

Allegato 2

APPLICAZIONE DELLA TECNICA MLPA NELLA DIAGNOSI DI IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA: VANTAGGI PER IL MANAGEMENT CLINICO E PER LA CONSULENZA GENETICA DI PAZIENTI E FAMILIARI

INTRODUZIONE: L' IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA

L' Iperplasia Surrenale Congenita (CAH) comprende una famiglia di patologie autosomiche recessive caratterizzate da deficit di cortisolo. Tale deficit causa un aumento di ACTH, per mancanza di feedback negativo, che esita nella sovrastimolazione della corteccia surrenale. Tale deficit è causato da alterazioni a carico di uno dei cinque enzimi coinvolti nella sintesi del cortisolo: 21-idrossilasi (21-OH), 11 β -idrossilasi (11 β -OH), 3 β -idrossisteroide-deidrogenasi (3 β HSD), 17 α -idrossilasi;17-20 liasi (17 α OH,17-20 liasi) e P450 ossidoreduttasi (POR).

Oltre al deficit di cortisolo, un'altra caratteristica clinica che accomuna le forme più gravi di CAH è la presenza di disordini della differenziazione sessuale (DSD) nei soggetti affetti. L'ambiguità genitale è spesso il primo segnale che porta al sospetto di questa patologia; si può manifestare sia nei maschi che nelle femmine a seconda del tipo di deficit e può essere di entità più o meno severa in base alla gravità del deficit. Tale manifestazione fenotipica è dovuta al fatto che tutti questi enzimi coinvolti nella steroidogenesi intervengono anche nella sintesi degli ormoni sessuali surrenalici (e talvolta anche gonadici), responsabili della virilizzazione dei genitali esterni nel feto. Il deficit di 21-OH è responsabile di circa il 90% dei casi di CAH risultandone la causa più frequente, seguito nel 5-8 % dei casi dal deficit di 11 β -OH. Gli altri tre deficit sono sempre stati considerati molto rari, con frequenze attorno all'1% o non stimate. Recenti studi stanno però mettendo in discussione questi dati, si pensa infatti che le loro frequenze possano essere state sottostimate sia a causa del quadro clinico eterogeneo di questi pazienti sia perché lo studio molecolare di questi geni è stato intrapreso solo di recente.

Nel deficit di 21-OH, la frequenza della malattia nella maggior parte della popolazione caucasica è stimata a 1/9.800-16.000 per la forma classica e 1/1000 per la forma lieve (dato sottostimato per il numero elevato di diagnosi mancate in alcune zone). La frequenza dei portatori eterozigoti per la forma classica è stimata a circa 1/55 nella popolazione generale.

Nel deficit di 11 β -idrossilasi invece la frequenza è stimata a 1/100.000-200.000 per la forma classica. Molto più frequente è invece tra i soggetti di origine ebraica-marocchina per i quali l'incidenza è stimata a 1/5.000-1/7.000. Sono ancora sconosciute invece sia la frequenza della forma non classica che dei portatori.

In entrambi questi deficit si distinguono due manifestazioni cliniche in base alla diversa severità del deficit definite forma classica (CL) e forma non classica (NC).

La forma classica di 21-OHD si suddivide a sua volta in una forma con perdita di Sali (SW), in cui la mancanza di aldosterone, porta a crisi surrenalica e in una forma virilizzante semplice (SV). In entrambe, la forte produzione di androgeni surrenalici porta a virilizzazione dei genitali esterni nei feti di sesso femminile (cariotipo 46,XX) e ad una precoce maturazione ossea in entrambi i sessi, con rapido sviluppo dei nuclei epifisari che comporta una rilevante diminuzione della statura definitiva. Molto simili sono le manifestazioni fenotipiche della forma classica di 11 β -OHD in cui però la funzione mineralcorticoide viene svolta dall'accumulo di DOC, un ormone a monte del difetto con attività simili a quelle dell'aldosterone; ciò evita la perdita di Sali, ma in circa 2/3 dei casi può portare a ipertensione arteriosa.

