

Firenze, 08.03.2013

Basi molecolari di malattie renali pediatriche

Acidosi Tubulare Renale distale

L'acidosi tubulare renale distale (dRTA) è una rara condizione genetica caratterizzata dallo sviluppo di uno squilibrio metabolico (acidosi), di nefrocalcinosi (accumulo di calcio a livello renale con formazione di calcoli), disidratazione e scarso accrescimento. La dRTA può essere dovuta a diversi meccanismi genetici, che si associano a diverse modalità di trasmissione ereditaria. Nella forma autosomica dominante (AD) i soggetti colpiti hanno una sola copia alterata ("mutata") del gene difettoso e hanno una probabilità del 50% di trasmetterla a ciascun figlio. Nella forma autosomica recessiva (AR), per sviluppare la malattia è invece necessario che siano presenti mutazioni a carico di entrambe le copie (paterna e materna) che ciascuno di noi possiede per il gene coinvolto. La forma AD è causata da mutazioni nel gene chiamato *SLC4A1*, che codifica per una proteina situata nella membrana plasmatica dei globuli rossi. La forma di dRTA a trasmissione AR è causata invece da mutazioni nei geni *ATP6V1B1* e *ATP6V0A4* che codificano due diverse subunità (B1 e a4) di un complesso proteico che pompa idrogeno fuori dalle cellule che rivestono la parete interna del tratto finale dei tubuli renali e dei dotti collettori renali, e sono anche situate nell'orecchio interno. Per questo motivo, i soggetti affetti possono presentare sordità, che può manifestarsi in diverse fasi dello sviluppo, sia nel periodo neonatale che nell'età adulta.

Poiché i dati della letteratura scientifica sulle alterazioni dei geni associati a dRTA sono ancora limitati negli anni precedenti, grazie al contributo dell'Associazione A.Ma.R.T.I., è stata condotta, presso il Laboratorio di Genetica Medica dell'A.O.U. Meyer/Università di Firenze, un'analisi genetica su pazienti affetti da dRTA provenienti da diversi centri italiani e, in piccola quota, anche esteri. Inoltre, in questi studi è stato rivelato un possibile legame tra la dRTA con mutazioni nei geni *ATP6V1B1* e *ATP6V0A4* e il rene a spugna midollare (MSK), un'altra rara malattia congenita caratterizzata da dilatazione dei tubuli collettori precaliceali a livello del rene.

Gli obiettivi del lavoro svolto possono essere così riassunti:

1. Abbiamo espanso l'analisi genetica, per giungere ad una caratterizzazione ancora più accurata dei difetti genetici che possono causare la dRTA;
2. Abbiamo analizzato una casistica di pazienti affetti da MSK, provenienti dall'AOU Meyer e da altri centri, per verificare l'esistenza di un rapporto tra questa condizione e mutazioni dei geni *ATP6V1B1* e *ATP6V0A4*, che causano la dRTA;
3. Infine, abbiamo proseguito studi di laboratorio già avviati su linee cellulari, che hanno lo scopo di comprendere più approfonditamente il meccanismo di azione della pompa H^+ -ATPasi e il suo ruolo biochimico all'interno del tubulo renale e dell'orecchio interno.

Risultati

L'analisi dei geni *ATP6V1B1*, *ATP6V0A4* e *SLC4A1* è stata finora effettuata su un totale di 70 pazienti con sospetta dRTA. I pazienti sono stati inviati da diversi centri italiani ed esteri.

Mutazioni considerate responsabili del quadro clinico di dRTA sono state trovate nella grandissima maggioranza dei pazienti analizzati (46/70); in 18 pazienti sono state identificate mutazioni nel gene *ATP6V1B1*, in 22 nel gene *ATP6V0A4*, e 6 in *SLC4A1*. E' interessante osservare che per molte delle alterazioni individuate (23/43) le nostre sono le prime ad essere individuate, poiché non sono mai state riportate finora in letteratura scientifica.

L'analisi di 8 pazienti con Rene a Spugna Midollare (MSK) ha permesso di confermare le nostre precedenti osservazioni sull'implicazione dei geni *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1* in questa condizione. In 7 casi su 8 sono state individuate delle alterazioni di questi geni. Ciò è particolarmente importante perché implica che i geni responsabili della dRTA possono anche causare un altro tipo di patologia renale, la cui causa era finora sconosciuta. In base a ciò, sarà possibile d'ora in poi prospettare l'analisi genetica (dei geni *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1*) non solo ai pazienti affetti da dRTA, ma anche a quelli affetti da MSK, rendendo possibile l'offerta di una consulenza genetica, con possibilità di diagnosi precoce e di attuazione di adeguate misure preventive nei familiari che hanno ereditato le mutazioni responsabili della patologia. E' inoltre interessante osservare che i nostri studi hanno dimostrato che sia nei pazienti con dRTA, sia in quelli con MSK, le mutazioni dei due geni *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1* si associano ad una particolare alterazione dell'orecchio interno che è implicata nella riduzione d'udito.

Sindrome Nefrosica Corticoresistente

La sindrome nefrosica steroideo-resistente (SNSR) si presenta come alterazione dei glomeruli renali che comporta una perdita di proteine con le urine e quindi ad una riduzione delle proteine nel sangue, edemi ed ipercolesterolemia e nei casi più gravi a insufficienza renale cronica.

