



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL' AMBIENTE
Corso di laurea in Scienze Biologiche

Iperplasia surrenalica congenita o sindrome adreno-genitale (SAG): effetti delle mutazioni a carico del gene CYP21A2 nelle forme considerate non classiche o ad insorgenza tardiva.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH): consequences of mutations in the CYP21A2 gene, in non-classical or late-onset forms.

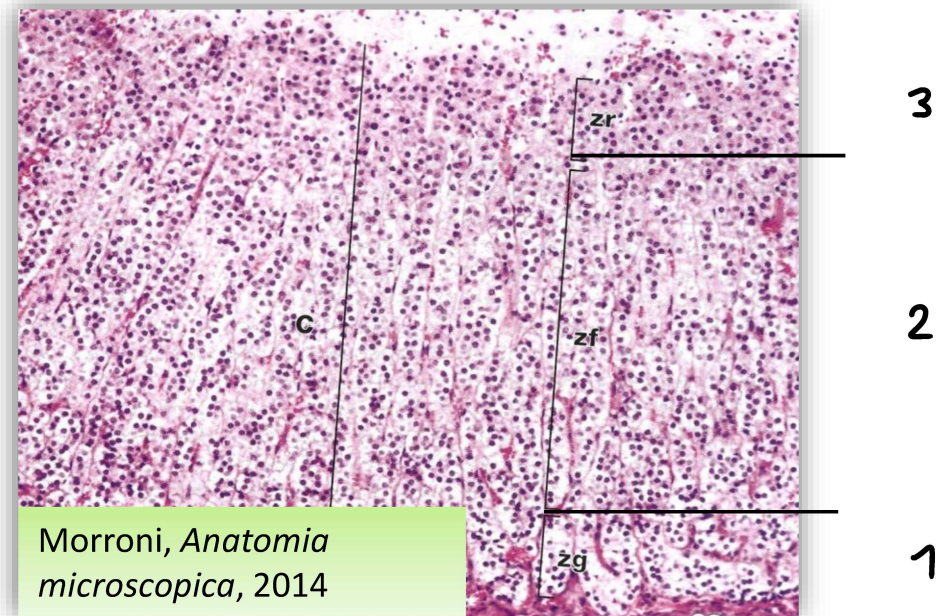
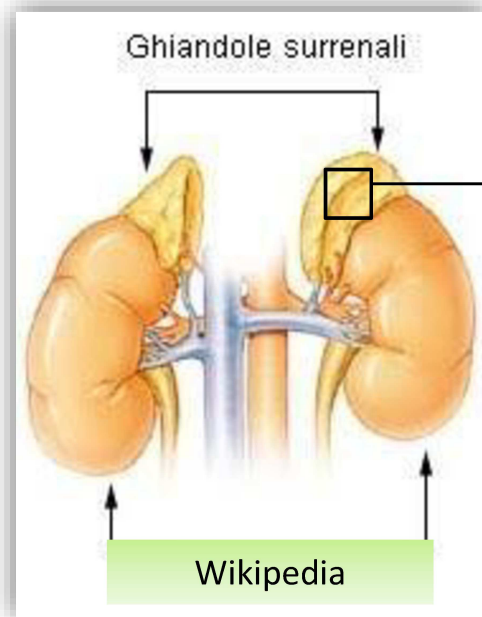
Tesi di laurea di:
Lotti Alice

