



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

Dottorato di Ricerca (XX ciclo)
"Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo"
Coordinatore Scientifico: Prof. Renzo Galanello
(MED 03)

STUDIO DI FATTIBILITA' DI
SCREENING NEONATALE
DELLA MALATTIA DI WILSON SULLA
POPOLAZIONE SARDA

Tutor:
Prof. Stefano De Virgiliis

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Valentina Dessi

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

INDICE

Introduzione	Pag. 1
Metodiche di Screening	5
Screening neonatale	7
La malattia di Wilson	10
Definizione	10
Epidemiologia	10
Patogenesi	11
La proteina della malattia di Wilson (ATP7B)	12
Sintomi clinici	12
Diagnosi clinica e di laboratorio	13
Indicazioni per l'analisi molecolare della malattia di Wilson	13
Terapia	15
Genetica	15
Sardegna	19
Obiettivo dello studio	21
Materiali e metodi	22
Estrazione DNA	22
PCR	23
Elettroforesi su gel di MDE	23
Studi di espressione sulla -366/-367ins21	23
Allelic Discrimination by 5' Nuclease Assay	24
Real-Time PCR	25
Risultati	28
Discussione	34
Bibliografia	37
Ringraziamenti	45

INTRODUZIONE

Lo screening viene definito come l'identificazione presuntiva di una malattia per mezzo dell'uso di test, esami o altri presidi che possono essere applicati rapidamente ¹.

Test di screening efficaci dovrebbero essere economici, applicabili su larga scala ed in grado di selezionare in modo efficace una sottopopolazione su cui eseguire specifici test diagnostici ².

Per quanto riguarda lo screening genetico, nel 1975 è stato definito come la ricerca in una popolazione di persone che possiedono determinati genotipi che:

- sono associati con delle malattie o predispongano ad esse;
- possono determinare il disturbo nei loro discendenti;
- possono produrre altre variazioni sconosciute associate con la malattia ³.

Oggi lo screening genetico può essere definito come ogni tipo di test eseguito per la sistematica e precoce identificazione o esclusione di una malattia ereditaria, per conoscere la predisposizione a una qualche malattia o per determinare in un portatore una predisposizione che possa produrre una malattia ereditaria nella discendenza.

Con la migliore conoscenza della genetica di varie malattie e una più larga capacità della tecnologia genetica, lo screening genetico ad uno stadio precoce è possibile per un numero crescente di malattie genetiche.

Le giustificazioni offerte in favore dello screening genetico includono la possibilità di effettuare una diagnosi precoce per la malattia oggetto di screening, la possibilità di iniziare un trattamento e le decisioni riproduttive ⁴.

Lo screening genetico si riferisce a programmi espliciti e sistematici diretti o a intere popolazioni di individui asintomatici o a sottopopolazioni nelle quali il rischio è maggiore.

I due obiettivi dello screening genetico citati più frequentemente sono quello di ridurre l'incidenza della malattia e quello di informare gli individui e le coppie a rischio riguardo le loro scelte riproduttive.

Nel 1968 l'Organizzazione Mondiale per la Salute ha enumerato le indicazioni di cui si deve tenere conto prima di effettuare un programma di screening:

la gravità della malattia per la salute deve essere importante;

- ci deve essere uno stadio sintomatico latente o precoce riconoscibile;
- la storia naturale della malattia deve essere conosciuta;
- ci deve essere un trattamento efficace per i pazienti con la malattia riconosciuta;
- ci deve essere un test appropriato che identifichi la malattia nel suo stadio precoce;
- il test deve essere accettabile per la popolazione;

- ci deve essere accordo sul trattamento della malattia;
- devono essere disponibili attrezzature per la diagnosi e per il trattamento;
- il case finding deve essere in corso;
- nel complesso il costo del case finding (incluso la diagnosi e il trattamento) deve essere economicamente bilanciato in relazione alla spesa possibile per le cure mediche.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità⁵ ha dichiarato un presupposto fondamentale, cioè l'esigenza che il corso della malattia possa essere modificato o prevenuto dalla precoce individuazione e dal trattamento o dall'intervento. Una grande importanza è stata attribuita a quale periodo (di vita) sia il più appropriato per attuare lo screening al fine di ottenere il miglior risultato per l'individuo insieme con una (concomitante) sensibilità nei confronti della comunicazione, del consenso e all'etichettamento.

Queste indicazioni sono state date prima che la diagnosi prenatale e l'analisi dei portatori fosse possibile e perciò oggi sono applicabili solo ad una parte degli screening⁶. Nel 1998 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha reiterato che il principale obiettivo dello screening genetico è di prevenire la malattia o di assicurare una diagnosi precoce e un trattamento. Ha riaffermato l'uso volontario dello screening e ha proposto le seguenti linee guida:

- lo screening genetico deve essere volontario e non obbligatorio;
- lo screening genetico deve essere preceduto da un'adeguata informazione riguardo allo scopo e al possibile risultato dello screening o del test e alle possibili scelte che devono essere fatte;
- lo screening anonimo per scopi epidemiologici deve essere condotto dopo aver avvisato la popolazione su cui effettuare lo screening;
- i risultati non devono essere rivelati a datori di lavoro, assicurazioni, scuole, o altri senza il consenso dell'individuo in modo da evitare discriminazioni;
- i risultati devono essere seguiti da una consulenza genetica, in particolare quando sfavorevoli;
- se il trattamento o la prevenzione esistono e sono possibili, devono essere offerti il prima possibile;
- lo screening neonatale dovrebbe essere obbligatorio e gratuito se la diagnosi precoce ed il trattamento saranno di beneficio per il nascituro.

Anche il Consiglio Europeo ha adottato delle raccomandazioni sullo screening genetico nelle quali questo è definito come un test applicato su un determinato gruppo di persone in modo da identificare in uno stadio precoce, uno stadio preliminare, un fattore di rischio o

una combinazione di fattori di rischio di una malattia. Lo scopo dello screening è di guarire o prevenire la malattia o di ritardare la sua progressione o il suo inizio attraverso un intervento precoce. Poichè esistono delle differenze nelle necessità e nei servizi sanitari, così come nei valori etici e nelle norme legali tra i diversi paesi, le decisioni riguardo ai programmi di screening devono essere prese da ciascuno stato in cooperazione con i medici ⁷.

Sulla base della popolazione target si possono distinguere diversi tipi di screening genetico:

1. screening genetici prenatale: che includono lo screening su cellule fetali nel sangue materno, lo screening sul siero materno, screening con ultrasuoni, lo screening su cellule fetali ottenute dopo amniocentesi o prelievo dei villi coriali, e la diagnosi genetica preimpianto. La maggiore motivazione per lo screening genetico prenatale è data dalla possibilità di individuare un disordine genetico precocemente nel corso di una gravidanza ⁸.

Gli screening prenatale tentano di identificare i feti con un maggiore rischio di anomalie in base alla storia familiare o all'età materna avanzata.

Applicazioni dello screening genetico prenatale sono la prevenzione della malattia emolitica da incompatibilità Rh, tramite l'analisi del fenotipo e genotipo Rh della coppia ed eventualmente del feto, l'individuazione delle gravidanze a rischio per aberrazioni cromosomiche, quali la sindrome di Down, e i difetti del tubo neurale, attraverso la misurazione con ultrasuoni della plica nucale ⁹.

2. screening genetici dopo la nascita: includono lo screening neonatale, screening di portatori nell'assistenza clinica preparto, screening di preconcezionale, screening a cascata, screening in età scolastica, e screening in età adulta. Gli screening genetici dopo la nascita hanno due scopi: possono confermare se la persona sottoposta al test abbia o non abbia determinate caratteristiche genetiche, con implicazioni per la sua salute futura ed inoltre possono fornire ad un adulto la possibilità di sapere se i suoi figli saranno a rischio.

Esistono diverse forme di screening dopo la nascita ¹⁰. La prima forma di screening attuato è stato quello per l'identificazione della fenilchetonuria nei neonati, oggi ampiamente diffuso, cui si sono aggiunti successivamente lo screening per l'anemia falciforme e quello per l'ipertiroidismo e per l'iperplasia surrenalica congenita. Invece, l'inclusione nella lista degli screening neonatali dello screening per malattie come la fibrosi cistica e la DMD è ancora in discussione nei vari stati: per queste ed altre patologie è messo in discussione l'utilizzo dello screening in quanto non esiste un trattamento efficace. Lo screening neonatale è comunque

consigliato affinché i genitori possano ricevere una consulenza genetica per le future gravidanze.

Attualmente la conoscenza delle basi genetiche di molte comuni malattie consente l'individuazione in fase presintomatica di molte patologie ad esordio tardivo come l'ipercolesterolemia familiare e l'emocromatosi, d'altronde lo screening per queste patologie ad esordio tardivo non è raccomandato in quanto o non esistono trattamenti efficaci di prevenzione o se esistono sono da attuarsi in età adulta¹¹. L'ipercolesterolemia familiare è una malattia autosomica dominante caratterizzata da un aumento del colesterolo nel sangue trasportato dalle lipoproteine a bassa densità. Il disturbo è diagnosticato sulla base dei segni clinici e biologici, ma una diagnosi genetica consente di identificare il fattore che lo determina. In questo caso uno screening genetico di popolazione non è praticabile a causa del largo numero di mutazioni che determinano la malattia¹². Infatti un requisito per lo screening di popolazione è la conoscenza delle mutazioni che causano la malattia in quella determinata popolazione. L'emocromatosi è un disturbo del metabolismo del ferro che determina un aumento del suo assorbimento e che porta ad un eccessivo accumulo di ferro. La comparsa delle manifestazioni cliniche avviene intorno ai 40-50 anni di età, ma la malattia se non trattata è associata con un alto tasso di mortalità. Attualmente però non esiste un test di screening efficace per questa malattia^{13, 14}.

Altre strategie di screening dopo la nascita sono date dall'identificazione dei portatori eterozigoti per malattie autosomiche recessive come le emoglobinopatie il cui screening è in atto in numerosi stati da oltre 20 anni. Tali programmi di screening sono risultati molto efficaci, come indicato dall'aumentata conoscenza della talassemia e dalla comprensione dell'importanza dello screening prenatale da parte della popolazione target¹⁵.

METODICHE DI SCREENING

La prima metodica utilizzata è stata sviluppata da Guthrie nel 1963 e consisteva nel test singolo su sangue essiccato su cartoncino (definito oggi internazionalmente "spot test") per lo screening neonatale della fenilchetonuria. Da allora le metodiche di screening sviluppate sono state numerose. Alcune forme di screening utilizzano test biochimici come nel caso dell'emocromatosi che si basa sulla determinazione dei livelli sierici di ferritina, sulla percentuale di saturazione della transferrina e sul dosaggio dei livelli epatici di ferro, altre utilizzano le tecniche di analisi del DNA.

Spesso, al fine di aumentare la sensibilità e la specificità, lo screening richiede l'utilizzo di più metodiche (two-tiered) come nel caso dell'ipotiroidismo congenito in cui si effettua la misurazione sia della tiroxina che della tireotropina, o nello screening per la fibrosi cistica in cui si esegue l'analisi immunoenzimatica del tripsinogeno su sangue seguita dall'analisi del DNA ^{16,17,18}.

Nel caso della DMD la diagnosi viene effettuata attraverso tre test differenti: il test per la creatinina chinasi, la biopsia del muscolo e l'analisi del DNA ¹⁹.

Attualmente le tecniche più innovative e di maggiore impatto sono la tandem spettrometria di massa, che permette da una goccia di sangue il riconoscimento di un gran numero di patologie ereditarie del metabolismo intermedio (acidurie organiche, difetti della beta ossidazione degli acidi grassi, aminoacidopatie), e le più moderne tecniche di analisi del DNA, in particolare recentemente i microarrays, che consentono l'analisi simultanea di numerosi geni nello stesso campione di sangue ²⁰.

La spettrometria di massa è una metodica recente che è capace di identificare più di 20 disordini metabolici, tra cui in particolare ricordiamo il deficit dell' Acyl-CoA deidrogenasi a catena media in cui la mancata diagnosi precoce e l'intervento terapeutico può condurre a severi episodi di ipoglicemia, fino al coma con un rischio di mortalità di circa il 20% dopo il primo episodio nel primo e secondo anno di vita ²¹.

