

	<b>TEST MOLECOLARE PER LA MALATTIA POLICISTICA RENALE AUTOSOMICA DOMINANTE</b>
<b>CONTESTO</b>	<p>L'insufficienza renale cronica è una condizione caratterizzata da una riduzione delle capacità di filtrazione del rene, con un decorso progressivo e irreversibile. La malattia policistica renale autosomica dominante (ADPKD) rappresenta &gt;95% di tutte le malattie cistiche renali che comportano perdita di funzionalità renale. La sua incidenza infatti è variamente descritta in letteratura tra 1:400 e 1:1000 nati vivi. La frequenza di ADPKD non è trascurabile se si considera che è più comune della malattia di Huntington, dell'emofilia, dell'anemia falciforme, della fibrosi cistica, della distrofia muscolare, e della sindrome di Down combinate insieme.</p> <p>La ADPKD è trasmessa come carattere autosomico dominante: pertanto ogni soggetto affetto ha una probabilità del 50% di trasmettere la mutazione ai propri figli. La maggior parte degli individui affetti ha uno dei genitori con ADPKD, ma in circa il 10% dei pazienti la mutazione è insorta <i>de novo</i>.</p> <p>ADPKD è prevalentemente associata a mutazioni in due geni denominati PKD1 (85% dei casi) e PKD2 (15% dei casi) (Veldhuisen B. et al, 1997; Rossetti S. et al, 2001; 2002). E' riportato che l'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto ha una sensibilità dell'85% circa. Attualmente sono note circa 340 mutazioni in PKD1 e PKD2 (Rossetti et al., 2007). Poiché la maggior parte delle mutazioni sono uniche, e circa un terzo delle mutazioni di PKD1 sono cambiamenti aminoacidici, non è sempre facile dimostrarne la patogenicità.</p>
<b>OBIETTIVI - FINALITÀ</b>	<p>L'intensa attività che si è venuta a creare negli ultimi anni all'interno dell'Istituto Scientifico San Raffaele su questo tema e la realizzazione di una più ampia collaborazione con tre importanti gruppi italiani di Nefrologia clinica, hanno permesso di definire una serie di obiettivi che spaziano dalla ricerca clinica, alla diagnostica molecolare sul paziente, con i seguenti risultati:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Identificazione delle mutazioni dei geni PKD1 e PKD2 nella popolazione italiana ed espressione delle nuove varianti in modelli in vitro.</li> <li>- Sviluppo di nuovi strumenti/protocolli diagnostici e prognostici mediante una accurata definizione clinica dei pazienti e mediante il miglioramento degli algoritmi interpretativi per le varianti genetiche identificate</li> <li>- Creazione di un network interdisciplinare tra ricercatori, laboratori clinici, nefrologi, genetisti con un beneficio diretto per i pazienti e le loro famiglie</li> <li>- Creazione di un database clinico-genetico che raccolga il Registro dei pazienti italiani con ADPKD.</li> </ul>
<b>STRATEGIA-METODOLOGIA</b>	<p>Per quanto riguarda la clinica, la genetica clinica, la ricerca sia di base sia applicata in campo bio-molecolare e bio-medico, abbiamo operato un rafforzamento delle attività allo scopo di ampliare le conoscenze sulla patogenesi della malattia con un beneficio diretto ai pazienti. Riteniamo che questi studi possano essere molto utili per stabilire una correlazione tra il difetto molecolare (genotipo) e la sintomatologia clinica dell'ADPKD (fenotipo), per la definizione di elementi utili alla prognosi della malattia, nonché per l'eventuale identificazione di nuovi marcatori diagnostici e, non meno importante, di terapie efficaci.</p>