Sessione estiva
Anno Accademico 2022/2023

Docente referente:
Prof.ssa Anna La Teana

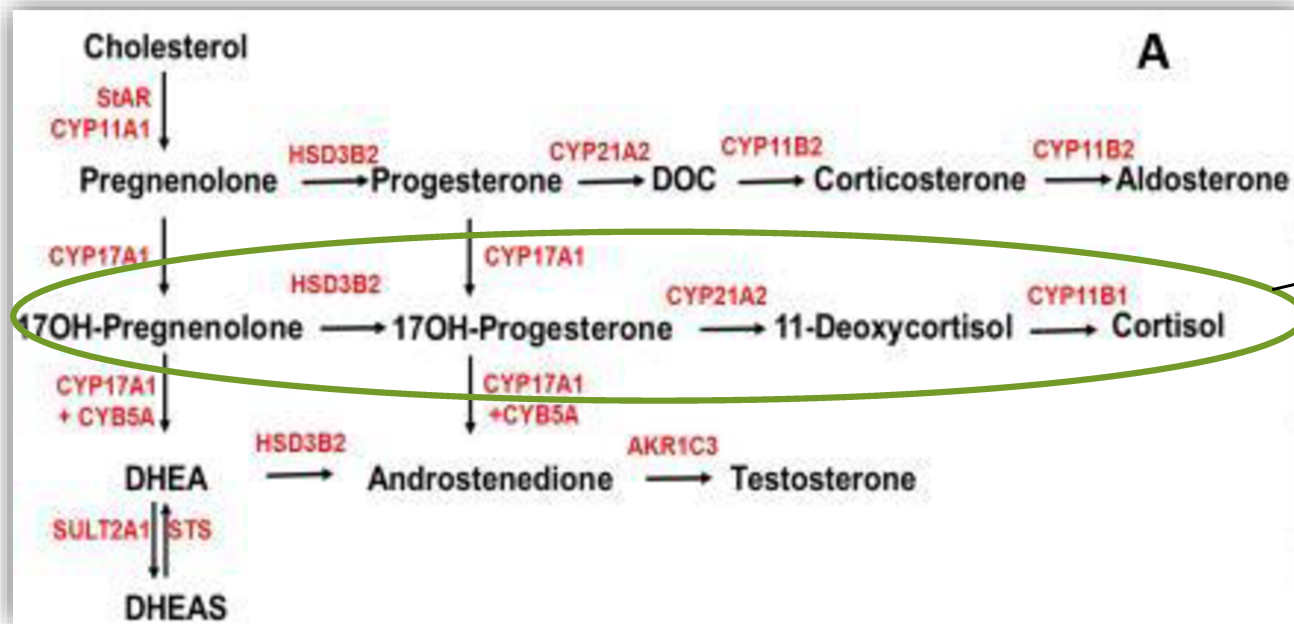
INTRODUZIONE:

- **Anatomia del surrene:** ghiandola endocrina pari localizzata sul polo superiore di ciascun rene.
 - **corticale:** secerne corticosteroidi;
 - **midollare:** secerne catecolamine (adrenalina e noradrenalina).
- **Corticale del surrene:** si possono distinguere in essa tre zone:
- 1 **ZONA GLOMERULARE**= sintesi di *mineralcorticoidi* → regolazione della concentrazione degli elettroliti;
 - 2 **ZONA FASCICOLATA**= sintesi di *glucocorticoidi* → stimolazione del metabolismo lipidico e proteico, regolazione della glicemia e repressione della risposta immunitaria;
 - 3 **ZONA RETICOLARE**= sintesi di *gonadocorticoidi*.



STEROIDOGENESI, BIOSINTESI DEL CORTISOLO:

Processo dinamico che a partire dal COLESTEROLO porta alla formazione di steroidi differenti. In particolare, nella zona fascicolata sarà convertito in CORTISOLO.

