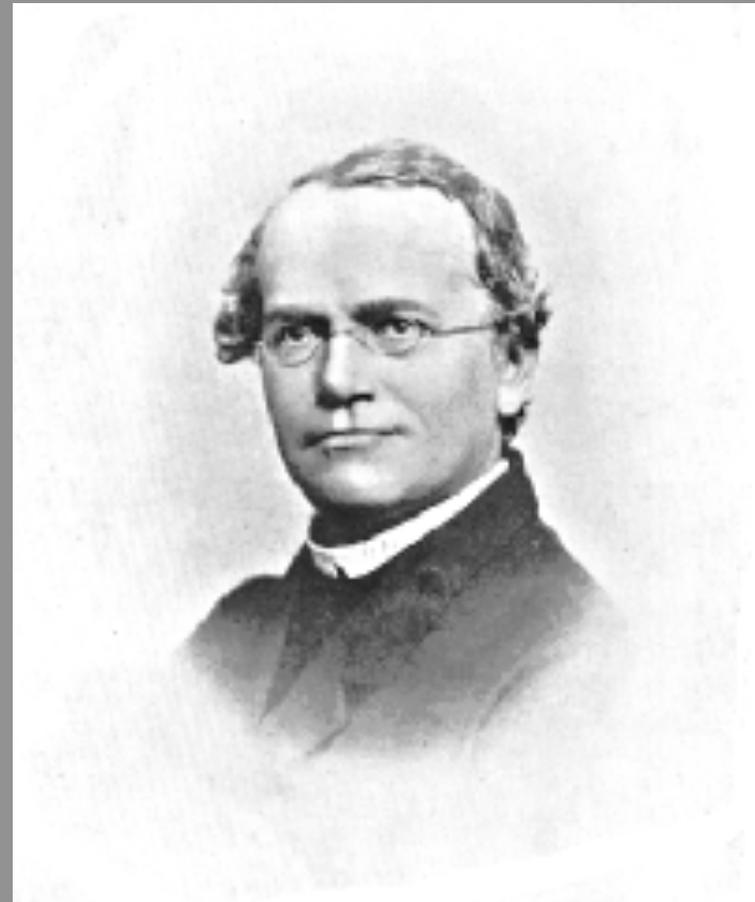


“...il progresso dello spirito umano consiste, o certo ha consistito finora, non nell’imparare ma nel disimparare principalmente, nel conoscere sempre più di non conoscere, nell’avvedersi di saper sempre meno, nel diminuire il numero delle cognizioni, restringere l’ampiezza della conoscenza umana. Questo è veramente lo spirito e la sostanza principale dei nostri progressi dal 1700 in qua, benché non tutti, anzi non molti, se ne avveggano”.

(G. Leopardi, *Zibaldone*, Bologna, 28 luglio 1826)

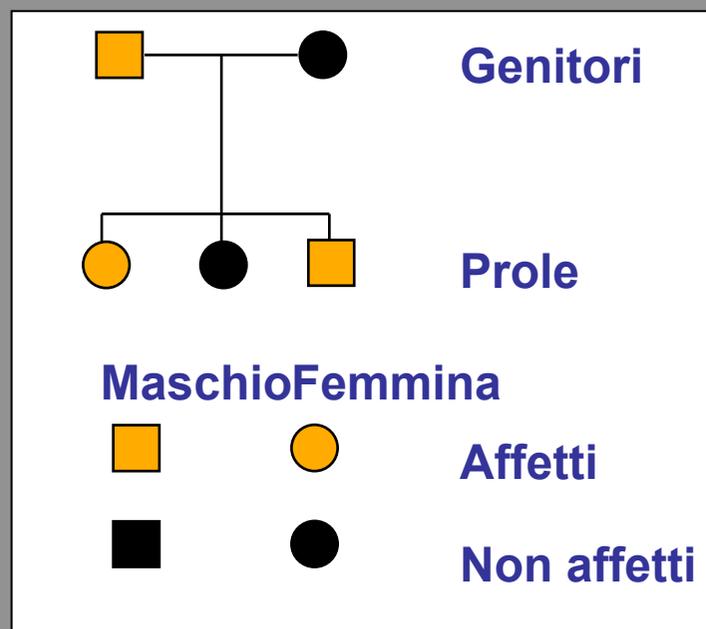
Le malattie monofattoriali o semplici o mendeliane

- Un rapido ricordo delle nozioni passate
- un po' di esempi su alcune malattie più frequenti



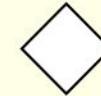
PEDIGREE

- Il pedigree e' la descrizione delle relazioni tra gli individui di una famiglia
- I pedigree sono di solito indicati graficamente usando simboli standard



**Male Female Sex unknown
or unspecified**

Unaffected individual



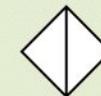
Individual affected
with trait



Obligate carrier
(carries the gene but
does not have the trait)



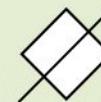
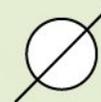
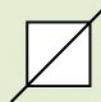
Asymptomatic carrier
(unaffected at this time
but may later exhibit trait)



Multiple individuals (5)

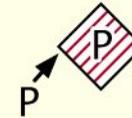
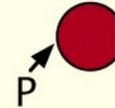
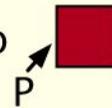


Deceased individual



**Male Female Sex unknown
or unspecified**

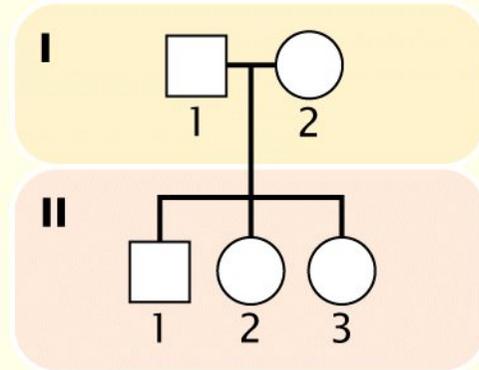
Proband (first affected family member coming to attention of geneticist)



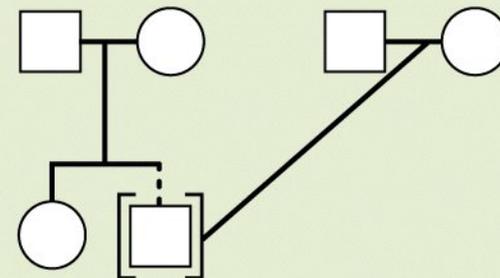
Family history of individual unknown



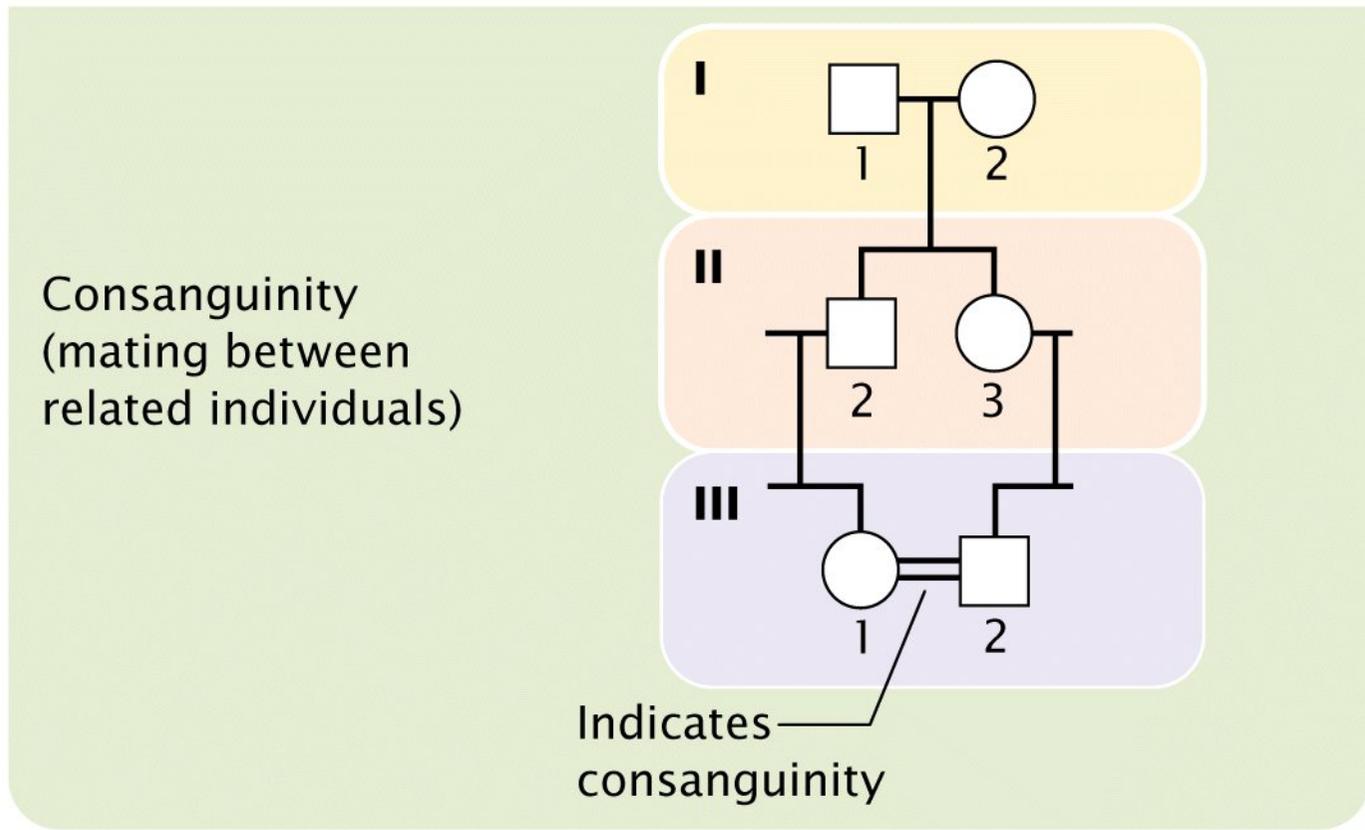
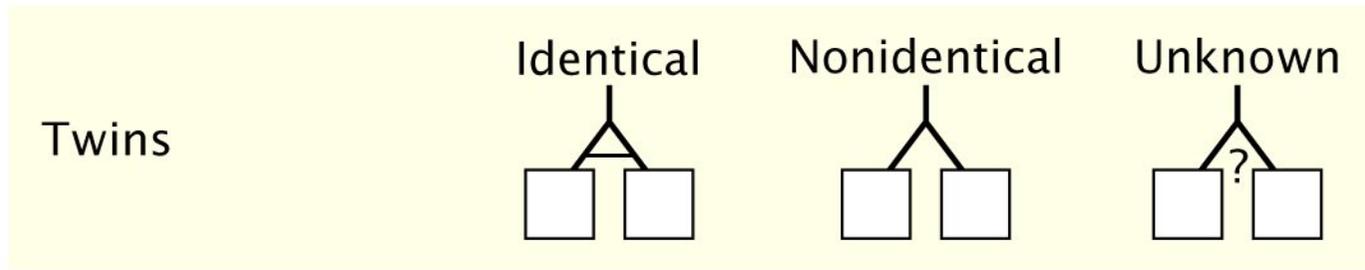
Family—
parents and three children: one boy and two girls in birth order



Adoption (brackets enclose adopted individuals. Dashed line denotes adoptive parents; solid line denotes biological parent)

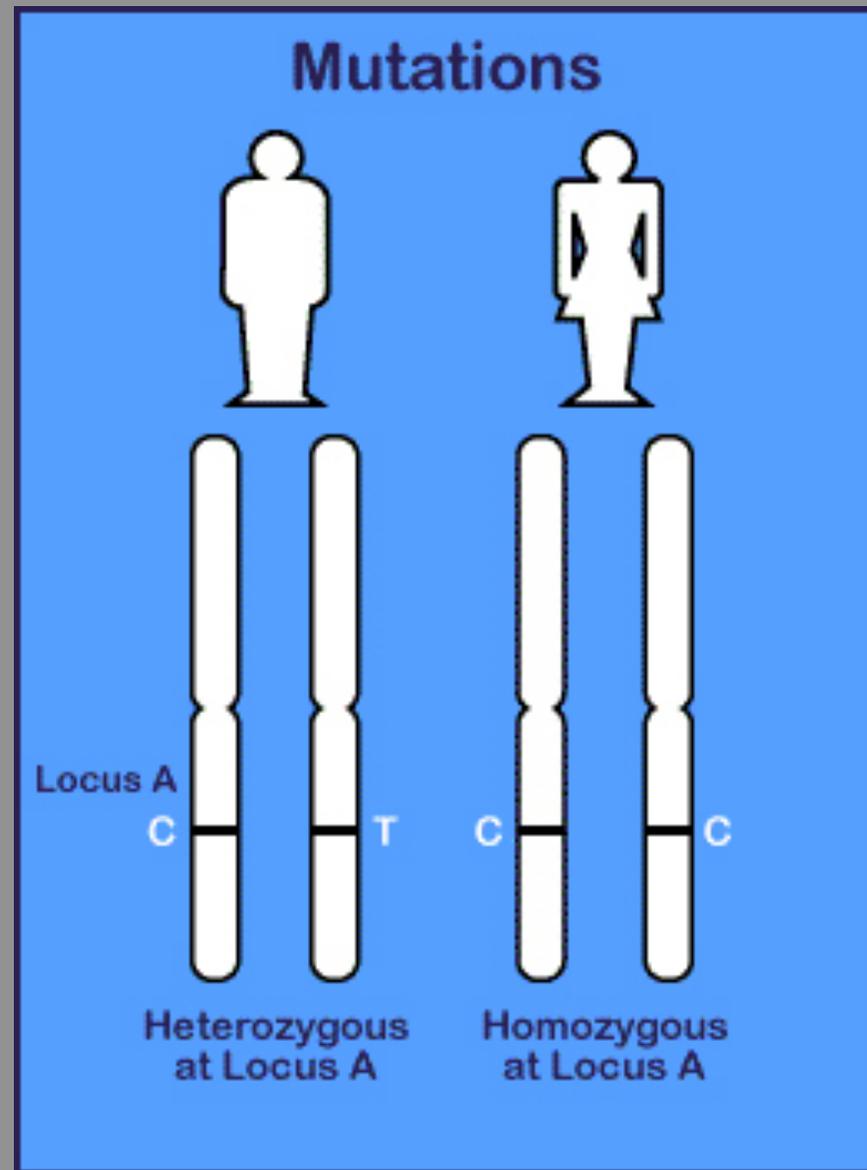


**Male Female Sex unknown
or unspecified**



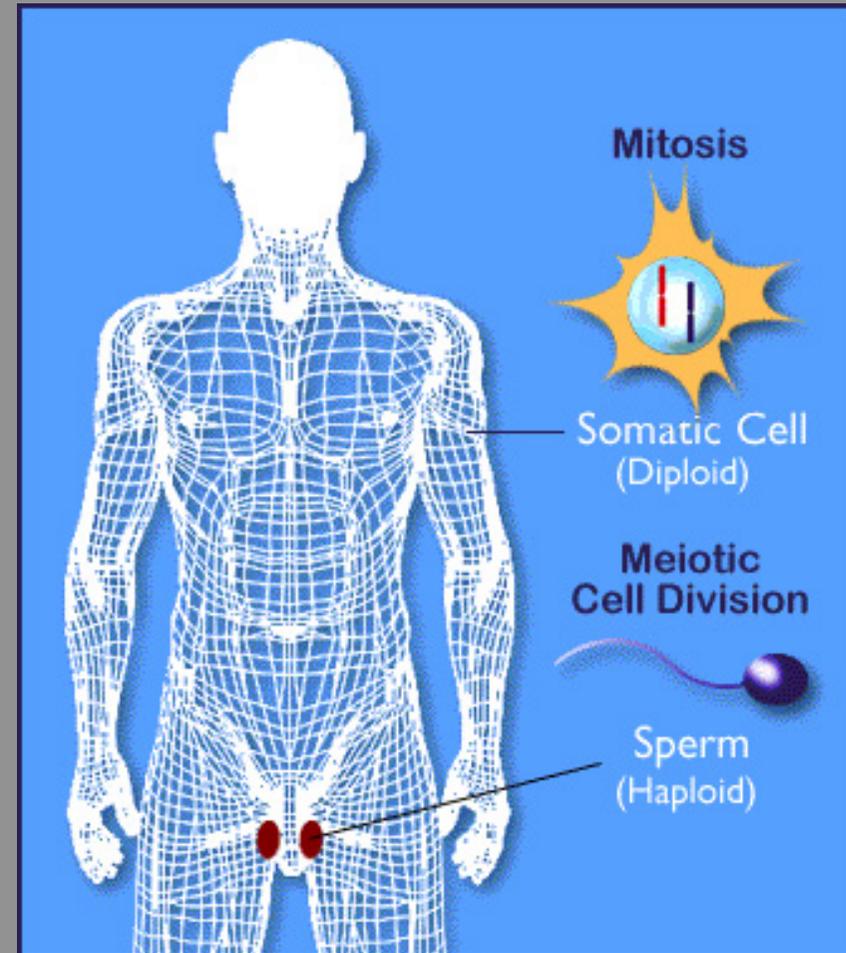
gene	sequenza di basi di DNA che dirige la sintesi di una specifica catena polipeptidica
locus genetico	specifica posizione di un gene su un cromosoma
allele	forme alternative di un gene
omozigotità	alleli identici ad un dato locus
eterozigotità	alleli differenti ad un dato locus
genotipo	costituzione genetica di un individuo
fenotipo	il risultato osservabile dell'interazione del genotipo con i fattori ambientali
autosomico	locus presente su uno dei 22 cromosomi
X-linked	locus presente sul cromosoma X
dominante	carattere che si esprime anche negli individui eterozigoti per quell'allele
recessivo	carattere che necessita della presenza di entrambi gli alleli per essere espresso

- **Mutazione**: alterazione della sequenza nucleotidica di una molecola di DNA
- **Eterozigote**: individuo con alleli diversi allo stesso locus (**Aa**)
- **Omozigote**: individuo con alleli identici ad uno stesso locus (**AA** o **aa**)



MUTAZIONI SOMATICHE E MUTAZIONI GERMINALI

- **Linea germinale:** le cellule che danno origine ai gameti (spermatozoi e ovuli). Le mutazioni nelle cellule della linea germinale verranno ereditate dalla generazione successiva
- **Linea somatica:** le cellule che danno origine ai tessuti e organi. Le mutazioni nelle cellule della linea somatica non vengono trasmesse alle generazioni successive



Eredità Mendeliana

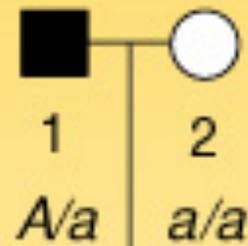
- I geni sono ereditati in coppia (uno dal padre e l'altro dalla madre)
- Ogni gene possiede diversi alleli, alcuni dei quali (**dominanti**) agiscono su altri (**recessivi**)
- Alla meiosi gli alleli segregano singolarmente ed indipendentemente nei gameti (I legge di Mendel)

Le modalità di trasmissione dei caratteri mendeliani

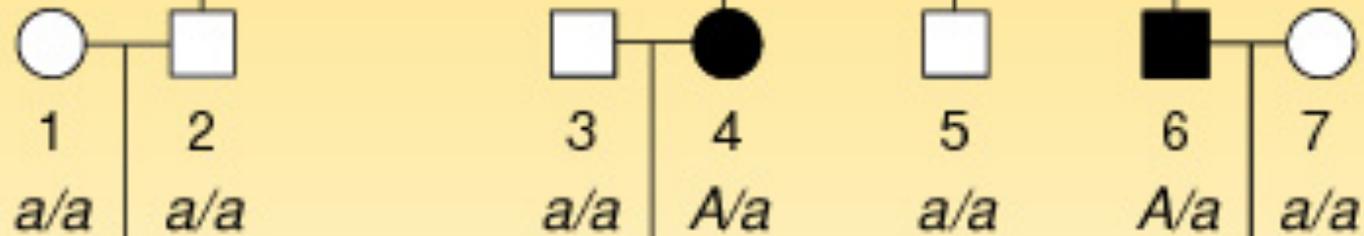
1. Autosomica dominante
2. Autosomica recessiva
3. Recessiva legata al cromosoma X
4. Dominante legata al cromosoma X
5. Legata al cromosoma Y

Eredità autosomica dominante

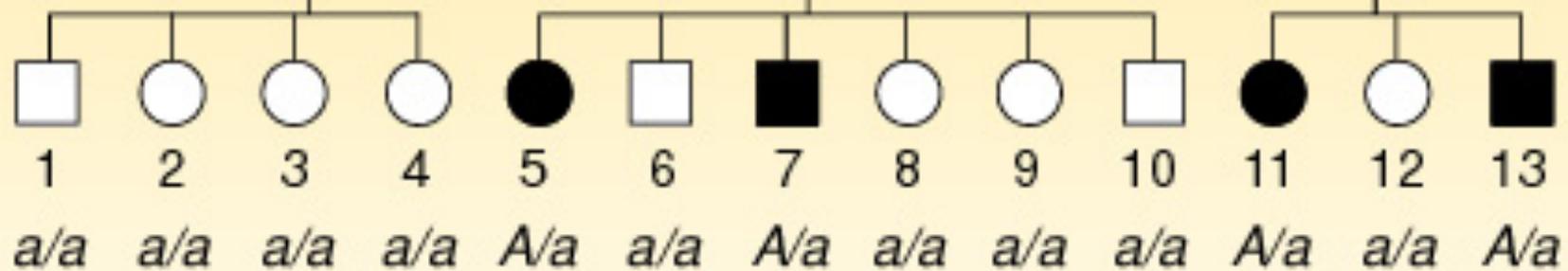
I



II

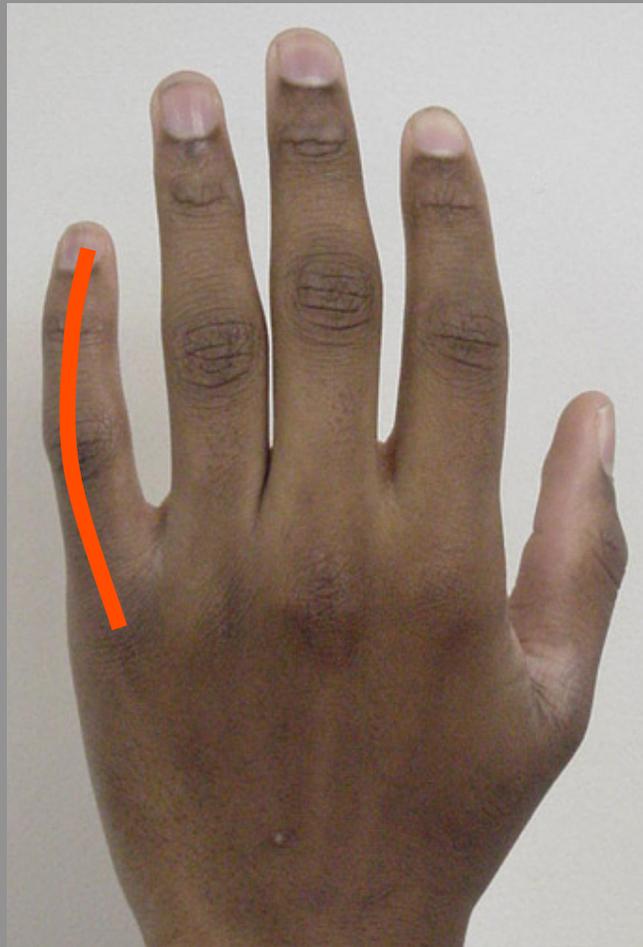


III



Tratti dominanti

Avere il dito migliolo piccolo e incurvato è un tratto dominante!!



