



Deficit di ACAD8 associato a un fenotipo MADD in un ragazzo con livelli plasmatici ridotti dei cofattori flavinici e alterati livelli del trasportatore RFVT2 nelle membrane degli eritrociti

Albina Tummolo¹, Piero Leone², Rita Solito², Maria Tolomeo², Francesca Lepri³, Matteo Mattiuzzo³, Donatella De Giovanni¹, Simonetta Simonetti⁴, Maria Barile²

1 UOC Malattie Metaboliche e Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Policlinico di Bari

2 Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari "A.Moro"

3 Laboratorio di Genetica Medica, Ricerca Citogenomica Traslazionale, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Roma

4 Unità di Screening Neonatale e Patologia Clinica, "Giovanni XXIII" Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII, Azienda Ospedaliero-Universitaria, Policlinico di Bari

ABSTRACT

Background Il deficit multiplo di Acil-CoA deidrogenasi (MADD) o aciduria glutarica di tipo II (GAII, OMIM #231680) è un disturbo del metabolismo degli acidi grassi e di alcuni aminoacidi, caratterizzato da un profilo plasmatico anomalo delle acilcarnitine e deficit secondario di carnitina. La sua presentazione clinica varia da una forma neonatale grave, a una forma a esordio tardivo, caratterizzata da miopatia prossimale.

Metodi Riportiamo il caso di un ragazzo di 11 anni, giunto alla nostra attenzione per mialgia e debolezza muscolare, associati a inappetenza e vomito. Si rilevavano anche ipertransaminasemia, con evidenza ecografica di epatomegalia. Il profilo delle acilcarnitine e gli acidi organici urinari deponevano per MADD.

Risultati Questo paziente presentava una singola variante patogenetica nel gene ETFDH e nessuna variante patogenetica nei geni correlati all'omeostasi della riboflavina (Rf) (*SLC52A1*, *SLC52A2*, *SLC52A3*, *SLC25A32*, *FLAD1*). E' stata riscontrata eterozigosi composta nel gene ACAD8, che codifica per l'isobutirril-CoA deidrogenasi, coinvolto nel catabolismo della valina. Lo studio biochimico sull'omeostasi della Rf ha mostrato livelli ridotti di Rf e dei cofattori flavinici (FMN, FAD) nel plasma e alterate attività enzimatiche FAD-dipendenti negli eritrociti, oltre a una significativa riduzione del livello del trasportatore plasmatico di Rf 2 (RFVT2) negli eritrociti.

Discussione Il deficit secondario di Rf, probabilmente dovuto agli squilibri metabolici riconducibili a diminuzione dell'attività di ACAD8 associata alla diminuzione dell'efficienza di ETFDH, può portare a un fenotipo simile a MADD. Il quadro clinico è nettamente migliorato con un'adeguata e continua integrazione di Rf, Carnitene e CoQ10 e con l'introduzione di 3-idrossibutirrato. In caso di alterazioni biochimiche che indicano compromissione dell'omeostasi della Rf, anche in assenza di un difetto genetico dei geni coinvolti, ulteriori analisi molecolari mirate possono rivelare alterazioni secondarie e possibilmente trattabili.

CASO CLINICO

Il paziente di 11 anni, è giunto alla nostra attenzione per dolori muscolari e debolezza, associati a inappetenza e vomito. L'ipertransaminasemia (AST 144 IU/l, ALT 267 IU/l), con evidenza ecografica di epatomegalia, sono state le ragioni del ricovero nel nostro reparto. Primo ricovero all'età di un anno per ipertransaminasemia e anemia, non eseguiti ulteriori accertamenti. Dall'età di 6 anni, episodi di crampi muscolari in apiressia (normale EEG), facile affaticamento e dolori muscolari dopo un leggero esercizio. Questi episodi erano talvolta accompagnati da vomito. All'ultimo episodio, riscontrato un aumento significativo delle acilcarnitine da catena corta a catena molto lunga, insieme a aciduria glutarica e 2-chetoglutarica, etilmalonica e dicarbossilica. Durante il ricovero è stato sottoposto ad infusione ev di glucosio 10% (4 mg/kg/min) e L-Carnitina (100 mg/kg), con graduale recupero clinico. Ha eseguito trial con riboflavina Rf (150 mg/die), con normalizzazione dell'aciduria glutarica, ma anomalia persistente degli altri acidi organici e delle acilcarnitine. Il paziente è stato dimesso con terapia con Carnitina, coenzima Q10 e dieta a ridotto apporto di lipidi a catena lunga e proteine. Ha presentato, nel corso del follow-up scompensi acuti e modifiche dell'assetto biochimico in relazione alla terapia eseguita.

