

Perché l'identificazione dei determinanti delle malattie ereditarie poligeniche è difficile? Un esercizio di enzimologia.

Andrea Bellelli (<http://biochimica.bio.uniroma1.it/bellelli.htm>)

Alcune malattie umane importanti, anche relativamente comuni presentano una ovvia familiarità ma non obbediscono alle leggi della trasmissione mendeliana dominante o recessiva, autosomica o legata al sesso. Queste malattie sono identificate come poligeniche, sebbene non sia stato chiaramente individuato nessuno specifico pattern genetico in grado di produrle. Esempi di malattie poligeniche sono la depressione maggiore e la schizofrenia, nelle quali la concordanza tra consanguinei di primo grado è circa il 10% e tra gemelli omozigoti circa il 50%, a fronte di una prevalenza nella popolazione dell'1-3%.

Sebbene sia ovviamente difficile identificare i determinanti di una malattia poligenica, una quantificazione di questa difficoltà non è stata tentata. In questo studio viene presentato un semplicissimo modello di system biology che, senza avere la pretesa di descrivere uno specifico caso, illustra un possibile meccanismo attraverso il quale una malattia poligenica potrebbe eludere la diagnosi basata sulle comuni indagini di laboratorio, anche se condotte su campioni molto estesi.

LO SCHEMA DI REAZIONE

Il modello della patogenesi di una ipotetica malattia poligenica è schematizzato nella serie di reazioni metaboliche:



La sostanza A è un mediatore chimico presente fisiologicamente ad una concentrazione costante ed è prodotta con flusso variabile in una reazione di ordine zero con costante cinetica k_0 ; la sua concentrazione è mantenuta costante da un meccanismo di regolazione a feedback negativo che agisce su k_0 .

A viene degradato dall'enzima E_1 in una reazione che segue lo schema di Michaelis e Menten con le costanti V_{max_1} e K_{m_1} ed il prodotto della reazione è il metabolita B.

La sostanza B viene degradata in una reazione irreversibile dall'enzima E_2 che anch'esso segue uno schema di Michaelis e Menten con le costanti V_{max_2} e K_{m_2} .

RELAZIONE TRA BIOCHIMICA E PATOLOGIA

In che modo lo schema di reazione proposto può essere correlato alla patogenesi di una malattia genetica ?

Per spiegare una correlazione di questo tipo basta ipotizzare che la sostanza B, il metabolita intermedio nel processo di degradazione di A, al di sopra di una concentrazione soglia eserciti un effetto tossico su alcune cellule o tessuti rendendosi quindi responsabile della malattia. Che questa ipotesi patogenetica sia plausibile è dimostrato da molte malattie metaboliche ereditarie ben note (in genere monogeniche a trasmissione mendeliana) quali ad esempio la fenilchetonuria.

Per contro la sostanza C, metabolita terminale di A, viene semplicemente escreta e nel nostro modello non si accumula né esercita alcuna azione dannosa sull'organismo.

CALCOLO DELLA CONCENTRAZIONE DI B

Dalle premesse del modello biochimico e patogenetico consegue che il parametro essenziale per causare (deterministicamente o probabilisticamente) la malattia è la concentrazione di B, che supponiamo essere costante, in quanto il sistema si trova in una condizione di stato stazionario.

Le equazioni cinetiche differenziali che calcolano le concentrazioni dei metaboliti sono le seguenti:

$$d[A] / dt = k_0 - \frac{[A]V_{\max 1}}{[A]+K_{m1}} \quad [1]$$

$$d[B] / dt = \frac{[A]V_{\max 1}}{[A]+K_{m1}} - \frac{[B]V_{\max 2}}{[B]+K_{m2}} \quad [2]$$

$$d[C] / dt = \frac{[B]V_{\max 2}}{[B]+K_{m2}} \quad [3]$$

Nella condizione di stato stazionario si ha un flusso costante di A e B, mentre C viene costantemente eliminato; pertanto le concentrazioni di A e B sono costanti nel tempo e le equazioni differenziali 1 e 2 possono essere uguagliate a zero. Come conseguenza si ottiene:

