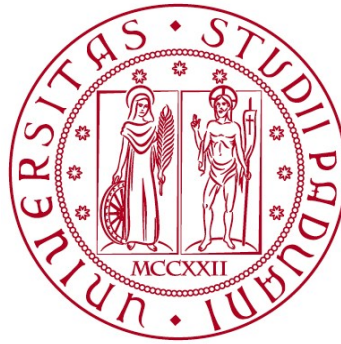


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**APOLO TIPO RICORRENTE IN PAZIENTI
ADPKD CON LA STESSA MUTAZIONE
GERMINALE NONSENSE NEL GENE PKD2**

**Tutor: Prof. Mauro Agostino Zordan
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Valentina Corradi
Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto renale; Fondazione IRRIV -
International Renal Research Institute (IRRIV), Azienda ULSS 8 BERICA
Ospedale San Bortolo, Vicenza**

Laureanda: Sara Radonic

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Polycystic Kidney Disease (PKD)	
1.2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)	
1.3 Variabilità genetica e allelica	
1.4 Analisi genetica	
1.5 ADPKD e Vicenza	
2. SCOPO DELLA TESI	7
3. MATERIALI E METODI	7
3.1 Arruolamento pazienti e criteri di inclusione	
3.2 Analisi genetica: sequenziamento	
3.2.1 Estrazione DNA	
3.2.2 Valutazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto	
3.2.3 Amplificazione Polymerase Chain Reaction (PCR)	
3.2.4 Controllo degli amplificati (gel elettroforesi)	
3.2.5 Purificazione degli amplificati	
3.2.6 Reazione di sequenziamento Sanger	
3.3 Analisi genetica: analisi di linkage	
3.3.1 Scelta dei marcatori	
3.3.2 Amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)	
3.3.3 Controllo degli amplificati (elettroforesi su gel di Agarosio)	
3.3.4 Elettroforesi capillare	
3.3.5 Assegnazione delle dimensioni alleliche e genotipizzazione	
4. RISULTATI	13
4.1 Descrizione pazienti arruolati	
4.2 Variante analizzata	
4.3 Disegno delle condizioni di PCR per i frammenti	
4.4 Analisi dei frammenti	
5. DISCUSSIONE	17
6. CONCLUSIONI	18

ABSTRACT

La malattia autosomica dominante del Rene Policistico (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD) è la più comune malattia genetica renale nella popolazione mondiale e in Europa è la quarta causa di CKD (*Chronic Kidney Disease*) che richiede terapia renale sostitutiva. ADPKD ha una prevalenza di 1:400-1:1000 e presenta un'ampia variabilità di manifestazioni cliniche, tra cui, principalmente, un aumento volumetrico dei reni dovuto allo sviluppo progressivo e bilaterale, età-dipendente, di cisti. Questa malattia presenta variabilità fenotipica sia inter- che intra-familiare ma anche eterogeneità genetica ed allelica. I principali geni associati a questa patologia sono PKD1 e PKD2, anche se sono stati riscontrati altri geni coinvolti. PKD1 e PKD2 presentano un notevole numero di varianti e questo contribuisce a caratterizzare la vasta variabilità allelica di ADPKD. Proprio per la presenza di numerose varianti patogenetiche nei geni PKD1 e PKD2, negli individui affetti da ADPKD troviamo mutazioni perlopiù private: per entrambi i geni risulta raro individuare la stessa mutazione in famiglie diverse. In questo lavoro discuteremo di una coorte di 30 pazienti ADPKD appartenenti a 13 famiglie e afferenti all'ambulatorio di Malattie Genetiche Renali dell'UOC di Nefrologia dell'ULSS8 Berica (Ospedale San Bortolo di Vicenza) dove è stata riscontrata non solo la stessa mutazione germinale causativa nel gene PKD2 ma anche lo stesso aplotipo.

1.INTRODUZIONE

1.1 Polycystic Kidney Disease (PKD)

I disordini genetici del rene policistico, classificati all'interno delle tubulopatie ereditarie, appartengono all'eterogeneo gruppo delle malattie cistiche renali che includono diversi disordini genetici che frequentemente progrediscono verso l'insufficienza renale terminale e sono fenotipicamente diversi per l'età di esordio, la velocità di progressione della malattia e la possibile associazione con manifestazioni cliniche extrarenali. L'identificazione dei geni responsabili associati alle malattie cistiche renali e il loro studio, hanno permesso di far luce sui processi patogenetici alla base della cistogenesi e di proporre una nuova classificazione: malattie del cilio primario (ciliopatie) e malattie associate all'uro-modulina.

Le ciliopatie sono una classe di malattie con una varietà di manifestazioni in diversi organi e nelle quali è presente una ridotta funzionalità del cilio primario, un organello formato da microtubuli presente sulla membrana plasmatica. Nelle ciliopatie riconosciamo la malattia del Rene Policistico (Polycystic Kidney Disease, PKD) che, a seconda del meccanismo di ereditarietà, si distingue in Rene Policistico Autosomico Dominante (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD) e Rene Policistico Autosomico Recessivo (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease, ARPKD). (1)

1.2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)

ADPKD è la più comune malattia genetica renale nella popolazione mondiale e in Europa è la quarta causa di CKD (*Chronic Kidney Disease*) che richiede terapia renale sostitutiva. Secondo i dati in letteratura, riferendosi agli studi di Dalgaard del 1957, la prevalenza di ADPKD è di 1:400-1:1000 (2), anche se studi successivi (3) hanno stimato una prevalenza non superiore a 5:10000 abitanti, compatibile con la definizione di malattia rara adottata dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA), sottolineando come in realtà l'epidemiologia di ADPKD presenti degli aspetti controversi.

ADPKD ha spesso un esordio tardivo, tra la terza e quarta decade di vita, anche se sono presenti casi ad esordio molto precoce. (4)

Questa patologia ha un'ampia variabilità di manifestazioni cliniche, tra cui, principalmente, un aumento volumetrico dei reni dovuto allo sviluppo progressivo e bilaterale, età-dipendente, di cisti, con conseguente perdita della funzionalità renale che porta ad insufficienza renale cronica terminale (*End Stage Kidney Disease*, ESRD o ESKD). La velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*, GFR) però rimane stabile o cala gradualmente finché non viene raggiunto un tasso di distruzione del 50% del parenchima renale in quanto i nefroni non colpiti da ADPKD compensano con l'iper-filtrazione. (5)

Tra le altre complicanze, risulta molto comune l'ipertensione arteriosa, la quale si manifesta nel 50-70% dei casi prima di riduzioni significative del GFR. (6)

Gli individui affetti, inoltre, possono presentare un ampio spettro di condizioni cliniche extra-renali, tra cui cisti epatiche e aneurismi intracranici (7), le quali contribuiscono a determinare l'ampia variabilità fenotipica sia intra- che inter-familiare di ADPKD.

