

Analisi del gene del recettore B del peptide natriuretico di tipo C (NPR2) in pazienti con bassa statura idiopatica e in un gruppo di controlli

**C. Volta, A. Smerieri, M.E. Street,
E. Favaro, S. Bernasconi**



Dipartimento Età Evolutiva
Università di Parma



***SHOX* point mutations and deletions in Leri-Weill dyschondrosteosis**

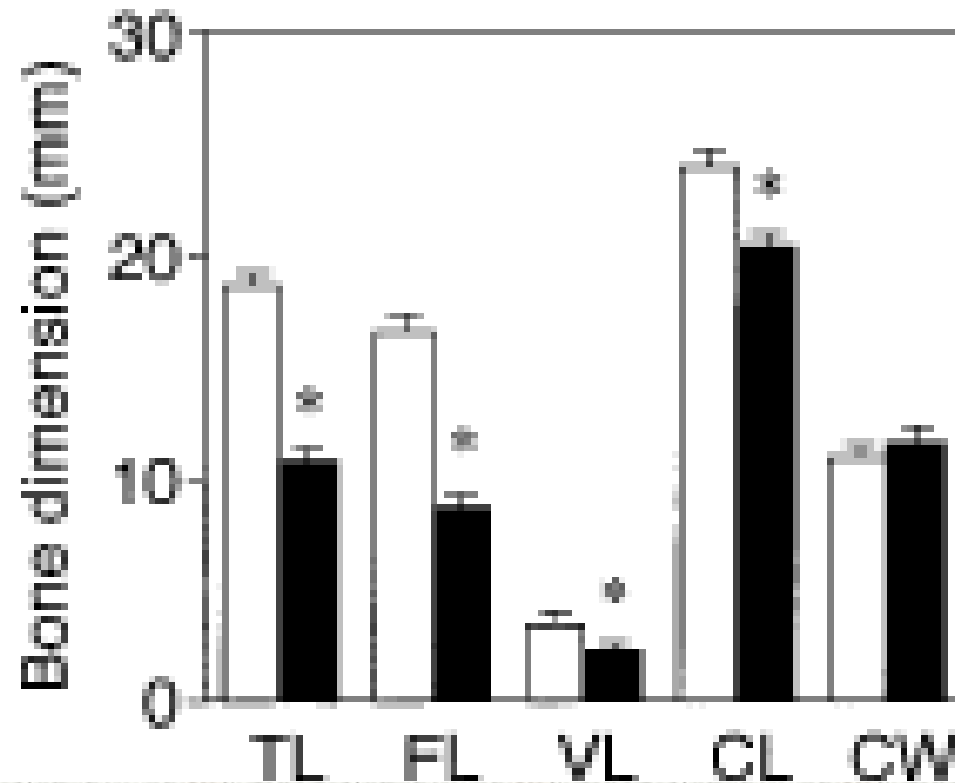
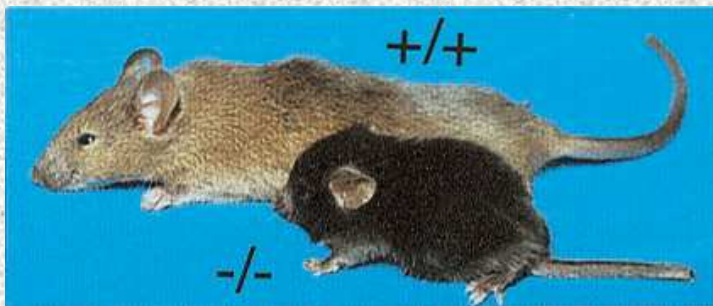
C Falcinelli¹, L Iughetti², A Percesepe¹, G Calabrese³, F Chiarelli⁴, M Cisternino⁵, L De Sanctis⁶, I Pucarelli⁷, G Radetti⁸, M Wasniewska⁹, G Weber¹⁰, L Stuppia^{3,11},

S Bernasconi¹² and A Forabosco¹

***Journal of Medical Genetics* 2002;39:e33-e33**

- *SHOX* (Short HOmeoboX containing) gene mutations have been investigated in 21 unrelated families affected by Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD), included in the study because of the presence of Madelung deformity of the forearms and disproportionate stature. Genomic deletions encompassing *SHOX* were assessed through the analysis of microsatellites within and flanking the gene. In non-deleted cases mutation analysis was performed through sequencing of the coding regions of the gene.
- Ten out of the 21 families studied showed *SHOX* gene deletions. In the remaining 11 families, sequence analysis showed three novel point mutations (one frameshift and two missense).
- Thirteen out of 21 (62%) families with typical LWD harbour a *SHOX* gene mutation; point mutations, predominantly involving the homeobox region, occur less frequently than large deletions.

Mutazione in omozigosi del gene NPR2 e bassa statura nel topo



Chusho H et al. PNAS 2001

Mutations in the Transmembrane Natriuretic Peptide Receptor NPR-B Impair Skeletal Growth and Cause Acromesomelic Dysplasia, Type Maroteaux

Cynthia F. Bartels,^{1,*} Hülya Bükülmez,^{2,6,*} Pius Padayatti,³ David K. Rhee,¹ Conny van Ravenswaaij-Arts,⁷ Richard M. Pauli,⁸ Stefan Mundlos,⁹ David Chitayat,¹⁰ Ling-Yu Shih,¹¹ Lihadh I. Al-Gazali,¹² Sarina Kant,¹³ Trevor Cole,¹⁴ Jenny Morton,¹⁴ Valérie Cormier-Daire,¹⁶ Laurence Faivre,¹⁷ Melissa Lees,¹⁸ Jeremy Kirk,¹⁵ Geert R. Mortier,¹⁹ Jules Leroy,¹⁹ Bernhard Zabel,²⁰ Chong Ae Kim,²¹ Yanick Crow,²² Nancy E. Braverman,²³ Focco van den Akker,³ and Matthew L. Warman^{1,4,5}

