



**DOTTORATO DI RICERCA
FISIOPATOLOGIA DELLO SVILUPPO SESSUALE
CICLO XIX**

**ANALISI DEL GENE PRKA1A IN UNA FAMIGLIA
AFFETTA DA CARNEY COMPLEX.**

TESI DI DOTTORATO

MED/38

Presentata dalla Dott.ssa

MONIA GENNARI

Coordinatore Chiar.mo Prof.

GIAN PAOLO SALVIOLI

Relatore Chiar.mo Prof.

ALESSANDRO CICOGNANI

A.A. 2005/2006

INDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUZIONE: il Carney Complex | 3 |
| <i>Sintomi e diagnosi</i> | 4 |
| <i>Studi di Genetica Molecolare nel CNC</i> | 10 |
| <i>La genetica del gene PRKARIA nel Carney Complex</i> | 17 |
| <i>Modelli murini</i> | 22 |
| METODI | 27 |
| <i>Studio clinico</i> | |
| <i>Analisi del DNA</i> | |
| <i>Coltura linfocitaria e trattamento con Cycloheximide</i> | |
| CASI CLINICI | 29 |
| RISULTATI | 34 |
| <i>Determinazione della mutazione in eterozigosi c501+1G>A</i> | |
| <i>Effetti della mutazione sull'RNA messaggero</i> | |
| <i>Albero genealogico</i> | |
| DISCUSSIONE | 36 |
| FOTO | 41 |
| BIBLIOGRAFIA | 43 |

IL CARNEY COMPLEX

Questa sindrome fu descritta per la prima volta nel 1985 come associazione di mixomi, lentiggini (spotty skin pigmentation), schwannomi e iperattività endocrina. Negli anni il quadro si è meglio definito e i pazienti identificati possono presentare 2 o più tumori di ghiandole endocrine tra cui: adenomi ipofisari GH- e prolattino-secerenti, lesioni nodulari iperpigmentate surrenaliche (PPNAD: primary pigmented nodular adrenocortical disease), tumori testicolari (LCCSCT: primarily large-cell calcifying Sertoli cell tumor) o cisti ovariche, adenomi o carcinomi tiroidei. Non sono stati finora descritti tumori del pancreas e delle paratiroidi.

Frequentemente sono altresì associati dei tumori non endocrini come mixomi cardiaci e trico-follicolo-epiteliomi del condotto uditivo esterno.

Altre manifestazioni più rare includono schwannomi psammomatosi melanocitici, adenomi duttali mammari e osteocondromixomi.

In molti casi le caratteristiche del CNC ricordano la sindrome di McCune-Albright mentre le anomalie dermatologiche sono simili a quelle di diverse sindromi lentiginose e/o amartomatose come quelle di Peutz-Jeghers, di Cowden, di Bannayan-Zonana, di Birt-Hogg-Dubè e la neurofibromatosi.

Il Carney Complex è una malattia rara. Fino ad oggi, sono stati identificati circa 500 pazienti affetti, elencati nei registri del National Institute of Health e della Mayo Clinic negli Stati Uniti e del Cochin Center in Francia.

Benchè il campione non sia molto numeroso, la prevalenza non varia per il sesso (43% maschi e 57% femmine), razza o gruppo etnico (sono stati identificati soggetti

europei-americani, afro-americani e asiatici). Si tratta di una patologia autosomica dominante, nella maggior parte dei casi di una forma familiare (70% dei casi), con trasmissione attraverso una femmina affetta, e con un numero limitato di soggetti in ogni famiglia. Ad oggi sono state descritte 67 famiglie, mentre 88 sono i casi sporadici. Molto varia è l'espressione clinica della malattia fra i pazienti che può essere responsabile dell'apparente salto generazionale e che identifica alcuni casi come sporadici.

Sintomi e diagnosi

Il CNC è un disordine di sviluppo. Raramente la diagnosi può essere fatta alla nascita, generalmente avviene intorno ai 20 anni. Inoltre i tumori associati alla sindrome possono comparire a diverse età. Già alla nascita possono essere presenti anomalie della pigmentazione cutanea, tuttavia le lentiggini non assumono la loro caratteristica morfologia fino a circa l'età puberale. Le lentiggini appaiono come piccole chiazze bruno-nerastre tipicamente localizzate a livello delle labbra, delle palpebre, dell'orecchio e della regione genitale. Diversamente alle altre lesioni cutanee pigmentate, le lentiggini associate con il CNC tendono a regredire dopo i quarant'anni. Altre lesioni pigmentate presenti sono i nevi melanocitici e blu, le macchie caffè-latte ed inoltre lesioni ipopigmentate che possono sia essere presenti alla nascita sia manifestarsi nei primi anni di vita. Le macchie caffè-latte sono generalmente più piccole e meno pigmentate di quelle della sindrome di McCune Albright, piuttosto ricordano quelle della Neurofibromatosi e tendono a sparire nel tempo.

Il quadro clinico di presentazione alla diagnosi è generalmente dovuto a mixomi cardiaci o cutanei e a una sindrome di Cushing (CS) dovuta a PPNAD che possono essere diagnosticati nella seconda-terza decade di vita anche se in una piccola

percentuale di pazienti si può diagnosticare uno o entrambe le lesioni tumorali nei primi 2-3 anni di vita. La sindrome di Cushing ACTH-indipendente dovuta a PPNAD è osservata nel 25-30% dei pazienti con CNC ed è la più comune lesione endocrina significativa clinicamente. La PPNAD è una forma di iperplasia surrenalica bilaterale, anche se le ghiandole sono generalmente di dimensioni normali o anche minori, con lesioni nodulari bruno-nerastre diffuse nella corteccia che è (non sempre) atrofica. Nonostante le piccole dimensioni (< 6 mm) i noduli sono visibili alla TAC e RMN surrenalica. I pazienti con CNC oltre alla classica CS possono presentare una variante “atipica” di CS caratterizzata da un habitus astenico più che da obesità, con severa osteoporosi, bassa statura e debolezza muscolare e cutanea. I pazienti descritti tendono avere una normale o pressochè normale cortisolemia in assenza di un normale ritmo circadiano del cortisolo. Occasionalmente è stata segnalata una “CS periodica” in bambini affetti da CNC in cui la definizione clinica della malattia avviene nel corso di anni. Comunque tutti i pazienti con PPNAD, sia con classica che con “atipica” o “periodica” CS, rispondono al test al desametasone (Liddle test) con un paradossale incremento della cortisolemia anche nei pazienti che mostrano una normale cortisolemia basale o che non presentano le stigmati cliniche della CS. Tra i vari tumori endocrini, la lesione surrenalica è la più frequente manifestazione della malattia, rilevata in circa un quarto dei pazienti anche se sembra essere sottostimata in quanto in quasi tutti i pazienti affetti è stata rilevata istologicamente all’esame autoptico.

I mixomi cardiaci, diversamente da quelli sporadici, più frequenti nelle donne, non presentano differenze per età e sesso. Usualmente si presentano in forma multipla o possono ricorrere nel tempo, possono essere presenti in una o in tutte le camere cardiache, senza predilezioni per la parte destra o sinistra. I mixomi cardiaci sono

responsabili per più del 50% della mortalità malattia-specifica dei pazienti affetti da CNC.

I mixomi cutanei possono svilupparsi in ogni sede ma frequentemente si possono trovare sulle palpebre, nel condotto uditivo esterno, seno e capezzolo. Occasionalmente si possono trovare nell'orofaringe e nei genitali femminili. Altri tumori, che non dovrebbero essere confusi con i mixomi, possono comparire nei pazienti CNC: i tricotricolo-epiteliomi sono frequenti nei condotti auricolari bilateralmente, lipomi, collagenomi, angiomi ecc.

I noduli tiroidei, i tumori gonadici e gli schwannomi sono raramente il motivo della valutazione medica ma molto spesso sono già presenti alla diagnosi.

I tumori testicolari possono essere di tre tipi: a larghe cellule calcifiche delle cellule di Sertoli (LCCSCT: large cell calcifying Sertoli cell tumor), adrenocortical rest, tumori delle cellule di Leydig. Più di $\frac{3}{4}$ dei pazienti maschi presentano una o più di queste masse. Quasi tutti i pazienti in età post-puberale possono presentare all'ecografia lesioni suggestive di LCCSCT. La conseguenza più importante di trovare all'ecografia testicolare delle microcalcificazioni è di potere fare diagnosi di CNC precocemente in quanto generalmente appaiono precocemente nel corso della vita, ancora in assenza di altre lesioni più caratteristiche come mixomi o PPNAD. LCCSCT solo raramente nel CNC (come nella S. di Peutz-Jeghers) possono avere conseguenze endocrine e portare a ginecomastia (per un incremento dell'espressione dell'aromatasi P450) e pubertà precoce. Sono tumori generalmente benigni; è stato riportato solo un caso di malignità in un soggetto di 62 anni. E' raccomandato il follow up annuale con ecografia testicolare e dosaggio dei markers tumorali testicolari in tutti i soggetti post-puberi.

Anche i tumori delle cellule di Leydig e gli adrenal rest sono stati riportati nei pazienti affetti da CNC ma sempre con la concomitante presenza di LCCSCT. Gli

adrenal rest possono portare alla ricorrenza di una sindrome di Cushing dopo surrenectomia per PPNAD; in questi casi anche gli adrenal rest risultano affetti da PPNAD.

Le ovaie possono essere affette da formazioni cistiche e benché usualmente poco significative clinicamente, possono occasionalmente progredire in carcinomi epiteliali ma non tumori delle cellule germinali.

La ghiandola tiroidea presenta un ampio spettro di manifestazioni di malattia, dalla presenza di noduli al carcinoma. Diversamente dalle neoplasie ipofisarie o surrenali e diversamente che nella S di McCune-Albright, non sembra esserci un maggior rischio né di ipo- né di iper-funzione. All'ecografia oltre il 75% dei pazienti possono mostrare lesioni cistiche o un gozzo multinodulare. Alla biopsia l'adenoma follicolare è il più comune reperto, mentre un carcinoma tiroideo, follicolare o papillare, può svilupparsi in più del 10% dei pazienti CNC con preesistente patologia tiroidea. Sono stati diagnosticati 5 carcinomi tiroidei nei pazienti affetti da CNC, tre follicolari e due papillari. Esistono recenti evidenze che la perdita dell'eterozigosità (LOH) nel locus CNC del cromosoma 17 (17q22-24) nei casi sporadici di carcinoma tiroideo possa determinare un'aumentata perdita di questa regione, supportando l'ipotesi che la perdita della funzione del gene PRKA1A possa contribuire alla tumorigenesi del tessuto tiroideo. I tumori delle paratiroidi non sono mai stati osservati.

Il gigantismo o l'acromegalia è una manifestazione relativamente infrequente di CNC (circa il 10%), ma nel 75% dei pazienti può essere documentata una asintomatica iperproduzione di GH e di IGF1 e una lieve iperprolattinemia che sembra possa precedere lo sviluppo di un tumore ipofisario nel CNC. Un'acromegalia biochimica può essere smascherata dall'anomala risposta al carico orale di glucosio o al TRH test.