Per quanto riguarda le tecniche di analisi del DNA nel 1987 ²² McCabe dimostrò la possibilità di utilizzare per lo studio del DNA lo spot test mediante la tecnica PCR (polymerase chain reaction). Successivi studi hanno dimostrato che il DNA può essere direttamente amplificato senza il processo di estrazione dalla carta bibula e che l'analisi della mutazione può essere proposta direttamente come screening neonatale ²³. Lo sviluppo più recente delle tecniche di analisi del DNA ha portato alla costruzione di "DNA chips" o "microarrays" costituiti da una serie di oligonucleotidi complementari a numerose sequenze normali e varianti appartenenti a numerosi geni, posti su una lastrina sottile di silice o di vetro, della grandezza di un francobollo. Il gene da analizzare, marcato con sostanze fluorescenti o radiattive, viene posto sul chip, dove forma una molecola ibrida con la sequenza oligonucleotidica complementare, che viene svelata con sistemi elettronici. I "DNA chips" consentono l'analisi simultanea di numerosi geni e del profilo di espressione di cellule specifiche ^{24,25,26}.

SCREENING NEONATALE

L'intento originale dello screening neonatale è quello di identificare le condizioni genetiche in modo di iniziare un trattamento precoce e di prevenire le complicazioni.

Lo screening genetico neonatale riguarda essenzialmente alcuni errori congeniti del metabolismo (ad esempio la fenilchetonuria) e l'ipotiroidismo congenito. Gli errori congeniti del metabolismo sono un gruppo di malattie genetiche dovute alla deficienza di un'enzima specifico che provoca malattia per accumulo di metaboliti a monte della reazione enzimatica coinvolta, o per mancanza del prodotto della reazione. La base razionale per questo screening è costituita dal fatto che numerosi errori del ricambio e l'ipotiroidismo congenito non si manifestano clinicamente nel neonato ma si esprimono fenotipicamente solo nel lattante, nel bambino o addirittura nell'adulto quando si sono verificati danni irreparabili. L'individuazione di queste affezioni nel neonato consente di instaurare un trattamento appropriato e quindi di prevenire o quanto meno attenuare le manifestazioni della malattia. Le linee guida per lo screening neonatale variano nei diversi paesi sviluppati. Attualmente tutti i neonati sono sottoposti per legge a screening per almeno due patologie, fenilchetonuria e ipotiroidismo. Questi due screening, in aggiunta a quello per la fibrosi cistica, sono obbligatori dal 1992 per legge in tutto il territorio nazionale²⁰.

L'identificazione di nuovi geni e di nuove tecnologie ha esteso il limite delle malattie che possono essere identificate al momento della nascita, per le quali molto spesso non esiste neanche un trattamento. Questi progressi hanno aperto un dibattito sugli aspetti etici dello screening neonatale ed in particolare sull'uso di campioni di DNA per scopi diversi da quelli originariamente oggetto dello screening.

Le principali malattie oggetto di screening neonatale sono:

- fenilchetonuria: la fenilchetonuria è una malattia congenita del metabolismo della fenilalanina. In caso di mancato trattamento, quasi tutti i pazienti sviluppano ritardo mentale grave ed irreversibile. Le manifestazioni cliniche della fenilchetonuria (disturbi psicomotori, quali crisi epilettiche, tremori, disturbi della deambulazione) sono stati evidenziati solo raramente nei bambini nati dopo la seconda metà degli anni '60, da quando cioè lo screening di routine per questa malattia è diventato obbligatorio per legge. Lo screening per la fenilchetonuria viene effettuato tramite la determinazione dei livelli di fenilalanina su campioni di sangue prelevati dal tallone e adsorbiti su carta da filtro (test di Guthrie)²⁷. In Italia lo screening è raccomandato per tutti i neonati prima della dimissione dall'ospedale.

- Ipotiroidismo: lo screening dell'ipotiroidismo congenito consiste nell'esecuzione di test di funzionalità tiroidea, dosaggio radioimmunologico della tiroxina e dell'ormone stimolante la tiroide, su campioni di sangue adsorbiti su carta da filtro. Disposizioni legislative differenti per i vari stati regolano la scelta del test e le modalità di esecuzione (test sequenziali o contemporanei). In Italia lo screening è raccomandato per tutti i neonati ²⁸.
- Fibrosi cistica (CF): la CF è la più comune malattia metabolica ereditaria nella popolazione bianca è caratterizzata da gravi problemi respiratori e una inadeguata funzionalità pancreatica causata da un accumulo di muco. Non esistono cure ma un miglior trattamento negli ultimi anni ha aumentato la lunghezza della vita di circa 30 anni. Lo screening neonatale per la fibrosi cistica è possibile attraverso l'analisi immunoenzimatica del tripsinogeno su sangue essiccato su cartoncino, alla quale alcuni raccomandano di far seguire il test della sudorazione e l'analisi delle mutazioni genetiche. Lo screening genetico per la fibrosi cistica è anch'esso raccomandato in Italia per tutti i neonati ²⁹.

Con gli enormi progressi nel campo delle conoscenze scientifiche e la possibilità di utilizzare nuove tecniche analitiche quali la spettrometria di massa e l'analisi del DNA, lo screening neonatale è destinato a subire profonde modificazioni. Le informazioni derivanti dal Progetto Genoma Umano con il sequenziamento del genoma umano, la creazione di una mappa di marcatori genici (microsatelliti), l'individuazione dei polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP), consentiranno di definire i geni responsabili di tutte le malattie genetiche che colpiscono l'uomo ³⁰.

La scelta dell'analisi del DNA come metodica di screening neonatale può essere presa in considerazione solo in quelle popolazioni nelle quali l'epidemiologia della malattia sia nota nella sua totalità, data l'impossibilità di eseguire uno screening neonatale basato solo sullo studio di mutazione prima di aver analizzato i pazienti noti e di essere certi dell'incidenza della patologia stessa. Con la disponibilità in futuro di metodi con uso di microchip, che consentiranno l'identificazione di un numero elevato di mutazioni in tempi rapidi, lo screening diventerà ancora più specifico e sensibile nonostante l'eterogeneità genetica della nostra popolazione ²⁰.

Una applicazione della analisi del DNA è rappresentata dallo screening neonatale per l'identificazione della fibrosi cistica dove, sullo stesso campione di sangue raccolto alla nascita, si associa nel caso di positività al test per il dosaggio della tripsina la ricerca delle mutazioni più frequenti ³¹.

Altre applicazioni delle tecniche di analisi del DNA hanno riguardato lo screening neonatale di:

- emoglobinopatie. Analizzando il gene della β -globina si possono diagnosticare patologie quali l'anemia falciforme e altre emoglobinopatie ³².
- endocrinopatie. Nella sindrome surrenogenitale, il numero di mutazioni nel gene della 21 idrossilasi che codifica l'enzima citocromo P450 é relativamente piccolo e sembra esserci una correlazione tra genotipo e fenotipo. Pertanto uno screening che includa lo studio molecolare può fornire utili informazioni sia diagnostiche sia terapeutiche ³³.
- sordità neurosensoriale. Dato che la sordità neurosensoriale non sindromica é stata osservata in numerosi soggetti in relazione a mutazioni del gene della connessina, e data l'elevata frequenza di portatori di questo disturbo genetico (1/500), é auspicabile uno screening mediante questa tecnica per questa patologia ³⁴.

LA MALATTIA DI WILSON

DEFINIZIONE

La malattia di Wilson è un disordine ereditario del trasporto del rame trasmesso come carattere autosomico recessivo. E' caratterizzata da difettosa escrezione biliare del rame e sua difettosa incorporazione nella ceruloplasmina. L'irregolare escrezione biliare porta a un progressivo accumulo nel fegato cui consegue un successivo danno epatocellulare. Successivamente quando l'organo è ormai saturo, il rame viene liberato dal fegato come rame libero e, trasportato per via ematica, si accumula principalmente nel cervello, nella cornea, nei tubuli renali e più limitatamente in altri organi³⁵.

Venne descritta per la prima volta nel 1912 da Kinner Wilson³⁶ che la definì come una "degenerazione lenticolare progressiva" e la descrisse come una malattia neurologica letale e a carattere familiare accompagnata da epatopatia cronica degenerante in cirrosi. Nello stesso anno Kaiser e Fleischer associarono alla malattia di WD la presenza di depositi di rame nella cornea³⁷.

Nei successivi settanta anni è stato ben definito il ruolo del rame nella patogenesi della malattia e stabilito il pattern della trasmissione come autosomico recessivo³⁸.

Nel 1993, è stato identificato il gene mutato (ATP7B) nella malattia di Wilson localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13^{39,40,41}. Il suo prodotto proteico è una proteina transmembrana che appartiene alla famiglia dei trasportatori dei metalli pesanti ed è localizzata nell'apparato di Golgi nella regione trans-golgi degli epatociti, con funzione di trasportatore di rame nella via secretoria necessaria sia per l'incorporazione del rame nella ceruloplasmina che per l'escrezione dello stesso nella bile.

EPIDEMIOLOGIA

La malattia di Wilson è uno dei più rari disordini del metabolismo. E' presente in tutto il mondo con una frequenza che varia da 1:30.000 a 1:100.000 nati vivi^{42,43} a seconda dello studio epidemiologico e delle diverse etnie cui si riferisce.

Si stima che un individuo ogni 90 persone sia portatore della malattia. Questa frequenza è più alta nelle popolazioni piccole, isolate e in cui la consanguineità tra coniugi è un evento ancora frequente.

In Sardegna l'incidenza è tra le più alte al mondo, con un caso ogni 7-10.000 nati vivi.⁴⁴

PATOGENESI

Il rame è un metallo essenziale di molti cuproenzimi come la superossido-dismutasi, la dopa-idrossilasi, la tirosinasi e la citocromo C ossidasi. Gioca un ruolo fondamentale in numerosi processi metabolici quali la respirazione cellulare, la sintesi di neurotrasmettitori, la produzione di pigmento, la detossificazione dai radicali liberi, il metabolismo del ferro e la maturazione del tessuto connettivo⁴⁵.

Tuttavia il rame libero può essere tossico se presente in quantità eccessiva, poiché può partecipare a reazioni di ossidoriduzione e incrementare la produzione dei radicali liberi, specie radicali idrossilici, che provocano distruzione cellulare attraverso perossidazione dei lipidi della membrana cellulare, mitocondriale, lisosomiale, ossidazione delle proteine, rottura delle molecole di DNA ed RNA⁴⁶.

Il rame libero pertanto è presente solo in tracce nell'organismo il quale ha predisposto un meccanismo di protezione che ne consente l'utilizzo e una sua rapida eliminazione attraverso la via biliare.

Nella malattia di Wilson l'assorbimento del rame e il suo trasporto dentro gli epatociti avviene normalmente. L'anomalia è nella tappa metabolica successiva, cioè nell'escrezione attraverso la via biliare e nel processo di incorporazione del rame nella ceruloplasmina. Tale difetto, conseguente ad una delle diverse mutazioni del gene ATP7B, risiede nell'assenza o nel malfunzionamento della proteina trasportatrice di rame P-type ATPasi.^{36,47}

Inizialmente il rame in eccesso è immagazzinato nel fegato causando un danno agli epatociti. Successivamente, superata la fase di compenso epatico, il rame viene rilasciato in circolo e si deposita negli altri organi esplicando la sua tossicità.

Quindi la sintomatologia presente nella malattia di Wilson è il risultato degli effetti tossici dell'accumulo di rame a livello dei vari tessuti e soprattutto nel fegato e cervello.

LA PROTEINA DELLA MALATTIA DI WILSON (ATP7B)

La ATP7B è una proteina transmembrana, collocata nella membrana del trans-Golgi, che lega e trasporta il rame nella via secretoria per l'incorporazione nell'apoceruloplasmina e l'escrezione nella bile. Le sue funzioni principali consistono nella formazione di un canale attivo del rame nella membrana del trans-Golgi per mobilizzare il rame dal citosol, per l'incorporazione nella apoceruloplasmina con la formazione della forma matura della ceruloplasmina e nell'eliminazione del rame nei canalicoli biliari.^{48,49}

La proteina della malattia di Wilson è una proteina di membrana che appartiene alla famiglia delle proteine trasportatrici di cationi chiamate P-type ATPasi in quanto, durante il loro ciclo di trasporto, avviene una fosforilazione reversibile di aspartato grazie all'utilizzo di un fosfato terminale dell'ATP. È una proteina omologa per il 57% con la proteina della malattia di Menkes. Entrambe le proteine hanno il ruolo di trasportare il rame, ma differiscono nell'espressione tissutale. La proteina di Menkes si esprime in quasi tutti i tessuti e, in particolar modo, negli enterociti e la sua assenza causa un deficit sistemico di rame nell'organismo che conduce ad una fatale malattia neurodegenerativa.

Nella malattia di Wilson, la ATP7B è localizzata nella placenta, cervello, rene ma principalmente negli epatociti; il suo compito è fare entrare il rame nelle cisterne del Golgi, dove si lega all'apoceruloplasmina trasformandola in oloceruloplasmina, forma matura e funzionante della ceruloplasmina, che viene poi escreta nel circolo ematico.^{49,50}

Le mutazioni possono colpire la funzionalità della proteina, la sua sintesi o la sua localizzazione.

