



Marfan - Rene policistico



Amenophis IV



Abramo Lincoln



Nicolo' Paganini



Sergej V. Rachmaninov

Lezione 5



MARFAN I

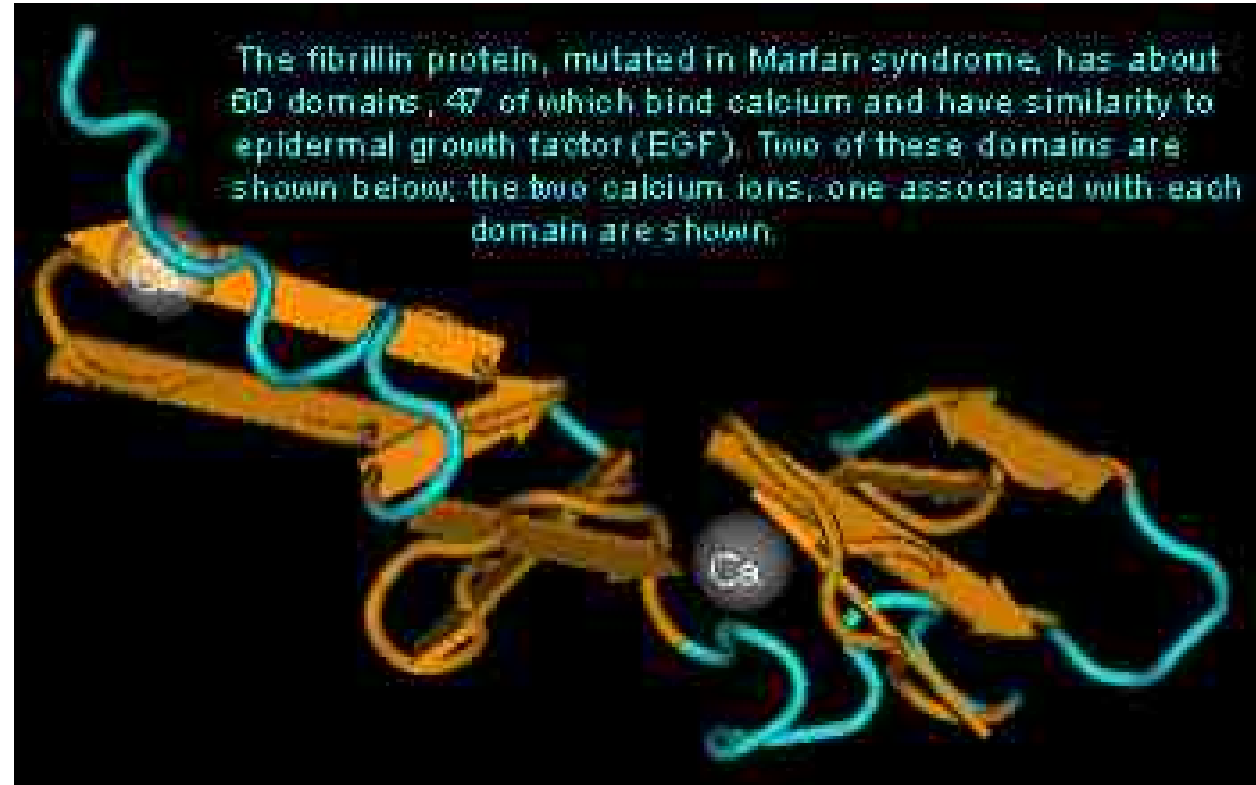
Questa patologia e' sistemica, dal momento che e' coinvolto il connettivo, e si presenta con un ampio spettro di espressivita', caratteristica comune e' l'altezza e la lassita' delle articolazioni

Il gene coinvolto in questa patologia e' FBN1 (Fibrillin 1), che mappa in 15q21.1, contiene 65 esoni, e' lungo 600 Kb, sono note oltre 400 mutazioni patogenetiche, nessuna delle quali limitata a popolazioni particolari. La patologia si tramette come autosomica dominante

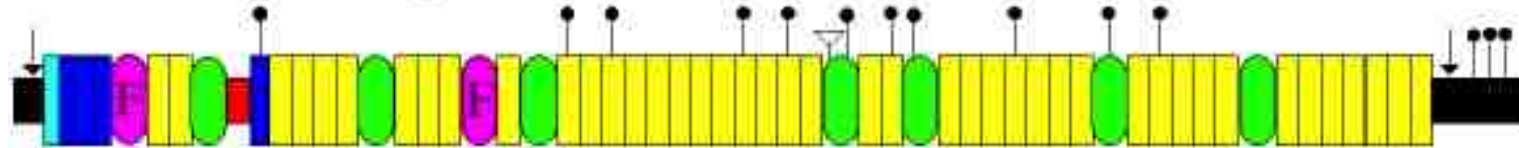
La fibrillina 1 e' una proteina della matrice extracellulare che contribuisce alla formazione delle miofibrille associandosi con altre proteine, da qui l'effetto dominante negativo.



la fibrillina



Domain organization of fibrillin-1. Blue rectangle: non-calcium binding epidermal growth factor like module (EGF); yellow rectangle: cbEGF module; green oval: latent transforming growth factor b1 binding protein (LTBP module, also referred to as TGFb1bp module); purple oval with ?F?: Fib module; red bar: proline-rich region, black bars: N- and C-terminal regions. 14 putative N-glycosylation sites are shown as black dots above the protein, N- and C-terminal proteolytic processing sites are shown as arrows, and an RGD motif cell-attachment signal is shown as a white triangle.