Gli schwannomi psammomatosi melanocitici (PMS) sono molto rari come tumori sporadici, sono stati diagnosticati in circa una trentina di pazienti CNC. Si possono trovare in ogni parte del sistema nervoso centrale e periferico ma più frequentemente si localizzano nel tratto gastrointestinale (esofago, fegato, stomaco e retto) e nella catena simpatica paraspinale. Il CNC è l'unica condizione genetica oltre alle Neurofibromatosi e alla schwannomatosi familiare isolata che predispone alla formazione di schwannomi. La peculiarità, rispetto alle altre patologie, è che sono fortemente pigmentati, hanno frequentemente delle calcificazioni, e sono multicentrici.

Per la diagnosi di CNC sono necessari almeno due criteri maggiori.

CRITERI MAGGIORI

1. Spotty skin pigmentation con tipica distribuzione (labbra, congiuntiva, mucosa vaginale e peniena)
2. Mixomi (cutanei e mucosi)
3. Mixomi cardiaci
4. Mixomatosi del seno
5. PPNAD o paradossale risposta al test di Liddle (test al desametasone)
6. Acromegalia da adenoma GH secernente
7. LCCSCT o caratteristiche calcificazioni all'ultrasonografia testicolare
8. Carcinoma tiroideo o noduli ipoecogeni multipli all'ecografia tiroidea
9. Schwannomi psammomatosi melanocitici
10. Nevi blu, nevi blu epitelioidi
11. Adenomi duttali mammari multipli
12. Osteocondromixoma

Criterio supplementare

13. Parente di primo grado affetto
14. Mutazione inattivante del gene PRKAR1A

Condizioni cliniche associate al CNC ma non diagnostiche

1. Importante freckling (senza punti iperpigmentati o distribuzione tipica)
 2. Nevi blu di tipo usuale (multipli)
 3. Macchie caffè-latte
 4. Elevata IGF1, OGTT anomalo o elevato GH al TRH test in assenza di clinica
 5. Cardiomiopatia
 6. Fistola pilonidale
 7. Storia di sindrome di Cushing, acromegalia, o morte improvvisa nella famiglia.
 8. Appendici cutanee multiple o altre lesioni cutanee, lipomi
 9. Polipi colici (associati generalmente con acromegalia)
 10. Iperprolattinemia (generalmente lieve e associata ad acromegalia clinica o subclinica)
 11. Nodulo tiroideo singolo in un giovane, o multipli in un adulto
 12. Storia familiare di carcinomi, in particolare della tiroide, colon, pancreas e ovaio e di altri tumori multipli benigni o maligni.
-

Studi di Genetica Molecolare nel CNC

La genealogia di ampie famiglie affette da CNC ha mostrato chiaramente che il disordine è trasmesso in modo autosomico dominante. Da ciò, per identificare i geni causativi del CNC sono state usate analisi di linkage genetico delle famiglie affette. L'analisi di linkage di markers polimorfici ha messo in evidenza due loci genetici per il CNC da aree sospette del genoma. Inizialmente, sono stati ottenuti positivi lod score per nove markers sul braccio corto del cromosoma 2, identificando un'area di circa 4cM nella banda citogenetica 2p16 (locus del CNC2), altamente sospetta per contenere il/i gene/i responsabili del complesso. Nella stessa regione è stata mappata un'altra sindrome genetica, il cancro coloretale non poliposico ereditario. Il gene per tale sindrome (hMSH2) codifica per una proteina che gioca un ruolo diretto nel meccanismo di riparazione del DNA, ma tale gene è stato escluso dall'essere un candidato per il complesso CNC. I fibroblasti derivati da tumori mixoidi o PPNAD di pazienti con CNC presentano frequentemente una instabilità genomica nella forma di associazioni telomeriche e cromosomi dicentrici. Alcuni studi avevano trovato un'instabilità cromosomica nelle culture cellulari di fibroblasti cutanei, di linfociti di sangue periferico e di cellule di polipi adenomatosi di pazienti affetti da poliposi familiare e sindrome di Peutz-Jeghers, tuttavia non sono stati rivelati specifiche rotture cromosomiche o mutazioni puntiformi, benché diversi siti fossero coinvolti in tre o più riarrangiamenti. L'analisi dei microsatelliti dei tumori provenienti da pazienti affetti da CNC hanno confermato una significativa instabilità genomica che accompagna la tumorigenesi in questa sindrome.

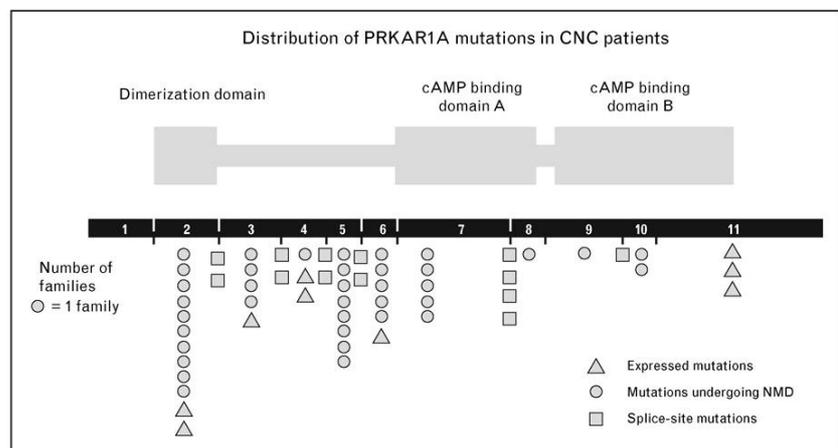
Uno dei primi geni considerati come possibili candidati per il CNC è stato il protooncogene *gsp* (GNAS1), ma non sono state trovate mutazioni ed inoltre escluse, dall'analisi di linkage, localizzazioni di diversi geni che codificano per componenti

delle proteine G. Tuttavia, partendo dalle analogie del CNC con la sindrome di McCune Albright, sembrava suggestivo che il gene o i geni coinvolti nel determinismo della sindrome partecipassero al sistema di segnale proteina G controllato o correlato.

Dal 1996 diverse famiglie affette da CNC sono state descritte non mappare sul cromosoma 2 facendo supporre un'eterogeneità genetica della sindrome, confermata quando sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q22-24) è stato identificato un secondo locus. Successivamente è stato identificato il gene PRKAR1A codificante per la subunità regolatoria I α (RI α) della proteina chinasi A come il gene responsabile del CNC in molte famiglie che mappavano sul cromosoma 17 e in alcuni casi sporadici (vedi figura 1).

Figura 1

Each symbol represents one family unit (kindred or sporadic case) with a mutation in that genomic location. From Ref. [5]. Copyright 2006 S. Karger AG, Basel.

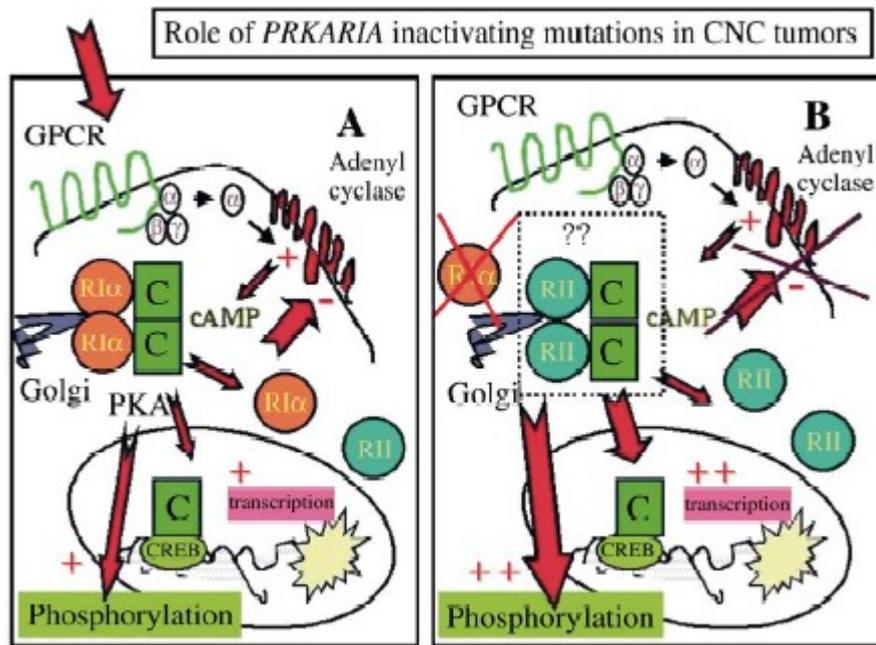


La perdita dell'eterozigosità osservata nel locus 17q22-24 nei tumori CNC ha suggerito che il gene PRKAR1A possa agire come un tumor suppressor nei tessuti affetti. Per molto tempo si è ipotizzato che alla base delle manifestazioni del CNC,

così come dei tumori della sindrome di McCune Albright con una paradossale risposta allo stimolo ormonale, ci fosse un deficitario pathway nucleotide-ciclico dipendente. Tuttavia il dosaggio dei livelli intracellulari di cAMP delle cellule in cultura derivanti da tumori CNC sia a livello basale che dopo stimolo, hanno dato risultati negativi. Quindi il difetto nel CNC è verosimilmente collocato a valle dell'attivazione dell'cAMP, perciò il complesso PKA, un punto critico nella trasmissione di segnale cAMP-dipendente, era un buon candidato per l'identificazione di mutazioni in pazienti affetti da CNC. Un'ipotesi per combinare il difetto di segnale cAMP con la perdita di eterozigotità e la possibile funzione di tumor suppressor del PRKAR1A può essere rappresentato dal fatto che la RI α troncata o assente possa inibire la normale formazione del complesso enzimatico multimerico della PKA, portando alla disregolazione dell'attività chinasi oppure che la RI α troncata possa interferire con la funzione dei normali componenti del complesso PKA in modo dominante negativo (assumendo che la RI α abbia primariamente un ruolo inibitorio nei tessuti CNC), o forse, il difetto dell' RI α porta all'esaltata espressione di geni codificanti per le altre subunità regolatorie del complesso PKA, come è stato dimostrato.

L'oloenzima PKA è un tetramero costituito essenzialmente da due dimeri: uno composto da una subunità regolatoria e l'altro da due subunità catalitiche inattive (v. figura 2)

Figura 2



Rappresentazione schematica della trasmissione di segnale nelle cellule normali (A) e con CNC (B). Dopo il legame del cAMP all'omodimero della subunità regolatoria, la PKA è attivata. Le subunità catalitiche sono rilasciate a seguito di cambiamenti conformazionali delle subunità regolatorie e fosforilano gli obiettivi citoplasmatici. Nel nucleo le subunità catalitiche fosforilano il CREB dando luogo all'attivazione della trascrizione del DNA. Nelle cellule con PRKARIA mutato, dove non viene prodotta o è inattiva la subunità regolatoria 1 α , c'è un compensativo eccesso delle altre subunità che possono anche determinare un aumentata disponibilità di subunità catalitiche libere, e forse una ridotta inibizione fosfodiesterasi o di altri meccanismi di feed-back. L'effetto netto di tutti questi cambiamenti nelle cellule di CNC è un aumento della trascrizione del DNA e/o l'attivazione di altri schemi che portano ad una anomala crescita e proliferazione cellulare.