1.3 Variabilità genetica ed allelica

ADPKD presenta eterogeneità genetica: ad essa sono associati principalmente il gene PKD1 (MIM: 601313) e PKD2 (MIM: 173910). Nel 72-75% delle famiglie affette le mutazioni sono a carico del gene PKD1, mentre il restante risulta suddiviso in 15-18% per le mutazioni nel gene PKD2 e 7-10% di casi ADPKD geneticamente non risolti (GUR). (8)

Il locus di PKD1 si trova nel cromosoma 16 (16p13.3) e la regione genomica che va dall'esone 1 all'esone 33 presenta duplicazioni in 6 pseudogeni (PKD1P1-PKD1P6) ad alta omologia di sequenza (>95%); soltanto la porzione 3' terminale (esoni 34-36), quindi, non è duplicata, motivo per cui il sequenziamento completo di PKD1 per la ricerca di mutazioni risulta più complesso rispetto a PKD2. PKD1 codifica per la Policistina-1 (PC1), una proteina integrale di membrana (9), mentre PKD2 (cromosoma 4, 4q21-q23) codifica per la Policistina-2 (PC2), un canale cationico non selettivo permeabile al Ca^{++} (10). PC1 e PC2 si trovano sulla membrana e sulle ciglia dell'epitelio tubulare renale insieme a molte altre proteine e interagiscono tra loro in una comune via di trasduzione del segnale. In particolare, il complesso PC1-PC2 è coinvolto nell'aumento intracellulare di Ca^{++} in seguito alle deformazioni dovute al flusso urinario in cui il ciglio primario svolge la funzione di trasduttore del segnale. Alcuni dati rafforzano quest'ipotesi

indicando, in topi transgenici in cui è stato silenziato il gene PKD1, l'assenza di un aumento intracellulare di Ca^{++} nei casi in cui quest'ultimo dovrebbe invece essere presente. Mutazioni patogenetiche in PKD1 e PKD2 portano ad una riduzione nella funzionalità del complesso PC1-PC2 fino anche ad una sua completa inattivazione, con una conseguente diminuzione del flusso intracellulare di Ca^{++} ; la cellula inoltre passa ad un fenotipo prevalentemente secretivo e perde la sua polarità, che prima era apico-basale. (11)

Di recente, in seguito ad analisi genetiche di famiglie ADPKD-GUR, sono stati identificati altri geni coinvolti: SEC63, SEC61B, GANAB, PRKCSH, DNAJB11, ALG8 e ALG9. (12)

L'ampia variabilità fenotipica di ADPKD può essere spiegata attraverso tre caratteristiche (13): variabilità di *locus* (a seconda del gene coinvolto), variabilità *allelica* (posizione o tipo di mutazione) e variabilità dovuta ad altri *fattori genetici e ambientali*.

Numerosi studi hanno confermato le differenze tra pazienti con mutazioni in PKD1 e PKD2: ad esempio, nel 2013 il gruppo della Prof.ssa Cornec-Le Gall. (14) ha evidenziato che l'età mediana di ESKD in pazienti con mutazioni nel gene PKD1 era di 58,1 anni, IC95% 56,5-59,9, rispetto ai 79,7 anni, IC95%, 76,8-82,6 nei pazienti con mutazioni nel gene PKD2.

ADPKD è caratterizzata anche da una variabilità *allelica* e la posizione e il tipo di mutazione possono influenzare il livello di patogenicità. Uno studio del 2016 (15) ha evidenziato come pazienti con mutazioni troncanti in PKD1 avessero un'età mediana di ESKD inferiore ai pazienti con mutazioni nel gene PKD2. Inoltre, PKD1 e PKD2 presentano un notevole numero di varianti e questo ha portato allo sviluppo, nel 2007, di un database (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Mutation Database: PKDB database, <http://pkdb.mayo.edu>) con raccolte le mutazioni patogenetiche germinali e somatiche, i polimorfismi e le varianti indeterminate dei due geni ad oggi riportate in letteratura. L'alto livello di eterogeneità allelica comporta la presenza di mutazioni perlopiù private: per entrambi i geni risulta raro individuare la stessa mutazione in famiglie diverse. (8) Studi di *screening* mutazionale di PKD1 e PKD2 hanno evidenziato come nel 61% circa dei casi le mutazioni siano troncanti, 26% non troncanti e dal 2% al 13% dei casi siano presenti ampie duplicazioni o delezioni.

Il gene PKD1 presenta un alto tasso di nuove mutazioni, che si stima sia attorno a $1,8 \times 10^{-5}$ mutazioni per generazione (17), motivo per il quale sono presenti numerose varianti.

La variabilità allelica dei geni associati ad ADPKD può portare a quadri clinici atipici o diversi da quelli classici considerati in precedenza. Ad esempio, alcune mutazioni missenso del gene PKD1 danno origine ad alleli ipomorfi, ovvero a condizioni in cui la proteina risulta ancora parzialmente funzionale oppure viene espressa ma con una riduzione del suo trascritto genico; l'effetto fenotipico che ne deriva può variare da forme lievi (o assenti) a più gravi in base anche alla combinazione con altri alleli ipomorfi o con mutazioni patogenetiche. Inoltre, come visto in precedenza, molte proteine sono coinvolte nella via di trasduzione del segnale in cui opera il complesso PC1/PC2: per questo motivo, anche

mutazioni a carico di altri geni possono aggravare il fenotipo clinico, ad esempio mutazioni nel gene PKHD1. Tutti questi aspetti, insieme anche a casi riscontrati di mosaicismo e trans-eterozigosi, contribuiscono a definire l'ereditarietà complessa di ADPKD e quindi anche la sua ampia variabilità fenotipica. (18)

1.4 Analisi genetica

Per la diagnosi molecolare di ADPKD il metodo utilizzato è l'analisi di sequenziamento di tutti gli esoni e dei siti di splicing di PKD1 e PKD2; il sequenziamento diretto per la ricerca di mutazioni puntiformi e piccole inserzioni/delezioni avviene tramite metodo Sanger e più di recente attraverso il sequenziamento di nuova generazione o *Next Generation Sequencing* (NGS).

