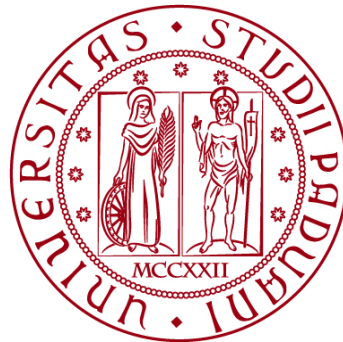


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

Relazione funzionale fra le mutazioni germinali di KDM1A e l'espressione ectopica di GIPR nella Sindrome di Cushing pasto-dipendente in pazienti con iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale (PBMAH)

Tutor: Gianluca Occhi
Dipartimento di Biologia

Laureando: Alice Boarolo

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

| | |
|--|-----------|
| RELAZIONE FUNZIONALE FRA LE MUTAZIONI GERMINALI DI KDM1A E L'ESPRESSIONE ECTOPICA DI GPR NELLA SINDROME DI CUSHING PASTO-DIPENDENTE IN PAZIENTI CON IPERPLASIA SURRENALICA MACRONODULARE BILATERALE (PBMAH) | 1 |
| ABSTRACT | 4 |
| INTRODUZIONE | 4 |
| IPERPLASIA SURRENALICA MACRONODULARE BILATERALE PRIMARIA PBMAH | 4 |
| PBMAH È UNA RARA CAUSA DELLA SINDROME DI CUSHING..... | 5 |
| ALTERAZIONI CAUSATIVE DI PBMAH | 6 |
| SCOPO DELLO STUDIO | 7 |
| MATERIALI E METODI | 8 |
| SELEZIONE DELLA COORTE OGGETTO DI STUDIO..... | 8 |
| UTILIZZO DI INGEGNERIA GENETICA | 9 |
| IMMUNOISTOCHEMICA..... | 11 |
| ANALISI STATISTICHE | 12 |
| RISULTATI | 12 |
| INTEGRAZIONE DELLE ANALISI GENOMICHE CON LE ANALISI CLINICHE | 12 |
| INATTIVAZIONE DI KDM1A NEI PAZIENTI G2 | 15 |
| DISCUSSIONI | 17 |
| CONCLUSIONI | 20 |
| BIBLIOGRAFIA | 21 |

ABSTRACT

L'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria (PBMAH) è una rara causa della Sindrome di Cushing responsabile dell'eccesso di produzione di corticosteroidi da parte della ghiandola del surrene. Negli ultimi anni si è osservata una crescente incidenza di questa patologia che ha portato, fra le altre cose, ad evidenziarne l'eterogeneità. A questo consegue l'importanza di indagare le diverse cause della patologia per offrire ai pazienti diagnosi più rapide e trattamenti più efficaci, considerando che questa patologia si ritiene ancor'oggi essere sottostimata. A questo scopo, in questo lavoro sono state utilizzate piattaforme di sequenziamento di nuova generazione che hanno permesso di raggruppare i tumori surrenalici responsabili di PBMAH in tre differenti gruppi molecolari. Il primo gruppo (G1) è caratterizzato da una mutazione germinale inattivante del gene *ARMC5*. Il secondo gruppo (G2) comprende tumori surrenalici con un'espressione alterata del recettore per il polipeptide insulinotropico glucosio-dipendente (*GIPR*). L'espressione ectopica di questo recettore induce una produzione elevata di cortisolo a livello surrenalico responsabile della sindrome di Cushing diagnosticata nei pazienti di questo gruppo. Inoltre, il sequenziamento genetico dei pazienti G2 rileva una mutazione tronca di *KDM1A* causa della sua perdita di espressione, che potrebbe correlare funzionalmente con l'espressione ectopica di *GIPR*. Mentre rimangono ancora non chiarite le mutazioni alla base del gruppo G3.

INTRODUZIONE

Iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria PBMAH

Nel 1964 Marc Kirschner descrive per la prima volta una patologia conosciuta ai giorni nostri come *iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria* (PBMAH). Si tratta di una patologia caratterizzata da una particolare eterogeneità, sia genetica che fenotipica, che ha portato ad un grande dibattito tra gli studiosi circa le sue cause. È una malattia rara, anche se negli ultimi anni i casi diagnosticati sono in costante aumento.

Il nome della malattia richiama la sua natura clinica. È caratterizzata da noduli, formazioni anatomiche patologiche, a livello della ghiandola del surrene, di natura benigna e con dimensioni maggiori al centimetro (macronodulare). Una delle sue caratteristiche principali è il fatto che interessa entrambe le ghiandole, anche se nella maggior parte dei casi ha uno sviluppo asimmetrico e asincrono nelle due parti, ed è proprio questa natura bilaterale che fa pensare ad una predisposizione genetica germinale. La presenza di queste formazioni tumorali benigne porta ad un ingrossamento della ghiandola e ad un'ipersecrezione di cortisolo, anche indipendentemente dall'attività dell'ormone adrenocorticotropico (ACTH) prodotto dalla ghiandola ipofisaria.

Considerando che nella maggior parte dei casi la diagnosi avviene in maniera incidentale – per esempio in seguito a radiografie addominali richieste per altri scopi clinici – si può dire che questa malattia ha un'incidenza probabilmente sottostimata: tra il 1993 e il 2020 sono stati individuati casi di PBMAH in 170 soggetti di 45 famiglie diverse. Interessa individui di entrambi i sessi, ma è più

frequente in pazienti di sesso femminile: il rapporto tra femmine e maschi affetti è, infatti, di 1.24.

PBMAH può essere legata a mutazioni genetiche ereditarie, in particolare disordini autosomici dominanti, ma può anche manifestarsi in forma sporadica. In quest'ultimo non vi sono evidenze della patologia nei familiari del soggetto affetto, mentre nel primo caso, oltre a forme isolate, può manifestarsi all'interno di alcune sindromi ereditarie, quali per esempio la poliposi adenomatosa familiare o la neoplasia endocrina multipla di tipo 1.

Essendo la componente ereditaria piuttosto rilevante, risulta efficiente indagare le alterazioni genetiche che possono condurre alla malattia, permettendo, attraverso screening genetici, una diagnosi più rapida. È stata proprio l'indagine di questa predisposizione genetica a permettere agli studiosi di capire si tratti di una malattia eterogenea, dove per eterogeneità genetica si intende il fenomeno per cui mutazioni in loci genici diversi possono avere lo stesso effetto fenotipico. Può, quindi, avere origine da anomalie multiple e diverse del DNA.

Le diverse difficoltà che si riscontrano nella diagnosi di questa patologia sono legate alla sua progressione molto lenta e alla sua presentazione clinica variabile, ragion per cui viene spesso riscontrata per la prima volta in età adulta, attorno ai 40 e i 60 anni d'età, quindi probabilmente molto tempo dopo la sua insorgenza.

Già quando non erano ancora conosciuti i vari fattori che portavano all'iperplasia surrenalica, si era capito che la sua evoluzione, dopo diversi anni, può essere responsabile dello sviluppo di una sindrome conosciuta come sindrome di Cushing. Infatti, in molti pazienti viene diagnosticata la PBMAH proprio dopo aver scoperto la presenza della sindrome di Cushing (CS), nonostante nella maggior parte dei casi l'iperplasia surrenalica porta alla manifestazione subclinica della sindrome, ovvero che ancora non manifesta sintomi obiettivi poiché si trova in fase precoce e sfugge all'esame clinico.