Il legame cooperativo di due molecole di cAMP ad ogni subunità regolatoria determina la dissociazione e il conseguente rilascio (“attivazione”) delle due subunità catalitiche. Queste fosforilano una gran varietà di substrati proteici sui residui di serina e treonina.

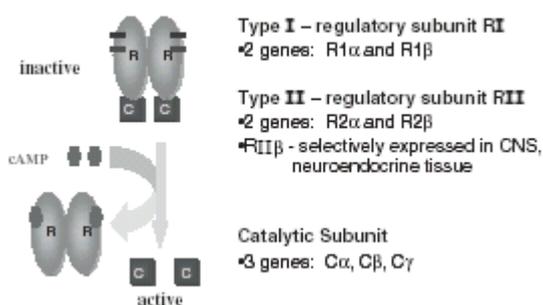
Ci sono quattro geni che codificano le diverse subunità regolatorie (RI α , RI β , RII α , RII β) e tre che codificano le subunità catalitiche (C α , C β , C γ). I quattro tipi di subunità regolatoria hanno un pattern di espressione diverso nell’uomo. Mentre la subunità RI α ha una distribuzione ubiquitaria, la RI β è espressa soprattutto nel cervello, testicoli e linfociti B e T. Nello stesso modo anche la RII α è ubiquitaria e la RII β è espressa solo nel cervello, tessuto adiposo e altri tessuti endocrini.

Le subunità regolatorie sono responsabili delle due principali isoforme di PKA: il tipo I e il tipo II.

Ogni isoforma è composta da due subunità regolatorie e da due subunità catalitiche (figura 3).

Figura 3

B cAMP – Dependent Protein Kinase A (PKA)



La subunità R1 α è quella più abbondante nella formazione del tetramero PKA. Il tipo predominante di PKA in una cellula dipende dalla differenziazione tissutale e dallo stadio proliferativo; la risposta cellulare della PKA al cAMP può variare molto in relazione al tipo di PKA e all'espressione tessuto-specifico delle molecole fosforilate.

Benchè nella maggior parte dei casi il tetramero sia costituito da due omodimeri (uno composto da due subunità catalitiche identiche e l'altro da due subunità regolatorie identiche), in alcuni tipi di cellule sono stati identificati due eterodimeri. Il tipo I contiene sia la subunità regolatoria R1 α o R1 β nella struttura, il tipo II la RII α o la RII β .

Le differenti isoforme delle subunità regolatorie giocano un ruolo specifico nella risposta a certi agonisti.

La R1 α è primariamente coinvolta nel controllo della proliferazione cellulare e nella trasformazione neoplastica. Ha inoltre un importante ruolo nella transizione dalla fase G1 a S del ciclo cellulare.

La RII α partecipa soprattutto al controllo della differenziazione, dell'arresto della crescita e all'induzione dell'apoptosi.

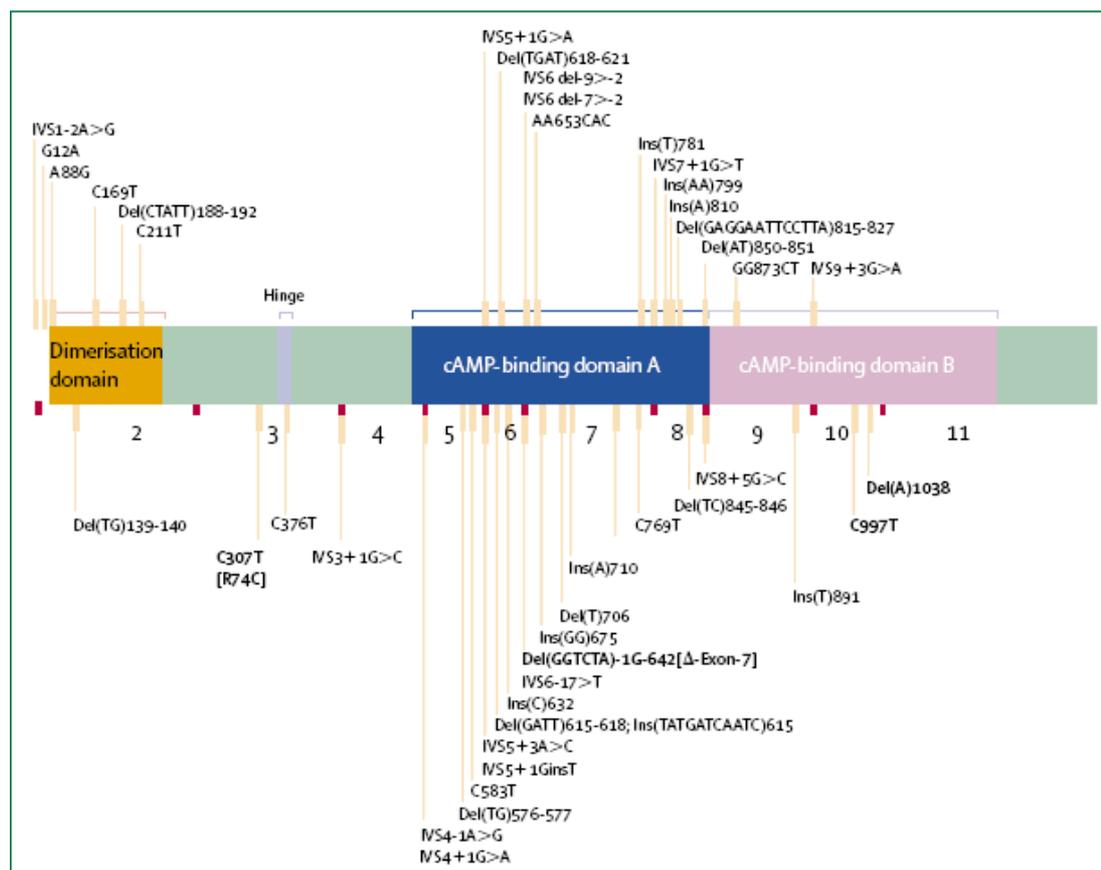
L'espressione aberrante di RI α è stata frequentemente ritrovata nelle linee cellulari tumorali. Nella struttura della cellula, diverse gruppi cAMP-PKA sono operativi ad un dato momento. Le PKA attivate possono fosforilare differenti obiettivi in risposta a diversi stimoli. La specificità di segnale è mediata dall'espressione tessuto-specifica delle subunità regolatorie e catalitiche e dalla compartimentalizzazione del tetramero da parte delle proteine di ancoraggio a-kinasi (AKAP).

La compartimentalizzazione degli oloenzimi di PKA è un importante aspetto della specificità di segnale: attraverso questo, il messaggio del cAMP è il bersaglio di posizioni subcellulari specifiche, come il citoscheletro, la membrana citoplasmatica, il nucleo, l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico e altri organelli. La compartimentazione è assicurata dall'interazione della subunità regolatoria con le AKPA. Inizialmente si pensava che solo il tipo II di PKA fosse interessato dall'azione delle AKAP, recenti evidenze hanno invece dimostrato l'associazione di alcune APKA con la PKA tipo I.

La genetica del gene PRKAR1A nel Carney Complex

L'analisi di linkage, lo studio con i microsatelliti per valutare la perdita dell'eterozigosità, la delezione allelica, ha permesso di identificare il gene PRKAR1A come il gene mutato in più della metà (circa il 65%) dei pazienti affetti da CNC (figura 3). Tali mutazioni sono state trovate in soggetti di etnie differenti: caucasici, afro-americani, asiatici, ispanici.

Figura 3. Schema del gene PRKAR1A e dello spettro di mutazioni trovate.



Pressocchè tutte le mutazioni trovate determinano un cambiamento nella sequenza, mutazioni nonsense, portano ad uno slittamento di lettura, mutazioni frameshift, alterano il sito di splicing. In generale tutte le mutazioni determinano un prematuro codone di stop e quindi l'aploinsufficienza del gene. La più frequente mutazione

hotspots è una delezione che porta allo slittamento del quadro di lettura (578delTG nell'esone 4B del gene), altra mutazione hotspots è la C769T. Una mutazione missenso è stata descritta, la C307T, che determina la sostituzione di una cisterna con una arginina in posizione 74, in una posizione altamente conservata.

Le diverse mutazioni e l'assenza di una correlazione genotipo-fenotipo, sottolineano che deve sussistere un medesimo meccanismo alla base della malattia. Le mutazioni sono inoltre distribuite nella porzione esonica del gene. Nonostante questa distribuzione genomica, se osserviamo le mutazioni in base al dominio funzionale della proteina codificata, più che nella parte esonica, c'è una stretta predilezione per il primo dominio sito di legame dell'AMP-ciclico.

Virtualmente tutte le mutazioni portano ad un mRNA anomalo, che è riconosciuto e degradato nelle cellule da un sistema chiamato nonsense-mediated decay (NMD). Questo sistema consiste in una cascata di enzimi di degradazione dell'RNA ed è attivato quando la cellula riconosce un RNA mutato che potrebbe codificare per delle proteine tronche che impedirebbero il normale funzionamento cellulare.

Il risultato netto è che il paziente affetto da CNC abbia solo metà della normale produzione della proteina RI α .

In un piccolo numero di pazienti (che presentano le mutazioni Δ -esone 7, del(A)1038, e C997T) gli mRNA mutati del gene PRKA1A riescono a sfuggire al sistema NMD, ma la proteina conseguentemente codificata è probabilmente degradata da altri sistemi cellulari di correzione.

Come può l'aploinsufficienza del gene PRKA1A portare alla tumorigenesi?

I meccanismi biochimici che portano alla tumorigenesi nel CNC rimangono irrisolti.

La riduzione della proteina $RI\alpha$ in molti dei pazienti affetti ha portato alla supposizione che la mutazione del gene $PRKA1A$ possa determinare un'alterata attività della PKA, con conseguente incremento della proliferazione cellulare e della tumorigenesi. Tuttavia, a seconda del tipo di cellule studiate, l'aumentata o ridotta attività della PKA è stata variabilmente associata con un aumento della proliferazione cellulare.

I tumori nel CNC mostrano una perdita di eterozigosità di 17q22-24 o una perdita allelica. Questi mostrano una aumentata attività chinastica in risposta al cAMP se confrontati con i tumori non associati alla sindrome. Recenti evidenze mostrano che questo è probabilmente dovuto allo sbilancio tra PKA tipo I e II nelle cellule dei soggetti. Come queste anomalie contribuiscano a determinare i noti effetti del cAMP e PKA sulla crescita e proliferazione cellulare, devono essere ancora completamente studiati. Tuttavia che l'aumento dell'attività chinastica, in risposta al cAMP, promuova la tumorigenesi è stato dimostrato recentemente da studi in vitro.

Gli effetti della PKA sono associati alla fosforilazione dalla subunità catalitica dei residui di serina e treonina delle proteine bersaglio. Conseguentemente le subunità regolatorie agiscono mediando la loro azione attraverso l'inibizione delle subunità catalitiche. La subunità catalitica media un segnale mitogenico, la $RI\alpha$ può essere considerato un soppressore di questa attività fino a che è legata alla subunità catalitica.