Per individuare un aplotipo malattia, invece, viene utilizzata l'analisi di *linkage*, un'analisi genetica indiretta che si basa sull'identificazione di marcatori che segregano insieme, solitamente includendo il gene/*locus* associato alla malattia all'interno di famiglie, tra i quali c'è una probabilità molto bassa di ricombinazione. Un aplotipo è una combinazione di specifici alleli sullo stesso filamento di DNA su un particolare cromosoma. In un'analisi di *linkage*, per individuare un aplotipo malattia, i marcatori utilizzati si trovano in *loci* polimorfici e quindi la frequenza di individui eterozigoti per gli alleli di questi *loci* sarà molto alta; una stessa mutazione patogenetica potrebbe trovarsi associata a marcatori allelici diversi proprio per questo alto livello di eterozigosità e la sua origine in tal caso può essere dovuta a molteplici eventi indipendenti causanti la stessa mutazione oppure all'insorgenza di una singola mutazione insorta in un antenato comune ma presente per un tempo sufficientemente lungo da permettere ricombinazione tra il *locus* del marcatore e quello della malattia. Se però, nonostante il polimorfismo, si trovano uno o pochissimi diversi alleli nello stesso aplotipo del gene malattia, questo in genere suggerisce che la mutazione presa in considerazione sia comparsa solo una o poche volte e che la ricombinazione con i *loci* adiacenti non si sia verificata sufficientemente spesso da dare origine ad altri possibili aplotipi associati a quella specifica mutazione e questo fornisce una forte evidenza di un *linkage* molto stretto con il gene bersaglio, ovvero quello della malattia. (19)

1.5 ADPKD e Vicenza

L'ambulatorio Malattie Genetiche Renali integrato al laboratorio di Genetica Renale e Biologia Molecolare dell'IRRIV dell'UOC di Nefrologia Dialisi e Trapianto Renale ha preso forma nel 2007 in seguito allo "Studio epidemiologico sull'incidenza e prevalenza della Malattia autosomica dominante del Rene Policistico (ADPKD) nell'area geografica afferente al Dipartimento Internazionale di Nefrologia, Dialisi e Trapianto renale (EX Ulss 4,5,6 del Veneto) e ricerca di un attendibile test genetico diagnostico".

Lo studio, Ricerca Sanitaria Finanziata dalla Regione Veneto (RSF 261/06), nasceva dall'osservazione di un'alta prevalenza (13,4%) di ADPKD tra i pazienti in trattamento dialitico che afferivano alla Provincia di Vicenza. Grazie a questa

ricerca infatti venne dimostrato come la provincia di Vicenza non fosse caratterizzata globalmente da un'anomala prevalenza di ADPKD, ma lo fosse invece in alcuni isolati geografici. Inoltre il profilo clinico dei pazienti ADPKD della provincia di Vicenza era sostanzialmente simile a quello descritto in letteratura(20).

Questo dato ha permesso di sottolineare come la provincia di Vicenza non fosse caratterizzata globalmente da un'anomala prevalenza di ADPKD, ma lo fosse invece in alcuni isolati geografici dalla presenza di alcuni fondatori caratteristici(21).

Questa ricerca ha permesso di mettere a punto l'analisi molecolare per la ricerca di un aplotipo comune ai pazienti ADPKD e l'analisi di *linkage* disegnata *ad hoc* per il campione si era dimostrata un buon metodo diagnostico per l'identificazione del gene responsabile dell'ADPKD.

Infine questo studio è stato inserito in una recente meta-analisi del Gruppo di Magisteroni PLoS One. 2018; 13(1) che cercava di fare luce sulla metodologia nel calcolo della prevalenza di ADPKD.

Dal 2016 è attiva una collaborazione con l'UOSD di Genetica dell'Azienda ULSS 8 Berica per integrare ed implementare la diagnostica delle malattie policistiche renali e altre malattie genetiche renali (ADPKD, Sindrome di Alport) con la metodica di nuova generazione Next Generation Sequencing (NGS) per avere la diagnosi completa in tempi più rapidi.

2. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si prefigge di valutare l'aplotipo di una coorte di 30 pazienti, appartenenti a 13 famiglie, affetti da malattia policistica renale autosomica dominante (ADPKD) aventi stessa mutazione germinale causativa nel gene PKD2 NM_000297.4: c.2533 C>T (p.Arg845 Ter).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Arruolamento pazienti e criteri di inclusione

Per la fase clinico-epidemiologica, la diagnosi di ADPKD si è basata su specifici criteri, descritti da Ravine et al.(22), rivisti nel 2009 (23), durante la prima visita, in particolare la presenza di almeno due cisti renali (unilaterali o bilaterali) se si tratta di soggetti tra i 15 e 30 anni; due cisti per ciascun rene tra i 30 e i 59 anni e quattro cisti per ciascun rene sopra i 60 anni. Il riscontro di cisti è avvenuto attraverso ultrasonografia e per ogni paziente sono stati raccolti i dati completi (anagrafici, clinici e familiari).

Per la fase genetico-molecolare, il criterio di inclusione si è basato sulla presenza della mutazione germinale NM_000297.4: c.2533C>T (p.Arg845Ter) nel gene PKD2 in:

- Pazienti con diagnosi clinica accertata e presenza di cisti renali bilaterali che hanno eseguito l'analisi genetica (sequenziamento);
- Familiari di pazienti affetti ADPKD che hanno eseguito il test genetico (sequenziamento) anche in assenza di cisti renali.

La coorte di pazienti inclusa in questa tesi proviene per la maggior parte dal gruppo già studiato nella Ricerca RSF 261/06 e i nuovi pazienti che all'analisi evidenziavano tale variante.