Bartels et al.: NPR2 Mutations Cause AMDM

29

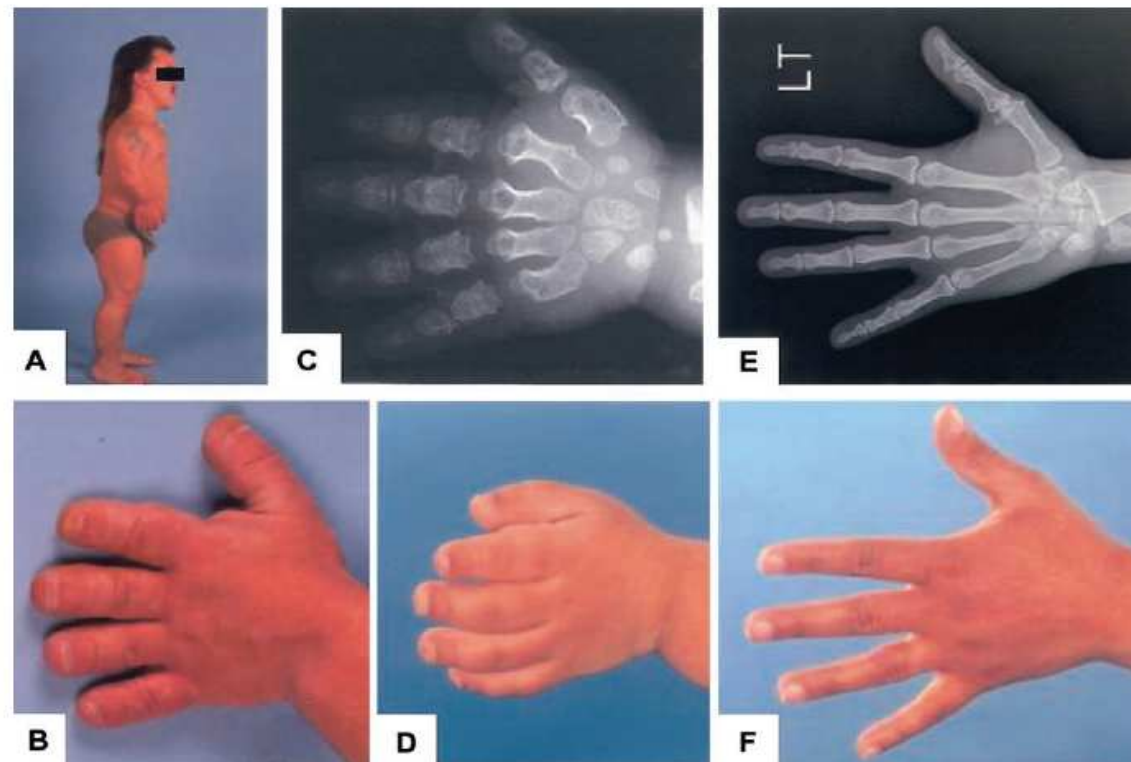


Figure 2 Clinical and radiographic features of AMDM. *A*, Side photograph of an adult male with AMDM, whose hand photograph is in panel *B*. Note the short stature, the shortening of the extremities, and the bowing of the forearm. *C*, Hand radiograph of a child with AMDM, whose hand photograph is in panel *D*. Note the shortening and widening of metacarpals and phalanges. *E*, Hand radiograph of an adult carrier of AMDM, whose height is 145 cm (4 ft, 9 in) and whose hand photograph is in panel *F*. Note the normal shape and proportion of the skeletal elements.