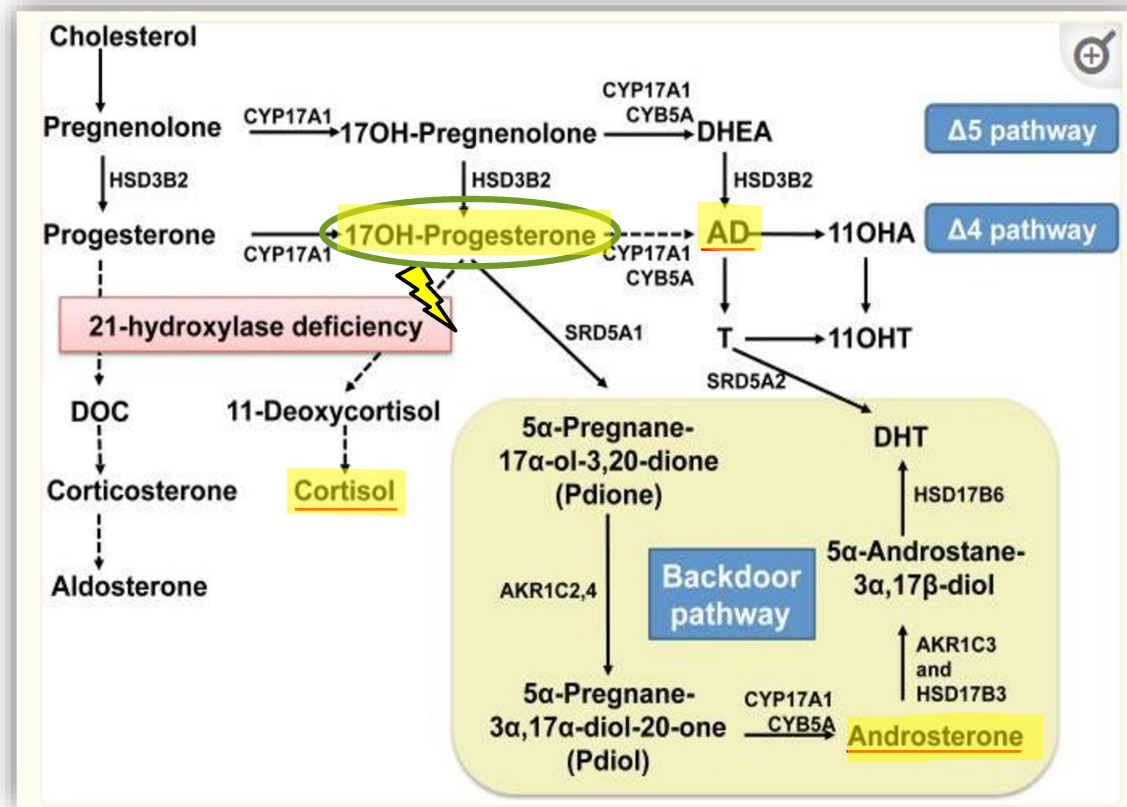


- 1) CYP17A1: si ottengono 17-OH-pregnenolone e 17-OH-progesterone;
- 2) HSD3B2 converte parte del 17-OH-pregnenolone in 17-OH-progesterone;
- 3) CYP21A2 trasforma il 17-OH-progesterone in 11-deossicortisolo;
- 4) CYP11B1 completa la trasformazione dell'11-deossicortisolo in cortisolo.

Turcu and Auchus, *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 2015

IPERPLASIA SURRENALICA CONGENITA:

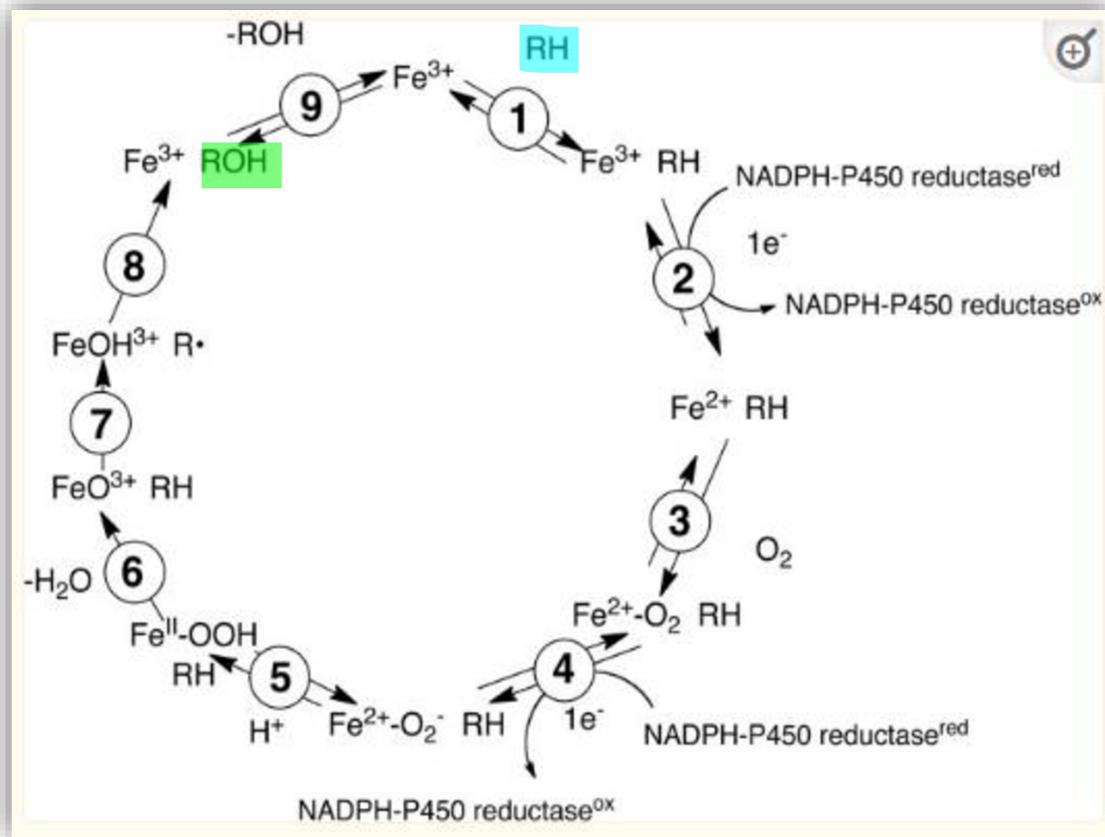
- **Generalità:** malattia autosomica recessiva, che fa parte di un gruppo di problemi enzimatici ereditari nella biosintesi del cortisolo. E' causata da una mutazione a livello del gene CYP21A2 (6p21.3).
- **Frequenza:** 1 bambino affetto su 15000-16000 nati vivi nel mondo.
- **Alterazione della biosintesi del cortisolo:**



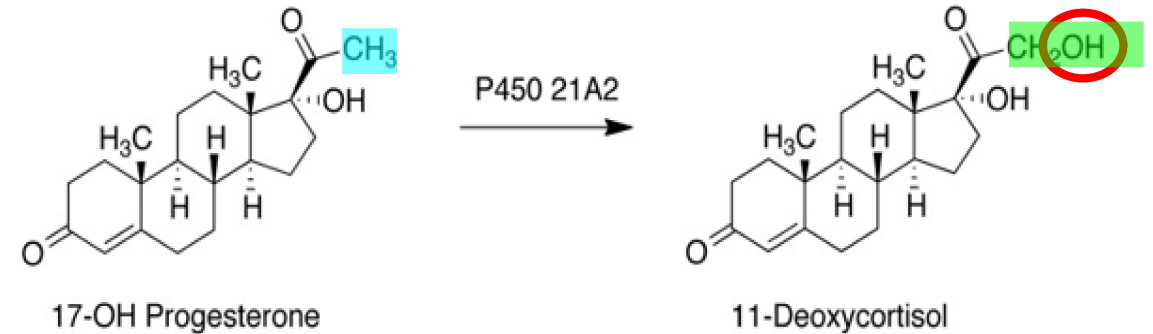
Turcu and Auchus, *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 2015

- Catalisi ciclica dell'enzima 21-idrossilasi (CYP21A2):

L'enzima funziona grazie alla presenza di un **gruppo eme** nel suo sito attivo:



1-2) $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, acquistando un elettrone dalla NADPH-P450 reductasi;
 3-4-5-6-7) in queste reazioni interviene un atomo di O, fondamentale per la formazione del gruppo ossidrilico;
 8-9) idrossilazione e liberazione di 11-deossicortisolo.

