



Il Rene Policistico e l'A.I.R.P. onlus

Il Registro Italiano del Rene Policistico Autosomico Dominante

P. Carrera^{2,3}, L. Palmieri¹, F. Caruso¹, D. Lodi¹, F. Rigo², L. Furci¹, M. Granito¹, F. Damiano¹, R. Iatrino¹, A. Boletta⁵, M. Ferrari^{2,3,4}, G. Aguiari⁶, R. Magistroni¹

¹Divisione di Nefrologia Dialisi e Trapianto, Dipartimento di Medicina e Specialità Mediche, Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Modena, Università di Modena e Reggio Emilia

²Genomic Unit for the Diagnosis of Human Pathologies, Center for Genomics, Bioinformatics and Biostatistics, San Raffaele Scientific Institute, Milano

³Diagnostica e Ricerca San Raffaele SpA, Milano

⁴Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

⁵Istituto Telethon Dulbecco (DTI) presso Istituto Scientifico San Raffaele

⁶Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara, Ferrara

Introduzione

La malattia policistica autosomica dominante (ADPKD) è una malattia ereditaria monogenica relativamente frequente nella popolazione generale. La sua incidenza infatti è variamente descritta in letteratura tra 1:400 e 1:1000 nati vivi. La frequenza di ADPKD non è trascurabile se si considera che è più comune della malattia di Huntington, dell'emofilia, dell'anemia falciforme, della fibrosi cistica, della distrofia muscolare, e della sindrome di Down combinate insieme. ADPKD è causata da mutazioni a carico dei geni PKD1 e PKD2 che rispettivamente codificano per le proteine transmembrana Policistina-1 e Policistina-2 (1-3). La caratteristica principale di questa affezione è lo sviluppo di cisti renali, un fenotipo per la verità non esclusivo di questa patologia, ma manifestato anche da altre sindromi umane (Rene policistico autosomico recessivo, sindrome di Bardet-Biedl, sindrome di Meckel, nefronoftisi ecc.). Di tutte queste, ADPKD è di gran lunga la più significativa in termini di incidenza.

Gli studi che hanno avuto origine da osservazioni su malattie renali cistiche diverse, sostenute da mutazioni su geni differenti, stanno progressivamente convergendo verso un punto comune. Questo elemento unificatore è il cilio primario, un organello scoperto nella cellula epiteliale tubulare almeno un secolo fa (4), da sempre considerato una mera curiosità biologica e di significato vestigiale. Il cilio cellulare è invece recentemente divenuto il soggetto di una intensissima attenzione scientifica perché sospettato di rappresentare la migliore chiave di lettura della degenerazione in senso cistico del rene.

I geni: PKD1 e PKD2

Le ricerche che hanno condotto all'identificazione e al sequenziamento dei geni coinvolti nella ADPKD hanno avuto inizio nei primi anni '80 attraverso un approccio definito "positional cloning". Nel 1994 la individuazione di una famiglia affetta da ADPKD, associata ad una traslocazione cromosomica bilanciata a livello del locus di PKD1, ha permesso l'individuazione del suo gene (1). Nel 1996 infine è stato poi identificato il secondo gene coinvolto nella patologia (PKD2) attraverso tecniche di positional cloning, studi di espressione e approcci bioinformatici per la ricerca di omologie di sequenza con PKD1 (2).

Le mutazioni di PKD1 sono responsabili dell'85% dei casi di ADPKD, mentre quelle di PKD2 sono responsabili del resto dei casi. Sebbene le manifestazioni cliniche nelle due forme siano sovrapponibili, i pazienti con mutazioni a carico di PKD2 presentano i sintomi più tardivamente e hanno mediamente una progressione verso l'insufficienza renale più lenta, con una sopravvivenza renale più lunga (69 anni) rispetto ai pazienti con mutazioni di PKD1 (53 anni) (5). Il gene PKD1 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 16 in prossimità del gene della sclerosi tuberosa di tipo 2 (TSC2). Oltre alla semplice associazione topografica i due geni sono correlati anche funzionalmente e di conseguenza presentano anche una correlazione di interesse clinico: sono stati infatti descritti casi di ampie delezioni che coinvolgono contemporaneamente PKD1 e TSC2. Nei pazienti in cui si realizza questa condizione si sviluppa un fenotipo ci-



stico particolarmente precoce e grave (6-8), con evoluzione verso l'insufficienza renale terminale molto più rapida di quanto non avvenga mediamente nelle consuete forme di ADPKD.