3.2 Analisi genetica: sequenziamento

Il procedimento completo di ricerca delle varianti genetiche si è basato su:

- Sequenziamento con metodo NGS, in collaborazione con l'UOS di Genetica AULSS8 Berica, che ha permesso l'analisi contemporanea dei geni PKD1, PKD2 e PKHD1; in particolare, è stato utilizzato il pannello "*Nephropathies Solution*" di *Sophia Genetics* il quale consente il rilevamento di *SNVs*, *Indels* e *CNVs* a livello delle regioni codificanti e giunzioni di splicing (+/- 5bp) di 44 geni (regione target di 105.8 kb) collegati ad una vasta gamma di nefropatie come la sindrome nefrosica, rene policistico, sindrome di Bartter, sindrome di Alport, CAKUT o tubulopatie. L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti avviene mediante software DDM (*Sophia Genetics*).
- Analisi di sequenziamento Sanger, eseguita presso l'UOC Nefrologia AULSS 8 Berica. In questo caso la reazione di sintesi del DNA avviene usando un *primer* che si lega al segmento da sequenziare. Viene aggiunta la DNA polimerasi insieme ai quattro nucleotidi e ad alcuni dideossinucleotidi, ciascuno marcato con un fluoroforo. Man mano che la sintesi del DNA avviene, ogni tanto sarà incorporato uno dei nucleotidi marcati e questo causerà l'interruzione della sintesi di quel frammento. Si origineranno così frammenti di lunghezze diverse e la miscela verrà sottoposta a elettroforesi per separare i diversi frammenti sulla base delle loro dimensioni. (19)

Qui di seguito verrà descritta l'analisi di sequenziamento Sanger svolta nel Lab UOC Nefrologia AULSS 8 BERICA.

La procedura prevede i seguenti passaggi:

1. Estrazione DNA
2. Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto
3. Amplificazione Polymerase Chain Reaction (PCR)
4. Controllo degli amplificati (gel elettroforesi)
5. Purificazione degli amplificati
6. Reazione di sequenziamento Sanger

3.2.1 Estrazione DNA

L'estrazione è avvenuta attraverso lo strumento NorDiagArrow, a partire da 500 µl di sangue venoso periferico con EDTA. Tale strumento utilizza cartucce Blood DNA 500 Extraction Kit e si basa sulla presenza di un campo magnetico che

agisce su biglie con alta affinità per gli acidi nucleici, in modo da trattenerle sul bordo del pozzetto e ottenere infine 400 µl di DNA.

3.2.2 Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto

La quantificazione del DNA è avvenuta attraverso un'analisi spettrofotometrica con lo strumento NanoPhotometer N50 Touch (IMPLEN), in particolare con la deposizione di 1,5 µl di estratto e la finale concentrazione espressa in ng/µl. Con lo stesso strumento è stato possibile determinare la purezza del DNA estratto, attraverso i rapporti fra l'assorbanza del DNA (A260) e quella dei possibili contaminanti (280 nm per le proteine e 230nm per i composti organici). Per una buona purezza, il rapporto A260/280 deve rientrare in un range da 1,6 a 1,8 per le proteine, mentre il valore A260/230 deve essere compreso in un intorno di 2,2.

3.2.3 Amplificazione Polymerase Chain Reaction (PCR)

Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la Master mix Gold 360 che presenta al suo interno Taq polimerasi, dNTPs, buffer, cofattori e alla quale bisogna aggiungere quindi soltanto primer e acqua. La mix di reazione è così composta (Tabella 1):

	x1
Acqua	12,5 µl
Master Mix Ampli Taq Gold 360	9 µl
PrimerForward (10 pmol/ml)	1,25 µl
PrimerReverse (10 pmol/ml)	1,25 µl
DNA 30ng/µl	1 µl
Totale	25 µl

Tabella 1: Mix di reazione

La coppia di primers utilizzati per l'amplificazione (Tabella 2):

Esone	PrimerForward	PrimerReverse	bp	Tm	cicli
EX14	CCAGTGGGGCTGAAAA GA	CTTCAAATACAACGTGTC AGCAACA	293	59	35

Tabella 2: Primers utilizzati per amplificare l'esone 14 del gene PKD2

L'esone 14 del gene PKD2 è la regione in cui è presente la mutazione analizzata in questa tesi.

Il programma di PCR prevede:

- Denaturazione e attivazione della Taq polimerasi : 95°C per 10 minuti;
- 35 cicli di:
 - - Denaturazione: 95°C per 30 secondi;
 - - Annealing (ex 14 PKD2): 59°C per 30 secondi;
 - - Estensione: 72°C per 30 secondi
- Ciclo finale: 72°C per 30 secondi.

3.2.4 Controllo degli amplificati (gel elettroforesi)

Il controllo degli amplificati è avvenuto tramite elettroforesi su gel di Agarosio (Seakem GTG) al 2%. La corsa è stata effettuata in TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) tramite lo strumento MupidOne impostando 100V per 30 minuti.

3.2.5 Purificazione degli amplificati

La purificazione degli amplificati permette l'eliminazione di primers e dNTPs in eccesso dai prodotti di PCR.

Sono stati diluiti 2 µl di mix enzimatica ExoProstar (miscela di esonucleasi 1 e di fosfatasi alcalina) in 10 µl di amplificato e successivamente posti nel termociclatore con il seguente ciclo:

15 minuti a 37°C

15 minuti a 80°C

3.2.6 Reazione di sequenziamento Sanger

Per le reazioni di sequenza preparate viene utilizzato il BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Il passo successivo consiste nella purificazione delle sequenze per rimuovere i terminatori in eccesso attraverso il metodo Centri-Sep Spin Columns con il Kit Centri-Sep Spin™ Columns.

Il sequenziamento avviene tramite il Sequenziatore Automatico 3500 Sequencing. In esso i frammenti migrano in un campo elettrico con velocità differenti a seconda della loro lunghezza. I picchi di fluorescenza di ciascun fluoroforo vengono visualizzati in un grafico, l'elettroferogramma, in cui ogni picco rappresenta una base azotata. Le sequenze vengono infine interpretate attraverso il software "Chromas".

Una volta rilevata la variante oggetto di analisi, si procede con l'analisi di linkage.

