

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

## **INTRODUZIONE E SCOPO**

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).

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; la mancanza di centri che si occupino della conferma molecolare di queste forme rare ha limitato la possibilità di identificarle e di definirne una precisa frequenza.

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 mettendo a punto l'indagine molecolare dei geni HSD3B2, CYP17A1 e POR. L'obiettivo finale è di inserire tali indagini 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.

## **RISULTATI**

### **HSD3B2**

#### Revisione letteratura

Nell'uomo sono presenti due isoforme dell'enzima, 3 $\beta$ HSD1 e 3 $\beta$ HSD2, codificate da due geni con alta omologia di sequenza (HSD3B1 e HSD3B2) entrambi localizzati sul cromosoma 1. L'isoforma di tipo 1 è essenziale per la produzione di progesterone da parte della placenta in gravidanza. Non sono mai state descritte mutazioni (probabilmente causa di aborti spontanei) a carico del gene HSD3B1.

L'isoforma di tipo 2 è invece espressa nel surrene e nelle gonadi e un suo deficit è causa di una rara forma di CAH che può portare a morte se non correttamente diagnosticata nel bambino. Nelle forme classiche causa perdita di sali in entrambi i sessi e si può presentare nei 46,XY con severa ipospadia e micropene e nei 46,XX genitali femminili normali o lievemente virilizzati a causa dell'azione dell'isoforma di tipo 1 periferica. Questa attività periferica è responsabile anche della difficile interpretazione dei dati ormonali in questi pazienti e quindi della difficoltà di diagnosi. Spesso infatti si rileva in questi pazienti un innalzamento dei livelli di 17OHP (17, idrossiprogestosterone), con positività alla screening neonatale, se eseguito, che li fa confondere con dei difetti di 21-OH. Recenti studi dimostrano come solo il dosaggio del 17-OHPregnenolone (17-OHPreg) dopo stimolo con ACTH e il suo rapporto con il cortisolo siano indicativi per fare diagnosi di deficit di 3 $\beta$ HSD2. Valori innalzati di DHEA non sono così significativi.

I casi più lievi possono manifestarsi solo con acne, pubarca prematuro e accelerazione della crescita nei bambini o con irsutismo, irregolarità mestruali e ovaio policistico nelle giovani donne.

Non si conoscono dati di frequenza nella popolazione; spesso sono riportati casi clinici senza però la conferma genetica della patologia. Sono descritte in letteratura più di 50 mutazioni puntiformi. La

correlazione genotipo-fenotipo è abbastanza buona per quanto riguarda il deficit di mineralcorticoidi e quindi la perdita di sali; al contrario sembra non sussistere correlazione tra gravità delle mutazioni e grado di sottovirilizzazione dei genitali.

### Genetica e messa a punto metodica

Il gene di interesse da analizzare è il gene HSD3B2 localizzato in 1p13.1 vicino all'altamente omologo HSD3B1; è formato da quattro esoni, di cui il primo non codificante. Si è progettata un'analisi mediante sequenzialmente diretto dei prodotti di PCR, resi specifici mediante l'utilizzo di 4 coppie di primer selettivi per il gene HSD3B2.

La metodica è stata testata su 5 controlli sani, evidenziando alcuni SNP ricorrenti.

Non essendoci al momento descritte alterazioni quali grosse delezioni, duplicazioni o riarrangiamenti non si è ritenuto essenziale pensare ad una metodica specifica per tale scopo. Tuttavia si è verificato che non è presente un kit commerciale per MLPA che includa tale gene; nel caso sarebbe necessario quindi disegnare delle sonde home-made come precedentemente fatto per il gene CYP11B1.

### Casi analizzati

Sono stati indagati 8 casi sospetti che presentavano innalzamento dei valori di DHEA all'ACTH test. Attualmente non è ancora disponibile il dosaggio ormonale del 17-OHPregnenolone, che fornirebbe indicazioni più precise su questi pazienti-

In un caso sono state identificate due mutazioni, una nell'esone 3 che causa la sostituzione AAT>AGT che esita nella mutazione N100S descritta in letteratura da Mebarki (JCEM 1995) associata a 46, XY DSD. La seconda mutazione, non descritta in letteratura, si trova nell'esone 4 ed è causata dalla delezione di una Guanina a livello dell'aminoacido 241 che causa uno slittamento del modulo di lettura con formazione di un codone di stop prematuro a livello dell'aminoacido 271. Ne risulta un proteina tronca che verosimilmente viene degradata prematuramente, pertanto la mutazione è da ritenersi nulla.

L'analisi dei genitori ha mostrato che la N100S è di origine paterna e la D241fsX di origine materna, pertanto il paziente è eterozigote composto per tali mutazioni.

Il paziente era risultato positivo a screening neonatale per CAH, presentava alla nascita ipospadia peno-scrotale e scroto bipartito e iperpigmentato. Successivi approfondimenti avevano evidenziato anche iperplasia surrenale.