La regione genomica di PKD1 ha una struttura complessa: la porzione del gene che va dall'esone 1 all'esone 33 è duplicato in 6 geni ad alta omologia ("Homology Genes"). L'origine di questi geni è il frutto di un' ancestrale duplicazione genomica di PKD1. Tali geni presentano una identità di oltre il 75% con PKD1 ed esprimono altrettanti RNA messenger. Ne deriva che solo la porzione 3' terminale del gene PKD1 (circa un quarto del gene) non è duplicato. L'identità ai geni di omologia ha ostacolato e ritardato il sequenziamento completo di PKD1 e rende tuttora complessa sotto il profilo tecnico la ricerca delle mutazioni (9-11).

Il gene PKD1 consta di 46 esoni, il suo mRNA è lungo 14 Kb (1 Kb, 1 Kilobase pari a 1000 nucleotidi). La proteina codificata, policistina-1, è lunga 4302 aminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 460 Kilodalton (Kd) (1, 3).

Nel 1996 è stato clonato il gene PKD2 (2) precedentemente localizzato sul braccio lungo del cromosoma 4 (4q22) (12-13); è compreso in una regione genomica di 68 Kb ed è trascritto in un mRNA di circa 5,4 Kb. La proteina codificata da questo mRNA viene chiamata policistina-2, consta di 968 aminoacidi (aa) ed ha un peso molecolare di 110 Kd.

Il registro ADPKD

Abbiamo deciso nel 2008 di creare un database delle mutazioni ADPKD registrate nel territorio italiano nell'ambito di un Consorzio di studio che coinvolge tre Università Italiane e grazie ad un finanziamento del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica. Crediamo che questo strumento aiuterà i ricercatori e i clinici ad aumentare la conoscenza riguardante il ruolo delle varianti genetiche in questa patologia. Esso raccoglie i dati di mutazione raccolti dal nostro consorzio nel primo anno e mezzo di attività ed ha l'ambizione di divenire luogo di concentrazione di questi dati su scala nazionale. Il registro si basa sul Leiden Open (Source) Variation Database (LOVD) (14) ed è liberamente accessibile attraverso la pagina web <http://grenada.lumc.nl/LOVD2/PKD/home.php>.

Struttura del database

Il database include tutte le mutazioni caratterizzate dal Consorzio ad oggi dei geni PKD1 e PKD2. Ogni gene ha la propria homepage dalla quale si può avere

accesso a diverse informazioni riguardanti lo specifico gene, i curatori del database, le sequenze di riferimento e tavole riassuntive riguardanti la posizione e la natura delle mutazioni caratterizzate. Sono utilizzabili inoltre strumenti di ricerca per l'individuazione rapida di determinate mutazioni e la navigazione attraverso le stesse. Inoltre, sono disponibili collegamenti a risorse orientate al gene quali MIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) e HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). Infine sono raggiungibili risorse in grado di generare disegni schematici indicanti la collocazione delle varianti patogenetiche in relazione alla struttura genica e proteica.