SINTOMI CLINICI

Le manifestazioni cliniche della malattia di Wilson sono la diretta conseguenza dell'accumulo tissutale di rame libero. Il rame entrando in circolo in forma non legata alla ceruloplasmina comincia ad accumularsi immediatamente dopo la nascita e dopo anni l'eccesso di rame nei tessuti comporta la comparsa di manifestazioni epatiche, psichiatriche e neurologiche. La malattia, però, può rimanere asintomatica per lungo tempo.

Le manifestazioni sono variabili e possono insorgere a varie età. Si presentano raramente prima dei 3 anni di vita e generalmente in età pediatrica la manifestazione più frequente è quella epatica, mentre negli adolescenti e nei giovani adulti diventa più frequente il

coinvolgimento neurologico e psichiatrico oltre a quello epatico. Raramente i sintomi della malattia di Wilson sono stati descritti sotto i 6 anni di vita. Sono stati riscontrati casi in cui l'esordio della malattia si è verificato a 50 o 60 anni,^{51,52} tuttavia la comparsa dei sintomi dopo i 40 anni è molto rara.

Se la malattia di Wilson viene identificata in tempo e adeguatamente trattata si può arrivare alla prevenzione di questa patologia che altrimenti può essere fatale. Per questa ragione è necessario considerare la malattia di Wilson nella diagnosi differenziale di malattie con segni epatici o neurologici non spiegati.⁵³

DIAGNOSI CLINICA E DI LABORATORIO

Non esiste un test singolo che consenta di porre diagnosi di malattia di Wilson con certezza assoluta. Nella maggior parte dei casi la diagnosi richiede una valutazione complessiva della storia familiare, del decorso della malattia e degli esami clinici e di laboratorio.

La condizione più semplice per il clinico si verifica in presenza della classica triade della malattia (epatopatia, interessamento neurologico e anello di Kayser-Fleischer) e dei tipici segni di laboratorio come la presenza di bassi livelli della Ceruloplasmina e Cupremia, aumento della Cupruria delle 24ore e aumento della concentrazione epatica del rame.

Indicazioni per l'analisi molecolare della malattia di Wilson

Attualmente l'analisi molecolare della malattia di Wilson deve essere presa in considerazione in tre circostanze:

- Pazienti con la diagnosi clinica di **certezza** della malattia di Wilson

In questi casi lo studio delle mutazioni ha soltanto lo scopo della definizione del difetto molecolare del propositus. In questi pazienti lo studio e l'identificazione del difetto molecolare permetterà lo screening dei fratelli dei malati o di altri consanguinei per definire lo stato di portatore e per la diagnosi presintomatica della malattia. Considerato che la malattia di Wilson è dovuta ad un progressivo accumulo di rame è molto importante che venga diagnosticata il più precocemente possibile per poter avviare un adeguato trattamento in modo da evitare gli effetti tossici del rame nel fegato. Lo studio e la ricerca di mutazioni può servire a questo scopo.

- Pazienti in cui la diagnosi clinica della malattia è **dubbia**

In questa categoria vanno inclusi:

- a) individui con **bassa ceruloplasmina sierica** rilevata con esami di routine
- b) individui con **malattia epatica** o con **ipertransaminasemia** di origine sconosciuta
- c) individui nei quali un controllo oculistico di routine ha evidenziato la presenza dell' **anello di Kayser-Fleischer**
- d) individui con **alterazioni motorie** o alterazioni **psichiatriche** di origine sconosciuta
- e) tutti quei casi nei quali la storia familiare, in combinazione con lo studio clinico e di laboratorio, **non ha chiarito** il sospetto di m.di Wilson.

In questi casi, lo studio e l' identificazione delle mutazioni responsabili possono confermare la malattia.

Mentre l' identificazione delle mutazioni nei campioni analizzati può avere un valore diagnostico, la mancata identificazione non può escludere la presenza della malattia. Questo fatto può essere dovuto a due fattori:

- La sensibilità del metodo di SSCP non arriva al 100%
- Le mutazioni possono riguardare regioni come gli introni del gene o altre regioni localizzate distanti dal gene ma che ne regolano il funzionamento, attualmente non note e che non vengono esaminate

- **Screening di popolazioni a rischio**

L'alta eterogeneità genetica rende difficile l'attuazione di uno screening di massa che può essere realizzabile in quelle popolazioni chiuse e a rischio per l'alto grado di consanguineità.

Si tratta di comunità isolate con un'alta presenza di consanguineità, come può avvenire in popolazioni di zone montagnose, di gruppi religiosi o di isole.

In Sardegna uno screening della popolazione è tecnicamente realizzabile e giustificabile.

Infatti, l'importanza di una diagnosi precoce è dovuta al fatto che la terapia, iniziata prima dell'insorgenza di lesioni irreversibili, può normalizzare il bilancio del rame e determinare la scomparsa dei sintomi.

TERAPIA

La malattia di Wilson, una volta stabilita la diagnosi, è soggetta attualmente a terapie efficaci basate sia sulla riduzione dell'assorbimento del rame, con la dieta e la somministrazione di zinco, sia sulla riduzione del contenuto di rame nell'organismo mediante dei chelanti del rame, quali la D-penicillamina, la trietilentetramina cloridrato e il tetrathiomolibdato di ammonio. Quello più largamente utilizzato è la D-penicillamina. Nei casi di effetti collaterali alla penicillamina può essere utilizzata la trietilentetramina cloridrato (trientine). Nei casi con importanti segni neurologici e in pazienti con insufficienza epatica acuta può essere utilizzato il tetrathiomolibdato di ammonio. Nei casi di gravidanza, per la terapia di mantenimento e in pazienti in fase asintomatica può essere utilizzato lo zinco come sale solfato o acetato. E' importante sottolineare che la terapia è più efficace se utilizzata in periodo presintomatico.

GENETICA

Il gene della malattia di Wilson, chiamato ATP7B, è stato clonato nel 1993. Il gene è localizzato sul cromosoma 13 e tramite studi di linkage è stato individuato il locus genetico a livello della regione q14.2-q21; è costituito da 21 esoni distribuiti lungo circa 80 Kb di DNA genomico⁵⁴ (Figura 1).

Il gene viene espresso nella placenta, cervello, rene ma principalmente nel fegato.

Lo studio delle basi molecolari della malattia di Wilson nel mondo attraverso la ricerca di mutazioni ha permesso l'identificazione di circa 380 mutazioni, gran parte delle quali sono riportate nel database center dell'Università di Alberta (<http://www.medgen.med.ualberta.ca>).

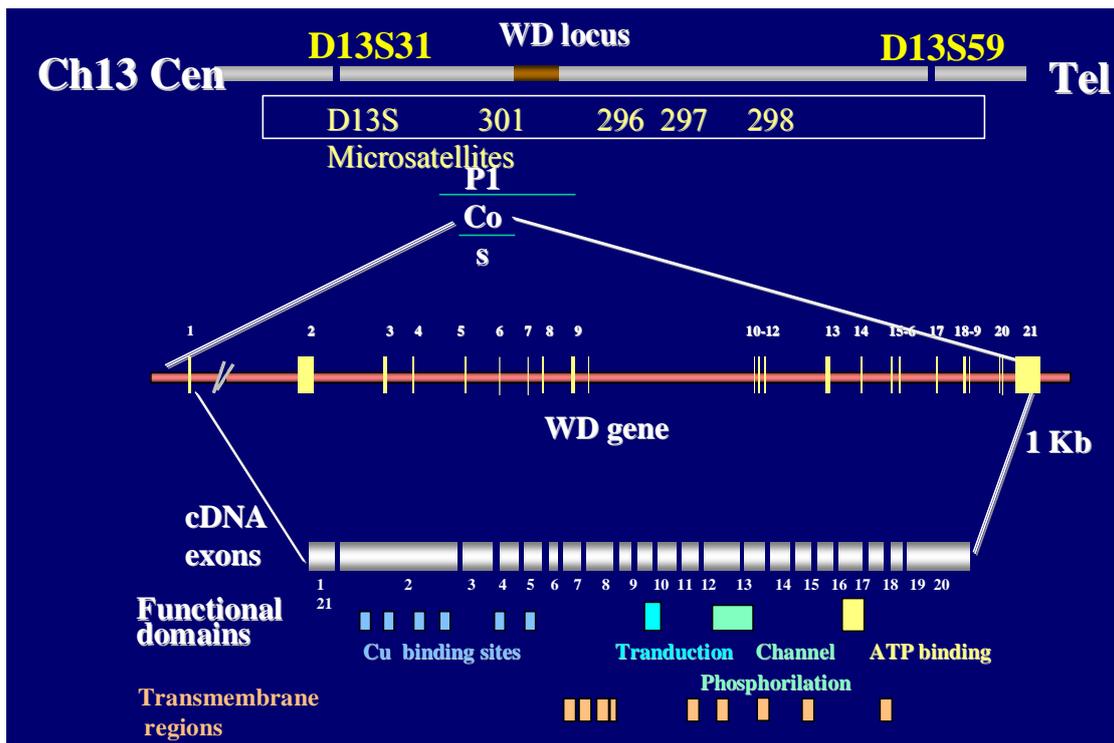


Figura 1: Struttura genomica del gene ATP7B

Le mutazioni identificate appartengono a diverse categorie: nonsense, frameshift, sostituzioni nei siti di splicing, ma nella maggioranza sono mutazioni missense.

Esiste un'alta eterogeneità allelica nella malattia di Wilson per la presenza di poche mutazioni relativamente frequenti e di un grande numero di mutazioni rare.

Esiste una certa variabilità etnica con la prevalenza di certe mutazioni in determinate popolazioni.

La mutazione più comune è la H1069Q presente con una frequenza allelica che varia da circa il 17% nella popolazione italiana ed inglese fino a circa il 70% nella popolazione polacca.^{55,56}, (Figura 2).

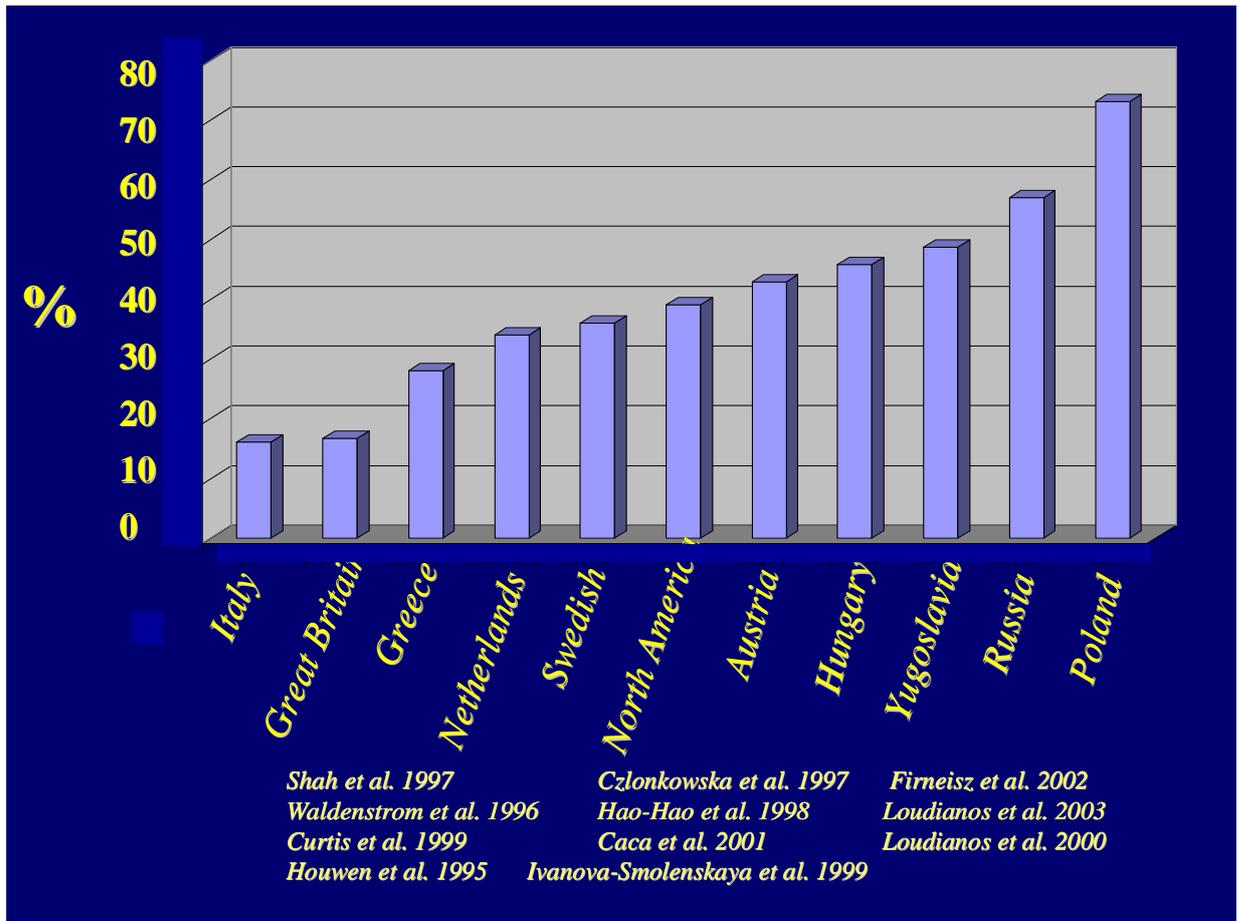


Figura 2: Frequenze della H1069Q in diverse popolazioni

Questa mutazione non è presente nelle popolazioni dell'estremo oriente dove è più comune la mutazione R778L con una frequenza allelica che varia dal 15% nei Giapponesi al 40% nei Koreani.^{57,58} (Figura 3).