MARFAN II

Circa il 75% degli affetti hanno un genitore affetto (la fitness non è ridotta), il restante 25% sono *de novo*, il mosaicismo germinale è raro. La diagnosi prenatale è possibile, ma raramente viene richiesta

L'analisi molecolare viene richiesta per conferma della diagnosi, che per il coinvolgimento sistemico e il livello di espressività, in mancanza di storia familiare è difficile: con lo studio molecolare vengono individuate circa il 90% delle mutazioni. Altrimenti si ricorre al linkage

Dal momento che alcuni soggetti potrebbero essere portatori senza saperlo l'analisi viene richiesta come test predittivo (Test a cui si sottopongono individui asintomatici, con una storia familiare di malattia genetica)



MARFAN III

Tipo di mutazioni:

- ⇒ missenso/nonsense ~ 65%
- ⇒ errori di splicing ~ 10%
- ⇒ piccole delezioni ~ 12%
- ⇒ piccole inserzioni/indel ~ 6%
- ⇒ grosse delezioni/inserzioni ~ 2%



MARFAN IV

Analisi di mutazioni: utilizzando i test di ricerca di mutazioni note sul genomico e/o sequenziando il cDNA e/o il gDNA si ottiene un'efficienza pari 70%-93%.

L'efficienza e' legata a:

- ☞ accuratezza della diagnosi
- ☞ tipo di mutazione : alcune possono non essere evidenziate dai test routinari
- ☞ efficienza del test

⇒ sequenziare il cDNA permette di evidenziare tutte quelle mutazioni che comportano splicing errato (sul gDNA non sarebbero evidenziabili)

⇒ sequenziare il gDNA permette di evidenziare quelle mutazioni che portano ad una rapida degradazione dell'RNA

☹ **attenzione nel sequenziare !!!**



Attenzione

Sequenziamento tenendo presente che se si trova una mutazione:

- ☞ Mutazione mai descritta in letteratura, ma che potrebbe essere patogenetica (il meccanismo di azione del prodotto e' noto): e' presente in altri soggetti sani della famiglia?
- ☞ Mutazione mai descritta in letteratura, con effetto ignoto sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ☞ Mutazione mai descritta in letteratura, ma il cui effetto si ritiene innocuo sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ☞ Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere innocuo sulla funzionalita' (come?)



Attenzione

Sequenziamento: si e' risposto SI a tutte le domande precedenti, quindi non si e' trovato niente di chiaramente patogenetico. Che vuol dire?

Il probando, chiaramente malato, ha una mutazione ad un altro locus, Diagnosi errata o il prodotto del secondo ipotetico locus interagisce con il primo e quindi il fenotipo e' uguale

Il probando, chiaramente malato, ha una mutazione che non visibile perche' si manifesta durante la maturazione dell'RNA.



MARFAN V

Analisi di linkage: se non si trova niente, si e' sicuri della diagnosi, l'analisi di linkage con polimorfismi interni al gene, e' informativa al 100% ed e' utile per la predittiva ma...

L'analisi di linkage non puo' essere utilizzata:

☞ quando nella famiglia l'affetto e' uno solo

☞ In presenza di fenotipi atipici che potrebbero essere legati ad altri locus (difficolta' legata all'aspetto sistemico della malattia)

💣 Tuttavia in famiglie in cui la diagnosi e' certa e ci sono piu' membri affetti si puo' al 100% identificare l' "allele Marfan" , cioe' quale e' la regione genomica che porta la mutazione patogenetica (qualunque essa sia)