ANALISI MOLECOLARE

L'analisi molecolare mostrava una singola variante patogenetica nel gene *ETFDH* e nessuna variante patogenetica nei geni correlati all'omeostasi della riboflavina (Rf) (*SLC52A1*, *SLC52A2*, *SLC52A3*, *SLC25A32*, *FLAD1*). Lo studio genetico è stato poi esteso ad altri disturbi mitocondriali legati al metabolismo degli acidi grassi e degli amminoacidi. Questa analisi ha evidenziato un'eterozigosi composta nel gene *ACAD8*, localizzato sul cromosoma 11q25. Queste mutazioni, c.512C>G (p.Ser171Cys) e c.822C>A (p.Asn274Lys), colpiscono rispettivamente gli esoni 5 e 7 (Figura 3a). L'analisi molecolare degli altri membri della famiglia ha evidenziato che il padre e la sorella erano portatori della mutazione nel gene *ETFDH* (c.524 G>A) e una mutazione nel gene *ACAD8* (c.822C>A). La madre portava la mutazione *ACAD8* c.512C>G (Figura 1).

Figura 1. Albero genealogico della famiglia del probando

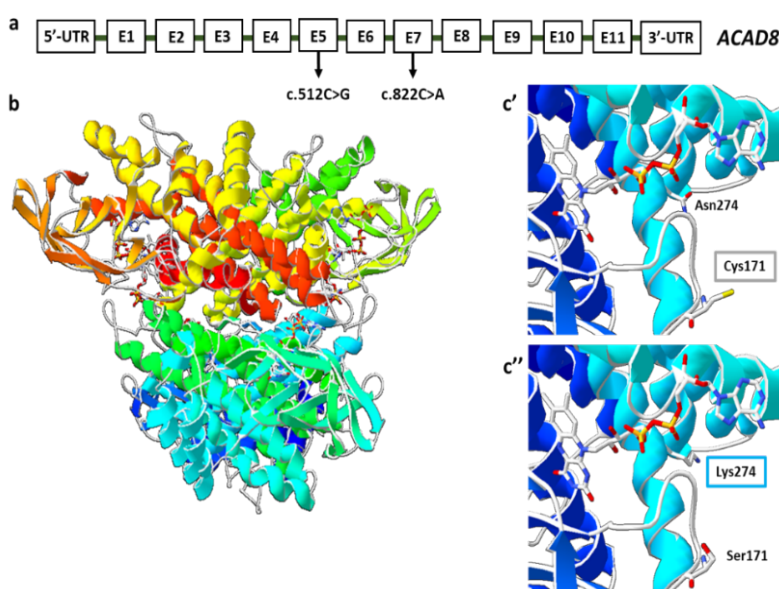
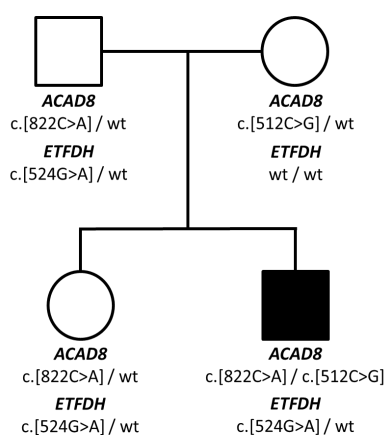


Figura 3. (a) Rappresentazione schematica della sequenza di cDNA di ACAD8: le caselle E1-E11 rappresentano gli esoni. Sono indicate le mutazioni identificate in questo studio. (b) Struttura dell'isobutiril-CoA deidrogenasi: rappresentazione a nastro della proteina dell'isobutiril-CoA deidrogenasi basata sulla struttura cristallina dell'IBD umana (PDB ID: 1RX0). Nei riquadri, ingrandita la catena IBD A, che mostra le mutazioni Ser171Cys (c') e Asn274Lys (c'').