<b>STRUMENTI</b>	<p>Abbiamo deciso nel 2008 di creare un database delle mutazioni ADPKD registrate nel territorio italiano nell'ambito di un Consorzio di studio che coinvolge tre Università Italiane e grazie ad un finanziamento del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica. Crediamo che questo strumento possa aiutare i ricercatori e i clinici ad aumentare la conoscenza riguardante il ruolo delle varianti genetiche in questa patologia. Esso raccoglie i dati di mutazione raccolti dal nostro consorzio nel primo anno e mezzo di attività e ha l'ambizione di divenire luogo di concentrazione di questi dati su scala nazionale. Il registro si basa sul Leiden Open (Source) Variation Database (LOVD) (4) ed è liberamente accessibile attraverso la pagina web <a href="http://grenada.lumc.nl/LOVD2/PKD/home.php">http://grenada.lumc.nl/LOVD2/PKD/home.php</a>.</p> <p>Il database verrà ampliato con un numero maggiore di dati molecolari per i geni PKD1 e PKD2. Ogni gene ha la propria homepage dalla quale si può avere accesso a diverse informazioni riguardanti lo specifico gene, i curatori del database, le sequenze di riferimento e tavole riassuntive riguardanti la posizione e la natura delle mutazioni caratterizzate. Sono utilizzabili inoltre strumenti di ricerca per l'individuazione rapida di determinate mutazioni e la navigazione attraverso le stesse. Inoltre, sono disponibili collegamenti a risorse orientate al gene quali MIM (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>), Entrez (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez</a>) e HGMD (<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk">http://www.hgmd.cf.ac.uk</a>). Infine sono raggiungibili risorse in grado di generare disegni schematici indicanti la collocazione delle varianti patogenetiche in relazione alla struttura genica e proteica. Le mutazioni sono descritte in accordo alla "Human Genome Variation Society" (HGVS)(5) ed identificate da un univoco codice ID.</p>
------------------	---

<p><b>PROCESSO LABORATORIO</b></p> <p><b>DI</b></p>	<p>Il test molecolare viene eseguito: i) per confermare la diagnosi clinica quando esiste un margine di incertezza; ii) per eseguire una diagnosi pre-sintomatica, quando i dati di imaging non sono risolutivi, o quando è richiesta l'esclusione ad esempio in un soggetto imparentato al paziente e potenziale donatore di rene. La diagnosi pre-natale o la diagnosi pre-impianto non sono richieste spesso in quanto la patologia si presenta solitamente nell'età adulta (Zerres et al. 1993).</p> <p>La caratterizzazione molecolare dei pazienti con ADPKD, anche se presenta ancora alcune difficoltà, sia tecniche che interpretative, sta assumendo un ruolo importante, sia per gli studi clinici e in prospettiva per l'interpretazione dei risultati dei trial terapeutici. Infatti, la speranza è di sviluppare terapie che permetteranno di trasformare profondamente la situazione attuale dei pazienti e di arrivare ad una diagnosi precoce tale da permettere interventi terapeutici preventivi.</p> <p>Attualmente, il test genetico è basato su sequenziamento diretto dei geni PKD1 e PKD2 con il metodo Sanger. Questo metodo è molto impegnativo per quanto riguarda l'analisi e l'interpretazione dei risultati, perché si tratta di analizzare per ogni paziente circa 18.000 basi di DNA. Stiamo sviluppando un nuovo protocollo basato sulle nuove metodiche di sequenziamento (Next Generation Sequencing) che ci permetterebbe un abbattimento dei tempi di esecuzione di quasi un ordine di grandezza.</p> <p>Il test genetico è sempre preceduto da un colloquio pre-test per la raccolta del consenso informato. Tutti i campioni e i dati sensibili relativi ai pazienti sono trattati nel rispetto delle norme vigenti in tema di "privacy".