

Identificazione di una nuova mutazione del gene NPHP1

Articoli originali

Antonella La Russa¹, Rosa Anna Cifarelli², Anna Perri¹, Angelo Saracino³, Giovanni Santarsia³ e Renzo Bonofiglio¹

¹Centro di Ricerca "Rene e Trapianto" UOC Nefrologia e Dialisi abilitata al Trapianto, AO Cosenza, Italia

²Fondazione Basilicata - Ricerca Biomedica, Madonna delle Grazie, Matera, Italia

³Unità Operativa Complessa "Nefrologia Dialisi e CRT-Centro Regionale Trapianti", Matera, Italia



Renzo Bonofiglio

Corrispondenza a:

Renzo Bonofiglio

UOC Nefrologia e Dialisi abilitata al Trapianto

Azienda Ospedaliera di Cosenza

Via F. Migliori, 1

87100 Cosenza, Italia

Tel 0984681865

E-mail: rbonofi@gmail.com

ABSTRACT

Le malattie cistiche renali rappresentano una causa importante di insufficienza renale cronica terminale, che, in relazione al difetto genetico associato, vengono classificate in malattie del complesso ciliare primitivo e malattie uromodulina-associate. Mutazioni in geni che codificano per proteine del cilio primario sono causa delle ciliopatie che possono interessare anche il rene. Ad oggi sono descritte tre ciliopatie: la forma autosomica dominante e recessiva del rene policistico e la nefronoftisi (NPHP). La Nefronoftisi familiare giovanile (NPHP) è una malattia tubulo-interstiziale a trasmissione autosomica recessiva di cui si conoscono 3 differenti forme: giovanile, infantile e adolescenziale. La Nefronoftisi giovanile o tipo 1 (NPHP1), è la forma più frequente e la diagnosi è basata principalmente su dati clinici e radiologici. È caratterizzata dalla presenza di delezioni in omozigosi del gene NPHP1 nel 20-40% dei casi. Le delezioni in eterozigosi si riscontrano nel 6% dei pazienti, con concomitante mutazione del gene NPHP1 sul secondo allele.

In questo lavoro abbiamo valutato, attraverso screening genetico, pazienti con sospetta diagnosi di NPHP1 appartenenti a 6 famiglie. Abbiamo osservato in 2/6 pazienti la delezione degli esoni 5-7-20 ed in 4/6 la delezione in eterozigosi dell'esone 20 ed una nuova delezione in eterozigosi dell'esone 17 non ancora descritta in letteratura.

I dati ottenuti suggeriscono che lo screening genetico dovrebbe rientrare nell'iter diagnostico dei pazienti con sospetta nefronoftisi e che questo potrebbe essere utilizzato a scopo diagnostico come alternativa alla biopsia renale.

PAROLE CHIAVE: Nefronoftisi, gene NPHP1; ciliopatie

ABSTRACT

Kidney cystic diseases are inherited disorders causing chronic renal failure. According to the genetic defect they are classified as diseases of the primary ciliary complex and uromodulin-associated diseases. Mutations in genes coding for ciliary proteins are the basis of a broad category of genetic diseases, called ciliopathies. To date, three important ciliopathies are known: the autosomal dominant form and the recessive shape of the polycystic kidney and the nephronophthisis (NPHP).

Juvenile Nephronophthisis (NPHP) is a progressive renal tubulo-interstitial disorder with a form of autosomal recessive inheritance that progresses inexorably towards terminal renal failure. Three different forms have been distinguished: juvenile (NPHP1), infantile (NPHP2) and adolescent (NPHP3). Juvenile Nephronophthisis or nephronophthisis type 1 (NPHP1), is the most frequent form. In most patients with a suspected diagnosis of NPHP, based primarily on clinical and radiological data, the deletion in homozygous NPHP1 is present in 20-40% of cases. Heterozygous deletions are found in 6% of patients, with concomitant mutation of the NPHP1 gene on the second allele.

In this study we subjected to genetic screening 6 patients with suspected NPHP causing chronic renal failure, belonging to 6 families. The genetic screening identified in 2/6 patients a deletion of exons 5-7-20 and in 4/6 patients an heterozygous deletion of exon 20 and an heterozygous deletion on exon 17 not yet described in literature.