$$k_0 = [A]V_{\max 1}/([A]+K_{m1}) \quad [4]$$

$$[A]V_{\max 1}/([A]+K_{m1}) = [B]V_{\max 2}/([B]+K_{m2}) \quad [5]$$

Si nota che le due eq. 4 e 5 hanno un membro in comune e perciò tutti i membri risultano uguali, in accordo con l'approssimazione di stato stazionario; si deve inoltre ricordare che in questo modello [A] è costante per un meccanismo di regolazione a feedback negativo, mentre il valore della costante cinetica k_0 è variabile.

Dalle equazioni precedenti (qui riportate per comodità):

$$k_0 = [A]V_{\max 1}/([A]+K_{m1}) \quad [4]$$

$$\frac{[A]V_{\max 1}}{[A]+K_{m1}} = \frac{[B]V_{\max 2}}{[B]+K_{m2}} \quad [5]$$

si può ricavare la concentrazione di B a stato stazionario:

$$[B] = \frac{[A]V_{\max 1}}{[A]+K_{m1}} \cdot \frac{[B]+K_{m2}}{V_{\max 2}}$$

$$[B] \left(1 - \frac{[A] V_{\max 1}}{[A] V_{\max 2} + K_{m1}V_{\max 2}}\right) = \frac{[A]V_{\max 1}K_{m2}}{[A] V_{\max 2} + K_{m1}V_{\max 2}}$$

$$[B] = \frac{[A]V_{\max 1}K_{m2}}{[A] V_{\max 2} + K_{m1}V_{\max 2} - [A] V_{\max 1}} \quad [6]$$

E' opportuno riassumere la descrizione del sistema in questo modo:

- I parametri costanti sono [A] (la concentrazione di questo metabolita essenziale è regolata a feedback, per ipotesi); $V_{\max 1}$, K_{m1} , $V_{\max 2}$, K_{m2} .

- Le variabili del sistema sono [B] (il metabolita tossico, di nostro maggiore interesse), [C] (che però è irrilevante), e k_0 (la velocità con la quale A viene prodotto).

- Le variabili di rilievo sono anequivocamente definite alle equazioni 4 e 6:

$$k_0 = [A]V_{\max 1}/([A]+K_{m1}) \quad [4]$$

$$[B] = \frac{[A]V_{\max 1}K_{m2}}{[A] V_{\max 2} + K_{m1}V_{\max 2} - [A] V_{\max 1}} \quad [6]$$

Studiando l'eq. 6 si osserva che la concentrazione di B è direttamente proporzionale a K_{m2} e inversamente proporzionale a V_{max2} e a K_{m1} ; dipende in modo più complesso da V_{max1} che appare sia al numeratore che al denominatore della frazione:

$$[B] = \frac{[A]V_{max1}K_{m2}}{[A]V_{max2} + K_{m1}V_{max2} - [A]V_{max1}} \quad [6]$$

Tutte le variazioni dei parametri che causano un aumento di [B] sono potenzialmente patologiche.

Nel nostro modello semplicistico il termine [A] è assunto come costante nella popolazione e quindi non varia; per contro potrebbero essere presenti nella popolazione varianti alleliche degli enzimi E_1 ed E_2 e quindi dobbiamo considerare variabili K_{m1} , V_{max1} , K_{m2} e V_{max2} .

Se esiste nella popolazione una variante allelica non funzionale dell'enzima 2 (cioè con $V_{max2} = 0$), si ha una malattia Mendeliana recessiva (o con penetranza incompleta). Un esempio di questo caso è dato dalla fenilchetonuria.

La concentrazione del metabolita B in questo caso eguaglia formalmente il valore di K_{m2} ma questo parametro è indefinito (E_2 è inattivo) e pertanto B si accumula finché non interviene qualche meccanismo di degradazione alternativo (spesso la semplice escrezione urinaria).