Nella forma NC dei due deficit le caratteristiche cliniche, perlopiù dovute all'eccesso di androgeni, si manifestano più tardivamente e comprendono: precoce comparsa di pelosità pubica, acne, aumentata velocità di crescita, irregolarità mestruali e infertilità.

Anche se i deficit di 21-OH e di 11 β -OH sono molto simili come manifestazioni cliniche, il loro trattamento farmacologico non è del tutto identico. Per intraprendere un piano terapeutico corretto è fondamentale perciò definire innanzitutto il tipo di deficit; all'inquadramento clinico deve pertanto seguire una valutazione completa dei profili ormonali che differiscono nei due deficit.

Nel caso di deficit di 21-OH si ha un aumento dei livelli di 17-OHP sia basale che dopo stimolo con ACTH, proporzionali al grado di deficit enzimatico. Nel deficit di 11 β -OH si ha invece un innalzamento dei livelli, basali e dopo stimolo, di 11-S e di DOC. A volte può essere elevato solo uno dei due valori e si può avere anche un innalzamento del 17-OHP che può fuorviare se non vengono analizzati al contempo anche i livelli degli altri ormoni implicati.

L'indagine molecolare si rivela importante sia per confermare il sospetto deficit e il suo grado di severità in modo da ottimizzare il trattamento terapeutico sia per una corretta consulenza genetica alla famiglia.

GENETICA

Il deficit di 21-OH è causato da alterazioni a carico del gene *CYP21A2* che mappa sul cromosoma 6p21.3 all'interno della regione di classe III del complesso maggiore d'istocompatibilità (MHC). Il gene si trova in un locus a struttura complessa: accanto al gene normale (*CYP21A2*), è presente un pseudogene inattivo (*CYP21P*) con un 98% di omologia rispetto al gene funzionale. Entrambi i geni sono disposti in "tandem repeat" con i geni C4B e C4A all'interno di un modulo ripetuto definito RCCX. Tale modulo è composto da una parte o l'intero gene RP (serina/treonina kinasi), da un

duplicazioni e formazione di geni chimerici deve avvalersi di tecniche alternative che consentano di quantificare le regioni di questi due geni ma in modo specifico, cioè distinguendo ogni gene dal suo corrispettivo omologo (CYP21A2 vs CYP21P e CYP11B1 vs CYP11B2). In particolare è fondamentale riuscire ad individuare geni chimerici, cioè geni formati in parte da un gene e in parte dall'omologo.

Ad oggi la tecnica più semplice, veloce ed economica che consente di ottenere queste informazioni è la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). L'MLPA è infatti una tecnica di analisi molecolare rapida e sensibile, in grado di evidenziare le variazioni del numero di copie (CNVs) di svariati geni. La tecnica si basa su una singola reazione di multiplex-PCR ma a differenza di una multiplex-PCR standard, l'MLPA permette di quantificare, per mezzo di un fluoroforo, il numero di copie di oltre 50 sequenze di DNA con l'utilizzo di una singola coppia di primer valida per tutte le sonde e rendendo così il metodo molto robusto.

Negli ultimi anni sono stati commercializzati svariati kit per MLPA per l'analisi delle più importanti malattie ereditarie tra le quali il deficit di 21-OH.

Il kit dedicato (P050) contiene, oltre a 13 sonde di controllo, 5 sonde specifiche per il gene *CYP21A2* posizionate negli esoni 1, 3, 4, 6 e 8 disegnate nei punti corrispondenti alle mutazioni del promotore, $\Delta 8$, I172N, CL6 e Q318X, rispettivamente. Inoltre sono presenti anche 3 sonde specifiche per lo pseudogene *CYP21A1P*, 3 sonde per *TNXB* (esoni 1, 15 e 32), 1 sonda per *C4A*, 1 per *C4B* e una per il gene *ATF6B* localizzato nella regione q-telomerica di *TNXB*.

Dal 2007 il Laboratorio di Genetica Molecolare dell'U.O. di Pediatria dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna ha iniziato ad utilizzare tale kit, prima in fase di ricerca e poi di diagnostica, per l'individuazione di delezioni/conversioni del gene *CYP21A2* associate a CAH.