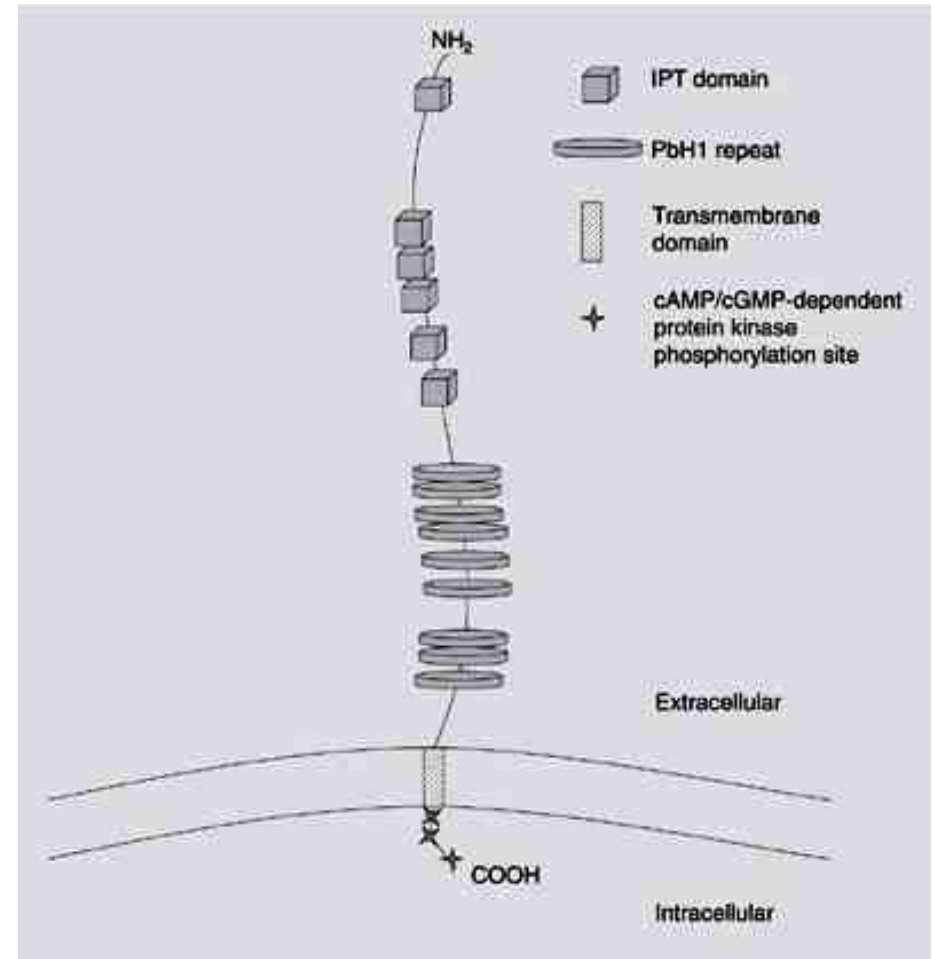
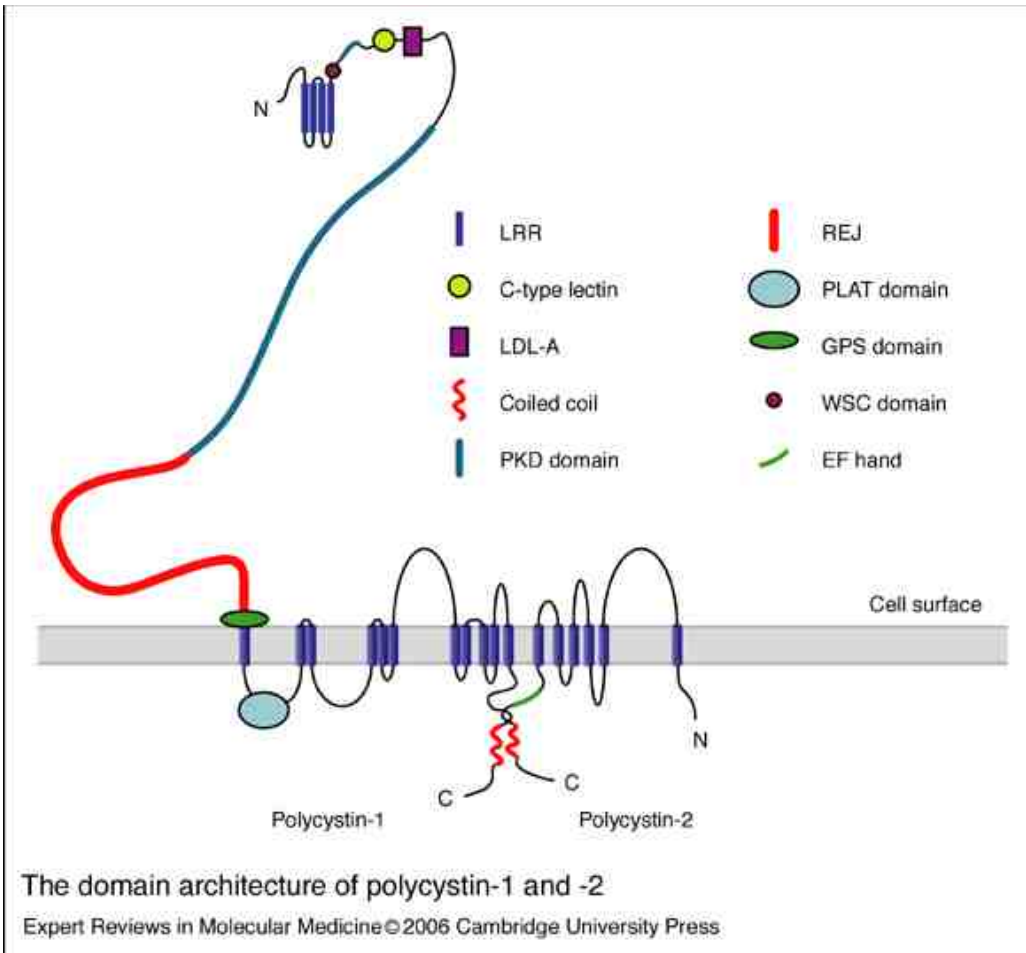
MARFAN VI

La relazione genotipo fenotipo non e' ben definita anche se si e' cercato di stabilire una relazione fra le diverse regioni del gene e l'effetto sul fenotipo della loro mutazione patogenetica, tenendo sempre presente che l'espressivita' e' diversa anche all'interno della stessa famiglia. Generalizzando:

- ☞ quelli che presentano il fenotipo neonatale (+grave) di solito hanno mutazioni nella parte centrale del gene (regione mutata tuttavia anche in alcuni con forma lieve o canonica)
- ☞ Le inserzioni, delezioni o errori di splicing senza perdita della frame, della regione centrale sono associate a manifestazioni piu' gravi.
- ☞ Mutazioni che provocano un trascritto piu' corto che viene degradato rapidamente o che impediscono la maturazione post traduzionale del C-terminale, sostituzioni aa che modificano le interazioni con altre molecole hanno fenotipi da lievi a canonici



Rene policistico





cosa e' il rene policistico



Il termine rene policistico e' molto vago: significa solo che nel parenchima

renale si formano delle cisti acquose che crescono progressivamente fino a compromettere la funzionalita' renale, in realta' le cause possono essere molte e non tutte genetiche.

Le forme ereditarie sono 2 entrambe autosomiche a trasmissione sia dominante che recessiva. In entrambe ad essere compromessi sono anche altri distretti dell'organismo.

Questo non deve sorprendere dal momento che in entrambi i casi il problema risiede in molecole mutate che si trovano anche in altri organi.



Rene policistico autosomico dominante ADPKD

L'ADPKD e' una malattia sistemica di solito ad insorgenza tardiva, caratterizzata da cisti renali bilaterali, da cisti in altri organi come fegato pancreas e membrana aracnoide, anormalita' vascolari che possono portare ad aneurismi.

Nel passato veniva indicata come rene policistico dell'adulto perche la sua caratteristica e' di comparire in media intorno ai 30 anni. In realta' con il miglioramento della diagnostica per immagini si puo' riconoscerlo a livelli subclinico anche nei bambini.



ADPKD

Non e' una patologia rara l'incidenza e' compresa fra 1/400 1/1000. E' dominante, e' presente eterogeneita' di locus e la storia familiare e' un elemento importante per la diagnostica e la consulenza.