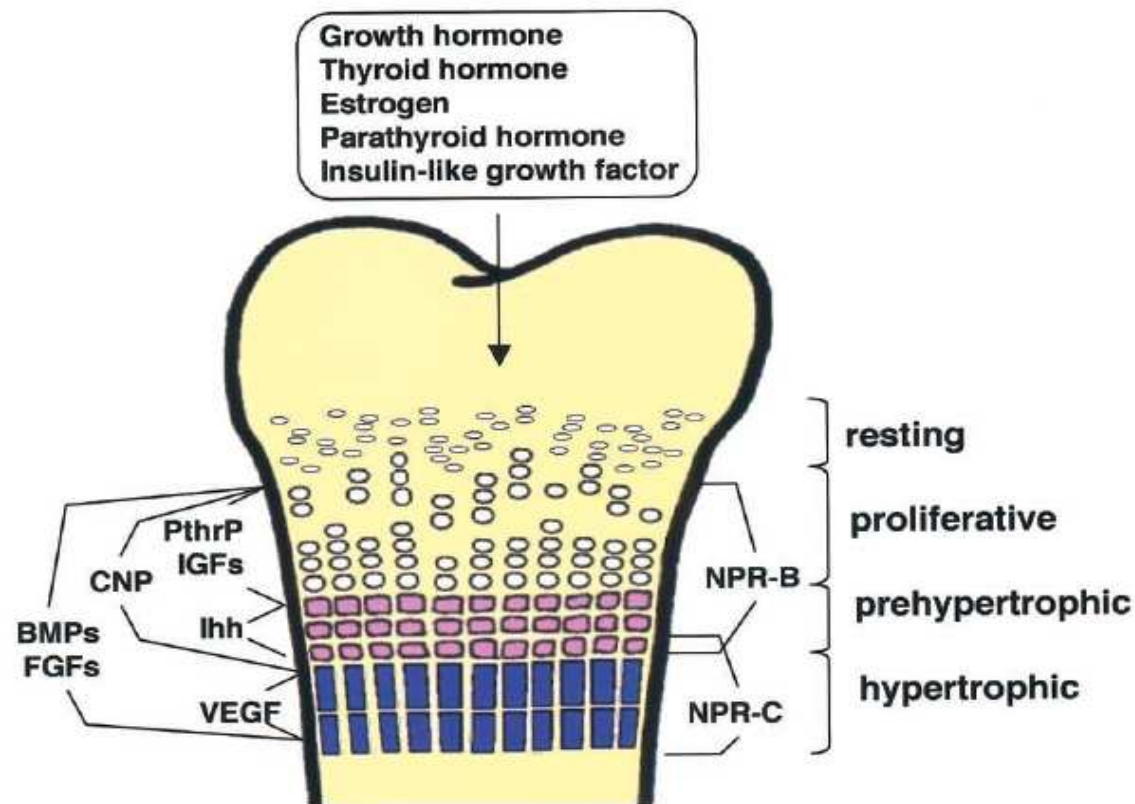
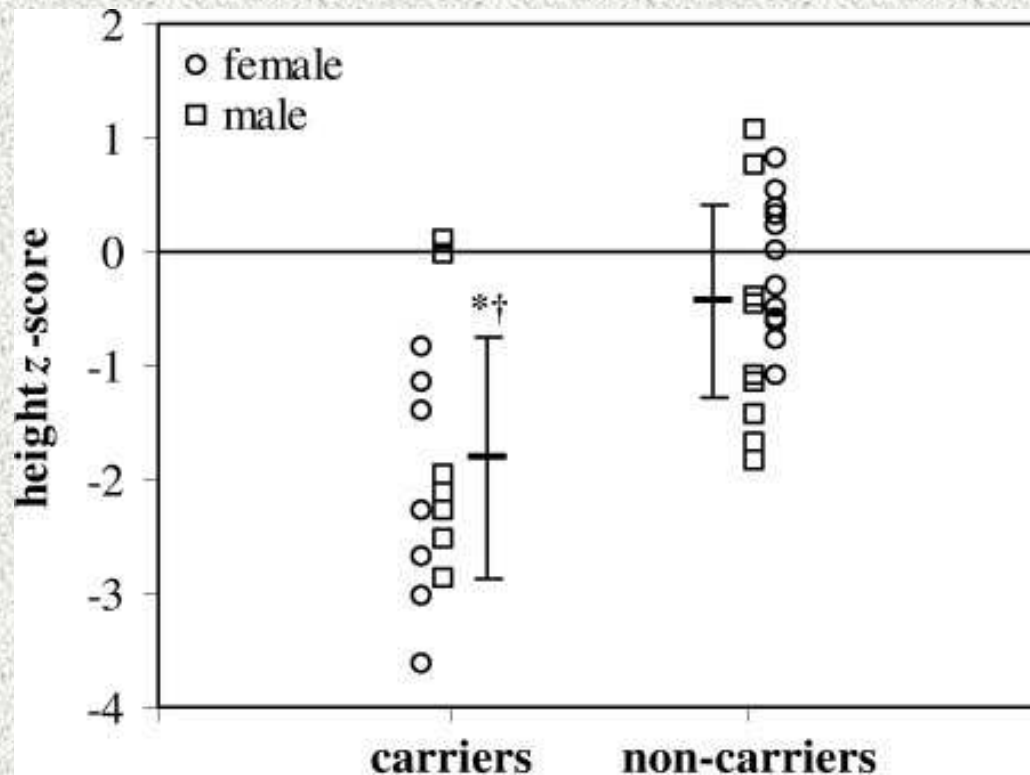


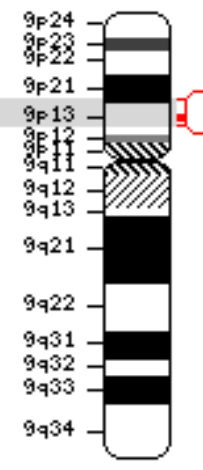
Figure 1 Schematic depiction of an endochondral growth plate, with resting, proliferative, prehypertrophic, and hypertrophic zones noted. Ligands or ligand families known to regulate endochondral growth (e.g., IGF, FGF, and BMP) are shown at left. Note that CNP is expressed by proliferative and prehypertrophic chondrocytes. Sites of expression of the two CNP receptors are shown at right. NPR-B is expressed in proliferative and prehypertrophic chondrocytes, whereas NPR-C is expressed in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. Systemic growth factors are noted above. Although some interactions between secreted growth factors are known (see, e.g., Minina et al. 2002), the interplay between most endocrine- and paracrine-signaling systems is still not delineated.