3.3 Analisi genetica: Analisi di linkage

L'analisi di linkage permette di individuare un aplotipo malattia ed è suddivisa nelle seguenti fasi:

1. Scelta dei marcatori
2. Reazione di amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)
3. Controllo degli amplificati (elettroforesi su gel di Agarosio)
4. Elettroforesi capillare
5. Assegnazione delle dimensioni alleliche e genotipizzazione

3.3.1 Scelta dei marcatori

I marcatori utilizzati sono VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), in particolare microsatelliti (*Short Tandem Repeats, STR*), che si trovano nel cromosoma 4 e sono cinque (Figura 1): D4S2929 e D4S1563, scelti in base alla letteratura e i database informatici (in cui il numero in seconda posizione del nome fa riferimento al cromosoma 4), VG2, VG3 e VG4 disegnati nel laboratorio Dipartimento di Nefrologia, Dialisi e Trapianto renale; Fondazione IRRIV-International Renal Research Institute (IRRIV), Azienda ULSS 8 BERICA Ospedale San Bortolo, Vicenza. Le caratteristiche di questi marcatori sono un valore di eterozigotità (HET) elevato nella popolazione e la vicinanza al gene d'interesse, in modo da ridurre la probabilità di ricombinazione. Tutti i marcatori selezionati sono entro i 10cM dal gene di interesse (distanza stabilita per poter associare un set specifico di alleli e pensare che possano essere ereditati in blocco).

I marcatori VG2, VG4 sono presenti nelle zone vicine alla sequenza di PKD2 (entro 2cM), mentre VG3 è intragenico. Inoltre, la scelta di questi tre marcatori si è basata su ripetizioni dinucleotidiche in tandem ripetute almeno 11 volte.

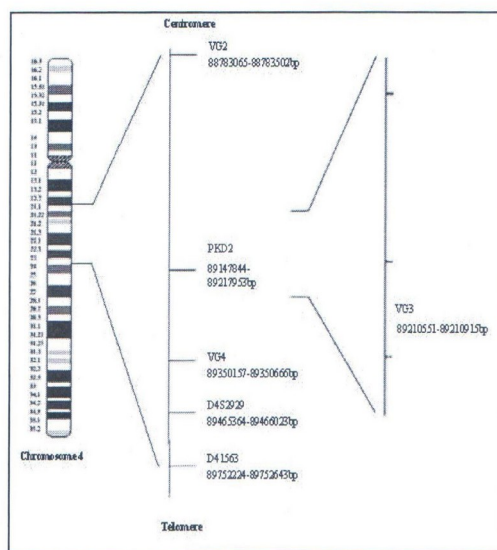


Figura 1: Mappa fisica dei marcatori microsatelliti relativi a PKD2 e loro posizioni

Di seguito le caratteristiche dei cinque marcatori nel cromosoma 4 (Tabella 3):

Posizione relativa	Marcatore	Posizione(bp)	Repeat	N° repeat	HET
Cen-PKD2	VG2	88783065-88783502	TG	13	0,65
intragenico	VG3	89210551-89210915	TA+GA	27	0,79
PKD2-Tel	VG4	89350157-89350666	CA	18	0,58
PKD2-Tel	D4S2929	89465364-89466023	AC	15	0,7
PKD2-Tel	D4S1563	89752224-89752643	TG	19	0,84

Tabella 3: Caratteristiche dei marcatori microsatelliti utilizzati per PKD2

3.3.2 Amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)

I *primers forward* sono stati realizzati attraverso marcatura con fluorocromo all'estremità 5'. In particolare, i fluorocromi utilizzati sono: VIC, NED e FAM. A seconda del marcatore, sono stati utilizzati due differenti enzimi: *AmpliTaqGold* (AppliedBiosystems) e *AccuPrime* (Invitrogen). Sono state quindi eseguite le reazioni di amplificazione tramite PCR.

3.3.3 Controllo degli amplificati (elettroforesi su gel di Agarosio)

Il controllo qualitativo e della dimensione degli amplificati è avvenuto tramite corsa elettroforetica in gel di Agarosio (Seakem GTG) al 2%. La corsa è stata effettuata in TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA). Le dimensioni dei frammenti sono calcolate confrontandole con 1µl di un marcatore di dimensioni note, PCR 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), che durante la corsa si divide in 19 bande aventi un range da 100-12000 bp.

Prima del caricamento:

- Diluizione 1:10 in acqua di MIDORI GREEN Direct a seconda del n° di campioni;
- Preparazione marcatore di confronto: 1 µl di 1Kb Plus DNA Ladder, 5 µl di H₂O, 1 µl di MIDORI GREEN Direct (non diluito);

Il MIDORI GREEN Direct è un colorante del DNA (non cancerogeno, non intercalante).

Caricamento:

- Marcatore di confronto nel primo pozzetto;
- 7µl di campione e 2µl di MIDORI GREEN Direct (diluito 1:10) per ogni pozzetto;

3.3.4 Elettroforesi capillare

L'analisi dei frammenti derivati da ciascuna amplificazione è avvenuta tramite il sequenziatore automatico 3500 Genetic Analyzer, il quale è collegato al software GeneMapper. Questo sistema viene usato per separare e quantificare i vari frammenti di DNA amplificati e si basa sull'uso dei fluorocromi che, legati al frammento amplificato (tramite uno dei due primer) permettono la rilevazione del frammento stesso. I segnali di fluorescenza emessi sono convertiti dal software in picchi visualizzati nell'elettroferogramma.

A seconda della resa, i campioni sono stati analizzati puri oppure diluiti.

La preparazione per il caricamento è avvenuta nel seguente modo:

- 2 µl di campione + 13,5 µl di Mix

La Mix comprende formammide deionizzata HI-Di (AppliedBiosystems) e 0,5 µl del marcatore GeneScan 500 Liz (AppliedBiosystems); quest'ultimo si divide durante la corsa elettroforetica in 16 bande con un range 35-500 bp.

- La miscela ottenuta è stata poi denaturata per 5 minuti a 95°C e quindi caricata nel sequenziatore automatico.

3.3.5 Assegnazione delle dimensioni alleliche e genotipizzazione

Le dimensioni degli alleli sono stabilite attraverso il software GeneMapper. In particolare, ciascun picco visualizzato nell'elettroferogramma è associato alla lunghezza specifica di quel frammento.

4. RISULTATI

4.1 Descrizione pazienti arruolati

I pazienti arruolati con riscontro della mutazione germinale *nonsense* nel gene PKD2 NM_000297.4: c.2533C>T (p.Arg845Ter) sono 30, appartenenti a 13 famiglie, con età dai 28 a 84 anni.

Dai dati raccolti durante la visita questi 30 pazienti appartengono a famiglie apparentemente non imparentate tra loro e tutte provenienti da un'area geografica di raggio circa 100km (Figura 1).

Ulteriori approfondimenti però, attraverso la ricostruzione degli alberi familiari, hanno poi permesso l'identificazione di un individuo comune tra le famiglie 003-004-089-092.