Ad oggi tale tecnica è stata impiegata in più di 250 pazienti/famiglie in cui l'analisi mediante sequenziamento poneva il dubbio di presenza di delezione o duplicazione genica ed ha completamente sostituito le precedenti metodiche quali Southern Blot (molto lungo e indaginoso) e amplificazione del gene chimerico (poco specifico e accurato).

Per quanto riguarda invece la diagnosi molecolare del deficit di 11β -OH si è iniziato nel 2006 presso il nostro laboratorio con il sequenziamento diretto di tutto il gene *CYP11B1* per l'identificazione delle mutazioni puntiformi e delle piccole ins/del.

Non esiste attualmente in commercio un kit MLPA per il gene *CYP11B1* pertanto la ricerca di delezioni, che portano alla formazione del gene chimerico *CYP11B2/CYP11B1* sono state finora limitate all'amplificazione del gene chimerico che però, come dicevamo prima, presenta limiti di affidabilità. Nel corso del 2013 si è pertanto svolto un progetto di ricerca allo scopo di creare un kit

intero gene C4, da un intero gene CYP21, e da parte o l'intero gene TNX (tenascina). Questo modulo viene ripetuto come un'unità genetica discreta e nella popolazione caucasica è solitamente presente nelle forme monomodulare, bimodulare o trimodulare. La forma bimodulare è la più frequente (69% degli alleli).

Per via della sua localizzazione all'interno del complesso MHC, regione nota per l'elevata frequenza di eventi di ricombinazione, fenomeni di microconversioni o di apparenti conversioni geniche portano al trasferimento di materiale genetico dallo pseudogene inattivo al gene funzionale e ciò rappresenta la causa determinante per 9 delle più comuni mutazioni. Oltre a queste altre 90 rare mutazioni pseudogene-indipendenti sono state ad oggi riportate. Inoltre questi fenomeni di ricombinazione portano ad eventi di delezione e duplicazione di alcune regioni dei moduli RCCX alcune delle quali risultano patologiche e altre no ma possono interferire in modo significativo con una corretta diagnosi molecolare.

Un particolare tipo di ricombinazione, causato da un evento di crossing-over ineguale tra TNXA e TNXB ad esempio, non solo elimina il gene CYP21A2 che si trova interposto, ma produce un gene chimerico non funzionale TNXA/TNXB. Pertanto in questa situazione non solo viene a mancare l'intero gene CYP21A2 ma si forma un gene TNX non funzionante. Questa sindrome da geni contigui è stata descritta per la prima volta nel 2003 e risulta in un deficit combinato di 21-OH e disordini dei tessuti connettivi come ipermobilità di pelle e articolazioni, fragilità vascolare e lenta guarigione dalle ferite. Le caratteristiche del tessuto connettivo riportate sono tipiche della sindrome di Ehlers-Danlos (EDS).

Il deficit di 11 β -OH è invece causato da mutazioni del gene *CYP11B1* localizzato sul cromosoma 8q21-q22. Anch'esso possiede un gene omologo al 95%, il gene *CYP11B2* codificante l'enzima aldosterone sintasi localizzato nella stessa regione cromosomica a 45 kb di distanza.

Sono state descritte ad oggi più di 90 mutazioni a carico del gene *CYP11B1* e a differenza del gene *CYP21A2* non ci sono mutazioni ricorrenti. Anche in questo caso, l'alta omologia di sequenza con il gene *CYP11B2* porta a fenomeni di misallineamento che causano formazione di geni chimerici con alterazione dell'attività dell'enzima prodotto.

MLPA: STATO DELL'ARTE

La diagnosi molecolare di 21-OHD e di 11 β -OHD viene eseguita mediante sequenziamento diretto dei due geni responsabili per l'identificazione delle mutazioni puntiformi e delle piccole delezioni e duplicazioni. L'identificazione invece dei riarrangiamenti più complessi che portano a delezioni,

home-made per l'analisi MLPA di questo gene. Sono state progettate 8 sonde altamente specifiche, 2 per il gene CYP11B2 posizionate sugli esoni 2 e 8, e 6 per il gene CYP11B1 posizionate sugli esoni 1, 3, 4, 5, 6 e 9. I primi risultati ottenuti sono stati molto soddisfacenti: le sonde sono tutte ben distinguibili e con buon segnale ed il dato è altamente ripetibile.