Il ruolo della PKA e delle subunità regolatorie è molto complesso agendo come mediatore di specifici segnali ormonali, nella progressione del ciclo cellulare da G1 a S, come regolatore di segnale Ras/ERK e di trascrizione del fattore di crescita dei fibroblasti, nella progressione della mitosi cellulare, nella segregazione e duplicazione del centrosoma e nell'incrementare l'efficienza trascrizionale di alcuni

geni target. Queste azioni sono inoltre ulteriormente complicate dall'espressione tessuto-specifica delle varie subunità che costituiscono il tetrametro, dalla compartimentalizzazione cellulare, mediata dalle numerose proteine di ancoraggio, e dall'interazione con molti schemi di trasmissione di segnale cellulare.

Non è ancora completamente chiaro se il gene PRKAR1A si possa classificare come un classico tumor-suppressor. La perdita dell'eterozigotità è un punto chiave nella funzione di un gene tumor-suppressor, infatti questi, diversamente dagli oncogeni, agiscono in modo recessivo, ed è necessaria la perdita di entrambe le copie per la tumorigenesi; l'aploinsufficienza porta dalla semplice predisposizione allo sviluppo tumorale. Inoltre un gene con la funzione di tumor-soppressore, quando entrambe le sue copie vanno perse, dovrebbe esercitare un effetto inibitorio sul ciclo cellulare, fermare la proliferazione cellulare, bloccare la trasformazione neoplastica iniziata da altri eventi molecolari o attivare l'invecchiamento in presenza di condizioni sfavorevoli di crescita.

Il gene PRKAR1A potrebbe non essere un classico tumor-suppressor per le sue multiple interazioni con i principali processi di segnale e per gli effetti, spesso opposti, su importanti funzioni cellulari.

In primo luogo sembra svolga funzioni diverse in condizioni differenti (stadio cellulare, differenziazione, modalità di segnale), in secondo luogo, per alcuni dei suoi effetti sulla tumorigenesi, la perdita di eterozigotità non sembra necessaria; cioè l'aploinsufficienza può essere sufficiente.

Lo studio delle linee cellulari derivate da pazienti portatori di mutazioni inattivanti in eterozigosi, indicano che l'aploinsufficienza di $RI\alpha$ è sufficiente per determinare un aumento del livello di attività della PKA. L'aumento di attività cAMP-PKA in

queste cellule è anche associato ad una aumentata proliferazione e fosforilazione di ERK1/2, suggerendo che, diversamente dai classici tumor-suppressor, le cellule aploinsufficienti di PRKAR1A non sono normali.

L'identificazione del gene causativo della CNC sul cromosoma 17 ha lasciato un gruppo di famiglie, che mappavano sul cromosoma 2, per le quali la sindrome non è stata delineata molecularmente. Ci sono anche famiglie che non sembrano mappare né sul cromosoma 2 né sul 17, suggerendo la possibilità di un terzo locus genico della sindrome.

Lo screening clinico e biochimico per il CNC rimane il gold standard per la diagnosi del CNC. La diagnosi molecolare per le mutazioni del gene PRKAR1A non è attualmente raccomandato per tutti i pazienti con CNC ma deve essere utilizzato per la definizione dei soggetti affetti nelle famiglie con nota mutazione dello stesso per evitare la sorveglianza medica inutile nei soggetti non portatori.

D'altro canto la presenza della mutazione può indurre a scelte terapeutiche precoci in assenza di chiare e complete manifestazioni cliniche (surrenectomia in soggetto portatore in assenza di classica sindrome di cushing ma con Liddle test paradosso).

Modelli murini

Vari modelli animali sono stati creati per approfondire il ruolo svolto dalla PKA nelle neoplasie dei tessuti endocrini e non, di origine mesenchimale e della cresta neurale.

I modelli animali creati sono: ***Prkar1a*** *-/-*, ***Prkar1b*** *-/-*, ***Prkar2a*** *-/-*, ***Prkar2b*** *-/-*.

Il primo, creato diversi anni fa da S. McKnight (University of Washington, Seattle) mostra un'aumentata attività di PKA, le cavie presentano una precoce mortalità embrionale dovuta a difetti cardiaci o altri disturbi di sviluppo.

Il secondo non mostra modificazioni dell'attività PKA, presentano difetti dell'ippocampo e altre anomalie neuronali ed inoltre ridotta infiammazione e risposta al dolore.

Il terzo modello mostra una ridotta attività PKA ma risulta apparentemente normale rendendo ancora necessario un lungo follow-up.

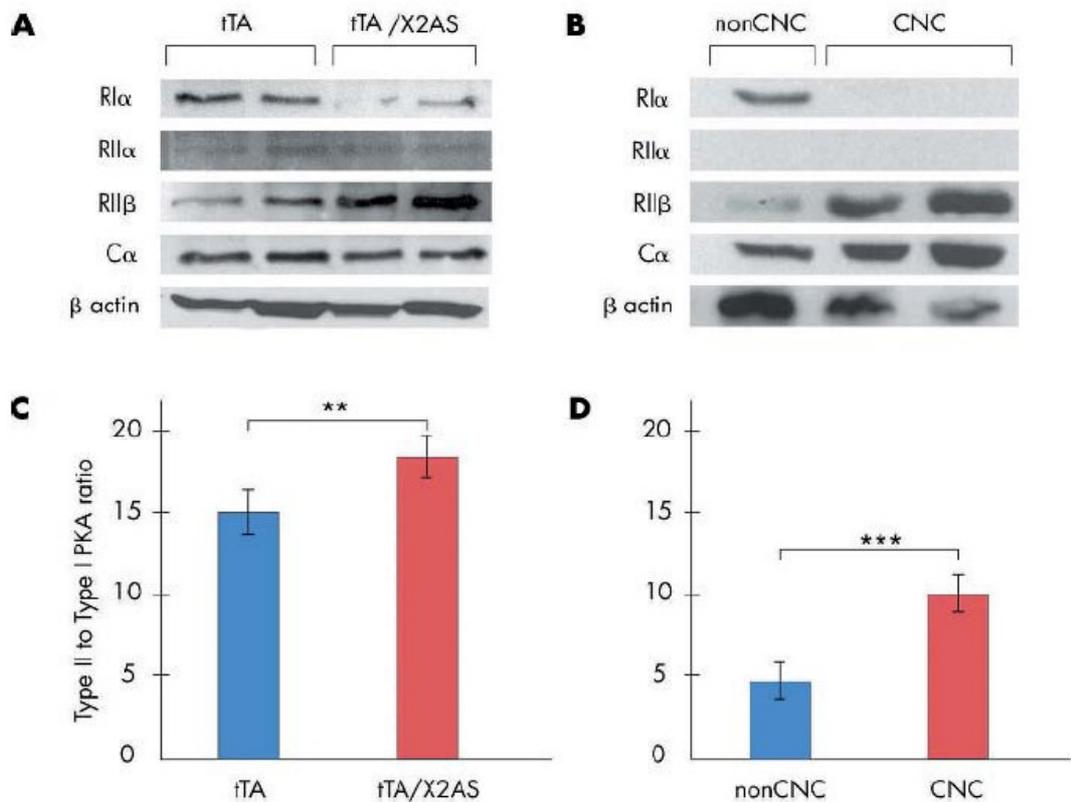
Il quarto presenta anch'esso una ridotta attività PKA ma anche diverse caratteristiche fenotipiche. Sono magri nonostante una dieta molto ricca, hanno un'aumentata lipolisi con ridotti livelli plasmatici di insulina e colesterolo; hanno ridotto apprendimento motorio, presentano un elevato catabolismo alcolico con una ridotta capacità di sedazione alcol-indotta.

Per ovviare alla precoce letalità del topo *prkar1a* *-/-* è stato creato da L. Kirschner (DEB, NIH, Bethesda) un topo ***Prkar1a*** *-/+* che successivamente diventava knockout per il gene in modo tessuto specifico dopo l'incrocio con un nuovo modello murino caratterizzato da cavie che esprimevano la proteina *cre* in alcuni tessuti endocrini (corteccia surrenalica, lobo anteriore dell'ipofisi e ghiandola tiroidea).

Conseguentemente al fatto che il modello *prkar1a* $-/+$ non sembrava sviluppare tumori, si è ipotizzato un differente sistema per avere migliori opportunità di riprodurre la malattia dell'uomo causata dall'aploinsufficienza del gene PRKAR1A. Perciò è stato creato un topo transgenico (TG) che porta un transgene antisenso (AS) per l'esone 2 del *Prkar1a* (X2AS) sotto il controllo di un promotore attivabile (tetracicclino-responsivo) (tTA/X2AS mice).

E' stato così possibile ottenere una down-regulation della *Prkar1a* **fino al 70%** nei tessuti murini e nei fibroblasti embrionali tali da determinare cambiamenti nell'attività della PKA e nella proliferazione cellulare (figura 4).

Figura 4.



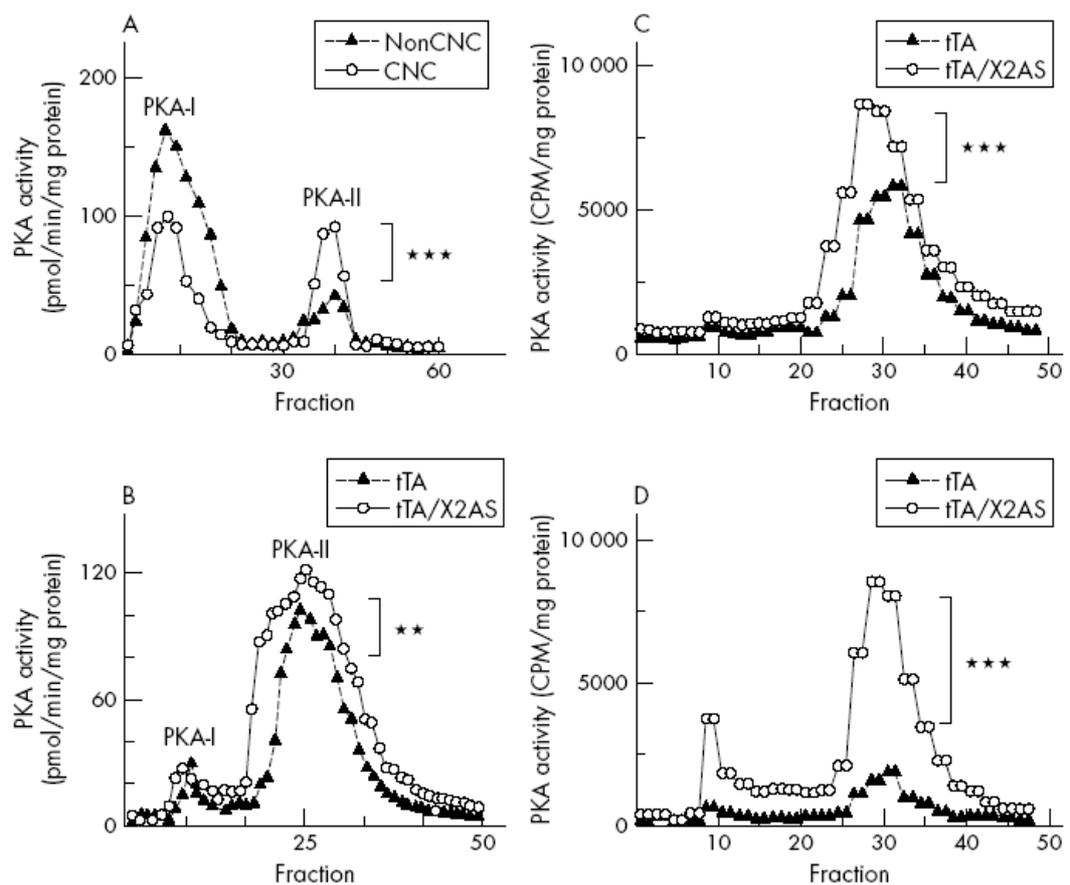
Subunità della PKA e livelli di attività dopo la downregulation del gene Prkar1a.