RISULTATI

CONCENTRAZIONI FLAVINICHE I profili flavinici ottenuti mediante HPLC nel corso del follow-up del paziente sono confrontati con i controlli di pari età. Come previsto, la FAD è la principale specie rilevabile (85% del contenuto totale) negli estratti plasmatici, per l'attività della FAD sintasi ematica; sono state rilevate invece solo piccole quantità di Rf e FMN. Nel paziente, al primo scompenso (Tabella 2: P 1stD_{adm}), si riscontra una diminuzione significativa sia dei livelli di FAD che di FMN rispetto ai controlli; si osserva anche una lieve, seppur non significativa, diminuzione del livello di Rf. Al secondo scompenso (Tabella 2: P 2ndD_{adm}), in seguito al trattamento con CoQ10 e carnitene, i valori di FAD appaiono rientrati nella normalità. FMN e Rf sono aumentati, ma non raggiungono ancora la normalità. All'inizio del trattamento con Rf durante il secondo ricovero, il livello di Rf raddoppia senza cambiamenti significativi nei livelli di FAD e FMN. A seguito del trattamento continuo con Rf si può osservare un eccesso di vitamina nel plasma (8 volte di più rispetto al primo ricovero). Il contenuto FAD rimane stabile e nell'intervallo normale, il valore FMN sembra essere compensato.

Table 2.

Plasma flavin concentration (nmol/L)					
		FAD	FMN	Rf	Tot.
Controls (n=8)	Interval	35.0 – 49.6	7.4 – 14.5	3.8 – 22.4	46.7 – 88.3
	Mean ± SEM	44.0 ± 2.1	9.3 ± 0.9	7.7 ± 2.1	61.0 ± 4.6
P 1 st D _{adm}		37.8 ± 1.4*	3.5 ± 0.1***	2.9 ± 0.1	44.2 ± 1.5**
P 2 nd D _{adm}		49.7 ± 0.5	5.1 ± 0.3**	3.1 ± 0.0	57.9 ± 0.2
P at start of Rf treatment		49.6 ± 3.3	4.5 ± 0.4***	6.5 ± 0.1	60.6 ± 3.6
P two months after start of Rf treatment		43.3 ± 1.2	8.1 ± 0.4	24.7 ± 0.4	76.0 ± 1.3

Data represent the mean ± SEM of two different HPLC determinations; student's t-test: * p<0.05; **p<0.01

LIVELLI DI EGRAC (coefficiente di attivazione della glutazione reduttasi eritrocitaria) Come riportato nella Tabella 3, EGRAC era 3,2 ± 0,35 al primo scompenso e 2,6 ± 0,32 al secondo scompenso metabolico, suggerendo uno stato di grave carenza di Rf. All'inizio del trattamento con Rf durante il secondo ricovero, il valore di EGRAC è migliorato. Quindi, dopo la terapia continua con Rf, il valore EGRAC (1,2 ± 0,16) ha testimoniato uno stato di FAD soddisfacente. Nella Tabella 3 sono riportati anche i livelli enzimatici endogeni di EGR. Sia i risultati analitici che enzimatici dimostrano una profonda alterazione dell'omeostasi Rf in questo paziente al primo scompenso e un'inversione di questo fenotipo biochimico a seguito della risposta al trattamento con Rf. Il difetto dell'omeostasi Rf sembra non essere congenito, ma secondario allo stress metabolico generato dal deficit della degradazione degli aminoacidi e degli acidi grassi, possibile effetto della combinazione tra disfunzione di ACAD8 e ridotta attività di ETFDH.

Table 3.

	EGRAC*	Endogenous EGR rate (μmol/min • g Hb)
P 1 st D _{adm}	3.2 ± 0.4	0.9 ± 0.1
P 2 nd D _{adm}	2.6 ± 0.3	2.8 ± 0.1
P at start of Rf treatment	1.4 ± 0.1	4.6 ± 0.2
P two months after the start of Rf treatment	1.2 ± 0.2	5.1 ± 0.3

Data represent the mean ± SD of three different determinations.

*Deficiency Status ≥ 1.4, Marginal Deficiency Status = 1.2 – 1.4, Acceptable Status ≤ 1.2.

RISULTATI

LIVELLI DEI TRASPORTATORI DI Rf Per rafforzare ulteriormente questa ipotesi, sono stati misurati i livelli di trasportatori Rf (RFVT1-3) nelle frazioni arricchite di membrana dagli eritrociti mediante western blotting. Le quantità di proteine rilevabili in questo modo, dovrebbero derivare sia dal tasso di espressione proteica negli eritroblasti che dal tasso di ricambio proteico durante la vita degli eritrociti. Uno screening effettuato sul prodotto dei tre geni SLC52A1-3, ha rivelato la presenza di RFVT2 (Figura 4). La banda cross-reattiva di RFVT2 migra a circa 42 kDa in SDS-PAGE, in buon accordo con la massa molecolare teorica di RFVT2 (45,7 kDa). Negli stessi estratti non erano rilevabili bande cross-reattive per RFVT1 e RFVT3. Una significativa diminuzione della banda RFVT2 è stata riscontrata nelle membrane dei pazienti al primo scompenso, ma non al secondo, forse a causa del trattamento con CoQ10 e carnitene.