Tutti i pazienti analizzati, inoltre, sono nati nella provincia di Vicenza ma, da un'analisi più approfondita, si è scoperto che la madre del soggetto 180P412, affetta anch'essa da ADPKD, è originaria della Slovenia.

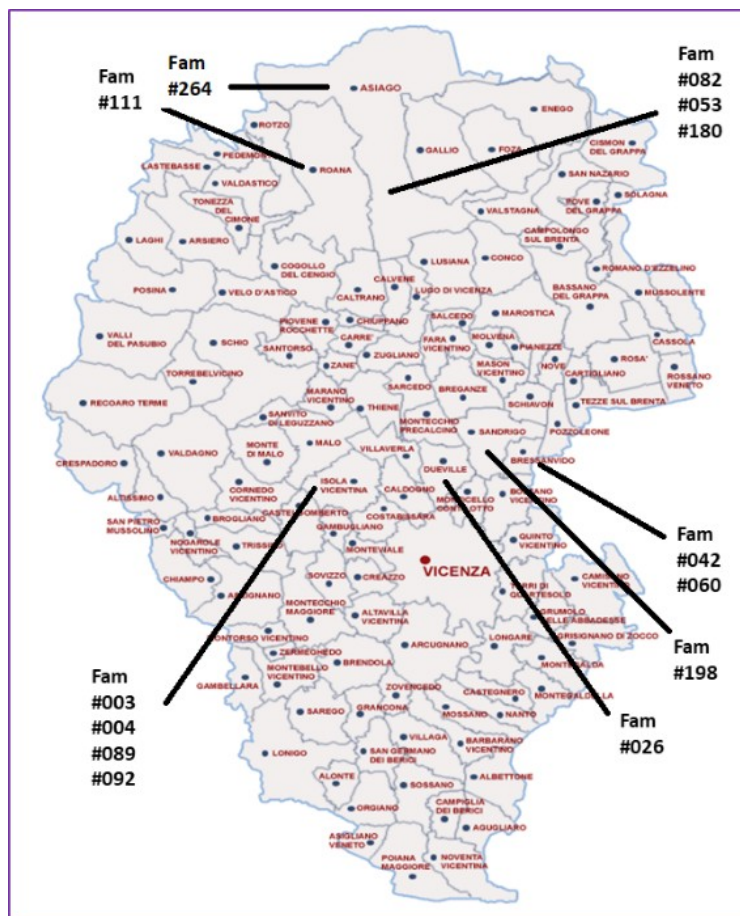


Figura 2: Mappa della Provincia di Vicenza con la distribuzione geografica delle famiglie analizzate

4.2 Variante analizzata

Questi pazienti presentano quindi una stessa variante nel gene PKD2: si tratta di una mutazione *nonsense*, ovvero una mutazione che genera un codone di stop prematuro, la quale determina il cambiamento amminoacidico p.Arg845Ter portando alla sintesi di una proteina trunca. Questa variante è classificata secondo gli standard ACMG e presente nel database Varsome, LOVD, InterVar come variante patogenetica e in particolare Definitivamente patogenetica nel database specifico per la patologia (ADPKD Mutation Database). La frequenza di questa variante, riportata in gnomAD, risulta essere $f=0,00005783$.

4.3 Disegno delle condizioni di PCR per i frammenti

Per ottenere una resa efficiente è stato messo a punto il protocollo, attribuendo ai diversi marcatori le giuste Taq polimerasi e relative temperature di *annealing* (Tabella 5).

<u>Marcatore</u>	<u>Marcatura</u>	<u>Taq</u>	<u>Ta</u>	<u>N°cicli</u>	<u>PCR size(pb)</u>
VG2	VIC	TAQ ACCUPRIME	57°C	30	213
VG3	6-FAM	TAQ ACCUPRIME	57°C	30	235
D4S2929	NED	TAQ ACCUPRIME TAQ GOLD 360	61°C 61°C	30	194
VG4	6-FAM	TAQ GOLD 360	58°C	30	199
D4S1563	NED	TAQ GOLD 360	61°C	30	217

Tabella 4: Condizioni di amplificazione dei marcatori, relative Taq polimerasi e dimensioni

Durante la messa a punto delle condizioni di amplificazione, per il marcatore D4S2929 sono state confrontate due Taq polimerasi: Taq Gold 360 e Taq AccuPrime.

Mix di amplificazione (Tabella 6) e programma di PCR per la Taq Gold 360:

	x1
Acqua	6,5µl
Master Mix Ampli Taq Gold 360	12,5µl
GC rich Buffer	2,5µl
PrimerForward (10 pmol/ml)	1,25µl
PrimerReverse (10 pmol/ml)	1,25µl
DNA	1µl
Totale	24µl + 1µl

Tabella 5: mix amplificazione Taq Gold 360

Programma di PCR (Taq Gold 360)

- 95°C x 10'
- 30 cicli di:
 - 95°C x 30''
 - Ta x 30''
 - 72°C x 1'
- 72°C x 7'
- 4°C ∞

Mix di amplificazione (Tabella 7) e programma di amplificazione per la Taq AccuPrime:

	x1
Acqua	20,4µl
Buffer II	2,5µl
PrimerForward (10 pmol/ml)	0,5µl
PrimerReverse (10 pmol/ml)	0,5µl
Taq	0,1µl
DNA	1µl
Totale	24µl + 1µl

Tabella 6: mix amplificazione Taq AccuPrime

Programma di PCR (Taq Accuprime)

- 94°C x 2'
- 30 cicli di:
 - 94°C x 30''
 - Ta x 30''
 - 68°C x 1'
- 4°C ∞

La Taq scelta alla fine è stata la Taq AccuPrime, con un conseguente miglioramento dei picchi visualizzati nell'elettroferogramma (Figura 2).