Mutazione in eterozigosi del gene NPR2 e bassa statura nell'uomo

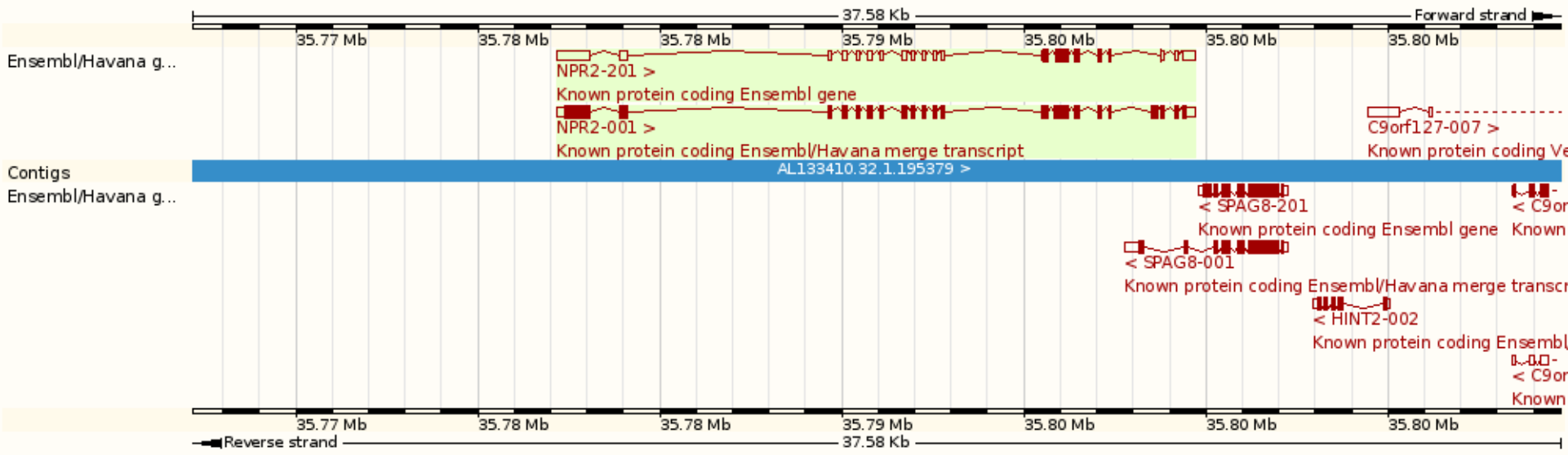
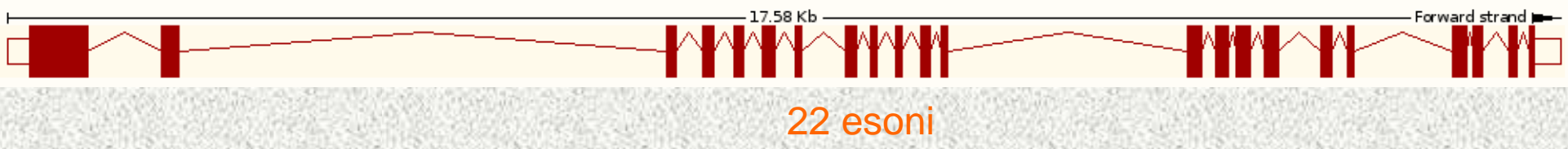
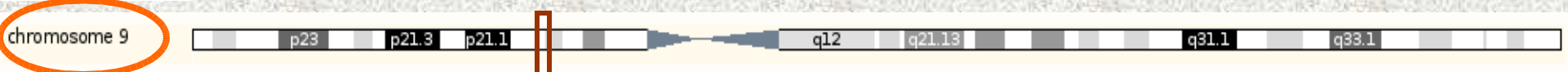


Olney RC et al. J Clin Endocrinol Metab 2006

Ideogram



NPR-B: Recettore del Peptide Natriuretico di Tipo B



MATERIALI E METODI

Casistica: 70 soggetti di bassa statura (22 dall'unità di Parma, 25 da Messina e 23 da Bari) e 46 soggetti con statura normale reclutati dal Centro di Parma.

Sono stati ad oggi studiati

34 soggetti con bassa statura idiopatica

Età: 10.83 anni \pm 4,9

peso alla nascita: 2987,65 gr \pm 538

BMI: 17,27 \pm 3,04

Ht SDS*: -2,7 \pm 0,6

13 controlli

Età: 8,45 anni \pm 2,9

peso alla nascita: 2897 gr \pm 448

BMI: 17,7 \pm 0,46

Ht SDS*: 0,07 \pm 0,95

*p <. 0,0005 (t=11,4)

Risultati

Esone	WT	Mutazione	Gruppo	c.DNA	Proteina
2	G	K	Bassa Statura	c.873+13 C>A;	Nessuna variazione
18	G	T	32% dei Soggetti di Bassa Statura 38% dei Soggetti di Controllo	c.2713insT	
22	-	G	Controllo	c.3080insG; 1057STOP CODON	

CONCLUSIONI (1)

- La mutazione identificata nell'esone 2 del paziente con bassa statura non determina variazioni nella sequenza aminoacidica.
- L'inserzione di timina identificata per l'esone 18 sia nel gruppo di controllo sia nei soggetti di bassa statura non mostra una distribuzione significativamente diversa ($p < 0,486$). Non sembrerebbe quindi attribuibile un significato patologico a tale polimorfismo.
- La mutazione identificata nell'esone 22 del paziente di controllo determina un allungamento della catena peptidica di 9 amminoacidi ma, data la sua posizione terminale potrebbe non avere conseguenze cliniche.

Risultati

Esone	WT	Mutazione	Gruppo	c.DNA	Proteina
2	G	K	Bassa Statura	c.873+13 C>A;	Nessuna variazione
16	C	T	Bassa Statura	c.2489 C>T	p.A830V
18	G	T	32% dei Soggetti di Bassa Statura 38% dei Soggetti di Controllo	c.2713insT	
22	-	G	Controllo	c.3080insG; 1057STOP CODON	

CONCLUSIONI (2)

- La mutazione in omozigosi c.2489 C>T, individuata nell'esone 16 del paziente di bassa statura, non è mai stata descritta in precedenza.
- La mutazione determina nella sequenza aminoacidica l'inserimento in posizione 830 di Valina al posto di Alanina; sono entrambi amminoacidi idrofobici. Ulteriori indagini e confronti sulla struttura terziaria permetteranno di capire gli effetti della mutazione.