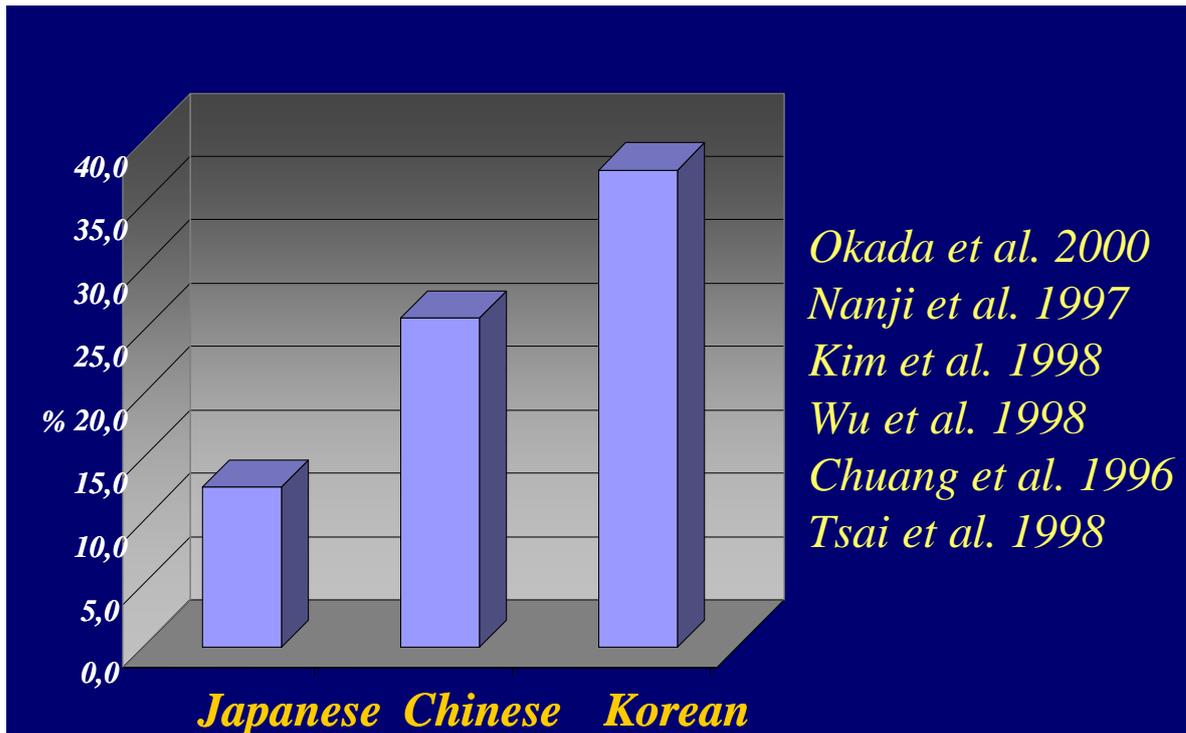


Figura 3: Frequenze della R778L in diverse popolazioni dell'Estremo Oriente

Il numero elevato di mutazioni diverse nel gene ATP7B rende molto probabile la presenza di composti eterozigoti.

L'esistenza di un gran numero di mutazioni diverse del gene ATP7B e la frequente necessità di ricercare due differenti anomalie nei due alleli diversi rende problematica la diagnosi genetica in individui senza nessun parente affetto. In caso contrario, la diagnosi molecolare può essere più facilmente posta nei parenti di primo grado tramite l'analisi di linkage⁵⁹.

Negli ultimi anni abbiamo eseguito lo studio molecolare della malattia di Wilson in 644 famiglie provenienti prevalentemente da popolazioni di origine mediterranea. In questo studio delle mutazioni ha permesso la caratterizzazione del 86% degli alleli e l'identificazione di 175 mutazioni dato che suggerisce la presenza di un'alta eterogeneità allelica per la malattia di Wilson in queste popolazioni^{60,61,62,63,64,65,66,67,68}.

Sardegna

Nella popolazione sarda l'analisi delle mutazioni in 110 famiglie ha permesso la caratterizzazione del difetto molecolare nel 94% dei cromosomi analizzati e l'identificazione di 22 diverse mutazioni⁶⁵ (Tabella 2). La mutazione più comune -441/-427del è una delezione di 15 nucleotidi localizzata nella regione promoter del gene ATP7B.

Studi funzionali hanno evidenziato che tale mutazione diminuisce l'attività del promoter di circa il 70% (Figura 4).

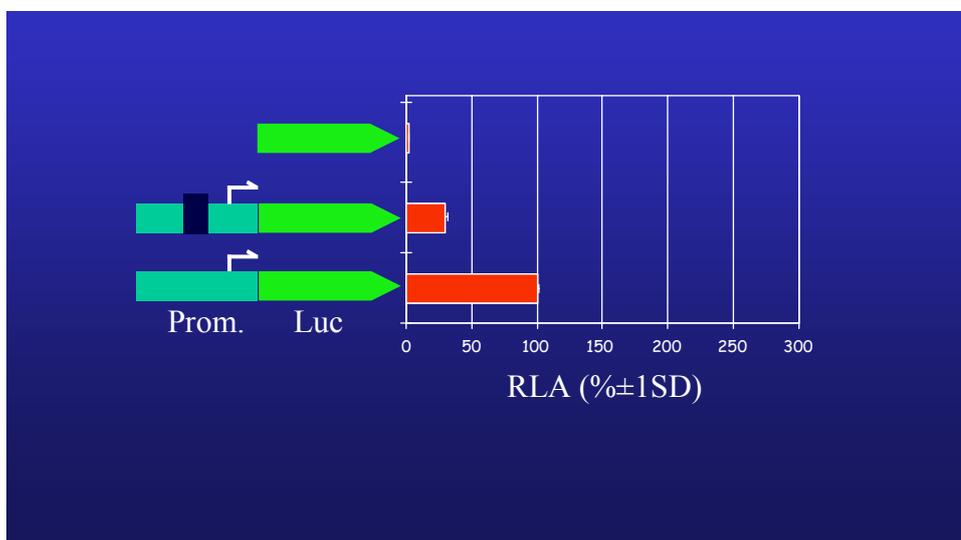


Figura 4: Caratterizzazione funzionale della mutazione -441/-427del

La mutazione -441/-427del è presente in circa il 62 % degli alleli, dato che suggerisce probabilmente la presenza di un effetto fondatore dovuto alla condizione di isolamento della popolazione sarda nei secoli che ha favorito a partire da pochi fondatori e i successivi incroci tra consanguinei, la diffusione di diverse malattie genetiche.

Esistono 5 mutazioni relativamente frequenti 213-214delAT, 1512-1513insT, R778W, 2463delC e la V1146M che insieme alla -441/-427del costituiscono circa l'85% degli alleli, dato che suggerisce la presenza di un'alta omogeneità allelica nella malattia di Wilson in Sardegna. Le mutazioni più comuni ma anche molte delle mutazioni rare sono popolazione specifiche in quanto sono state identificate solamente in Sardegna. La mutazione -441/-427del è stata identificata in circa 1% dei campioni provenienti dall'Italia Continentale ma in tutti i casi nei quali è stato possibile ottenere delle informazioni sull'esatta origine del

campione é stato constatato che si trattava di emigrati Sardi di prima o seconda generazione. Le 6 mutazioni piú comuni sono presenti in almeno un allele in 107/110 dei campioni analizzati. Solo in 3 delle famiglie analizzate sono state identificate mutazioni diverse dalle 6 piú comuni. Questi dati suggeriscono che quella Sarda é una popolazione omogenea e che lo studio molecolare potrebbe essere utilissimo non solamente per la diagnosi di singoli casi ma probabilmente per uno screening di massa.

OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro progetto è stato quello di calcolare l'incidenza della malattia di Wilson nella popolazione sarda attraverso un approccio genetico e sviluppare un procedimento efficace per un futuro screening di massa per la diagnosi precoce della malattia di Wilson sulla popolazione sarda. Lo studio genetico ha riguardato la ricerca della mutazione -441/-427del in 5290 neonati utilizzando diverse tecniche di biologia molecolare. Per ogni metodica abbiamo cercato di ottimizzare i vari passaggi, ottenere delle buone rese e renderli così efficaci, veloci e poco costose.

MATERIALI E METODI

Lo sviluppo delle metodiche é stato eseguito utilizzando sangue periferico e sangue fissato sulle Guthrie cards. Per il calcolo dell'incidenza della malattia e per la validazione delle metodiche é stato utilizzato il DNA di 5290 neonati estratto dalle Guthrie cards previo consenso informato da parte dei genitori.

Estrazione DNA

Come metodiche di estrazione di DNA genomico sono state utilizzate: l'estrazione da sangue periferico e l'estrazione da sangue fissato su cartoncino (Guthrie cards) già usata per lo screening neonatale di altri disturbi genetici come la Fenilchetonuria. Sulla base della nostra esperienza abbiamo selezionato come metodo di estrazione il Master Pure™ DNA purification kit (Epicentre) ed è stato modificato opportunamente per permettere l'estrazione direttamente su piastre da 96 campioni.

Per l'estrazione del DNA si utilizzano alcune gocce di sangue intero del neonato che vengono fissate su un cartoncino (GUTHRIE CARD) e fatte asciugare.

Il protocollo è il seguente :

1. Con un'apposita pinza perforatrice ricavare dai cartoncini dei dischetti di 3 mm che vengono inseriti in provette di plastica monouso da 0,5 ml ;
2. Diluire 1 µl di una soluzione da 50 mg/ µl di proteinase K in 300 µl di "Tissue and cell lysis solution " per ciascun campione. Aggiungere 300 µl della miscela così preparata ad ogni provetta contenente il dischetto ;
3. Incubare per 30 minuti a 65 °C, o in alternativa incubare a 55 °C per tutta la notte ;
4. Aggiungere 160 µl di MPC Protein Precipitation Reagent a 300 µl di campione lisato e vortexare vigorosamente per 10 secondi. Tenere in ghiaccio per almeno 30 minuti ;
5. Centrifugare per 30 minuti ad almeno 13000 giri in una microcentrifuga in maniera tale da far precipitare i detriti ;
6. Trasferire il surnatante in una provetta pulita ed eliminare il pellet ;
7. Aggiungere 600 µl di isopropanolo al surnatante raccolto. Invertire la provetta alcune volte e congelare a – 20 °C per un'ora o per tutta la notte ;
8. Centrifugare a 13000 giri per 30 minuti a 4 °C ;
9. Eliminare l'isopropanolo evitando di rimuovere il pellet di DNA e lavare con l'etanolo al 70% ,

10. Far asciugare il pellet e risospenderlo in 10-20 μ l di soluzione tampone (TE buffer)
Il surnatante ottenuto può essere utilizzato per la PCR.

PCR

Per il metodo della PCR abbiamo utilizzato differenti quantità di DNA estratto dalle Guthrie cards e stabilito la quantità esatta di DNA da utilizzare.

Attraverso il metodo della PCR abbiamo analizzato la mutazione -441/-427del. Per la PCR sono stati usati due paia di primers con le seguenti sequenze: il primer forward: TGCGCAGCTCACCTGCCC e il primer reverse: AGTGCCACAATGTCCTCT .

L'amplificazione del DNA è stata preparata in un volume finale di 25 μ l contenente 10ng di DNA genomico, 25pmoli di ogni primer, 5U di Taq polimerasi, 1,25 mM di ogni dNTP e Buffer 10x contenente 1.5mM di MgCl₂.