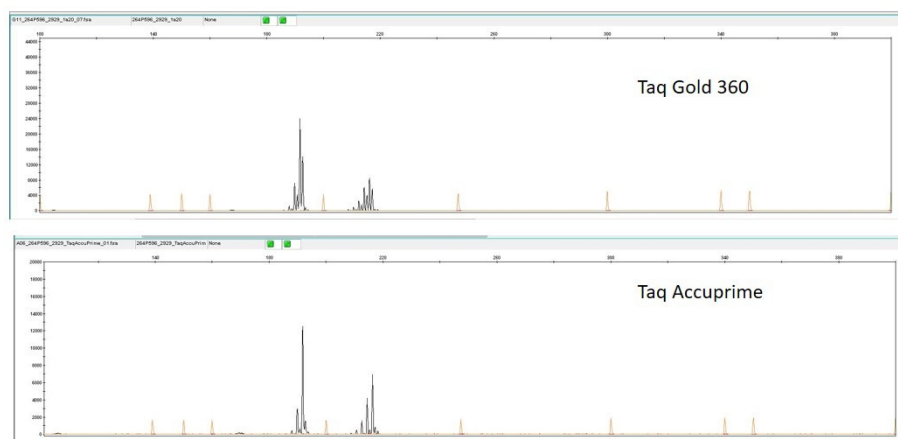


Figura 2: confronto Taq Gold 360 e Taq AccuPrime

4.4 Analisi dei frammenti

Tutti i 30 pazienti sono stati sottoposti ad analisi di linkage per identificare l'aplotipo malattia, che è risultato essere lo stesso per tutti i soggetti analizzati: **cromosoma 4 CEN - VG2(TG)₂₀, VG3 (TA + GA)₃₂, VG4 (CA)₁₃, 2929 (AC)₂₆, 1563 (TG)₂₀ - TEL**

Chr	Posizione rispetto a PKD2	Marcatore	Repeat	N° repeat
4	Cen-PKD2	VG2	TG	20
4	intragenico	VG3	TA + GA	32
4	PKD2-Tel	VG4	CA	13
4	PKD2-Tel	D4S2929	AC	26
4	PKD2-Tel	D4S1563	TG	20

Tabella 7: Aplotipo ricorrente nei 30 pazienti analizzati

5. DISCUSSIONE

Lo scopo di questa tesi è stato di valutare l'aplotipo di una coorte di 30 pazienti, appartenenti a 13 famiglie, afferenti all'ambulatorio di Malattie Genetiche Renali dell'UOC di Nefrologia dell'ULSS8 Berica (Ospedale San Bortolo di Vicenza), aventi stessa mutazione germinale causativa nel gene PKD2 NM_000297.4: c.2533 C>T (p.Arg845 Ter).

Uno degli aspetti caratterizzanti ADPKD è l'elevata variabilità allelica e questo rende improbabile la presenza di una stessa mutazione causativa in famiglie che non condividono un antenato comune, motivo per il quale le mutazioni riscontrate sono perlopiù private. La presenza, nelle 13 famiglie analizzate, non solo di una mutazione causativa condivisa (con una frequenza bassissima secondo la letteratura, $f=0,00005783$), ma anche di un aplotipo comune, ha portato ad ipotizzare che la variante allelica in questione si sia presentata una volta sola in un antenato comune agli individui analizzati, piuttosto che essersi presentata più volte indipendentemente. Questo potrebbe rappresentare quindi un primo dato a favore di un'ipotesi "effetto fondatore". Tale ipotesi è rafforzata anche dal fatto che le famiglie analizzate siano tutte provenienti da un'area ristretta (di raggio circa 100km) della Provincia di Vicenza.

L'effetto fondatore è un fenomeno per il quale, a partire da pochi individui di una popolazione, viene fondata una nuova popolazione, più piccola e isolata da quella originale, in cui cambiano le frequenze alleliche; come risultato vi è la fissazione o la perdita di alcuni alleli e quindi anche una diminuzione della variabilità genetica. (24)

Ogni piccola popolazione derivata, quindi, sarà caratterizzata da un particolare carattere prevalente rispetto agli altri. Se il carattere in questione fosse un gene mutato causa di una determinata malattia, a distanza di diversi decenni quella comunità potrebbe essere caratterizzata da più persone affette da quella malattia rispetto alla comunità di partenza.

Nell'ambito del progetto finanziato dalla Ricerca Finalizzata della Regione Veneto (N.261/06) sulla malattia autosomica dominante del Rene Policistico (ADPKD) (21) presso i laboratori di UOC di Nefrologia ULSS8 Berica Vicenza, erano già state analizzate alcune di queste famiglie. Il riscontro di un aplotipo comune e della stessa mutazione germinale aveva già allora fatto ipotizzare un effetto fondatore. L'ipotesi risultava e risulta essere rafforzata considerando anche le caratteristiche del territorio. Infatti, sappiamo che una delle cause che può portare

all'isolamento di una popolazione da quella originale è l'isolamento geografico di alcune comunità (ad esempio montane). La Provincia di Vicenza conta numerosi comuni (114), per via dello storico frazionamento del territorio, presentando anche molti comuni montani; l'aspetto morfologico di questa Provincia può quindi essere un ulteriore dato a favore dell'ipotesi di un effetto fondatore. Quest'ipotesi, inoltre, può essere una possibile spiegazione del perché, in un territorio in cui globalmente la frequenza della malattia è in linea con i dati riportati in letteratura, sia presente una prevalenza maggiore di pazienti in dialisi (13,4 % rispetto all' 8,2% in Italia) in alcuni isolati geografici. (21)

Per l'individuazione dell'aplotipo malattia comune a questi pazienti è stata eseguita un'analisi di *linkage*, attraverso l'utilizzo di 5 marcatori microsatelliti: D4S2929, D4S1563, VG1, VG2 e VG3. La scelta di quali marcatori utilizzare risulta fondamentale per l'accuratezza diagnostica dei risultati in quanto quest'ultima dipende dalla probabilità che il gene responsabile sia effettivamente associato ai marcatori e dalla frequenza di ricombinazione tra i marcatori stessi e i geni malattia.

Infine, in questo progetto di tesi si è voluta migliorare l'analisi di *linkage* disegnata *ad hoc* per questa popolazione di pazienti confrontando diverse Taq polimerasi, in questo caso la Taq AccuPrime e la Taq Gold 360. La messa a punto delle condizioni di PCR ha permesso l'identificazione della Taq polimerasi più idonea da utilizzare e le relative temperature, portando ad un miglioramento dei picchi visualizzati con la conseguenza di ottenere una maggiore accuratezza dei risultati e quindi di stabilire con più precisione la dimensione allelica dei frammenti oggetto dell'analisi.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, con questo lavoro abbiamo descritto una coorte di 30 pazienti con stessa mutazione germinale causativa di ADPKD nel gene PKD2, caratteristica insolita per la patologia dato che presenta una notevole variabilità allelica.