Più interessante è invece il caso seguente: nella popolazione esistono due varianti alleliche meno attive di E_1 ed E_2 , che possiamo chiamare rispettivamente e_1 ed e_2 .

E' immediatamente evidente che, essendo costante $[A]$, si danno due casi estremi:

- l'omozigote "fortunato" $e_1 e_1 / E_2 E_2$ produce lentamente B e lo degrada rapidamente; pertanto presenta il più basso valore di $[B]$ ed è protetto dai suoi effetti patogeni;

- l'omozigote "sfortunato" $E_1 E_1 / e_2 e_2$ produce rapidamente B e lo degrada lentamente, quindi presenta il più alto valore di $[B]$ ed è esposto al rischio di contrarre la malattia.

Gli eterozigoti si trovano evidentemente in condizioni di rischio intermedie tra i due casi estremi.

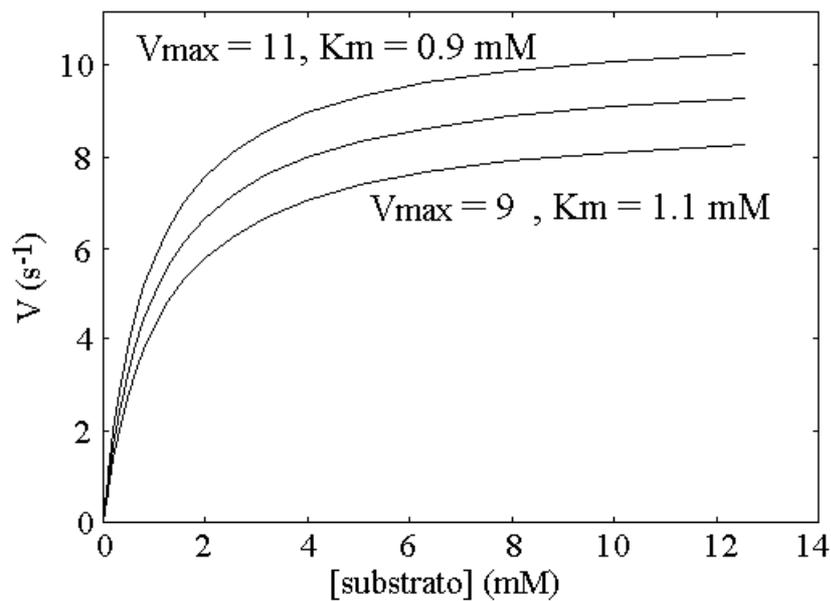
Le moderne tecniche di analisi genetica ci consentono di individuare facilmente la presenza delle varianti alleliche E_1 / e_1 ed E_2 / e_2 .

Il problema che ci interessa è il seguente: è possibile che E_1 ed e_1 (o E_2 ed e_2) differiscano tra loro nei parametri di stato stazionario K_m e V_{max} abbastanza poco da sembrare indistinguibili al laboratorio e ciononostante abbastanza da causare variazioni grandi nella concentrazione del metabolita tossico B ?

Ovvero, quanto deve essere grande la differenza tra i valori di K_m e V_{max} delle isoforme più attiva e meno attiva di ciascun enzima perché si abbiano variazioni significative di $[B]$?

In linea di massima la precisione con la quale possiamo determinare i parametri di stato stazionario di un enzima è limitata ed un margine di errore di $\pm 10\%$ è ottimistico.

Simulazione di una curva di stato stazionario
con il suo intervallo di confidenza



Le principali ragioni della limitata precisione con cui possono essere misurati i parametri di stato stazionario sono le seguenti:

- V_{max} è pari al prodotto $k_{\text{cat}}[E]_{\text{tot}}$; oltre all'errore sperimentale sulla determinazione della k_{cat} si ha evidentemente quello sulla concentrazione totale dell'enzima che deve essere purificato da un materiale biologico eterogeneo e anche nella preparazione finale non corrisponde al 100% della proteina totale.