L'indagine molecolare è stata estesa anche ad altri membri della famiglia: lo zio e la zia paterni sono risultati entrambi portatori della mutazione N100S, mentre la zia materna è portatrice della mutazione D241fsX. Anche la partner dello zio paterno è stata sottoposta all'indagine molecolare dell'intero gene HSD3B2 risultando normale.

Negli altri casi analizzati sono state individuate alterazioni nel gene HSD3B2.

## **CYP17A1**

### Revisione letteratura

L'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi è l'unico tra gli enzimi steroidei a catalizzare due diverse reazioni, la 17 $\alpha$ -idrossilazione del pregnenolone e del progesterone e la reazione di 17,20 liasi che converte il 17-OHPreg in DHEA e in misura minore il 17-OHP in androstenedione, di conseguenza un suo deficit può causare sia un difetto di glucorticoidi che di ormoni sessuali. Per contro, l'accumulo di mineralcorticoidi e dei suoi precursori, che ne deriva, da un lato causa ipertensione ed ipokaliemia, dall'altro, avendo alcuni lieve attività glucocorticoide, prevengono l'insorgenza di crisi surrenaliche. Il deficit di ormoni sessuali esita in ipogonadismo ipergonadotropo in entrambi i sessi, mancata virilizzazione anche molto grave nei 46,XY e amenorrea primaria nei 46, XX. Viene generalmente riportata una frequenza attorno all'1% rispetto a tutte le cause di CAH. In realtà la frequenza può essere molto diversa in alcune popolazioni come il Canada, Giappone, Est Asia o Brasile dove è addirittura la seconda causa di CAH con mutazioni ricorrenti.

Mutazioni nel gene CYP17A1 possono risultare anche nel deficit isolato di 17-20 liasi, affliggere cioè soltanto una delle due attività di questo enzima. I pazienti affetti da deficit isolato di 17-20 liasi presentano pertanto un fenotipo determinato dal solo deficit di Testosterone (di severità variabile) senza alcuna compromissione della funzionalità surrenalica. L'attività 17-20 liasi è regolata dalla disponibilità di elettroni che dipende essenzialmente da tre fattori: POR, citocromo b5 e fosforilazione di residui di Ser/Thr. Di conseguenza, è stato osservato che, anche l'alterazioni di uno di questi tre fattori causa un fenotipo identico a quello del deficit di attività 17-20 liasica.

#### Genetica e messa a punto metodica d'indagine

Il gene CYP17A1 è localizzato in 10q24.3 ed composto da 8 esoni. Codifica per un'unica proteina con due diversi domini funzionali per le due attività 17 $\alpha$ -OH e 17,20 liasi.

Sono descritte in letteratura più di 100 mutazioni tra puntiformi e piccole delezioni o inserzioni e 1 solo grosso riarrangiamento. Circa un decimo delle mutazioni sono responsabili solo del deficit di 17,20 liasi.

Per l'analisi mutazionale è stata messa a punto l'indagine tramite PCR e sequenziamento diretto degli 8 esoni. Per la valutazione di grosse delezioni e riarrangiamenti si è utilizzato invece il kit MLPA commerciale P334 Gonadal che include una sonda specifica per ogni esone del gene.

#### Casi analizzati

Sono stati selezionati per l'analisi del gene CYP17A1 10 pazienti- 6 soggetti erano 46, XY con genitali esterni completamente femminilizzati e classificati come CAIS (Complete Androgen Insensitivity Syndrome) negativi per mutazione del gene AR- 2 soggetti erano 46, XY con genitali esterni ipovirilizzati già negativi all'indagine dei principali geni coinvolti nel fenotipo. Infine 2 pazienti presentavano difetti di sintesi surrenalica verosimilmente compatibili con questo deficit.

Sono state identificate due mutazioni in uno dei casi arrivati come simil-CAIS: 46, XY DSD di 39 anni a cui erano state asportate le gonadi a 30 anni, l'indagine istologica del materiale gonadico ha evidenziato la presenza di tubuli immaturi e di un carcinoma in situ. In questa paziente, oltre all'indagine del gene AR, erano già stati indagati altri geni: SRY, NR5A1, DHH, MAMLD1 e WT1(EX8-9). Inoltre erano state escluse delezioni nei principali geni coinvolti nei casi DSD mediante i due kit MLPA per Intersex e Disgenesia Gonadica.

Le due mutazioni individuate si trovano entrambe nel sesto esone. Una è causata dalla sostituzione CGT>TGT che esita nella mutazione nota missenso R347C; la seconda è l'inserzione di una citosina, c.1117\_1118insC, che causa uno slittamento del modulo di lettura con la creazione di uno stop codon prematuro a livello dell'aminoacido 378 esitando in una proteina tronca con 130 aminoacidi in meno.

Due casi del tutto sovrapponibili al nostro erano stati descritti in [Van Den Akker et al. JCEM 2002](#) : si trattava di due pazienti 46, XY entrambe mis-diagnosticate come CAIS e che presentavano pressione arteriosa ai limiti superiori della norma- Le pazienti descritte presentavano entrambe la mutazione R347C e una mutazione nulla, del tutto paragonabile alla nostra, sull'altro allele. L'attività residua della mutazione R347C è stata studiata in vitro: presentava il 13.6% di attività 17 alfa idrossilasi e meno dell'1% di attività 17,20 liasica, risultando pertanto associata ad un deficit combinato parziale di 17,20liasi e 17 alfa idrossilasi.

