

IMPLEMENTAZIONE DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE DI IPERPLASIA SURRENALE CONGENITA: TRASFERIMENTO INDAGINE GENI “RARI” DELLA STEROIDOGENESI SU TECNOLOGIE AVANZATE

INTRODUZIONE: TECNOLOGIA NGS

La “next generation sequencing” (NGS, sequenziamento di nuova generazione) è un innovativo e potente mezzo per analizzare sequenze geniche con alta processività ed efficienza: possibilità tecnica di produrre un volume enorme di dati a costi estremamente più bassi ed in tempi estremamente più rapidi.

Produce sequenze con una processività parallela immensa che continua a crescere in modo esponenziale e oggi è nell’ordine di centinaia di miliardi di basi di DNA per singola analisi.

Ad un decennio dalla sua introduzione, l’NGS trova oggi vasta applicazione in ogni campo medico, tra cui la genetica medica, per la quale è diventata una tecnologia insostituibile. L’NGS sta rivoluzionando i test genetici diagnostici, sostituendo l’approccio “gene per gene” con una strategia a pannelli di geni. Questi pannelli possono essere focalizzati ad un singolo o molteplici geni. Questo nuovo approccio è particolarmente promettente per la diagnosi di malattie pediatriche neuromuscolari, endocrinologiche, metaboliche, ecc., che sono caratterizzate da una forte eterogeneità clinica e genetica. Con la NGS è possibile effettuare un’indagine genetica senza dover necessariamente ipotizzare un gene responsabile a priori, ma sequenziare un pannello molto ampio di geni o, per finalità di ricerca, tutto il genoma.

Il termine NGS definisce differenti tecnologie di sequenziamento parallelo del DNA che consentono di analizzare DNA misti. Questa proprietà è una svolta epocale rispetto al sequenziamento tradizionale Sanger, poiché nonostante ci sia stata negli anni un’evoluzione di questo metodo, essa ha riguardato solo la velocizzazione della fase di separazione elettroforetica ad opera dei sequenziatori capillari. Poco è stato fatto per velocizzare le prime due fasi, molto più limitanti, di preparazione di frammenti di DNA. La tecnologia NGS supera questo collo di bottiglia, consentendo di evitare i passaggi che comportano il maggior dispendio di tempo. I vantaggi dell’NGS sono ovviamente più evidenti quanto più numerosi sono i segmenti di DNA da analizzare e, nel campo delle malattie genetiche, quanto più numerosi e grandi sono i geni da studiare per una diagnosi molecolare.

Ad esempio, con il Progetto Genoma Umano (basato su metodo Sanger) dal 1990 al 2003 sono stati coinvolti molti laboratori nel mondo per sequenziare un solo genoma, mentre con l’NGS la stessa analisi è da considerarsi fattibile in circa 30 ore con uno sequenziatore di medie dimensioni.

L'uso di metodi di arricchimento sempre più precisi ed affidabili sta portando la NGS dal laboratorio di ricerca alla diagnostica di routine. La validazione su larga scala ne sta permettendo un impiego affidabile e a costi contenuti.

DIAGNOSI MOLECOLARE MEDIANTE PANNELLI FOCALIZZATI DI GENI

Questo tipo di applicazioni dell'NGS è tra le più diffuse e di maggiore riscontro pratico immediato poiché non ha alcuna differenza con la diagnostica tradizionale sia per l'interpretazione dei risultati sia per quanto riguarda i dilemmi etici (evidenze di alterazioni in geni non relati alla patologia o non facilmente interpretabili). In genere l'analisi si effettua solo sul *propositus* e poi si verifica la presenza nei genitori delle varianti riscontrate.

Si sequenziano 1-20 geni specifici utilizzando piccoli strumenti NGS da banco, come Ion Torrent PGM o Illumina MiSeq. Moltissime pubblicazioni mostrano la buona affidabilità delle procedure con l'identificazione delle mutazioni più rapida e più completa rispetto alle tecniche tradizionali. Ad esempio la tecnica NGS è stata già utilizzata con successo per le diagnosi di: neurofibromatosi di tipo I tramite l'analisi del gene NF1 (Maruoka et al., 2014); sindrome di Stickler mediante l'analisi dei geni COL11A1 ed COL11A2 (Acke et al., 2014); condizioni geneticamente molto eterogenee come la ciliopatia associata a nefronoftisi (Halbritter et al., 2012) o l'anemia di Fanconi (De Rocco et al., 2014).

La tecnica va associata a metodologie per rilevare delezioni o duplicazioni che, se in eterozigosi, sono non correttamente rilevate dall'analisi bioinformatica dei dati NGS. Un'altra applicazione è nello screening neonatale, ad esempio di fibrosi cistica (Baker et al., 2015).

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