Le mutazioni sono descritte in accordo alla "Human Genome Variation Society" (HGVS) (15) ed identificate da un univoco codice ID. Ogni specifico record all'interno del database contiene informazioni dettagliate riguardanti la mutazione e dati clinici del paziente nel quale la mutazione è stata identificata. In particolare sono disponibili la precisa descrizione molecolare a livello di DNA e proteina, il riferimento bibliografico di pubblicazione della mutazione, dettagli sulla metodologia di ricerca della mutazione, l'ID paziente con dati anagrafici e clinici dettagliati (età, sesso, livelli di funzione renale, emocromo, dati radiologici, ecografici ecc.). La patogenicità delle mutazioni riportata nella colonna "Path" è stata compilata sulla base del HUGO Mutation Database Initiative/ Human Genome Variation Society (in assenza di studi di espressione e con l'eccezione di comparsa di Stop Codon e delezioni) quando due o più dei criteri descritti nelle prossime righe sono stati presenti: 1) co-segregazione della malattia nella famiglia; 2) comparsa della malattia in corrispondenza di una mutazione de novo; 3) frequenza allelica inferiore all'1% (assenza in almeno 100 individui normali corrispondente a 200 alleli); 4) coinvolgimento di un aminoacido altamente conservato. Le variazioni di sequenza con frequenza inferiore all'1% che non hanno raggiunto un numero sufficiente di criteri sono riportate come "inferred but not concluded". Variazioni di sequenza che mostrano una frequenza allelica maggiore dell'1% sono state codificate come polimorfismi. I dati sono consultabili in tre tavole accessibili attraverso collegamenti ipertestuali dalla pagina principale: nella "unique sequence variant table" ciascuna singola mutazione non ripetuta è elencata sulla base del numero esonico e non sono visualizzati dati clinici inerenti il paziente; nella "complete sequence variant table" le mutazioni associate a ciascun paziente sono descritte in dettaglio; nella "variants with no known pathogenicity table"

PKD1 homepage Switch gene

LOVD Gene homepage

General information	
Gene name	Polycystic Kidney Disease 1
Gene symbol	PKD1
Chromosome Location	16p13.3
Database location	grenada.lumc.nl
Curator	Dr. Francesco Caruso, Dr. Riccardo Magistroni, Dr. Daniele Lodi, Dr.ssa Lucia Palmieri and Dr.ssa Paola Carrera
PubMed references	View all (unique) PubMed references in the PKD1 database
Date of creation	February 02, 2009
Last update	February 15, 2010
Version	PKD1 100215
Add sequence variant	Submit a sequence variant
First time submitters	Register here
GenBank reference	AC005600.1
Total number of unique DNA variants reported	20
Total number of individuals with variant(s)	1850
Total number of variants reported	1854
Subscribe to updates of this gene	

Graphical displays and utilities

[Summary tables](#) Summary of all sequence variants in the PKD1 database, sorted by type of variant (with graphical displays and statistics)

Sequence variant tables

Unique sequence variants	Listing of all unique sequence variants in the PKD1 database, without patient data
Complete sequence variant listing	Listing of all sequence variants in the PKD1 database
Variants with no known pathogenicity	Listing of all PKD1 variants reported to have no noticeable phenotypic effect (note: excluding variants of unknown effect)

Search the database

By type of variant	View all sequence variants of a certain type
Simple search	Query the database by selecting the most important variables (exon number, type of variant, disease phenotype)
Advanced search	Query the database by selecting a combination of variables
Based on patient origin	View all variants based on your patient origin search terms
Search through hidden entries	Find the number of variant entries in the database (including hidden entries) matching your search terms.

Links to other resources

OMIM - Gene	601313
-------------	--------

Powered by LOVD v.2.0 Build 24
 Enabled modules: recaptcha
 ©2004-2010 Leiden University Medical Center

Fig. 1 - Pagina principale del database online di PKD1.

sono inclusi tutti i polimorfismi noti sia validati che non validati. Il database permette l'inserimento online delle nuove mutazioni non appena sono identificate anche da altri gruppi di ricerca dopo una semplice procedura di registrazione autorizzata dai curatori del database. La descrizione delle mutazioni sottomesse viene verificata dai curatori anche per mezzo dell'ausilio del software Mutalyzer(16). Dopo la validazione alla mutazione viene assegnato un identificatore unico (17) e, se non vi sono altre restrizioni alla pubblicazione, il record è reso disponibile alla comunità scientifica sul database (Fig. 1).

