IN DEPTH REVIEW

Quali test genetici nelle malattie renali

Mariagrazia Granata[1], Carolina Canto[2], Maria Clorinda Mazzarino[1], Pasquale Fatuzzo[3], Antonio Granata[4]

(1) Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Università degli studi di Catania
(2) Laboratorio di Anatomia Patologica OncoPath s.r.l., Floridia, Siracusa
(3) Dip. di Medicina Interna, Scuola di Specializzazione in Nefrologia, AOU "Policlinico-Vittorio Emanuele", Catania
(4) UOC Nefrologia e Dialisi, P.O. "San Giovanni di Dio", Agrigento

Corrispondenza a: Antonio Granata; UOC Nefrologia e Dialisi, P.O. "San Giovanni di Dio", Agrigento, Italia; Tel:+39 092 2442292 Fax:+39 092 2442238 Mail: antonio.granata4@tin.it

Abstract

La genetica clinica ricopre un ruolo fondamentale nella pratica diagnostica, dovuto principalmente all'importante componente genetica ereditaria e non, che caratterizza la maggior parte delle malattie. Questa branca della medicina ha subito dal 2003, anno in cui è stato sequenziato l'intero genoma umano, una rapida crescita tecnologica. Basti infatti pensare alla riduzione sia in termini di tempo e di costi, che il sequenziamento genico ha subito: se prima erano necessari 13 anni ed un costo di circa tre miliardi di dollari, adesso sono sufficienti poche settimane e circa diecimila dollari per sequenziare l'intero genoma umano. L'applicabilità della genetica clinica in campo nefrologico risiede nel fatto che molte malattie renali sono causate da mutazioni genetiche (ad. es., sindrome di von-HippelLindau, Fabry, Liddle, Bartter, malattie MYH9 correlate, etc.,). La genetica clinica svolge, quindi, un ruolo cruciale dal momento che molte di queste malattie spesso non sono correttamente diagnosticate. In questa *review* vengono prese in esame le tecnologie che sono in atto a disposizione del nefrologo per la diagnostica molecolare delle malattie renali.

Parole chiave: malattie renali, malattie renali rare, sindrome nefrosica idiopatica, test genetici

Which genetic testing in renal disease

Clinical genetics plays a central role in the diagnostic practice, mainly due to both the hereditary and non-hereditary genetic component, which characterizes most of the diseases. This branch of medicine has been characterized by a rapid technological growth since 2003, when the entire human genome was sequenced. We need to consider the reduction in terms of both time and costs that the gene sequencing has gone through. Before, 13 years and about three billion dollars were needed, now it takes only a few weeks and about ten thousand dollars to sequence the entire human genome. The applicability of clinical genetics in nephrology is due to the fact that many kidney diseases are characterized by genetic mutations (e.g., von-Hippel Lindau syndrome, MYH9 related disorders, Fabry's syndrome, Liddle's and Bartter's Syndrome, and others). Clinical genetics plays, therefore, a crucial role since many of these diseases are often not properly diagnosed. In this review, we examine the new technologies that are available to the nephrologist for the molecular diagnosis of renal diseases.

Key words: genetic tests, idiopathic nephrotic syndrome, kidney diseases, rare kidney diseases

Introduzione

Il campo della genetica clinica e delle biotecnologie ad essa associate sono al centro di un rapido progresso e sono destinate a trasformare inevitabilmente anche la pratica clinica nefrologica. Le tecniche sempre più innovative a disposizione dei clinici, infatti, permettono l'identificazione dei geni coinvolti in una determinata patologia ed il contributo che ciascuno di essi fornisce nell'insorgenza della patologia stessa [1]. Un altro ruolo chiave è rappresentato dalla possibilità di attuare la prevenzione di determinate patologie, rendendo così la prognosi più favorevole. La genomica (una branca della biologia molecolare che si occupa dello studio del genoma) può fornire indicazioni precise sulla predisposizione genetica che un individuo possiede in merito ad una determinata patologia e di capire quali sono i geni che danno la sensibilità ad una determinata terapia. I test genetici ad oggi disponibili possono avere diverse finalità: i. PREDITTIVA: dovrebbero consentire l'identificazione delle persone a rischio in fase molto precoce, in modo da prevenire la comparsa del fenotipo patologico (essi forniscono indicazioni precise sulla predisposizione genetica che un individuo possiede in merito ad una determinata patologia); ii. DIAGNOSTICA: consentono di effettuare una diagnosi o di confermare, in una persona affetta, un sospetto clinico. (ad es., ricercare nel DNA del soggetto la presenza di alcuni geni mutati che sono indice di malattia già in corso). iii. FARMACOGENETICA: riguardano le analisi finalizzate all'identificazione di variazioni di sequenza nel DNA, in grado di predire la risposta individuale ai farmaci, in termini di efficacia e di rischio relativo di eventi avversi. I test genetici di nuova generazione forniscono un valido aiuto al clinico nella diagnosi, nonché nella prevenzione di eventuali patologie, permettendo un monitoraggio mirato ad individuare precocemente l'eventuale esordio della malattia (ad es., ricorso periodico alla colonscopia, mammografia, ecografia renale, etc.). Alcuni geni, inoltre, sono in grado, da soli, di determinare la malattia e quindi la loro analisi ha un significativo valore predittivo. Molte malattie renali sono causate dalla mutazione di un singolo gene come ad es. la sindrome di von Hippel Lindau causata da mutazioni a livello del gene VHL, un oncosoppressore. La proteina prodotta dal gene mutato non è in grado di regolare il ciclo cellulare, portando ad una incontrollata proliferazione cellulare e quindi alla formazione di cisti e masse tumorali [2] (full text). Un ulteriore esempio è costituito dalla sindrome di Liddle, causata da mutazioni a livello dei geni SCNN1B o SCNN1G. Ciascuno di questi geni codifica per una delle subunità che compongono il canale epiteliale per il sodio (ENaC). Mutazioni a livello dei geni SCNN1B o SCNN1G provocano un malfunzionamento nei processi di degradazione del canale stesso e quindi ad un eccessivo riassorbimento di sodio che ha, come conseguenza, l'ipertensione e l'ipopotassiemia [3]. Nel caso di malattie multifattoriali, ovvero patologie nelle quali vi sono più geni coinvolti e che necessitano dell'interazione tra questi ultimi e l'ambiente perché si abbia la comparsa della patologia, i dati che l'analisi genetica può fornire riguardano solo la suscettibilità ad ammalarsi. Un esempio è costituito dalla nefrolitiasi da acido urico (UAN), una comune malattia multifattoriale caratterizzata dalla formazione di nefrolitiasi uratica a causa della eccessiva concentrazione di calcio, ossalato ed acido urico nelle urine. La componente genetica di questa patologia è costituita dal gene ZNF365 [4].