Riduzione della subunità RI α e aumento di quella RII β nel tessuto surrenalico del

topo mutato (A) (*tTA/X2AS*), e in pazienti affetti da CNC (B) con mutazione inattivante del gene *PRKA1A c.578delTG*. Si osserva in entrambi i modelli (murino ed umano) un aumento del rapporto dell'attività della PKA tipo II verso la tipo I. **** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$**

I vari tessuti del modello murino mostrano una significativa variazione dell'attività della PKA (figura 5).

Figura 5.



Profilo dell'attività della PKA I e II nel tessuto surrenalico affetto da PPNAD di soggetti CNC con mutazione *c.578delTG* (A); tessuto surrenalico(B), renale (C) ed epatico(D) murino. **** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$**

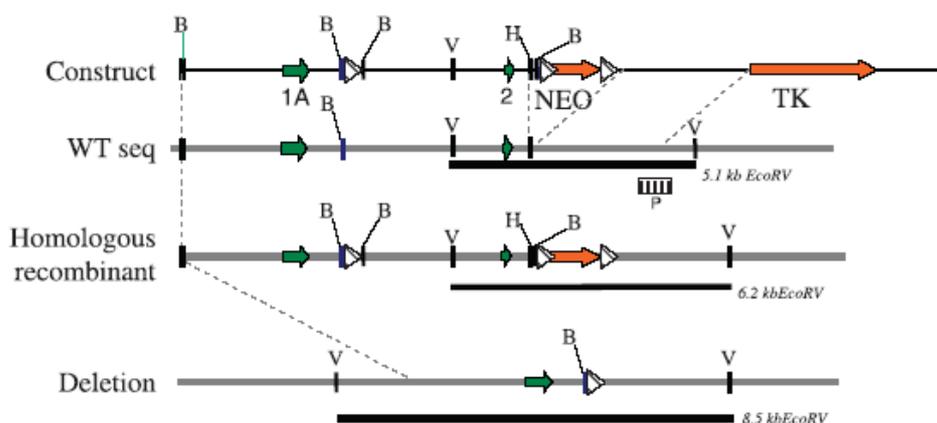
Soprattutto c'è un marcato incremento dell'attività della PKAII con un corrispondente incremento del rapporto PKAII/PKAI (figura 4C); questa modifica è simile a quella osservata nel tessuto surrenalico di soggetti affetti da CNC portatori della mutazione causativa c.578delTG (figura 4D).

Il fenotipo di tale modello è apparso il seguente: iperplasia follicolare e adenomi tiroidei, iperplasia surrenalica e lesioni simili a PPNAD, iperplasia istiocitica ed epiteliale, linfomi e tumori mesenchimali (4-6 mesi), aumento della mortalità dopo i 16 mesi soprattutto per problemi renali o polmonari (correlati a linfomi, sarcoma istiocitico, sindromi linfo- o istio-proliferative o tumori mesenchimali).

L'iperplasia istiocitica, sarcomi o linfomi si sviluppano sia in tessuti linfoidi primari (timo ecc) che in altri tessuti (fegato, rene).

Un modello murino simile, creato dallo stesso gruppo del NIH, è stato quello *Prka1a*^{Δ2/+} cioè un allele nullo del gene mancante dell'esone 2 (figura 6).

Figura 6.



Generazione di un allele nullo del gene Prka1a. Schema della generazione dell'allele mancante dell'esone 2.

Lo scopo è stato quello di osservare i tumori sviluppati dal topo e sovrapporre il fenotipo murino con quello umano dei soggetti affetti da CNC.

Lo spettro di tumori osservati in questo modello murino è sostanzialmente sovrapponibile a quello mostrato dai soggetti affetti da CNC. Sono presenti lesioni tumorali in tessuti significativi come le cellule di Schwann, gli osteociti e i tireociti. I risultati sono differenti da quelli riportati in altri topi knockout nei quali le caratteristiche preminenti erano gli emangiomi ed altri sarcomi. Forse perché in tali modelli il costrutto allelico risultava differente mancando dall'esone 3 al 5. Tuttavia le differenze fenotipiche non sono dovute alle differenze funzionali della proteina risultante poiché in tutti i casi si otteneva una proteina nulla. Forse i fenotipi riportati in precedenza erano parzialmente differenti perché il tempo di osservazione delle cavie era più ridotto e molte lesioni non si erano ancora sviluppate al momento dell'osservazione.

Si è quindi potuto concludere che la down-regulation del gene *Prkar1a* porta alla formazione di tumori nel topo e che questa è associata alla perdita allelica del locus *Prkar1a*, con il conseguente incremento dell'attività della PKA II e un maggiore livello della proteina RII β .

Gli studi ancora in corso hanno lo scopo di far luce su importanti quesiti di biologia tumorale come la relazione tra cAMP e proliferazione cellulare, espressione tessuto-dipendente di alcuni pathways di segnale, e la progressione da iperplasia a tumore in organi endocrini e non.

METODI

Studio clinico

I pazienti sono stati valutati e seguiti presso il reparto di Endocrinologia Pediatrica del S.Orsola-Malpighi di Bologna fino all'età adulta, al momento sono in follow up presso la Medicina Generale di Padova.

I campioni ematici sono stati inviati, previ contatti con il Direttore Prof. Constantine A. Stratakis, al laboratorio di ricerca del Developmental Endocrinology Branch del the National Institute of Health di Bethesda (MD, U.S.A.) per eseguire lo studio genetico nell'ambito del protocollo 95-CH-0059 dal titolo "Definition of the Genotype and Clinical Phenotype of Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease (PPNAD) and its associated Conditions (Carney Complex). Successivamente alla scoperta di una mutazione nuova abbiamo provveduto ad eseguire studi funzionali creando una linea cellulare da cellule derivanti dalla biopsia cutanea della prima paziente.

Il consenso informato all'analisi genetica è stato ottenuto da tutti i soggetti partecipanti allo studio.

Analisi del DNA

Il DNA dei partecipanti allo studio è stato estratto dai linfociti di sangue periferico in accordo con le metodiche correnti (QIAGEN, Germania). Gli esoni 2-11 e le circostanti regioni introniche del gene PRKAR1A sono stati amplificati con PCR, purificati e sequenziati direttamente.

Coltura linfocitaria e trattamento con Cycloheximide

Le linee cellulari derivate dai linfociti dei pazienti sono state create con la trasformazione indotta da virus di Epstein Barr come già descritto in letteratura.

I linfociti sono stati trattati con 100 µg/ml di cycloheximide per 6 ore. L'RNA totale è stato isolato usando come reagente il TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA,USA). E' stato prelevato 1 µg di RNA e ad opera dell'enzima AMV transcriptasi inversa con un primer Oligo dT è stato da esso ottenuto il cDNA in accordo con le istruzioni della ditta fornitrice (Roche Applied Science, Indianapolis, IN,USA).

Il gene PRKAR1A del cDNA di derivazione linfocitaria è stato amplificato usando i primer seguenti (5'-3'): R1AF – TAACATTCAAGCGCTGCTCA e R1AF – TTCTCAAAGCTCCCTCCTT. I frammenti amplificati con RT-PCR sono stati poi purificati su gel di agarosio e analizzati per sequenziamento diretto.

CASI CLINICI

Paziente 1 (CAR52.IV.5 - probando).

La ragazza, nata il 6 Maggio 1976, è stata seguita presso la nostra Clinica dal 1982 (vedi foto).

Secondogenita, nata a termine dopo gravidanza decorsa con minaccia d'aborto al 6° mese e ipertensione arteriosa all'8° (PN 2200 gr), ha presentato in epoca neonatale epatite "gigantocellulare" ad eziologia non determinata ed evoluta, attraverso un quadro inusualmente importante di steatosi epatica, fino a guarigione in circa quattro anni.

PPNAD. All'età di quattro anni la piccola ha iniziato a presentare ripetute crisi di ipersurrenalismo in occasione di episodi febbrili semplici e per tale motivo è giunta alla nostra osservazione dopo circa due anni. All'esame obiettivo presentava facies lunaris, rapida crescita ponderale e caratteristiche lentiggini al volto, semimucosa delle labbra e congiuntiva. Gli esami di laboratorio hanno confermato la perdita del ritmo circadiano del cortisolo con ridotti livelli ematici di ACTH, persistente ipercortisolemia e alti livelli di steroidi urinari e cortisoloria dopo somministrazione di Desametasone (1 mg) overnight (test di blocco breve) e a basse dosi per due giorni (test di blocco lungo). La TAC ha mostrato ghiandole surrenali di normali dimensioni ma la scintigrafia con Iodometil-19-colesterolo ha rilevato un lieve aumento di volume della ghiandola sinistra con omogenea captazione. Quindi la bambina è stata sottoposta a

surrenectomia sinistra, dopo cateterismo venoso selettivo, per una **Sindrome di Cushing ACTH-indipendente** (febbraio 1983).

La diagnosi istologica è stata di iperplasia adrenocorticale pigmentata e nodulare.

Patologia tiroidea. A tredici anni (1989) è stato diagnosticato un ipotiroidismo con noduli ipoecogeni all'ecografia ed iniziato trattamento sostitutivo con Eutirox. Le lesioni nodulari sono state indagate istologicamente più volte confermando la natura di noduli iperplastici/adenomatosi.

La ghiandola tiroidea era più piccolo del normale con ridotta ipoecogenicità , fini alterazioni strutturali e calcificazioni puntiformi e ha mostrato una progressiva evoluzione in un **gozzo colloidocistico con noduli multipli**.

Ipofisi. A 18 anni è stato rilevato un **microadenoma ipofisario** (2 mm). Gli annuali controlli di RMN hanno mostrato un quadro piuttosto stabile con il lobo destro dell'ipofisi lievemente aumentato di dimensioni e disomogeneo e il peduncolo ipofisario lievemente dislocato verso sinistra. La lesione non sembrava essere secernente: il dosaggio basale e dopo stimolo di Ormone della Crescita e Prolattina sono sempre stati nei limiti di normalità (Novembre 2002 IGF1: 351 ng/ml (114-490); Arginina test: GH picco 15.3 ng/ml) fino al 2006 quando i livelli di IGF1 hanno iniziato ad aumentare ed è stata intrapresa terapia con Sandostatina sottocute.

Ghiandole mammarie. Dopo il menarca la ragazza ha presentato cicli mestruali regolari e a 21 anni l'ecografia mammaria ha mostrato la presenza d noduli

ipoecogeni. Durante il follow up è stata confermata la presenza di una mastopatia fibrocistica senza noduli solidi.