PBMAH è una rara causa della sindrome di Cushing

La sindrome di Cushing è rappresentata da un complesso di anomalie cliniche, di diversa causa, provocate da livelli ematici elevati di ormoni corticosurrenalici, in particolare di cortisolo, ormone steroideo sintetizzato nella zona fascicolata della corticale del surrene su stimolazione dell'ormone ipofisario adrenocorticotropico (ACTH). Il ruolo fisiologico di questa molecola, anche chiamata ormone dello stress, è quella di inibire le funzioni corporee indispensabili nel breve periodo, come ad esempio l'attività insulinica, e per questo motivo, in situazioni non patologiche, un suo aumento avviene quando l'individuo è a digiuno.

Nell'80% dei casi questo eccesso è dovuto alla presenza di un tumore ipofisario ACTH secernente – in questo caso si parla di malattia di Cushing. Nel rimanente 20% dei casi, invece, la sovrapproduzione di cortisolo da parte delle ghiandole surrenali avviene per ragioni diverse, compresa la presenza di iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria.

Una piccola percentuale di pazienti affetti da PBMAH, inoltre, sviluppa una forma della CS pasto-dipendente (FDCS). Infatti, in una donna di 48 anni con diagnosticata iperplasia surrenalica nodulare e CS è stato dimostrato sperimentalmente che le cellule surrenaliche stimulate da uno specifico peptide

mostravano una produzione di cortisolo più elevata rispetto a quando stimolate da ACTH. Ciò ha permesso di capire che la CS pasto-dipendente potrebbe essere il risultato di una risposta anomala da parte delle cellule surrenaliche alla secrezione di questo peptide. Si tratta del polipeptide insulinotropico glucosio-dipendente (GIP), ormone della famiglia delle incretine che viene normalmente prodotto a livello gastrointestinale e secreto dalle cellule K del duodeno con la funzione specifica di regolare il metabolismo energetico e la glicemia in vario modo, ma in particolare stimolando la secrezione pancreatica di insulina. Questa proteina è in grado di stimolare in maniera specifica l'attività di un recettore di membrana (GIPR) della famiglia di recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), espresso sulle cellule beta del pancreas.

Essendo il GIP secreto dopo i pasti, inizialmente si riteneva che nei pazienti responsivi a questo ormone la CS pasto-dipendente potesse essere legata ad una secrezione di cortisolo pasto-dipendente causata da un'alterazione nell'espressione di *GIPR*.

Infatti, in alcuni pazienti affetti da iperplasia surrenalica e FDCA stimolando la secrezione di cortisolo attraverso il pasto è possibile evidenziare un'inversione nel ritmo circadiano dei livelli di concentrazione di cortisolo rispetto a soggetti sani: livelli più bassi sono riscontrati durante la mattina quando il paziente è a digiuno, mentre dopo i pasti è visibile un incremento della concentrazione dell'ormone. Quando, inoltre, le cellule surrenaliche di questi pazienti sono state infuse con GIP, viene rilevata una precisa corrispondenza tra i valori di concentrazione di GIP e quelli di cortisolo, non riscontrabile in soggetti non affetti dalla patologia. Di conseguenza risulta chiarito che il polipeptide è un modulatore della produzione di cortisolo. In ogni caso si deve sempre tenere in considerazione che la sua attività è strettamente correlata al legame con il rispettivo recettore GIPR. È già in parte dimostrato che in pazienti con PBMAH affetti dalla sindrome di Cushing pasto-dipendente si trova un'espressione anomala di questo recettore nelle cellule di entrambe le ghiandole surrenaliche, responsabile della secrezione pasto-dipendente di cortisolo a livello surrenalico.

Alterazioni causative di PBMAH

L'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale in pazienti affetti da CS pasto-dipendente sembrerebbe associata ad un'alterazione causante un'espressione ectopica di *GIPR*.

Tuttavia, questa alterazione non è l'unica causa della patologia, ma si tratta di una malattia eterogenea poiché associata a differenti alterazioni, sia germinali che somatiche. Risulta quindi necessario ricercarne le cause.

Procedendo in questo senso è stato scoperto che le principali mutazioni molecolari e/o genetiche responsabili della patologia vanno ad agire a livello di una via di segnalazione, quella che permette l'attivazione della proteina chinasi A (PKA). Si tratta di un enzima oligomero ubiquitario, ma molto rappresentato a livello del tessuto endocrino. Qui, la via si innesca a partire dal legame specifico tra un recettore di membrana MC2R, appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, e l'ormone rilasciato dalla ghiandola ipofisi ACTH, dando inizio ad un processo di trasduzione del segnale intracellulare mediato dall'attivazione della

proteina G eterotrimerica. Quest'ultima, che presenta una subunità enzimatica che catalizza la reazione di conversione del GTP in GDP e viceversa, determina il rilascio del GDP e la sua sostituzione con il GTP, quindi il rilascio della parte attiva della proteina che, attraverso un processo di amplificazione del segnale intracellulare, attiva l'adenilato ciclasi verso la sintesi di AMP ciclico. Questo secondo messaggero permette l'attivazione della proteina chinasi PKA, la quale andrà a fosforilare diversi substrati specifici, tra cui fattori di trascrizione coinvolti nelle funzioni surrenaliche endocrine, come la sintesi di ormoni steroidei. Risulta chiaro che un'alterazione a livello di qualsiasi molecola coinvolta in questo pathway, come l'espressione ectopica di *GIPR* o dei recettori di membrana accoppiati alle proteine G, potrà essere responsabile della produzione elevata di cortisolo a livello surrenalico poiché sarà causa dell'attivazione impropria di questa via di trasduzione del segnale. Se a livello somatico analisi trascrittomiche avevano già mostrato duplicazioni di loci genici responsabili di un'espressione traslocata ed ectopica di *GIPR* nella sindrome di Cushing in pazienti con PBMAH; a livello germinale, non erano ancora state identificate alterazioni genetiche di questi recettori e la patologia rimaneva piuttosto complessa da trattare, anche perché essendo molto rara e con situazioni cliniche molto diverse, è difficile da diagnosticare.

SCOPO DELLO STUDIO

Ciò che ha aperto la strada per i ricercatori verso l'approfondimento della patogenesi e diagnosi di PBMAH fu la scoperta, avvenuta nel 2013, di un'alterazione genetica a livello del gene identificato con *ARMC5* (armadillo repeat containing 5). Nell'ultimo decennio, infatti, lo sviluppo della genomica integrata ha portato ad un incremento nella capacità di mappare sequenze regolatorie o mutazioni a livello di DNA, permettendo così l'identificazione del gene oncosoppressore *ARMC5* situato nel cromosoma 16p, la cui mutazione viene considerata come l'alterazione genetica più comune nei pazienti affetti da iperplasia surrenalica, avendo un'incidenza del 25% nei casi isolati e dell'80% nei casi familiari. Tuttavia, alcuni pazienti affetti da PBMAH non mostrano questa mutazione genica, suggerendo, di conseguenza, la presenza di fattori alternativi che predispongono allo sviluppo di questa patologia.

L'eterogeneità genetica della malattia rispecchia un'eterogeneità clinica, con predisposizioni differenti responsabili della vasta variabilità fenotipica e sintomatica visibile nei pazienti; pertanto, analizzare tutte le diverse origini della patologia significa meglio definirne le diverse sottocategorie molecolari.

Sulla base di quanto detto risulta chiara la necessità di correlare i diversi fattori clinici e patologici con le cause genetiche, con lo scopo ultimo di permettere una diagnosi più rapida ed efficace, riducendo al massimo il numero dei pazienti affetti da questa malattia che non vengono diagnosticati.

La mutazione di *ARMC5* come causa genetica della sindrome di Cushing pasto-dipendente in pazienti con PBMAH è già stata esclusa da studi passati, quindi il focus principale di questo studio è stato quello di investigare quale alterazione

genetica potesse esserci alla base e ricercare un'eventuale relazione funzionale tra essa e l'espressione ectopica di GIPR già verificata in questi pazienti.