Essendo ad insorgenza tardiva e con espressivita' variabile, non e' detto che altri membri della famiglia siano stati identificati: potrebbero essere morti prima della comparsa della malattia conclamata. E quindi il probando sembra una nuova mutazione

La malattia e' dominante quindi per i fratelli il rischio e' 50% se si puo' dimostrare la familiarita', altrimenti, se il probando e' una nuova mutazione, e' 0. Il mosaicismo germinale non e' stato dimostrato, ma non puo' essere escluso a priori



ADPKD: i geni

Sono due i geni coinvolti nella patologia: PDK1 (~nell'85%) e PDK2 (nel restante ~15%). si sospetta però, che il restante sia dovuto a mutazioni in un terzo gene non ancora identificato

Questa è una complicazione in più nella diagnostica molecolare: se non si trova la mutazione non vuol dire che non sia APDKD.

Vista l'eterogenità di locus e la espressività variabile anche all'interno della famiglia, in questa patologia la diagnostica per immagini è uno strumento indispensabile per la consulenza.



PDK1

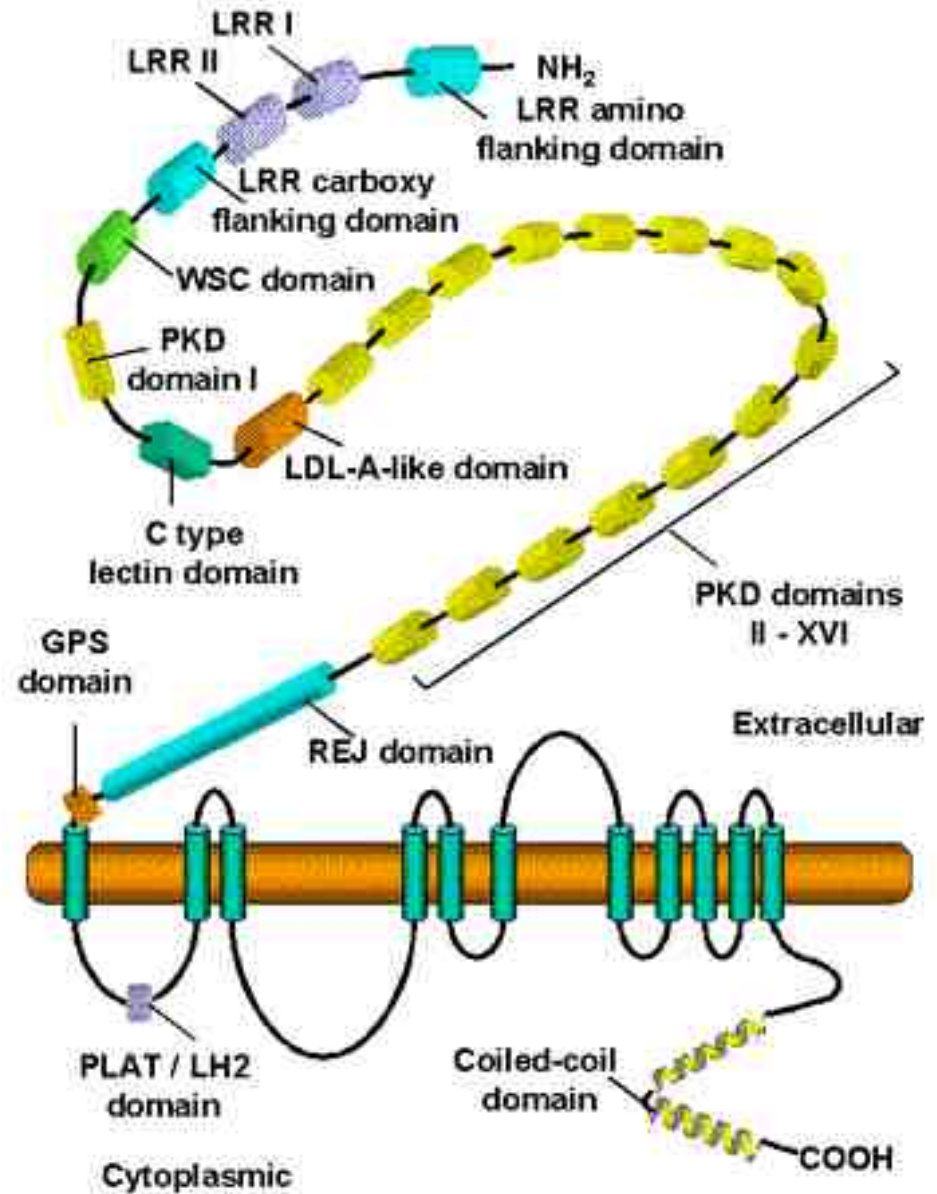
Mappa in 16p13.3, occupa una regione di circa 52 kb, ha 46 esoni e almeno 6 pseudogeni nella regione vicina. La presenza di questi pseudogeni che conservano una similarita' elevata con il gene PKD1 ha reso piu' complicata la messa a punto di protocolli di diagnostica molecolare. Il suo trascritto lungo circa 14 kb, presenta 3 isoforme dovute a splicing alternativo, la cui funzione non e' nota

E' un gene conservato nella scala zoologica un ortologo e' stato descritto negli anfibi e nei pesci ed e' stato descritto un omologo anche nel lievito e in Drosophila



PDK1

Il suo prodotto la policistina 1, e' una proteina transmembrana, lunga 4303 aa, del peso di circa 460 kDa. Ha numerosi domini. in particolare: 11 domini transmembrana, il C-terminale citoplasmatico breve che costituisce il dominio di interazione con PKD2, il segmento extracellulare (N-terminale) piuttosto lungo, ha due repeat ricchi in leucina.