- K_m è indipendente dalla concentrazione dell'enzima, ma soffre degli errori sulla misura della concentrazione del substrato che può essere più o meno precisa in funzione di vari parametri (solubilità, purezza, affinità per le pareti del recipiente, etc.).

Poiché è ragionevole attendersi un errore almeno pari a $\pm 10\%$ nella determinazione dei parametri di stato stazionario, è possibile usare le equazioni 4 e 6 per determinare le concentrazioni attese dei metaboliti A, B e C nei diversi tipi di omozigoti (per gli eterozigoti sono necessarie equazioni un po' più complesse).

Per fare questo occorre fissare dei valori almeno nominali per i diversi parametri e assumere qualcosa sulle concentrazioni degli enzimi implicati. Le assunzioni più banali sono le seguenti:

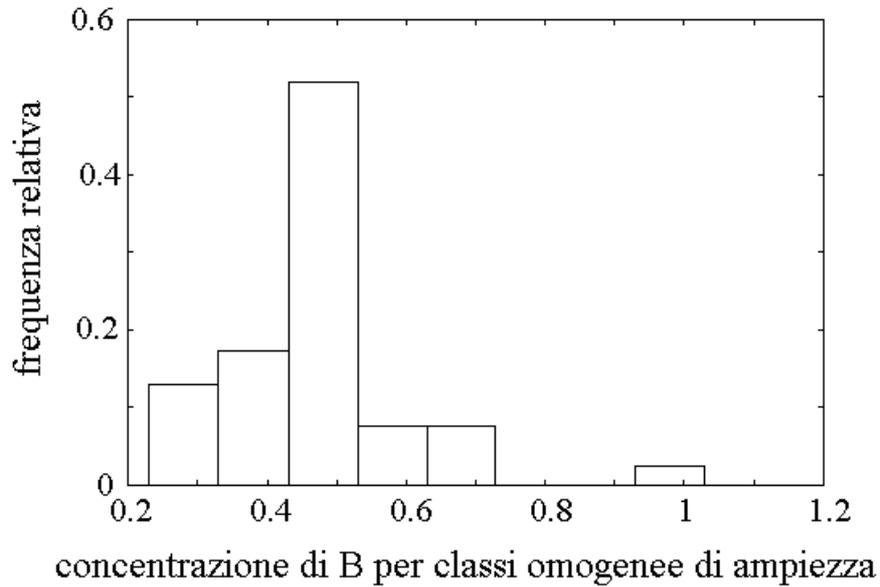
- Fissiamo rispettivamente V_{max} a 11 e 9 e K_m a 0.9 e 1.1 per le varianti alleliche più attiva e meno attiva di entrambi gli enzimi (corrispondono a 10 e 1 $\pm 10\%$).
- Assumiamo che le due varianti alleliche dello stesso enzima siano espresse allo stesso modo; cioè la mutazione non causa aumento o diminuzione dell'espressione del gene.

I valori dei parametri di interesse possono essere tabulati (tabella 1). La concentrazione di B è indipendente dalle frequenze geniche ipotizzate (in tabella: $E_1 = 0.4$; $E_2 = 0.6$).

