

Cosa significa ricerca delle mutazioni.

Intanto bisogna chiarire il significato del termine, o meglio ricordare il significato del termine. Vi ricordo che mutazione significa semplicemente variazione di una sequenza confrontata con una sequenza di riferimento. Da questo ne consegue che mutazione non vuol dire che ci sia un effetto patologico. Vi ricordo la definizione di polimorfismo: **variazione presente nella popolazione con una frequenza superiore a 1%**. Per definizione un polimorfismo è innocuo, almeno finché non si dimostra il contrario.

Le tecniche per evidenziare le mutazioni patogene si distinguono in due categorie:

- ☞ Ricerca di mutazioni note (genotyping: genotipizzazione)
- ☞ Ricerca di mutazioni nella regione di interesse (mutation scanning)

Naturalmente non si parla solo di mutazioni puntiformi, ma anche di mutazioni genomiche come riarrangiamenti submicroscopici, di alterazione quantitative di geni e/o prodotto genico, di difetti di metilazione, di alterazioni cromosomiche identificabili al microscopio con le tecniche standard o con la citogenetica molecolare (FISH).

Dal punto di vista diagnostico è necessario sottolineare che ogni volta che si sceglie una tecnica bisogna considerare due punti fondamentali:

- ☞ Sensibilità della tecnica: quante mutazioni posso evidenziare, la possibilità di discriminare fra linee cellulari mutate e linee normali (per es. nei tumori)

☞ Specificità della tecnica: quanti sono i falsi positivi e i falsi negativi
Va anche tenuto in conto il rapporto costo/beneficio, il tempo di risposta.

Le tecniche vanno scelte caso per caso in relazione a quello che si sa della patologia in studio, al caso che si sta studiando, alla struttura della famiglia in relazione al modello di trasmissione della malattia, alla possibilità di mosaicismi, al perché si fa la diagnosi (conferma diagnostica, ricerca degli eterozigoti, diagnosi prenatale...). Per una particolare famiglia può non bastare l'approccio standard e bisogna cambiare strategia ricorrendo a tecniche aggiuntive.

Per chiarire il concetto di sensibilità e specificità: una tecnica come il test delle proteine troncate permette di riconoscere se, a causa della presenza di codoni di stop (non senso), si ha un prodotto più corto. Dal momento che questo tipo di mutazioni sono quasi sicuramente patogenetiche questo test è altamente specifico.

Questo test però, non mi permette di vedere le mutazioni missenso quindi è meno sensibile dell' DHPLC denaturante, D'altra parte DHPLC non discrimina fra le patogenetiche e i polimorfismi, quindi è meno specifico ai fini della diagnostica.

Il sequenziamento della regione mi permetterebbe di vedere le non senso e le missenso consentendo di discriminare fra polimorfiche e patogenetiche.

Allora perché non sequenziare subito la regione di interesse? Perché non è un procedimento né breve né economico, rimane indubbiamente un mezzo ottimo quando gli altri sistemi si sono rivelati inefficaci o ambigui e comunque trovare variazioni nella sequenza non vuol dire aver trovato la mutazione patogenetica ci sono sempre i polimorfismi. quindi bisogna tenere presente che se si trova una mutazione ci sono diverse possibilità:

- ☞ Mutazione mai descritta in letteratura, ma che potrebbe essere patogenetica (il meccanismo di azione del prodotto è noto): è presente in altri soggetti sani

della famiglia?

- ☛ Mutazione mai descritta in letteratura, con effetto ignoto sulla funzionalità: e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ☛ Mutazione mai descritta in letteratura, ma il cui effetto si ritiene innocuo sulla funzionalità: e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ☛ Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere innocuo sulla funzionalità

Ovviamente dipende da come si risponde alle domande. Se la risposta e' SI a tutte, significa che non si e' trovato niente di chiaramente patogenetico.

Dal momento che il probando e' chiaramente ammalato potrebbe trattarsi di una diagnosi errata oppure ci si trova di fronte ad una mutazione di un locus il cui prodotto interagisce con il primo, concorrendo allo svolgimento della funzione. Ci si trova cioe' di fronte ad un caso di eterogeneita' di locus: fenotipi clinicamente simili, ma dovuti a mutazioni patogenetiche di locus diversi.

Esclusa questa possibilita' potrebbe trattarsi di un problema nella maturazione dell' RNA: splicing alternativi per mutazioni negli introni....