MATERIALI E METODI

Selezione della coorte oggetto di studio

Mutazioni a livello del gene *ARMC5* sono presenti solo nel 20-25% dei casi di PBMAH, suggerendo che altri eventi genetici o epigenetici potessero essere la causa del processo di trasformazione neoplastica.

A questo scopo viene presa in considerazione una coorte di pazienti affetti da PBMAH, in particolare 36 pazienti sottoposti ad analisi ormonali, preoperatorie e patologiche.

La presenza di noduli a livello surrenalico in questi soggetti è stata confermata tramite l'utilizzo della tomografia computerizzata, ovvero un esame radiologico che, grazie al passaggio di raggi X nell'area interessata, ricostruisce un'immagine tridimensionale del tessuto.

Successivamente vengono misurati i livelli di cortisolo libero urinario attraverso la raccolta delle urine prodotte in 24h, ricordando che i pazienti affetti da PBMAH mostrano un eccesso di questo ormone. I risultati sono visibili in tabella 1.

Tabella 1. Dati clinici, ormonali e patologici di pazienti affetti da PBMAH. Da Anna Vaczlavik et al. 2021.

| Characteristics | Total Cohort | G1 (ARMC5) | G2 (GIPR) | G3 | P value ^a |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| Number of patients, n (%) ^b | 36 (100) | 16 (44.4) | 6 (16.7) | 14 (38.9) | — |
| Sex (F/M), n (%) ^b | 23 (63.9)/13 (36.1) | 9 (56.3)/7 (43.7) | 6 (100)/0 (0) | 8 (57.1)/6 (42.9) | .16 |
| Age at diagnosis, y ^c | 50 [30-73] | 49.5 [30-73] | 43.5 [31-64] | 52.5 [40-67] | .4 |
| Twenty-four-hour urinary free cortisol, nmol/24 h ^c (normal range < 248 nmol/24 h) | 641.5 [38-2493] | 791 [289-2338] | 1076 [176-1909] | 316 [38-2493] | .056 ^e |
| Morning plasma cortisol after 1 mg dexamethasone, nmol/L ^c (normal range < 50 nmol/L) | 400 [81-1140] | 693 [294-1140] | 174 [160-400] | 194 [81-582] | .0064 ^{e,f} |
| 8:00 AM plasma cortisol, nmol/L ^c | 453.5 [57-1283] | 676 [405-1283] | 214 [57-290] | 444 [372-817] | <.001 ^{e,f,g} |
| Midnight plasma cortisol, nmol/L ^c | 437.5 [86-1178] | 447.5 [232-1178] | 607 [461-1156] | 199 [86-766] | .0096 ^{e,g} |
| Adrenal size on CT (left + right), mm ² | 80 [28-200] | 100 [60-200] | 95 [57-115] | 61 [28-150] | .066 ^e |
| Surgery (bilateral/unilateral), n (%) ^b | 29 (80.6)/7 (19.4) | 15 (93.8)/1 (6.2) | 5 (83.3)/1 (16.7) | 8 (57.1)/6 (42.9) | .13 |
| Proportion of eosinophilic cells in adrenal tumor, n (%) ^{b,d} | | | | | <.001 ^{e,f,g} |
| <5% | 9 (36.0) | 1 (9.1) | 0 (0.0) | 8 (88.9) | |
| 5-29% | 12 (48.0) | 10 (90.9) | 1 (20.0) | 1 (11.1) | |
| >30% | 4 (16.0) | 0 (0.0) | 4 (80.0) | 0 (0.0) | |
| Diabetes, n (%) ^b | 13 (43.3) | 7 (58.3) | 1 (20.0) | 5 (38.5) | .33 |
| Hypertension, n (%) ^b | 26 (83.9) | 13 (100) | 4 (80.0) | 9 (69.2) | .11 |

This table gives the results of the hormonal investigations, preoperative adrenal imaging, and pathological analysis of the 36 patients from the integrated genomics analysis cohort.

CT, computed tomography; F, female; M, male.

^aP value is given for the 3-groups comparison.

^bQualitative variables are presented as absolute number of patients and relative counts percentage.

^cQuantitative variables are presented as medians [range].

^dData for count of eosinophilic cells in adrenal tumors were available for 25 patients (11 G1 patients, 5 G2 patients, 9 G3 patients).

^eP values for the 2-group comparisons are expressed as G1 (ARMC5) patients significantly different from G3 patients ($P < .05$).

^fP values for the 2-group comparisons are expressed as G1 (ARMC5) patients significantly different from G2 (GIPR) patients ($P < .05$).

^gP values for the 2-group comparisons are expressed as G2 (GIPR) patients significantly different from G3 patients ($P < .05$).

In seguito al rilevamento di questo incremento di cortisolo, si passa al test di Nugent con desametasone, glucocorticoide di sintesi che va ad agire inibendo la produzione di ACTH, ormone che stimola la produzione di cortisolo, sintetizzato dalla ghiandola pituitaria e bloccando la sintesi di cortisolo in soggetti sani.

La diagnosi è poi confermata attraverso un esame istologico successivo a surrenectomia unilaterale o bilaterale.

Dei 36 pazienti selezionati per lo studio vengono individuati i soggetti affetti da PBMAH con manifestazione della CS attraverso l'analisi dell'andamento della

concentrazione di cortisolo a digiuno e dopo i pasti. Guardando la tabella 1 è chiaro che un gruppo di pazienti, che poi verrà indicato con G2, presenta la sindrome di Cushing pasto-dipendente.

Infine, vengono presi in considerazione ulteriori 5 pazienti, di sesso femminile, di età compresa tra i 30 e 58 anni, con già diagnosticata PBMAH e CS.

Analisi genomica integrata

Dai 36 pazienti presi in considerazione erano disponibili 52 campioni di tessuto surrenalico tumorale, che sono stati analizzati attraverso le nuove tecnologie omiche per valutarne diversi aspetti. Innanzitutto si è proceduto a fare delle valutazioni trascrittomiche, allo scopo di determinare l'espressione dei trascritti in un gruppo cellulare, e genomiche. In questo modo vengono determinate le possibili variazioni presenti. La quantificazione dei trascritti permette di capire quali geni, nel gruppo cellulare preso in considerazione, sono attivati o meno, in specifiche situazioni patologiche e no. Questi risultati sono stati poi associati a dati genomici al fine di determinare le possibili varianti presenti e correlarli con i dati del trascrittoma.

Affinché questa analisi sia precisa, è importante mantenere costanti e omogenee le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei campioni, per questo motivo vengono congelati utilizzando azoto liquido, il quale, avendo un punto di ebollizione a -196° , viene spesso scelto per la crioconservazione dei campioni biologici.

Il primo step vede il sequenziamento di DNA, RNA e microRNA, di conseguenza è stato necessario iniziare con l'estrazione, l'isolamento e la purificazione del materiale genetico poi amplificato con la tecnica della PCR.

Allo scopo di ottenere molecole di DNA prive di contaminanti proteici che potrebbero alterare gli studi successivi degradando o legandosi alla molecola. Per estrarre il DNA si procede con una iniziale lisi cellulare. Successivamente, per eliminare le proteine presenti nel lisato cellulare viene utilizzata una serinproteasi ad ampio spettro chiamata proteinasi K, in grado di degradare le DNasi e le proteine contaminanti grazie alla sua capacità di rompere il legame peptidico in prossimità di amminoacidi idrofobici, quali aromatici e alifatici.

Dopo la rimozione preventiva delle proteine e l'inattivazione dell'attività catalitica delle proteinasi K mediante il calore, eventuali tracce di RNA che potrebbero essere presenti nel campione vengono rimosse mediante l'utilizzo di ribonucleasi. La molecola di RNA essendo a singolo filamento risulta essere molto reattiva; quindi, la sua eventuale presenza nel campione potrebbe portare a dei risultati approssimativi delle analisi successive.