Our results suggest that genetic screening should be included in the diagnostic procedure of patients with suspected nephronophthisis and that it may be used alternatively to renal biopsy.

KEYWORDS: Nephronophthisis, NPHP1 gene, Ciliopathies

INTRODUZIONE

Le malattie cistiche renali sono patologie ereditarie e rappresentano una causa importante di insufficienza renale cronica terminale (1). In base alle modalità di trasmissione, la classificazione tradizionale suddivideva le patologie cistiche renali in autosomiche dominanti, autosomiche recessive e X-linked. Oggi, l'identificazione dei geni responsabili di queste malattie e lo studio del loro prodotto proteico, hanno permesso di far luce sui meccanismi patogenetici che sono alla base della formazione delle cisti e di riclassificare le suddette malattie in relazione al difetto genetico associato in: malattie del complesso ciliare primitivo e malattie uromodulina-associate (1, 2).

Il ciglio primario è un organello altamente conservato che emerge dalla superficie della quasi totalità delle cellule presenti nei vertebrati. Esso è composto dall'assonema, una struttura costituita da 9 coppie di microtubuli, che si assemblano a partire dal corpo basale, ovvero uno dei due centrioli di un centrosoma (3). La precisa funzione del ciglio primario resta sconosciuta, tuttavia è stato proposto che esso possa percepire una varietà di stimoli extra-cellulari (meccanici, chimici, termici, olfattivi, ecc.) ed influenzare poi processi come proliferazione, crescita, polarità e differenziamento (4). Nei tubuli renali, tale organulo è deputato al rilevamento del flusso luminale e alla trasduzione del segnale extracellulare attraverso l'orletto a spazzola e varie *pathways* intracellulari (1). Mutazioni nei geni che codificano per proteine ciliari sono alla base di una vasta categoria di malattie genetiche, definite ciliopatie, a dimostrazione del fatto che il ciglio primario gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo degli organi e nel loro mantenimento. Uno degli organi più frequentemente colpiti è il rene. Infatti, si conoscono, ad oggi, tre importanti ciliopatie che colpiscono tale organo: la forma autosomica dominante e la forma recessiva del rene policistico e la nefronoftisi (NPHP) (5). La Nefronoftisi familiare giovanile (NPHP) (MIM 256100) è un disturbo tubulo-interstiziale renale progressivo trasmesso con ereditarietà autosomica recessiva (6) che progredisce inesorabilmente verso l'insufficienza renale terminale entro l'età adolescenziale e prima dei 25 anni. La malattia è quindi raramente osservata nell'adulto e rappresenta, pertanto, una delle più comuni cause di insufficienza renale terminale in età pediatrica, con un'incidenza del 10-15%, risultando la terza malattia renale ereditaria nelle casistiche pediatriche di dialisi e trapianto (7). L'NPHP, insieme alla malattia renale cistica midollare (MCKD), appartiene a un gruppo di malattie (NPH-MCKD) che condividono caratteristiche comuni quali: (1) sintomi clinici, (2) patologia macroscopica, (3) istologia renale. I primi sintomi nei bambini con NPHP si sviluppano di solito intorno ai 6 anni e comprendono la poliuria, la nicturia o l'enuresi secondaria, la polidipsia e la letargia (secondaria all'anemia) (8). Queste caratteristiche sono una conseguenza della perdita di sale e dell'incapacità di concentrare l'urina (<400mosm/kg di urina del mattino), implicando disfunzioni del dotto collettore renale (9). L'ecografia è il mezzo diagnostico strumentale migliore per porre un sospetto diagnostico. Infatti, nei casi in cui le cisti siano assenti, i segni clinici suggestivi di malattia sono rappresentati da reni ridotti di volume e dalla presenza di iperecogenicità all'ecotomografia. Nel 70% dei casi sono visibili cisti di diametro variabile da 1 a 15 mm, soprattutto nella giunzione cortico-midollare e nella midollare. Le cisti compaiono tardivamente, ma possono essere osservate anche in fase precoce di malattia. Questa è una caratteristica che la distingue dalla malattia renale policistica dominante e recessiva, dove i reni sono ingranditi e le cisti sono distribuite uniformemente (8). L'esame istologico dimostra nell'interstizio infiltrazioni di cellule linfo-istiocitiche, sclerosi, atrofia e dilatazione tubulare. Inoltre, contestualmente a glomeruli completamente sclerotici, è possibile rilevare la presenza di glomeruli normali. Il quadro in microscopia ottica (MO) è simile a quello di un'aspecifica nefropatia tubulo interstiziale cronica. La microscopia elettronica (ME) conferma l'ispessimento della membrana basale dei tubuli accompagnata da attenuazione, frammentazione e lamellazione della stessa.