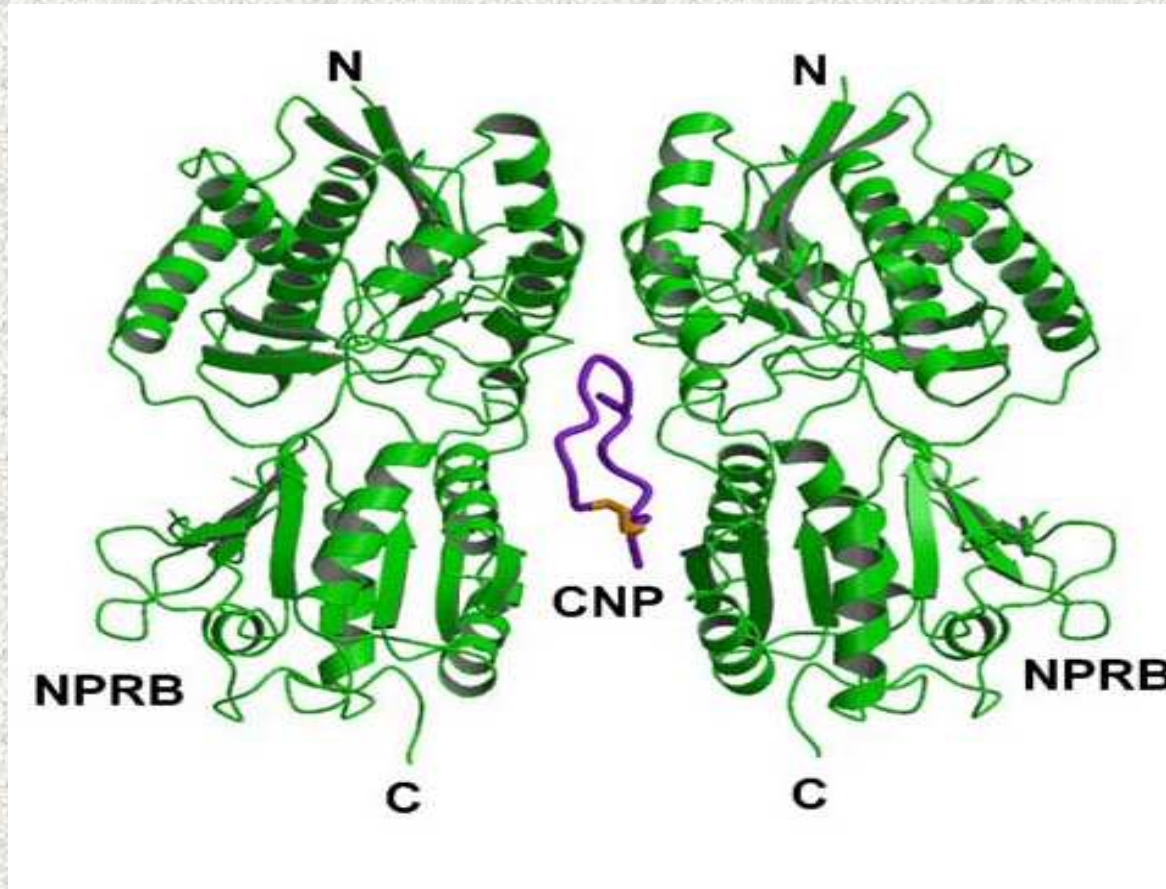
CONCLUSIONI (3)

- Se la mutazione in omozigosi c.2489 C>T, individuata nell'esone 16 del paziente di bassa statura fosse clinicamente significativa potremmo affermare che il 2,9% delle basse stature idiopatiche può essere dovuto a tale mutazione e ciò corrisponde al calcolo teorico del lavoro di Olney del 3,3%

Cattedra di Pediatria



Interazione del Recettore NPRB col Peptide Natriuretico (CNP)

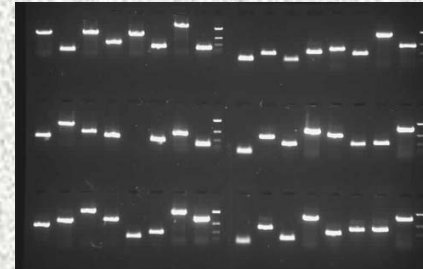


MATERIALI E METODI (2)

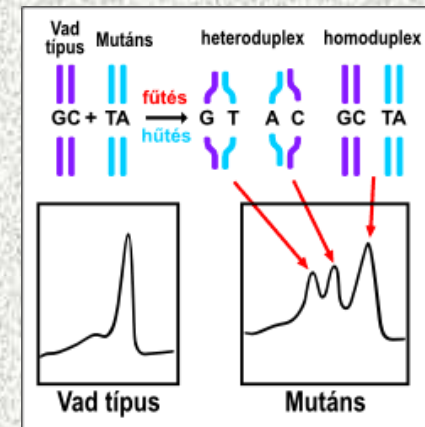
METODICHE UTILIZZATE



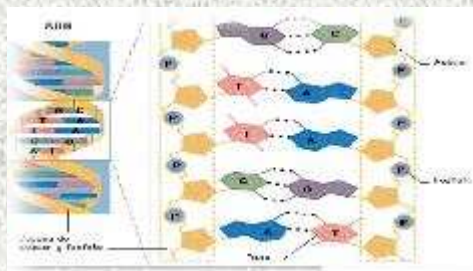
PCR (Polymerase Chain Reaction)