TRASMISSIONE VERTICALE

- Un carattere (malattia) autosomica dominante viene trasmesso verticalmente da una generazione a quella successiva
- Uguale probabilità per entrambi i sessi
- 50% dei figli di un genitore affetto sono affetti
- Nessun figlio di genitore sano sarà affetto

Meccanismi della Dominanza

- Perdita di funzione (loss-of-function) [PAX3]
- Guadagno di Funzione (gain-of-function)
 - Aumento di dose [PMP22]*
 - Aumento dell'attività proteica [SCN4]*
- Mutazioni dominanti negativi [collagene]
- Tossicità di proteina [amiloidosi]
- Nuove funzioni proteiche [alfa-1-antitripsina]

NOMENCLATURA

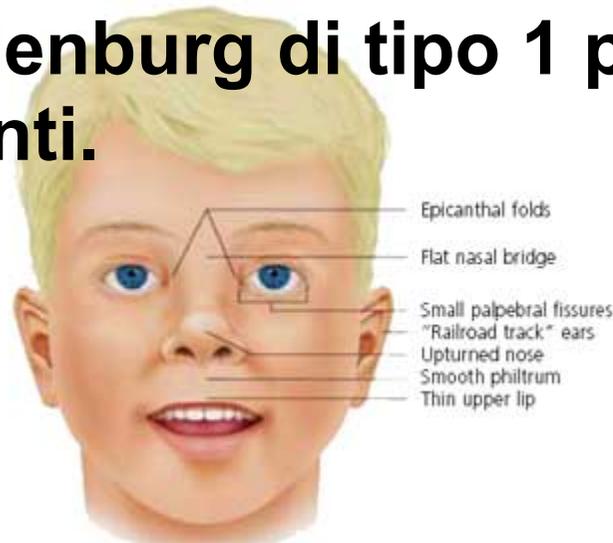
- **Null allele** or **amorph**: an allele that produces no product.
- **Hypomorph**: an allele that produces a reduced amount or activity of product.
- **Hypermorph**: an allele that produces increased amount or activity of product.
- **Neomorph**: an allele with a novel activity or product.
- **Antimorph**: an allele whose activity or product antagonizes the activity of the normal product.

Perdita di funzione

- Prodotto *amorfo* o *ipomorfo*. Di solito porta a malattie dominanti.
- aploinsufficienza. *PAX3 (2q35)*
- La sindrome di Waardemburg (WS) è un raro disordine dello sviluppo clinicamente e geneticamente eterogeneo, caratterizzato da albinismo parziale, sordità congenita bilaterale, anomalie dello sviluppo dei tessuti derivati dalla cresta neurale.

Waardenburg syndrome (WS)

- eredità autosomica dominante
- sordità con anomalie della pigmentazione.
- La loro incidenza è di 1/270.000 nati (2-3% degli audiolesi). La sindrome di Waardenburg di tipo 2 (tipo 2A se legata al locus 3p13, tipo 2B se non legata al locus 3p13) è un gruppo eterogeneo che si differenzia dalla sindrome di Waardenburg di tipo 1 per l'assenza di distopia dei canti.



Waardenburg syndrome (WS)

- 4 forme cliniche e 5 geni:

Forma clinica	Localizzazione e	Gene
Tipo I	2q35	PAX3
Tipo II	3p14	MITF
Tipo III	2q35	PAX3
Tipo IV	13q22	EDNRB
Tipo IV	20q13.2	EDN3
Tipo IV	22q13	SOX10

PMP22

- Il gene PMP22 (17p11.2) codifica per una proteina chiamata proteina mielinica periferica 22. E' un componente della mielina, sostanza che ricopre i nervi e promuove l'efficiente trasmissione dell'impulso nervoso E' prodotta dalle cellule di Schwann dove partecipa al mantenimento della mielina.

Aumento di dose [PMP22]

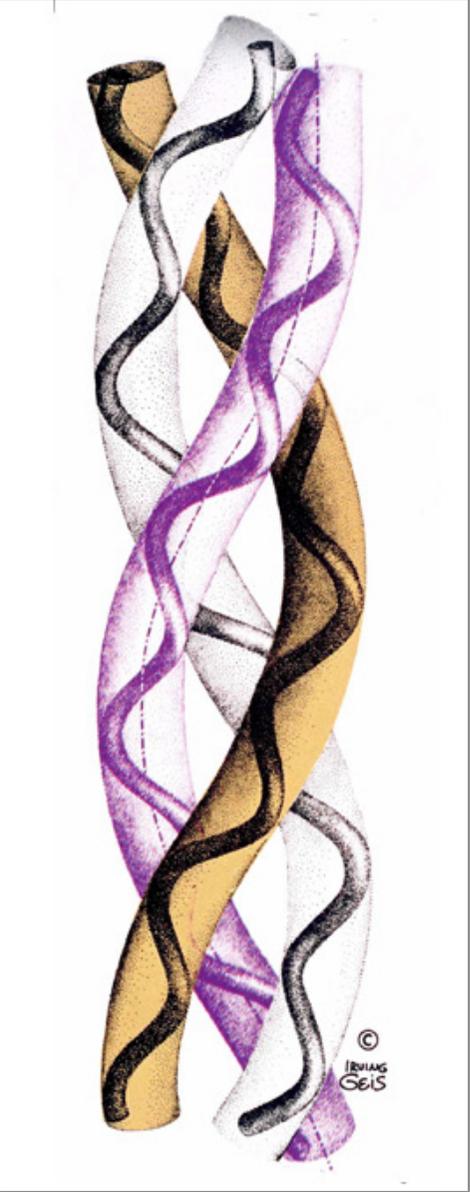
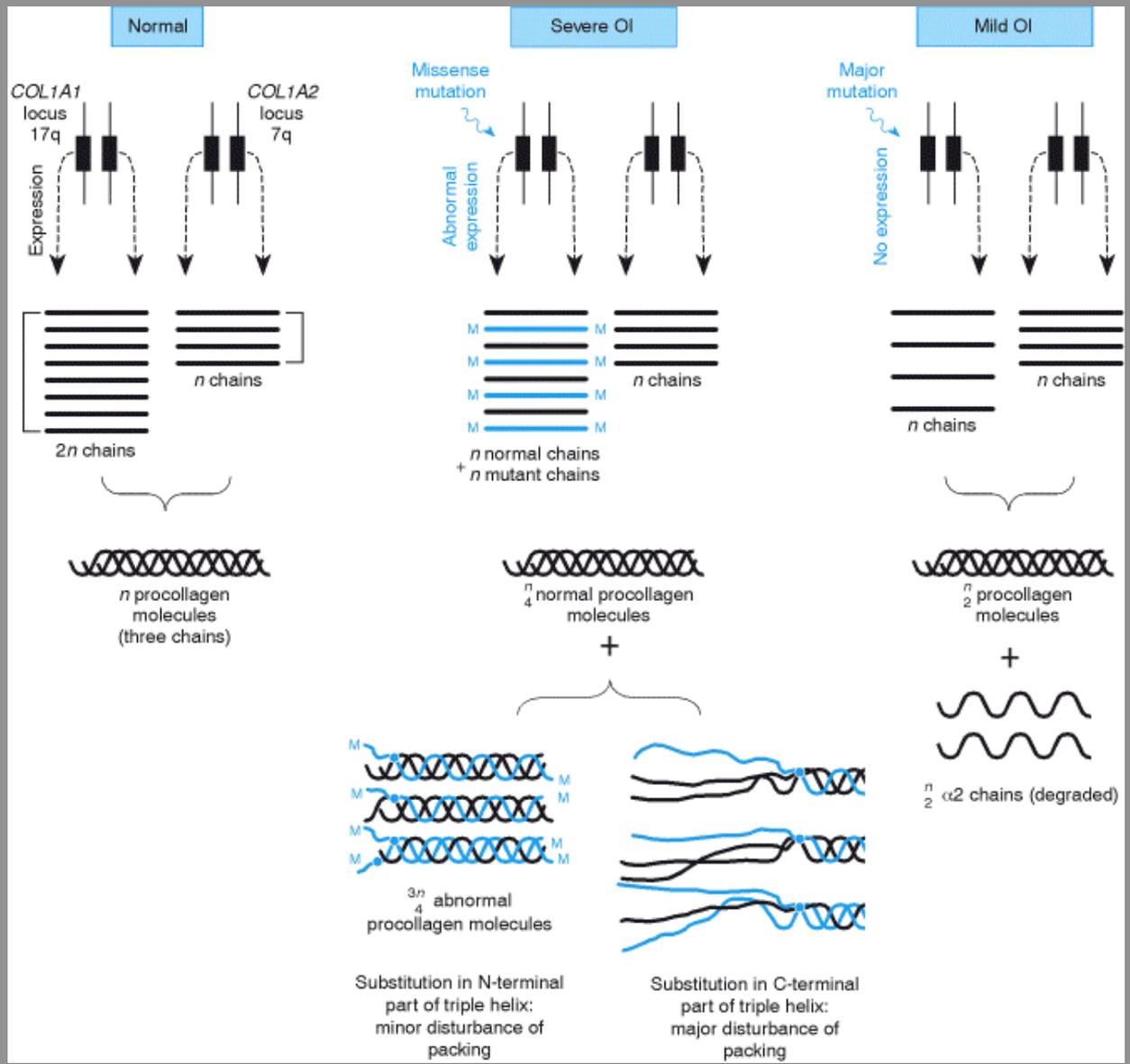
Malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo I e II
Esistono numerose forme di questa malattia, tanto che si parla più genericamente di Neuropatie Ereditarie Sensitivo-motorie (HMSN) per includerle tutte. Nel loro insieme queste malattie ereditarie colpiscono circa 1 persona su 2.500, e risultano le malattie ereditarie più frequenti del sistema nervoso periferico. Caratterizzata da debolezza e atrofia muscolare, principalmente a livello dei muscoli degli arti inferiori.

- La mutazioni più frequente consiste in una duplicazione di 1.5 Mb, mentre nell'1% dei casi si riscontrano mutazioni puntiformi.

Diminuzione di dose [PMP22]

La neuropatia ereditaria sensibile alla pressione indicata come HNPP

- I nervi interessati presentano, in certi punti, una forma a salsiccia, dovuta ad una irregolarità nello spessimento della guaina della mielina.
- Il numero di persone affette da HNPP non è ancora definito con precisione. Attualmente si stima che 2/5 persone su 100.000 ne siano affette ma è possibile che questi valori siano più elevati.
- I sintomi della HNPP consistono essenzialmente in sensazioni di debolezza muscolare, di intorpidimento o di formicolio nelle zone colpite. Questi episodi possono perdurare per alcune ore, settimane, a volte mesi. Queste sensazioni sono talvolta transitorie e quindi normalmente tendono a sparire.



CASI SPORADICI DI MALATTIA AUTOSOMICA DOMINANTE

- **NUOVA MUTAZIONE:** più probabile nel caso di malattia che incide sulla Fitness Riproduttiva
- **NON PATERNITA' BIOLOGICA**
- **PENETRANZA RIDOTTA DEL GENE:** figlio affetto da genitore apparentemente normale
- **Esordio tardivo [Corea di Huntington]**
- **Espressività variabile**
- **Eterogeneità genetica**
- **Eterogeneità allelica**

CASI SPORADICI DI MALATTIA AUTOSOMICA DOMINANTE

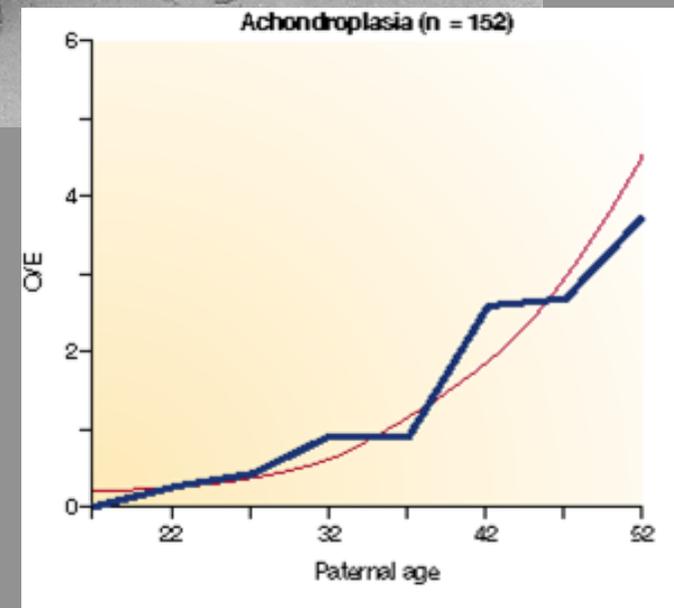
- **NUOVA MUTAZIONE:** più probabile nel caso di malattia che incide sulla Fitness Riproduttiva
- **NON PATERNITA' BIOLOGICA**
- **PENETRANZA RIDOTTA DEL GENE:** figlio affetto da genitore apparentemente normale
- **Esordio tardivo [Corea di Huntington]**
- **Espressività variabile**
- **Eterogeneità genetica**
- **Eterogeneità allelica**

Mutazione de novo



Acondroplasia

- 1/25.000 nati vivi
- È la forma più comune di nanismo con arti corti
- L'80% è dovuto a mutazioni de novo che avvengono nella spermatogenesi, quando i genitori non sono affetti, il rischio di ricorrenza nelle successive gravidanze è leggermente superiore a quello della popolazione generale ma comunque inferiore all'1% dovuto a possibili condizioni di mosaicismo gonadico presente in uno dei due genitori



Genetica

- **Osteocondrodisplasie** (OCD): gruppo eterogeneo di malattie ereditarie in cui si assiste ad uno sviluppo anormale delle ossa e delle cartilagini, che determinano disturbi della crescita e dello sviluppo. Le OCD comprendono circa 200 malattie diverse, distinte in base alle caratteristiche cliniche, radiologiche e genetiche.
- La più comune fra le OCD è la **acondroplasia**, che colpisce circa 1/25.000 nati vivi.
- Il termine acondroplasia (ACP), che deriva dall'unione di tre parole di origine greca (a = senza, condros = cartilagine, plasis = formazione), è una malattia genetica caratterizzata da un mancato sviluppo armonico della cartilagine di accrescimento delle ossa lunghe degli arti.
- Il gene coinvolto nell'ACP si trova nel cromosoma 4 e contiene l'informazione per produrre una proteina chiamata "**recettore del fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 3**", o più brevemente **FGFR3**. Questo recettore permette alle cellule di ricevere una particolare "molecola segnale" che stimola le cellule stesse a moltiplicarsi.
- La ACP è causata da alterazioni (mutazioni) nel gene dell'FGFR3, che lo rendono incapace di ricevere il segnale e trasmetterlo all'interno della cellula. L'alterazione di questo gene colpisce soprattutto le cellule della cartilagine di accrescimento, che necessitano particolarmente di questo segnale per moltiplicarsi.

Genetica

- Il 99% dei pazienti affetti da ACP ha la stessa mutazione (G380R), consistente in una sola base nucleotidica alterata. In circa 9 casi su 10 i pazienti affetti da ACP nascono da genitori assolutamente normali, a causa di alterazioni nel gene che avvengono negli spermatozoi e negli ovuli dei genitori. In questo caso, la possibilità di avere un altro figlio affetto da ACP è trascurabile, identica a quella di qualsiasi altra coppia normale.
- L'acondroplasia si trasmette con modalità autosomica dominante questo significa che una persona affetta da ACP, insieme ad una normale, hanno il 50% di probabilità di avere un figlio affetto da ACP. Una coppia in cui entrambi i genitori sono affetti da ACP ha 1 probabilità su 4 di concepire un figlio\la affetto da una grave forma di acondroplasia **letale** alla nascita (chiamata **acondroplasia omozigote**); 1 probabilità su 4 di avere figli normali e 1 su 2 di avere un figlio affetto come loro.
- L'**ipocondroplasia** (ICP), é un'osteocondroplasia caratterizzata da alterazioni scheletriche che si manifestano con un mancato accrescimento generale del paziente. A differenza dell'ACP, l'accrescimento non é disarmonico ma equilibrato. Oltre il 70% dei pazienti affetti da ICP presentano due mutazioni (N540K) nel gene FGFR3.

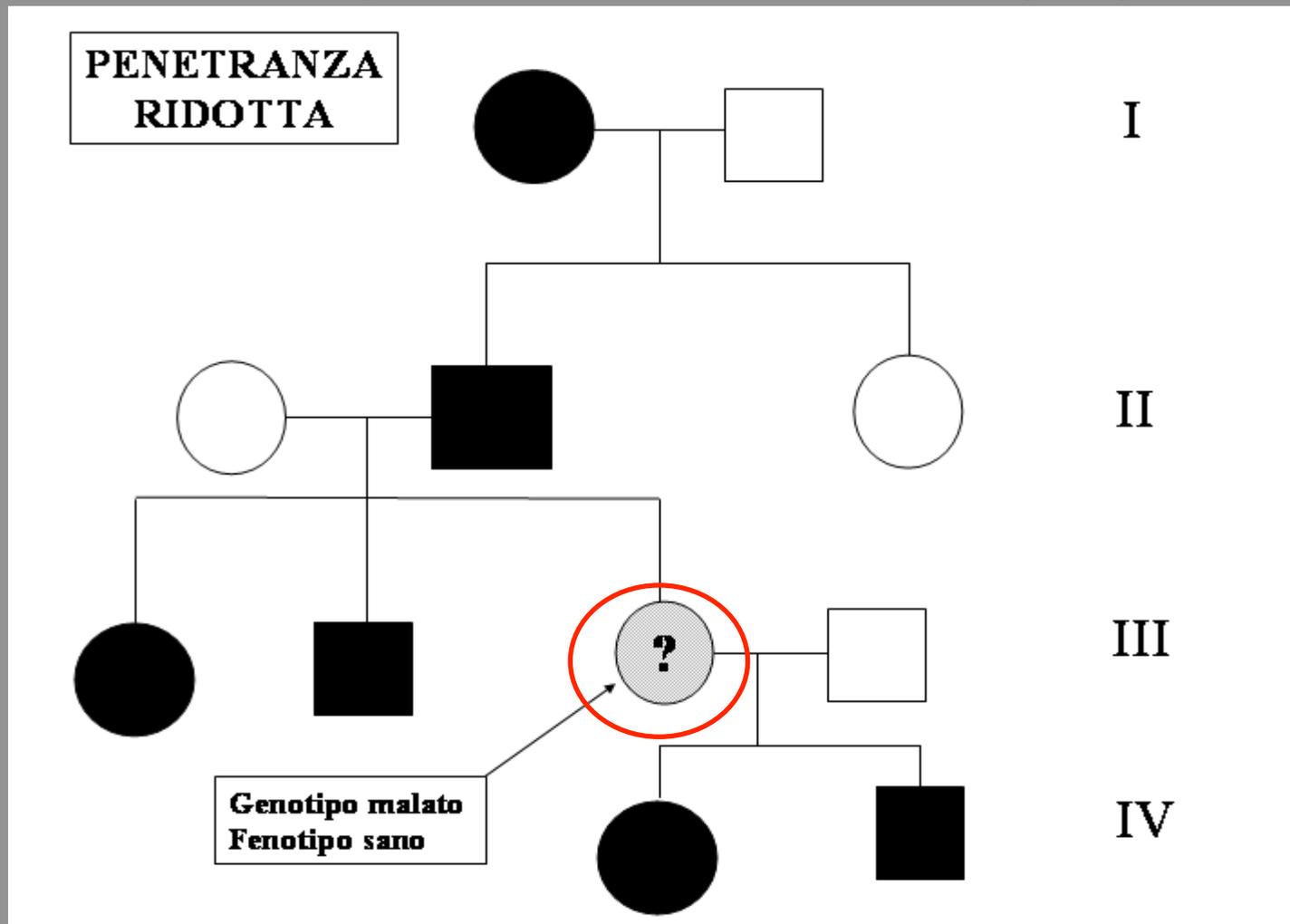
Clinica

- Si manifesta alla nascita con: peso normale, lunghezza ridotta (circa 47 cm), ipotonia
- Nel neonato e nella prima infanzia è molto caratteristico l'aspetto ovoide e traslucido della porzione prossimale del femore
- Le tappe dello sviluppo motorio possono essere rallentate, con acquisizione del controllo della testa a 3-4 mesi e capacità di camminare autonomamente a 24-36 mesi
- La statura adulta è mediamente 123 cm nelle femmine e 130 nei maschi
- L'intelligenza è normale

PENETRANZA RIDOTTA

Individui che esprimono il carattere

Penetranza = $\frac{\text{Individui che esprimono il carattere}}{\text{Individui portatori dell'allele che codifica per quel carattere}}$



