

# **IMPLEMENTAZIONE DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA: MESSA A PUNTO DELL'ANALISI DEGLI ALTRI GENI COINVOLTI NELLA STEROIDOGENESI SURRENALICA**

## **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 $\beta$ -idrossilasi (11 $\beta$ -OH), 3 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi (3 $\beta$ HSD), 17 $\alpha$ -idrossilasi;17-20 liasi (17 $\alpha$ OH,17-20 liasi) e P450 ossidoreduttasi (POR).

Le manifestazioni cliniche della CAH includono insufficienza surrenalica, ambiguità genitale, bassa statura e un aumentato rischio di sindrome metabolica e infertilità durante l'adolescenza o l'età adulta.

Ogni diversa forma di CAH è caratterizzata da uno specifico pattern ormonale che rispecchia le conseguenze dello specifico blocco nella steroidogenesi. L'ambiguità genitale si manifesta nei neonati 46, XX nei deficit di 21-idrossilasi e 11-idrossilasi, nei neonati 46, XY nel caso di deficit di 17 $\alpha$ -idrossilasi e di 3 $\beta$ -idrossisteroide-deidrogenasi. Il deficit di POR è l'unica a causare ambiguità genitale sia negli XX che negli XY e inoltre può causare anche malformazioni scheletriche.

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 $\beta$ -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.

Attualmente presso il Laboratorio di Genetica Molecolare afferente al programma di Endocrinologia pediatrica della Prof.ssa Mazzanti sono disponibili le indagini sui geni CYP21A2 e CYP11B1 sia mediante sequenziamento, per la ricerca di mutazioni puntiformi, sia mediante MLPA per la ricerca di delezioni e riarrangiamenti.

## **CAH causata da deficit di 17 $\alpha$ -idrossilasi-17,20 liasi (CYP17A1)**

Questo enzima è l'unico, tra gli enzimi steroidogenici, ad avere due diverse attività: 17 $\alpha$ -idrossilasi e 17,20 liasi. Per tale motivo il suo deficit risulta in una diminuzione sia di glucocorticoidi che di steroidi sessuali. L'eccesso di precursori dei mineralcorticoidi causa da un lato una severa

ipertensione, dall'altro, esercitando una debole azione glucocorticoide, spesso è in grado di evitare le crisi surrenaliche. Il difetto di ormoni sessuali si manifesta nei soggetti 46, XY con sottovirilizzazione nei neonati, nelle femmine 46, XX invece causa amenorrea primaria. In entrambe i sessi si ha il mancato sviluppo puberale dovuto all'ipogonadismo ipergonadotropo. Seppur molto più raro, è possibile anche il deficit isolato di 17,20 liasi che risulta nel solo deficit di ormoni sessuali.

Il gene CYP17A1, localizzato nel cromosoma 10, è formato da 8 esoni che codificano per una proteina di 508 aminoacidi. Ad oggi sono note più di 100 mutazioni (includendo missenso, splicing, regolatorie e piccole inserzioni e delezioni).

### **CAH causata da deficit di 3-beta-idrossisteroide-deidrogenasi di tipo 2 (HSD3B2)**

Questo enzima è coinvolto in tutte e tre le vie di sintesi surrenalica: mineralcorticoidi, glucocorticoidi e ormoni sessuali. Per questo i pazienti con questo tipo di deficit mostrano diminuiti livelli di  $\Delta 4$  progesterone, 17OHP e androstenedione unitamente all'accumulo dei loro precursori ( $\Delta 5$  pregnenolone, 17-OHpregnenolone e DHEA).

Lo spettro fenotipico è molto ampio, spazia da forme con severa perdita di Sali a forme senza perdita di Sali, con o senza ambiguità genitale nei neonati maschi, pubarca prematuro isolato in neonati o bambini di entrambi i sessi, fino a una variante ad esordio tardivo che si manifesta con irsutismo e irregolarità mestruali.