Screening di mutazione con DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)



Mutációdektálás Transgenomic WAVE rendszeren (részleteket lásd a szövegben)

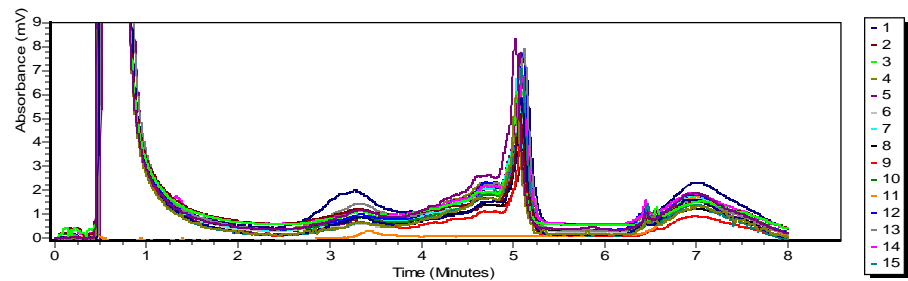


Sequenziamento degli esoni risultati mutati

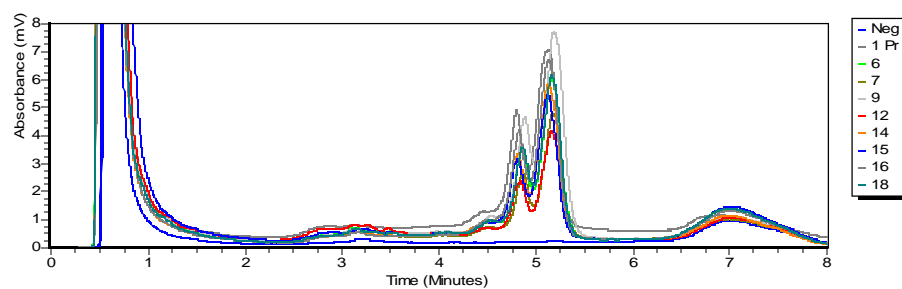
DHPLC

(Denaturino High Performance Liquid Chromatography)

Nessuna mutazione individuata



Eteroduplex che individua la mutazione

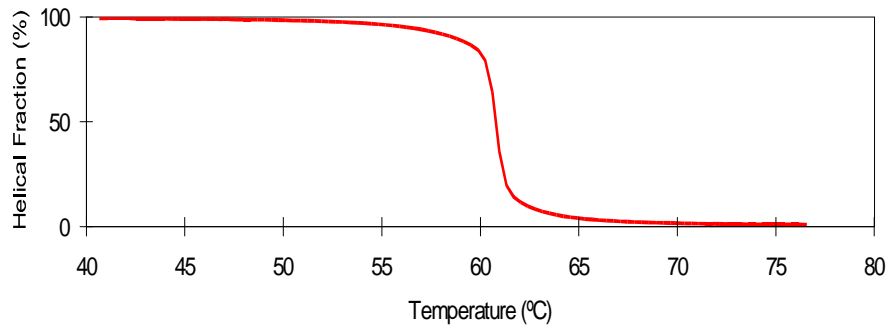


Esempio di individuazione della mutazione

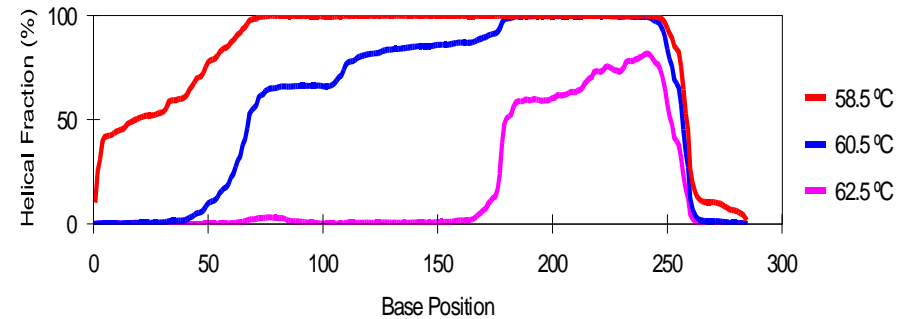
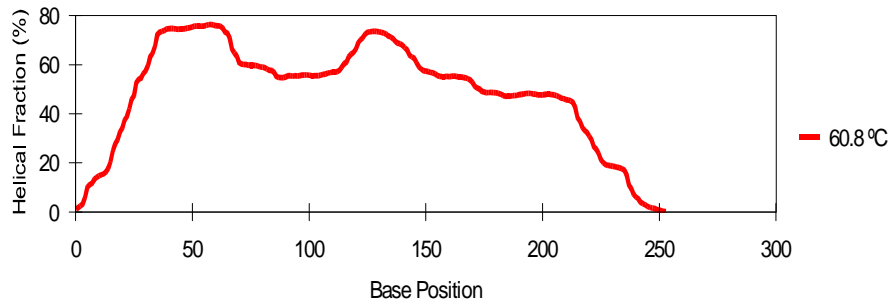
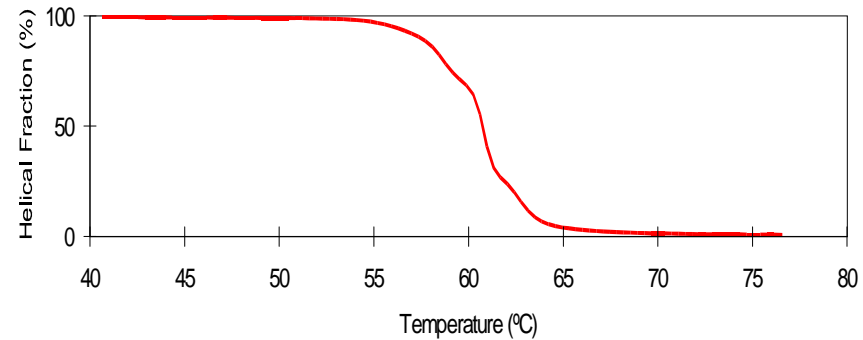
Analisi con DHPLC

