klose P, Schmidt H, Maier-Woelfle M, Peczkowska M, Szmigielski C, Eng C; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 346:1459-66, 2002.