Il DNA viene poi inserito in soluzione acquosa di etanolo in presenza di sali monovalenti per consentire la sua precipitazione dopo la centrifugazione. L'etanolo essendo più idrofilo rispetto la molecola di DNA sequestra l'acqua che circonda il DNA tenuto in soluzione permettendone l'aggregazione e la precipitazione. Infine, l'estratto viene lavato e può essere analizzato dal punto di vista quantitativo, grazie alla quantizzazione fluorometrica, basata sul rilevamento della fluorescenza.

L'estrazione di RNA e miRNA, invece, richiede dei passaggi più delicati e precisi con utilizzo di desossiribonucleasi e inibitori di RNasi. L'analisi avviene poi tramite elettroforesi automatizzata, ma può essere fatta anche attraverso elettroforesi su gel di agarosio.

A questo punto si procede con il sequenziamento tramite le cosiddette piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (NGS). Molecole di RNA estratte da 31 campioni tumorali sono stati sequenziati attraverso RNA-seq.

Si tratta di una tecnica quantitativa che permette di ottenere dei retrotrascritti di DNA, chiamati reads, a partire dall'RNA estratto, che possono poi essere sequenziati portando all'identificazione di diversi livelli di espressione dei geni. L'RNA estratto, isolato e selezionato è stato utilizzato per creare delle librerie di sequenze di cDNA poi sequenziate attraverso piattaforme di sequenziamento sviluppate da Illumina, in grado di processare un numero elevato di campioni in tempi molto rapidi. Per il procedimento i frammenti di DNA lunghi 500-700pb, vengono legati ad opportuni adattatori e inseriti in celle di flusso in cui è possibile realizzare un preciso controllo della dimensione dei cluster e un processo di amplificazione a ponte ottenendo dei cluster clonali cui vengono appaiati i primer per il sequenziamento. Il sequenziamento viene fatto aggiungendo un deossinucleotide marcato con un fluorocromo per volta. Il deossinucleotide nell'estremità 3'OH è legato a un bloccante che deve essere rimosso una volta rilevata la fluorescenza per poter far continuare il processo con l'aggiunta di ulteriori deossinucleotidi marcati. Il ciclo viene così ripetuto un numero prefissato di volte, leggendo ogni volta la fluorescenza.

Segue poi l'analisi qualitativa dei campioni attraverso FastQC.

Le reads così ottenuti vengono allineati su genomi di riferimento, in questo caso è stato utilizzato Human Genome hg38, e assegnati ai geni annotati. In questo modo si possono quantificare i livelli di espressione dei geni considerando che il numero di reads che mappano su un gene è proporzionale ai livelli di espressione del gene stesso.

Lo stesso procedimento di sequenziamento è stato svolto anche per i miRNA isolati dai campioni tumorali.

Mediante metodi di clusterizzazione, geni con pattern di espressione simili vengono visualizzati graficamente attraverso dendogrammi. Nonostante oggi sia considerata una tecnica obsoleta, l'analisi dell'espressione di numerosi geni, o dell'intero genoma, può essere svolta anche attraverso la procedura del microarray.

È importante valutare anche le modificazioni epigenetiche, ovvero alterazioni a livello dell'espressione dei geni, le quali non sono ereditabili poiché non inducono modifiche nella sequenza di DNA. Tra queste, quella più comune vede l'aggiunta di un gruppo metilico a livello della base azotata citosina, la quale viene misurata attraverso l'uso del bisolfito, in grado di convertire, in maniera selettiva e specifica, le citosine non metilate in uracili, identificando con precisione i siti metilati. Quindi per prima cosa da 32 campioni tumorali sono state ottenute delle librerie di DNA aggiunto al bisolfito poi sequenziato. Le tecniche NGS hanno permesso di individuare le regioni CpG metilate permettendo una maggiore discriminazione tra

i tumori PBMAH causati dalla mutazione di *ARMC5* e quelli dovuti alla sovra-espressione di *GIPR*.

Un ulteriore scopo del lavoro era quello di evidenziare le possibili mutazioni causative nel gruppo dei pazienti non ancora “risolti” (quelli privi di mutazione in *ARMC5*). A questo scopo si è proceduto al sequenziamento dell’esoma – ovvero dell’insieme delle regioni codificanti (esoni) del genoma. Questa procedura è molto usata soprattutto nello studio di malattie eterogenee come l’iperplasia surrenalica. Consiste nel confrontare la composizione esonica di un paziente con delle sequenze di riferimento prive di mutazioni. Il sequenziamento dell’esoma (WES, Whole Exome Sequencing) è stato svolto su 15 casi privi di mutazioni in *ARMC5*.

A questo punto viene definito il pannello di geni coinvolti nella patologia, grazie anche alle analisi bioinformatiche di confronto e allineamento delle sequenze; pertanto, si può procedere con il sequenziamento mirato di specifici geni estratti e amplificati con PCR, come il sequenziamento di Sanger per validare quanto emerge dal WES ed escludere le varianti che potrebbero essere conseguenza di artefatti della tecnica.

I livelli di espressione di *GIPR* e *KDM1A* vengono visualizzati utilizzando la tecnica denominata RT-qPCR, ovvero trascrittasi inversa polymerase chain reaction. Si tratta di una PCR real time che permette di amplificare e quantificare simultaneamente il DNA complementare all’RNA da analizzare ottenuto tramite reazione di trascrizione inversa. Questo metodo di laboratorio utilizza un enzima, chiamato trascrittasi inversa, per ottenere una molecola di DNA a partire da una molecola di RNA. Successivamente il DNA complementare ottenuto viene amplificato grazie alla tecnica della PCR, ovvero una reazione di replicazione in vitro di uno specifico frammento di DNA grazie all’utilizzo di un termociclatore, uno strumento in grado di creare dei cicli di temperatura fondamentali e necessari per l’amplificazione. La procedura prende questo nome perché vede l’utilizzo dell’enzima polimerasi di organismi termofili, in grado di polimerizzare acidi nucleici anche ad alte temperature. Contemporaneamente all’amplificazione avviene anche la quantificazione con l’utilizzo di marcatura fluorescente.

Infine, tramite SNP arrays sono state visualizzate grandi regioni cromosomiche per stabilire la presenza di eventuali CNV (copy number variation).

Immunoistochimica

I campioni vengono fissati e processati in sezioni di paraffina spesse 3 micrometri e successivamente colorati con ematossilina ed eosina. L’immunoistochimica o immunocolorazione permette di marcare differenti gruppi cellulari in base alle sostanze che vengono prodotte dalle cellule stesse. In particolare, l’ematossilina colora in blu violetto i componenti cellulari carichi negativamente (nucleo), mentre l’eosina colora in rosso rosato i componenti cellulari carichi positivamente. Per la colorazione il tessuto è stato trattato con xilene per eliminare la paraffina e successivamente viene immerso in etanolo per consentirne l’idratazione e permettere la successiva colorazione. I vetrini colorati vengono poi nuovamente disidratati.

Le sezioni sono state poi colorate con un anticorpo specifico contro *KDM1A* che permette di evidenziare, in base all'intensità della colorazione, in quali e quanti campioni tissutali tumorali si ha la giusta espressione di questo gene rispetto un tessuto non tumorale.

Analisi statistiche

Tutti i dati raccolti dai precedenti esperimenti svolti sui pazienti devono essere sottoposti ad analisi statistiche che permettono di trovare relazioni funzionali tra i diversi risultati ottenuti. In particolare, sono volte a trovare una relazione tra la mutazione germinale di *KDM1A* e l'espressione ectopica di *GIPR* e con questo scopo viene calcolato l'indice di correlazione di Pearson.