Fegato. All'età di 19 anni sono state evidenziate alla RMN delle **lesioni epatiche** ipointense in T1, e disomogenee e iperintense in T2 ed inoltre è stata segnalata una **cisti pancreatico** (1,5 cm) in corrispondenza della testa pancreatico. L'arteriografia ha mostrato quattro lesioni focali intraepatiche localizzate nel lobo destro con vascolarizzazione irregolare, ipercaptanti e dall'aspetto moruliforme con margine regolare. L'ipotesi diagnostica è stata di lesioni displastiche. La prima biopsia ha confermato trattarsi di noduli epatocellulari iperplastici. Durante il follow up tali lesioni sono cresciute in numero e dimensione mostrando un quadro istologico dubbio per evoluzione proliferativa. La paziente è quindi stata sottoposta ad epatectomia parziale (febbraio 2002) con asportazione mediante resezioni wedge delle neoformazioni localizzate rispettivamente tra 5° e 7° segmento e 6° segmento. Durante l'intervento è stata rimossa anche la lesione cistica a struttura parzialmente calcifica localizzata al passaggio testa-corpo del pancreas. L'esame istologico ha deposto per adenomi epatocellulari (figura 4) con aree emorragiche e parete di cisti pancreatico con diffuse aree calcifiche. Durante l'intervento è stato necessario effettuare la ricostruzione, su tutore inserito, del Wirsung per la creazione di una soluzione di continuità in seguito alla rimozione della cisti. Successivamente all'intervento la ragazza ha mostrato una persistenza di elevati livelli di amilasi e lipasi e la ricomparsa di una lesione cistica in corrispondenza della testa pancreatico (3,5 cm) e calcificazioni parenchimali nel corpo e coda pancreatico da pancreatite cronica (novembre 2002). Nel dicembre 2002 la

ragazza ha iniziato a presentare vomito ripetuto ed incoercibile; la lesione cistica pancreatica, cresciuta fino a circa 8 cm, è quindi stata drenata e successivamente intrapresa terapia medica con Somatostatina. Vista l'inefficacia di tale trattamento si è tentato di effettuare la cauterizzazione farmacologica del Wirsung per ovviare alla continua raccolta di secreti pancreatici. L'inefficacia anche di quest'ultima pratica ha reso necessaria la correzione chirurgica a cielo aperto con confezionamento di un'anastomosi pancreatico-digiunale L-L su ansa esclusa alla Roux e digiuno-digiuno anastomosi T-L a piede d'ansa (settembre 2003). Il decorso post-operatorio è stato privo di complicanze.

Nel novembre 2002 è stato effettuato anche un controllo gastroenterologico: l'esofago-gastro-duodeno-scopia ha mostrato una **lieve gastrite cronica aspecifica** mentre la ricerca di Helicobacter Pylorii è risultata negativa; la colonscopia, con visualizzazione possibile solo fino alla flessura splenica, è risultata nella norma.

I controlli ecocardiografici sono sempre stati nella norma.

Paziente 2 (CAR52.IV.4).

Primogenito della coppia, è nato il 19 giugno 1973, ed è stato seguito presso la nostra clinica dall'età di sedici anni. Come la sorella presenta lentiggini al volto e alla semimucosa labiale e macule ipercromiche a livello genitale (vedi foto).

Il ragazzo, giunto alla nostra osservazione per eseguire accertamenti per alta statura, è risultato essere affetto da un **adenoma GH secernente**.

Dopo un iniziale tentativo farmacologico con Somatostatina e Bromocriptina è stato sottoposto ad intervento di adenomectomia per via transfenoidale (Ottobre 92) con

esito favorevole. In seguito il prognatismo presente è stato corretto con un intervento maxillo-facciale.

Durante il follow up il ragazzo non ha mostrato altre manifestazioni cliniche correlabili alla sindrome (lesioni tiroidee, surrenali, testicolari, cardiache e gastroenterologiche).

Patient 3 (CAR52.III.3).

E' la madre dei due ragazzi. Come i figli, presenta cute chiara, lentiggini al viso, labbra e braccia. E' affetta da ipotiroidismo con gozzo multinodulare, mastopatia fibrocistica ed inoltre è stata sottoposta a vari interventi di rimozione di noduli cutanei risultati essere schwannomi all'esame istologico. Nessun'altra manifestazione del quadro sindromico è stato riferito o rilevato.

Patient 4 (CAR52.II.5).

E' il nonno materno. Anche lui presenta lentiggini. Nella sua storia di salute è stata riportata l'asportazione di polipi all'orecchio e al colon e di mixomi cutanei. E' stato sottoposto a tiroidectomia per un nodulo identificato come carcinoma tiroideo (i dettagli non sono disponibili). I familiari riferiscono la presenza di prognatismo e di mani grandi ma senza avere mai effettuato indagini in proposito.

RISULTATI

Determinazione della mutazione in eterozigosi c501+1G>A

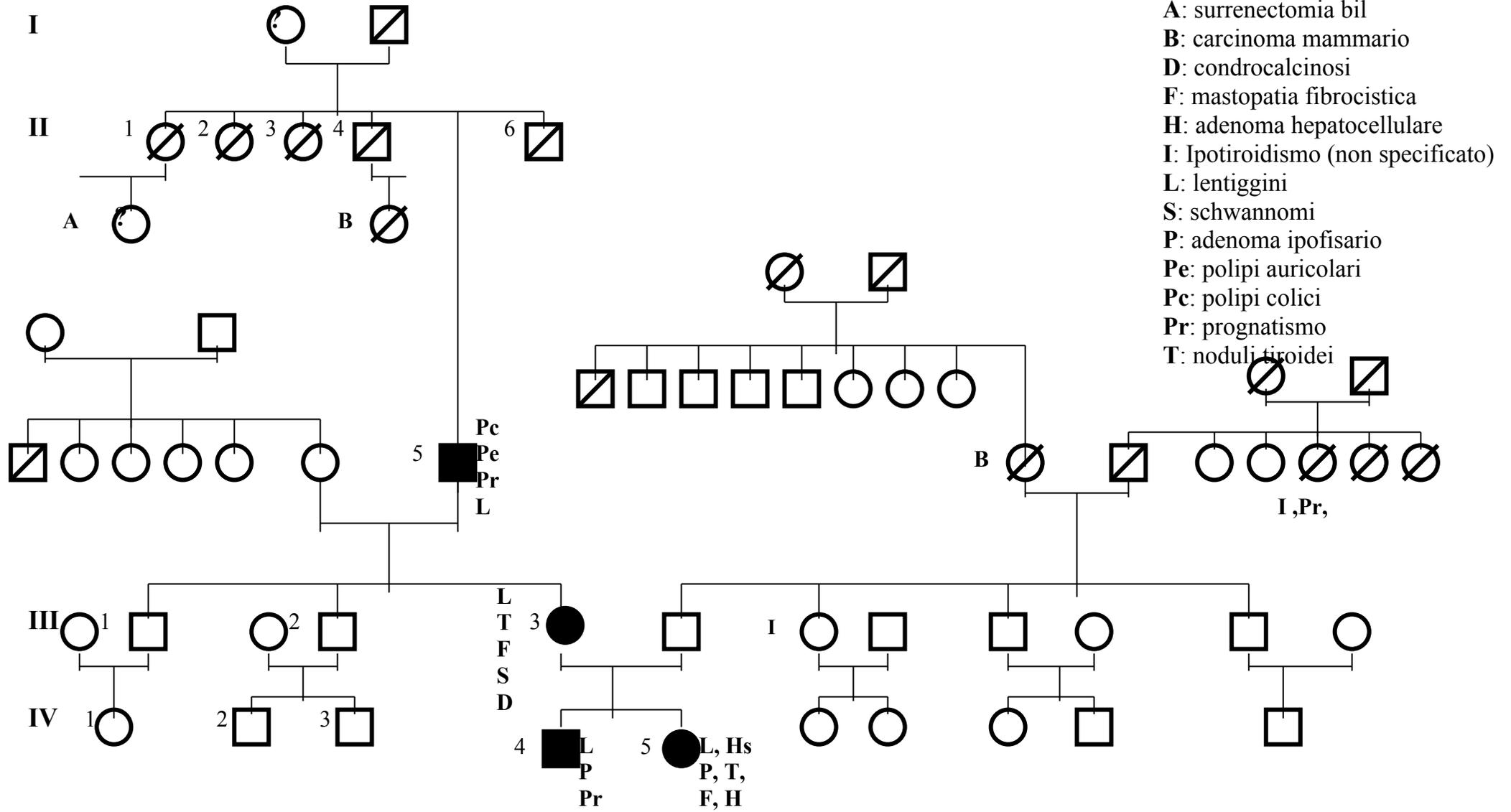
Il sequenziamento diretto degli esoni codificanti il gene PRKA1A nel caso indice ha rivelato la presenza di una singola sostituzione in eterozigosi in posizione +1 dell'introne 5. Tale mutazione altera la sequenza "GT" donatrice di splicing di consenso e presumibilmente distrugge il sito di splicing dell'introne 5, causando la perdita parziale o totale dell'introne stesso dal messaggero.

Vari componenti della famiglia sono stati analizzati e la stessa mutazione è stata trovata in tre di questi (vedi albero genealogico).

Effetti della mutazione sull'RNA messaggero

La delezione dell'esone 5 determina lo slittamento di lettura e conseguentemente la creazione di un prematuro codone di stop. Come in altre mutazioni del gene PRKA1A che determinano un prematuro codone di stop, si presume che l'allele mutato sia degradato dal meccanismo di decadimento nonsense-mediato del messaggero (NMD: nonsense mediated decay). Per prevenire l' NMD, abbiamo trasformato i linfociti della probanda con cyclohexamide. La RT-PCR è stata condotta usando primers per l'esone 5. Il trattamento ha portato alla stabilizzazione di un anomalo mRNA in cui mancava l'esone 5 per un prematuro codone di stop. Lo slittamento del quadro di lettura della sequenza avviene a livello del codone 147 che si modifica da AGA a AGG (R147R) e crea il codone di stop immediatamente dopo.