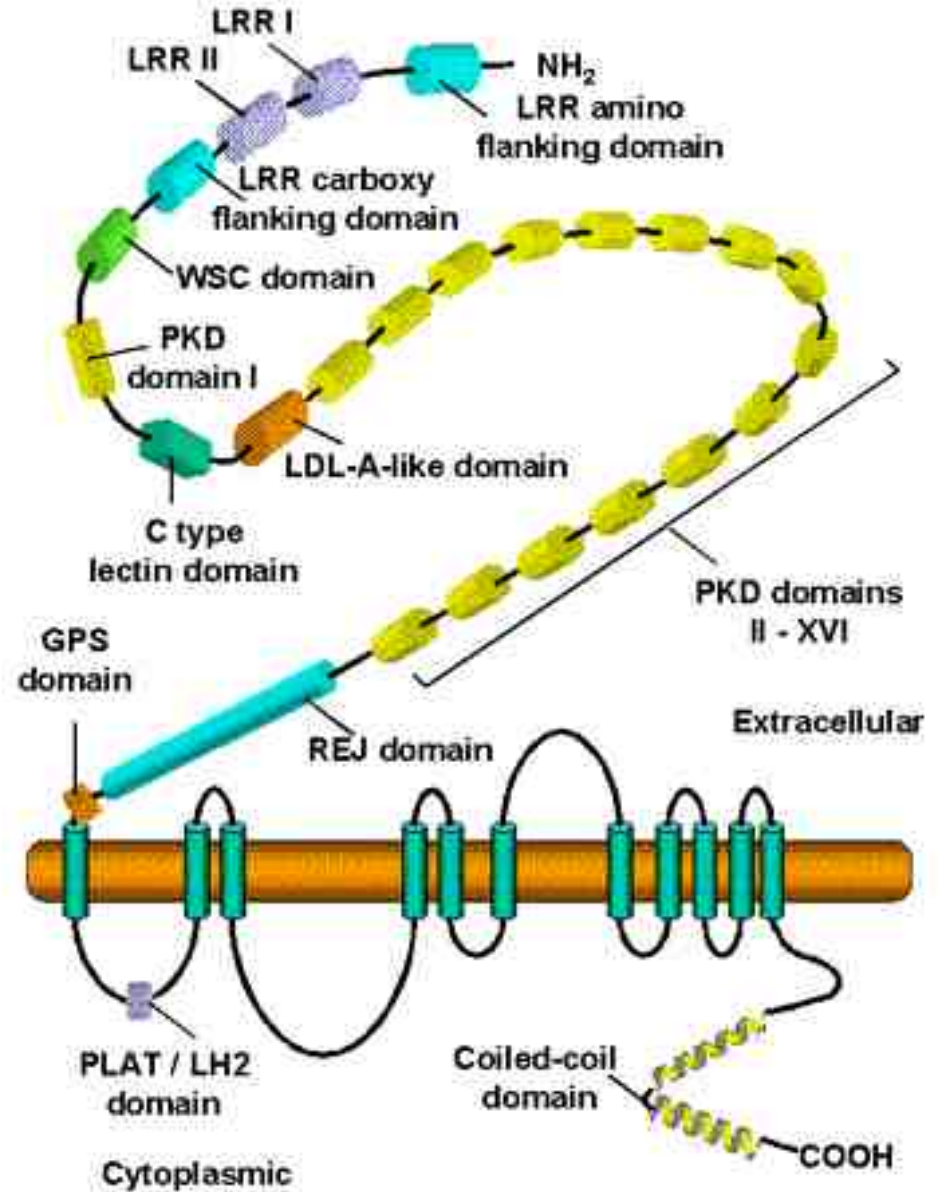




PDK1

La funzione di questa proteina non è chiara: potrebbe avere la funzione di recettore per diverse proteine e carboidrati, come pure avere una funzione nella trasmissione del segnale, e/o essere un regolatore di canali ionici, e/o funzioni per mantenere l'adesione cellulare, di sicuro forma un eterodimero con PKD2

Sono presenti numerosi alleli patogenetici, a volte privati, in ~ 3% sono delezioni. La caratteristica comune è che provocano proteine troncate che non possono essere utilizzate