**PENETRANZA
RIDOTTA**

**ESPRESSIVITA'
VARIABILE**

➤ per espressività si intende la gravità della malattia prodotta dall'allele patologico

➤ per penetranza si intende la percentuale di individui che avendo il difetto genico hanno l'espressione della malattia

LE MALATTIE MENDELIANE NON SONO SEMPLICI

➤ Le variazioni di penetranza ed espressività sono probabilmente legate alla influenza di altri geni o a fattori ambientali

Meccanismi di Espressività

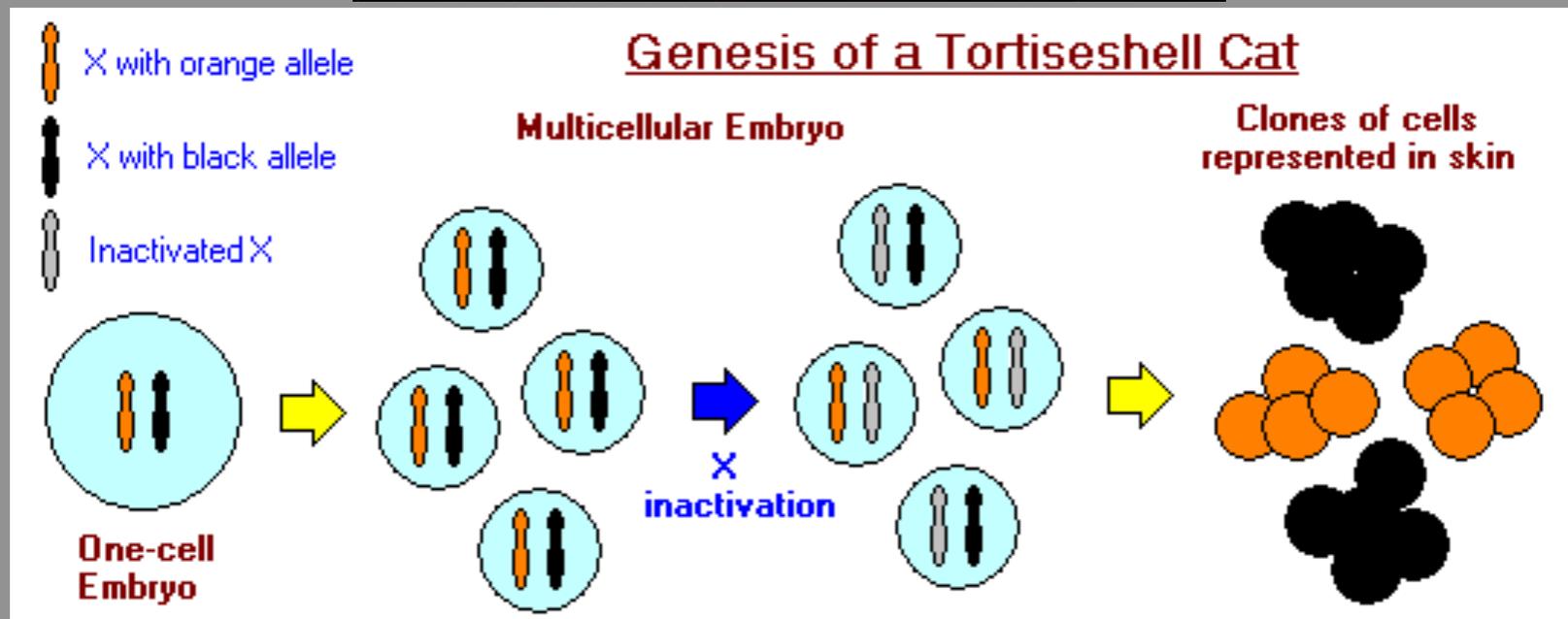
- A) differenze nello stesso fenotipo:
 - “Pseudo-differenze” (Omozigosità dei dominanti)
 - Polimorfismi in cis (FC per R347-D979/DF508)
 - Infleunza dell’ allele in trans (ellissocitosi)
 - Influenza di altri geni (glaucoma per MYOC/CYP1B1)
 - Anticipazione (DM1)
 - Sesso CABVD e FC)
 - Mosaicismo somatico (OI tipo II)
 - Ambiente (intolleranza er. Fruttosio)

Meccanismi di Espressività

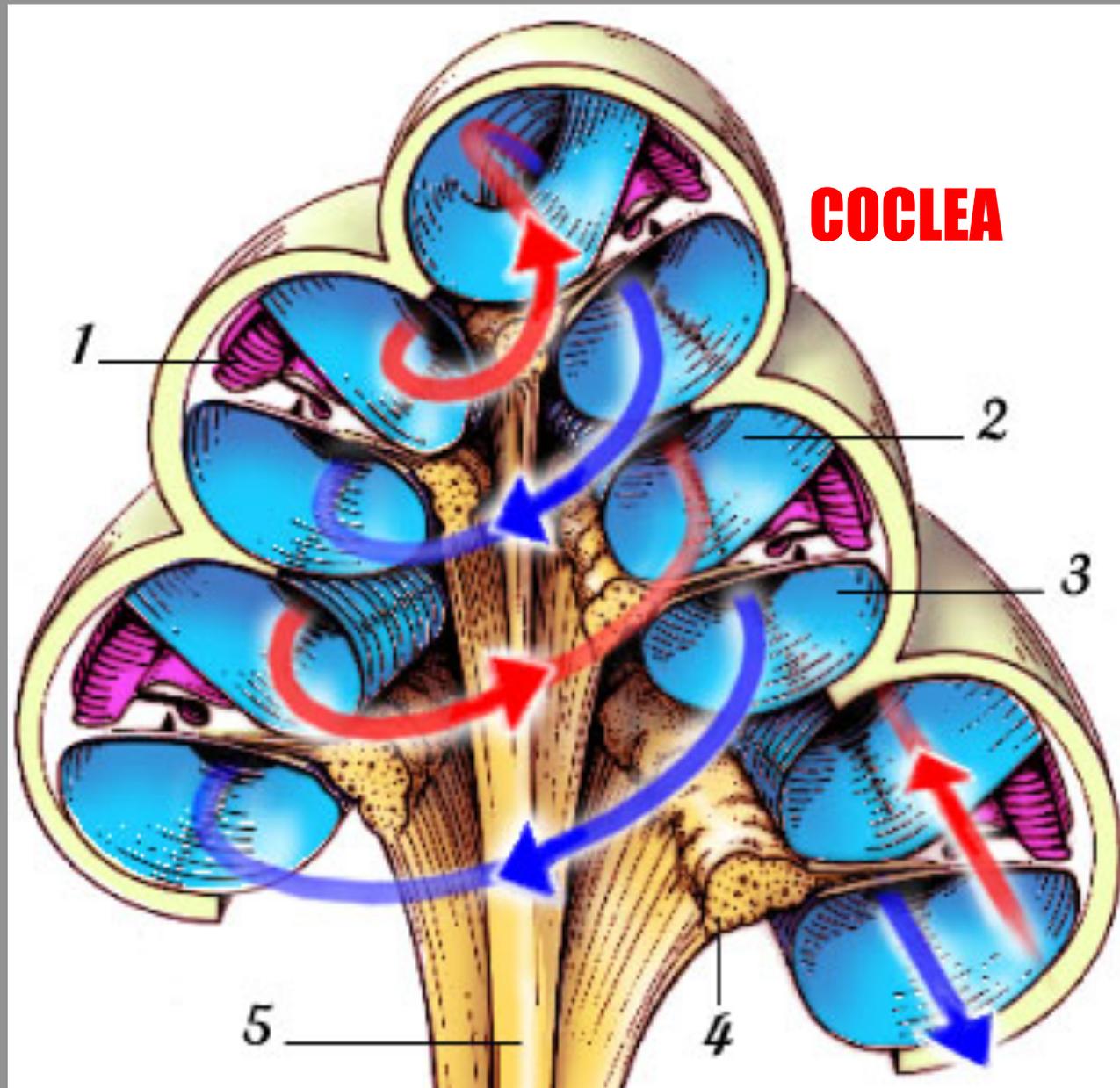
- B) differenze nel fenotipo clinico:
 - Eterogeneità molecolare (Tay-Sachs)
 - Polimorfismi in cis (Creutzfeld-Jakob e FFI)
 - Imprinting (Sindrome Prader-Willi/Angelman)
 - Mosaicismo somatico

MOSAICISMO SOMATICO

- Più complessa è invece la consulenza se a richiederla sono genitori di un figlio affetto da una forma letale o severa in vista di una nuova gravidanza; infatti, va considerata la possibilità di un mosaicismo somatico e/o germinale dei genitori. Nel primo caso, un accurato esame clinico della coppia potrebbe rivelare la presenza di sfumati segni clinici, ad es. pelle particolarmente liscia e sottile, sclere grigie o bassa statura, che possono essere il risultato dello stato di mosaicismo somatico.



ETEROGENEITA' GENETICA

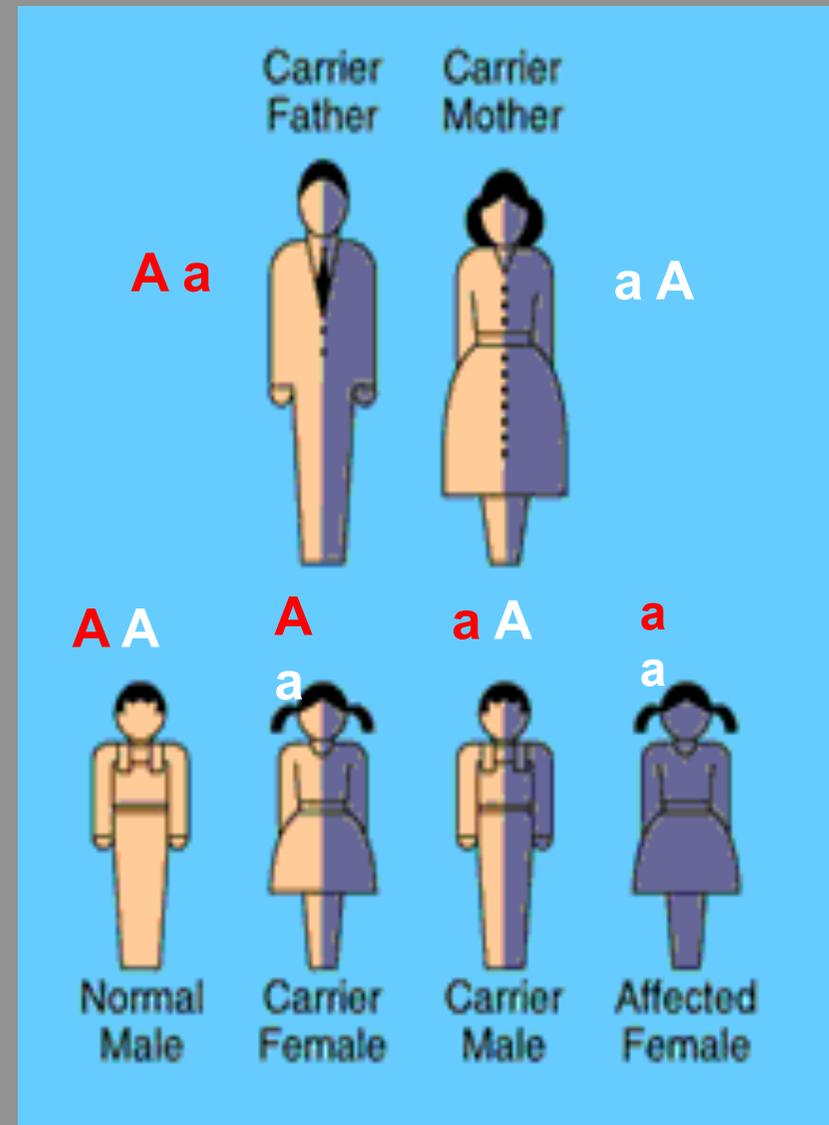


MALATTIE MONOGENICHE

EREDITA' AUTOSOMICA RECESSIVA

Caratteristiche

- Due copie dell' allele mutato sono necessarie per causare la malattia
- I portatori hanno il 25% di rischio di avere figli affetti
- Maschi e femmine sono ugualmente affetti
- Spesso coinvolgono geni che codificano per enzimi
- Individui affetti spesso figli di non affetti

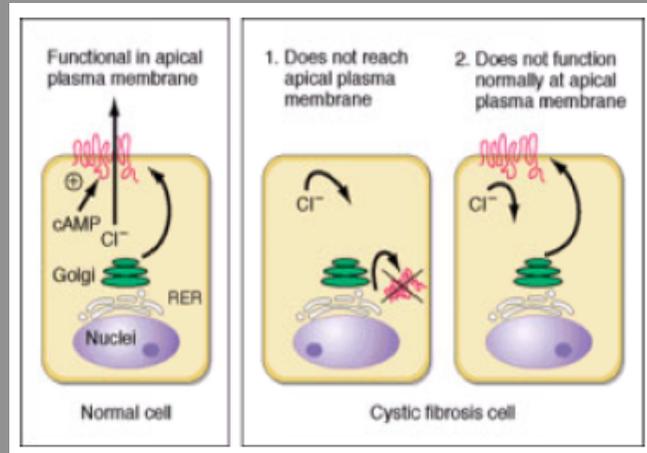




Dominante



Fibrosi Cistica



1/2500-3000 nati vivi

AR

Alterazioni in CFTR (7q)

La mutazione più frequente (70%) è la $\Delta f508$, ma se ne conoscono più di 800 (scarsamente frequenti nella popolazione <2%)

**Cystic Fibrosis
Mutation Database**

[Search](#) [CFTR Gene](#) [Consortium](#) [News Letters](#) [Links](#) [Submit](#) [Statistics](#) [Help](#)

CFMDB Statistics

There are currently **1541** mutations listed in this CFTR mutation database.

Clinica

- La FC è una malattia genetica multisistemica in cui il trasporto difettoso del cloro attraverso le membrane cellulari causa la presenza di secrezioni disidratate. Questo porta alla presenza di muco denso nei bronchi, all'ispessimento del succo pancreatico e ai caratteristici elevati livelli di cloro nel sudore. Altri organi interessati sono il fegato, l'intestino, l'apparato riproduttivo
- Intelligenza e funzioni cognitive sono del tutto normali.

Clinica

- La modalità di comparsa, l'entità dei sintomi e il decorso sono estremamente variabili.
- Nelle forme "classiche" vi è associazione di sintomi respiratori e digestivi; la broncopneumopatia è di entità lieve o media nell'infanzia e nell'adolescenza, si aggrava durante la giovinezza o l'età adulta con esito in insufficienza respiratoria.
- Nelle forme atipiche i sintomi respiratori, quando presenti, sono modesti o minimi e con evoluzione più lieve; spesso l'insufficienza pancreatica è assente.

Prognosi

- La gravità della malattia polmonare è determinante per la prognosi. Il 90% delle persone affette da FC muore per complicanze polmonari
- In seguito ai progressi della terapia più del 36% dei pazienti ha raggiunto l'età adulta (>18 aa) e il 12% supera i 30 aa
- Durata media della vita: 32 aa per i maschi e 28 per le femmine

Correlazione genotipo-fenotipo

- E' stata stabilita una relazione tra la condizione di omozigosi per $\Delta f508$ e l'insufficienza pancreatica, ma non esistono relazioni predittive riguardanti la malattia polmonare

Diagnosi

- Diagnosi primaria: criteri clinici + test del sudore
 - Il test del sudore, che mette in evidenza un'elevata eliminazione di cloruri e sodio, rimane comunque fondamentale per la diagnosi: *tipicamente una concentrazione di $Cl^- > 70 mEq/l$ consente di distinguere i pz con FC da quelli con altra patologia polmonare*
- Diagnosi secondaria: test genetico

Terapia

- La diagnosi e il trattamento precoce migliorano la crescita e lo stato nutrizionale, questo influenza positivamente l'evoluzione della broncopneumopatia
- Obiettivi: promuovere la clearance delle secrezioni, fornire un'alimentazione adeguata e prevenire l'ostruzione intestinale
- La pneumopatia viene trattata con fisioterapia respiratoria, antibioticoterapia intensiva, antinfiammatori.
- L'insufficienza pancreatica e i sintomi gastrointestinali vengono trattati con alimentazione ipercalorica, enzimi pancreatici e supporto di vitamine liposolubili

SMA

- 1/2.500 nati vivi SMA I
- 1/50.000 nati vivi SMA II
- 1/100.000 nati vivi SMA III
- AR
- SMA I o malattia di Werdnig Hoffman: forma grave ad esordio neonatale
- SMA II: forma intermedia
- SMA III o malattia Kugelberg-Welander: forma meno grave con sopravvivenza prolungata, ma persistente debolezza muscolare

Genetica

- Il sintomo cardine delle atrofie muscolari spinali è la debolezza muscolare, dovuta ad una degenerazione dei grandi motoneuroni alfa delle corna anteriori del midollo spinale e dei nuclei dei nervi cranici con conseguente atrofia muscolare neurogena.
- Mappata sul cromosoma 5, identificati due geni: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP) e Survival Motor Neuron (SMN)

Clinica SMA I (forma infantile)

- La debolezza muscolare esordisce entro i primi 2-3 mesi di vita, e spesso può avvenire già in utero (riduzione dei movimenti fetali attivi nel terzo trimestre)
- Alla nascita i neonati appaiono profondamente ipotonici con immobilità degli arti che vengono mantenuti in posizione tipica: gli arti inferiori addotti e allargati, nei superiori sono possibili a volte modesti movimenti delle dita e delle mani. I riflessi osteotendinei sono assenti.
- Scarsissimo controllo del capo, i bambini sono incapaci di alzare la testa, di girarsi su un fianco o di sollevare gli arti inferiori
- L'espressione del volto è spesso normale e il bimbo appare attento e intelligente
- Talora la debolezza muscolare è tale da richiedere la ventilazione assistita e la nutrizione con sondino nasogastrico per incapacità del bimbo a succhiare.
- I pazienti con SMA I non raggiungono mai la capacità di sedere senza appoggio
- La sopravvivenza media è intorno agli 8 mesi, con morte comunque entro il primo anno di vita

Clinica SMA II (forma cronica infantile)

- Sviluppo motorio normale nei primi 6 mesi di vita e usualmente raggiungono l'abilità di sedere senza appoggio. Lo sviluppo della debolezza muscolare è lentamente progressivo, interessa simmetricamente e prevalentemente i muscoli prossimali degli arti inferiori.
- Non raggiungono mai l'abilità di mantenere la stazione eretta senza appoggio
- Sintomi bulbari sono di solito assenti, ma fascicolazioni e atrofia della lingua sono comuni

Clinica SMA III (forma giovanile)

- Sviluppo motorio nella norma nel primo anno di vita, acquisiscono l'abilità di camminare senza appoggio. L'esordio della debolezza muscolare (tarda età infantile o inizio adolescenza) è graduale e si presenta con le caratteristiche di una forma pseudo-distrofica: debolezza muscolare prossimale, andatura anserina in iperlordosi, difficoltà nel salire le scale e nel rialzarsi da terra, manovra di Gowers
- La progressione della malattia è varia da paziente a paziente: in alcuni rimane relativamente stabile negli anni, in altri banali cause concomitanti (fratture, stress, ...) possono causare un brusco declino

Diagnosi clinico-strumentale

- Segni clinici caratteristici
- Analisi dei livelli di creatinasi (CK) (normale nel tipo I)
- EMG: denervazione molto estesa con fibrillazioni
- Biopsia muscolare: atrofia neurogena

Diagnosi molecolare

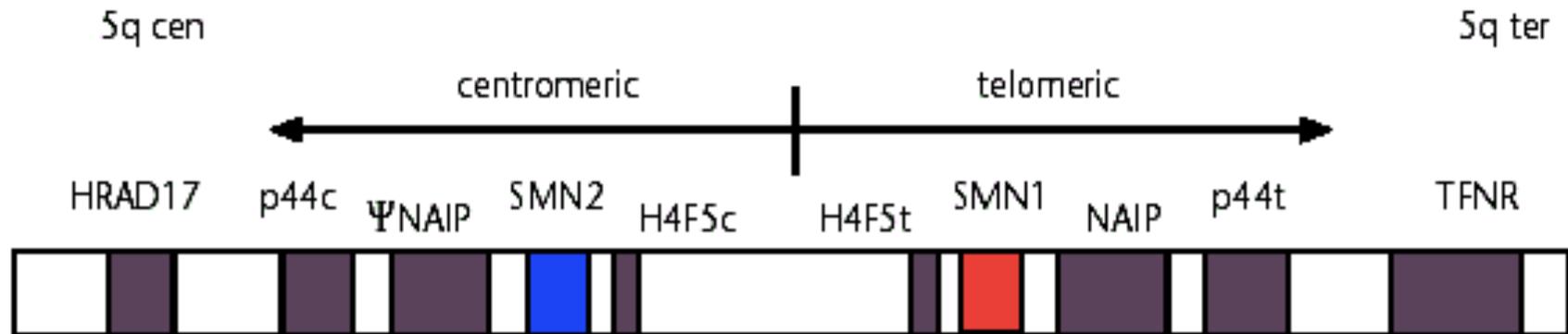
Diagnosi molecolare di certezza: identificazione di una delezione omozigote del gene **SMN**

*Il gene responsabile della SMA è stato chiamato **SMN1** che significa gene di sopravvivenza del motoneurone. Tale gene è localizzato sul cromosoma 5 nella regione 5q13 dove esiste inoltre un gene quasi identico a SMN1 che è denominato SMN2.*

La SMA è causata da assenza o alterazione del gene SMN1. La delezione del solo gene SMN2 non dà invece luogo a malattia. Il gene SMN2 si differenzia nella regione codificante dal SMN1 solo per 2 nucleotidi, uno nell'esone 7 e uno nell'esone 8. La differenza rilevante è la transizione nucleotidica C-T nell'esone 7 in SMN2. Tale differenza comporta una separazione (splicing) anomala del DNA ed esclusione dell'esone 7 nella maggior parte dei trascritti del gene SMN2 che risultano quindi funzionalmente difettosi.