Questa condizione ha molto spesso una base genetica e i geni più frequentemente studiati sono *NPHS2* e *WT1*. Presso il laboratorio di Genetica dell'Ospedale Meyer sono stati analizzati per questi due geni 22 casi di SNSR tutti provenienti dalla Nefrologia dell'Ospedale Meyer e in questi casi sono state individuate 3 mutazioni nel gene *NPHS2*.

Ad oggi infatti sono stati descritti almeno 14 geni le cui mutazioni, per lo più recessive, sono state associate alla SNSR e proprio l'associazione di un elevato numero di geni coinvolti nello sviluppo della sindrome e la variabilità dei sintomi con cui essa si può manifestare la rende una condizione difficile da studiare.

Per questo motivo, per poter meglio studiare e analizzare tutti i casi di SNSR abbiamo applicato il *Next Generation Sequencing*, che consiste in una tecnologia all'avanguardia presente in pochi laboratori italiani, che permette di analizzare contemporaneamente un numero elevato di diversi geni. In questo caso abbiamo messo a punto la metodica per poter analizzare in un unico esperimento 46 geni alcuni già associati alla SNSR ed altri possibili candidati.

Grazie all'utilizzo di questa nuova tecnologia abbiamo potuto individuare una mutazione che ha permesso di caratterizzare da un punto di vista genetico la patologia e ha dato la possibilità al paziente di poter accedere ad un trapianto renale. Inoltre abbiamo individuato 3 mutazioni mai descritte nella letteratura scientifica in geni che probabilmente non avremmo avuto la possibilità di studiare con la metodica classica soprattutto in relazione ad i tempi ed i costi necessari. Applicando questa nuova tecnologia è possibile giungere rapidamente ad una diagnosi genetica che permette non solo di poter modificare il trattamento farmacologico ai pazienti in modo tale da essere il più corretto possibile ma permette, soprattutto, di poter accedere ad un trapianto renale. Infatti l'identificazione di una base genetica della malattia riduce notevolmente la possibilità di andare incontro a rigetto d'organo in seguito a trapianto renale.

Analisi di altre patologie renali

Infine, è stata messa a punto l'analisi di geni (denominanti *SLC12A1*, *KCNJ1*, *CLCNB*, *BSND*, *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G* e *AVP*) implicati in altre patologie renali rare dell'infanzia, come, Sindrome di Bartter, Sindrome di Liddle, Diabete insipido centrale e forme di Acidosi Tubulare Renale distale mista.

Implicazioni dei risultati ottenuti e prospettive future

I principali punti di importanza dei risultati sopra esposti sono i seguenti:

La sempre più dettagliata conoscenza delle mutazioni dei geni implicati nella dRTA in Italia, nonché in altri paesi mediterranei, ha reso possibile l'offerta di una consulenza genetica ad un considerevole numero di famiglie, consentendo di individuare persone in fase presintomatica e di poter quindi prevenire le complicanze più temibili di questa patologia. Inoltre, in alcuni pazienti per i quali erano state poste diagnosi di diverso tipo, l'analisi genetico-molecolare ha consentito di formulare una diagnosi di dRTA; di conseguenza in questi pazienti sono state messe in atto le misure terapeutiche indicate per la dRTA, con notevole miglioramento del quadro clinico, che in alcuni era gravemente compromesso.

La scoperta del coinvolgimento dei due geni *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1*, finora noti per la loro associazione con la dRTA, anche in un'altra malattia renale, il rene a spugna midollare (MSK) è particolarmente importante perché offre nuove prospettive terapeutiche e di consulenza genetica anche ad individui che fino ad ora non potevano usufruirne. Inoltre, tale scoperta implica che il meccanismo d'azione di questi geni è molto complesso, e rende particolarmente interessanti le prospettive derivanti dallo studio degli effetti delle mutazioni genetiche in linee cellulari renali umane che è stato avviato in altra parte del progetto. Questi dovrebbero consentire di determinare le ragioni per cui alterazioni in uno stesso gene possono dar luogo a quadri clinici diversi.

L'applicazione della Next Generation Sequencing ci ha permesso di analizzare in un unico esperimento fino a 46 geni consentendoci una rapida individuazione della causa genetica della patologia e quindi la possibilità di poter effettuare un trapianto renale con la possibilità non solo di ottenere una diagnosi rapida ma anche di poter individuare nuovi geni coinvolti nella SNSR.



Azienda Ospedaliero-Universitaria "A. Meyer"

U.O. Genetica Medica
Responsabile Prof.ssa Sabrina Giglio



In futuro, la continuazione del progetto prevede quindi:

- 1) il proseguimento dell'analisi di altri pazienti affetti da dRTA ;
- 2) L'applicazione della Next Generation Sequencing non solo alla SNSR ma anche alla dRTA e alle altre patologie renali;
- 3) l'analisi funzionale in laboratorio di linee cellulari umane nelle quali siano stati inseriti i geni *ATP6V0A4* e *ATP6V1B1* contenenti diverse mutazioni riscontrate nella casistica analizzata e caratterizzare le nuove mutazioni trovate nei casi di SNSR.