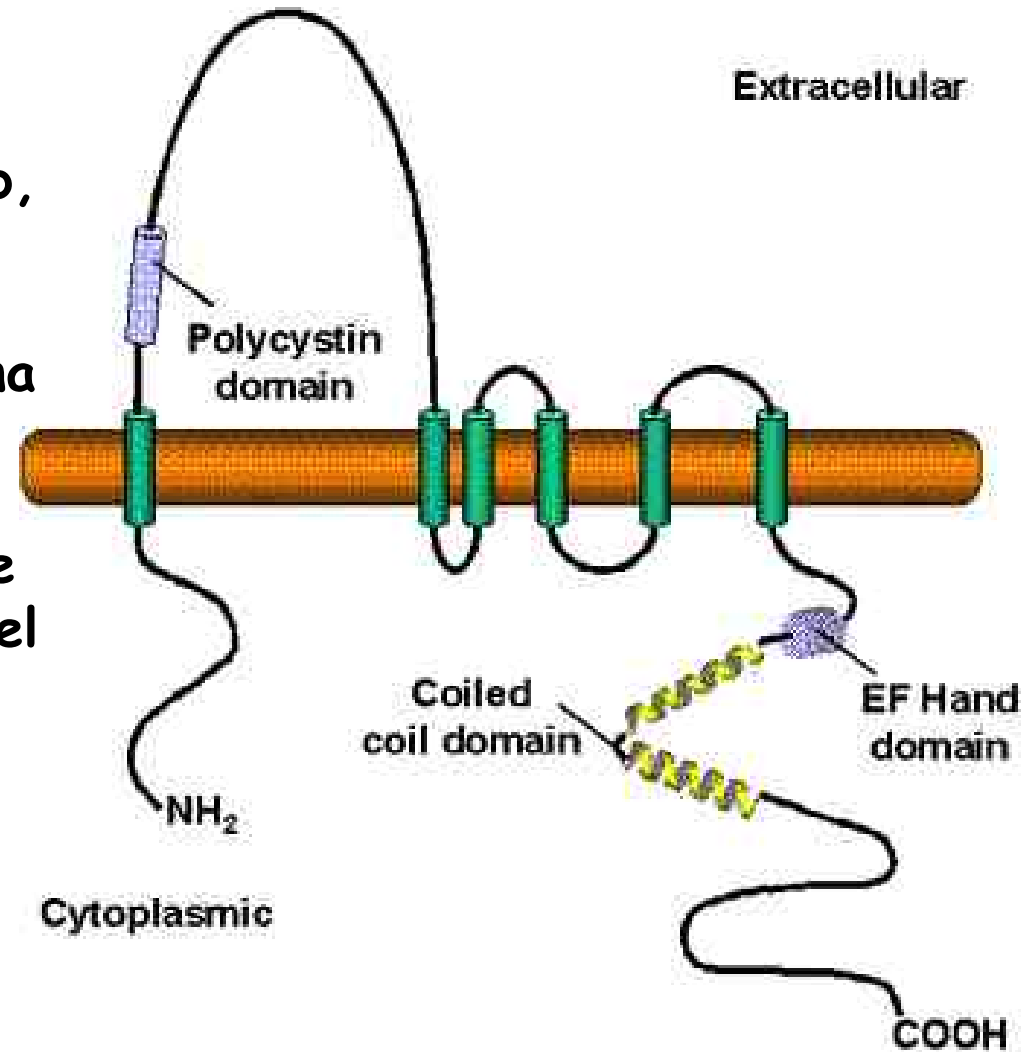




PDK2

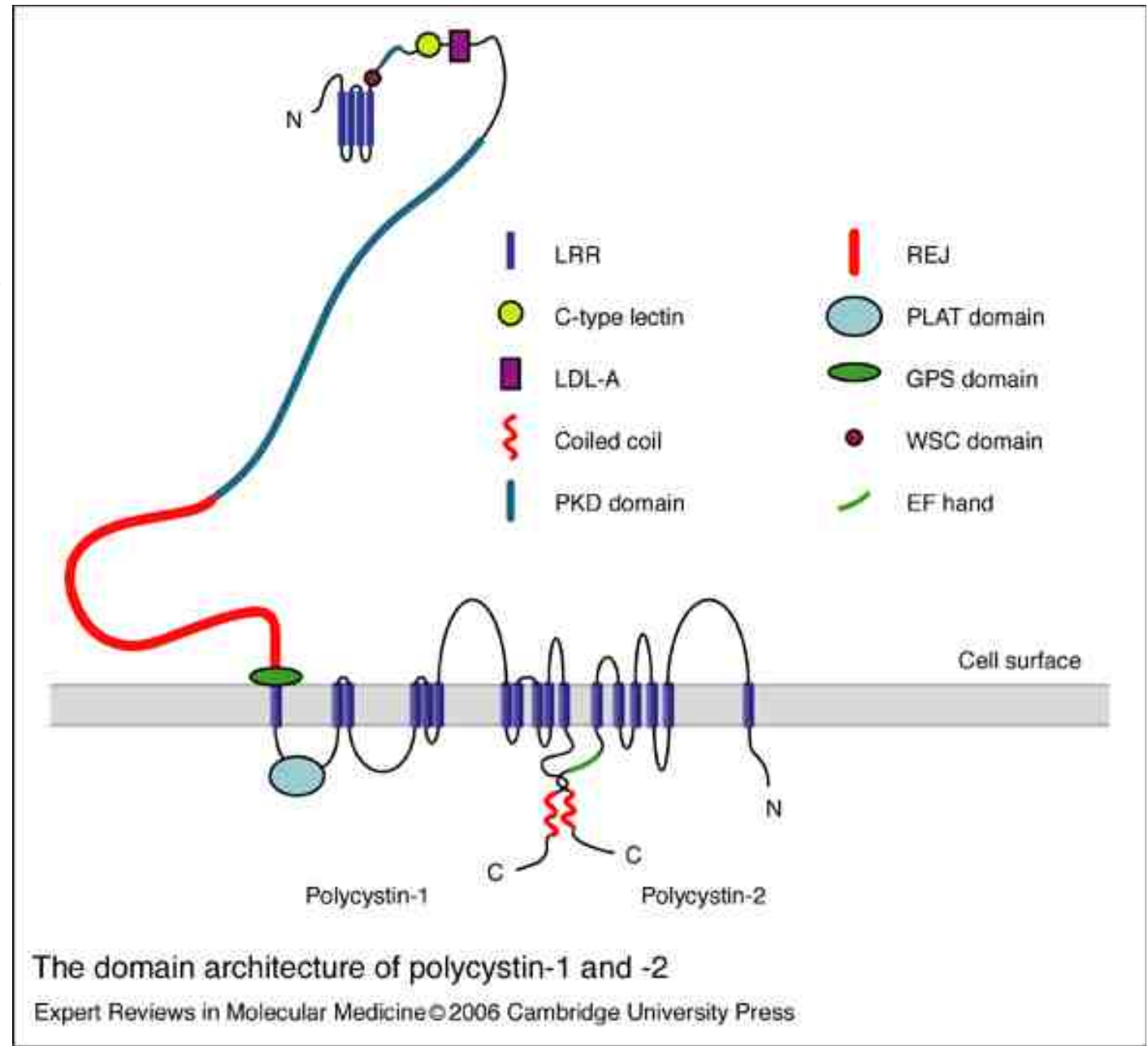
E' il secondo gene coinvolto nel ADPKD (~ 15%). Mappa in 4q22, e' lungo 70 kb, ha 15 esoni. Il suo prodotto e' la policistina 2, che contiene 968 aa e ha un peso di circa 110kDa. E' una proteina transmembrana con 6 domini transmembrana, il C e N terminali sono entrambi citoplasmatici, e l'N-terminale dovrebbe giocare un ruolo importante nel mantenimento della morfologia del glomerulo e del tubulo.