Le condizioni di amplificazione sono state : uno step di denaturazione iniziale a 95° per 1', seguito da 30 cicli di denaturazione a 95° per 30", 30" di annealing a 60° e 1' di estensione a 72° ed uno step di estensione finale per 10' a 72°. Abbiamo ottenuto un prodotto di PCR di 146bp.

Elettroforesi su gel di MDE

Un' aliquota di 2 μ l di prodotti amplificati sono stati miscelati con 5 μ l di un loading buffer e poi caricati su un gel di MDE TM (JD Baker Inc) contenente 90 mM di Tris Borate e 10 mM di EDTA . Diversi set di campioni sono stati caricati nello stesso gel di sequencing.

L'elettroforesi è stata eseguita con un apparato di sequencing a una potenza costante di 8W per approssimativamente 3h per ogni set di campioni. L'esistenza della delezione di 15nt nei prodotti amplificati di 146bp può essere rivelato dalla presenza, in un gel elettroforetico, di una banda a migrazione più rapida rispetto al controllo normale causata dalla separazione dell'allele normale da quello mutato.

Studi di espressione sulla -366/-367ins21

Un frammento di 991 bp della regione 5' dalla posizione -143 alla posizione -1134 dal sito d'inizio traduzione è stato amplificato dal DNA genomico di un campione portatore della -366/-367in21 ed un controllo normale. Per realizzare l'amplificazione sono stati usati i

seguenti primers: il primer forward (-1134 a 114): 5'TCACCTCAACAACCTTGCACAG3'; il primer reverse (-143 a -162): 5'AGCAAACAGGGGTCCGGGAA3'. Entrambi i frammenti sono stati subclonati nel vettore PCR 2.1 Topo cloning (Invitrogen) in accordo con le istruzioni di fabbricazione. I costrutti sono stati successivamente subclonati in un sito di restrizione EcoRI di un vettore di espressione pRL – null (Promega) contenente il cDNA della Renilla luciferasi come gene reporter. Il promotore pRL-Null fu usato come controllo negativo. L'integrità e l'orientazione di tutti i costrutti fu verificata dal sequencing. Le cellule HepG2 vennero fatte crescere in un ambiente arricchito dal 5% di carbonio diossido a 37° su piastre Petri in DMEM, aggiungendo il 10% di fetal calf serum e antibiotici. Le cellule, raggiunta la confluenza del 50%, sono state transfettate dal DNA mediato dal liposoma usando un rapporto tra liposoma e DNA di 8:1 e dopo 72 hr sono state recuperate. Tutti i valori sono stati normalizzati per l'efficienza della transfezione tramite l'inclusione di una quantità uguale del plasmide pCMVLUC basato sulla firefly luciferase. L'attività della firefly e renilla luciferasi sono state determinate da un'uguale quantità di proteina estratta attraverso l'uso di tubi singoli Dual luciferase (Promega) .

Allelic Discrimination by 5' Nuclease Assay

In questo ultimo periodo abbiamo sviluppato la metodica della discriminazione allelica attraverso l'utilizzo dell'”ABIPRISM 7000 Sequence Detection System” (TaqMan) usando appropriate paia di primers per la ricerca delle 6 mutazioni più comuni in Sardegna che saranno il primo bersaglio di studio per un futuro screening di massa.

La metodica **Allelic Discrimination by 5' Nucleare Assay**, è una metodica semplice, rapida e altamente specifica, che implica **l'ibridazione nucleotidi allele-specifici e la determinazione attraverso il trasferimento di energia di risonanza fluorescente, (FRET)**.

Tale strategia, utilizza un innovativo oligonucleotide, la sonda **TaqMan®**. E' un oligonucleotide che, come i primers utilizzati nella metodica della PCR, è complementare alla sequenza bersaglio da amplificare nella regione circoscritta alla localizzazione del polimorfismo, ed è in grado di appaiarsi tra i due primers forward e reverse.

Il potere di discriminazione allelica del metodo, è dato dall'uso di due sonde, ciascuna specifica per le varianti alleliche possibili, e ciascuna marcata con un differente fluoroforo Reporter, il **colorante fluorescente FAM** e il **colorante fluorescente VIC**; ciò permette che entrambi gli alleli dello stesso SNP siano analizzati in un singolo pozzetto. Un sostanziale aumento del segnale di fluorescenza del FAM o del VIC, indica omozigosi per l'allele FAM

o VIC specifico; un aumento di entrambi i segnali fluorescenti indica una condizione di eterozigoti di un determinato SNP nel campione di interesse (Figura 5).

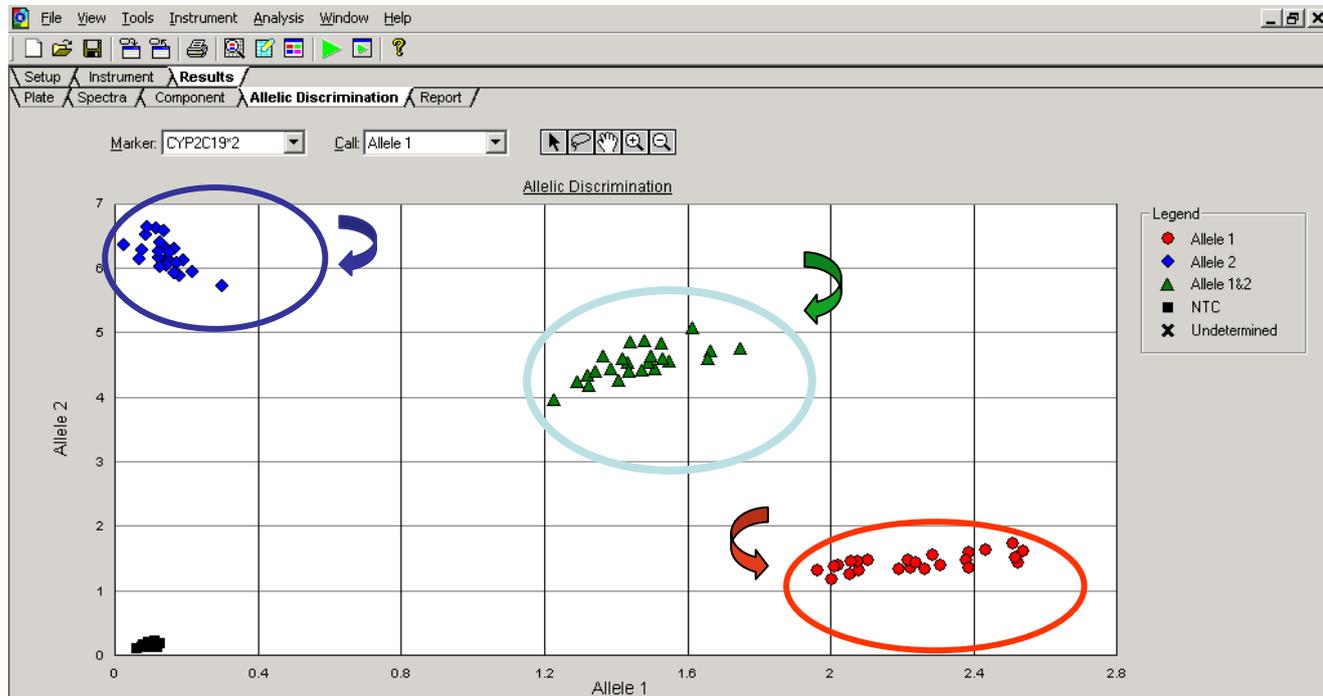


Figura 5 :Rappresentazione grafica del rilevamento di fluorescenza effettuato con un software direttamente collegato allo strumento di analisi, (Taqman 7000 Applied Biosystem), la freccia blu indica i campioni omozigoti per l'allele 2, la freccia rossa gli omozigoti per l'allele 1, e la freccia verde gli eterozigoti.

REAL-TIME PCR

La “Real-Time PCR” sviluppata per lo studio delle 6 mutazioni più comuni in Sardegna è la seguente:

I primers e le probe sono stati costruiti mediante un software e con un programma ABI Prism Primer Express (Applied Biosystem) vedi Tabella 1.

L'amplificazione del DNA è stata preparata in un volume finale di 25µl contenente 2,5µl di DNA genomico, 2,5µl del primer forward e reverse, 0.10µl delle P probe Vic e Fam, 5,5µl di acqua bidistillata e 12.5µl della Master Mix costituita da: amplitaq Gold DNA polimerasi, dNTPs con dUTP al posto dTTP. l'enzima ampErase Uracil-N-Glicosidasi e il fluorocromo ROX. Le condizioni di amplificazione sono state : uno step di incubazione a 50° per 2', 10' di attivazione a 95° e 40 cicli di denaturazione a 95° per 15" e di annealing/estensione a 60° per 1'.

Durante la reazione, il computer e il programma collegato misura la fluorescenza emessa, che è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato.

La PCR Real-Time è un metodo di amplificazione e quantificazione in tempo reale del DNA, infatti permette di monitorare l'amplificazione del DNA target in tempo reale, mediante l'uso di fluorocromi. Essendo una metodica di tipo quantitativo, può essere utilizzata per quantificare l'espressione di un gene.

Tabella1: Sequenze dei Primers e delle Probes

213 - 214 del AT	
Ex 2 ¹ Forward :	ACCAGCACAGTCAGGATCTTG
Ex 2 ¹ Reverse :	GCTGATGATGCCTTTCAAATTGGAA
TaqMan VIC-MGB Probe :	ACTTGCCAGTCATGTGTGA
TaqMan Fam-MGB Probe :	ACTTGCCAGTCGTGTGA

1512 - 1513 insT	
Ex 3 Forward :	GCTTCTTACAGATCAAAGGCATGAC
Ex 3 Reverse :	CGTTCATCTCTTACCAGCTTCTTTC
TaqMan VIC-MGB Probe :	CCTGTGTGTCTAACATAGA
TaqMan Fam-MGB Probe :	CCTGTGTGTCTAACATAGA

R778W	
Ex 8 Forward :	CCCATGCTCTTTGTGTTTCATTGC
Ex 8 Reverse :	GCTGTTACCTTTGCCAAGTGTTCC
TaqMan VIC-MGB Probe :	CAGCCACCGGCCCA
TaqMan Fam-MGB Probe :	CAGCCACCAGCCCA

2463 del C	
Ex 10 Forward :	GCTCAGTATAAGCAAATACAGTGTA ACTATTGTA
Ex 10 Reverse :	CTTTCCCCCAGGGACCAC
TaqMan VIC-MGB Probe :	CAAGTCCCCATGGAGCT
TaqMan Fam-MGB Probe :	CAAGTCCCCATGGAGCT

V1146 M	
Ex 16 Forward :	AACCACAGCCTCTTTTGAATAGATG
Ex 16 Reverse :	GTGGTCTGTCATAGCGTCACTGA
TaqMan VIC-MGB Probe :	AGACCTTCTCTATGCTGA
TaqMan Fam-MGB Probe :	AGACCTTCTCTGTGCTGA

441 del 15	
PROMOTER Forward :	TGTCGGAGCGCACCAG
Reverse :	GTGCCAGTGCCACAATGTC
TaqMan Fam :	CCTCCGCGGTCTCG

RISULTATI

Abbiamo sviluppato delle tecniche di biologia molecolare a partire dall'estrazione del DNA fino all'identificazione delle sei mutazioni più comuni (-441/-427del, 2463delC, V1146M, 213-214delAT, R778W, 1512-1513insT) responsabili della malattia di Wilson in Sardegna attraverso l'utilizzo di diverse metodiche rendendole efficaci e veloci in tutti i vari passaggi. L'estrazione del DNA costituisce il momento più critico che condiziona tutti i passaggi successivi, questo perché uno screening di massa basato sui metodi di biologia molecolare richiede un metodo per l'estrazione che permette di ottenere quantità sufficienti e approssimativamente uguali di DNA, di buona qualità, senza contaminazioni che possono rendere difficile il successivo passaggio, quello dell'amplificazione con il metodo della PCR.

L'estrazione da sangue periferico è stato effettuato utilizzando 5 ml di sangue periferico reso incoagulabile per aggiunta di EDTA secondo l'utilizzo di metodi standard. Per l'estrazione da sangue fissato su cartoncino (Guthrie cards) abbiamo testato diversi protocolli riportati in letteratura e 5 kit commerciali. Sulla base della nostra esperienza abbiamo selezionato come metodo di estrazione il Master Pure™ DNA purification kit (Epicentre) ed è stato modificato opportunamente per permettere l'estrazione direttamente su piastre da 96 campioni.

Abbiamo eseguito uno screening limitato analizzando il DNA di 5290 neonati.