L'analisi di *linkage* inoltre ha permesso di individuare un aplotipo comune a tutti gli individui affetti (**cromosoma 4 CEN** - VG2(TG)₂₀, VG3 (TA + GA)₃₂, VG4 (CA)₁₃, 2929 (AC)₂₆, 1563 (TG)₂₀ - **TEL**). La presenza di un aplotipo ricorrente e di una stessa mutazione germinale, aveva già in passato permesso di ipotizzare la presenza di un effetto fondatore nella Provincia di Vicenza. Una caratterizzazione più precisa a livello molecolare potrebbe essere utilizzata per affermare con maggiore certezza la presenza di un fondatore comune in queste famiglie.

L'analisi di *linkage* risulta una metodologia importante nell'aspetto diagnostico, in quanto ci permette di effettuare un'analisi indiretta per individuare un aplotipo malattia e di conseguenza il gene malattia. In questo contesto, un'analisi più dettagliata, attraverso l'utilizzo di un numero maggiore di marcatori, in particolare intragenici, potrebbe essere effettuata per dimostrare l'ipotesi di un effetto fondatore.

1. Gritti AP, Boletta A “The ciliopathies-Polycystic Kidney Disease” *Giornale italiano di nefrologia* 2015;32 Suppl 64:gin/32.S64.15; PMID: 26479061
2. Torres VE, Harris PC “Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years” *Kidney international* 2009 Jul;76(2):149-68. Epub 2009 May 20.
3. Solazzo A, Testa F, Giovanella S, Busutti M, Furci L, Carrera P, Ferrari M, Ligabue G, Mori G, Leonelli M, Cappelli G, Magistroni R “The prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): A meta-analysis of European literature and prevalence evaluation in the Italian province of Modena suggest that ADPKD is a rare and underdiagnosed condition” *PloS One*. 2018 Jan 16;13(1): e0190430. ECollection 2018.
4. Bergmann C, von Bothmer J, Ortiz Bruchle N, Venghaus A, Frank V, Fehrenbach H, Hampel T, Pape L, Buske A, Jonsson J, Sarioglu N, Santos A, Ferreira JC, Becker JU, Cremer R, Hoefele J, Benz MR, Weber LT, Buettner R, Zerres K “Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease” *Journal of the American Society of Nephrology*: 2011 Nov;22(11): 2047-56. Epub 2011 Oct 27.
5. Ronco C, La Manna G “Current Perspectives in Kidney Diseases” *Blood purification* 2017;44(4):311-313. Epub 2017 Oct 30.
6. Ecker T, Schrier RW “Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects” *Journal of the American Society of Nephrology* 2001 Jan;12(1):194-200.
7. Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone Ronald D “Autosomal dominant polycystic kidney disease” *Lancet* 2019 Mar 2;393(10174):919-935. Epub 2019 Feb 25.
8. Caprara C, Corradi V, Curioni A, Pegoraro O, Giuliani A, Gastaldon F, Ronco C “Rene policistico: dall’ereditarietà complessa alla terapia” *Biochimica Clinica*, 2021, vol. 45 SS1, S37.
9. Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris PC “The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains” *Nature Genetics* 1995;10(2):151-60.
10. Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, Torres VE, Wu G, Hayashi T, Mochizuki T, Park JH, Witzgall R, Somlo S “Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product” *The Journal of biological chemistry* 1999 Oct 1;274(40):28557-65.
11. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Xiaogang L, Elia AEH, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J “Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells” *Nature genetics* 2003 Feb;33(2):129-37.

12. Lanktree MB, Haghighi A, di Bari I, Song X, Pei Y “Insights into Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease from Genetic Studies” *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 2021 May 8;16(5):790-799. Epub 2020 Jul 20.
13. Rossetti S, Harris PC “Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease” *Journal of the American Society of Nephrology* 2007 May;18(5):1374-80. Epub 2007 Apr 11.
14. Cornec-Le Gall E, Audrezet MP, Chen JM, Hourmant M, Morin MP, Perrichot R, Charasse C, Whebe B, Renaudineau E, Jousset P, Guillodo MP, Grall-Jezequel A, Saliou P, Férec C, Le Meur Y “Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD” *Journal of the American Society of Nephrology* 2013 May;24(6):1006-13. Epub 2013 Feb 21.
15. Hwang YH, Conklin J, Chan W, Roslin NM, Liu J, He N, Wang K, Sundsbak JL, Heyer CM, Haider M, Paterson AD, Harris PC, Pei Y “Refining genotype-phenotype correlation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease” *Journal of the American Society of Nephrology* 2016 Jun;27(6):1861-8. Epub 2015 Oct 9.
16. 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” *Journal of the American Society of Nephrology* 2007 Jul;18(7):2143-60. Epub 2007 Jun 20.
17. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, Burton S, Sneddon V, Peral B, et al. “Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications” *American journal of human genetics* 2001 Jan;68(1):46-63. Epub 2000 Dec 12.
18. Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC. Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Jan;29(1):13-23. Epub 2017 Oct 16.
19. Bruce R. Korf, Mira B Irons “The Human Genome.” Chapter 4; page 64-86; *Human Genetics and Genomics*; 2013.
20. Corradi V, Gastaldon F, Virzì GM, de Cal M, Soni S, Chionh C, Cruz DN, Clementi M, Ronco C “Clinical pattern of adult polycystic kidney disease in a northeastern region of Italy” *Clin Nephrol.* 2009 Oct;72(4):259-67
21. Corradi V, Gastaldon F, Virzì GM, Clementi M, Nalesso F, Cruz DN, de Cal Massimo, Torregrossa R, Ronco C “Epidemiological and molecular study of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in the province of

Vicenza, Italy: possible founder effect?" *Giornale italiano di nefrologia* 2010 Nov-Dec;27(6):655-63.

22. Ravine D, Gibson RN, Walker RG, LG Sheffield, P Kincaid-Smith, D M Danks. "Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1" . *Lancet*. 1994; 343(8901): 824 – 7

23. Pei Y, Obaji J, Dupuis A, Paterson AD, Magistroni R, Dicks E, Parfrey P, et al. "Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD" *Journal of the American Society of Nephrology* 2009 Jan;20(1):205-12. Epub 2008 Oct 22.

24. Bruce R. Korf, Mira B Irons "Population Genetics." Chapter 7; page 125-136; *Human Genetics and Genomics*; 2013.