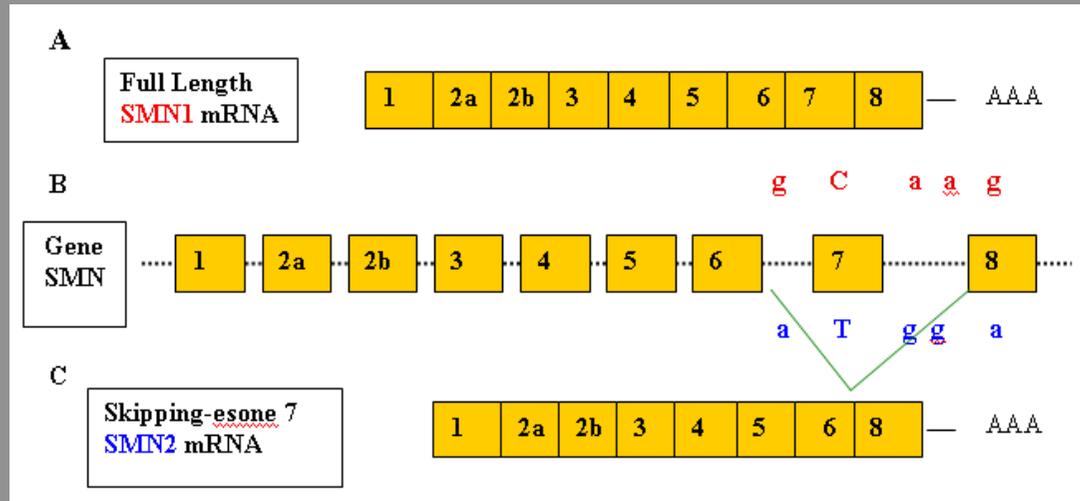
Il gene SMN1 codifica per la proteina SMN. Anche il gene SMN2 produce proteina SMN. Per questo motivo i pazienti SMA sono in grado di produrre una certa quantità di proteina SMN che però risulta insufficiente perché la maggior parte non è funzionale, in quanto manca del dominio codificato dall'esone 7. Quindi la malattia è causata da una insufficiente disponibilità di proteina SMN normale.

Genetica



Rappresentazione schematica della regione SMA sul braccio lungo (q) del cromosoma 5. In questa regione vi è una duplicazione invertita di 4 geni, tra cui SMN1 telomerico (in rosso) e SMN2 centromerico (in blu).

Genetica



SMN1 e SMN2 differiscono tra loro per soli 5 basi nucleotidiche: due nell'introne 7 e le altre tre nell'introne 6, nell'esone 7 e nell'esone 8. Due di questi diversi nucleotidi situati negli esoni 7 e 8 permettono di distinguere SMN1 da SMN2 e tale differenza è tuttora usata per effettuare la diagnosi molecolare di SMA.

Circa il 94% dei soggetti affetti da SMA di Tipo I-III risultano deleti in omozigosi per l'esone 7 e 8 o soltanto per l'esone 7 nel gene SMN1 e più precisamente la frequenza è del 96 e del 94% rispettivamente in pazienti SMA di Tipo I e II. Nei soggetti affetti da SMA di Tipo III la frequenza è pari all'86%. Inoltre circa il 3,4% dei pazienti con SMA sono eterozigoti composti, in quanto presentano la delezione del gene SMN1 su un cromosoma e una mutazione intragenica sull'altro cromosoma

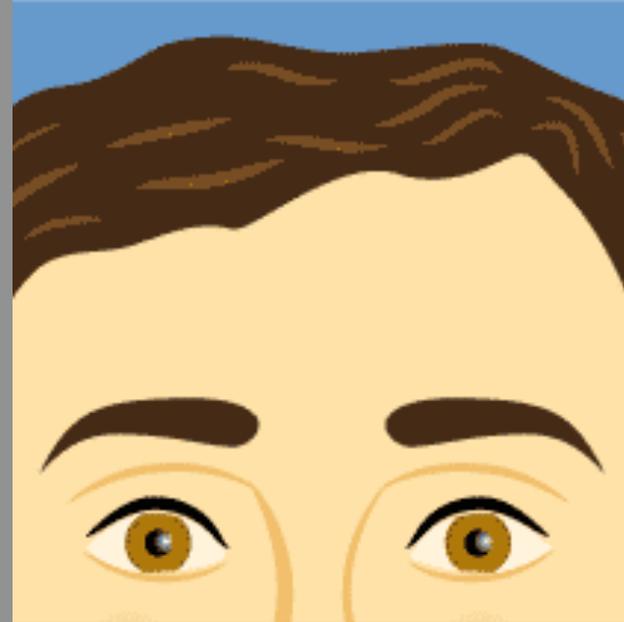
Genetica

- La sostituzione C-T genera in SMN2 una sequenza esonica silencer (ESS) a cui si lega in maniera altamente specifica una proteina repressore, chiamata hnRNP A1. Questo provoca lo splicing e quindi l'eliminazione dell'esone 7 dal trascritto di SMN2.
- Evidenze sperimentali hanno dimostrato che il meccanismo di splicing di SMN2 può essere regolato *in vivo* da diversi fattori di splicing, quali proteine SR o SR-like
- La proteina prodotta dal gene SMN2 manca della parte carbossiterminale e per questo motivo risulta meno stabile della forma completa
- Le interazioni esistenti tra la proteina SMN e hnRNP-R e hnRNP-Q hanno suggerito un coinvolgimento di SMN nelle modificazioni post trascrizionali dell'mRNA, come la formazione, il trasporto e la traduzione dell'mRNA. Queste interazioni specifiche potrebbero spiegare il motivo per cui i motoneuroni sono le uniche cellule dell'organismo che risultano colpite così gravemente dalla drammatica diminuzione della proteina SMN. Infatti hnRNP-R e hnRNP-Q interagiscono solo con la proteina SMN corretta e non con la forma tronca e hnRNP-R risulta localizzata in modo predominante negli assoni dei motoneuroni, fornendo in questo modo una prima spiegazione nel coinvolgimento motoneurone-specifico della proteina SMN

Terapia

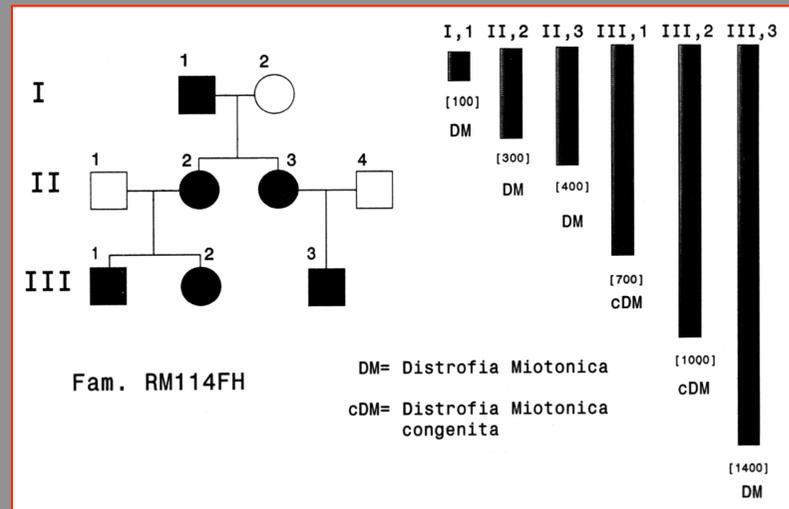
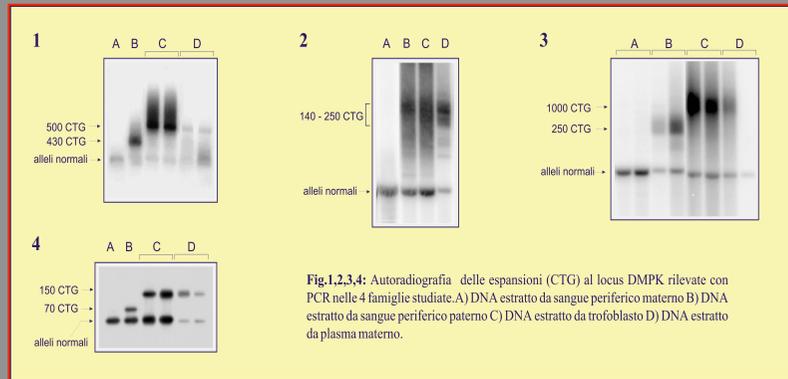
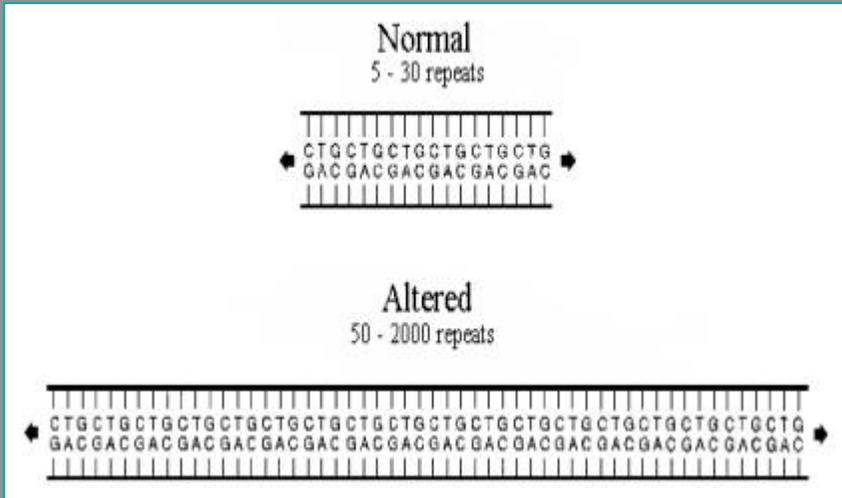
- Non esiste attualmente una cura risolutiva per le SMA, è possibile una cura di supporto delle complicanze

Ad esempio lo sviluppo di scoliosi e contratture, associate a una generalizzata atrofia muscolare, è responsabile della scarsa efficienza del mantice respiratorio e causa di frequenti episodi broncopneumonici e atelettasici

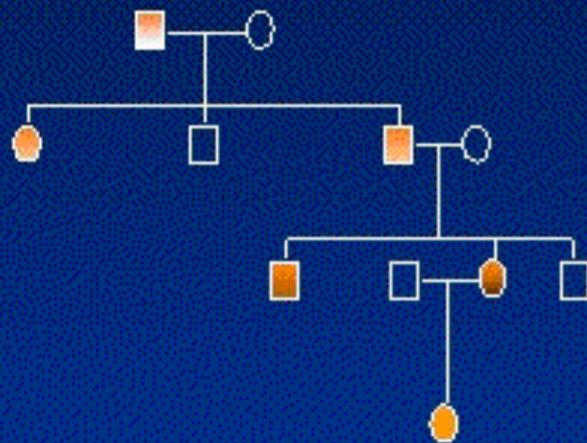


Dominante



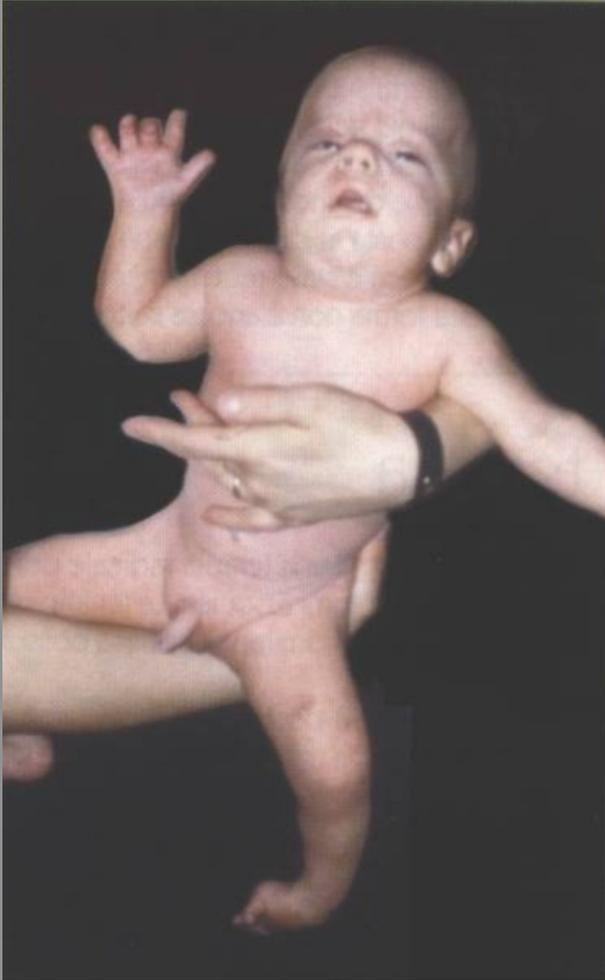


Anticipation



- increasing severity from one generation to next
- commonly seen in triplet repeat disorders

DISTROFIA MIOTONICA



- Anomalie muscolari progressive con miotonia, debolezza muscolare distale, atrofia ed invalidità
- E' causata da un'espansione del numero di triplette CTG
- 1:8000

DISTROFIA MIOTONICA

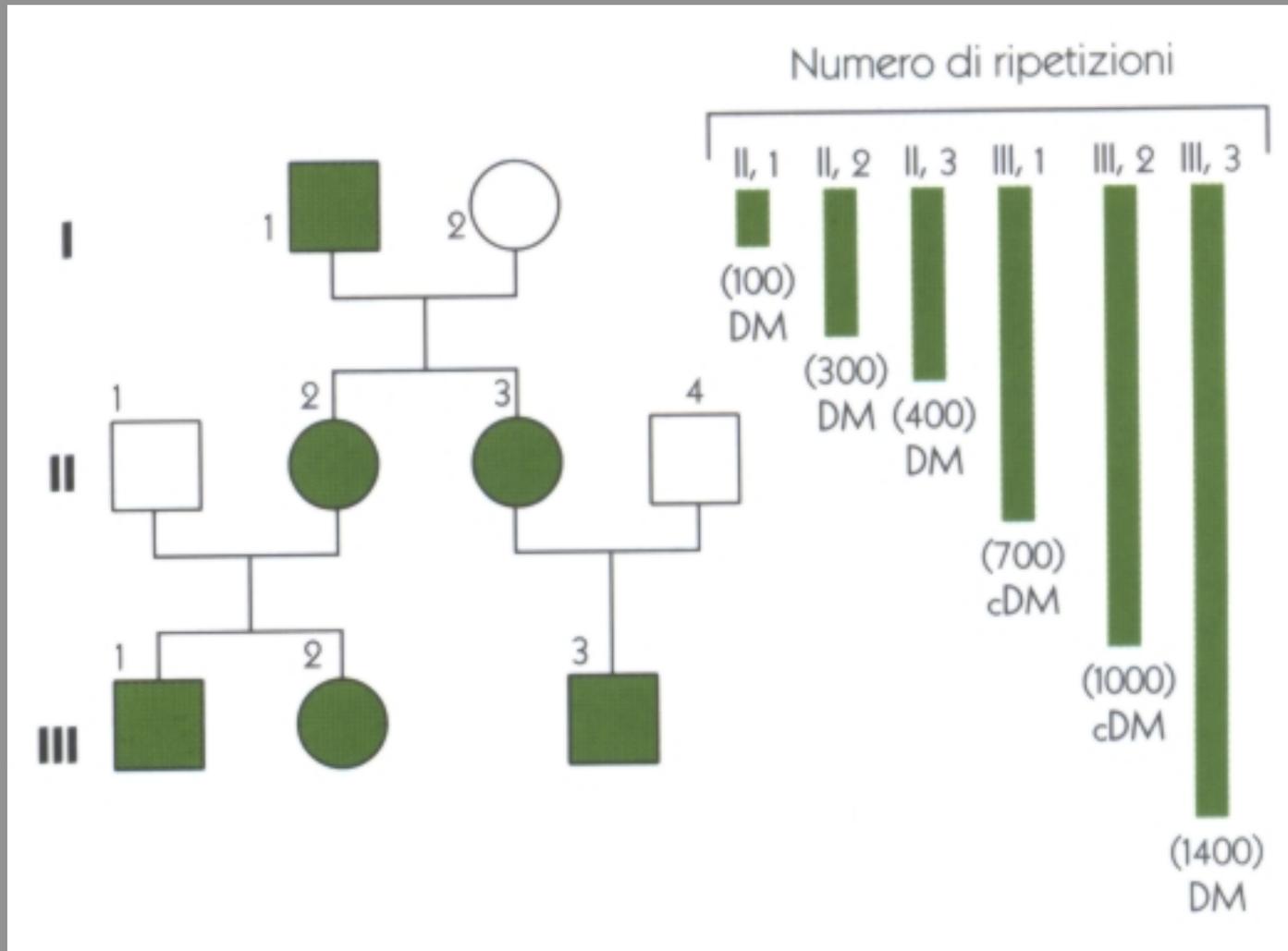
- L'espansione della tripletta CTG nel 3'UTR del gene per la miotonina protein chinasi (*DMPK*) mappato sul cromosoma 19
- Nelle persone non affette il numero di ripetizioni è 37;
- Le persone affette hanno un numero di ripetizioni di almeno 50.

Triplet Repeat Expansion

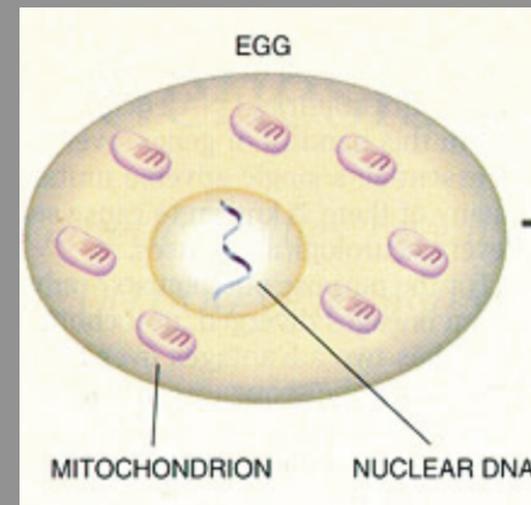
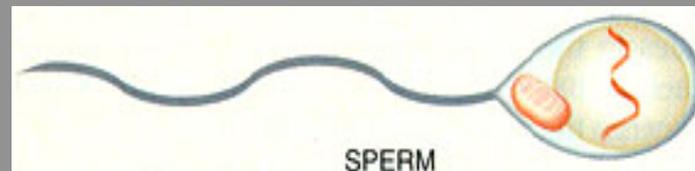


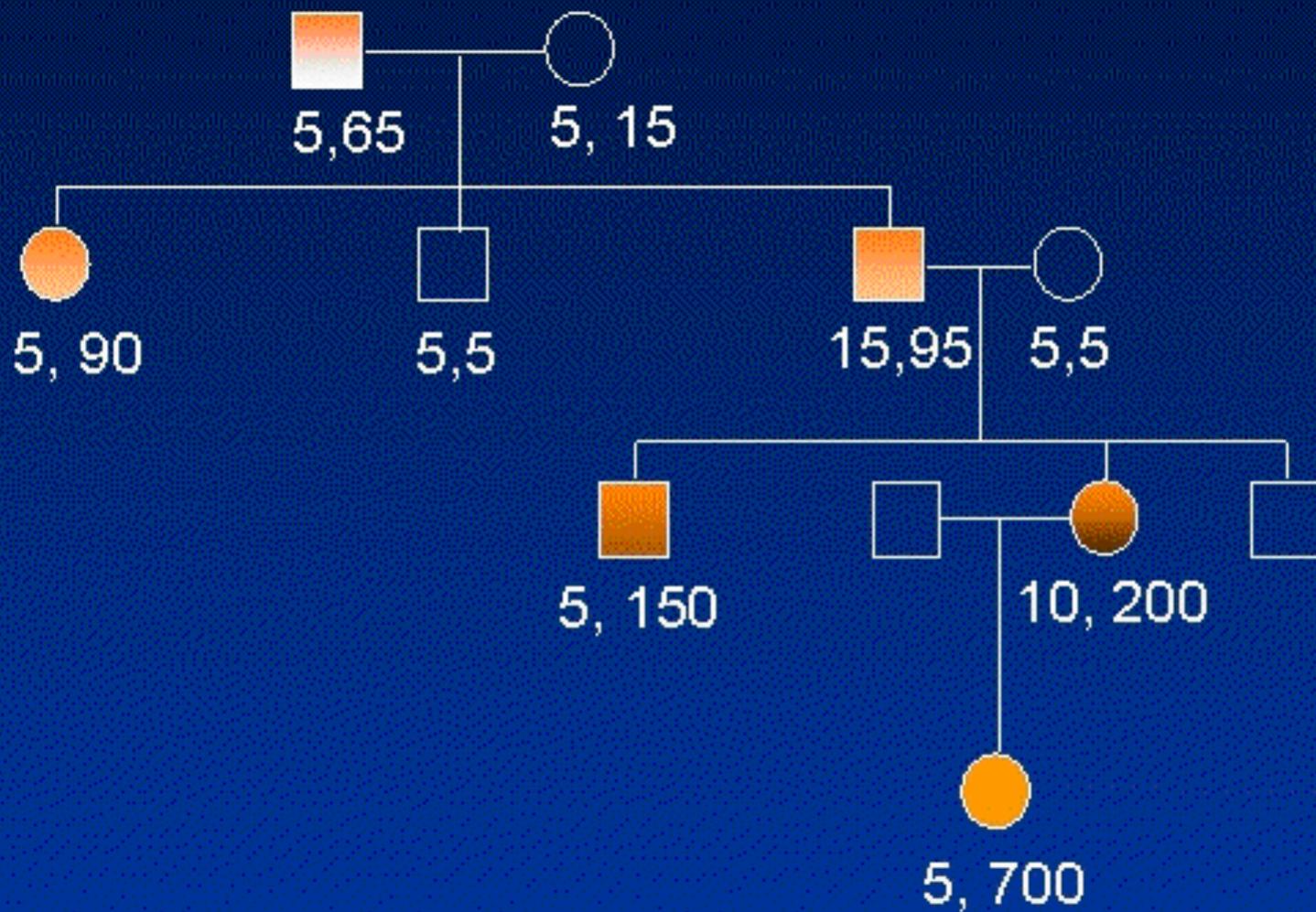
Myotonic Dystrophy

ANTICIPAZIONE



- L'espansione di piccoli alleli appare più comune nei maschi;
- Le forme congenite con severità grave ed il più alto numero di copie sono trasmesse quasi esclusivamente dalla madre





Genetica

- Causa della malattia è un'espansione di una tripletta CTG nel gene per la proteina miotonina protein chinasi (DMPK), mappato sul cromosoma 19
- Negli individui normali il numero di ripetizioni è inferiore a 37, mentre nei pazienti affetti il numero delle triplette varia da 50 ad alcune migliaia
- I pazienti con un quadro clinico intermedio hanno dalle 50 alle 80 triplette
- Soggetti gravemente affetti possono arrivare a più di 2000 triplette

Clinica

- La presentazione clinica di questa malattia multisistemica è molto variabile da un paziente all'altro e persino nell'ambito della stessa famiglia
- Casi classici: esordio nell'età adulta, i segni precoci di debolezza muscolare sono evidenti a carico dei muscoli del distretto facciale (facies tipica: "faccia ad accetta" per atrofia ed ipostenia dei muscoli temporali, masseteri e facciali), dei muscoli anteriori del collo (difficoltà a mantenere la testa eretta), flessori delle braccia e dorsiflessori dei piedi (piede cadente, con difficoltà a salire le scale). La miotonia (ritardato rilasciamento muscolare) può manifestarsi con difficoltà ad iniziare il movimento o difficoltà nel lasciare un oggetto dopo averlo afferrato
- I quadri avanzati si contraddistinguono per la presenza di marcate atrofie dei vari distretti muscolari
- I sistemi extramuscolari generalmente coinvolti sono: cuore, muscolo liscio, cristallino, SNC, cute, sistema endocrino
- La distrofia miotonica congenita è la forma più grave e si trasmette usualmente dalle madri affette alla discendenza (25%). Durante la gravidanza è comune una riduzione dei movimenti fetali attivi; alla nascita sono presenti: marcata debolezza muscolare e ipotonia, insufficienza respiratoria grave, che richiede ventilazione assistita, e ritardo dello sviluppo psicomotorio.