Su questi campioni abbiamo ricercato la mutazione più comune in Sardegna -441/-427del. I risultati hanno evidenziato la presenza di 122 portatori eterozigoti per questa mutazione che corrisponde a una frequenza allelica del 1.15%. Non è stato trovato nessun omozigote. Questo può essere spiegato dal fatto che noi abbiamo eseguito uno screening limitato in una popolazione che presenta circa 15.000 nati per anno. Da un precedente studio di 110 famiglie sarde abbiamo constatato che la mutazione -441/-427del è presente nel 61,7 % degli alleli (vedi Tabella 2) e presupponendo la stessa distribuzione delle mutazioni WD nella popolazione sarda, noi deduciamo una frequenza allelica di 0.77% per altre mutazioni non -441/-427del ottenendo così una frequenza allelica complessiva delle mutazioni WD del 1.92%. Applicando la legge di Hardy Weinberg, abbiamo stimato la frequenza dei pazienti WD del 0.037% che include 0.013% omozigoti per la mutazione -441/-427del, 0.06% portatori di differenti combinazioni di mutazioni non -441/-427del e lo 0.018% di campioni doppi eterozigoti per la mutazione -441/-427del e altre mutazioni. Questo corrisponde a una

incidenza della malattia di Wilson di 1/3000 nati vivi. I neonati nati vivi per anno sono circa 15000 e da questi dati il numero dei nuovi casi di malati attesi per anno è risultato essere di 5 casi.

Durante lo screening facendo uso dell'elettroforresi su gel di MDE abbiamo osservato che oltre alla presenza di bande corrispondenti alla mutazione -441/-427del che migravano più velocemente rispetto al controllo, erano presenti delle bande che invece migravano più lentamente (Figura 6). Il sequencing del DNA corrispondente a queste bande ha evidenziato la presenza di una inserzione di 21 nucleotidi, -366/-367ins21. Abbiamo effettuato degli studi di espressione per quanto riguarda la mutazione -366/-367ins21 e abbiamo constatato che tale inserzione non altera l'espressione del gene (Figura 7).

In seguito per la ricerca delle sei mutazioni più comuni sono stati usati due approcci entrambi basati sulla tecnologia del TaqMan: quello della quantificazione relativa e quello della discriminazione allelica. Per la messa a punto dei metodi sono stati usati come controlli campioni di DNA di pazienti o composti eterozigoti per le mutazioni in studio. In quest'ultimo caso abbiamo usato tutte le combinazioni delle 6 mutazioni disponibili nella nostra casistica. La metodica ottimizzata è stata in seguito validata con lo studio su piastra di 94 campioni di DNA (Figura 8 e 9) rivoltisi al nostro laboratorio per l'analisi molecolare della malattia e caratterizzati genotipicamente con l'uso delle metodiche di SSCP, sequencing, multiplex PCR e reverse dot blot.

I risultati ottenuti sono stati con i diversi approcci sovrapponibili confermando la messa a punto della metodica.

Tabella 2: Analisi mutazionale eseguito su 110 famiglie sarde e risultati dello screening limitato sulla popolazione sarda.

Sardegna				
Mutazione	Chr	Esone	Dominio	%
-441/-427del	137	5'UTR	Promoter	61.7
246delC	17	10	Td	7.6
V1146M	18	16	ATPloop	8.1
213-214delAT	6	2	Cu1	2.7
R778W	5	8	Tm4	2.2
1512-1513insT	4	3	Cu5	1.8
A1018V	3	13	ATPloop	1.3
2035delC	2	7	Tm1-Tm2	0.9
2304-2305insC	2	8	Tm4	0.9
G869V	2	11	Td	0.9
S921N	2	12	Tm5	0.9
H1069Q	2	14	SEHPL	0.9
1285+5G->T	1	2	Cu4	0.45
2122-8 T->G	1	8	Tm3	0.45
I747F	1	8	Tm3	0.45
R919W	1	12	Tm5	0.45
G943S	1	12	Tm5	0.45
T993M	1	13	Ch/Tm6	0.45
G1000R	1	13	Ch/Tm6	0.45
L1043P	1	14	ATPloop	0.45
G1089V	1	15	ATPloop	0.45
3852-3875del	1	18	ATPhinge	0.45
Unknown	12			5.4
Popolazione	N° dei campioni studiati	Frequenza all'elica (%)	Frequenza portatore (%)	
Sardegna	5290	1.92	3.8	

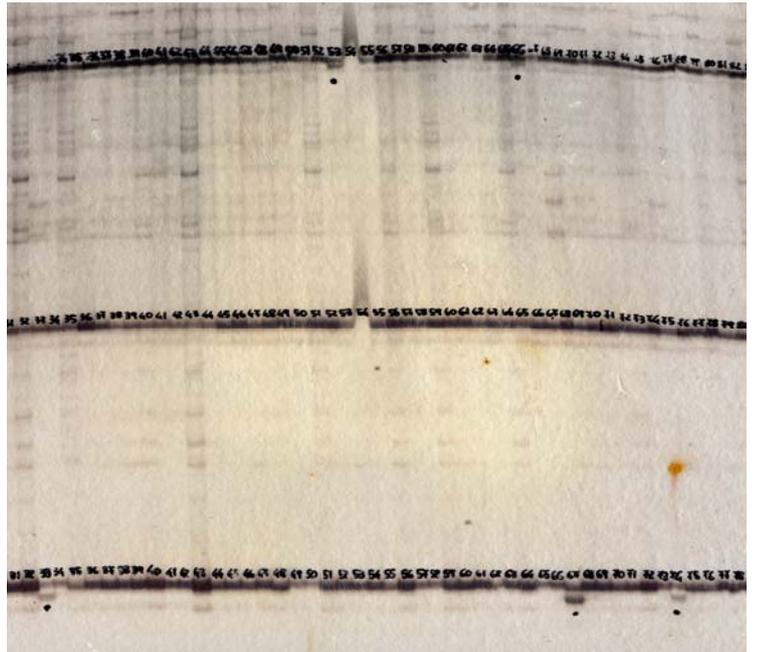
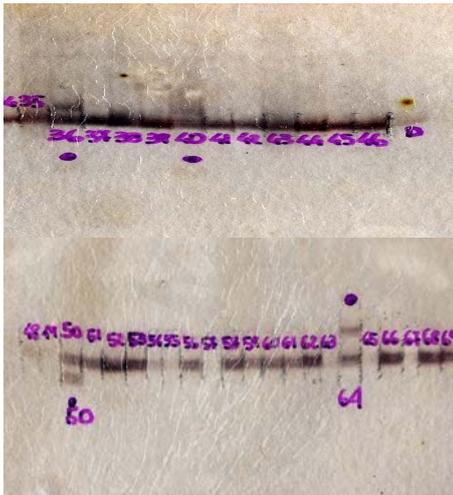


Figura 6: Elettroforesi su gel di MDE. La banda che migra più lentamente corrisponde alla mutazione -366/-367ins21 e la banda che migra più velocemente corrisponde alla mutazione -441/-427del.

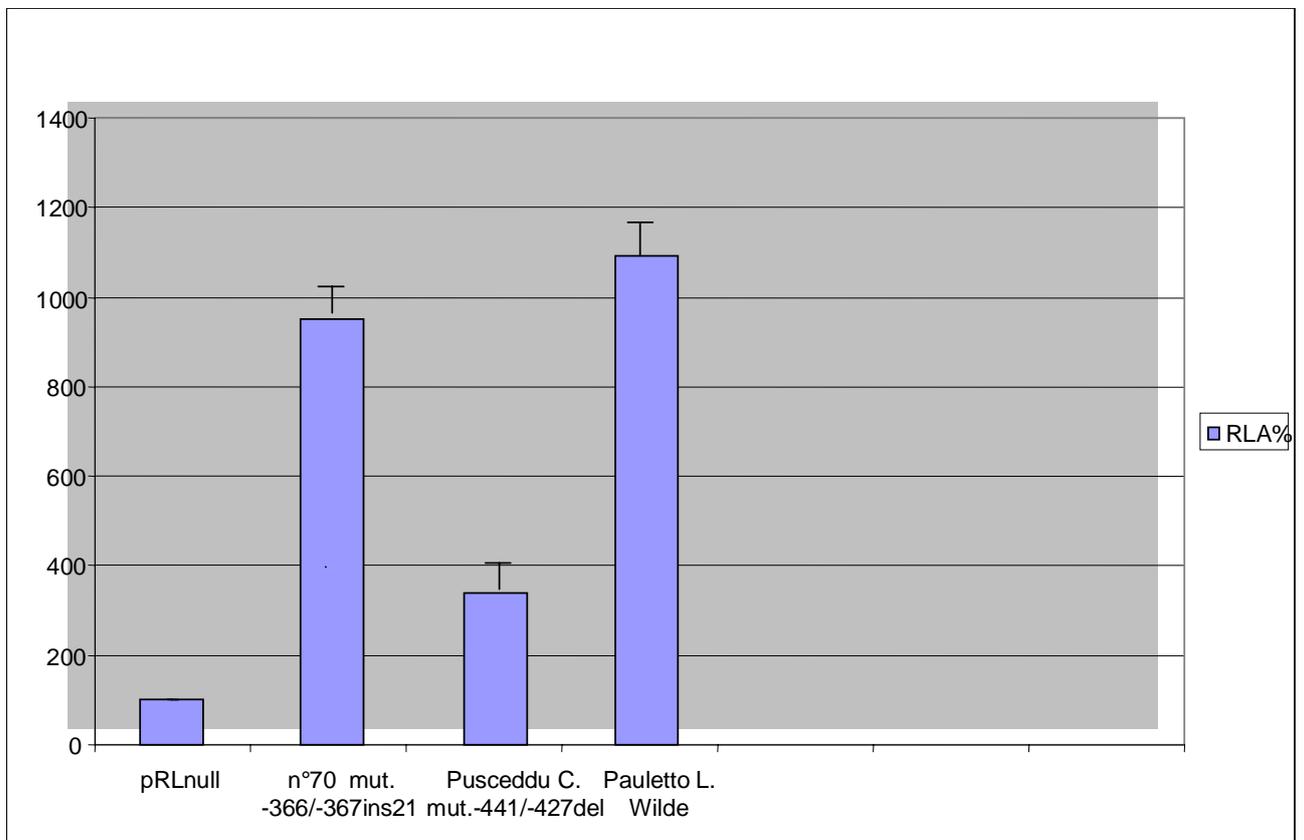


Figura 7: Caratterizzazione funzionale delle mutazioni nella regione promoter del gene ATP7B

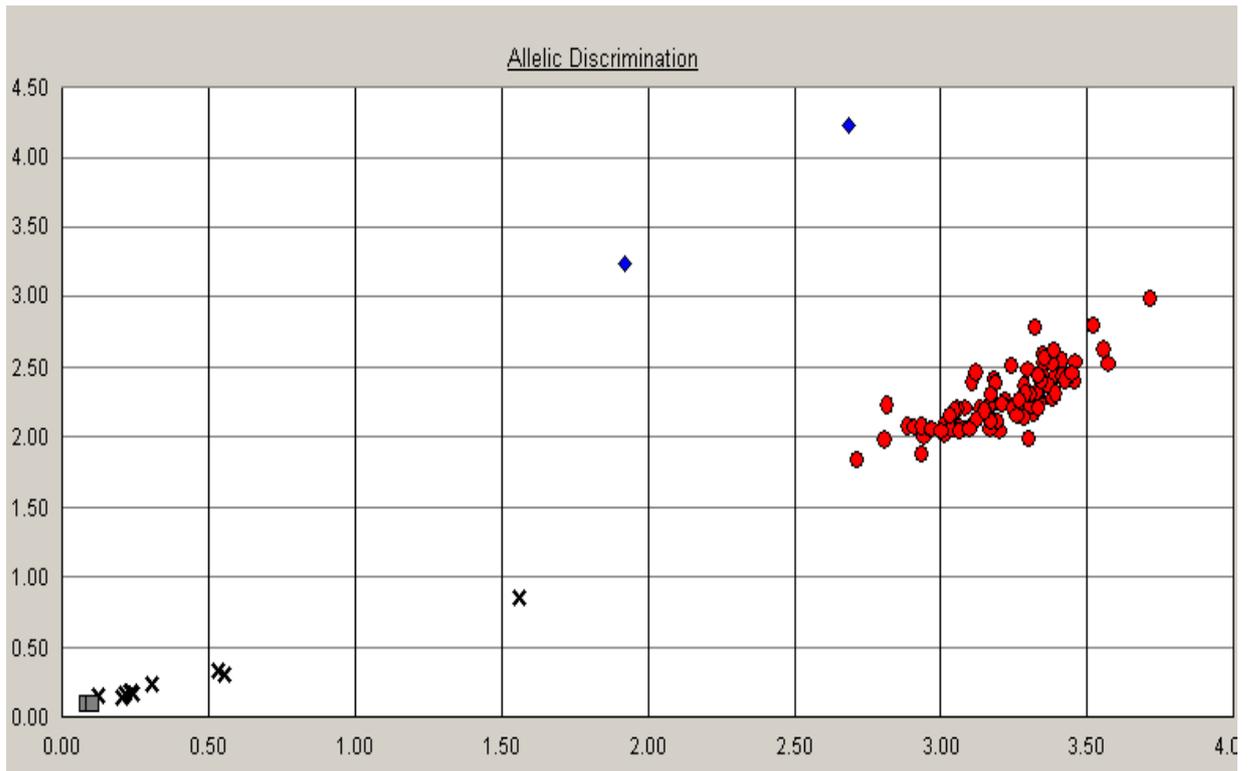


Figura 8: Rappresentazione grafica del rilevamento della fluorescenza per quanto riguarda la delezione 213-214 delA, il simbolo blu indica 2 individui eterozigoti per la mutazione mentre il simbolo rosso gli individui normali. L'assegnazione dei simboli viene fatta dall'operatore attribuendo un simbolo distintivo per le condizioni di omozigosi ed eterozigosi in base all'intensità della fluorescenza.