Tecnologie a disposizione del nefrologo per lo studio genetico

Sempre più numerose sono le tecnologie che il nefrologo ha a disposizione per lo studio genetico delle nefropatie (Tabella 1) e di seguito verranno riportate le più importanti e le relative informazioni cliniche (Tabella 2).

A. Tecnologie diagnostiche genomiche

1. Analisi del Cariotipo mediante bandeggio-G

Nel corso degli anni le tecniche citogenetiche per lo studio del cariotipo si sono sempre più raffinate ed oggi, grazie al [1]bandeggio dei cromosomi e alle colorazioni specifiche, è possibile verificare non solo la presenza di un corretto numero di cromosomi nelle cellule, ma anche individuare alterazioni strutturali anche di piccole dimensioni. Si è sviluppata così una branca della patologia umana che prende il nome di patologia cromosomica. Tra le applicazioni dell'analisi citogenetica nella patologia cromosomica ritroviamo la diagnosi prenatale di sindromi associate ad anomalie cromosomiche, la diagnosi postnatale di anomalie cromosomiche in individui portatori di sindromi o di malattie genetiche, la diagnosi postnatale di anomalie cromosomiche bilanciate in individui sani che mostrano poliabortività, lo studio citogenetico delle cellule tumorali volto all'identificazione di cromosomi "marcatori" per una determinata neoplasia, la mappatura di regioni subcromosomiche che contengono geni associati allo sviluppo o alla progressione tumorale [5] [6]. Le anomalie genetiche sono generalmente il risultato di errori durante la gametogenesi (non-disgiunzione dei cromosomi omologhi o rotture cromosomiche seguite da una riorganizzazione degli stessi in combinazioni anomale), ma possono verificarsi anche al momento della fecondazione o nelle prime fasi dello sviluppo embrionale. Le rotture dei cromosomi si verificano in modo casuale, pertanto a livello teorico sono possibili numerosissime anomalie delle quali solo una piccola parte è compatibile con la vita.

2. Ibridazione in situ (FISH – CISH - SISH)

Questa tecnica si avvale di sonde di DNA che riconoscono specifiche sequenze di regioni cromosomiche di dimensioni maggiori di 100Kb; tale valore definisce il limite di risoluzione di questa metodica nella identificazione delle aberrazioni cromosomiche. Le sonde marcate con fluorocromi/cromofori o argento vengono applicate alle piastre metafasiche o ai nuclei interfasici. La sonda ibrida la sequenza complementare sul cromosoma marcando la regione

Tabella 1. Schema riassuntivo delle tecnologie a disposizione del nefrologo per lo studio genetico

Tecnologie diagnostiche genomiche	Analisi del Cariotipo mediante bandeggio-G Ibridazione in situ Microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH)
Tecniche diagnostiche PCR-based	Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) Real Time PCR (Polymerase Chain Reaction)
Sequenziamento	Metodo Sanger Tecniche di sequenziamento next generation
Mappatura dei geni umani mediante l'analisi di linkage	

Tabella 2. Principali tecniche genetiche impiegate in campo nefrologico

Analisi del Cariotipo mediante bandeggio-G	Verifica la presenza di un corretto numero di cromosomi nelle cellule ed individua alterazioni strutturali anche di piccole dimensioni.
Microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH)	Identifica squilibri cromosomici che sono troppo piccoli per essere rilevati tramite il bandeggio G e microscopio ottico.
Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)	Identifica riarrangiamentiintragenici che non sono visibili tramite la metodica aCGHarray.
Sequenziamento	Fornisce informazioni sull'ordine della sequenza nucleotidica del gene per identificare mutazioni e SNPs (single nucleotide polymorphism)
Mappatura dei geni umani mediante l'analisi di linkage	Fornisce dati sulla posizione dei geni e permette la creazione di mappe geniche.

cromosomica ricercata che viene poi visualizzata al microscopio a campo chiaro o a fluorescenza [7]. La metodica di ibridazione in situ consente, inoltre, di ovviare alla necessità di operare su cellule in attiva divisione mitotica, fornendo un vantaggio inestimabile nei casi in cui serve una diagnosi rapida (ad es., nei quadri clinici critici a sospetta origine genetica). La tecnica dell'ibridazione in situ viene usata per identificare l'alterazione del numero di cromosomi (aneuploidie), microdelezioni, traslocazioni complesse non dimostrabili con la tipizzazione tradizionale, per mappare geni di nuova identificazione nei relativi loci cromosomici. Un recente studio si è avvalso di questa tecnica per identificare il ruolo della infezione renale da Epstein-Barr virus (EBV) nella patogenesi della nefrite lupica [8]. In particolare l'ibridazione in situ ha permesso di esaminare l'espressione delle proteine EBV-LMP1 (EBV-latent membrane protein-1) e EBER-1 (EBV-encoded RNA 1) nel tessuto renale bioptico.

3. Microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH)

Le aberrazioni cromosomiche possono essere diagnosticate, anche senza conoscerne anticipatamente la natura, con una metodica globale detta CGH. L'array CGH rappresenta un significativo passo in avanti nella diagnosi genetica poiché permette di identificare squilibri cromosomici che sono troppo piccoli per essere rilevati tramite il bandeggio G ed il microscopio ottico. Queste alterazioni di piccole dimensioni prendono il nome di alterazioni submicroscopiche e traggono il loro nome proprio dal fatto che non possono essere identificate al microscopio. Tali alterazioni possono compromettere i processi di crescita e sviluppo e comprendono microdelezioni e microduplicazioni. L'array CGH confronta il DNA del soggetto con un campione di DNA di controllo e individua le differenze tra le due serie di DNA. In questo modo è possibile identificare delezioni o duplicazioni (squilibri) nel DNA del soggetto costituendo il punto di partenza per l'identificazione del gene compromesso. Un *microarray* funziona sfruttando la capacità di una molecola di DNA da analizzare, di legare specificamente un'altra molecola di DNA. Il *microarray* comprende decine di migliaia di brevi sequenze di DNA ("sonde"), disposte in una griglia presente su un vetrino chiamato chip. Le sequenze che costituiscono l'array sono rappresentative dell'intero genoma umano, a intervalli regolari, e coprono i 22 autosomi e i cromosomi sessuali [9] (full text). Ai fini della metodica, il DNA del paziente viene trattato preliminarmente con endonucleasi per essere frammentato. I frammenti così ottenuti vengono marcati con fluoroforo (un colorante fluorescente colorato). Il DNA di riferimento, da una persona o da un pool di persone senza anomalie genetiche è marcato con un diverso colorante fluorescente. Generalmente vengono utilizzati i coloranti Cy5 e Cy3 che emettono, rispettivamente, fluorescenza rossa e verde. Il DNA di riferimento e quello del paziente vengono mescolati e applicati sul chip in modo da far avvenire l'ibridazione. I frammenti di DNA ibridano con la loro corrispondente sonda sull'array. Il chip viene quindi sottoposto a scansione in una macchina chiamata microarray scanner che misura la quantità di fluorescenza rossa e verde su ciascuna sonda. Per esempio il DNA del paziente può essere marcato con un colorante fluorescente rosso e quello di controllo può essere marcato con il verde. Lo scanner, avvalendosi di un apposito software per computer, calcola il rapporto del rosso e del verde per determinare se, per il tratto di DNA rappresentato da ciascuna sonda, il campione del paziente ha la giusta quantità di DNA (mostrata in giallo), troppo DNA (una duplicazione) evidenziato da una colorazione rossa o troppo poco DNA (una delezione) mostrato da una colorazione verde [10] [11].Questa tecnologia permette di identificare variazioni geniche con una risoluzione massima di 10Kb. I microarray di nuova generazione, che utilizzano i polimorfismi a singolo nucleotide, hanno una risoluzione ancora più elevata e consentono di diagnosticare variazioni del numero di copie in varie patologie, dal cancro all'autismo. Un esempio dell'applicabilità di questa metodica all'ambito della nefrologia è costituito da un recente

studio che ha permesso di identificare le mutazioni a livello del gene complement factor H–related 1 (CFHR1) associate a glomerulopatie C3: un gruppo di malattie renali caratterizzate da infiammazione glomerulare e da un accumulo di C3 causato da una errata regolazione del sistema del complemento. Il gene CFHR1 codifica per FHR1 (factor H protein-1), una proteina che sembra essere preliminarmente coinvolta nella regolazione del sistema del complemento [12].

B. Tecniche diagnostiche PCR-based

1. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

La MLPA è una metodica di recente introduzione in grado di evidenziare variazioni nel numero di copie che interessano numerosi geni. In particolare la MLPA può essere utilizzata per la diagnosi molecolare di numerose malattie genetiche la cui patogenesi è correlata con la presenza di delezioni, duplicazioni geniche, o non corretta metilazione del DNA. Grazie al cospicuo numero di geni analizzati per singola reazione, la metodica MLPA è diventata il *gold standard* per l'analisi molecolare di tutte quelle patologie che sono associate a riarrangiamenti intragenici o a variazioni nel numero di copie di un dato gene [13] (full text). Come suggerisce il nome, l'amplificazione della sonda è subordinato al processo di ligazione, che può verificarsi solo se il DNA bersaglio è presente nel campione. Il metodo, infatti, utilizza due sonde oligonucleotidiche per ciascun target di interesse. Le sonde sono costruite in modo tale da essere contigue alla regione nucleotidica da analizzare e contengono all'estremità 3' e 5' sequenze che funzionano da primer (sequenza X e sequenza Y) uguali per tutte le sonde in esame. Uno dei due primer è coniugato con un marcatore fluorescente; inoltre una delle sonde contiene una sequenza di lunghezza variabile (stuffer) per l'analisi contemporanea di più target: ciò permette di discriminare sequenze che differiscono anche per un solo nucleotide. La peculiarità dell'MLPA risiede nel fatto che, non i campioni genomici bensì le sonde aggiunte a tali campioni, vengano amplificate e quantizzate [14] (full text).