Diagnosi

Presentazione clinica tipica:

- Elevati valori di CK (creatinina chinasi)
- EMG: miotonia
- Diagnosi genetica: espansione di una tripletta CTG nel cromosoma 19q13.3, non si sa come questa espansione possa influenzare il funzionamento muscolare

Terapia

- Non esiste una terapia radicale, ma è attuabile un trattamento dei vari sintomi associati
- La fenitoina e la carbamazepina possono ridurre la miotonia
- I disturbi nella conduzione cardiaca possono talora giovare dall'applicazione di un pacemaker
- Particolare cautela va posta alle procedure anestesologiche per intervento chirurgico nei pz con DM, possono infatti sviluppare con facilità una miotonia generalizzata sino all'insufficienza respiratoria o avere aritmie cardiache anche gravi con l'uso di bloccanti depolarizzanti della giunzione neuromuscolare

RAPPORTI MENDELIANI DISATTESI

➤ COMBINAZIONE DI ALLELI DOMINANTI

La combinazione di 2 alleli dominanti può non essere vitale e alla nascita osservo soltanto una classe di omozigoti e gli eterozigoti

HH	Hh
Hh	hh

ESISTONO PIU' ALLELI

I geni non
agiscono da soli!

ES: very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency

Enzima prodotto dai mitocondri che fornisce energia al cuore ai muscoli volontari

- 2 alleli determinano morte nell'infanzia
- altri alleli consentono la produzione parziale di enzima e i sintomi sono attenuati

ESISTONO PIU' ALLELI

➤ PKU (phenylchetonuria)

(assenza enzima necessario alla rimozione dell'aa fenilalanina nel cervello)

Ci sono più di 300 alleli mutanti che si combinano per dare il fenotipo

➤ Fibrosi cistica:

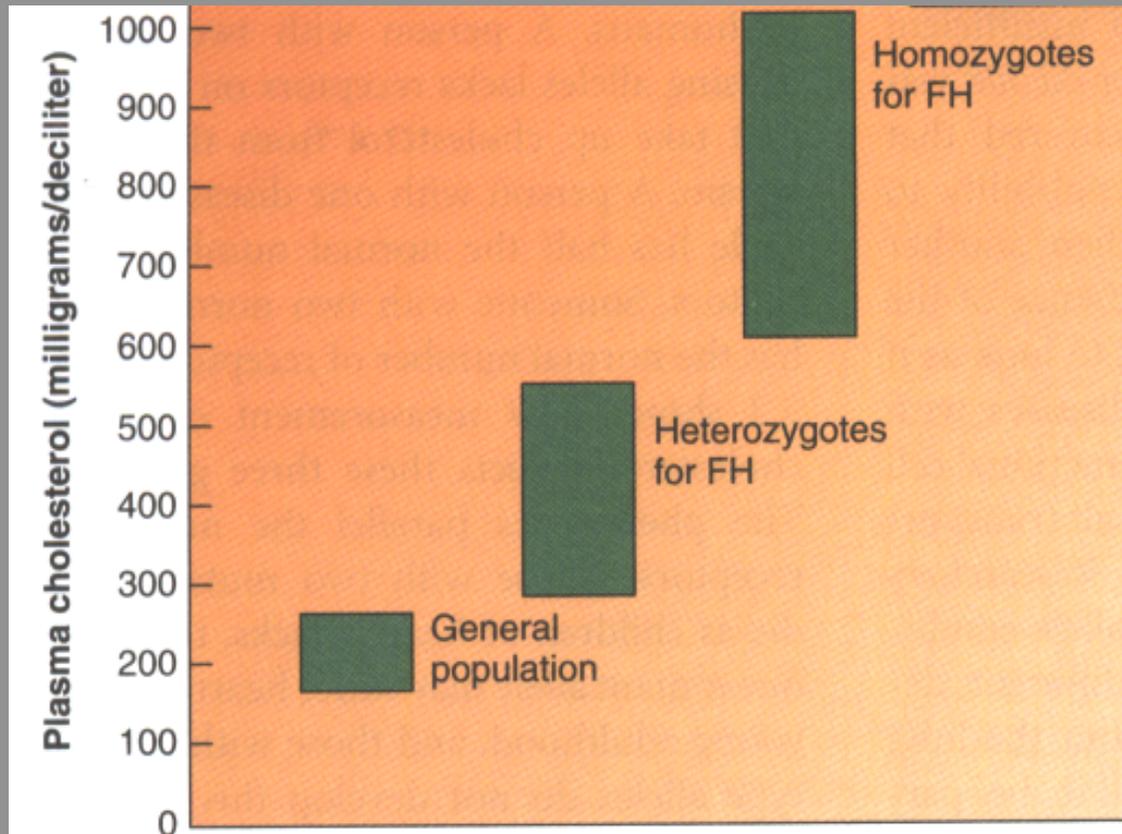
centinaia di mutazioni la cui combinazione causa sintomi diversi

DOMINANZA INCOMPLETA

- Il fenotipo degli eterozigoti è intermedio rispetto ai due omozigoti: sono espressi entrambi gli alleli!
- **Familial Hypercholesterolemia (FH)**
alleli che causano la perdita di recettori delle cellule epatiche che rimuovono il colesterolo dal sangue



Familial Hypercholesterolemia (FH)



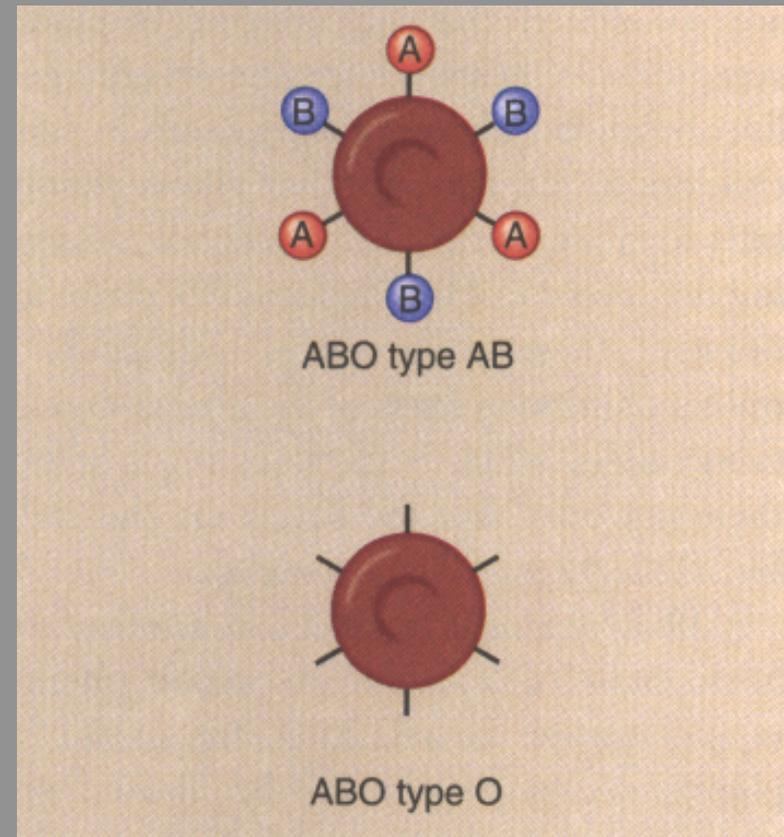
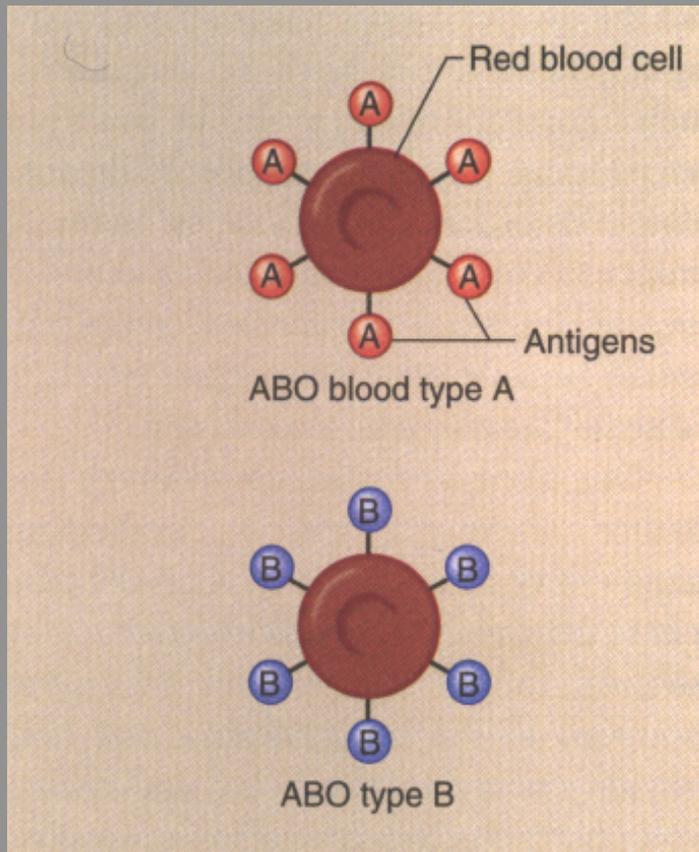
DOMINANZA INCOMPLETA

- Diversi alleli entrambi espressi

The ABO Blood Group		
Genotypes	Phenotypes	
	Antigens on Surface	ABO Blood Type
$I^A I^A$	A	Type A
$I^A i$	A	
$I^B I^B$	B	Type B
$I^B i$	B	
$I^A I^B$	AB	Type AB
ii	None	Type O

- Presenza sulla superficie dei globuli rossi di agglutinogeni A, B
- AB: riceventi universali
- O: donatori universali

DOMINANZA INCOMPLETA



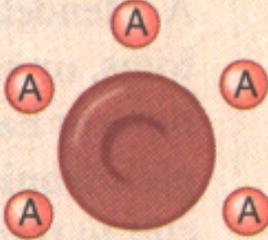
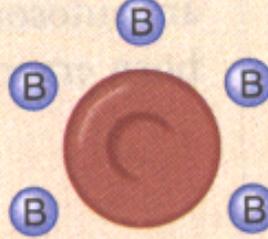
EPISTASI

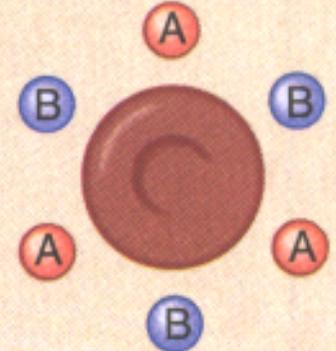
- Interazione tra più geni che determinano un fenotipo
- **ES: fenotipo Bombay**
(Interazione tra geni H e geni I)

L'allele H codifica per un enzima che inserisce una molecola di zucchero (antigene H) cui si legano gli antigeni A e B

L'allele h non inserisce lo zucchero e gli antigeni A e B non si legano

FENOTIPO BOMBAY

If person is <i>hh</i> :	Possible genotypes
	$I^A I^A hh$ $I^A i hh$
ABO type O	
	$I^B I^B hh$ $I^B i hh$
ABO type O	

	$I^A I^B hh$
ABO type O	
	$ii hh$
ABO type O	

ETEROGENEITA' GENETICA

DIVERSI GENI

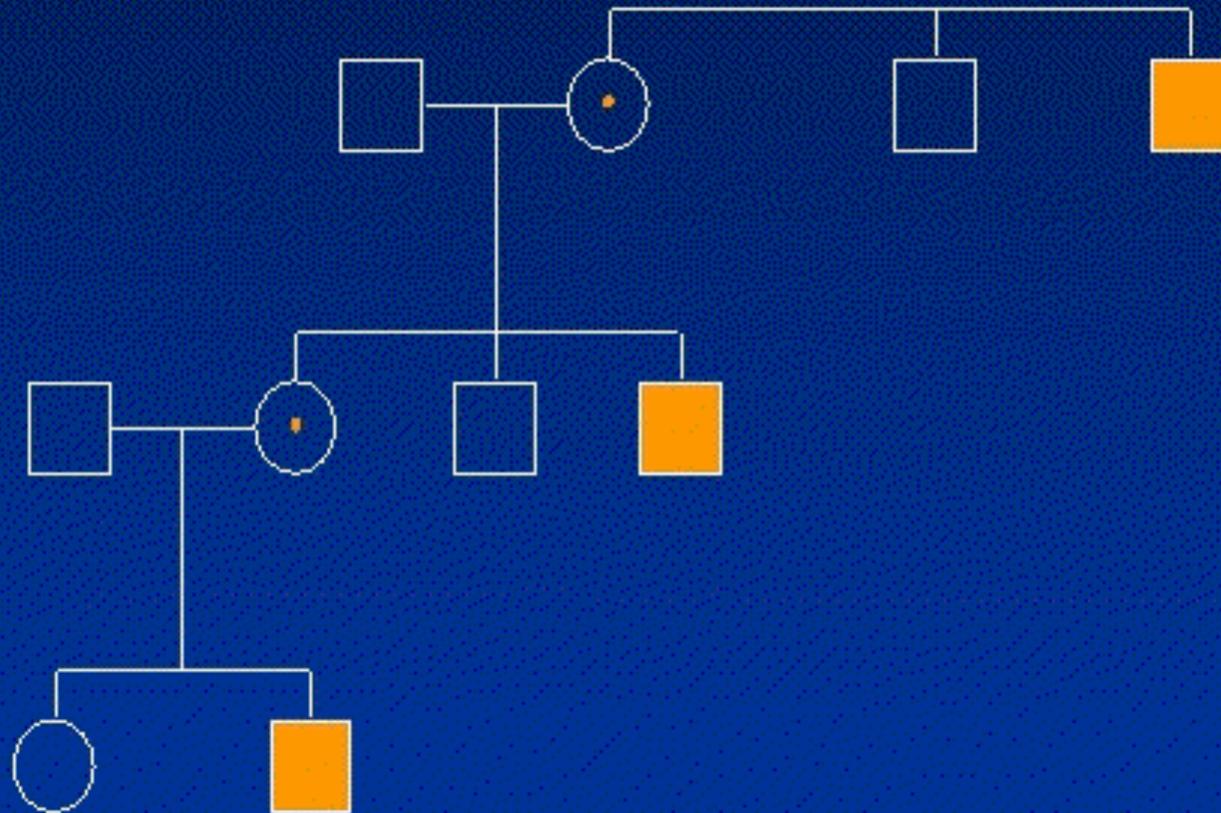
STESSA MALATTIA

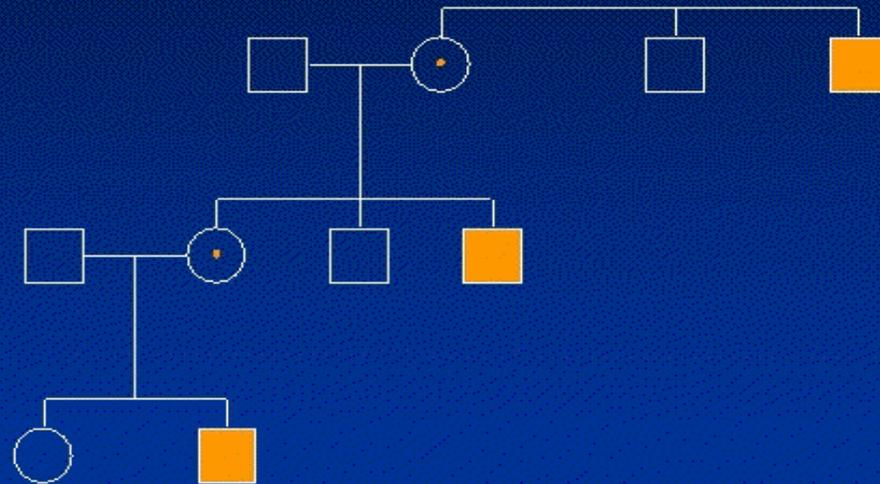
ETEROGENEITA' ALLELICA

DIVERSI ALLELI

MALATTIE DIVERSE

EREDITA' RECESSIVA LEGATA ALL'X

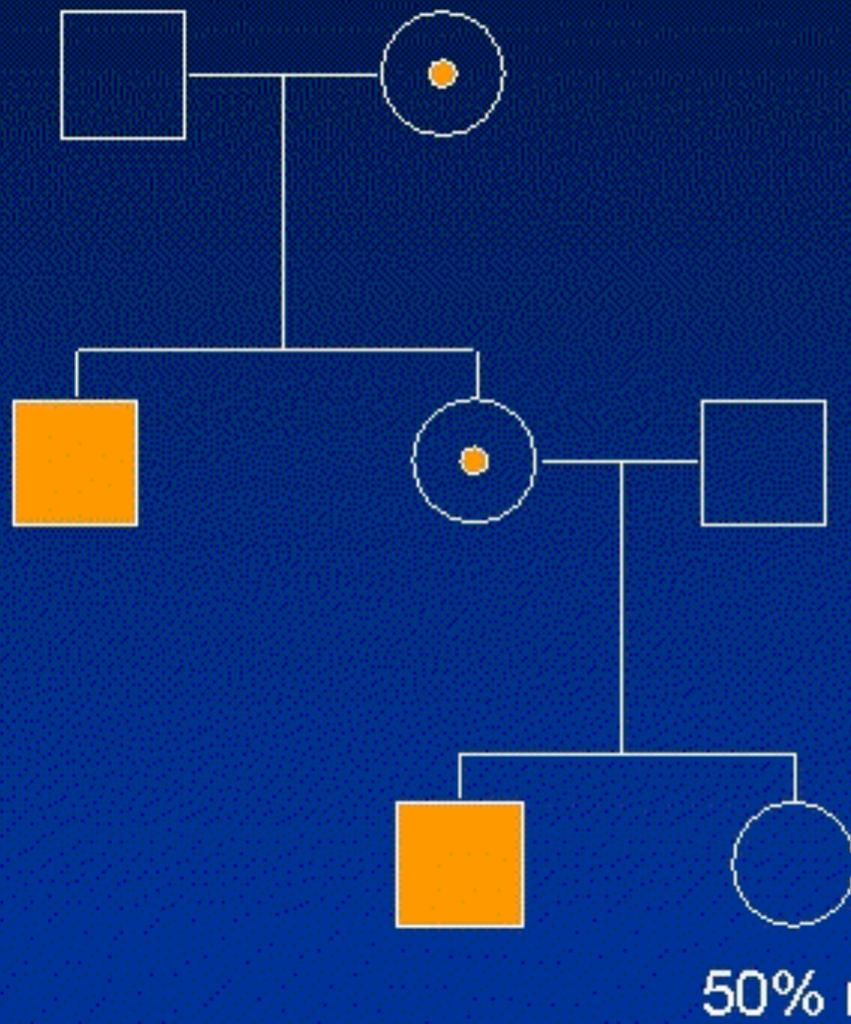




•Colpisce quasi esclusivamente i maschi

maschi affetti da mamme asintomatiche

il 50% dei figli di mamma portatrice risulterà affetto



sporadically-affected male

Distrofia muscolare di Duchenne-Becker

- 3/20.000 nati vivi (Duchenne)
- 3/200.000 nati vivi (Becker)
- XL recessivo
- La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e la sua forma allelica mite, distrofia muscolare di Becker (BMD), sono malattie muscolari caratterizzate da un decorso clinico cronico e progressivo e da una progressiva sostituzione fibroadiposa del muscolo (distrofia). Le distrofinopatie (DMD e BMD) rappresentano circa il 50% di tutte le distrofie muscolari e sono pertanto le più frequenti malattie degenerative del muscolo
- In un terzo dei casi si tratta di mutazioni de novo

Duchenne/Becker Dystrophy

- Duchenne
 - onset early childhood
 - proximal muscle weakness
 - wheelchair-bound in teens
 - progressive
- Becker
 - variable age of onset
 - variable rate of progression
 - muscle weakness/cramps
 - slowly progressive

Clinica DMD

I neonati nascono clinicamente normali e la debolezza muscolare diventa evidente fra i 3 e i 5 anni. In alcuni casi è evidente un ritardo nell'acquisizione delle tappe motorie.