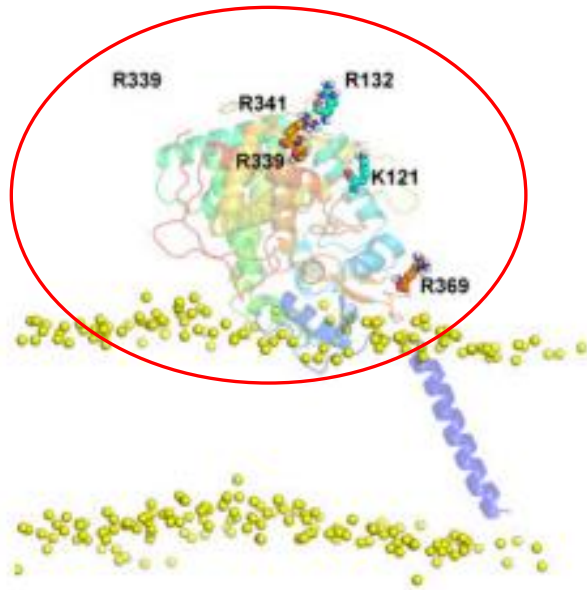


Pallan et al., *J Biol Chem.*, 2015

PRINCIPALI MUTAZIONI DEL GENE CYP21A2, CAUSANTI LA MALATTIA IN FORMA NON CLASSICA:

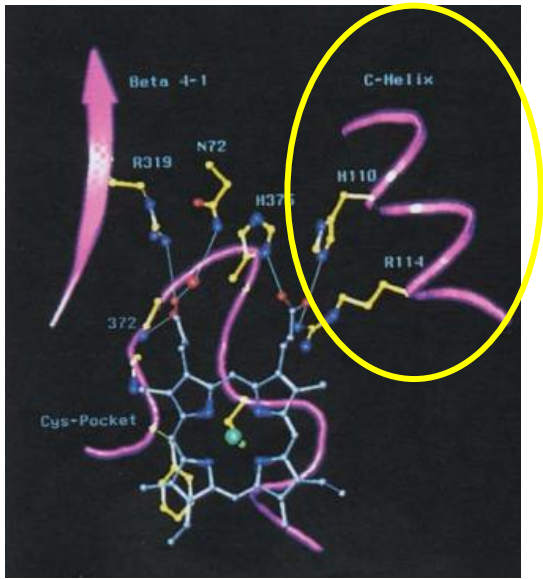
Ciò che determina il manifestarsi di una forma non classica è la capacità dei restanti amminoacidi di mantenere il **20-60% della funzionalità enzimatica**, compensando la perdita del giusto residuo.

1) Mutazioni che coinvolgono il sito proteico di interazione con la NADPH-P450 reduttasi:



I **residui basici** che interagiscono col complesso NADPH, quando in forma ossidata, creano un alone di carica positiva per favorire lo scambio di elettroni.

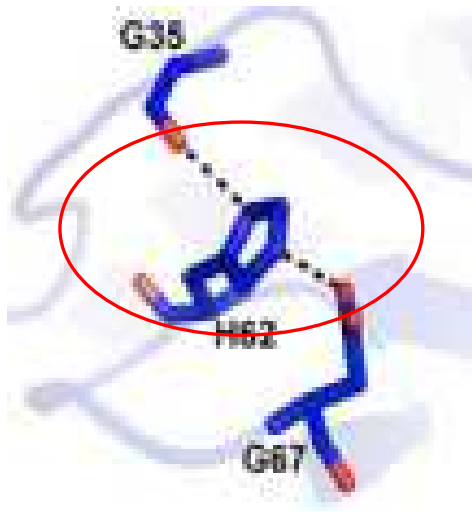
Haider et al., *PNAS*, 2012



Nell'elica C è stata riscontrata una mutazione **H119R**. Trattandosi di una sostituzione tra due amminoacidi basici, l'enzima non perde affinità per il suo substrato.