Sono stati finora identificati 6 locus genici responsabili della nefronoftisi in maniera isolata o in associazione ad altre anomalie extrarenali. Tuttavia, si distinguono, al momento, 3 differenti forme di nefronoftisi: giovanile (NPH1), infantile (NPH2) e adolescenziale (NPH3) (8). La Nefronoftisi giovanile, anche denominata nefronoftisi tipo 1 (NPH1), costituisce la forma più frequente. Il locus del gene NPHP1 coinvolto nella forma giovanile è localizzato al cromosoma 2q12-q13 (10). Poliuria, polidipsia, diminuita capacità di concentrazione urinaria e secondaria enuresi sono i sintomi di esordio nell'80% dei casi e si presentano tra i 4 e i 6 anni di età. Anemia e ritardo di crescita compaiono successivamente e sono molto evidenti. L'ipertensione arteriosa è rara. L'insufficienza renale cronica pre-terminale viene usualmente raggiunta in media intorno ai 13 anni. Varie anomalie extrarenali sono state descritte in associazione alla nefronoftisi. Il coinvolgimento di organi extrarenali è esclusivo della forma giovanile NPHP1. Infatti, la nefronoftisi può avvenire in combinazione con l'aprassia motoria oculare tipo Cogan, con la retinite pigmentosa nella sindrome Senior-Loken, con il coloboma del nervo ottico e l'aplasia del verme cerebellare nella sindrome di Joubert, con la distrofia toracica nella sindrome di Jeune, con alterazioni retiniche e polidattilia nella sindrome di Bardet-Biedl, e con la fibrosi epatica isolata o in associazione alle caratteristiche delle precedenti sindromi (8).

Il gene NPHP1 codifica per la nefrocistina, una proteina di 733 aminoacidi con un dominio N-terminale coiled-coil, un adiacente dominio Src3(SH3) e un dominio conservato C-terminale che comprende due terzi della proteina (11). Sono stati individuati alcuni partner di interazione con la proteina, tra cui la p130CAS, la tirosina chinasi 2, ricca di proline, e la tensina, che funzionano in complessi di adesione focale o in siti di contatto cellulare nelle cellule MDCK polarizzate. Inoltre, alcune proteine coinvolte, quali NPHP2, NPHP3 e NPHP4, sono associate alla nefrocistina, suggerendo l'assemblaggio in un grande complesso multi proteico (12). Nella maggior parte dei pazienti con sospetta diagnosi di NPHP, basata principalmente su dati clinici e radiologici, la delezione in omozigosi NPHP1 è presente nel 20-40% dei casi. Le delezioni in eterozigosi si riscontrano nel 6% dei pazienti, con concomitante mutazione del gene NPHP1 sul secondo allele (13). Inoltre, Hildebrandt et al. hanno calcolato che la probabilità di mutazione in eterozigosi composta nel gene NPHP1 è di 1 su 10^9 (14). Sulla base di queste frequenze, l'analisi molecolare di NPHP1 è indicata quindi solo in pazienti con (NPHP1-del) in eterozigosi (13).

Lo scopo di questo studio è stato quello di investigare la presenza di mutazioni del gene NPHP1 in 6 famiglie con almeno un membro che presentava caratteristiche cliniche di nefronoftisi.