RISULTATI

Integrazione delle analisi genomiche con le analisi cliniche

I campioni di tessuto tumorale prelevati da pazienti con PBMAH sono stati sottoposti ad analisi trascrittomiche che hanno permesso di valutare i livelli di espressione genica determinando i livelli di RNA messaggeri e microRNA. Questi risultati sono stati poi rappresentati graficamente attraverso diagrammi che esplicano al meglio la divisione e la classificazione di gruppi di RNA con affinità nei livelli di espressione.

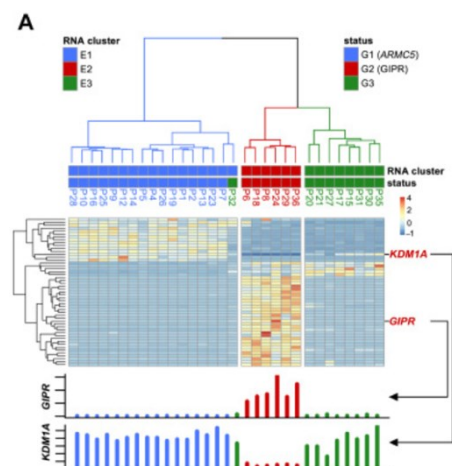


Figura 1. Dendrogramma rappresentante i risultati delle analisi trascrittomiche svolte sui campioni tumorali di PBMAH. Da Anna Vaczlavik et al. 2021

L'analisi differenziale dell'espressione genica ottenuta confrontando i profili trascrizionali dei tessuti ha permesso di determinare tre diversi cluster di trascritti, visibili nella figura 1. Il primo cluster, rappresentato in blu e denominato E1, è ricorrente in pazienti affetti da PBMAH associata a mutazione del gene *ARMC5*; il secondo, in rosso e denominato E2, comprende tutti i pazienti diagnosticati con sindrome di Cushing pasto-dipendente (FDCS); infine, il terzo gruppo E3 comprende campioni prelevati da pazienti che non mostrano né alterazione genica di *ARMC5*, né FDCS. Nella figura 1, inoltre, viene introdotto un grafico che permette di capire il livello di espressione di *GIPR* e *KDM1A* nei tre diversi gruppi.

È evidente che *GIPR* ha un livello di espressione molto elevato nei pazienti del secondo cluster: questo comprende i soggetti che erano stati diagnosticati con FDCS prima dell'intervento ed è già stato verificato che la sindrome è dovuta ad una sovra-espressione ectopica di questo recettore. Per giunta si nota una down-regolazione di *KDM1A* nei tumori surrenalici ottenuti da questo gruppo di individui, suggerendo che l'inattivazione del gene oncosoppressore possa essere in qualche modo correlato alla sovra-espressione di *GIPR*. Negli altri due cluster è visibile una normale espressione di *KDM1A* e di *GIPR*. Quest'analisi dell'espressione genica, quindi ha permesso di determinare l'alterazione del gene *KDM1A* come quella più rilevante nei pazienti del secondo gruppo.

L'indagine sulle alterazioni epigenetiche del DNA viene riportata nella figura 2 dove è possibile vedere la suddivisione dei tumori PBMAH in quattro diversi cluster. Il primo cluster M1 è associato ai tumori causati dall'alterazione di *ARMC5*, mentre M2 e M4 sono associati rispettivamente ai pazienti con PBMAH e FDCS e al gruppo di pazienti con PBMAH cui cause ancora non sono definite.

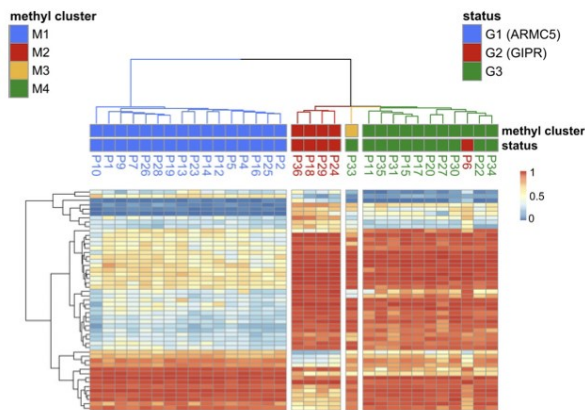


Figura 2. Dendrogramma rappresentante i risultati delle analisi sulle alterazioni epigenetiche e suddivisione dei tumori in 4 cluster. Da Anna Vaczlavik et al. 2021

Lo studio delle alterazioni cromosomiche a livello somatico, misurate grazie alla tecnica del SNP array, rivelano che le alterazioni più frequenti si trovano soprattutto a livello del cromosoma 16p e del cromosoma 1. Quando si parla di alterazioni si fa riferimento a delezioni, aggiunte o perdite di eterozigosità senza perdita netta di materiale genetico (cnLOH), segnate con colori diversi in rappresentate con colori diversi nella figura 3

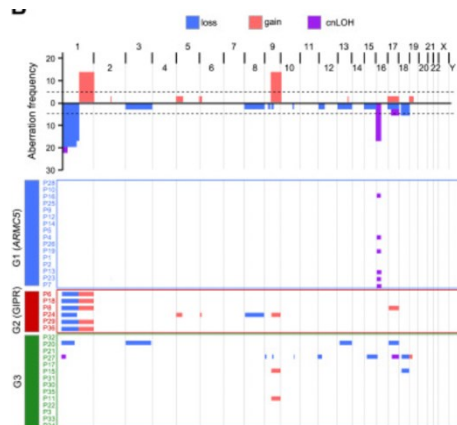


Figura 3. Rappresentazione dei risultati delle analisi delle alterazioni cromosomiche nei campioni tumorali di pazienti affetti da PBMAH. Da Anna Vaczlavik et al 2021.

Da questi primi risultati, quindi, risulta chiaro che i campioni tumorali di PBMAH possono essere classificati in tre diversi gruppi molecolari, denominati rispettivamente G1, G2 e G3. Questa suddivisione trova riscontro anche a livello clinico, ovvero i singoli individui appartenenti a gruppi diversi mostrano caratteristiche fisiopatologiche indipendenti, come riportato di seguito nella figura 4.

Il primo gruppo (G1) comprende i 16 pazienti rappresentati in blu nei grafici di raccolta dei dati omici. La maggior parte di questi soggetti ha una mutazione somatica a livello del cromosoma 16p dove è situato il locus genico di *ARMC5*, responsabile della patologia. Un terzo di questi 16 pazienti mostra cnLOH a livello dello stesso locus genico, suggerendo che questo rappresenta il secondo hit per l'inattivazione funzionale di *ARMC5*. Mentre non è rilevata alcuna alterazione nel cromosoma 1 in nessun individuo.

I dati clinici infine mostrano casualità di incidenza della patologia in base al sesso e concentrazione di cortisolo nel plasma misurati alle 8 del mattino superiori ai 300 nmol/L, inoltre in pazienti con questa alterazione sono rilevate delle sintomatologie più gravi rispetto gli altri gruppi.

Il gruppo G2, rappresentato in rosso, comprende 6 pazienti – tutte femmine – che non mostrano alcuna alterazione a livello del cromosoma 16p. Tuttavia, tutti presentano una delezione a livello del cromosoma 1, contenente il locus genico di *KDM1A*. Questi soggetti presentavano livelli di cortisolo al mattino inferiori ai 300nmol/L, e risultavano affetti da CS pasto-dipendente.

Infine, il gruppo G3 comprende un gruppo molto più eterogeneo di pazienti, rappresentati in verde, privi di alcuna alterazione a livello del cromosoma 16p e, nella maggior parte dei casi, anche nel cromosoma 1. Dal punto di vista clinico, si tratta di pazienti di entrambi i sessi con livelli di cortisolo che non portano a pensare alla presenza di sindrome di Cushing pasto-dipendente. Oltre a ciò, i pazienti G3 mostrano una sintomatologia meno grave rispetto gli altri gruppi con valori di cortisolo più bassi e dimensioni delle ghiandole surrenali più ridotte.