Sintomi d'esordio comuni sono:

- Andatura “dondolante” (anserina, per la debolezza dei muscoli delle cosce e delle anche), sulla punta dei piedi
- Difficoltà nell'alzarsi da terra o dalla posizione seduta
- Difficoltà nella corsa
- Difficoltà nel salire le scale

La debolezza muscolare è progressiva e conduce alla perdita della deambulazione intorno ai 10-11 anni e al decesso per insufficienza cardiaca e/o respiratoria nella seconda- terza decade di vita. La DMD coinvolge, oltre al muscolo scheletrico, il muscolo cardiaco, il muscolo liscio, il SNC

Alla visita si può notare molto precocemente il peculiare aspetto “pseudoipertrofico” dei polpacci: sono voluminosi e alla palpazione risultano di consistenza aumentata, perché il tessuto muscolare viene sostituito dal tessuto fibroadiposo.

DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE: X-LINKED RECESSIVA



Clinica BMD

La BMD “classica” esordisce clinicamente intorno ai 7-8 anni. La distribuzione e l'andamento del difetto di forza ricalcano, in forma più lieve, quelli che si osservano nella DMD. L'esordio clinico si colloca abitualmente tra gli 8 e i 10 anni ma può essere molto variabile. La progressione della malattia è variabile, con possibilità di perdita della deambulazione fra i 20 e i 30 anni, decorso cronico sino alla completa asintomaticità.

In questa forma il coinvolgimento respiratorio è piuttosto raro e comunque non così severo come nella DMD. Il problema dominante è invece l'interessamento cardiaco (cardiomiopatia dilatativa): da esso dipende la sopravvivenza dei soggetti affetti. E' più raro e in ogni caso meno severo anche l'interessamento cognitivo

È presente una marcata variabilità nella presentazione clinica e nella progressione della malattia

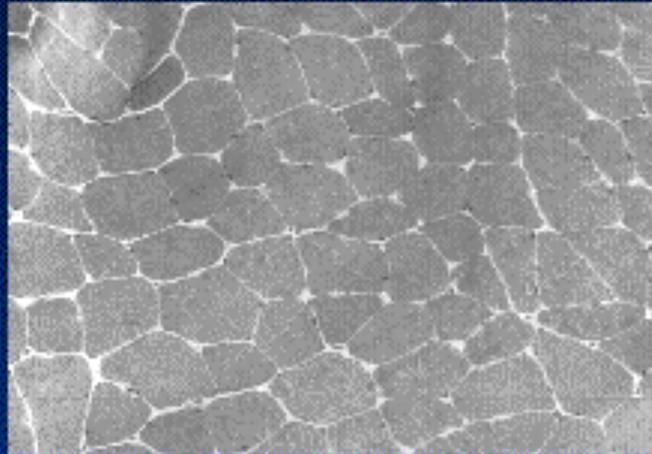
Sintomi d'esordio:

- Debolezza muscolare prossimale
- Mioglobinuria (urine color coca-cola)
- Crampi muscolari
- Mialgie
- Elevati livelli ematici di creatinina chinasi (CK)
- Ipertrofia o atrofia muscolare
- Cardiomiopatia (presente in circa il 70% dei pz, può essere l'unica manifestazione di malattia)

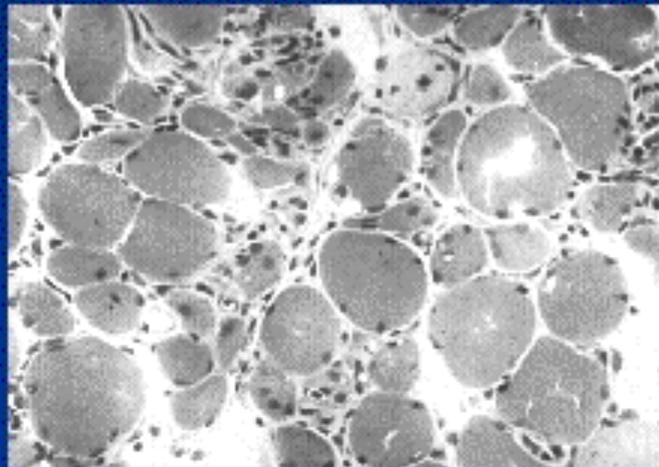
Diagnosi

- Esame clinico
- Livelli di CK (creatina chinasi) da 20 a 100 volte il normale alla nascita, poi diminuiscono col progredire della malattia per la perdita di tessuto muscolare
- EMG : miopatia
- Analisi del DNA
- Biopsia muscolare nei pz mutazione-negativi: i tessuti connettivo e adiposo prendono il posto delle fibre muscolari

Nella biopsia muscolare la distrofina risulta completamente assente nei DMD e alterata per quantità o per qualità nei BMD

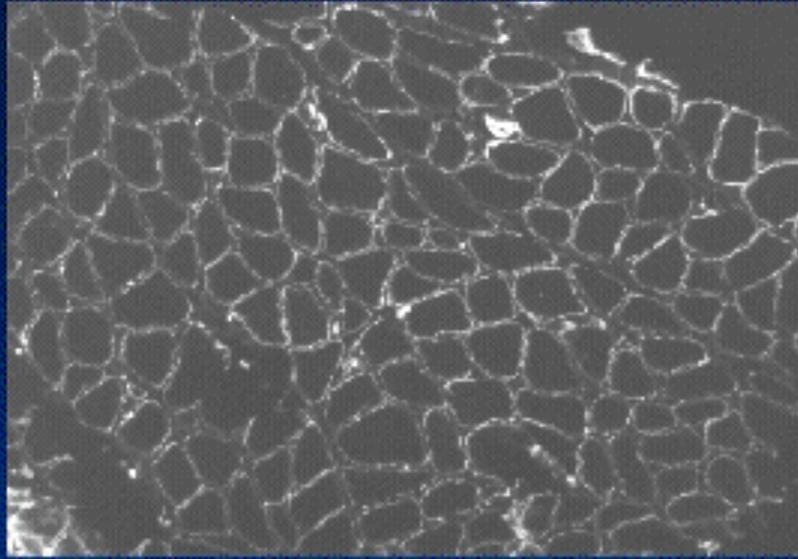


Normal muscle

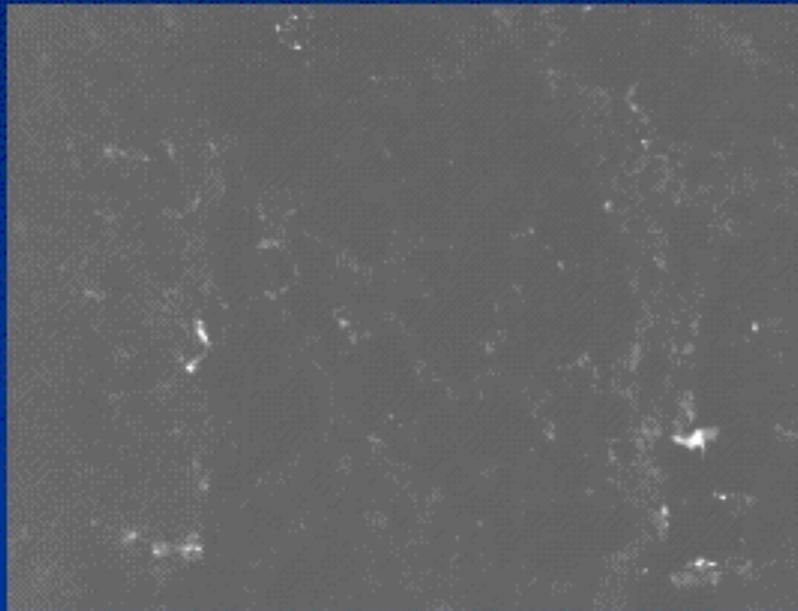


**Duchenne muscular
dystrophy muscle**

IMMUNOISTOCHEMICA: ANTICORPO ANTI-DISTROFINA

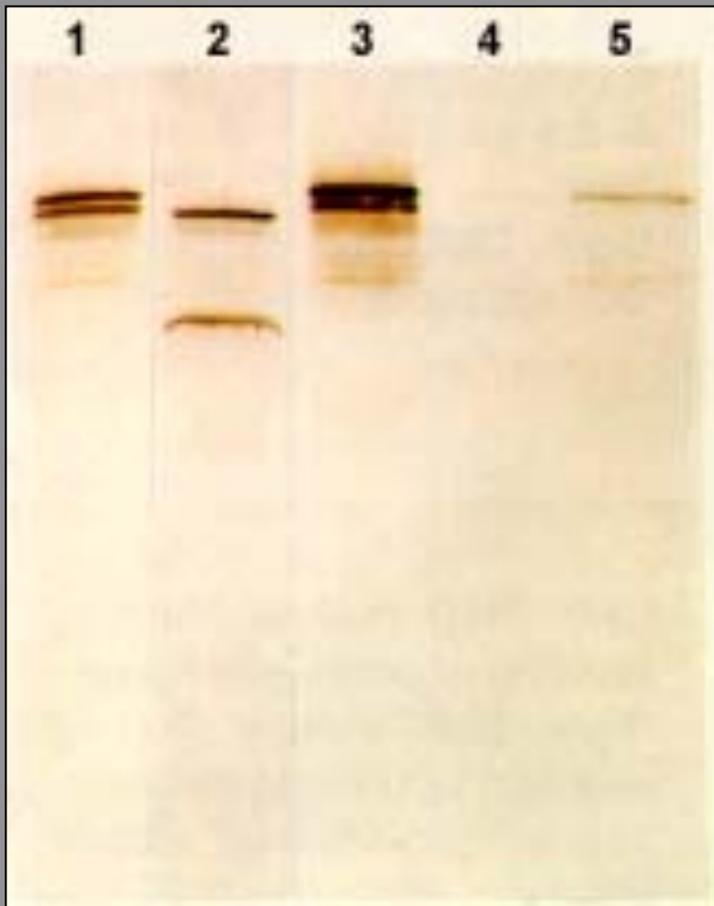


normal



DMD

Duchenne Muscular Dystrophy: Dystrophin recognition



Western blot of dystrophin from dystrophinopathies.

Lane 1: **Becker dystrophy**; Dystrophin has reduced abundance but normal size.

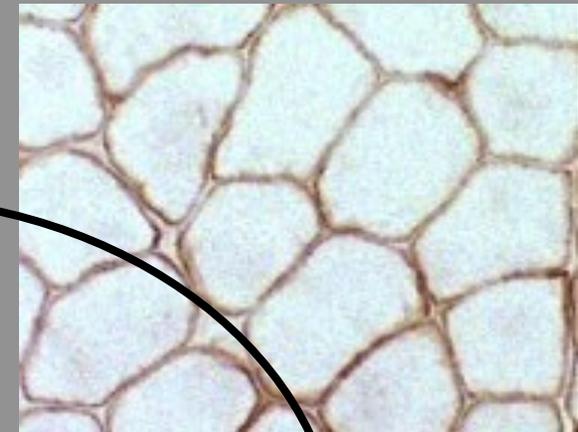
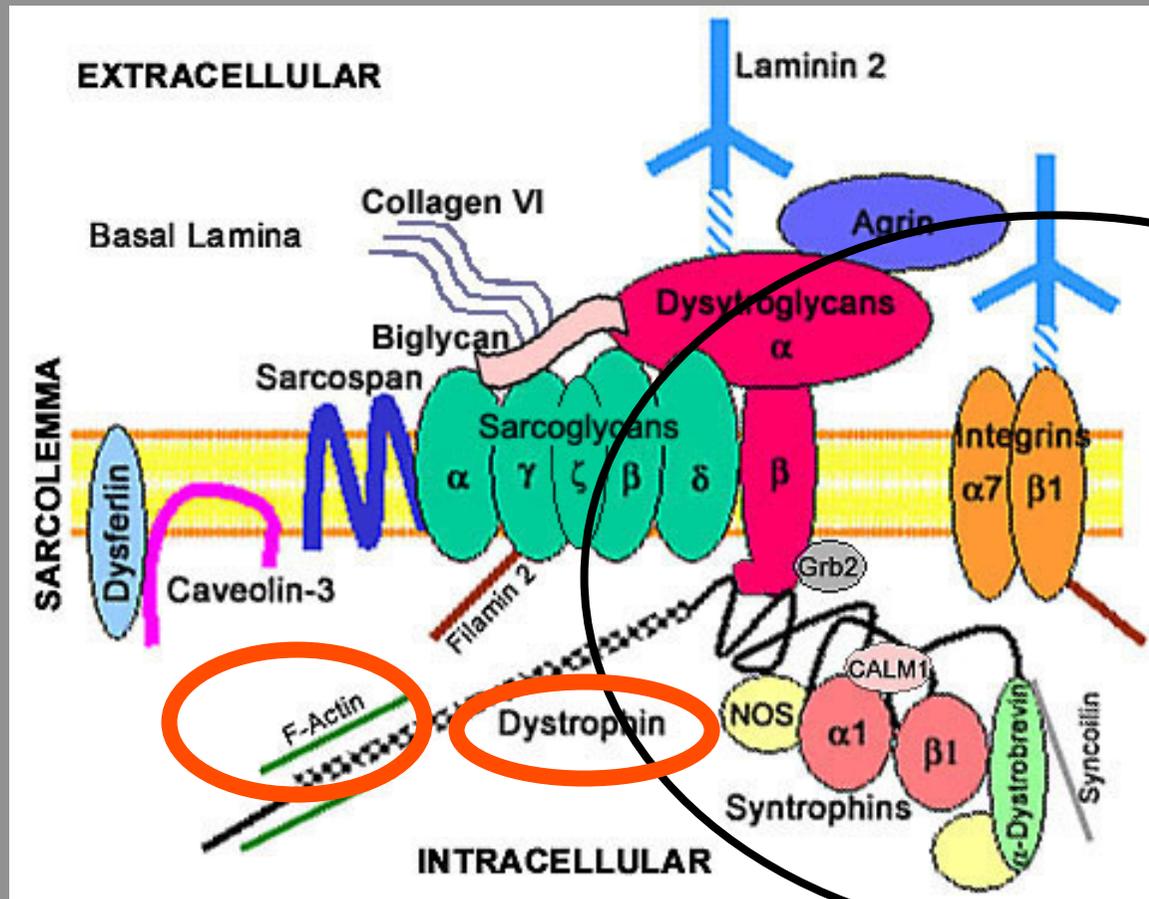
Lane 2: **Becker dystrophy**; Dystrophin has reduced size and abundance.

Lane 3: **Normal**; Dystrophin has normal size and amount.

Lane 4: **Duchenne dystrophy**; Almost no protein is present.

Lane 5: **Duchenne outlier**; Dystrophin has severely reduced abundance.

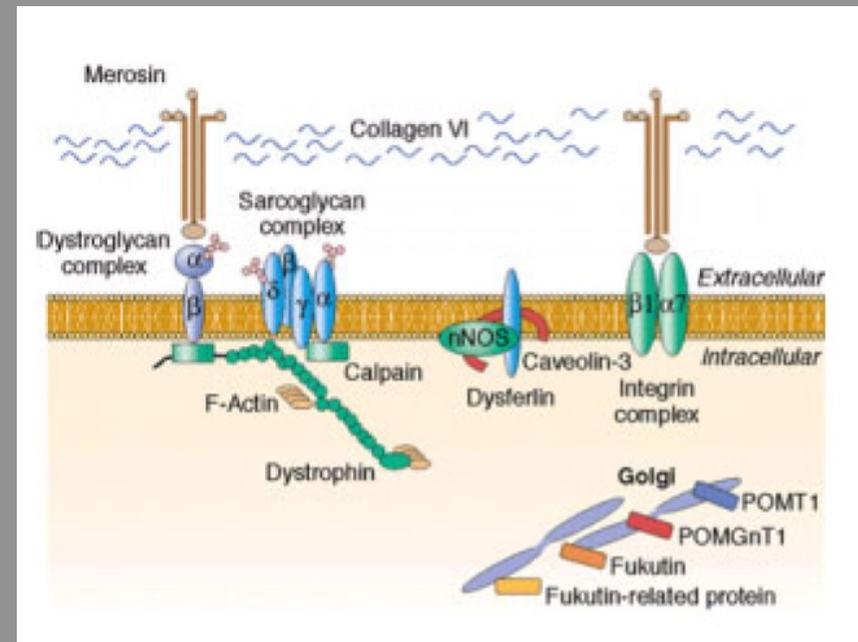
MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEIN COMPLEXES IN SKELETAL MUSCLE FIBERS

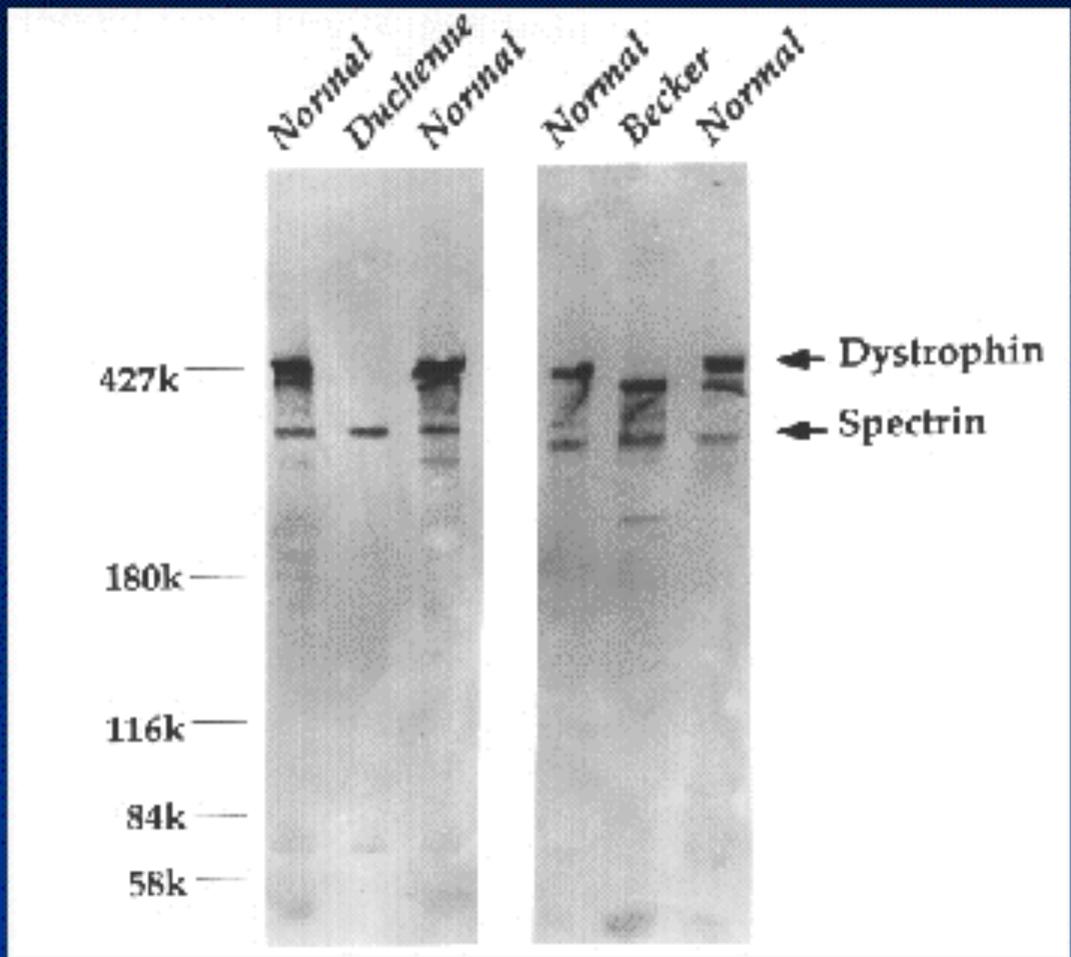


Costameres

Extrajunctional muscle membrane Associated proteins

- La *distrofina* è parte integrante di un complesso glicoproteico rappresentato fundamentalmente dal *distroglicano* e dal *sarcoglicano*. Quest'ultimo è a sua volta costituito da almeno quattro componenti (detti *alfa*, *beta*, *gamma* e *delta-sarcoglicano*), i cui difetti causano altrettante forme di distrofia muscolare dei cingoli.
- Il complesso *distrofina-glicoproteine associate* fa parte poi di un'ampia famiglia di proteine che costituiscono il *citoscheletro*, cioè l'"intelaiatura di sostegno" della fibra muscolare.
- Il tessuto normale contiene piccole quantità di distrofina (circa lo 0.002% della quantità totale delle proteine muscolari),





Terapia

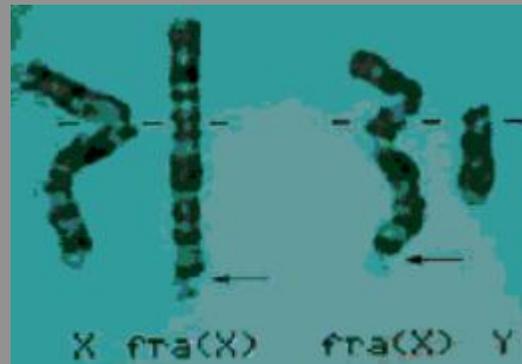
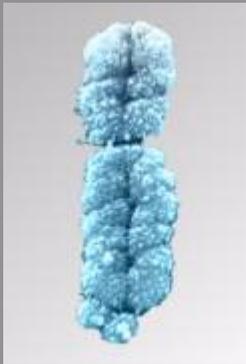
- Una cura risolutiva della malattia non esiste
- Vari interventi possono migliorare la qualità di vita del pz (tutori)
- Sia il trapianto di mioblasti che la terapia genica sono attualmente in fase sperimentale
- L'unico trattamento farmacologico palliativo che abbia mostrato qualche utilità nel rallentare la progressione di malattia è attualmente la terapia steroidea (prednisone e deflazacort)

Sindrome X-fragile

- E' la più comune forma di ritardo mentale dopo la sindrome di Down. Descritta per la prima volta da Martin e Bell (1943).
- 1/4000 maschi; femmine portatrici 1/50

Sindrome X-fragile

Il nome “X-Fragile” deriva dal fatto che la mutazione del DNA provoca una modificazione della struttura del cromosoma X che visto al microscopio presenta una “strozzatura” nella regione terminale del cromosoma X (q27.3), dove è situato il gene FMR1.