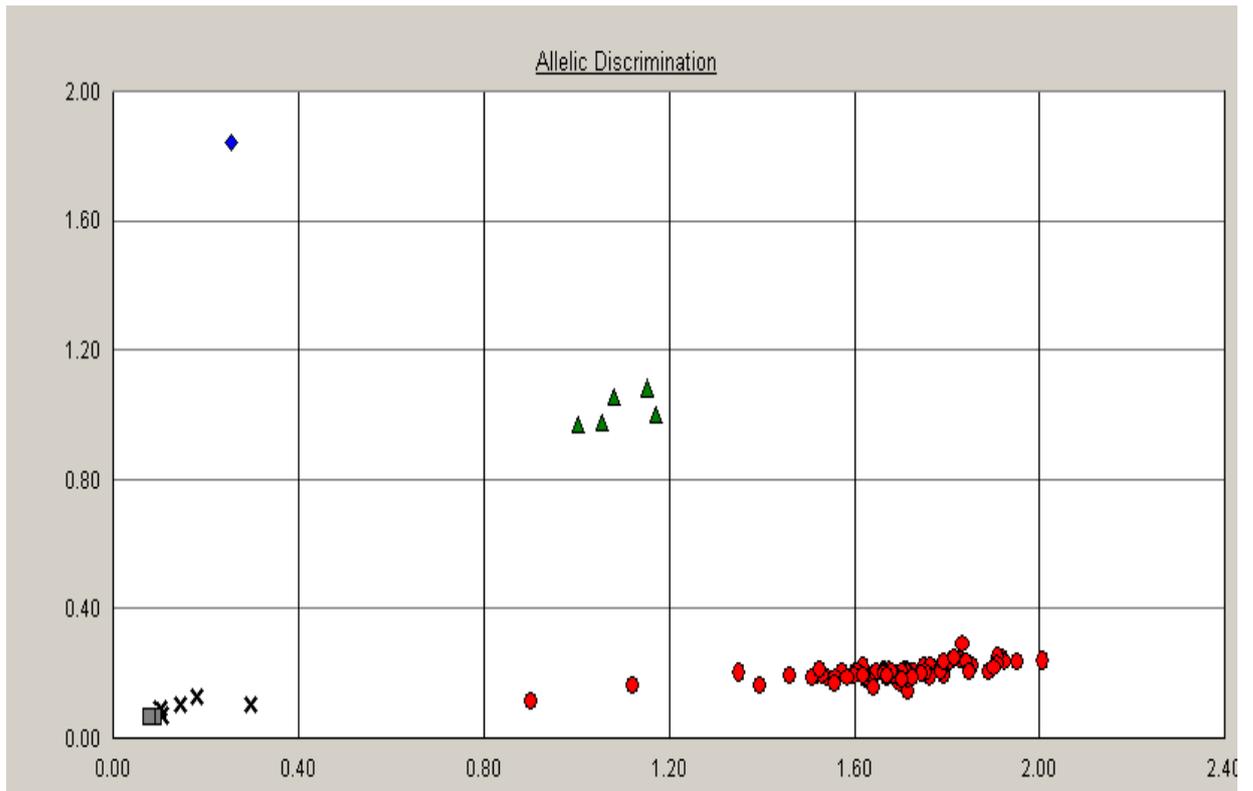


Figura 9: Rappresentazione grafica del rilevamento della fluorescenza mediante il software per quanto riguarda la delezione 2463delC 1 campione omozigote con il simbolo blu, 5 campioni eterozigoti con il simbolo verde e con il simbolo rosso i campioni normali.

DISCUSSIONE

Lo studio delle basi molecolari della malattia di Wilson in Sardegna ha permesso la caratterizzazione della quasi totalità dei cromosomi analizzati (96%).

Esiste un'alta omogeneità allelica nella malattia di Wilson sulla popolazione sarda con la presenza di 6 mutazioni (213–214delAT, 1512–1513insT, R778W, 2463delC, V1146M e –441/-427del) che costituiscono l' 85% degli alleli casi di cui una singola mutazione la delezione –441/-427del nella regione promoter costituisce il 61,7% dei casi dato che suggerisce la presenza di un effetto fondatore.

Le 6 mutazioni più comuni sono presenti in almeno un allele in 107/110 dei campioni analizzati. Solo in 3 delle famiglie analizzate sono state identificate mutazioni diverse dalle 6 più comuni. Questi dati suggeriscono che quella Sarda è una popolazione omogenea e che lo studio molecolare potrebbe essere utilissimo non solamente per la diagnosi di singoli casi ma probabilmente per uno screening di massa per la diagnosi precoce della malattia. Per meglio rafforzare questa ipotesi abbiamo eseguito uno screening limitato di 5290 neonati estraendo il DNA dalle Guthrie cards utilizzate per lo studio di altre malattie come lo sono la Fenilchetonuria e l' Ipotiroidismo congenito.

Lo scopo dello studio era quello di meglio stabilire l'incidenza della malattia di Wilson in Sardegna ma anche di sviluppare un approccio efficace per uno screening di massa per la diagnosi precoce della malattia di Wilson con l' uso delle tecniche di biologia molecolare. A questo scopo siamo riusciti a rendere efficaci e veloci tutti i passaggi di tale studio a partire dall'estrazione del DNA fino alla identificazione delle 6 mutazioni più comuni responsabili della malattia di Wilson in Sardegna. Per l'estrazione sono stati utilizzati diversi protocolli riportati in letteratura e diversi kit commerciali ed è stato stabilito un metodo che permette di ottenere quantità sufficienti e approssimativamente uguali di DNA, di buona qualità, senza contaminazioni che possono rendere difficile il successivo passaggio quello della amplificazione con il metodo della PCR. Per rendere ancora più efficace le nostre prestazioni diagnostiche abbiamo sviluppato la strategia innovativa della discriminazione allelica e la sua variante della PCR quantitativa per la ricerca delle 6 mutazioni più comuni in Sardegna.

I vantaggi offerti da questo approccio sono ancora maggiori in quanto si tratta di un sistema automatizzato che permette di analizzare in tempi brevi 96 campioni posti su piastra senza interventi intermedi da parte dell' operatore, evitando passaggi intermedi di controlli, uso di radioattività e portando al minimo la possibilità di contaminazione del campione offrendo

una lettura dei risultati in tempo reale. Lo stesso approccio è stato validato per lo studio di campioni estratti da sangue periferico e da sangue fissato su Guthrie card. I risultati ottenuti sono stati con i diversi approcci sovrapponibili confermando la messa a punto della metodica.

Lo screening dei 5290 neonati ha riguardato la ricerca della mutazione -441/-427del. I risultati hanno evidenziato la presenza di 122 eterozigoti per tale mutazione. Sulla base dei dati ottenuti abbiamo calcolato la frequenza allelica della malattia di Wilson che è risultata essere del 1.9 %, la frequenza del portatore, 3.8 % e il numero dei nuovi casi che è risultato essere di circa 5.5 nuovi casi per 15000 neonati all'anno, dato che corrisponde ad un'incidenza della malattia di 1/1707 nati vivi.

Questa incidenza risulta essere molto più alta di quella ottenuta sulla base di precedenti studi epidemiologici secondo i quali l'incidenza della malattia di Wilson in Sardegna è di circa 1/7000 nati vivi.

Questo dato suggerisce molto probabilmente che gran parte dei malati Wilson non venendo diagnosticati come tali, sfuggono alla diagnosi per cui vengono trattati come affetti da epatopatie o neuropatie di diversa natura.

La Sardegna riassume tutte le caratteristiche che rendono realizzabile e necessario l'uso dello studio molecolare finalizzato ad uno screening di massa per la diagnosi precoce e la prevenzione della malattia di Wilson.

- ◆ Primo importante elemento è l'alta omogeneità genetica della popolazione sarda con la presenza di 6 mutazioni che raggruppate costituiscono circa il 85% cioè la stragrande maggioranza dei casi, dato questo che rende più semplice il metodo di analisi del DNA.
- ◆ Inoltre la natura della malattia comporta un progressivo accumulo del rame nei tessuti dove provoca dei danni. Quindi è importante che venga diagnosticata precocemente in modo da evitare gli effetti dannosi del rame attraverso un adeguato trattamento.

La malattia di Wilson è una malattia trattabile. Esiste il trattamento per l'eliminazione dell'accumulo di rame cioè la Penicillamina ed il Trientine nei casi di sovraccarico di rame ma esiste anche il trattamento con lo Zinco nella forma di acetato o di solfato che può essere usato in pazienti diagnosticati allo stato presintomatico. Per cui il trattamento con lo Zinco in un bambino diagnosticato allo stato presintomatico, per esempio in epoca neonatale, può evitare l'accumulo dannoso del rame. Il trattamento va iniziato anche in assenza di segni di malattia o di alterazione dei livelli di transaminasi. E' noto infatti che diversi casi di malattia di Wilson a presentazione neurologica nell'infanzia o nell'età adulta non mostravano alterazioni degli enzimi epatici.

Attualmente lo sviluppo della tecnologia del DNA può permettere questo tipo di studio in modo agevole.

Per meglio verificare la fattibilità di uno screening di massa sarebbe prima necessario avviare uno studio pilota di screening neonatale riguardante tutti i nati in Sardegna in un dato periodo, così articolato:

Il DNA estratto dalle gocce di sangue sulle Guthrie cards utilizzate per lo studio di altre malattie del metabolismo verrà analizzato per la ricerca delle 6 mutazioni più comuni nella popolazione sarda. Tale studio permetterà l'identificazione dei portatori e dei malati allo stato presintomatico nella maggioranza dei casi. Gli eterozigoti per le 6 mutazioni più comuni saranno analizzati per le rimanenti 18 mutazioni rare, permettendo di coprire il 94.6% dei casi. Viste le dimensioni del campione in studio, circa 12000 neonati all'anno, solo l'automatizzazione potrebbe renderlo realizzabile.

I risultati di questo programma daranno precise informazioni sull'incidenza della malattia di Wilson in Sardegna e sulla fattibilità, la riproducibilità ed il costo/beneficio di questo approccio in un programma di prevenzione in questa popolazione.

I neonati affetti verranno seguiti nel tempo e saranno trattati prima dell'accumulo del rame nel organismo.

Verrà somministrato loro lo Zinco per bloccare l'assorbimento del rame a livello intestinale. Un lungo follow up permetterà di stabilire i dosaggi appropriati del trattamento precoce e il tipo e la qualità delle valutazioni periodiche per poter controllare in modo preciso il bilancio del rame nel organismo.