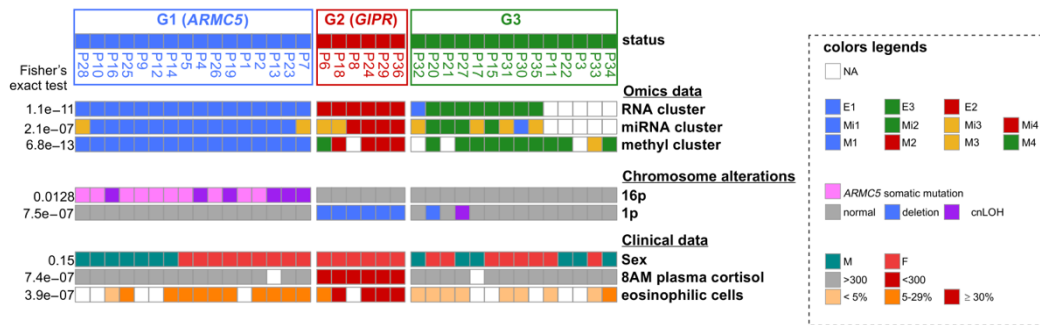


Figura 4. Rappresentazione di tre gruppi di pazienti affetti da PBMAH con diverse caratteristiche fisiopatologiche e cliniche. Da Anna Vaczlavik et al. 2021.

Inattivazione di *KDM1A* nei pazienti G2

Le analisi trascrittomiche già mostrano una sotto espressione del gene *KDM1A* nei pazienti del gruppo G2, evidenziando una probabile mutazione a livello di questo gene come causa di PBMAH negli individui che a livello fenotipico mostrano la FDCS. È necessario capire se si tratti di una mutazione germinale o una mutazione somatica per poi ricercare una possibile relazione funzionale tra questa mutazione e la sovra-espressione di *GIPR*.

Di conseguenza viene fatto il sequenziamento esonico sia a livello di cellule leucocitarie, per determinare possibili alterazioni germinali ereditabili, che a livello di cellule tumorali, per determinare eventuali alterazioni somatiche. Il sequenziamento prende in considerazione 15 pazienti di cui 5 appartenenti al gruppo G2, e 10 al gruppo G3. Viene dimostrata l'ipotesi secondo cui *KDM1A* di fatto è la causa molecolare di PBMAH nei pazienti G2. Infatti, in tutti i soggetti non è stata rilevata alcuna mutazione somatica ricorrente, mentre nei 5 pazienti affetti da sindrome di Cushing pasto-dipendente è stata identificata una mutazione germinale a livello del gene *KDM1A*. Si tratta di un'alterazione a livello della sequenza nucleotidica tale per cui si ha la comparsa di un codone di stop prematuro responsabile della trascrizione e traduzione del gene in una proteina tronca, cioè mancante di una porzione importante della sua struttura e quindi non più funzionale.

Questo spiegherebbe perché sperimentalmente il gene mostra un livello di espressione più basso in questi individui. Tutto ciò viene confermato anche dal sequenziamento di Sanger fatto per *KDM1A* e dalla delezione nel locus genico di *KDM1A* nel cromosoma 1 già mostrata dal sequenziamento genomico in pazienti G2.

A questo punto vengono presi in considerazione ulteriori 5 pazienti di sesso femminile, oltre i 36 pazienti della coorte iniziale, con PBMAH e sindrome di Cushing pasto-dipendente già dimostrata. Di questi 5 individui, 2 appartengono alla stessa famiglia (madre-figlia). Come predetto, anche questi soggetti mostrano mutazioni germinali a livello del gene oncosoppressore *KDM1A*. Inoltre, è possibile affermare si tratti di un'alterazione ereditabile, poiché è presente a livello della linea germinale. Quindi, si ipotizza di trovare la stessa mutazione nei due pazienti imparentati, e così è dimostrato.

L'inattivazione del gene nel gruppo di pazienti G2, e quindi la sua mancata espressione viene dimostrato anche grazie alle tecniche di immunohistochimica. L'immunocolorazione, infatti, è volta a mostrare le differenze tra il tessuto tumorale e il tessuto adiacente, prelevato dalla ghiandola surrenale sana. Come è visibile nella figura 5, nella maggior parte delle cellule tumorali prelevate da pazienti con sovra espressione di *GIPR* non è presente, o comunque è molto debole, alcuna marcatura del gene *KDM1A*, rilevabile, invece, a livello di cellule del tessuto ghiandolare sano o negli altri gruppi tumorali.

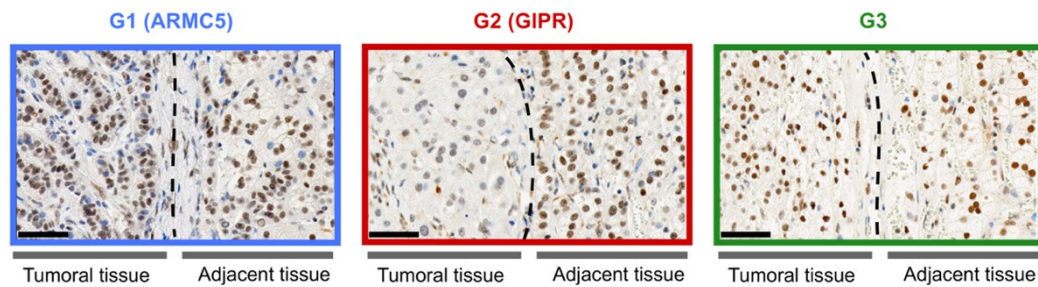


Figura 5. Immunohistochimica di *KDM1A* in campioni di tessuto tumorale e sano prelevati dai tre gruppi diversi di pazienti. Da Anna Vaczlavik et al. 2021

I risultati ottenuti dopo la trascrittasi inversa-PCR real time hanno permesso di costruire il seguente diagramma a scatola e baffi, utilizzato per descrivere la distribuzione di un campione tramite semplici indici di dispersione e di posizione. In questo caso nei grafici sono mostrati i livelli di espressione di *KDM1A* e *GIPR* nei pazienti dei diversi gruppi. È possibile notare che l'inattivazione di *KDM1A* è ricorrente solo nei pazienti del gruppo G2, i quali mostrano poi una sovra-espressione di *GIPR* (in rosso).

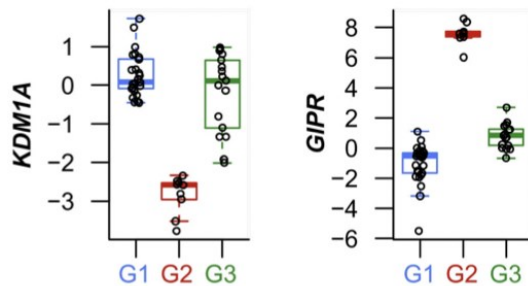


Figura 6. I diagrammi mostrano i livelli di espressione di *KDM1A* e *GIPR* in pazienti dei diversi gruppi. Da Anna Vaczlavik et al. 2021.

Infine, il calcolo del coefficiente di correlazione r di Pearson, attraverso software specifici e analisi statistiche adeguate, ha portato ad un risultato di $r = -0.75$. Il calcolo permette di valutare l'esistenza di una relazione lineare tra l'espressione di *KDM1A* e *GIPR*. Il valore ottenuto è molto vicino a -1 , ciò significa che si può considerare l'esistenza di una relazione forte tra i due livelli di espressione. Il segno del coefficiente, inoltre, è negativo, ciò indica una relazione inversa tra le due variabili.