Contenuto del database

Il database ADPKD contiene al momento 21 varianti uniche delle quali 12 sono considerate conclusivamente

patogeniche e sono state individuate indipendentemente in 23 pazienti; 2 sono polimorfismi non correlati alla patologia (Tab. I).

TABELLA I - CARATTERISTICHE DELLE VARIANTI GENETICHE RACCOLTE NEL DATABASE

Tipo di mutazione	Gene		Totale
	PDK1	PDK2	
Nonsense	5	4	9
Missenso	11	0	11
Piccola inserzione o delezione	2	0	2
Difetto di sito di Splicing	0	0	0
Frameshift	0	1	1
Totale	18	5	23



Queste mutazioni patogeniche sono così distribuite: 21 nonsense, 2 piccole delezioni e inserzioni, 3 frame shifts, 11 missenso. Il gene PKD1 mostra la maggior parte di mutazioni patogeniche (18/21). Queste sono eterogenee essendo di diversi tipi e distribuendosi sull'intero gene. Dei 20 pazienti affetti da mutazioni di PKD1, 11 sono portatori di mutazioni missenso, 5 sono portatori di mutazioni nonsense, 2 piccole inserzioni e delezioni. Attualmente sono in corso studi espressione di mRNA, proteine e funzionalità proteica.

Il gene PKD2 presenta 3/21 delle mutazioni uniche globali in un totale di 5 pazienti. Di questi pazienti affetti da mutazioni di PKD2, 4 sono portatori di mutazioni nonsense, 1 paziente presenta una delezione che determina frameshift.

Discussione

Il Registro Italiano del Rene Policistico Autosomico Dominante è nato con lo scopo di raccogliere a livello nazionale le varianti genetiche legate ai geni associati a questa malattia. Il Registro è nato in tempi recenti, ma inizia ad accogliere un numero di mutazioni in rapida crescita. Attualmente sono presenti 21 mutazioni uniche, che come atteso sono prevalentemente a carico di PKD1 (85,7% del totale), in linea con quanto riportato in altre casistiche internazionali. Le mutazioni a carico di PKD1 incluse nel nostro database sono in gran parte riportate per la prima volta (16 varianti su 18); il loro ruolo patogenetico è stato codificato nella maggior parte dei casi come "concluded" (9 varianti) e "inferred but not concluded" (6 varianti). Tra le varianti prevalgono decisamente le sostituzioni di tipo "missense" a cui seguono mutazioni "nonsense" e quindi delezioni o frameshifts; poco rappresentate risultano le varianti che coinvolgono i siti di splicing. Attualmente sono in valutazione dati riguardanti l'effetto delle mutazioni sui valori di espressione di mRNA, della proteina codificante e della funzionalità della stessa. Nonostante la distribuzione delle mutazioni coinvolga diversi esoni compresi tra il 14° e il 46° e non esistano veri e propri "Hot Spots", da questi dati preliminari scaturisce una certa predominanza di mutazioni concentrate sull'esone 15 (3 variazioni). La concentrazione delle mutazioni in questa regione è verosimilmente solo apparente e complessivamente legata alle dimensioni dell'esone 15 che sopravanzano decisamente quelle degli altri esoni.

I dati rispettivi a PKD2 sono di difficile discussione per il numero esiguo di mutazioni identificate. In PKD2 prevalgono le mutazioni "nonsense": 2 varianti; mentre il terzo tipo di variante identificato è una "frameshift". Per

tutte e tre le varianti è stato concluso un ruolo patogenetico definitivo.