2. Real-time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR)

La Real-time PCR è una tecnica che permette di identificare le mutazioni geniche senza l'ausilio di tecniche accessorie: è interamente basata sulla PCR. I primers utilizzati sono progettati in modo tale da essere specifici per la sequenza da analizzare. La fase di amplificazione del DNA da saggiare può essere monitorata grazie all'aggiunta, nella miscela di reazione, di un colorante in grado di emettere fluorescenza, il SYBR green. Tale colorante è un intercalante del DNA e, nello specifico, lega il solco minore del DNA a doppia elica (ds DNA). Con il procedere del processo di amplificazione si verifica un aumento della quantità di ds DNA (che è, a sua volta, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione iniziale) e quindi si assiste ad un considerevole e graduale aumento della fluorescenza. Un apposito software permette di visualizzare, durante tutta la fase di amplificazione, la curva determinata dall'aumento della fluorescenza nella miscela di reazione. Il punto in cui la curva di amplificazione supera il valore soglia della fluorescenza viene definito ciclo soglia (Ct). Il valore di Ct è inversamente proporzionale alla quantità di sequenza target presente nel DNA stampo. L'uso di molecole fluorescenti intercalanti è un metodo efficace e relativamente economico, tuttavia questo sistema non è in grado di discriminare tra i prodotti specifici di amplificazione ed altri prodotti aspecifici come i dimeri di primers. Per ovviare a tale problematica sono state sviluppate numerose tipologie di sonde specifiche che legano selettivamente la sequenza di interesse. Il principio che accomuna queste sonde è che se non rilevano sul DNA la sequenza per le quali sono specifiche, o quest'ultima possiede mutazioni, non si ha emissione della fluorescenza e quindi un segnale identificativo. La sonda gene-

specifica si appaia nella zona compresa fra i due primer (*forward* e *reverse*) e contiene un colorante fluorescente (*Reporter*), solitamente di colore verde all'estremità 5' ed un colorante inibente l'emissione della fluorescenza del reporter (*Quencher*), di colore rosso all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal *quencher* a bassa energia. Fino a quando, in altri termini, la sonda resta intatta, la vicinanza tra reporter fluorescente e *quencher*, annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno e, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla, l'allontanamento tra il reporter ed il quencer pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà ad ogni ciclo di amplificazione e proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del reporter. Registrando la quantità di emissione fluorescente per ogni ciclo, è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale nella quale il primo incremento significativo di prodotti neo-sintetizzati è collegato alla concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza [15]. L'utilizzo di queste sonde fornisce risultati più accurati e più affidabili rispetto all'impiego di coloranti fluorescenti intercalanti, nonostante ciò comporti un significativo aumento dei costi. La quantificazione della sequenza target può essere assoluta, avvalendosi di una curva standard di calibrazione, o relativa rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo o *housekeeping* per normalizzare l'espressione del gene studiato. Si deve essere certi, tuttavia, che l'efficienza della PCR sia la stessa per i campioni noti e per quelli incogniti [16].

C. Sequenziamento

1. Metodo di Sanger

Il metodo dei dideossi o metodo di Sanger costituisce l'approccio tradizionale al sequenziamento. In un primo step la regione di interesse viene amplificata tramite PCR; in un secondo step, denominato reazione di sequenza, nella miscela di reazione si includono dei dideossi nucleotidi, modificati con un H al posto di OH in posizione 3 del pentosio, nonché marcati con quattro fluorofori diversi i quali una volta incorporati bloccano l'ulteriore sintesi del filamento. Al termine dell'elettroforesi capillare si ottengono una serie di frammenti di lunghezza variabile determinando il così detto elettroferogramma. Il sequenziamento Sanger è in grado di analizzare in modo affidabile la sequenza di frammenti di DNA di 50-800 bp, individuando inserzioni/delezione e polimorfismi a singolo nucleotide(SNPs) [17] (full text) [18].

2. Tecniche di sequenziamento next generation (NGS)

Fino a pochi anni fa i metodi utilizzati per il sequenziamento si basavano sul metodo di Sanger, il quale però risulta avere notevoli svantaggi soprattutto per quanto riguarda il basso numero di campioni analizzabili in parallelo e la difficoltà di automatizzazione del processo. L'avvento delle tecnologie di ultima generazione di sequenziamento del DNA ha permesso di sequenziare molti milioni di paia di basi di DNA in un singolo esperimento in modo altamente rapido e non eccessivamente dispendioso [19]. I principali fornitori di strumenti di ultima generazione per quanto concerne il sequenziamento includono Illumina (San Diego, CA, the HiSeqanalyser) e Life Technologies (Carlsbad, CA; ABI SOLiD). Inoltre, con questi nuovi sistemi è possibile ottenere sequenze da singoli frammenti di DNA o da

frammenti amplificati mediante PCR aggirando la necessità di effettuare il clonaggio in sistemi batterici, un procedimento che sarebbe più lungo e problematico. Nonostante la minore lunghezza dei frammenti analizzati, la possibilità di effettuare un gran numero di letture in parallelo, permette di ottenere in poco tempo una grande mole di dati. È infatti necessario il ricorso ad avanzati sistemi bioinformatici per la gestione dell'informazione ottenuta dal sequenziamento [20].