DISCUSSIONI

PBMAH è una patologia difficile da diagnosticare, proprio per la sua elevata eterogeneità clinica, ovvero perché le sue caratteristiche fisiopatologiche principali si mostrano in maniera differente nei diversi pazienti.

Lo scopo iniziale dello studio era quello contribuire a chiarire l'eterogeneità fisiopatologica visibile nei pazienti affetti da iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria e ciò ha portato alla suddivisione dei 36 pazienti presi in considerazione in tre differenti gruppi.

In particolare, l'esigenza di trovare le cause principali della patologia nasce proprio dall'incremento dei casi diagnosticati negli ultimi anni. Le difficoltà nella diagnosi spesso portano ad un ritardo nella diagnosi stessa e all'impossibilità di trovare trattamenti efficaci come cura. L'indagine delle cause molecolari alla base dell'iperplasia surrenalica risulta, quindi, importante non solo per ridurre al minimo la sottostima dei casi esistenti, permettendo un incremento nella frequenza delle diagnosi, ma anche per limitare al massimo il ritardo nella valutazione della presenza della patologia e di conseguenza offrire migliori trattamenti ai pazienti. Questo ritardo è dovuto prevalentemente al fatto che l'ipercortisolismo tipico dei pazienti con PBMAH si manifesta in maniera molto graduale, inizialmente quasi impercettibile; quindi, la sua diagnosi biochimica risulta molto complessa. Di conseguenza, nella maggior parte dei casi, dal punto di vista clinico, la patologia si manifesta in età relativamente avanzata. Inoltre, ad oggi, la patologia viene trattata prevalentemente attraverso surrenectomia (soprattutto unilaterale) e con l'utilizzo di farmaci che inibiscono la sintesi e la secrezione di cortisolo. Ma spesso il trattamento è riservato solo ai pazienti con già sintomi manifesti. È per questo motivo che una diagnosi più precoce potrebbe rendere l'intervento medico più efficace in un numero maggiore di soggetti affetti da PBMAH.

La natura bilaterale della patologia esorta gli esperti a pensare alla presenza di alterazioni germinali alla base della malattia la cui scoperta sarebbe un punto di svolta nella ricerca. Queste mutazioni, infatti, manifestandosi a livello delle cellule germinali, ovvero delle cellule coinvolte nella riproduzione sessuale, sono ereditabili dalla progenie. La loro individuazione, quindi, permetterebbe la diagnosi di molti casi familiari e di soggetti asintomatici attraverso screening genetici, sempre tenendo in considerazione la possibilità della popolazione di accedere a questo tipo di analisi. Si ridurrebbe così anche la scoperta di incidentalomi surrenalici, ovvero la scoperta accidentale di masse localizzate a livello del surrene.

I processi che portano alla manifestazione di PBMAH non sono ancora chiariti del tutto, ma è possibile affermare che negli ultimi anni sono stati fatti passi in avanti per quanto concerne le conoscenze fisiopatologiche, soprattutto grazie alla ricerca di predisposizioni genetiche, sia somatiche che germinali, che hanno permesso di considerare l'iperplasia surrenalica come patologia eterogenea.

L'utilizzo della genomica integrata aveva già permesso di scoprire una mutazione a livello del gene *ARMC5*, considerata la causa principale della malattia. Tuttavia, tra i pazienti di PBMAH una quota molto bassa risulta affetto dalla sindrome di

Cushing pasto-dipendente senza alcuna alterazione del gene *ARMC5*. Ciò ha portato ad ipotizzare la presenza di meccanismi genetici alternativi.

I soggetti affetti da PBMAH associata a FDCA presentano un'espressione aberrante del recettore per il polipeptide inibitore gastrico GIPR. Ciò significa che questi individui sintetizzano questo recettore anche dove normalmente è assente, ovvero nelle cellule della corticale del surrene. Questo può essere evidenziato anche attraverso l'utilizzo della tecnica dell'ibridazione *in situ* che permette di mettere in evidenza le cellule che esprimono un certo gene e che contengono nel citoplasma un particolare RNA messaggero. Consiste nell'utilizzo di una sonda antisenso marcata, complementare al trascritto da analizzare, in grado di appaiarsi con il mRNA e la successiva aggiunta di un anticorpo legato all'enzima fosfatasi alcalina. Questa reagisce con il suo specifico substrato attraverso una reazione colorimetrica e formando un prodotto blu, marcando, così, la presenza del nostro trascritto di interesse.

Inoltre, analisi genetiche hanno dimostrato la presenza di duplicazioni di loci genici, tra cui il locus di *GIPR*, causanti la sua espressione traslocata.

I risultati delle analisi trascrittomiche e genomiche ottenuti consentono di individuare tre classi molecolari responsabili dell'iperplasia surrenalica macronodulare. Di fatto questi tre gruppi trovano corrispondenza anche a livello clinico, ovvero le tre cause molecolari rispecchiano l'esistenza di tre classi di pazienti con sintomatologia differente. Una di queste viene denominata G2 e corrisponde al gruppo di individui con PBMAH affetti anche da sindrome di Cushing pasto-dipendente, quindi con espressione ectopica di *GIPR*. L'utilizzo della trascrittomica, della genomica, dell'immunoistochimica e di altre tecniche più moderne ha consentito di individuare in questo gruppo di soggetti una mutazione germinale rilevante: inattivazione di *KDM1A*. È un gene codificante per la proteina demetilasi 1A specifica della lisina K nota anche come istone demetilasi 1A (LSD1). Si tratta del primo enzima demetilasi di cui è stato studiato e descritto il ruolo in diversi processi biologici poiché coinvolto nella regolazione dell'espressione genica mediante la demetilazione del DNA. Non ha una funzione specifica a livello fisiologico poiché è caratterizzata da una struttura complessa che le attribuisce la capacità di stabilire diverse interazioni con differenti substrati, prevalentemente fattori di trascrizione, promotori (enhancer) e repressori. Il gene *KDM1A* codifica per un dominio principale della proteina, chiamato TOWER, che separa in due sottodomini il dominio catalitico dell'ammina ossidasi. In questo modo l'ammina ossidasi è in grado di stabilire due interazioni importanti. La prima avviene con il dominio SWIRM, responsabile dei legami della proteina con altre proteine, quali fattori di trascrizione, e di mantenere stabile la struttura complessiva della molecola. La seconda, invece, con il substrato specifico della demetilasi, ovvero le lisine 4 e 9 mono o dimetilate dell'istone 3. In questo modo la proteina è in grado di attuare delle modificazioni istoniche permettendo l'attivazione o la repressione di specifici geni attraverso alterazioni epigenetiche. Ad esempio, quando *KDM1A* si lega a recettori ormonali, come quelli per gli androgeni, permette l'attivazione genica, mentre se legata a complessi di corepressori sarà responsabile della mancata trascrizione di geni specifici. Utilizzando tecniche di knockdown genico è stato possibile esaminare la funzione di *KDM1A* in situazioni non patologiche. Si

tratta di un enzima importante per lo sviluppo embrionale; infatti, è in grado di interagire con determinate molecole regolatorie del processo di transizione epitelio-mesenchimale, e con miRNA regolatori del differenziamento delle cellule neurali. Ma interviene anche nei fenomeni di determinazione delle cellule staminali e di differenziamento di cellule specializzate; l'inibizione di questo gene, infatti, permette di ottenere cellule beta del pancreas a partire da cellule staminali pluripotenti indotte, aprendo la strada verso la scoperta di nuovi farmaci antidiabetici.

