

RELAZIONE DEL PROGETTO: OTTIMIZZAZIONE DELLA DIAGNOSI GENETICA IN ALCUNE PATOLOGIE ENDOCRINE

Questo progetto si pone l'obiettivo generale di migliorare la diagnosi genetica nei principali gruppi di patologie endocrinologiche seguite dal laboratorio di genetica molecolare: difetti di bassa statura, disordini dello sviluppo sessuale (DSD), ipotiroidismi e deficit di enzimi surrenalici. In particolare si vuole incrementare il numero di casi diagnosticati e ridurre i tempi per giungere alla diagnosi. I diversi gruppi di patologie di cui ci occupiamo presentano problematiche diverse sia dal punto di vista di inquadramento clinico del paziente sia per quanto riguarda la complessità dell'indagine genetica da svolgere.

Al momento il gruppo meglio caratterizzato sia clinicamente che geneticamente è quello dei deficit di enzimi surrenalici. L'indagine genetica, in particolare per deficit di 21-idrossilasi, viene già svolta ad alto livello ed in modo molto più approfondito rispetto all'offerta diagnostica di altri centri italiani. Dal punto di vista biochimico, invece, sarebbe auspicabile incrementare l'individuazione delle forme più rare di deficit surrenalici tramite l'armonizzazione dei dosaggi e la formazione di personale esperto nell'interpretazione dei casi rari. Per il deficit di 21-OH sono stati indagati più di 1300 soggetti, mentre per le forme rare sono stati indagati più di 100 soggetti.

Per il gruppo delle basse stature si sta lavorando al momento sul gruppo più numeroso, più di 600 pazienti in cui è stata richiesta l'indagine del gene SHOX. Si è partiti da un allestimento di un database secondo quanto deciso nelle ultime riunioni del gruppo di studio SIEDP (Società Italiana di Endocrinologia e Diabetologia Pediatrica). Sono stati quindi inseriti tutti i dati molecolari dei pazienti suddivisi per variazioni puntiformi o per delezioni/duplicazioni. Da questi dati emerge la necessità di confrontarsi con gli altri gruppi in merito all'interpretazione di varianti di numero identificate in regioni prossime all'area di regolazione di SHOX ma non chiaramente identificate come regioni regolatorie del gene. Emerge inoltre il numero altissimo di diagnosi negative (circa 80%) e la necessità di stabilire al più presto linee guida per i clinici che meglio stabiliscano i criteri di inclusione per indirizzare i pazienti alla diagnosi genetica. Il database dei soli pazienti interni all'U.O. di Pediatria è stato inoltrato ai clinici per l'inserimento dei dati clinici mancanti che consentirà di meglio interpretare le varianti in futuro. Inoltre per i pazienti negativi diagnosticati prima del 2014, in cui non tutte le regioni regolatorie venivano analizzate, sarebbe necessario selezionare quelli ancora seguiti e in cui il sospetto diagnostico continua a persistere per ripetere l'indagine con le metodiche attuali.

Anche per il gruppo degli ipotiroidei, circa 250 pazienti, si è partiti con l'allestimento di un database per monitorare la situazione, infatti alcuni pazienti hanno eseguito solo l'indagine del gene TSHR, circa un quinto sono stati sottoposti anche ad MLPA per la ricerca di delezioni ed in una ventina di casi è stato analizzato anche per il gene PAX8. Anche per questo gruppo la percentuale di varianti patogenetiche identificate è scarsa, attorno al 16%. Alla luce di questo quadro, il primo step sarà quello di selezionare i pazienti negativi più candidati per completare l'indagine con MLPA. Inoltre, essendo ormai noto che l'ipotiroidismo ha spesso un'origine oligogenica, sarebbe necessario analizzare in questi pazienti non un solo gene ma un gruppo di geni noti implicati. L'obiettivo è quindi quello di trasferire il prima possibile l'analisi di questi pazienti a tecnologia NGS con utilizzo di un pannello ad hoc. A tal fine è stato perciò progettato un pannello Ion con i

geni disponibili attualmente in versione On demand (TSHR, TPO, TG, PAX8, DUOX2, NKX2-5, THRB, DUOXA2, SLC26A4).

Per il gruppo DSD l'obiettivo che si sta perseguitando è quello di allinearsi il più possibile con quanto suggerito dal gruppo di lavoro europeo DSDnet. Tale gruppo di esperti internazionali ha infatti proposto delle linee guida a cui attenersi per migliorare l'approccio ai pazienti DSD in diversi ambiti tra i quali anche la diagnosi genetica.

Da queste indicazioni emerge innanzitutto l'importanza di un approccio multidisciplinare a queste patologie e l'importanza dell'impiego di nuove tecnologie genetiche che però non possono escludere da una accurata valutazione clinica e biochimica del paziente, essenziali per una corretta interpretazione dei dati genetici. Il gruppo multidisciplinare del policlinico è attualmente composto dalle seguenti figure professionali: endocrinologo pediatra, ginecologo, genetista molecolare, genetista clinico e psicologo. Gli incontri si svolgono circa ogni tre mesi o al bisogno in base ai casi da discutere. Sarebbe necessario riuscire a coinvolgere altre figure professionali importanti come l'anatomo-patologo, l'endocrinologo degli adulti ed il biochimico clinico.

Dal punto di vista molecolare, al fine di passare a tecnologie high throughput per il sequenziamento, è stato testato un primo pannello contenente più di 30 geni DSD-related.

Il test si proponeva di valutare il numero di campioni ideali da analizzare ad ogni seduta e la "bontà" del disegno del pannello, cioè l'effettiva analisi di tutti i tratti codificanti dei geni inseriti nel pannello nonché la corretta identificazione delle varianti. Per fare ciò sono stati selezionati 32 campioni, di cui 28 con alterazioni note. I risultati sono stati soddisfacenti: il sistema ha rilevato tutte le mutazioni precedente identificate eccetto una inserzione di una base. Dei 456 ampliconi inseriti nel pannello, quasi la totalità ha avuto in tutti i campioni almeno una lettura 20X di tutte le basi sia caricando contemporaneamente 32 campioni sia caricandone solo 16. In particolare, analizzando 16 campioni con il chip 510, più del 99% delle basi sono state lette a 20X e più del 97% a 100X. La copertura media ottenuta è da ritenersi pertanto molto soddisfacente.

Per due dei nuovi geni inseriti nel pannello, ZFPM2 (FOG2) e MAP3K1, sono stati disegnati tutti i primer di verifica e testate le condizioni di PCR e sequenziamento Sanger; due regioni di ciascun gene continuano ad essere di difficile analisi con entrambe le metodiche.

Si stanno attualmente risolvendo alcune problematiche relative alla successiva analisi bioinformatica dei dati (licenze per i software e training per l'utilizzo).

In generale si sta cercando di acquisire il know-how tecnico e bioinformatico necessario per l'inserimento della metodica NGS nella normale pratica di laboratorio per tutti i gruppi di pazienti sopra citati. Le tempistiche al momento non possono essere stimate con precisione perché soggette a molte variabili tra cui: il trasferimento del laboratorio in altro padiglione, il budget limitato e la carenza di personale dedicato a queste nuove tecnologie.