(Denaturino High Performance Liquid Chromatography)

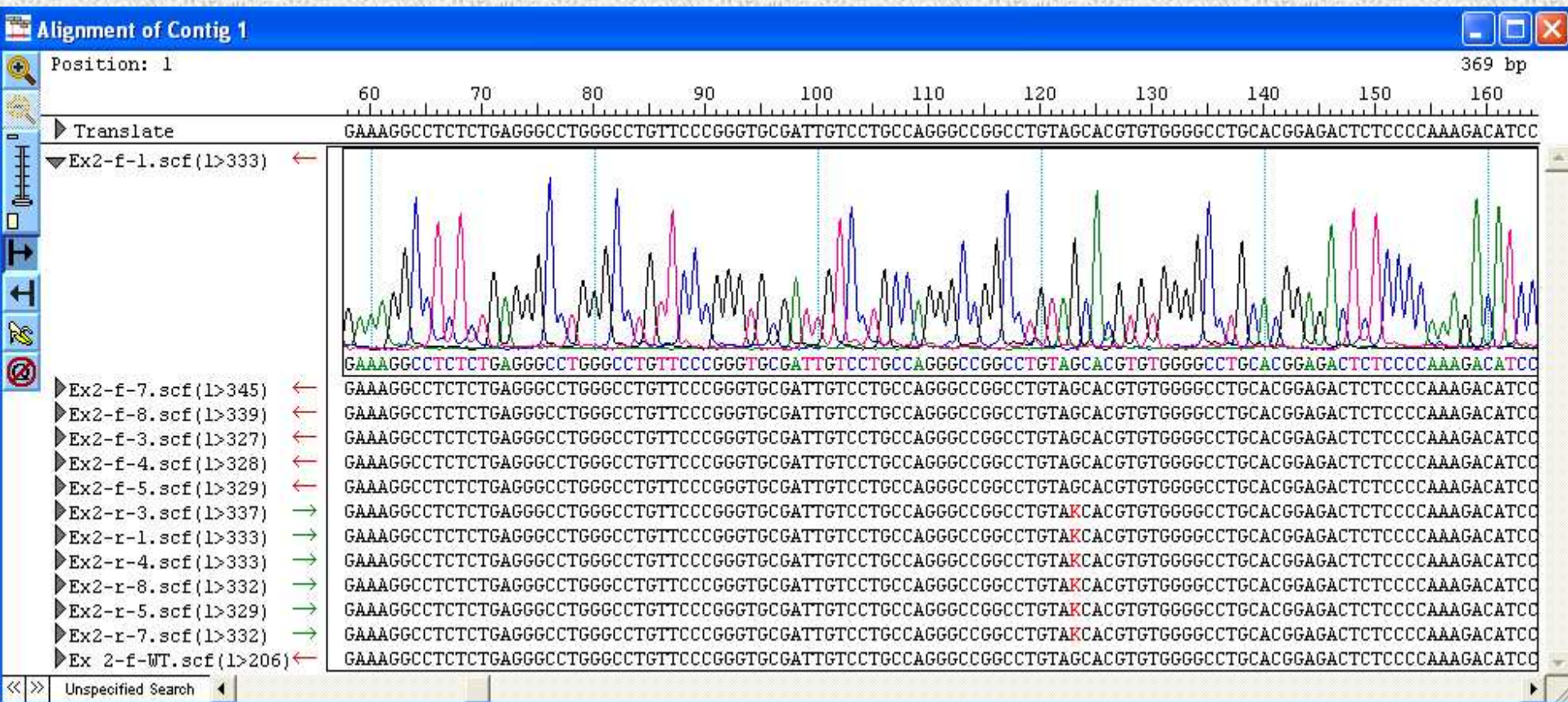
Esone 4: 1 temperatura



Esone 13: 3 temperature

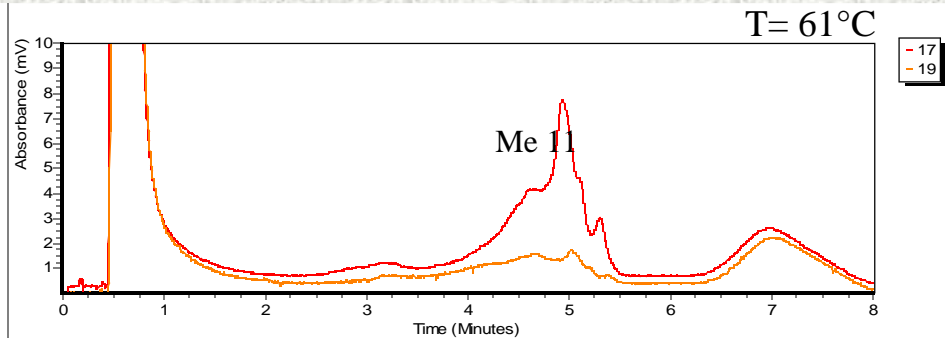
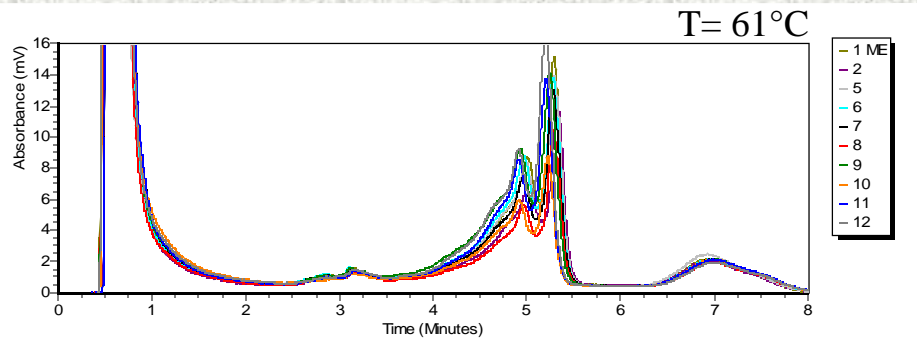


Due esempi di analisi di esoni con DHPLC: il software produce la curva di denaturazione in cui è visibile il punto di flesso in corrispondenza della temperatura di