Tuttavia, questo gene, essendo coinvolto in alterazioni cromatiniche, può anche essere associato ad una serie di condizioni patologiche, in particolare nello sviluppo di diversi tipi di tumori. Difatti la struttura piuttosto versatile consente all'enzima di interagire con diverse molecole che possono essere implicate nella genesi e nella progressione di cellule tumorali. Gli studi evidenziano come *KDM1A* possa essere coinvolto nel tumore al seno o alla prostata, nel mieloma, nel glioblastoma ecc. Nonostante ciò, la morfologia complessa permette alle proteine anche di legare a complessi enzimatici per controllare la progressione oncogena, riparando eventuale DNA danneggiato, inibendo la divisione cellulare o inducendo processi apoptotici.

KDM1A è quindi un gene oncosoppressore, ovvero la sua funzione consiste nel limitare la crescita delle cellule tumorali. Di conseguenza risulta logico che un paziente con una mutazione a livello di questo gene, tale per cui si ha la mancata espressione del gene, ha maggiore probabilità di sviluppare una trasformazione neoplastica. In oncologia si parla di perdita di eterozigotità; fenomeno per cui un paziente che eredita dalla generazione parentale due copie dello stesso gene oncosoppressore, di cui una non funzionale a causa di una mutazione nella regione di interesse, vede la perdita della situazione di eterozigosi a causa di una mutazione puntiforme somatica anche nell'allele funzionante. A questo punto anche l'allele non mutato nella cellula somatica della progenie mutata è inattivato e ne consegue la completa mancanza di espressione del gene.

Inoltre, studiare la perdita di eterozigotità può essere importante per spiegare predisposizioni tumorali ereditarie.

Per capire la relazione funzionale tra la mutazione germinale del gene *KDM1A* e l'espressione ectopica di *GIPR* nei pazienti del gruppo G2 è quindi importante tenere in considerazione che questo gene gioca un ruolo molto importante nella regolazione della trascrizione genica, quindi nell'espressione di diversi geni, poiché interviene nel processo di metilazione del DNA. In questi individui le formazioni macronodulari possono essere causate da un accumulo di cambiamenti epigenetici nella sequenza nucleotidica del gene oncorepressore demetilasi 1A specifico della lisina K. Tuttavia, riprendendo l'ipotesi del doppio "hit" di Knudson, questa singola mutazione non sarebbe sufficiente a causare la patologia, poiché entrambi gli alleli genici dovrebbero essere inattivati. È quindi la mutazione germinale di *KDM1A*, ereditabile, insieme ad una seconda mutazione somatica del locus genico nel cromosoma 1, la causa di PBMAH e successivo sviluppo della sindrome di Cushing pasto-dipendente. Nelle cellule surrenaliche tumorali, infatti, entrambi gli alleli di *KDM1A* non sono funzionali e ciò porta al mancato controllo dei livelli di espressione di *GIPR* con successiva espressione aberrante del

recettore. La secrezione di GIP successiva ai pasti, quindi, stimola in maniera anomala GIPR a livello surrenalico causando la sindrome pasto-dipendente.

CONCLUSIONI

L'iperplasia surrenalica macronodulare bilaterale primaria è una patologia molto rara e questo è il motivo principale per cui rimane ancora poco compresa. Negli ultimi anni, soprattutto grazie allo sviluppo di nuove tecnologie biochimiche e genetiche, la patologia risulta essere più chiara per quanto ne concerne le cause e le caratteristiche cliniche e patologiche. È stato possibile, infatti, identificare e classificare tre differenti gruppi molecolari ciascuno comprendente pazienti con particolari caratteristiche cliniche. La causa genetica del primo gruppo era già stata chiarita, mentre questo studio è riuscito a spiegare e dimostrare la causa genetica del secondo gruppo. Rimane ancora ignota la base genetica della terza classe in quanto le analisi genomiche e trascrittomiche svolte non hanno portato ad alcun risultato rilevante. I soggetti appartenenti al gruppo G3 hanno presentato un quadro clinico molto più eterogeneo e blando rispetto agli altri due gruppi; quindi, si può pensare alla possibile esistenza di differenti alterazioni all'interno dello stesso gruppo. Le tecniche genomiche non sono state soddisfacenti poiché non hanno rilevato alcuna mutazione germinale ricorrente. Tuttavia, si deve considerare che non è ancora accertato che la causa di PBMAH in pazienti G3 sia germinale, potrebbe anche essere dovuta a mutazioni somatiche indotte da fattori esterni.

La scoperta di PBMAH come patologia genetica ha avuto un grande impatto perché ha permesso di migliorare gli approcci diagnostici totalmente limitati dai vari contesti clinici visibili nei pazienti. La valutazione diagnostica ora può essere svolta attraverso investigazione di predisposizioni genetiche con l'utilizzo di tecniche di sequenziamento esonico e screening genetici.

I trattamenti della patologia includono intervento chirurgico in pazienti con sintomi più gravi. Se possibile è raccomandata surrenectomia unilaterale poiché permette di avere meno effetti collaterali a lungo termine rispetto surrenectomia bilaterale. Pazienti asintomatici o con sintomi più lievi, invece, vengono trattati attraverso monitoraggio e normalizzazione dei livelli di cortisolo, ed esaminati per eliminare le possibili comorbilità dovute all'eccesso di quest'ormone.

Infine, deve essere garantita assistenza sanitaria a tutti i pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Ragazzo D., Barbot M., Scaroni C., Albiger N., Occhi G. (2020). The pathogenic role of the GIP/GIPR axis in human endocrine tumors: emerging clinical mechanisms beyond diabetes. *Springer Nature*. 21, 165-183
2. Lacroix A., Bolté E., Tremblay J., Dupré J., et al. (1992). Gastric Inhibitory Polypeptide-Dependent Cortisol Hypersecretion- A new cause of Cushing's Syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 327:974-80.
3. Nies C., Bartsch D. K., Ehlers K., Wild A., Langer P., Fleischhacker S., Rothmund M. (2002). Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Thieme* 110:277-283
4. Bouys L., Chiodini I., Arlt W., Reincke M., Bertherat J. (2021). Update on primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH). *Springer Link*. 71, 595-603
5. Chevalier B., Vantyghem MC., Espiard S. (2021). *Biomedicines*. 9(10), 1397
6. Charchar H. L. S., Fragoso M. C. B. V. (2022). An Overview of the Heterogeneous Causes of Cushing Syndrome Resulting From Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia (PMAH). *Journal of the Endocrine Society*. Volume 6, Issue 5.
7. Gross J.J., Schwinn A-C., Bruckmaier R. M. (2021). Free and bound cortisol, corticosterone, and metabolic adaptations during the early inflammatory response to an intramammary lipopolysaccharide challenge in dairy cows. *Science Direct*. Volume 74.
8. Tayaba ismail, Hyun-Kyung Lee, Chowon Kim, Taejoon Kwon, Tae Joo Park, Hyun-Shik Lee (2018) KDM1A microenvironment, its oncogenic potential and therapeutic significance. *BMC Part of Springer Nature*. 33.
9. Stavropoulos p., Blobel G., Hoelz A. (2006). Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1. *Nature structural and molecular biology*. 13, 626-632.
10. Xiao-Fei Yang, Shu-Yan Zhou, Ce Wang, Wei Huang, Nink Li, Fei He, Fu-Rong Li (2020). Inhibition of LSD1 promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into insulin-producing cells. *BMC Part of Springer Nature*. 185
11. Wang L.-H., Wu C.-F., Rajasekaran N., Shin Y.K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Karger*. 51: 2647-2693
12. Anna Vaczlavik, Lucas Bouys (2021). KDM1A inactivation causes hereditary food-dependent Cushing syndrome. *Genetics in Medicine*. 24, 374-383
13. Amaldi F., Benedetti P., Pesole G., Plevani P. (2018). *Biologia Molecolare Terza Edizione*. Casa Editrice Ambrosiana. Capitolo 20.