D. Mappatura dei geni umani mediante l'analisi di linkage

Il linkage può essere definito come la tendenza di alleli vicini e presenti su un singolo cromosoma ad essere ereditati insieme, come unità, attraverso il processo meiotico che coinvolge le cellule germinali [21].Due geni, infatti, sono ereditati insieme quando si trovano molto vicini tra loro mentre, se non sono vicini, gli eventi di ricombinazione e segregazione casuale che caratterizzano il processo meiotico possono separarli portando alla formazione di alleli ricombinanti. La distanza genica di due loci viene espressa in centimorgan (cM): due loci che presentano l'1% di ricombinazione, per definizione, sono distanti 1 cM. Va tuttavia sottolineato che, dopo una certa distanza fisica, la frazione di ricombinazione non rispecchia più la distanza genetica per l'esistenza di doppi *crossing-over*. L'analisi di linkage serve dunque ad associare il gene in esame ad un cromosoma e quindi conoscerne la posizione. Oggetto di tale analisi sono solitamente i geni che, se mutati, sono responsabili di un fenotipo patologico, rivestendo così un ruolo di fondamentale importanza in genetica medica: permette infatti di mappare geni (inclusi quelli coinvolti in malattie) che sono identificabili solo sulla base del fenotipo. Una grande percentuale dei geni coinvolti in malattie appartengono a questa categoria, specialmente quelle di cui non ne è ancora stato chiarito il processo biochimico e molecolare. L'analisi di concatenazione nell'uomo si basa sullo studio degli alberi genealogici e sulla ricerca delle meiosi informative, ovvero quelle che permettono di identificare se il gamete è ricombinante oppure no. Per costruire le mappe geniche è necessario avvalersi di un marcatore del quale si conosce la posizione [22] (full text). Quest'ultimo è un carattere mendeliano sufficientemente polimorfico da offrire una ragionevole probabilità che una persona scelta a caso sia eterozigote. A tale scopo vengono costruite delle mappe genetiche dei marcatori, ottenute grazie ad un mappatura marcatore-marcatore. Per rendere più facile la mappatura è necessario che i marcatori siano tanti e quanto più possibile vicini fra loro. I marcatori attualmente più utilizzati sono i microsatelliti (o short tandem repeats o STR), ovvero sequenze ripetute di DNA non codificante costituite da unità di ripetizione molto corte (1-5 bp) disposte secondo una ripetizione in tandem ed ereditati in modo mendeliano. La loro presenza nel genoma umano non influisce per più del 3%, ma si pensa che comunque essi svolgano una funzione essenziale per la struttura dei cromosomi. Questa metodica presenta delle complicazioni: spesso le famiglie da analizzare contano pochi membri e vi è un basso numero di ricombinanti per avere risultati statisticamente significativi. Per ovviare a queste problematiche si analizzano più famiglie contemporaneamente: per questo motivo è stato introdotto il LOD score (Logarithm of Odds; test statistico usato per l'analisi del linkage). Quest'ultimo compara le probabilità di riscontrare i valori osservati se i due loci sono effettivamente sullo stesso cromosoma rispetto alla probabilità di osservare gli stessi valori esclusivamente per caso. Valori positivi di LOD implicano la presenza di linkage, mentre valori negativi indicano che il linkage è meno probabile. Per convenzione, un LOD score più grande di 3.0 (odds di 1000: 1) è considerato prova di linkage [23].

E. Tipologie di difetti genetici

1. Variazioni nel numero di copie

Il termine "variazione del numero di copie" (CNV) fa riferimento alla variazione nel numero di copie di un dato gene, come per esempio la duplicazione e la delezione. Tali variazioni possono coinvolgere un singolo gene, più geni, un intero cromosoma (es., sindrome di Down) o l'intero genoma aploide. Le CNV giocano un ruolo fondamentale nella genetica delle patologie complesse: alterazioni genomiche possono condurre ad un'ampia gamma di manifestazioni cliniche che includono ritardi mentali e malformazioni congenite.Inoltre, alterazioni nel numero di copie di DNA sono state associate all'autismo, al morbo di Parkinson e a vari tipi di tumore. L'avvento delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione ha aperto nuove opportunità per l'identificazione delle CNV, consentendo di raggiungere risoluzioni fino a pochi anni fa impensabili [24]. Alcune CNV hanno caratteristiche e frequenze diverse nelle differenti popolazioni, il che potrebbe spiegare la maggiore o minore suscettibilità ad alcune patologie riscontrate in particolari aree o gruppi etnici [25] (full text). Un esempio di CNV è costituito dalla delezione della regione cromosomica 17q12 che contiene il gene HNF-1β (fattore nucleare di trascrizione degli epatociti), responsabile della RCAD (Renal Cysts And Diabetes) [26] (full text). Questa delezione è stata evidenziata in un numero sempre più elevato di famiglie ed è diventato evidente che, oltre alla presenza di cisti renali e di diabete ad esordio precoce nei soggetti più colpiti, possono essere presenti caratteristiche fenotipiche supplementari in alcuni soggetti, tra cui malformazioni del tratto genitale [27] [28], iperuricemia, gotta a giovane esordio [29], alterazioni della funzionalità epatica e atrofia pancreatica [30] (full text). Le mutazioni nel gene HNF-1β possono, quindi, essere considerate causa di una malattia multisistemica.

2. Polimorfismi a singolo nucleotide

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sono variazioni di una singola base nella sequenza del DNA presenti in almeno l'1% della popolazione. Sono le varianti genetiche più comuni all'interno del genoma e sono quindi diventati i marcatori più frequentemente utilizzati per gli studi di associazione. A seconda della regione di sequenza in cui cadono, gli SNPs possono essere definiti codificanti o non codificanti. Nel primo caso sono coinvolte regioni di DNA codificanti ed il polimorfismo può causare una sostituzione, modificando l'amminoacido codificato, o può cambiare il codone ma non l'amminoacido codificato: ciò avviene grazie al fatto che il codice genetico è degenerato. Nel secondo caso, invece, sono coinvolte regioni di DNA non tradotte in 5' o 3' (untranslated region o UTR), introni, tratti intragenici. Questi ultimi vengono anche detti polimorfismi di non sostituzione e possono, in ogni caso, influenzare il processo di splicing, il legame dei fattori di trascrizione, la stabilità dell'mRNA [31]. Gli SNPs sono sempre più oggetto di studio, dal momento che, secondo alcune stime, nella popolazione mondiale si trovano circa dieci milioni di SNPs per i quali entrambi gli alleli sono presenti con una frequenza superiore all'1%. Tali SNPs (common SNPs) costituiscono il 90% della variabilità nella popolazione mondiale, mentre il restante 10% è costituito da un insieme diversificato di altre varianti rare [32]. Un esempio dell'importanza dello studio degli SNPs in campo nefrologico può essere fornito dal rene policistico dove è stato possibile identificare un cospicuo numero di SNPs a livello della sequenza del gene PKHD1 probabilmente correlati con la malattia del rene policistico autosomica recessiva (autosomal recessive polycystickidney disease o ARPKD).