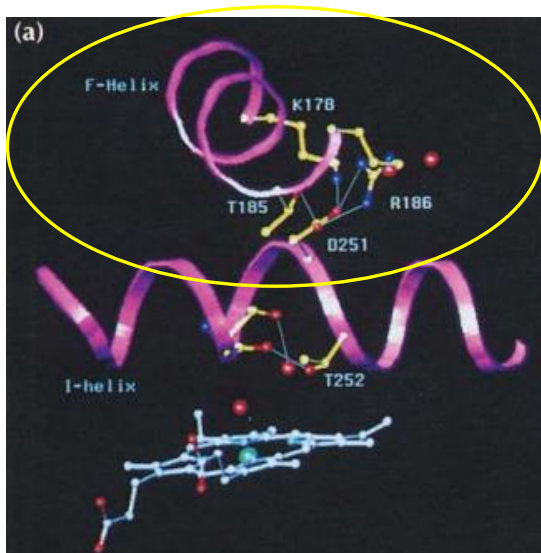
Hasemann et al., *Structure*, 1995

2) Mutazioni che vanno ad alterare la stabilità dell'enzima:



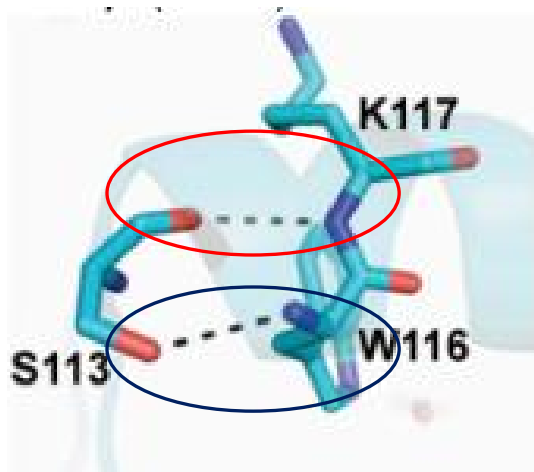
La sostituzione dell'istidina centrale con una leucina idrofobica (**H62L**) ad esempio, porta al crollo dei due legami idrogeno.

Haider et al., *PNAS*, 2012



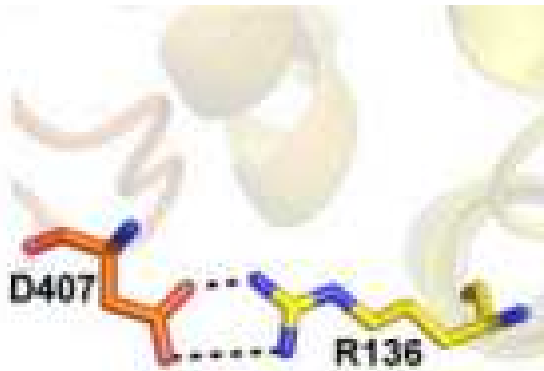
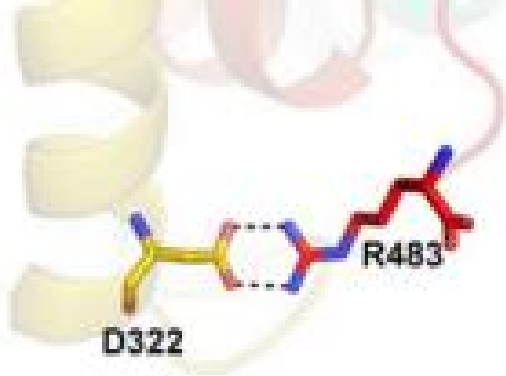
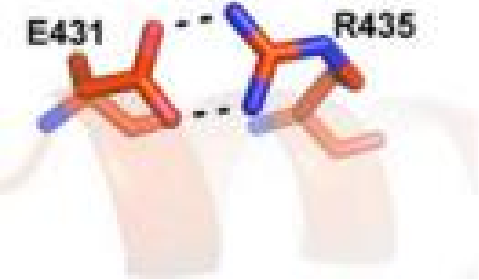
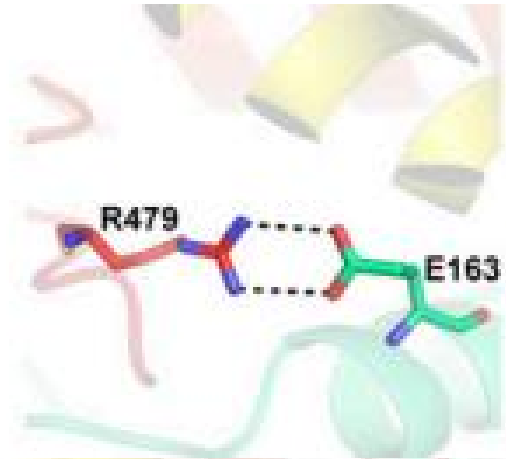
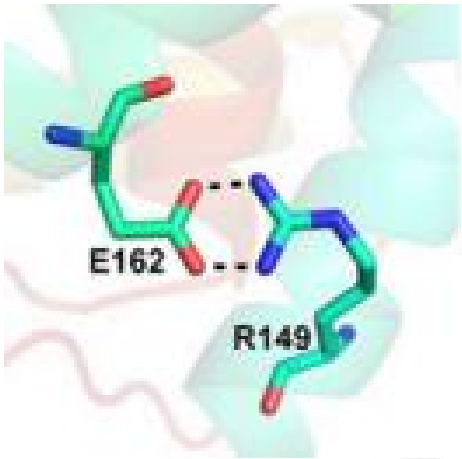
Nell'elica F è stata scoperta una mutazione **I194N** che porta ad una modificazione della struttura della proteina.