Colpisce molto più frequentemente i maschi rispetto alle femmine: infatti queste ultime possedendo 2 cromosomi X hanno anche una copia del gene che può funzionare correttamente. Lo sviluppo mentale delle persone affette da FraX è molto vario. Alcune mostrano capacità cognitive quasi normali, altre un lieve ritardo mentale, altre ancora un ritardo mentale più grave.

Sindrome X-fragile

- **Ritardo cognitivo**
- Il primo segno della malattia è il ritardo nello sviluppo psicomotorio, in particolare nell'apprendimento del linguaggio. Il ritardo mentale è di grado variabile e spesso si associa ad anomalie comportamentali come irrequietezza, instabilità psicomotoria e incapacità a fissare l'attenzione. Queste caratteristiche persistono con l'avanzare dell'età.
- **Anomalie nel comportamento**
- Il comportamento delle persone affette da FraX può andare da un carattere estroverso e sociale a comportamenti simili all'autismo (iperattività, incapacità di fissare negli occhi gli altri, avversione all'essere toccati, comportamento stereotipato).
- A volte possono manifestarsi anche episodi convulsivi.
- **Caratteristiche fisiche**
- Molte persone affette da FraX hanno tratti somatici tipici: viso stretto e allungato con fronte e mandibola prominenti, orecchie più grandi e più basse della media e, nei maschi, ingrossamento dei testicoli (macrorchidismo). Le persone affette da FraX possono presentare anche altri sintomi, come l'iperestensibilità delle articolazioni, il piede piatto e il prollasso della valvola mitrale (un'anomalia di una valvola cardiaca).

Sindrome X-fragile

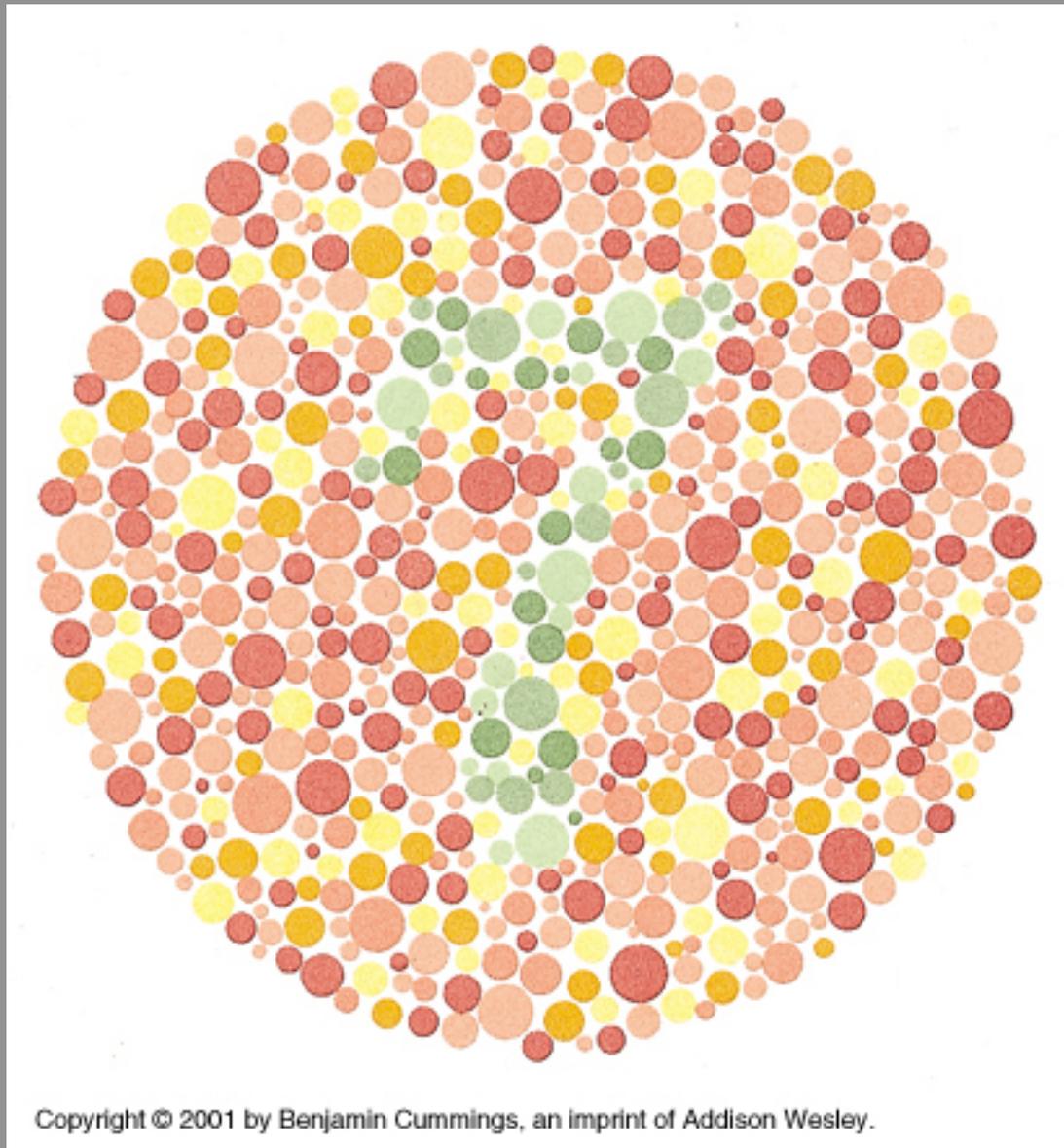
- **Caratteristiche fisiche**
- Molte persone affette da FraX hanno tratti somatici tipici: viso stretto e allungato con fronte e mandibola prominenti, orecchie più grandi e più basse della media e, nei maschi, ingrossamento dei testicoli (macrorchidismo). Le persone affette da FraX possono presentare anche altri sintomi, come l'iperestensibilità delle articolazioni, il piede piatto e il prolasso della valvola mitrale (un'anomalia di una valvola cardiaca).



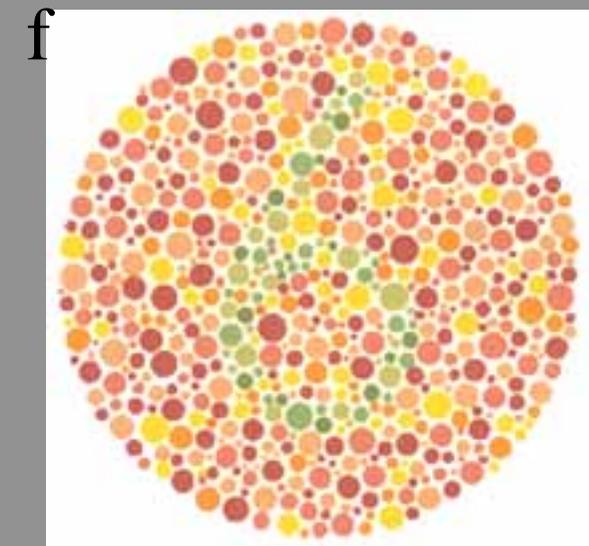
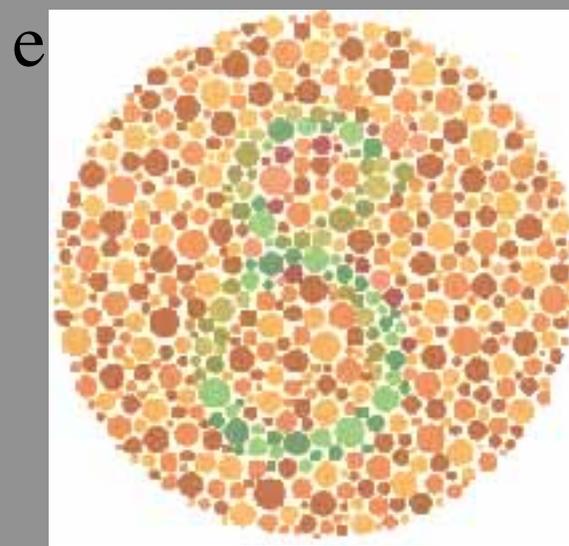
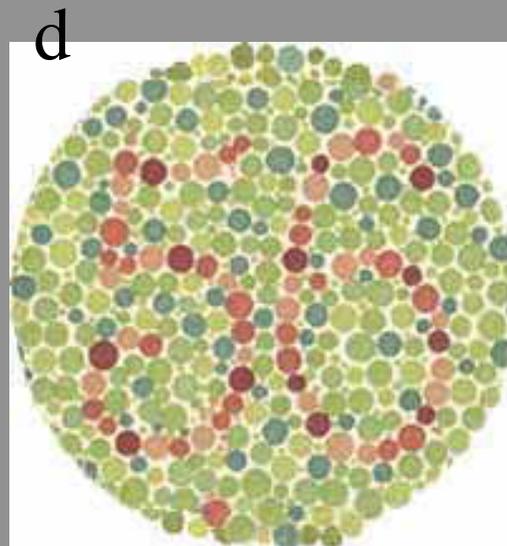
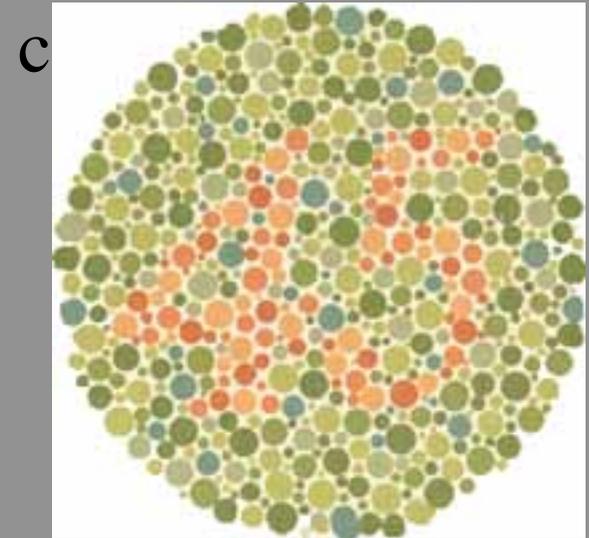
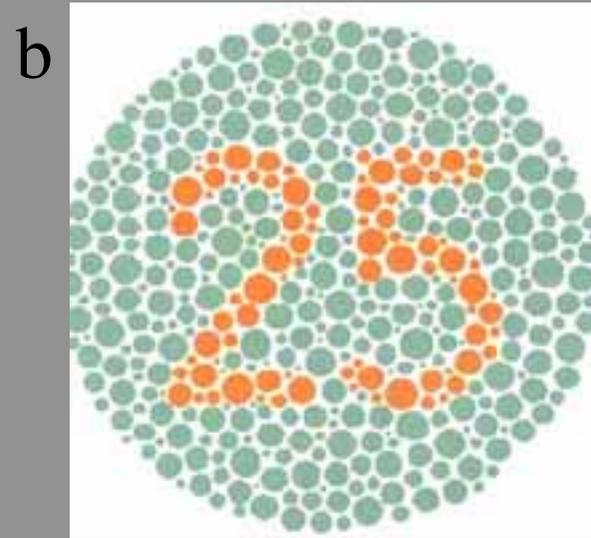
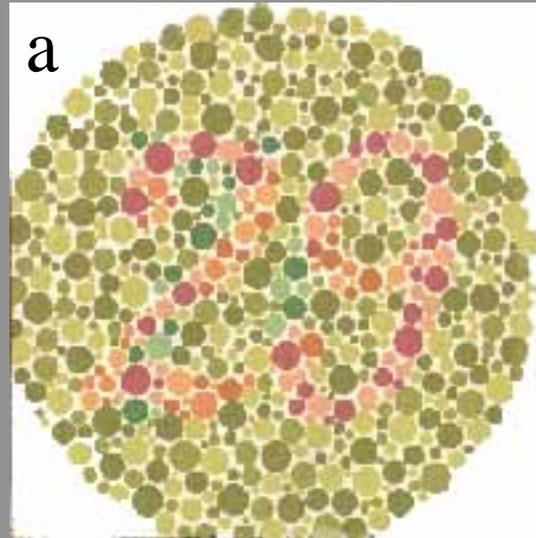
Sindrome X-fragile

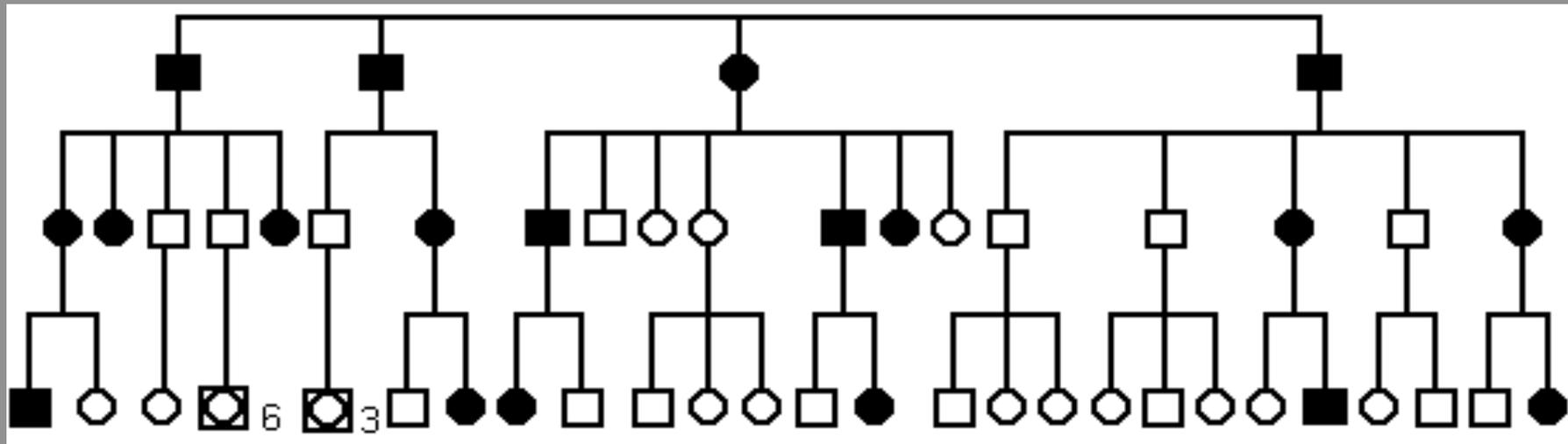
- La modalità di trasmissione della FraX presenta alcune caratteristiche peculiari. Infatti essendo il gene FMR1 localizzato sul cromosoma X, la malattia si manifesta in modo diverso nei due sessi:
- I maschi con la mutazione completa sono affetti, mentre circa la metà delle femmine con la mutazione completa presenta i sintomi della malattia.
- Maschi e femmine portatori della premutazione sono clinicamente normali.
- Nel passaggio alle generazioni successive la premutazione tende ad espandersi: le ripetizioni CGG aumentano di numero e quando superano le 200 copie diventano mutazione completa.
- E' da sottolineare che la tendenza all'espansione della sequenza ripetuta CGG si verifica solo quando la premutazione è trasmessa dalla madre: pertanto, poichè durante la maturazione dell'ovulo materno o nelle prime fasi della crescita embrionale, la premutazione può espandersi a mutazione completa, una madre portatrice sana avrà il rischio del 50% di avere dei figli maschi affetti e del 50% di avere delle femmine con la mutazione completa metà delle quali presenterà i sintomi della malattia.