F. Studi di associazione Genome-wide

Lo studio di associazione genome-wide o GWAS misura e analizza le variazioni di sequenza del DNA di tutto il genoma umano utlizzando campioni provenienti da centinaia o migliaia di individui nel tentativo di identificare i fattori di rischio genetici per le malattie che sono comuni nella popolazione, cercando polimorfismi di singoli nucleotidi [33] (full text).Questo metodo rende possibile la genotipizzazione di un gran numero di pazienti con diagnosi identiche, seguito da calcoli statistici per verificare un'associazione tra ogni singolo SNP, o una serie di SNPs contigui (aplotipo), e la malattia. Questi studi normalmente mettono a confronto il DNA di due gruppi di persone: individui che presentano la malattia e individui sani il più possibile simili ai malati. Il DNA estratto dai campioni provenienti dai soggetti in esame viene analizzato tramite un *microarray* ed i dati vengono interpretati grazie a software bioinformatici. Se alcune variazioni genetiche sono significativamente più frequenti negli individui malati, allora le variazioni si dicono "associate" con la malattia. Queste variazioni sono poi considerate come indicative della regione in cui è probabile che si trovi anche la mutazione che causa la malattia [34]. Un dato molto interessante è emerso dall'osservazione che la maggior parte degli SNPs associati con la malattia non sono in una regione genica adibita alla codifica di una proteina, ma si trovano invece molto spesso in una regione non codificante di genoma, portando all'ipotesi che queste sequenze probabilmente svolgano un'attività di regolazione genica [35] (full text).

G. Applicazione delle tecniche genetiche nelle malattie renali: alcuni esempi

Numerose patologie renali possono essere diagnosticate mediante analisi genetica, grazie alla correlazione tra fenotipo e genotipo mutato (Tabella 3).

1. Il rene policistico autosomico dominante dell'adulto (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ADPKD)

Può essere causata da mutazioni a livello di due geni, PKD1 e PKD2, che codificano, rispettivamente, per due proteine, la policistina-1 e -2. Il gene PKD1, mutato in circa l'85% dei pazienti, si trova sul cromosoma 16 mentre il gene PKD2, localizzato sul cromosoma 4, risulta mutato nel rimanente 15% circa dei pazienti [36]. La diagnosi di ADPKD è confermata da test genetico - molecolari, essenziali soprattutto in individui la cui diagnosi è incerta. L'analisi molecolare si basa sui seguenti metodi: amplificazione mediante PCR degli esoni dei geni

Tabella 3. Patologie renali, geni coinvolti e tecniche genetiche a disposizione per la conferma della diagnosi

Malattia	GeniInteressati	Tecnica Genetica Impiegata Per La Diagnosi
ADPKD	PDK1 - PDK2	PCR -NGS
Sindrome di Alport	COL4A5 (X-linked)	NGS - MLPA
	COL4A4	NGS
	COL4A3	NGS
Malattia di Fabry	GLA	PCR -SEQUENZIAMENTO - MLPA
Sindrome di Liddle	SCNN1B	SEQUENZIAMENTO - MLPA
	SCNN1G	
von Hippel Lindau	VHL	PCR - SEQUENZIAMENTO - MLPA
Malattia MYH9 correlata	MYH9	SEQUENZIAMENTO - MLPA

studiati e sequenziamento delle regioni codificanti e di parte delle regioni introniche, per l'identificazione delle possibili varianti.

2. La sindrome di Alport

Causata da mutazioni dei geni COL4A3, COL4A4 e COL4A5, codificanti catene di collagene, che impediscono la corretta produzione o l'assemblaggio della rete di collagene di tipo IV. In circa l'80% dei soggetti affetti da tale sindrome, la patologia è trasmessa con un'ereditabilità legata all'X (X-linked Alport Syndrome o XLAS) ed è dovuta a mutazioni nel gene COL4A5 [37] (full text). La Sindrome di Alport può essere ereditata anche con configurazione autosomica recessiva se entrambe le copie dei geni COL4A3 o COL4A4, collocati sul cromosoma 2 sono mutate. In base alle caratteristiche cliniche viene proposta l'esecuzione dell'analisi molecolare dei geni responsabili della sindrome di Alport: COL4A5, oppure COL4A4 e COL4A3. In particolare, l'analisi molecolare dei geni COL4A5, COL4A4 e COL4A3 viene effettuata mediante tecniche NGS. Il campione sul quale si effettua l'analisi può essere sangue in EDTA oppure DNA. A causa della familiarità della malattia, è necessario il prelievo del probando e dei genitori. In aggiunta a quanto sopra indicato, può essere effettuato, su richiesta, il test MLPA per il gene COL4A5. Si tratta di un test genetico relativo al gene responsabile della XLAS, che può essere erogato solo in seguito alla consulenza genetica.