ALBERO GENEALOGICO DELLA FAMIGLIA

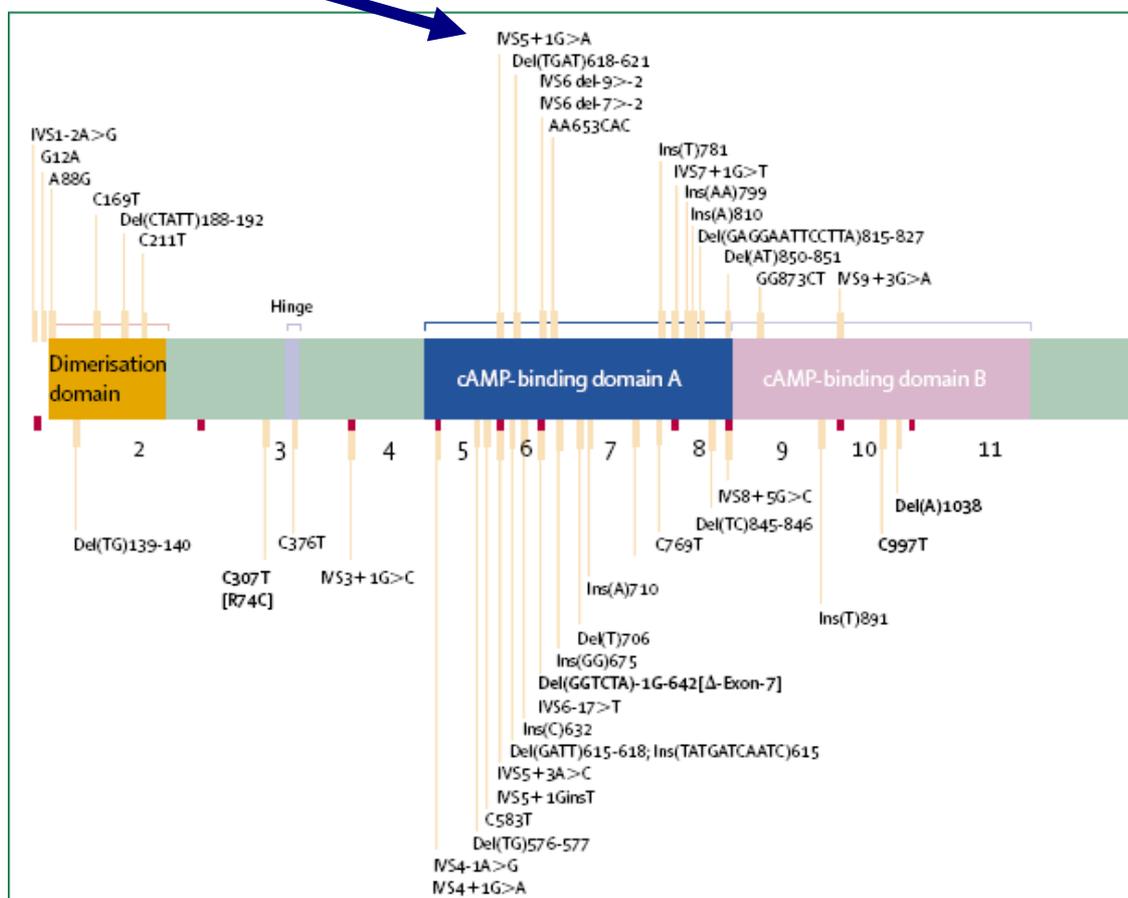


DISCUSSIONE

Il nostro lavoro ha portato alla definizione di una nuova mutazione del gene PRKA1A: la sostituzione in eterozigosi G>A della costante “GT” della sequenza donatrice di splicing dell'introne 5 nel pre-mRNA del gene PRKA1A. Tale variante è stata identificata in 4 soggetti – il caso indice e altri 3 membri della famiglia, studiati con l'analisi genetica dopo l'identificazione della mutazione nel probando. Il loro fenotipo era più sfumato ma rientrava ugualmente nei criteri diagnostici di CNC. Sembra quindi che la mutazione **c.502+1G>A** (figura 7) possa avere una espressione fenotipica estremamente variabile.

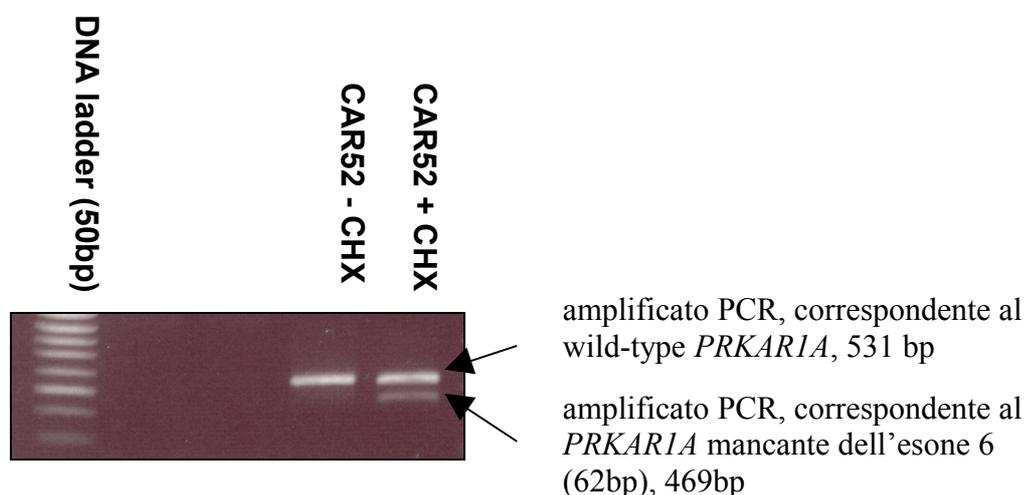
Figura 7.

Mutazione IVS5+G>A nella famiglia CAR52.



Per studiare l'effetto della variante c.502+1G>A in vitro, è stata creata una linea cellulare linfocitaria trasformata derivante dal sangue della probanda. Dopo aver bloccato il meccanismo NMD con ciclohexamide, è stata osservata una nuova variante di mRNA mancante dell'esone 5, il che potrebbe significare una ridotta efficienza di splicing del pre-mRNA mutato in confronto del controllo wild-type (figura 8).

Figura 8.



Le cellule sono state trattate per 6h con 200 micromolare di cyclohexamide (CHX) per abolire la degradazione nonsense mediate (NMD) del messaggero mutato (più corto).

Molte delle mutazioni del gene *PRKARIA* identificate finora, portano direttamente o per slittamento della lettura alla creazione di un prematuro codone di stop, e di queste circa il 25% rappresentano la variazione del sito di splicing. In seguito al processo di NMD, gli mRNA mutati sono degradati e l'effetto complessivo di

questo tipo di mutazioni è la riduzione dell'mRNA e della proteina wild-type del gene PRKA1A e la regolazione del pathway di segnale della protein chinasi A. Nel nostro studio abbiamo osservato un fenotipo attenuato in alcuni componenti della famiglia portatori della mutazione c.502+1G>A. La maggior parte delle mutazioni conosciute del gene PRKA1A sono caratterizzate da una penetranza del 100% . Recentemente è stata riportata una ridotta penetranza delle varianti di sito di splicing del gene PRKA1A; nella persona affetta questa variazione è stata associata *in primis* con una fenotipo *mild* e, nella maggior parte dei casi, solo con le più comuni manifestazioni del Carney Complex – per esempio la PPNAD. Una possibile spiegazione della ridotta penetranza delle mutazioni osservate potrebbe essere determinata dal fatto che meno del 100% delle molecole mutate sono soggette allo splicing alternativo.

La nostra famiglia riveste un ruolo importante perché la probanda ha presentato nella sua storia clinica l'interessamento epatico della malattia. Abbiamo trovato solo pochissimi casi in letteratura di lesioni tumorali epatiche nei soggetti affetti da CNC e il dato era considerato come un'associazione casuale.

In realtà gli studi murini hanno messo in evidenza come a livello delle cellule epatiche il pattern di attività delle PKA sia simile a quello di altri tessuti interessati (testicoli, surreni) così come a quello dei tessuti tumorali dei soggetti umani affetti da CNC (figure 4 e 5). Veugelers et al hanno trovato 5 casi su 17 topi *Prka1a +/-* con carcinoma epatocellulare mentre solo 2 topi *wild type* mostravano foci epatici di alterazione cellulare ma con preservata architettura e senza carcinoma.

La relazione del CNC col carcinoma epatocellulare non è particolarmente chiara. Il gene PRKA1A è stato inizialmente identificato come locus che reprime la trascrizione specialmente nelle cellule del carcinoma epatocellulare.

Le differenze fra il topo *Prka1a +/-*, che ha mostrato presentare epatocarcinomi, e i soggetti con CNC, che generalmente non li mostrano, può riflettere le differenze fra le varie specie per i diversi tipi tumorali o forse ancora non sono noti tutti i meccanismi che possono interagire nei soggetti per lo sviluppo di tali lesioni.

Il nostro caso può forse essere utile a sostenere che l'associazione di lesioni epatiche e CNC non sia completamente casuale nella specie umana.

In conclusione i pazienti affetti da CNC e/o mutazioni della linea germinale PRKA1A dovrebbero essere seguiti annualmente in follow up per le manifestazioni della malattia (vedi tabella), tale pratica potrebbe contribuire enormemente alla diagnosi precoce e, conseguentemente, alla prognosi.

Tabella 3. Gestione dei pazienti affetti da CNC

Valutazione dello stadio puberale e della velocità di crescita (bambini)

Indagini biochimiche ed ormonali: glicemia, cortisolemia, ritmo circadiano del cortisolo ematico/salivare, ACTH, GH, Prolattina, IGF1

Ecocardiogramma

TAC regione surrenale

RMN della regione ipofisaria e della colonna

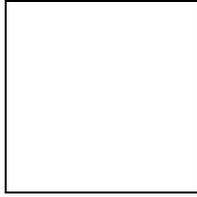
Ecografia tiroidea

Ecografia testicolare od ovarica

Il trattamento delle varie manifestazioni dipende dal tipo di tumore insorto. I mixomi cardiaci dovrebbero sempre essere rimossi chirurgicamente. Il migliore trattamento della PPNAD è la surrenectomia bilaterale, anche se, in certi casi, il Ketoconazolo o il Mitomane può essere usato per l'adrenolisi medica.

Gli adenomi ipofisari GH-secernenti possono essere rimossi chirurgicamente, ma il trattamento dell'acromegalia con analoghi della somatostatina può rappresentare sia un primo tentativo terapeutico che un adiuvante del trattamento chirurgico.

Gli schwannomi sono i tumori più difficili da trattare. Molte di queste neoplasie sono in prossimità o attorno ai nervi lungo la colonna vertebrale, una localizzazione che li rende inoperabili. In più, spesso metastatizzano a livello polmonare, del fegato o del cervello; e non c'è praticamente nessun trattamento medico o chirurgico efficace per tali lesioni metastatiche.

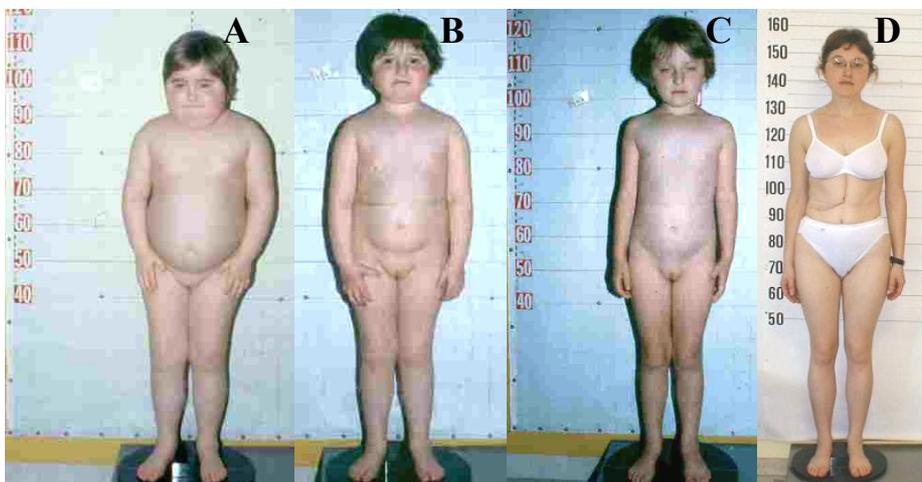


FOTO

Paziente CAR 52.IV.5



La paziente a 6 anni e 8/12, prima (A) e dopo 3 mesi dalla surrenectomia (B). C) a 7 anni e 4/12. D) a 28 anni.