SCOPO DEL PROGETTO

Questo progetto si propone di approfondire l'uso e le conoscenze relative all'utilizzo della tecnica MLPA nella diagnosi di CAH sia da 21-OHD che da 11 β -OHD.

- Il primo obiettivo riguarda la valutazione/ricerca sia genetica che clinica della presenza di sindrome Ehlers Danlos in pazienti con 21-OHD. Da recenti pubblicazioni è infatti emerso che l'aploinsufficienza di TNXB, associata a deficit di 21-OH è stata osservata nel 7% dei pazienti con 21-OHD. Tali pazienti mostravano una ipermobilità dei giunti con presenza o meno di dolori cronici articolari, reumatismi, lussazioni, piedi piatti e papule piezogeniche; inoltre presentano un aumentato rischio cardiovascolare. Questa sindrome, deficitica "da geni contigui", è causata dal fatto che la delezione che affligge il gene CYP21A2 si estende anche al gene contiguo TNXB. A tale scopo si vuole approfondire l'indagine molecolare in tutti i pazienti con delezione totale del gene CYP21A2 (dimostrata con kit MLPA P050) mediante l'utilizzo di un altro kit MLPA, P155, maggiormente specifico per il gene TNXB. Tale kit contiene infatti 17 sonde per il gene TNXB oltre ad altre 17 sonde per il gene COL3A1 anch'esso implicato nella stessa sindrome (EDS). Si ritiene infatti che le 3 sonde per il gene TNXB già presenti nel kit P050 (sugli esoni 1, 15 e 32) utilizzato normalmente per i casi di 21-OHD non siano sufficienti a vedere le delezioni contigue in quanto il gene TNXB consta di 44 esoni ed è proprio la parte terminale ad essere attigua al gene CYP21A2. Questo approfondimento diagnostico permetterà di inquadrare meglio il paziente dal punto di vista clinico e terapeutico. Si intende inoltre promuovere uno o più incontri di approfondimento con gli endocrinologi sia pediatri che dell'adulto per informare e formare alla valutazione di questa sindrome da geni contigui i cui sintomi sono quasi sempre o non riferiti dal paziente o non chiesti/valutati dal medico nella fase di inquadramento diagnostico in quanto non prettamente di carattere endocrinologico.
- Il secondo obiettivo è il raggruppamento e il confronto dei dati ottenuti mediante MLPA con kit P050 per riuscire a identificare le varianti dei moduli RCCX presenti nella nostra popolazione. Tale obiettivo avrà diversi scopi secondari quali: la catalogazione dei diversi tipi di delezioni/conversioni ma soprattutto duplicazioni geniche (non ancora caratterizzate

nelle popolazioni caucasiche), la verifica della frequenza delle varianti dei geni C4 (C4A o C4B) del complemento associate a minor o maggior predisposizione alle infezioni virali o batteriche, la definizione della correlazione di particolari assetti dei moduli con particolari aplotipi ad es. per gli alleli con mutazione V281L o Q318X. Tutti questi dati avranno lo scopo di portare a una migliore e più rapida interpretazione dei dati ottenuti sia dal sequenziamento che dall'MLPA, contribuendo a ridurre la percentuale di errore o incertezza nelle diagnosi più complesse.

- Il terzo obiettivo riguarda l'implementazione della diagnosi molecolare di 11 β -OHD. Si intende infatti standardizzare al meglio il kit home-made per un corretto utilizzo in fase diagnostica. A tale scopo bisogna creare un pool di controlli idonei e un protocollo di esecuzione standard. Inoltre, non essendo un kit commerciale non è possibile analizzare i dati grezzi con il software Coffalyser dedicato all'analisi MLPA. E' necessario perciò creare un foglio di calcolo Excel apposito. Una volta validato il metodo si progetta poi di proporlo alla ditta MRC-Holland per la valutazione di una possibile commercializzazione.