Hasemann et al., *Structure*, 1995



Nell'elica C si trova la **S113** che costruisce due legami idrogeno. Mutazioni a carico di questi amminoacidi porterebbero ad un aumento dell'ingombro sterico.

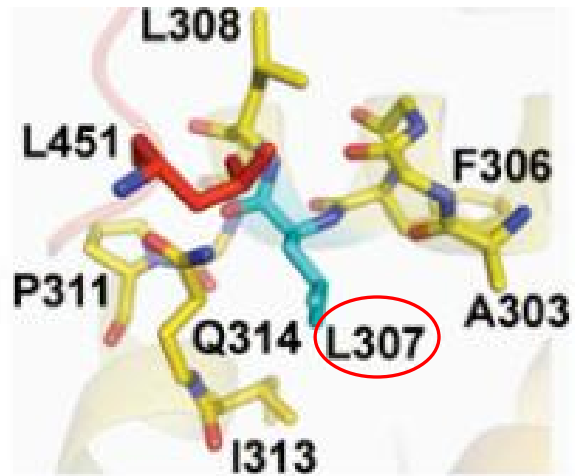
Haider et al., *PNAS*, 2012



Altre tante **interazioni tra catene laterali** vanno a stabilizzare la struttura terziaria dell'enzima, mantenendo il ripiegamento funzionale alla sua attività catalitica.

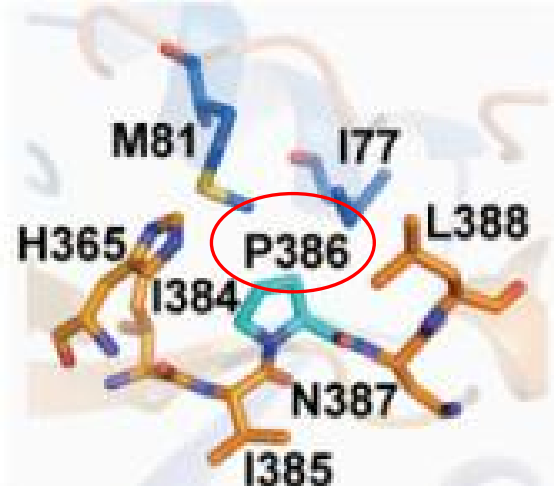
Haider et al., *PNAS*, 2012

3) Mutazioni che causano una perdita di funzionalità dei cluster dell'enzima:



Qualora venga inserito al suo interno un amminoacido con caratteristiche chimico-fisiche opposte o con ingombro sterico maggiore, allora si perderebbe la **funzionalità del cluster** stesso.