denaturazione. Per alcuni esoni è sufficiente una temperatura sola per aprire l'intero tratto di DNA, per altri sono necessarie più temperature.

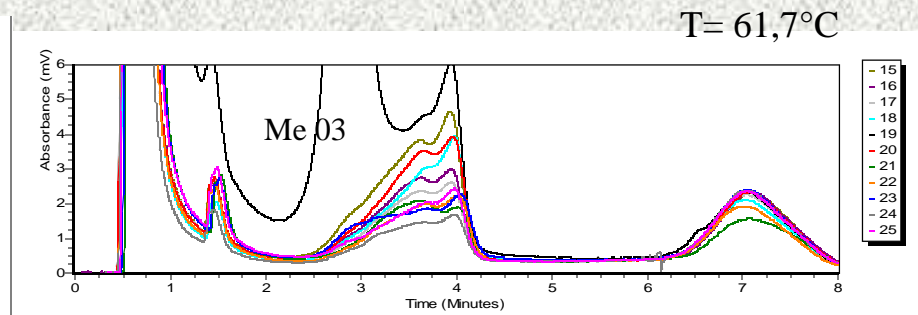
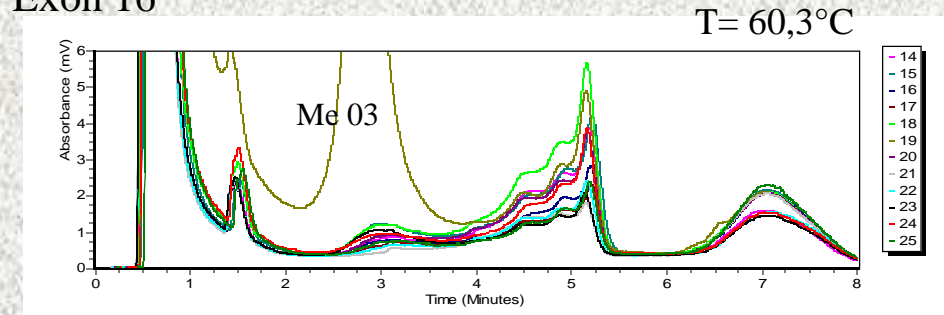


Esempio di sequenziamento con polimorfismo individuato

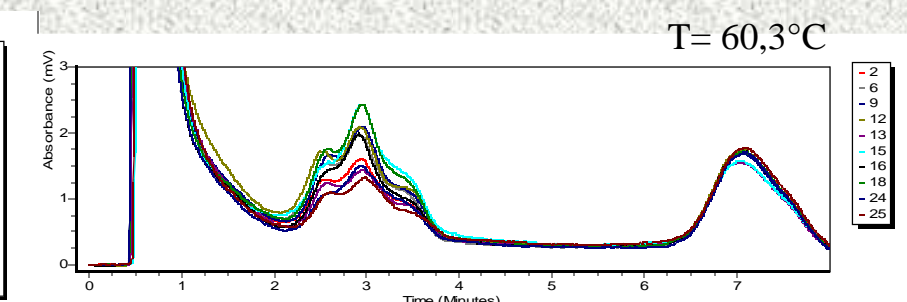
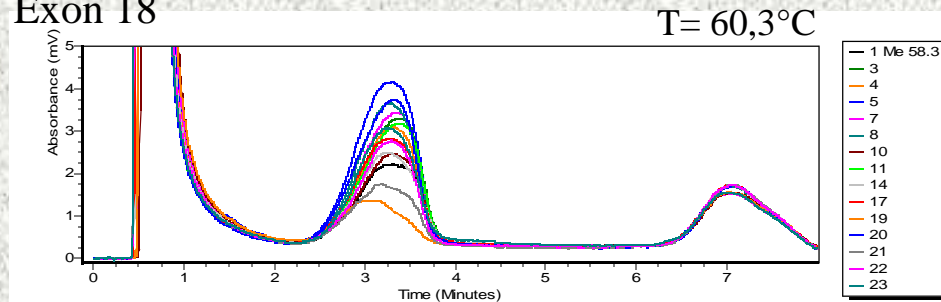
Exon 2



Exon 16



Exon 18



Exon 22