La sua funzione dovrebbe essere quella di regolare la permeabilita dello ione calcio, attraverso il suo C-terminale eterodimerizza con il corrispondente di PKD1





PDK1 + PDK2





Diagnosi APDKD

la diagnosi molecolare e' complessa per la complessita' di PDK1 Sembra tuttavia che con il sequenziamento si possano individuare circa l'85% delle mutazioni patogenetiche a carico di entrambi i geni coinvolti.

L'analisi di linkage per identificare i soggetti portatori, ma preasintomatici, ha il grosso limite di essere informativa solo se le famiglie sono ampie e se la diagnosi e' sicura.



Rene policistico autosomico recessivo ARPKD

E' una patologia sistemica che coinvolge sostanzialmente due organi: il rene e il fegato, le altre manifestazioni sono secondarie alla patologia renale ed epatica. E' distinta dalla forma dominante, anche se coinvolge primariamente lo stesso organo. A differenza della forma dominante questa patologia compromette pesantemente le aspettative di vita. Circa il 30% degli affetti muore nel periodo neonatale. La sopravvivenza fino un anno e' circa l'85%, di quelli che superano l'anno di vita circa l'80% raggiunge i 10 anni, mentre raggiungono l'adolescenza circa il 70% . di solito la sopravvivenza non supera i 50 anni.



ARPKD

L'incidenza della patologia e' ritenuta essere compresa fra 1/20.000 e 1/40.000. Questo ampio margine si ritiene sia dovuto al fatto che i neonati muoiono prima di poter fare una diagnosi certa e che altri si aggiungono solo durante l'adolescenza a seguito della diagnostica molecolare, e quindi non risultano nel conteggio degli affetti alla nascita.

Si ritiene che i portatori nella popolazione generale siano 1/70.

La penetranza e' 100% con una espressivita' variabile fra le famiglie. La patologia si trasmette come autosomica recessiva, da cui deriva che i genitori del probando sono eterozigoti obbligati e sono asintomatici.



ARPKD ricorrenza

Rischio di ricorrenza: i genitori sono eterozigoti e portatori sani . Al momento del concepimento: 25% affetti m/m, 50% portatori sani wt/m, 25% non portatori e quindi wt/wt. I fratelli già nati e non affetti hanno 2/3 di probabilità di essere portatori

Naturalmente nelle famiglie in cui si è identificata la mutazione, lo stato di portatore dei fratelli viene definito in maniera inequivocabile dal test genetico. Mentre per la presenza di allelia multipla non è possibile individuare l'eterozigote nella popolazione.



ARPKD ricorrenza

Nel caso di affetti che raggiungono l'età riproduttiva dipende dal genotipo del partner: la frequenza dei portatori nella popolazione è $1/70$ (1,42%).

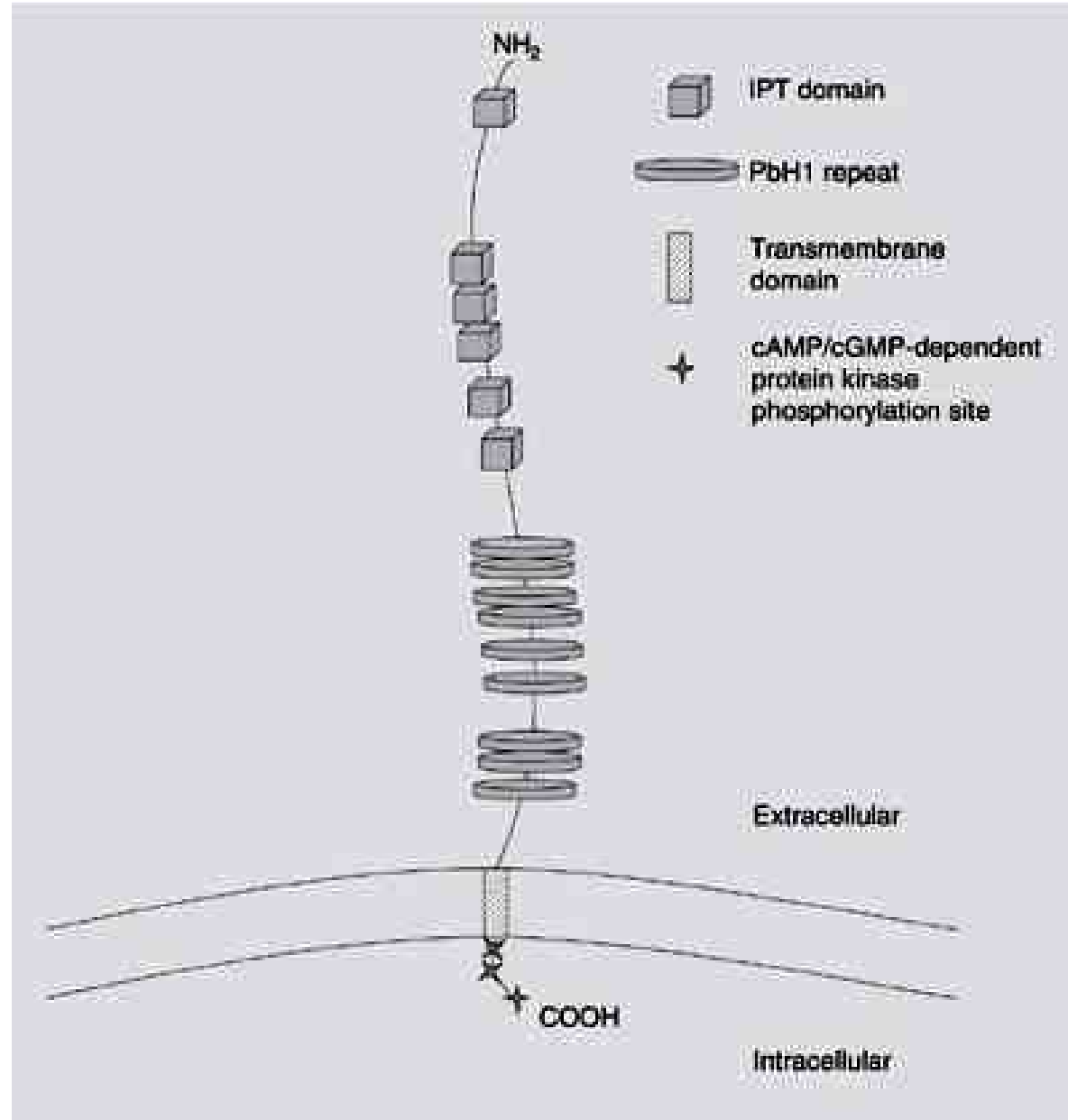
Quindi:

- ⇒ La probabilità per un affetto di avere un figlio affetto nel caso di partner wt/wt è 0, mentre è 100% di averli portatori.
- ⇒ La probabilità nel caso di partner portatore è circa 0,7% sia malato che portatore: $1,42(\text{probabilità di eterozigosi}) \times 1$ (il proposito è portatore dell'allele) $\times 50$ (è un incrocio Aa x aa: $1/2$ Aa, $1/2$ aa)



ARPKD: il gene

PKHD 1 e' l'unico gene le cui mutazioni sono state associate al ARPKD. Mappa in 6p12, e' lungo 472,28 kb ed e' composto da 67 esoni e produce almeno 4 trascritti. Il suo prodotto, la fibrocistina, e' un recettore di membrana lungo 4072 aa del peso di 447 kDa. La sua funzione non e' chiara, sembrerebbe agisca durante il differenziamento nei dotti collettori e biliari.





PKHD1

Gli alleli patogenetici sono molti e spesso sono privati (presenti in una sola famiglia), distribuiti lungo tutto il gene, e non c'è nessun "hot spot". La maggior parte di esse sono missenso o non senso, che portano alla formazione di una proteina troncata nel 45% delle famiglie studiate.

Una chiara correlazione genotipo-fenotipo non è possibile visto il gran numero di mutazioni, sembra tuttavia che le non senso provochino il fenotipo più grave e due alleli non senso sono letali in epoca neonatale. Le missenso sembrano meglio tollerate e l'eterozigote composto nonsenso/missenso non è letale.



Diagnosi ARPKD

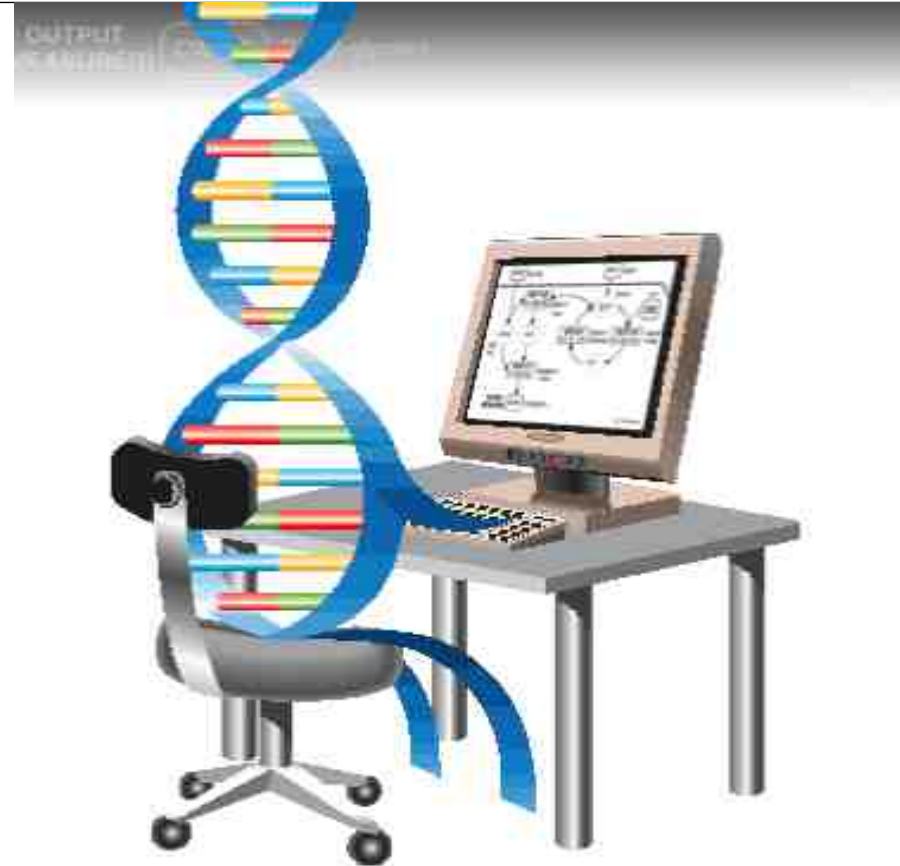
La diagnosi molecolare e' complicata dal gran numero di mutazioni, e dalla grandezza del gene, l'identificazione delle mutazioni e' tuttavia indispensabile per poter eseguire una diagnosi prenatale, che viene richiesta visto l'alto tasso di mortalita' infantile di ARPKD.

La tecnica di elezione e' la DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), permette di identificare almeno una mutazione in circa il 92-98% di affetti, il limite e' quello legato alla difficile interpretazione di eventuali variazioni nella sequenza che potrebbero essere dei polimorfismi e non mutazioni patogenetiche.



Diagnosi ARPKD

Un'altra possibilita' viene dagli studi di linkage che in teoria dovrebbero essere facilitati dal fatto che la patologia e' recessiva e quindi sicuramente familiare e dalla presenza di polimorfismi intragenici, che possono permettere di identificare senza dubbi l'aplotipo che porta l'allele ARPKD. In effetti e' cosi, ma c'e' un limite che e' costituito dal fatto che bisogna essere certi che non ci sia un genitore affetto dalla forma dominante che non ha ancora manifestato la malattia. In questo caso l'affetto sarebbe una forma di rene policistico dominante.



NON sono dispense, ma un ausilio allo studio sul libro