

**RELAZIONE PARZIALE DEL PROGETTO “IMPLEMENTAZIONE DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA: TRASFERIMENTO INDAGINE GENI “RARI” DELLA STEROIDOGENESI SU TECNOLOGIE AVANZATE”
AL 24 MARZO 2018**

Il progetto presentato si proponeva l’obiettivo di mettere a punto l’analisi molecolare di un gruppo di geni implicati nella sintesi degli steroidi surrenali e degli ormoni sessuali con tecnologia NGS (Next Generation Sequencing) al fine di ampliare e velocizzare la diagnosi genetica di un’ampia fascia di pazienti DSD.

La prima parte del progetto, di tipo progettuale, ha riguardato due filoni principali: da un lato la valutazione scientifica, mediante attenta analisi della letteratura e lo studio dei meccanismi fisiopatologici implicati, per individuare un alista di geni candidati a far parte del pannello da testare, dall’altra una parte più tecnica/metodologica, per la valutazione della tecnologia più appropriata e conveniente tra quelle a disposizione.

Per quanto riguarda la strumentazione, tra le possibilità valutate, si è ritenute inizialmente più appropriato testare il sistema Ion Torrent (distribuito da Thermo Fisher). Il sistema Ion Torrent è basato sulla captazione degli ioni H^+ prodotti durante la reazione di polimerizzazione consentendo la trasposizione diretta di informazioni chimiche in segnali digitali di sequenza. Questo elimina la necessità di costose ottiche, laser e complessi processi di sequenziamento con nucleotidi marcati in modo fluorescente.

Il risultato è un sistema di sequenziamento che è più economico e conveniente, più veloce e relativamente semplice da utilizzare. Inoltre tale sistema è già in uso presso la Genetica Medica per altre patologie genetiche; si tratta quindi di una scelta di uniformità e di condivisione di materiali, idee, problematiche e know-out. Per quanto riguarda il dispositivo da utilizzare, è stato fatto inizialmente un affiancamento per l’utilizzo dell’Ion PGM System: preparazione campioni e librerie, purificazione, quantificazione, emulsion PCR, arricchimento e caricamento su chip. Successivamente si è resa disponibile la possibilità di passare ad un dispositivo più recente, Ion S5, che consente un flusso di lavoro più semplice e rapido per pannelli o esomi.

Questo dispositivo inoltre è integrato con il sistema Ion Torrent Ion Chef che automatizza completamente la preparazione della libreria, dei template e produce chip già pronti per il sequenziamento; consente quindi di accorciare i tempi di lavoro del personale in modo significativo nonché di garantire una uniformità di esecuzione.

La scelta a questo punto era tra il sistema PGM o il sistema S5 e tra preparazione manuale o automazione attraverso Chef.

Abbiamo avuto la possibilità di discutere di queste diverse soluzioni a fine novembre 2017 durante l'incontro organizzato a Milano da Thermo Fisher "Ion World Clinical Solution 2017" in cui i vari utilizzatori di tecnologia Ion hanno mostrato i loro risultati in diversi campi di applicazione con i diversi sistemi e supporti.

Si è deciso quindi di iniziare con il sistema S5 e di effettuare la preparazione mediante Chef visti gli ottimi risultati riportati sia in termini di efficienza che di tempo.

La scelta di una tecnologia più innovativa e con un potenziale maggiore si è riflettuta anche sul numero di geni da includere nel primo pannello di prova. Utilizzando infatti il chip più piccolo disponibile (chip 510) è comunque possibile ottenere da 0.3 a 0.5 Gb di dati, è possibile effettuare 2-3 milioni di reads. In base ad un semplice calcolo quindi è possibile sequenziare con una copertura che consente di vedere i mosaicismi di mutazione fino al 10% , 30-35 geni in 32 campioni contemporaneamente.

Contemporaneamente, la fase di individuazione dei geni candidati, ci ha portato ad individuare un gruppo di 30-40 geni tra i più comuni e i più probabilmente implicati nei meccanismi in studio.

Chip 510 in 2.5 ore

I sistemi Ion Torrent hanno semplificato l'analisi dei dati NGS con soluzioni bioinformatiche end-to-end, incluso il software e il server Ion Reporter. Sono disponibili software operativo e plugin per l'analisi del sequenziamento del genoma, sequenziamento mirato, analisi delle varianti e annotazione, sequenziamento microbico, trasferimento a pacchetti di bioinformatica di terze parti e altro ancora.