</p> <p>In breve, il DNA genomico, estratto da campioni di sangue periferico, è amplificato con la PCR. I prodotti di PCR sono sequenziati su entrambi i filamenti e caricati su sequenziatori automatici (AB 3730 o 3130xl). I file di sequenza vengono allineati rispetto alle sequenze di riferimento (ENSG00000008710 e ENSG00000118762) con il software Sequencer (GeneCode). A seconda della variante/mutazione identificata vengono eseguiti gli approfondimenti opportuni. Nel caso di delezioni, inserzioni, mutazioni nei siti di splicing o mutazioni nonsense, è direttamente evidente il ruolo patogenetico di questo tipo di alterazioni. Nel caso delle mutazioni missenso, o di varianti introniche la dimostrazione che esse rappresentino la mutazione vera e propria richiede un certo numero di indagini ulteriori. Le nuove varianti a significato incerto vengono studiate mediante studi di segregazione nelle famiglie, attraverso l'analisi della loro conservazione nelle diverse specie, mediante software di simulazione, verificandone la presenza in DataBase genomici (Entrez SNPs, Ensembl, HapMap), analizzando la loro frequenza nella popolazione generale italiana.</p> <p>Inoltre, in casi selezionati, abbiamo deciso di eseguire, in collaborazione con i laboratori di base, alcuni test funzionali utilizzando costrutti di cDNA nei quali sono state inserite mutazioni di PKD1 identificate in pazienti.</p>
<p><b>BIBLIOGRAFIA</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, Roy S, Bakkaloglu A, Komel R, Winearls CG, Harris PC (2001) Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. <i>Am J Hum Genet</i> 68:46-63</li> <li>2. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggari-Malik A, Winearls CG, Torres VE, Harris PC (2002) A complete mutation screen of the</li> </ol>

	<p>ADPKD genes by DHPLC. <i>Kidney Int</i> 61:1588-99</p> <p>3. Veldhuisen B, Saris JJ, de Haij S, Hayashi T, Reynolds DM, Mochizuki T, Elles R, Fossdal R, Bogdanova N, van Dijk MA, Coto E, Ravine D, Norby S, Verellen-Dumoulin C, Breuning MH, Somlo S, Peters DJ (1997) A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). <i>Am J Hum Genet</i> 61:547-55</p> <p>4. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB, Torres VE, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Bennett WM, Meyers CM, Walker DL, Bae K, Zhang QJ, Thompson PA, Miller JP, Harris PC; CRISP Consortium. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. <i>J Am Soc Nephrol.</i> 2007 Jul;18(7):2143-60.</p> <p>5. Fokkema IF, den Dunnen JT, Taschner PE. LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. <i>Hum Mutat</i> 2005; 26:63-8.</p> <p>6. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. <i>Hum Mutat</i> 2000; 15: 7-12.</p> <p>7. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Deget F (1993) Childhood onset autosomal dominant polycystic kidney disease in sibs: clinical picture and recurrence risk. German Working Group on Paediatric Nephrology. <i>J Med Genet</i> 30:583-8</p>
<b>RIFERIMENTI</b>	<p>- Dr.ssa Paola Carrera e Prof. Maurizio Ferrari: Istituto Scientifico San Raffaele, Centro di Genomica Traslazionale e Bioinformatica, Genomica per la Diagnosi delle Patologie Umane; Laboraf, Laboratorio di Biologia Molecolare Clinica; Cattedra di Patologia Clinica Università Vita e Salute di Milano</p> <p>- Dr.ssa Alessandra Boletta: Istituto Scientifico San Raffaele, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Basi molecolari delle malattie cistiche renali</p> <p>- Prof. Paolo Manunta: Istituto Scientifico San Raffaele, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Genomica delle malattie renali e dell'ipertensione; Divisione di Nefrologia e Dialisi Università Vita e Salute di Milano</p> <p>- Dr. Riccardo Magistroni: Divisione di Nefrologia Dialisi e Trapianto Dipartimento di Medicina e Specialità Mediche Azienda Universitario Ospedaliera Policlinico di Modena Università di Modena e Reggio Emilia</p> <p>- Prof. Francesco Scolari: Divisione di Nefrologia e Dialisi, Spedali Civili, Brescia; Cattedra di Nefrologia Università di Brescia</p>
<b>LINK</b>	<p>Associazione Italiana Rene Policistico (AIRP)  <a href="http://www.renepolicistico.it">http://www.renepolicistico.it</a>  <a href="http://grenada.lumc.nl/LOVD2/PKD/home.php">http://grenada.lumc.nl/LOVD2/PKD/home.php</a></p>