Mutazioni identificate come patogenetiche

Dal 1979 quando e' stata descritta la prima sostituzione di base come causa di malattia (beta talassemia), circa 100.000 mutazioni patogenetiche sono state identificate a carico di circa 2000 geni. Lo spettro delle mutazioni patogene va da grandi alterazioni (delezioni /duplicazioni di Mb, espansioni di triplette), alle sostituzioni di singola base, microdelezioni, microduplicazioni. Quasi tutti i difetti monogenici frequenti (circa 300) sono stati studiati e il gene coinvolto identificato .

La patogenicita' delle mutazioni dipende da un insieme di fattori che piu' volte abbiamo richiamato:

- ☛ la funzione wt e' sensibile alla dose sia in piu' che in meno: cioe' perche' la funzione venga mantenuta non deve esserci ne' aumento ne' perdita di funzione (notare che non parlo di eterozigosi o omozigosi, questo e' un discorso funzionale)
- ☛ tipo di mutazione e suo effetto sull'espressione del gene:
 - ⇒ perdita di funzione
 - ⇒ aumento di funzione
 - ⇒ effetto dominante negativo
 - ⇒ over espressione
 - ⇒ espressione ectopica nello spazio e/o nel tempo
 - ⇒
- ☛ il grado con cui il fenotipo mutato e' espresso nell'eterozigote wt/m: cioe' se ci troviamo di fronte ad un carattere patologico dominante o recessivo
- ☛ presenza di imprinting, per cui il fenotipo si manifesta a seconda del sesso del genitore che trasmette (ricordate che la probabilita' di tramettere l'allele mutato e' sempre il 50% per entrambi i genitori portatori indipendentemente se manifestano, mentre la probabilita' di trasmettere il fenotipo e' 0 per il genitore che trasmette il locus improntato, e 50% per il genitore che lo trasmette attivo cfr. i testi in rete di Genetica II)
- ☛ la proporzione e il tipo cellulare in cui il gene mutato e' presente: cioe' tutte

le cellule dell'organismo (mutazione ereditata) o solo alcune (mutazione somatica)

Mosaicismo

Il mosaicismo può essere definito come la presenza in un singolo individuo di due linee cellulari distinte a livello di sequenza di DNA, ma che derivano da un unico zigote. La presenza di popolazioni cellulari può costituire un elemento importante nella variabilità di espressione del fenotipo e una difficoltà aggiuntiva nella consulenza genetica.

Nel corso degli anni si sono accumulate numerose dimostrazioni di questo fenomeno. Oltre all'eteroplasma mitocondriale è stato dimostrato nei tumori grazie alla perdita di eterozigosi (LOH), e nella linea germinale dove deve essere sempre sospettato quando ci si trova di fronte ad una famiglia in cui sono presenti più figli affetti da una patologia dominante. La lista dei disordini monogenici in cui è stata dimostrata la presenza di mosaicismo si è allungata in questi ultimi anni ed è stato descritto nei disturbi metabolici, nelle displasie scheletriche, nei disturbi della coagulazione, in DMD. È sicuramente un fenomeno sottostimato dal momento che la ricerca delle mutazioni si effettua estraendo il DNA dal sangue, in cui a meno di un'insorgenza molto precoce nell'embrione, rimane non evidenziabile.

Trovare le mutazioni: una combinazione fra scansione dei geni (scanning) e screening

Ricordate che il numero e la frequenza degli alleli patogenetici varia moltissimo da un locus all'altro e questo non semplifica la diagnosi molecolare. Solo poche malattie hanno la stessa mutazione in praticamente tutti i pazienti. Per es, anemia falciforme in cui la traversione A>T al codone 6 del gene della beta globina è sempre presente in tutti i malati che sono veri omozigoti, la corea di Huntington e le altre patologie da espansione di triplette. In questi casi è relativamente semplice fare la diagnosi molecolare e rispondere alle domande della famiglia interessata: chi di noi è portatore?, si può fare diagnosi prenatale? si può fare prevenzione (nel caso dei tumori familiari)?

Tuttavia la maggior parte delle malattie ereditarie hanno un ampio spettro di mutazioni distribuite lungo il gene coinvolto, e dal punto di vista della facilità di identificazione nella diagnostica si possono dividere in

- ⇒ mutazioni "compiacenti" (compliant mutations): cioè quelle mutazioni che possono essere identificate con i normali test routinari basati sulla PCR e sue variazioni
- ⇒ mutazioni "ribelli" (refractory mutations) cioè quelle mutazioni che includono delezioni di uno o più esoni, inserzioni, variazioni che alterano l'espressione del gene a livello della maturazione della proteina o di RNA che non saranno evidenziabili con i test di routine.