Sono

- 1) Scelta geni da includere
- 2) Scelta strumento e metodica La valutazione delle varie tecnologie/strumentazioni che ci erano state messe a disposizione è stata eseguita confrontando vari parametri tra cui: accessibilità dello strumento, tipo di metodica, facilità di passaggio alla fase diagnostica, tempi e difficoltà di esecuzione e di analisi dei dati. Dopo varie consultazioni con specialist e colleghi si è deciso di progettare la prima prova su strumento ION S5; è il più innovativo tra quelli a disposizione e ciò garantisce di poter testare una metodica implementata e più affidabile, inoltre è associato ad un preparatore automatico di campioni e chip (CHEF) che oltre a diminuire le tempistiche, aumenta l'uniformità dei dati ottenuti.

Inoltre

- 3) Scelta campioni E' stata prevista l'analisi di 32 campioni: 28 con mutazioni già identificate mediante sequenziamento Sanger in modo da così costituiti: 12 campioni con mutazioni del gene AR distribuite nei vari esoni, sia in emizigosi che in eterozigosi; 2 SRD5A2, 1 SRY, 1 HSD17B3, 2 NR5A1, 2 WT1, 2 CYP11B1, 1 CYP17A1, 1 POR, 3 HSD3B2, 1 GnRHR e 4 pazienti non diagnosticati.
- 4) Fase sperimentale Al momento è in corso la preparazione delle librerie di DNA che consiste nella "selezione" nell'ambito di tutto il genoma dei frammenti che corrispondono ai geni selezionati per questo pannello. Vengono preparate le librerie di 8 campioni per volta, i diversi campioni vengono distinti applicando un codice a barre univoco su ogni frammento di quel campione.

I TEST DISPONIBILI PER GENI COINVOLTI NELLA CAH

L' Iperplasia Surrenale Congenita (CAH) comprende una famiglia di patologie autosomiche recessive causate 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).

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 α -idrossilasi e di 3 β -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 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.

Presso il Laboratorio di Genetica Molecolare della UO Pediatria Pession della AOU di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi vengono attualmente eseguite routinariamente le indagini

molecolari dei geni CYP21A2 e CYP11B1 mediante Sanger sequencing per identificare mutazioni puntiformi e mediante MLPA per identificare riarrangiamenti e CNVs (variazioni nel n. copie). Recentemente sono state introdotte anche le indagini per i geni HSD3B2, CYP17A1 e POR mediante sequenziamento Sanger. Le metodiche utilizzate sono il sequenziamento Sanger, per la ricerca di mutazioni puntiformi, e l'MLPA per la ricerca di delezioni e riarrangiamenti.

SCOPO DEL PROGETTO

Da quanto brevemente citato si evince che il sequenziamento Sanger finora utilizzato, oltre ad essere stato tecnologicamente superato dal nuovo tipo di sequenziamento, si adatta bene a patologie monogeniche se causate da geni di dimensioni medio-piccole. In questi casi infatti può essere ancora vantaggioso applicare la strategia di indagine a singolo gene.

Ciò è valido ad esempio per il deficit di 21-idrossilasi, chiaramente identificabile con i test ormonali. Inoltre le difficoltà tecniche che caratterizzano l'analisi del gene CYP21A2 lo rendono poco adatto al trasferimento, almeno per il momento, alla metodica NGS; lo stesso vale per il gene CYP11B1.

Per quanto riguarda invece le forme rare, sia le tre note citate prima (3 β HSD, 17 α OH,17-20 liasi, POR) che altre ancora più rare coinvolte ad esempio nella back door pathway (via di sintesi alternativa del testosterone fetale) l'approccio a pannelli genici è senza dubbio preferibile, in quanto consente l'analisi contemporanea di tutti i geni di interesse in un unico test, riducendo enormemente i tempi diagnostici ed alcune incertezze interpretative che ancora persistono nei risultati dei test ormonali.

Lo scopo di tale progetto è pertanto quello di mettere a punto l'indagine con metodica NGS di un pannello di geni implicati nelle forme più rare dei difetti di sintesi degli steroidi surrenali e degli ormoni sessuali.

La conferma molecolare di queste forme più rare consentirà non solo di approfondire le conoscenze attuali sia dei fenotipi dei pazienti 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 si procederà attraverso i seguenti step:

- Attenta analisi della letteratura al fine di individuare i principali geni candidati da includere nel pannello.
- Progettazione del pannello stesso (regioni codificanti e fiancheggianti di tutti i geni)

- Messa a punto delle varie fasi di preparazione dei campioni: amplificazione, arricchimento, selezione sfere coniugate ecc.
- Analisi di un gruppo di DNA di controllo per verificare e validare la metodica
- Stesura di un protocollo di analisi applicabile in fase diagnostica
- Analisi su un gruppo selezionato di casi