PAZIENTI

Da gennaio 2000 a settembre 2016 sono stati arruolati presso il nostro centro N°6 pazienti appartenenti a 6 famiglie con sospetta diagnosi di nefronoftisi come causa di insufficienza renale cronica. L'analisi genetica veniva effettuata su tutti i pazienti e sui loro parenti di primo grado. La possibile diagnosi clinica era basata sul soddisfacimento dei seguenti criteri: 1) esordio dell'insufficienza renale cronica (IRC) o uremia terminale (ESRD) nelle prime due decadi di vita, 2) poliuria e polidipsia con perdita di sale in età infantile; 3) difetti di concentrazione delle urine; 4) ritardo di crescita; 5) assenza o minima presenza di microematuria e proteinuria; 6) ecografia renale caratterizzata da iperecogenicità corticale, perdita della differenziazione cortico-midollare e presenza di cisti corticomidollari, 7) biopsia renale effettuata prima del raggiungimento dell'ESRD caratterizzata dal classico quadro di nefrite interstiziale aspecifica, dilatazioni cistiche tubulari, atrofia tubulare, fibrosi tubulo interstiziale. Poiché la nefronoftisi può accompagnarsi a manifestazioni extrarenali in circa il 10% dei pazienti, tutti i pazienti venivano sottoposti ad indagini per escludere degenerazione retinica, aplasia del verme cerebellare ed eventuali altre complicanze. In un paziente 1/ 6 erano presenti sintomi extrarenali all'esordio della malattia, quali

artralgie, afte recidivanti e lesioni eczematose della cute. L'età media dei pazienti all'esordio dell'insufficienza renale era di 15.5 ± 5.2 anni. Il valore medio della pressione sistolica e diastolica era rispettivamente di 122 ± 20.9 mmHg e 85.37 ± 12.02 . Circa il 70% era iperteso. Tutti i pazienti mostravano poliuria e polidipsia nella loro storia anamnestica; il ritardo mentale non era presente in nessun paziente, mentre 2/3 pazienti mostrava alterazioni oftalmologiche, quali restringimento dei vasi retinici in uno, e atrofia coroidale nel secondo. 5/6 pazienti erano avviati al trattamento dialitico all'età media di 23 ± 8.9 anni; 6/6 sono stati sottoposti a trapianto di rene all'età media di 26.3 ± 7 anni, di cui uno in modalità pre-emptive da donatore vivente.

MATERIALI E METODI

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico secondo procedure standard e sottoposto ad amplificazione mediante reazione polimerasica a catena (PCR). L'analisi di delezione NPHP1 è stata effettuata usando primer specifici già descritti in letteratura per l'esone 5, 7 e 20 del gene NPHP1. All'interno della mix di PCR è stato inserito un gene di controllo LHX9. Le coppie di primers sono state usate in un setting di PCR multiplex ad una concentrazione finale di 10 pMol. I prodotti di PCR sono stati analizzati su un gel di agarosio ad una percentuale dell' 1,5%. I pazienti che presentavano eterozigotità sono stati analizzati per le mutazioni che coinvolgono tutti i restanti esoni del gene NPHP1 utilizzando primer già descritti in letteratura (15). La presenza di eterozigotità (NPHP1-del) è stata dedotta dall'analisi di segregazione nella famiglia.

RISULTATI

L'analisi genetica ha messo in evidenza in 2 dei 6 pazienti la delezione degli esoni 5-7-20. 4 su 6 pazienti presentavano la delezione dell'esone 20 in eterozigosi ed una nuova delezione in eterozigosi dell'esone 17 non descritta in letteratura.

DISCUSSIONE

La diagnosi di NPHP dovrebbe essere presa in considerazione in tutti quei casi in cui si hanno sintomi come poliuria, perdita urinaria di sodio, ritardo di crescita, insufficienza renale, meno frequentemente ematuria e minima proteinuria, pressione arteriosa normale e reni di dimensioni normali senza dilatazione delle vie urinarie (8). I dati riportati in letteratura dimostrano che circa l'80% dei bambini con diagnosi clinica di NPHP presentano delezioni in omozigosi del gene NPHP1, mentre solo alcuni sono portatori di mutazioni puntiformi in combinazione con delezioni in eterozigosi (8). In assenza di tali delezioni, la biopsia renale, potrebbe essere considerata l'unico strumento per confermare la diagnosi clinica. Allo stato attuale, lo screening per le mutazioni nel gene NPHP1 non viene eseguito di routine a causa della bassa frequenza delle mutazioni rilevate e dell'elevato costo della procedura.