Questo ha portato allo sviluppo di due categorie principali di tecnologie

1. destinate ad un'analisi minuziosa della sequenza in oggetto alla ricerca di mutazioni sconosciute. Sono altamente informative, ma lunghe e incompatibili con una elevata produttività

2. destinate ad evidenziare le mutazioni note, sfruttando gli strumenti robotizzati hanno una elevata efficienza, produttività e bassi costi. Tuttavia sono utili solo per un numero limitato di mutazioni

All'atto pratico non esiste un singolo metodo applicabile a tutte le situazioni, ma come detto all'inizio, bisogna combinare metodi diversi a seconda del contesto in cui si opera.

Riconoscimento di mutazioni note

Sono disponibili a questo scopo molti test commerciali specifici per numerose mutazioni note. Si basano sulla PCR amplificando semplicemente la sequenza target sia utilizzando primer specifici per la sequenza mutata e quindi osservando l'avvenuta amplificazione, o evidenziando la mutazione dopo digestione con enzimi di restrizione, o ibridazione dei prodotti di amplificazione con oligonucleotidi specifici, o con i test di ligation tipo MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification cfr. Insensibilità agli androgeni).

Un secondo gruppo di test routinari si basa sempre sulla PCR, ma come elemento di un sistema di riconoscimento più complesso tipo estensione selettiva dei primer, real-time quantitativa.

Va tenuto presente che anche se routinari, questi test vanno sempre standardizzati e vanno sempre inclusi i controlli interni. Va inoltre tenuta presente l'eventualità della presenza di polimorfismi (ahimè) sconosciuti che potrebbero portare a risultati errati.

Per una panoramica su questo argomento vi rimando al PDF presente in rete (Test Genetici)

Analisi dei prodotti di PCR con enzimi di restrizione

È il modo più semplice per testare uno SNP che abbia creato o eliminato un sito di restrizione. Il sito perso o acquisito può essere la mutazione patogenetica. Cioè la sostituzione ha come effetto la modificazione del prodotto e nello stesso tempo modificando la sequenza ha creato un fenotipo alternativo del DNA visibile dopo digestione. Per esempi riguardate le diapositive dal 29 al 32 della lezione 4

Analisi di linkage

In molti casi la ricerca delle mutazioni non è produttiva, pertanto si deve ricorrere al linkage utilizzando polimorfismi possibilmente interni al gene. Si fa il cosiddetto "gene tracking". La presenza delle banche dati in cui si possono trovare tutti i tipi di polimorfismi di una determinata sequenza rende possibile raggiungere in molti casi una diagnosi di portatore al 100%.

La logica della diagnosi per linkage è: il probando (soggetto che porta allo studio la famiglia) ha ereditato l'allele patogenetico (qualunque esso sia) da un genitore (se dominante) o da entrambi (se recessivo e ho identificato una sola delle mutazioni), insieme alla mutazione ha ereditato tutta la sequenza, quindi se non posso sapere quale è la mutazione, posso però identificare l'aplotipo che ha ricevuto, cioè quale è la sequenza del locus che gli viene dal genitore portatore. Dal momento che posso usare polimorfismi interni al gene, la probabilità di ricombinazione è praticamente pari a 0. Nel caso di soggetti a rischio di portare la mutazione identificherò se condividono con l'affetto l'aplotipo a rischio.

Prerequisiti:

☞ Malattia mappata per poter identificare in banca dati marcatori il piu' strettamente associati.

☞ La struttura della famiglia e la disponibilita' dei campioni devono permettere di ricostruire la fase.

Procedura :

☞ Distinguere i due cromosomi(aplotipi) del(i) genitore(i) che possono aver trasmesso il gene malattia.