La successiva rivalutazione della nostra paziente, alla luce della diagnosi genetica fatta, ha confermato un'ipertensione arteriosa ai limiti superiori della normalità, una insufficienza surrenalica non troppo evidente, vista la percentuale di attività residua della mutazione. Il fenotipo completamente femminile dei genitali esterni è la conferma della completa assenza di attività 17,20 liasica data dalle due mutazioni.

Negli altri casi analizzati non sono state riscontrate mutazioni.

#### **POR**

#### Revisione letteratura

Il deficit di P450 ossidoreduttasi (ORD) si manifesta biochimicamente come un deficit apparente combinato di 21-OH e 17 $\alpha$ -idrossilasi;17,20-liasi in quanto questo cofattore serve da donatore di elettroni sia per CYP21A2 che per CYP17A1 oltre a svariati altri enzimi.

Le prime mutazioni sono state identificate solo nel 2004, la frequenza è ancora dubbia ma il numero di mutazioni già riportate fa supporre che sia simile a quella del deficit di 11-OH.

Diversamente alle altre forme di CAH può causare severa ambiguità genitale sia negli XY che negli XX. Nei 46, XY DSD il fenotipo, con severità molto variabile tra caso e caso, può andare da un micropene borderline a una severa ipospadia perineo scrotale; nei 46,XX DSD l'ambiguità dei genitali esterni può essere molto significativa (grado Prader III-V).

La seconda caratteristica importante è che spesso, ma non sempre, questi pazienti possono anche presentare malformazioni scheletriche, soprattutto cranio-facciali, molto simili a quelle osservate nella sindrome di Antley-Bixler.

L'interazione di POR con tantissimi enzimi (surrenali, epatici, della sintesi degli steroli e altri) rende il quadro fenotipico estremamente ampio e complesso da identificare.

### Genetica e messa a punto metodica d'indagine

Il gene localizzato in 7q11.2, è composto da 15 esoni. Sono state descritte più di 70 mutazioni e 3 grosse delezioni.

Per l'analisi mutazionale è stata messa a punto l'indagine tramite PCR e sequenziamento diretto dei 15 esoni. Per la valutazione di grosse delezioni e riarrangiamenti si è utilizzato invece il kit MLPA commerciale P312 POR che include una sonda specifica per ogni esone del gene.

### Casi analizzati

Essendo stato l'ultimo gene messo a punto, il reclutamento dei pazienti è tuttora in corso.

Attualmente è stato analizzato un solo paziente arrivato per deficit surrenalico ed alterazioni ossee che potevano essere riconducibili alla sindrome di Antley-Bixler. Il paziente presentava un difetto lieve di 21-idrossilasi che però al clinico di riferimento non sembrava sufficiente a giustificare il quadro clinico del paziente. Non sono state individuate mutazioni del gene POR in questo paziente.

### **CONCLUSIONI**

Lo sviluppo di questo progetto di ricerca ha contribuito in modo sostanziale al miglioramento della diagnosi molecolare di Iperplasia Surrenale Congenita mediante la messa a punto della diagnostica delle tre forme più rare causate da alterazioni nei geni *HSD3B2*, *POR* e *CYP17A1*. Ad oggi tale offerta diagnostica è disponibile in Italia solo presso questo centro.

Le novità, in termini di indagini genetiche, sono state presentate ad un convegno nazionale; questo ci ha dato la possibilità di far conoscere la nostra attività in modo da poter raccogliere negli anni a venire la maggior parte della casistica italiana con forme rare di CAH. Verosimilmente si ritiene quindi che i primi dati di frequenza delle forme rare in Italia non si avranno prima di cinque-dieci anni.

Anche nella esigua casistica analizzata finora si è potuto verificare quanto descritto in letteratura: la diagnosi clinica e ormonale delle forme rare di CAH è estremamente complicata. Tali difetti non solo possono avere caratteristiche molto sovrapponibili fra loro ma possono anche confondersi con altri difetti non surrenalici. In particolare quando il difetto di enzimi surrenalici, es. *CYP17A1*, altera esclusivamente la via di sintesi degli androgeni, il fenotipo è del tutto identico agli altri difetti non surrenalici della via di sintesi o di risposta agli androgeni (*SRD5A2*, *AR* ecc.). Per questo la distinzione anche delle casistiche dei pazienti fatte finora es. tra difetti surrenalici e pazienti con DSD deve essere rivista ed integrata. L'indagine soprattutto dei geni *POR* e *CYP17A1* deve essere presa in considerazione in tutti questi pazienti e possibilmente inclusa in pannelli NGS dedicati. Il sequenziamento a singolo gene mediante metodica Sanger continuerà ad essere invece la tecnica di elezione per i geni *CYP21A2* e *CYP11B1*, data la complessità dei locus di questi geni.