Daltonismo



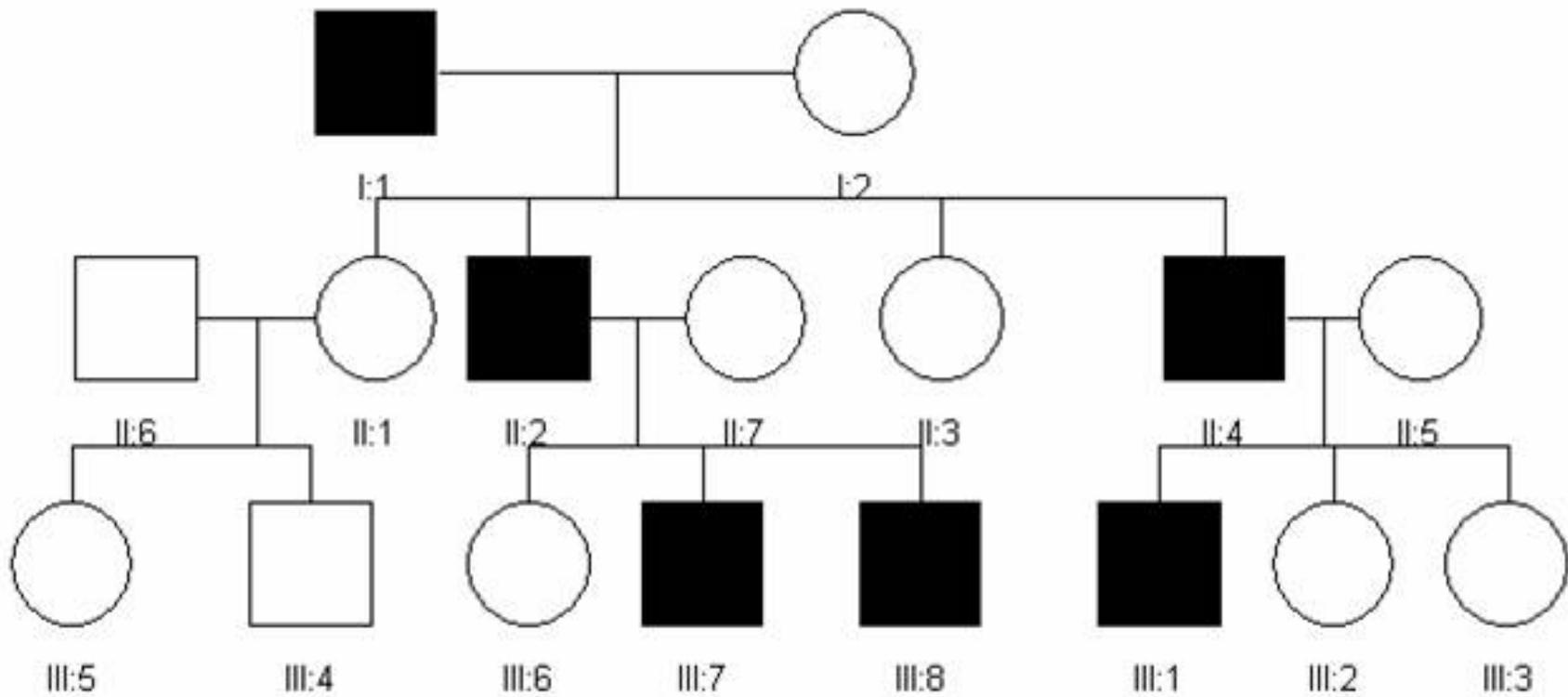
Daltonismo

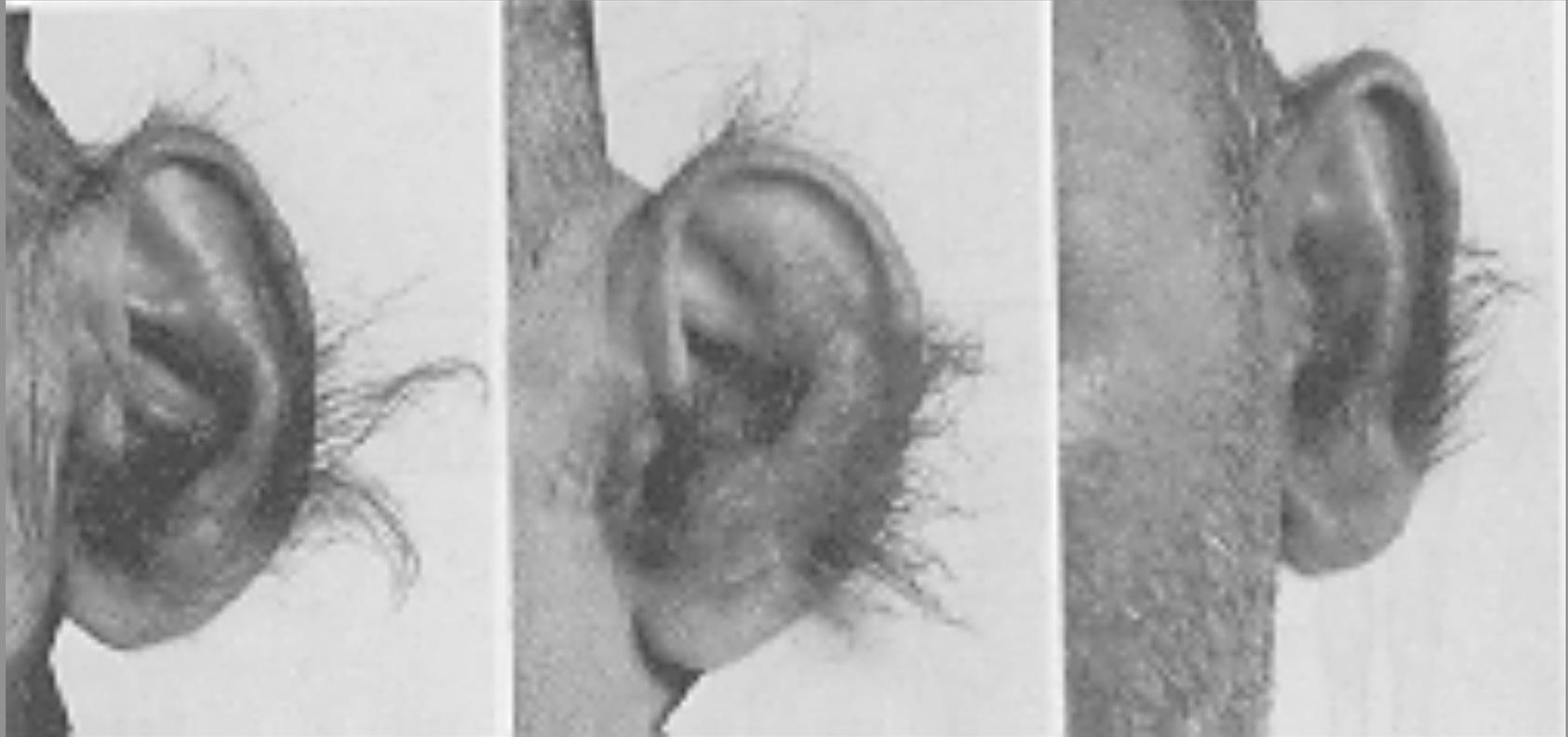


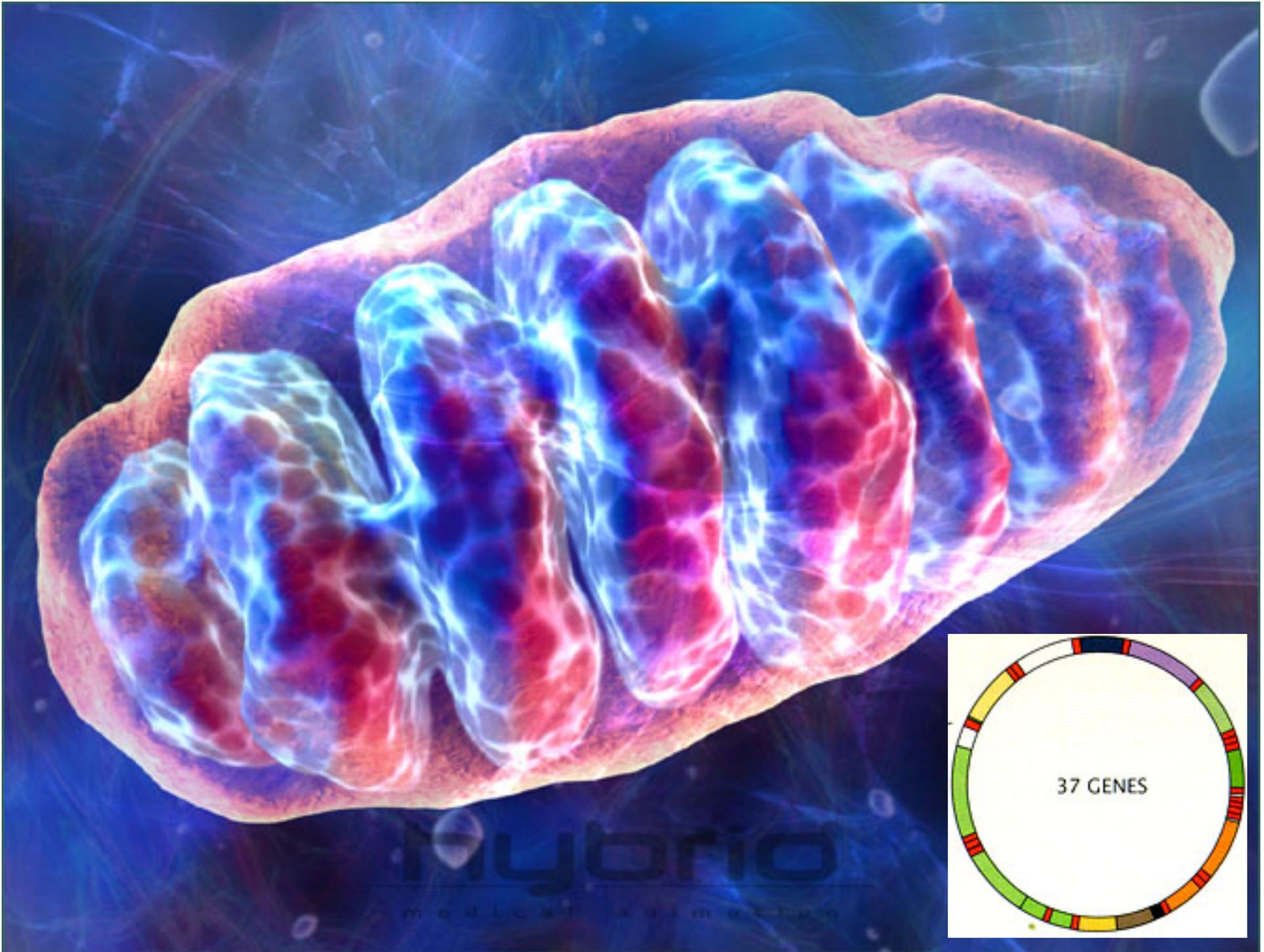


- Se un tratto legato alla X è dominante, il carattere sarà trasmesso direttamente dai padri a tutte le figlie femmine, ma mai da padre a figlio.
- Se un tratto legato alla X è recessivo, madri omozigoti (affette) trasmetteranno il carattere a tutti i figli maschi, mentre le madri portatrici (eterozigoti) trasmetteranno il carattere alla metà dei figli.
- Padri affetti non trasmettono mai il carattere ai figli maschi.

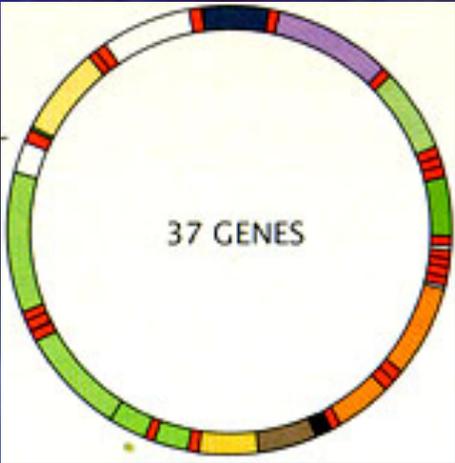
EREDITA' LEGATA ALL'Y

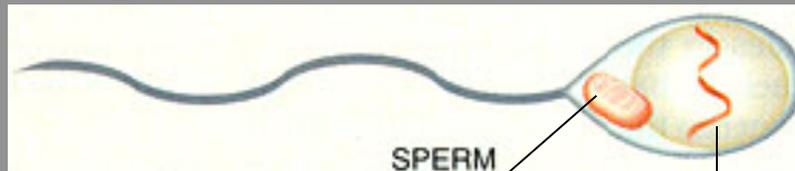






Hybriio
medical xai m e t l u o

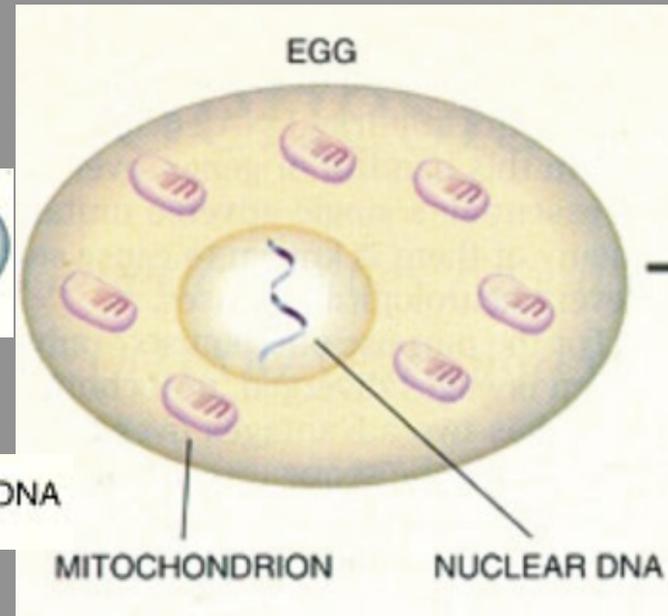




SPERM

MITOCHONDRION

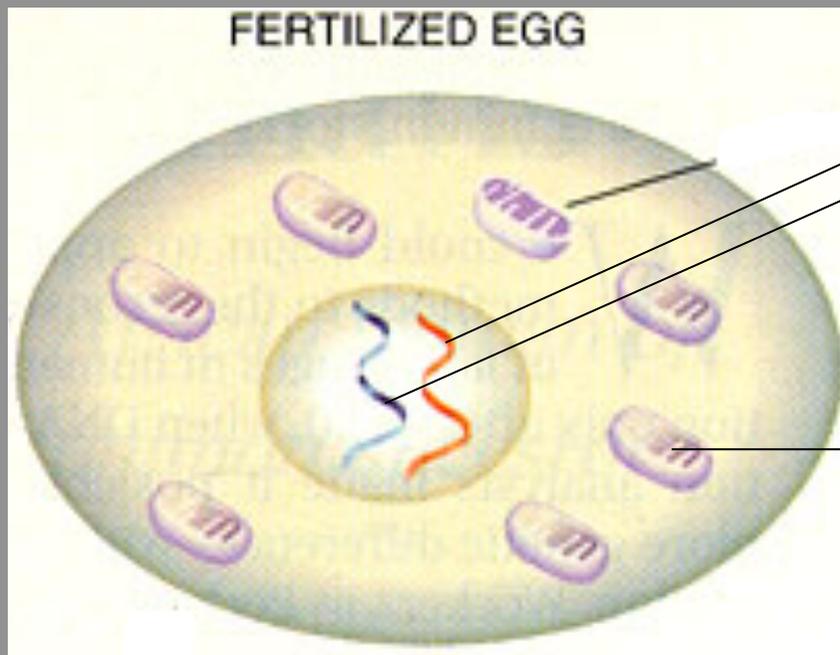
NUCLEAR DNA



EGG

MITOCHONDRION

NUCLEAR DNA



FERTILIZED EGG

Il DNA nucleare riceve il contributo di entrambi i genitori

Il DNA mitocondriale riceve il contributo esclusivo della madre

Eredità Mitochondriale

- I mitocondri Pt sono selettivamente distrutti nello zigote
- Diluiti con i mitocondri dell'ovocita
- Raramente osservazioni di mitocondri paterni sono stati osservati
- Le femmine con una mutazione trasmetteranno la stessa a tutti i figli
- Non tutti i figli manifesteranno il fenotipo-malattia
- I maschi affetti e i portatori non trasmetteranno la mutazione a nessuno dei loro figli

Eredità Mitochondriale

- In condizioni normali tutto il DNA mitocondriale di un individuo è omogeneo, l'insorgenza di una mutazione può portare alla presenza contemporanea di due DNA mitocondriali diversi. Quando il genotipo mutato prende il sopravvento su quello "selvatico" si può avere la comparsa della malattia, per questo la maggior parte delle malattie mitocondriali si manifestano in età adulta e presentano un'ampia variabilità clinica anche all'interno di una stessa famiglia

MALATTIE MITOCONDRIALI

Sindrome di Leigh

malattia infantile spesso letale contraddistinta dalla degenerazione progressiva delle facoltà visive, uditive e motorie

Encefalomiopatia mitocondriale, epilessia, acidosi lattica e apoplezia (EMALA o MELAS, all'anglosassone)

disfunzione di alcune aree cerebrali che causa epilessia, ipoacusia, ritardo nello sviluppo, paralisi regionale transitoria e demenza insieme a un accumulo di acido lattico

Epilessia a fibre stracciate

epilessia, atassia, sordità e demenza, ipostenia muscolare

Neuropatia, atassia e retinite pigmentosa (NARP)

oltre ai disturbi da cui prende il nome, sono presenti spesso anche demenza e ipostenia

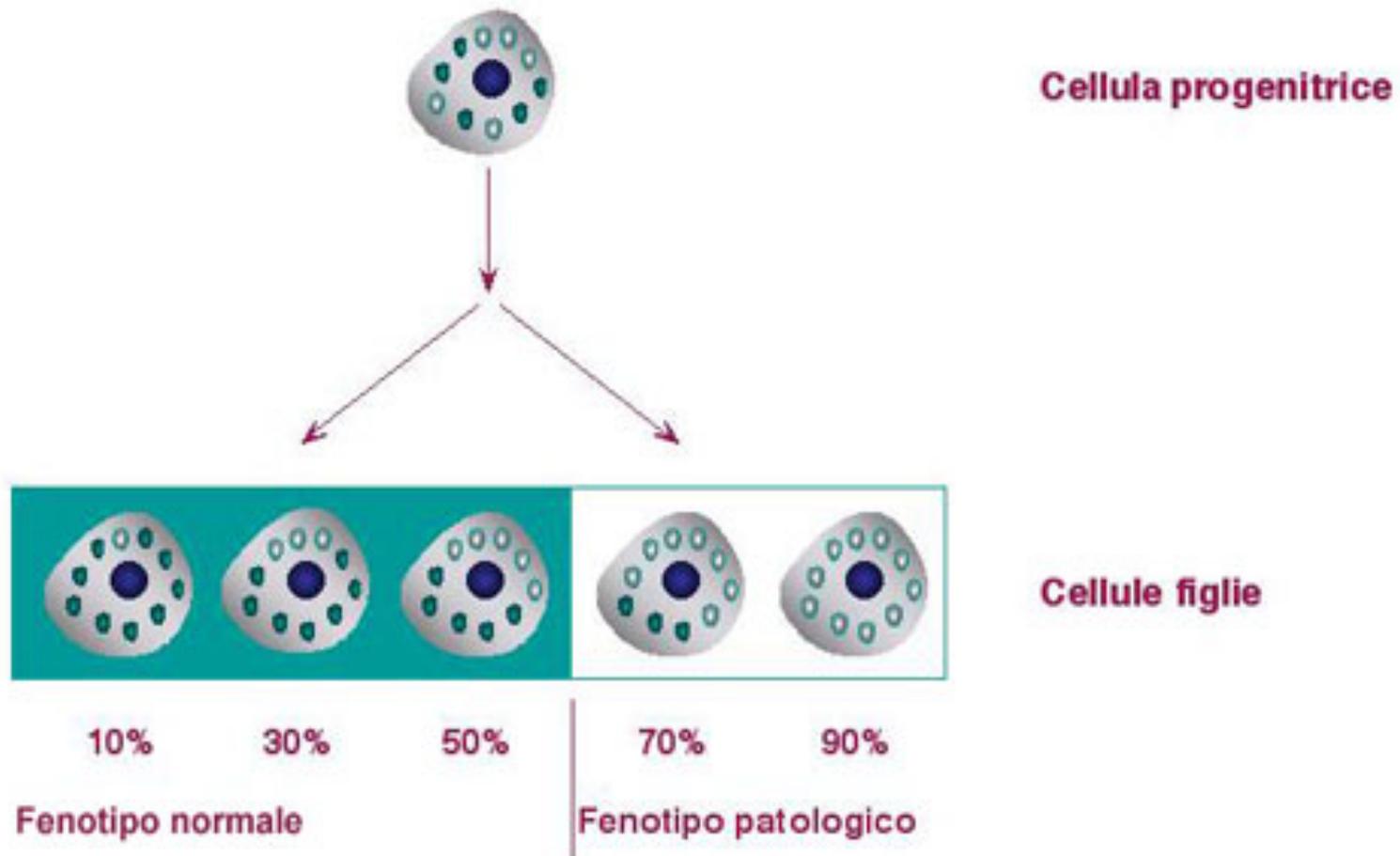
Neuropatia ottica di Leber (NOEL)

tipica dell'età adulta, comporta la perdita progressiva della vista a causa dei danni al nervo ottico, insieme a difetti nella conduzione cardiaca

MALATTIE MITOCONDRIALI

- **Sindrome di Kearns-Sayre**
simile alla NOEL ma tipica dell'età giovanile, è anche contraddistinta da un accumulo di proteine nel liquido cerebrospinale. Sono inoltre comuni il ritardo mentale, i disturbi endocrini quali il diabete e l'insufficienza renale
- **Sindrome di Pearson**
disfunzione del midollo osseo dell'età infantile, di solito fatale che prevede anemia, insufficienza pancreatica, epatica e renale e, tra i sopravvissuti, l'instaurarsi della sindrome di Kearns-Sayre
- **Miopia oculare pura**
è una delle forme meno gravi in quanto circoscritta ai muscoli oculari e caratterizzata da ptosi palpebrale bioculare a partire dall'infanzia o dall'adolescenza
- **Diabete mellito**
a una mitocondriopatia viene attribuita una percentuale di diabete mellito attorno all'1,5 per cento dei casi
- **Malattia di Alzheimer**
il cinque per cento circa dei malati anziani presenta la stessa mutazione del DNA mitocondriale
- **Cancro**
è recente la scoperta di una anomalia del DNA mitocondriale in una forma di tumore cerebrale ereditario molto aggressivo, il paraganglioma

Effetto soglia: basi genetiche



Mito Facts

Structure

Double-stranded, circular molecule: Except for D-loop which is triple stranded (Contains extra 7S DNA)

16,569 nucleotide pairs

Copies

2 to 10 in each mitochondrion

Polyplasmmy: > 1,000 in each cell

Strands

Heavy (H) strand: Rich in guanines; 28 genes

Light (L) strand: Rich in cytosines; 9 genes

mtDNA encodes for 37 [genes](#)

Peptides

Encodes 13 of mitochondrial peptide subunits

All 13 peptides are in

[mitochondrial respiratory-chain complex](#) (OXPHOS)

Remaining > 67 OXPHOS subunits are nuclear encoded

rRNAs: 2

tRNAs: 22; Located between every 2 rRNA or Protein coding genes

Other mitochondrial proteins encoded by [nuclear DNA](#)

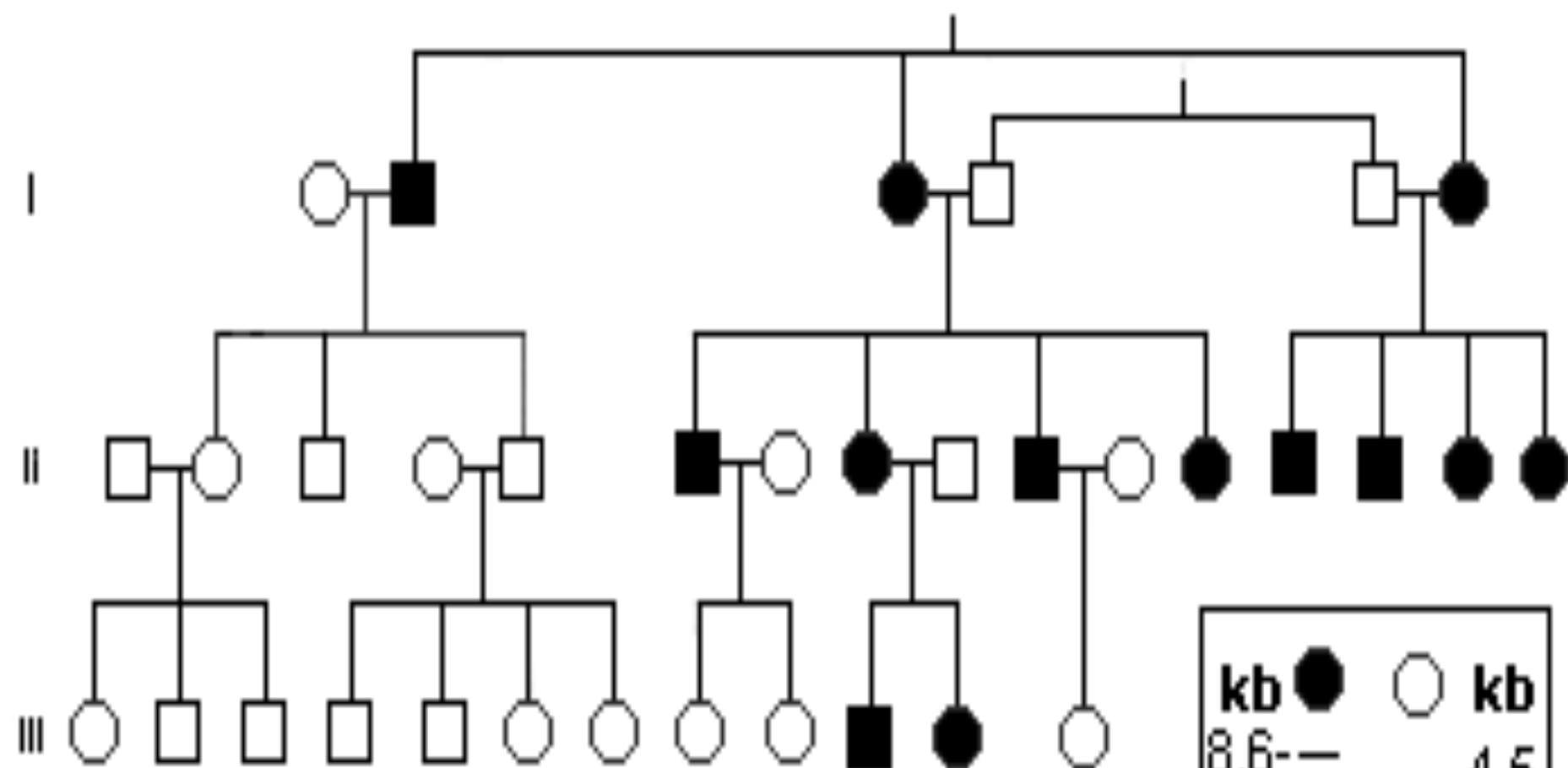
Mito Facts

Mitochondrial DNA variation

- Normal: Homoplasmy; All copies of mtDNA are identical within coding region
- Heteroplasmy: Single cells contain different mtDNA populations
 - Occurs with some mtDNA mutations
 - Due to presence of multiple mitochondria in one cell, each containing several mtDNA copies
 - Produces tissue variation
 - Post-mitotic tissues
 - Usually contain highest levels of mutated mtDNA
 - Neurons; Skeletal & Cardiac muscle; Endocrine tissue
 - Mutations in mtDNA
 - % vs normal in mtDNA can vary widely among tissues in an individual
 - Mutational loads may change over time
 - Tissues are differentially sensitive to levels of mtDNA mutations: ? Related to oxidative energy requirements

Differences from nuclear DNA

- No introns
- Small intergenic spacing: Coding sequences of most genes are contiguous or separated by 1 or 2 bases
- Codon sequences
 - Different start, stop & arginine, tryptophan, isoleucine
 - Some mitochondrial genes lack termination codon: Insertion of UAA at the transcriptional level instead
- Replication of mtDNA
 - Rapid rate
 - Lacks proofreading
 - Mutation rate 10 to 100x > than nuclear DNA
- Mitochondria lack an adequate DNA-repair mechanism



**Hae II restriction enzyme polymorphism
in mitochondrial DNA (16.4kb)**