Il gene HSD3B2, formato da 4 esoni di cui solo 3 codificanti, si trova sul cromosoma 1 adiacente al suo omologo HSD3B1. Mentre il primo si esprime nel surrene e nelle gonadi, il secondo è espresso nella placenta e in molti tessuti periferici.

La correlazione genotipo-fenotipo non è molto buona; le mutazioni più gravi causano la forma con perdita di Sali mentre le parzialmente inattivanti mantengono un minimo di produzione di aldosterone. Non vi è però correlazione con il grado di sottovirilizzazione.

### **CAH causata da deficit di P450 ossidoreduttasi (POR)**

Questo enzima funge da donatore di elettroni per diversi altri enzimi tra cui CYP17A1 e CYP21A2, per questo motivo il suo deficit si manifesta come deficit combinato di CYP17A1 e CYP21A2. Il difetto molecolare a carico del gene POR è stato dimostrato solo nel 2004 pertanto non se ne conosce ancora bene la frequenza, ma il numero di casi già riportato in questi anni fa supporre che sia frequente almeno quanto il deficit di CYP11B1.

A differenza dalle altre forme di CAH, il deficit di questo cofattore può causare ambiguità genitale sia nei maschi che nelle femmine. Le femmine affette possono presentare una virilizzazione anche di

grado elevato dei genitali esterni; la virilizzazione però non progredisce dopo la nascita. I maschi presentano invece sottovirilizzazione che può andare dal solo micropene ad una severa ipospadia perineoscrotale. I livelli di androgeni postnatali si mantengono bassi o ai limiti inferiori di normalità.

In alcuni pazienti si associano anche anomalie scheletriche, prevalentemente malformazioni cranio facciali, molto simili a quelle presenti nella sindrome di Antley-Bixler.

Il gene POR è localizzato nel cromosoma 7 ed è formato da 15 esoni.

## **SCOPO DEL PROGETTO**

Da quanto brevemente citato sopra si evince che la cause minori di CAH sono ancora poco conosciute e studiate. Pertanto è difficile dire se sono veramente così poco frequenti o se, l'eterogeneità fenotipica e l'impossibilità di condurre analisi ormonali e genetiche mirate, abbiano in qualche modo portato ad una sottostima della situazione.

Attualmente, in Italia, non è disponibile un centro in grado di analizzare i geni implicati nelle forme più rare di Iperplasia Surrenale Congenita. Lo scopo di tale progetto è pertanto quello di poter offrire ai pazienti un centro in cui poter ottenere una diagnosi molecolare per qualsiasi forma di CAH. Si intende pertanto mettere a punto l'indagine molecolare dei geni HSD3B2, CYP17A1 e POR. L'obiettivo finale sarà di poter inserire tali indagine tra le prestazioni diagnostiche disponibili nel nostro centro completando così il pannello diagnostico per l'Iperplasia Surrenale Congenita.

La conferma molecolare di queste forme più rare consentirà non solo di approfondire le conoscenze attuali sia dei fenotipi dei pazienti che delle frequenze nella nostra popolazione ma soprattutto di migliorare l'inquadramento e il piano terapeutico del paziente nonché la consulenza genetica per gli altri familiari.

Dal punto di vista pratico, per ognuno dei 3 nuovi geni da studiare si procederà attraverso i seguenti step:

- Attenta analisi della letteratura al fine di evidenziare eventuali hot-spot mutazionali, punti critici per l'indagine, geni omologhi che possano complicare l'indagine
- Progettazione dei primer specifici per amplificare le diverse regioni codificanti e i relativi siti di splicing
- Messa a punto delle reazioni di amplificazione e sequenza con verifica della specificità
- Analisi di un gruppo di DNA di controllo per verificare la presenza/frequenza di polimorfismi nella nostra popolazione
- Stesura di un protocollo di analisi applicabile in fase diagnostica