3. La Malattia di Fabry

La Malattia di Fabry (FD) è una patologia X-linked causata da mutazioni a livello del gene GLA, localizzato in Xq22, che portano ad un deficit dell'enzima lisosomiale α-glattosidasi A (α-Gal A) [38] (full text). La diagnosi molecolare delle Malattia di Fabry viene effettuata su un prelievo di sangue periferico e si basa sull'amplificazione mediante PCR degli esoni del gene e sul sequenziamento degli esoni del gene in grado di identificare tutte le mutazioni puntiformi. In aggiunta, può essere eseguita l'analisi mediante MLPA dei 7 esoni del gene per la ricerca di delezioni o duplicazioni.

4. La Sindrome di Liddle

La sindrome di Liddle è una rara forma ereditaria di ipertensione ad esordio precoce, associata alla diminuzione dei livelli plasmatici di potassio, renina e aldosterone. Come già esplicitato nel testo, la sindrome di Liddle è causata da mutazioni a livello dei geni SCNN1B o SCNN1G. Ciascuno di questi geni codifica per una delle subunità che compongono il canale epiteliale per il sodio (ENaC) [3]. La conferma della diagnosi si basa sul sequenziamento del gene SCNN1G o sulla ricerca di delezioni/duplicazioni di tali geni mediante MLPA.

5. La Sindrome di von Hippel Lindau

Come già trattato nel testo, la sindrome di von Hippel Lindau è causata da mutazioni a livello del gene VHL, un oncosoppressore. La proteina prodotta dal gene mutato non è in grado di regolare il ciclo cellulare, portando ad una incontrollata proliferazione cellulare e quindi alla formazione di cisti e masse tumorali [2] (full text). La diagnosi genetica si basa sull'amplificazione mediante PCR degli esoni del gene VHL, oppure sul sequenziamento delle regioni codificanti e di parte delle regioni introniche, per la ricerca delle mutazioni puntiformi. In aggiunta può essere effettuata un'analisi mediante MLPA per la ricerca di delezioni o duplicazioni non rilevabili in sequenza.

6. La Malattia MYH9 correlata

La Malattia MYH9-correlata è un raro disordine genetico che deriva dalle mutazioni di MYH9, il gene che codifica per la catena pesante della miosina citoplasmatica IIA. Questa patologia viene ereditata in maniera autosomica dominante. La diagnosi viene effettuata tramite analisi in immunofluorescenza di uno striscio di sangue periferico, o tramite se-

quenziamento del gene MYH9. In aggiunta possono essere condotte analisi MLPA per evidenziare delezioni o duplicazioni esoniche.

Conclusioni e prospettive

Le nuove tecnologie di sequenziamento, attualmente per lo più limitate all'ambiente di ricerca, saranno sempre più integrate nelle routine della clinica diagnostica. Tuttavia, una rivoluzione porta naturalmente dei rischi e delle promesse. Avere la certezza di essere affetti da malattie come la ADPKD senza poter sperare in una cura, o di essere geneticamente predisposto per lo sviluppo di una neoplasia, ha di sicuro un forte impatto sulla qualità della vita. Un altro scenario rischioso è quello della possibilità di abuso, da parte delle imprese di assicurazione o da parte dei datori di lavoro, delle informazioni genetiche personali. Come medici, dobbiamo essere consapevoli di questi rischi, in modo da poter consigliare al meglio il paziente e decidere insieme allo stesso ed alla sua famiglia quali test genetici effettuare. La promessa finale di questa rivoluzione è personalizzare la medicina, assicurando al paziente un trattamento efficace e mirato grazie alla conoscenza dettagliata della fisiopatologia molecolare del processo di malattia e delle caratteristiche genetiche specifiche del paziente.

Definizioni

Bandeggio: Trattamento e colorazione dei cromosomi atti a rivelare arrangiamenti, tipici e caratteristici di ogni cromosoma, di bande chiare e scure orizzontali all'asse lungo del cromosoma stesso. Essendo l'arrangiamento in bande tipico per ogni cromosoma, è possibile identificare una regione cromosomica corrispondente a una singola banda in modo univoco. Esistono differenti metodiche di bandeggio cromosomico e il tipo ottenuto dipende dal trattamento chimico usato: (*a*) il bandeggio C colora il centromero; (*b*) il bandeggio G (colorazione Giemsa) fornisce la visione di una serie di bande chiare e scure; (*c*) il bandeggio R presenta un pattern opposto al G e al C; (*d*) il bandeggio Q usa un colorante fluorescente, la quinacrina, ed è simile al bandeggio G. Il fenomeno del bandeggiamento è probabilmente in relazione alla composizione in basi del DNA e alla struttura della regione cromosomica che comprende il grado di condensazione e il tipo di proteine associate.

FISH (Fluorescence In Situ Hybridization): L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH), è una tecnica di citogenetica molecolare che permette di visualizzare la localizzazione e il numero di copie di una sequenza specifica di DNA sia su preparati di cromosomi metafasici, sia su nuclei interfasici mediante l'utilizzo di sonde marcate con fluorocromi.

CISH: L'ibridazione in situ cromogenica (CISH) è una metodica citogenetica che si avvale sia della tecnica immunoistochimica che della FISH. Nonostante condividano l'uso di procedure di ibridazione in situ, la tecnica CISH trova maggiore applicazione nell'ambito della diagnostica poiché richiede microscopi molto più semplici ed economici rispetto a quelli richiesti dalla FISH.

SISH: La Silver Enhanced in Situ Hybridization (SISH) è una metodica quasi completamente automatizzata che permette la visualizzazione quantitativa delle copie del gene HER2 e del cromosoma 17 mediante ibridazione in situ con argento. Questa tecnica è caratterizzata da bassi tempi di esecuzione ed i risultati possono essere facilmente interpretati dai patologi utilizzando un comune microscopio a campo chiaro.