In conclusione, il Registro Italiano del Rene Policistico Autosomico Dominante è stato sviluppato con l'intento di raccogliere a livello nazionale informazioni molecolari e cliniche che diversamente risulterebbero disperse e non fruibili. Le informazioni saranno preziose nell'ambito nazionale ed internazionale in progetti di approfondimento clinico e molecolare. La raccolta di dati sta crescendo in modo esponenziale dall'inizio della disponibilità online di questa risorsa. È ambizione dei suoi curatori che questa risorsa completamente gratuita per la comunità scientifica sia pienamente utilizzata dagli operatori nazionali coinvolti nella gestione clinica e nella ricerca scientifica inerente il rene policistico autosomico dominante. È prevedibile che questa risorsa giunta ad un certo grado di maturità si colleghi e interfacci alle altre realtà internazionali di registri inerenti i geni PKD1 e PKD2 (<http://pkdb.mayo.edu/>) (18).

Ringraziamenti

Dobbiamo ringraziare l'ingegnere Ivo F.A.C. Fokkema e il Dottor Johan T. den Dunnen del "Leiden University Medical Center <http://www.LUMC.nl/>, Netherlands" per il loro supporto nel corso dello sviluppo del database. Dobbiamo inoltre ringraziare la "Associazione Italiana Rene Policistico" (AIRP) nella figura del suo Presidente Professor Marco Soria e di tutti i suoi collaboratori per il supporto dimostrato nello sviluppo del progetto. Questo lavoro è stato possibile per mezzo del finanziamento PRIN Anno 2007 - prot. 2007FJRB7H per il progetto "*Rene policistico autosomico dominante: dalla clinica alla analisi cellulare e molecolare: approccio multidisciplinare di valutazione diagnostica e prognostica*".

Indirizzo degli Autori:

Dr. Riccardo Magistroni
Divisione di Nefrologia Dialisi e Trapianto
Azienda Ospedaliero Universitaria
Policlinico di Modena
41100 Modena, Italy
riccardo.magistroni@unimore.it

Bibliografia

1. Consortium EPKD: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 1994; 77: 881-94.
2. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, et al. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; 272: 1339-42.
3. Hughes J, Ward CJ, Peral B, et al. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995; 10: 151-60.
4. Zimmerman KW. Contributing to the knowledge of glands and epithelium [in German]. *Arch Mikr Entwicklungsmech* 1898; 52: 552-706.
5. Hateboer N, Dijk MA, Bogdanova N, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 1999; 353: 103-7.
6. Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, et al. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 843-51.
7. Torra R, Badenas C, Darnell A, Camacho JA, Aspinwall R, Harris PC, Estivill X. Facilitated diagnosis of the contiguous gene syndrome: tuberous sclerosis and polycystic kidneys by means of haplotype studies. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 1038-43.
8. Harris PC. The TSC2/PKD1 contiguous gene syndrome. *Contrib Nephrol* 1997; 122: 76-82.
9. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggari-Malik A, Wignall CG, Torres VE, Harris PC. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002; 61: 1588-99.
10. Rossetti S, Strmecki L, Gamble V, et al. Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 46-63.
11. Phakdeekitcharoen B, Watnick TJ, Germino GG. Mutation analysis of the entire replicated portion of PKD1 using genomic DNA samples. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 955-63.
12. Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S. Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* 1993; 18: 467-72.
13. Schneider MC, Rodriguez AM, Nomura H, Zhou J, Morton CC, Reeders ST, Weremowicz S. A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics* 1996; 38: 1-4.
14. Fokkema IF, den Dunnen JT, Taschner PE. LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum Mutat* 2005; 26: 63-8.
15. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15: 7-12.
16. Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 2008; 29: 6-13.
17. Claustres M, Horaitis O, Vanevski M, Cotton RG. Time for a unified system of mutation description and reporting: a review of locus-specific mutation databases. *Genome Res* 2002; 12: 680-8.
18. Gout AM, Martin NC, Brown AF, Ravine D. PKDB: Polycystic Kidney Disease Mutation Database—a gene variant database for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mutat* 2007; 28: 654-9.