Haider et al., *PNAS*, 2012



P386: la sostituzione con un amminoacido dall'ingombro sterico maggiore, diminuirebbe l'efficienza catalitica.

Haider et al., *PNAS*, 2012

DIAGNOSI:

Con indagini neonatali o su soggetti adulti si cerca di individuare la presenza di elevati livelli di 17OH-progesterone tramite prelievo venoso. Eventualmente la conferma è data da analisi genetica.

Non affetti o portatori sani	Forme non classiche	Forme classiche
< 1000 ng/dL	1000-10000 ng/dL	>10000 ng/dL

APPROCCIO TERAPEUTICO:

Forme non classiche	Forma classica SW	Forma classica SV
Glucocorticoidi	Mineralcorticoidi, iniezioni di cloruro di sodio	Chirurgia ricostruttiva oltre alla terapia.

RIASSUNTO:

L'iperplasia surrenalica congenita, anche detta sindrome adreno-genitale, è una malattia autosomica recessiva che fa parte di quella classe di problemi enzimatici relativi ad una produzione non sufficiente di cortisolo a livello delle ghiandole surrenali. La causa scatenante della malattia è una mutazione a carico del gene CYP21A2, codificante per una proteina della famiglia dei citocromi P450, denominata 21-idrossilasi. La malattia può manifestarsi con diversi gradi di severità: dalle forme meno tollerabili, come quelle che causano perdite di sali (SW) o virilizzazione (SV), a quelle più lievi, come le forme denominate non classiche. Ciò che determina il manifestarsi di una forma non classica, piuttosto che di una forma severa, è la capacità dei residui restanti di supplire quello mancante o sostituito da uno con caratteristiche differenti. Diverse mutazioni possono portare ad una forma non classica della malattia, in particolare si possono dividere in tre gruppi: quelle che interessano il sito di interazione con la NADPH-P450 reduttasi; quelle che alterano la stabilità dell'enzima ed infine quelle che modificano l'efficienza dei cluster della proteina. Tuttavia, ciò che i gradi di espressione di questa malattia condividono è il fatto di presentare alla base un difetto nella via biosintetica che interessa e connette tra loro i tre strati del surrene: la steroidogenesi. In particolare viene colpita dalla mutazione una delle sue tre vie biosintetiche: quella che porta alla produzione del cortisolo nella corticale. Siccome la proteina 21-idrossilasi presenta una struttura non completamente funzionante, l'intero processo di steroidogenesi subirà un rallentamento, dovuto all'accumulo di un prodotto intermedio detto 17OH-progesterone. Per tentare di ristabilire l'equilibrio a livello della corticale, questo prodotto viene quindi impiegato in altre vie biosintetiche, conducendo ad una produzione eccessiva di ormoni virilizzanti a livello della midollare del surrene.

BIBLIOGRAFIA:

Articoli consultati:

- «Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia», Turcu and Auchus, *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 2015;
- «Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: STRUCTURE OF THE ENZYME. PROGESTERONE SUBSTRATE COMPLEX AND RATE-LIMITING C-H BOND CLEAVAGE», Pallan et al., *J Biol Chem.*, 2015;
- «Structure–phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia», Haider et al., *PNAS*, 2012;
- «The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders», Miller and Auchus, *Endocr Rev.*, 2010;
- «Two novel CYP21A2 missense mutations in Italian patients with 21-hydroxylase deficiency: Identification and functional characterisation», Concolino et al., *IUBMB*, 2009;
- «Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures», Hasemann et al., *Structure*, 1995;

Libri di testo consultati:

- *Biologia Molecolare*, Amaldi et al., *Casa editrice ambrosiana*;
- *Genetica un approccio molecolare*, Russell, *Pearson*.
- *Principi di biochimica*, Voet et al., *Zanichelli*;
- *Anatomia Umana*, McKinley and O’Loughlin, *Piccin*;
- *Anatomia Microscopica*, Morroni, *E.E.*;