Bibliografia

[1] Bockenhauer D, Medlar AJ, Ashton E et al. Genetic testing in renal disease. Pediatric nephrology (Berlin, Germany) 2012 Jun;27(6):873-83

[2] Gläsker S, Neumann HPH, Koch CA et al. Von Hippel-Lindau Syndrome 2000; (full text)

[3] Biesenbach G, Raml A, Schmekal B et al. Decreased insulin requirement in relation to GFR in nephropathic Type 1 and insulin-treated Type 2 diabetic patients. Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association 2003 Aug;20(8):642-5

[4] Gianfrancesco F, Esposito T [Multifactorial disorder: molecular and evolutionary insights of uric acid nephrolithiasis]. Minerva medica 2005 Dec;96(6):409-16

[5] Howe B, Umrigar A, Tsien F et al. Chromosome preparation from cultured cells. Journal of visualized experiments : JoVE 2014 Jan 28;(83):e50203

[6] Russell PJ. Genetica Un Approccio Molecolare. Ed Piccin Nuova Libraria 2012

[7] Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C. Robbbins – Fondamenti di patologia e fisiopatologia.Ed. Masson -Edra 2013.

[8] Yu XX, Yao CW, Tao JL et al. The expression of renal Epstein-Barr virus markers in patients with lupus nephritis. Experimental and therapeutic medicine 2014 May;7(5):1135-1140

[9] Beseler-Soto B, Jiménez-Candel MI, Pedrón-Marzal G et al. [Familial presentation of microdeletion and inverted microduplication with array-CGH]. Revista de neurologia 2014 Dec 16;59(12):551-4 (full text)

[10] Reddy KS, Aradhya S, Meck J et al. A systematic analysis of small supernumerary marker chromosomes using array CGH exposes unexpected complexity. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 2013 Jan;15(1):3-13

[11] Shinawi M, Cheung SW The array CGH and its clinical applications. Drug discovery today 2008 Sep;13(17-18):760-70

[12] Tortajada A, Yébenes H, Abarrategui-Garrido C et al. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. The Journal of clinical investigation 2013 Jun;123(6):2434-46

[13] Stuppia L, Antonucci I, Palka G et al. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. International journal of molecular sciences 2012;13(3):3245-76 (full text)

[14] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic acids research 2002 Jun 15;30(12):e57 (full text)

[15] Frayling IM, Monk E, Butler R.PCR-Based Methods for Mutation Detection.Molecular Diagnostics 2005, pp 65-74.

[16] Heuckmann JM, Thomas RK A new generation of cancer genome diagnostics for routine clinical use: overcoming the roadblocks to personalized cancer medicine. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2015 Sep;26(9):1830-7

[17] Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR et al. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. Clinical chemistry 2005 Jan;51(1):35-9 (full text)

[18] Brown TA. Biotecnologie molecolari, Principi e tecniche. Zanichelli, 2008

[19] Schuster SC Next-generation sequencing transforms today's biology. Nature methods 2008 Jan;5(1):16-8

[20] Mardis ER Next-generation DNA sequencing methods. Annual review of genomics and human genetics 2008;9:387-402

[21] Ott J, Wang J, Leal SM et al. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. Nature reviews. Genetics 2015 May;16(5):275-84

[22] Bailey-Wilson JE, Wilson AF Linkage analysis in the next-generation sequencing era. Human heredity 2011;72(4):228-36 (full text)

[23] Lange K. Mathematical and Statistical Methods for Genetic Analysis. Springer 2002.

[24] Alkan C, Coe BP, Eichler EE et al. Genome structural variation discovery and genotyping. Nature reviews. Genetics 2011 May;12(5):363-76

[25] Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD et al. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. American journal of human genetics 2005 Jul;77(1):78-88 (full text)

[26] Bingham C, Hattersley AT Renal cysts and diabetes syndrome resulting from mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2004 Nov;19(11):2703-8 (full text)

[27] Bockenhauer D, Bichet DG Pathophysiology, diagnosis and management of nephrogenic diabetes insipidus. Nature reviews. Nephrology 2015 Jun 16;

[28] Grantham JJ Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. The New England journal of medicine 2008 Oct 2;359(14):1477-85

[29] Mekahli D, Woolf AS, Bockenhauer D et al. Similar renal outcomes in children with ADPKD diagnosed by screening or presenting with symptoms. Pediatric nephrology (Berlin, Germany) 2010 Nov;25(11):2275-82

[30] Bingham C, Bulman MP, Ellard S et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. American journal of human genetics 2001 Jan;68(1):219-24 (full text)

[31] Brookes AJ The essence of SNPs. Gene 1999 Jul 8;234(2):177-86

[32] Kruglyak L, Nickerson DA Variation is the spice of life. Nature genetics 2001 Mar;27(3):234-6

[33] Bush WS, Moore JH Chapter 11: Genome-wide association studies. PLoS computational biology 2012;8(12):e1002822 (full text)

[34] Pearson TA, Manolio TA How to interpret a genome-wide association study. JAMA 2008 Mar 19;299(11):1335-44

[35] Manolio TA Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. The New England journal of medicine 2010 Jul 8;363(2):166-76 (full text)

[36] Spithoven EM, Kramer A, Meijer E et al. Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2014 Sep;29 Suppl 4:iv15-25

[37] Jais JP, Knebelmann B, Giatras I et al. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2000 Apr;11(4):649-57 (full text)

[38] Arends M, Hollak CE, Biegstraaten M et al. Quality of life in patients with Fabry disease: a systematic review of the literature. Orphanet journal of rare diseases 2015 Jun 16;10:77 (full text)