Paziente CAR 52.IV.4



BIBLIOGRAFIA

1. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. **Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity.** *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5308-19.
2. Bertherat J. **Carney complex (CNC).** *Orphanet J Rare Dis.* 2006 Jun 6;1:21.
3. Boikos SA, Stratakis CA. **Carney complex: pathology and molecular genetics.** *Neuroendocrinology.* 2006;83(3-4):189-99. Review.
4. Boikos SA, Stratakis CA. **Carney complex: the first 20 years.** *Curr Opin Oncol.* 2007 Jan;19(1):24-9. Review
5. Bossis I, Stratakis CA. **Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions.** *Endocrinology.* 2004 Dec;145(12):5452-8. Epub 2004 Aug 26.
6. Bossis I, Voutetakis A, Bei T, Sandrini F, Griffin KJ, Stratakis CA. **Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm.** *Endocr Relat Cancer.* 2004 Jun;11(2):265-80. Review.
7. Bossis I, Voutetakis A, Matyakhina L, Pack S, Abu-Asab M, Bourdeau I, Griffin KJ, Courcoutsakis N, Stergiopoulos S, Batista D, Tsokos M, Stratakis CA. **A pleiomorphic GH pituitary adenoma from a Carney complex patient displays universal allelic loss at the protein kinase A regulatory subunit 1A (PRKARIA) locus.** *J Med Genet.* 2004 Aug;41(8):596-600.
8. Bourdeau I, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Sandrini F, Boikos S, Stratakis CA. **17q22-24 chromosomal losses and alterations of protein kinase a**

- subunit expression and activity in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Sep;91(9):3626-32.
9. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. **The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity.** *Medicine* (Baltimore). 1985 Jul;64(4):270-83.
 10. Carney JA. **The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity.** *Arch Intern Med.* 1987 Mar;147(3):418-9.
 11. Cazabat L, Ragazzon B, Groussin L, Bertherat J. **PRKAR1A mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease.** *Pituitary.* 2006;9(3):211-9.
 12. Cheung PS, Thompson NW. **Carney's complex of primary pigmented nodular adrenocortical disease and pigmentous and myxomatous lesions.** *Surg Gynecol Obstet.* 1989 May;168(5):413-6.
 13. Chrousos GP, Stratakis CA. **Carney complex and the familial lentiginosis syndromes: link to inherited neoplasias and developmental disorders, and genetic loci.** *J Intern Med.* 1998 Jun;243(6):573-9.
 14. DeMarco L, Stratakis CA, Boson WL, Jakbovitz O, Carson E, Andrade LM, Amaral VF, Rocha JL, Choursos GP, Nordenskjold M, Friedman E. **Sporadic cardiac myxomas and tumors from patients with Carney complex are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene.** *Hum Genet.* 1996 Aug;98(2):185-8.
 15. Doppman JL, Chrousos GP, Papanicolaou DA, Stratakis CA, Alexander HR, Nieman LK. **Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary adrenal hypercortisolism.** *Radiology.* 2000 Sep;216(3):797-802.
 16. Grant CS, Carney JA, Carpenter PC, van Heerden JA. **Primary pigmented nodular adrenocortical disease: diagnosis and management.** *Surgery.* 1986 Dec;100(6):1178-84.

17. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Robinson-White A, Lenherr S, Weinberg FD, Claflin E, Meoli E, Cho-Chung YS, Stratakis CA. **Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors.** *Cancer Res.* 2004 Dec 15;64(24):8811-5.
18. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Robinson-White A, Weinberg F, Meoli E, Bornstein SR, Stratakis CA. **A mouse model for Carney complex.** *Endocr Res.* 2004 Nov;30(4):903-11.
19. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Robinson-White A, Lenherr SM, Weinberg FD, Claflin ES, Batista D, Bourdeau I, Voutetakis A, Sandrini F, Meoli EM, Bauer AJ, Cho-Chung YS, Bornstein SR, Carney JA, Stratakis CA. **A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions.** *J Med Genet.* 2004 Dec;41(12):923-31.
20. Groussin L, Cazabat L, Rene-Corail F, Jullian E, Bertherat J. **Adrenal pathophysiology: lessons from the Carney complex.** *Horm Res.* 2005;64(3):132-9.
21. Groussin L, Horvath A, Jullian E, Boikos S, Rene-Corail F, Lefebvre H, Cephise-Velayoudom FL, Vantghem MC, Chanson P, Conte-Devolx B, Lucas M, Gentil A, Malchoff CD, Tissier F, Carney JA, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J. **A PRKAR1A mutation associated with primary pigmented nodular adrenocortical disease in 12 kindreds.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 May;91(5):1943-9.
22. Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J. **Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal**

tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet.* 2002 Dec;71(6):1433-42.

23. Gunther DF, Bourdeau I, Matyakhina L, Cassarino D, Kleiner DE, Griffin K, Courkoutsakis N, Abu-Asab M, Tsokos M, Keil M, Carney JA, Stratakis CA. **Cyclical Cushing syndrome presenting in infancy: an early form of primary pigmented nodular adrenocortical disease, or a new entity?** *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3173-82.
24. Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, de Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF, Stratakis CA. **Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population.** *Cancer Res.* 2006 Dec 15;66(24):11571-5.
25. Horvath A, Mathyakhina L, Vong Q, Baxendale V, Pang AL, Chan WY, Stratakis CA. **Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Feb;91(2):584-96.
26. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. **Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex.** *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):89-92
27. Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WH 2nd, Carney JA, Westphal H, Stratakis CA. **A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues.** *Cancer Res.* 2005 Jun 1;65(11):4506-14.
28. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA, Stratakis CA. **Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex.** *Hum Mol Genet.* 2000 Dec 12;9(20):3037-46.

29. Kirschner LS, Stratakis CA. **Protein kinase A and tumorigenicity: the example of micronodular adrenocortical hyperplasia and Carney complex.** *Endocr Res.* 2002 Nov;28(4):749-50.
30. Kirschner LS, Taymans SE, Stratakis CA. **Characterization of the adrenal gland pathology of Carney complex, and molecular genetics of the disease.** *Endocr Res.* 1998 Aug-Nov;24(3-4):863-4.
31. Libe R, Bertherat J. **Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases.** *Eur J Endocrinol.* 2005 Oct;153(4):477-87.
32. Libe R, Mantovani G, Bondioni S, Lania AG, Pedroni C, Beck-Peccoz P, Spada A. **Mutational analysis of PRKAR1A and Gs(alpha) in sporadic adrenocortical tumors.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005 May;113(5):248-51.
33. Matyakhina L, Pack S, Kirschner LS, Pak E, Mannan P, Jaikumar J, Taymans SE, Sandrini F, Carney JA, Stratakis CA. **Chromosome 2 (2p16) abnormalities in Carney complex tumours.** *J Med Genet.* 2003 Apr;40(4):268-77.
34. Pack SD, Kirschner LS, Pak E, Zhuang Z, Carney JA, Stratakis CA. **Genetic and histologic studies of somatomammotropic pituitary tumors in patients with the "complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas" (Carney complex).** *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Oct;85(10):3860-5
35. Papageorgiou T, Stratakis CA. **Ovarian tumors associated with multiple endocrine neoplasias and related syndromes (Carney complex, Peutz-Jeghers syndrome, von Hippel-Lindau disease, Cowden's disease).** *Int J Gynecol Cancer.* 2002 Jul-Aug;12(4):337-47.
36. Perdigao PF, Stergiopoulos SG, De Marco L, Matyakhina L, Boikos SA, Gomez RS, Pimenta FJ, Stratakis CA. **Molecular and immunohistochemical investigation of protein kinase a regulatory subunit type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas.** *Genes*

Chromosomes Cancer. 2005 Oct;44(2):204-11.

37. Robinson-White A, Hundley TR, Shiferaw M, Bertherat J, Sandrini F, Stratakis CA. **Protein kinase-A activity in PRKAR1A-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2.** *Hum Mol Genet.* 2003 Jul 1;12(13):1475-84.
38. Robinson-White A, Meoli E, Stergiopoulos S, Horvath A, Boikos S, Bossis I, Stratakis CA. **PRKAR1A Mutations and protein kinase A interactions with other signaling pathways in the adrenal cortex.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2380-8.
39. Robinson-White AJ, Leitner WW, Aleem E, Kaldis P, Bossis I, Stratakis CA. **PRKAR1A inactivation leads to increased proliferation and decreased apoptosis in human B lymphocytes.** *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10603-12.
40. Sandrini F, Kirschner LS, Bei T, Farmakidis C, Yasufuku-Takano J, Takano K, Prezant TR, Marx SJ, Farrell WE, Clayton RN, Groussin L, Bertherat J, Stratakis CA. **PRKAR1A, one of the Carney complex genes, and its locus (17q22-24) are rarely altered in pituitary tumours outside the Carney complex.** *J Med Genet.* 2002 Dec;39(12):e78.
41. Stergiopoulos SG, Stratakis CA. **Human tumors associated with Carney complex and germline PRKAR1A mutations: a protein kinase A disease!** *FEBS Lett.* 2003 Jul 3;546(1):59-64. Review.
42. Stratakis CA, Carney JA, Lin JP, Papanicolaou DA, Karl M, Kastner DL, Pras E, Chrousos GP. **Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2.** *J Clin Invest.* 1996 Feb 1;97(3):699-705.
43. Stratakis CA, Cho-Chung YS. **Protein kinase A and human disease.** *Trends Endocrinol Metab.* 2002 Mar;13(2):50-2.
44. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. **Carney complex: diagnosis and management of the complex of spotty skin pigmentation, myxomas,**

- endocrine overactivity, and schwannomas.** *Am J Med Genet.* 1998 Nov 2;80(2):183-5.
45. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. **Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4041-6.
46. Stratakis CA, Kirschner LS. **Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome.** *Horm Metab Res.* 1998 Jun-Jul;30(6-7):456-63.
47. Stratakis CA. **Genetics of adrenocortical tumors: Carney complex.** *Ann Endocrinol (Paris).* 2001 Apr;62(2):180-4.
48. Stratakis CA. **Genetics of Carney complex and related familial lentiginoses, and other multiple tumor syndromes.** *Front Biosci.* 2000 Mar 1;5:D353-66. Review.
49. Stratakis CA. **Clinical genetics of multiple endocrine neoplasias, Carney complex and related syndromes.** *J Endocrinol Invest.* 2001 May;24(5):370-83.
50. Stratakis CA. **Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit (PRKAR1A) in patients with the "complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas" (Carney complex).** *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;968:3-21.
51. Wilkes D, McDermott DA, Basson CT. **Clinical phenotypes and molecular genetic mechanisms of Carney complex.** *Lancet Oncol.* 2005 Jul;6(7):501-8.