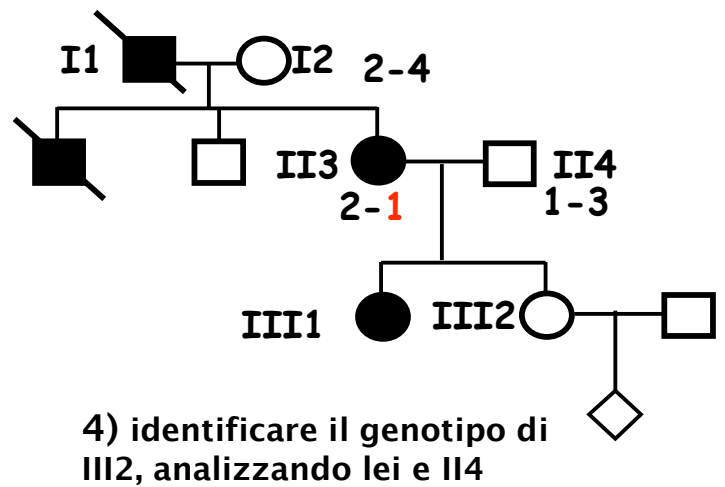
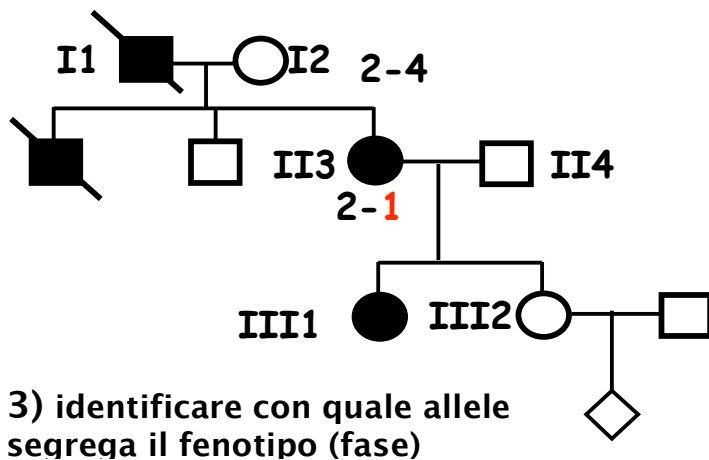
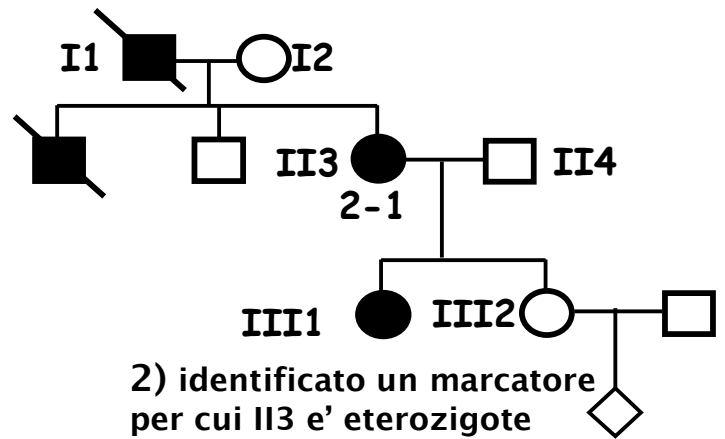
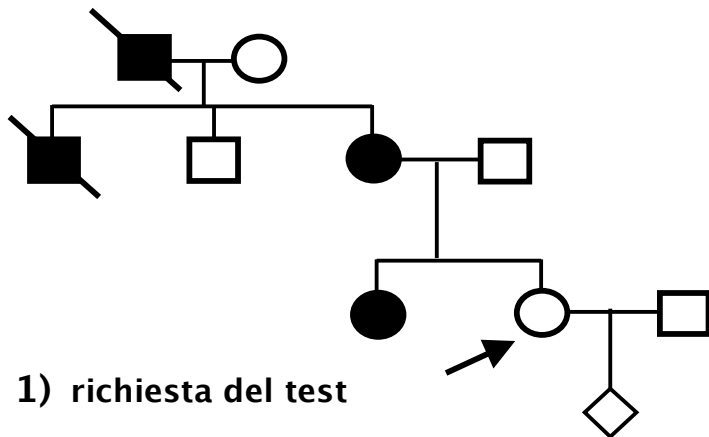
☞ Determinare la fase