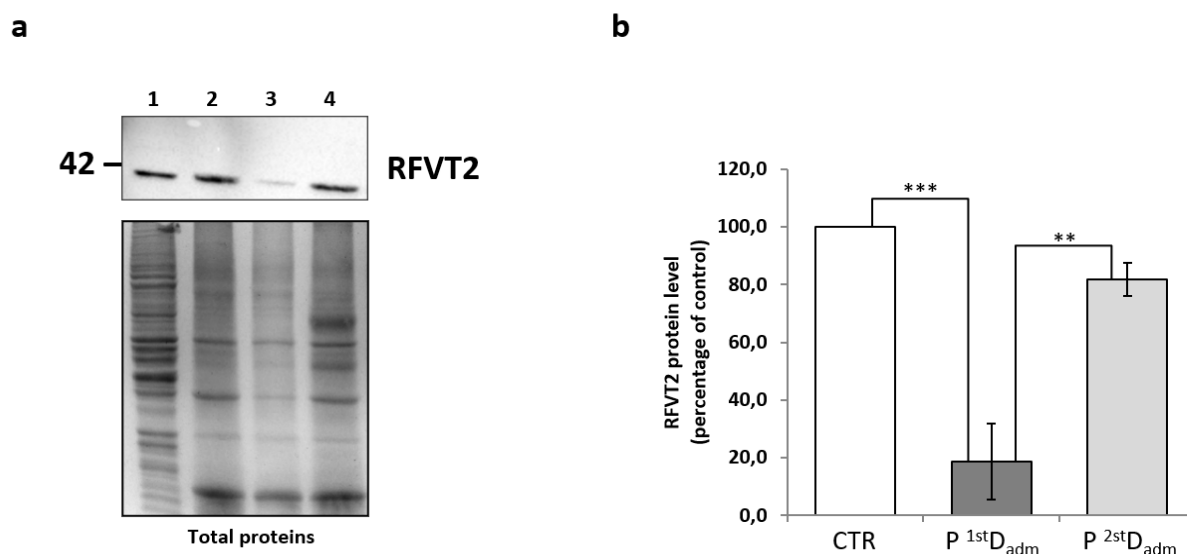


Figura 4. (a) Analisi immunoblot rappresentativa della proteina RFVT2. Estratti proteici da frazioni non solubili di eritrociti da un controllo di pari età (corsia 2), paziente al primo scompenso (P 1stDadm, corsia 3) e al secondo scompenso (P 2ndDadm, corsia 4) sono stati caricati su SDS-PAGE e immunoblotting con un anticorpo policlonale generato contro RFVT2. Come controllo sono stati caricati anche estratti da cellule Caco-2 (corsia 1). (b) La quantità relativa di RFVT2 nel paziente rispetto al controllo è stata quantificata e normalizzata rispetto alle proteine totali. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard di tre diverse determinazioni (test t-student: **p<0.01, ***p<0.001).

CONCLUSIONI

Con questo studio abbiamo descritto un disturbo secondario dell'omeostasi del cofattore flavinico che, a sua volta, creerebbe una sorta di circolo vizioso che induce all'instabilità del sistema ETF/ETF:QO45. Infatti, i sintomi del paziente sono migliorati dopo un'adeguata e continua integrazione di Rf (carnitene e CoQ10). Nel tentativo di bypassare i difetti della beta-ossidazione epatica e di migliorare l'apporto energetico al tessuto extraepatico, l'inserimento di una dietoterapia basata su un basso apporto di lipidi a catena lunga e l'integrazione di 3OH-butirrato, ha determinato il miglioramento del pattern biochimico confermando la compromissione della via della beta-ossidazione. Questo caso dimostra che, in caso di alterazioni biochimiche suggestive di compromissione del metabolismo di Rf, anche in assenza di un difetto genetico diretto, ulteriori analisi sull'omeostasi di Rf possono rivelare alterazioni secondarie e possibilmente trattabili.