Il nostro studio ha messo in evidenza che la frequenza delle delezioni nel gene che codifica per la nefrocistina 1, NPHP1, non sono così rare nella popolazione italiana così come già è stato dimostrato precedentemente (13). Infatti, l'indagine molecolare condotta nella nostra popolazione ha evidenziato in tutti i probandi in cui era stata posta diagnosi clinica di nefronoftisi oltre che le delezioni più frequenti (in due pazienti), la delezione dell'esone 20 in eterozigosi, evento molto raro (13), ed una nuova delezione in eterozigosi nell'esone 17 (in quattro pazienti). Possiamo escludere nei nostri pazienti un antenato comune considerando la diversa provenienza dei soggetti. Sebbene la nostra coorte di pazienti non possa essere considerata rappresentativa dal punto di vista statistico della frequenza delle mutazioni nella popolazione italiana, i nostri risultati,

tuttavia, suggeriscono l'importanza dello screening genetico per la conferma della diagnosi clinica.

CONCLUSIONI

In conclusione, i dati ottenuti dall'indagine molecolare, suggeriscono che lo screening genetico dovrebbe rientrare nell'iter diagnostico dei pazienti con sospetta nefronoftisi, quale potenziale arma diagnostica alternativa alla biopsia renale che potrebbe, in tal modo, essere riservata solo a quei casi nei quali l'indagine genetica risultasse negativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Watnick T, Germino F. From cilia to cyst. *Nat Genet* 2003; 34: 355-6 DOI:10.1038/ng0803-355.
2. Scolari F, Caridi G, Rampoldi L, et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kidney Dis* 2004; 44: 987-99.
3. Fry AM, Leaper MJ, Bayliss R et al. The primary cilium: guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis*. 2014 Jan 1;10(1):62-8. doi: 10.4161/org.28910.
4. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N et al. Ciliopathies. *N Engl J Med*. 2011 Apr 21;364(16):1533-43. doi: 10.1056/NEJMra1010172.
5. Tobin JL, Beales PL. The nonmotile ciliopathies. *Genet Med*. 2009 Jun;11(6):386-402. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181a02882.
6. Saunier S, Calado J, Benessy F, et al. Characterization of the NPHP1 locus: mutational mechanism involved in deletions in familial juvenile nephronophthisis. *J. Hum. Genet*. 2000 Mar;66(3):778-89. DOI: 10.1086/302819
7. Hildebrandt F, Zhou W. Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J Am Soc Nephrol* 2007 Jun;18(6):1855-71. DOI: 10.1681/ASN.2006121344
8. Hildebrandt F, Otto E. Molecular Genetics of Nephronophthisis and Medullary Cystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Sep;11(9):1753-61.
9. Hildebrandt F, Waldherr R, Kutt R, Brandis M. The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects. *Clin Investig* 1992 Sep;70(9):802-8.
10. Antignac C, Arduy CH, Beckmann JS, et al. A gene for familial juvenile nephronophthisis (recessive medullary cystic kidney disease) maps to chromosome 2p. *Nat Genet*. 1993 Apr;3(4):342-5. DOI: 10.1038/ng0493-342
11. Fliegau M, Horvath J, von Schnakenburg C, et al. Nephrocystin Specifically Localizes to the Transition Zone of Renal and Respiratory Cilia and Photoreceptor Connecting Cilia. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2424-33. DOI: 10.1681/ASN.2005121351
12. Fliegau M, Horvath J, von Schnakenburg C, et al. Nephrocystin Specifically Localizes to the Transition Zone of Renal and Respiratory Cilia and Photoreceptor Connecting Cilia. 2006; *J Am Soc Nephrol* 17: 2424 -2433. DOI: 10.1681/ASN.2005121351
13. Caridi G, Dagnino M, Trivelli A, Emma F, Perfumo F, Ghiggeri GM. Stop codon at arginine 586 is the prevalent nephronophthisis type 1 mutation in Italy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Aug;21(8):2301-3. DOI: 10.1093/ndt/gfl277
14. Hildebrandt F, Rensing C, Betz R et al. Establishing an algorithm for molecular genetic diagnostics in 127 families with juvenile nephronophthisis. *Kidney Int*. 2001 Feb;59(2):434-45. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.059002434.x
15. Saunier S, Calado J, Benessy F, et al. Characterization of the NPHP1 Locus: Mutational Mechanism Involved in Deletions in Familial Juvenile Nephronophthisis. *Am J Hum Genet*. 2000 Mar;66(3):778-89. DOI: 10.1086/302819