Questa esperienza potrebbe costituire un caso unico di prevenzione di malattia attraverso uno screening neonatale basato sui metodi di analisi del DNA, un'esperienza da utilizzare in popolazioni con caratteristiche simili alla popolazione sarda per la prevenzione di malattie genetiche tipo la malattia di Wilson.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO: *“Technical report series”* 401, 1968

2. GENETICA MEDICA. Gelehrter TD, Collins FS, Ginsburg D, ed. Masson
3. Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism: “ *Genetic screening: programs, principles and research*” Washington, DC: National Academy of Sciences, 1975
4. Khoury MJ, McCabe LL, McCabe ERB: “*Population screening in the age of genomic medicine*” N Engl J Med 2003; 348: 50-55
5. WHO Wilson JMG, Jungner G: “*Principles and practice of screening for disease*” Geneva: WHO, 1968
6. Goel V: “*Appraising organised screening programmes for testing for genetic susceptibility to cancer*” BMJ 2001; 322: 1174-1178
7. Godard B, Kate L, Evers-Kiebooms G, Aymè S: “*Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies*” Eur J Hum Genet 2003; 11:S49-S87
8. Anderson P, Aro AR, Dragonas T, et al: “*Prenatal screening and genetics*” Eur J Public Health 2001; 11:231-233
9. Milunsky A: “*Maternal serum screening for neural tube and other defects*” In: Milunsky A, editor “*Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatment*” IV ed. London: John Hopkins University Press, 1998; 635-701
10. Levi HL, Albers S: “*Genetic screening of newborns*” Annu Rev Genomics Hum Genet 2000; 1:139-177
11. Therrell Jr BL: “*US newborn screening policy dilemmas for the twenty-first century*” Mol Genet Metab 2001; 74:64-74
12. Defesche JC, Kastelein JJ: “*Molecular epidemiology of familial hypercholesterolemia*” Lancet 1998; 352:1643-1644

13. Niederau C, Strohmeyer G: “*Strategies for early diagnosis of haemochromatosis*” Eur J Gastroenterol Hepatol. 2002; 14:217-221
14. Burke W, Franks AL, Bradley LA: “*Screening for hereditary hemochromatosis: are DNA-based tests the answer ?*” Mol Med Today. 1999; 5428-430
15. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC: “*Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies*” Bailliere’s Clin Haematol 1998; 11:215-238
16. American Academy of Pediatrics Committee on Genetics: “*Newborn screening fact sheets*” Pediatrics 1989; 83:449-464
17. Burrow GN, Dussault JH, eds: “*Neonatal thyroid screening*” New York: Raven Press, 1980:155
18. Hassemer DJ, Laessig RH, Hoffman GL, Farrell PM: “*Laboratory quality control issues related to screening newborns for cystic fibrosis using immunoreactive trypsin*” Pediatr Pulmonol Suppl 1991; 7:76-83
19. Maheshwari M, Vijaya R, Kabra M, et al: “*Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy*” Natl Med J India 2000; 13:129–131
20. Burlina A.B: “*Lo screening neonatale nel nuovo millennio*” Prospettive in pediatria 2000; 30:43-46
21. Roe CR, Ding J: “*Mitochondrial fatty acid oxidation disorders*” In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds: “*The metabolic & molecular bases of inherited disease*” 8th ed. Vol. 2. New York: McGraw-Hill, 2001; 2297-2326
22. McCabe ER, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML: “*DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening*” Hum Genet. 1987; 75:213-216

23. McCabe ER: “ *DNA techniques for screening of inborn errors of metabolism*” Eur J Pediatr. 1994; 153 (Suppl 1):S84-S85
24. Wang DG, Fan JB, Siao CJ: “*Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome*” Science. 1998; 280: 1077-1082
25. Hacia JG, Brody LC, Chee MS, et al: “*Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis*” Nat Genet. 1996; 14:441-447
26. De Risi J, Penland L, Brown PO, et al: “*Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer*” Nat Genet. 1996; 14:457-460
27. Guthrie R, Susi A: “*A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants*” Pediatrics 1963; 32:338-343
28. American Academy of Pediatrics AAP Section on Endocrinology and Committee on Genetics and American Thyroid Association Committee on Public Health: “*Newborn screening for congenital hypothyroidism: recommended guideline*”. Pediatrics. 1993; 91:1203-1209
29. Bekker H, Modell M, Denniss G: “*Uptake of cystic fibrosis testing in primary care: supply push or demand pull?*” BMJ 1993; 306:1584-1586
30. Cao A: “*Prevenzione genetica. Prospettive in pediatria*” 2000; 30:19-26
31. Travert G, Wursteisen B (eds): “*Neonatal screening for cystic fibrosis*” Proceeding of the International Conference. Caen, 10-11 September 1998. Caen Cedex: Presses Universitaires de Caen, 1999 ; 115-121
32. Zbang YH, McCabe L, Wilbom M, et al: “*Application of molecular genetics in public health: improved follow up in a neonatal hemoglobinopathy screening program*” Biochem Med Metab Biol 1994; 52:17-35

33. Fitness J, Dixit N, Webster D, et al: “ *Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia*” J Clin Endocrinol Metab. 1999; 84:960-966
34. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, et al: “*Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1)*” Pediatrics 1999; 103:546-550
35. Danks DM: “*Disorders of copper Transport*”. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. “*The metabolic Basis of Inherited Diseases*”. 6th ed., New York; Mac Graw-Hill 1989; 1:1416-22
36. Wilson SAK: “*Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver*” Brain 1912; 18:421
37. Fleischer B: “*Ueber einer der “Pseudosclerose“ nahestehende bisher unbekannte Krankheit (gekennzeichnet durch Tremor, psychische Stoerungen, braeunlicke Pigmentierung bestimmter Gewebe, insbesondere Such der Hornhauptperpherie, Lebercirrhose)*“ Deutsch Z Nerven Heilk 1912; 44:179-201
38. Bearn AG: “*Genetic analysis of the 30 families with Wilson’s disease (hepatolenticular degeneration)*” Ann Hum Genet 1960; 24:33-43
39. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW: “*The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*” Nat Genet 1993; 5:327-337
40. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I et al: “*The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene*” Nature Genet 1993; 5:344-350
- 41 Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD: “*Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease*” Biochem Biophys Res Commun 1993; 197:271-277

42. Sheinberg IH, Sternlieb I: "*Wilson disease and idiopathic copper toxicosis*" *Am J Clin Nutr* 1996; 63:842S-845S
43. Danks DM: "*Disorders of copper transport*" In: Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *Metabolic basis of inherited disease*, New York: McGraw-Hill, 1989; 1411-1431
44. De Virgiliis S: "*Workshop sulla diagnosi precoce delle malattie genetiche e della suscettibilità ereditaria allo sviluppo di neoplasie: proposte per una programmazione sanitaria*" Istituto Superiore Sanità 8-19 Dicembre 1997, Roma
45. Pena MM, Lee J, Yhiele DJ: "*A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution*" *J Nutr* 1999; 129:1251-1260
46. Sokol RJ: "*Antioxidant defenses in metal-induced liver damage*" *Semin Liver Dis* 1996; 16:39-46
47. Schaefer M, Gitlin JD: "*Genetic disorder of membrane transport. Wilson's disease and Menkes disease*" *Am J Physiol* 1999; 276:G311-G314
48. Lutsenko S, Petris MJ: "*Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches*" *J Membr Biol* 2003; 191:1-12
49. Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, Gitlin JD: "*Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver*" *Am J Physiol* 1999; 276:G639-G646
50. Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD: "*Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae*" *J Biol Chem* 1997; 272:21461-21466
51. Pleskow RG, Grand RJ: "*Wilson's disease In: Pediatric gastrointestinal disease*" Vol. II. Walker WA, Dune PR, Hamilton JR et al. (eds). BC Decker, Philadelphia, Toronto 1993; 1014-1023

52. Yarze JC, Martin P, Munoz SJ, Friedman LS: “*Wilson’s disease: current status*” Am J Med 1992; 92:643-654
53. Morrison ED, Kowdley KV: “*Genetic liver disease in adults. Early recognition of the three most common causes*” Postgrad Med 2000; 107:147-152,155,158-159
54. Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC: “*Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-Type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions*” Hum Mol Genet 1994; 3:1647-1656
55. Caca K, Ferenci P, Kuhn HJ, Willgerodt H, Kunath B, Mossner J, Berr F: “*High prevalence of the His1069Gln mutation in East German patients with Wilson disease. Rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype-genotype correlation analysis*” J Hepatol 2001; 35:575-581
56. Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, Kanavakis E, Tzetis M, Manolaki N, Panagiotaki E, Karpathios E, Cao A: “*Delineation of the spectrum of mutations in the Greek population and identification of six novel mutations*” Genetic Testing 2000; 4(4):399-402
57. Chuang LM, Wu HP, Jang MH, Wang TR, Sue WC, Lin BJ, Cox DW and Tai TY: “*High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease*” J Med Genet 1996; 33:521-523
58. Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, Chang JG, Lee CC, Lin SP, Yang CF, Jong YJ, Lo MC: “*Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations*” Hum Mut 1998; 12:370-376
59. Maier-Dobersberger T, Mannhalter C, Rack S, Granditsch G, Kaserer K, Korninger L, Steindl P, Gangl A, Ferenci P: “*Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by linkage analysis*” Gastroenterology 1995; 109:2015-2018

60. Figus AL, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, Deiana M, Lovicu M, Olla N, Sole G, De Virgiliis S, Lilliu F, Farci AMG, Nurchi AM, Giacchino R, Barabino A, Marazzi M, Zancan L, Greggio NA, Marcellini M, Solinas A, Deplano A, Barbera C, Devoto M, Ozsoglou S, Kocak N, Akar N, Karayalcin S, Mokini V, Cullufi P, Balestrieri A, Cao A, Pirastu M: “*Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in mediterranean populations*” Am J Hum Genet 1995; 57:1318-1324
61. Loudianos G, Dessi V, Angius A, Lovicu M, Loi A, Deiana M, Akar N, Vajro P, Figus AL, Cao A, Pirastu M: “*Wilson disease mutations associated with uncommon haplotypes in mediterranean patients*” Hum Genet 1996; 98:640-642
62. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi AM, Sturniolo GC, Marcellini M, Zancan L, Barbera C, Akar N, Braggeti P, Yagci R, Vegnente A, Cao A, Pirastu P: “*Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the mediterranean population*” Hum Mut 1998a; 12:89-94
63. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Kanavakis E Tzetis M, Kattamis C, Manolaki N, Getsi V, Karpathios Th, Cao A, Pirastu M: “*Haplotype and mutation analysis in Greek patients with Wilson disease*” Eur J Human Genet 1998b; 6:487-491
64. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Altuntas B, Giacchino R, Marazzi M, Marcellini M, Sartorelli MR, Sturniolo GC, Kocak N, Yuce A, Akar N, Pirastu M, Cao A: “*Mutation analysis in patients of Mediterranean descent with Wilson disease: identification of 19 novel mutations*” J Med Genet 1999a; 36:833-836
65. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus AL, Lilliu F, De Virgiliis S, Nurchi AM, Deplano A, Pirastu M, Cao A: “*Molecular characterization of Wilson disease in the Sardinian population-Evidence of a founder effect*” Hum Mutat 1999b; 14:294-303
66. Loudianos G, Lovicu M, Solinas P, Kanavakis E, Tzetis M, Manolaki N, Panagiotaki E, Karpathios T, Cao A: “*Delineation of the spectrum of Wilson disease mutations in the Greek population and identification of six novel mutations*” Genet Testing 2000; 4:399-402

67. Loudianos G: “*Characterization of the molecular defect and genotype-phenotype analysis in Wilson disease patients from Yugoslavia*” *Genetic Testing* 2003; 7:107-112
68. Lovicu M, Dessì V, Zappu A, De Virgiliis S, Cao A, Loudianos G: “*Efficient strategy for molecular diagnosis of Wilson disease in the Sardinian population*” *Clin Chem* 2003; 49:496-498
69. Lepori MB, Lovicu M, Dessì V, Zappu A, Incollu S, Zancan L, Giacchino R, Iorio R, Vajro P, Maggiore G, Marcellini M, Barbera C, Pellecchia MT, Simonetti R, Kostic V, Farci AMG, Solinas A, De Virgiliis S, Cao A, Loudianos G: “*Twenty-Four Novel Mutations in Wilson Disease Patient of Predominantly Italian Origin*” *Genet Test* 2007; 11(3):328-32

RINGRAZIAMENTI

E' per me un grande piacere ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato e sostenuto durante il periodo di frequenza del Dottorato di Ricerca.

Desidero ringraziare il Laboratorio di Epatopatie Genetiche dell'Ospedale per le Microcitemie di Cagliari in particolar modo il Dott. Georgios Loudianos per il fondamentale supporto e per la costante disponibilità. Un caloroso grazie alla Dott.ssa M.Barbara Lepori, alla Dott.ssa Antonella Zappu e alla Dott.ssa Simona Incollu, colleghe e amiche, la cui compagnia ha reso più gradevoli questi anni.

Un ringraziamento particolare va a Giuseppe per essermi stato sempre vicino e per avermi sempre sopportato nei momenti più critici.

Un grazie di cuore ai miei genitori che, oltre ad avermi mantenuto agli studi per un periodo che solo il bacato sistema italiano può richiedere, hanno sempre mostrato per quello che faccio una fiducia cieca e priva di incertezze, spronandomi sempre ad andare avanti per la mia strada.