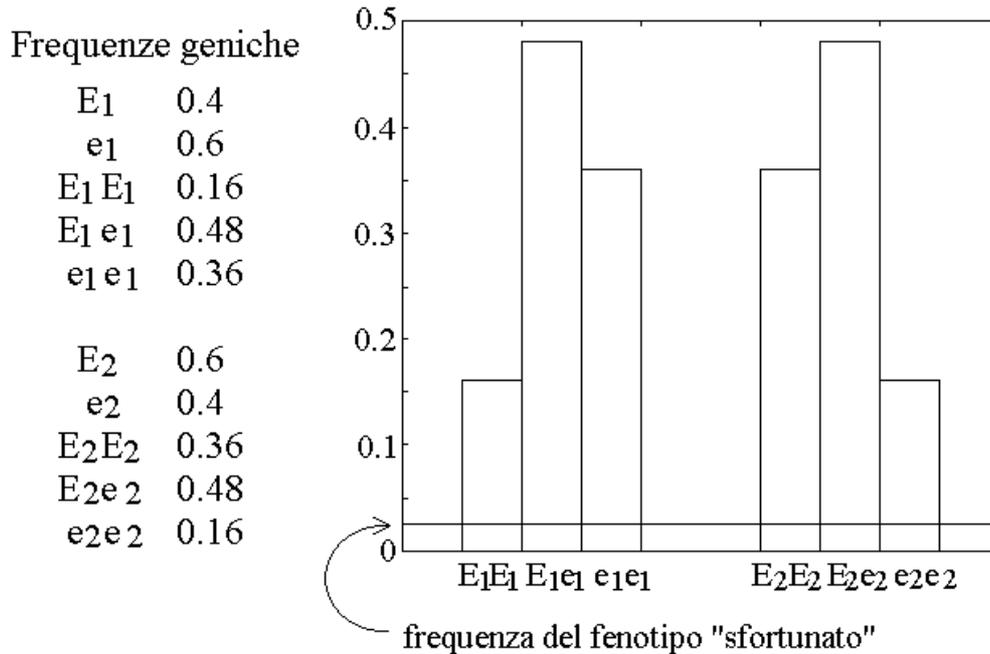
Tabella 1: frequenze geniche e concentrazione di B.

genotipo	frequenza	k_0	V_{max1}	K_{m1}	V_{max2}	K_{m2}	[A]	[B]
$E_1E_1 - E_2E_2$	0.0576	5.79	11.0	0.90	11.0	0.45	1.0	0.50
$E_1E_1 - E_2e_2$	0.0768	5.79	11.0	0.90	10.0	0.49	1.0	0.55
$E_1E_1 - e_2e_2$	0.0256	5.79	11.0	0.90	9.0	0.55	1.0	0.99
$E_1e_1 - E_2E_2$	0.1728	5.04	10.0	0.99	11.0	0.45	1.0	0.38
$E_1e_1 - E_2e_2$	0.2304	5.04	10.0	0.99	10.0	0.49	1.0	0.50
$E_1e_1 - e_2e_2$	0.0768	5.04	10.0	0.99	9.0	0.55	1.0	0.70
$e_1e_1 - E_2E_2$	0.1296	4.29	9.0	1.10	11.0	0.45	1.0	0.29
$e_1e_1 - E_2e_2$	0.1728	4.29	9.0	1.10	10.0	0.49	1.0	0.45
$e_1e_1 - e_2e_2$	0.0576	4.29	9.0	1.10	9.0	0.55	1.0	0.50

Distribuzione di [B] nella popolazione
(dai dati della Tabella 1)



La frequenza del fenotipo "sfortunato" non correla con nessuna delle frequenze dei genotipi dei singoli geni !



Conclusioni e implicazioni

- 1) Anche in un percorso metabolico minimale con due sole reazioni e tre metaboliti, differenze piccole dei parametri funzionali degli enzimi coinvolti portano ad ampie fluttuazioni delle concentrazioni degli intermedi metabolici.
- 2) Varianti alleliche dello stesso enzima, identificabili con tecniche di analisi genetica, che presentino differenze tanto piccole nei parametri funzionali da risultare indistinguibili alla usuale caratterizzazione biochimica, possono portare a fenotipi caratterizzati da grandi differenze nella concentrazione dei metaboliti.
- 3) La frequenza dei fenotipi estremi correla con quella di specifiche associazioni di alleli, ma non con le frequenze di ciascun allele singolarmente considerato.

Quanto è grande la differenza di concentrazione di B tra il fenotipo "fortunato" e quello "sfortunato" ?

I valori di 0.29 mM e 0.99 mM presentano una differenza piuttosto significativa: ad esempio la concentrazione del glucosio nel sangue delle persone sane è normalmente compresa tra 70 e 110 mg/100 mL; un valore pari al triplo del valore minimo (210 mg/100 mL) sarebbe considerato indice di una condizione diabetica grave.