☞ Definire quale aplotipo ha ereditato il probando dai genitori

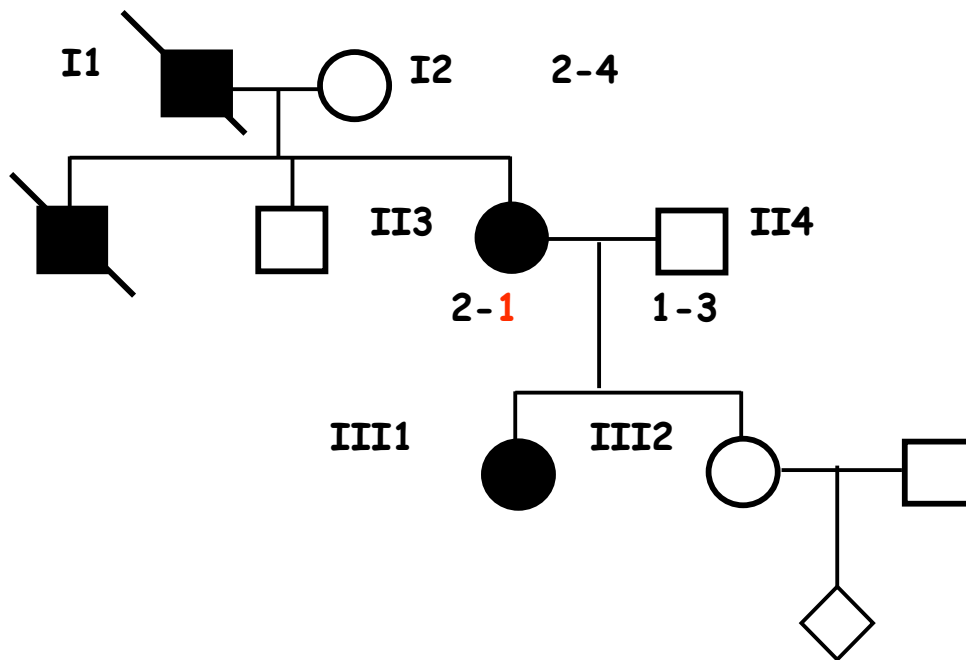
Questa logica si applica a fenotipi con qualunque tipo di ereditarieta'
L'informativita' dei marcatori non e' piu' un problema: ci sono oggi microsatelliti altamente informativi mappati su tutto il genoma. Il limite piu' grosso e' dato dalla struttura della famiglia

Riporterò alcune situazioni standard per chiarire cosa si intende per situazione familiare ottimale e rispolverare il concetto di linkage

**Patologia dominante (a penetranza ridotta e/o espressività
variabile e/o insorgenza tardiva)**



Quali sono i risultati possibili?

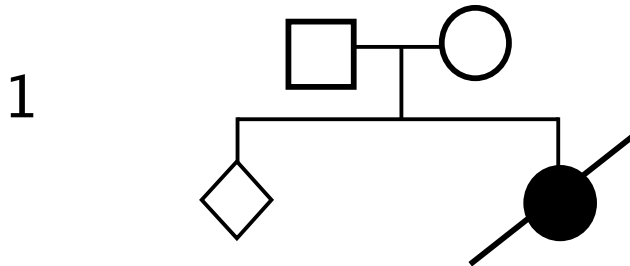


III2: 2-1 o 2-3 NON e' portatrice, perche' in questa famiglia la regione mutata e' identificata dall'allele 1

III2: 1-1 o 1-3 E' portatrice, perche' in questa famiglia la regione mutata e' identificata dall'allele 1 materno

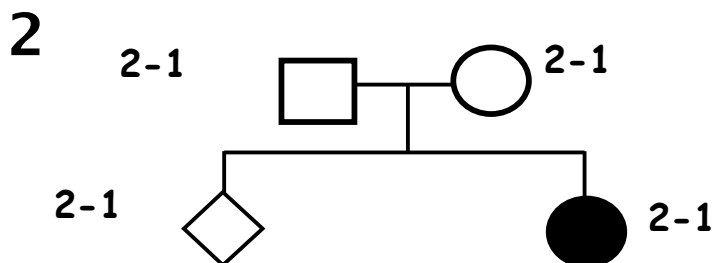
ATTENZIONE: e' importante la segregazione all'interno della famiglia e non il particolare genotipo: se III2 avesse 2-1 cioe' lo stesso genotipo della madre malata, non sarebbe portatrice, in quanto l'allele 1 deriverebbe dal padre

Stesso fenotipo recessivo e segregazione in 4 famiglie diverse



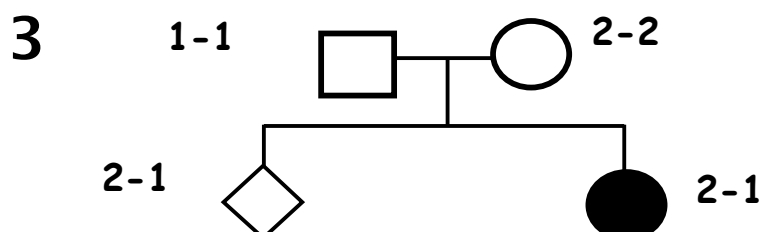
Impossibile fare il test perche' non c'e' il DNA di riferimento dell'affetto

Ricordate che il linkage si fa quando la ricerca delle mutazioni ha dato esito negativo: nessuna mutazione identificata o una sola e se l'affetto non c'e' non posso sapere quale aplotipo ha ereditato dai genitori



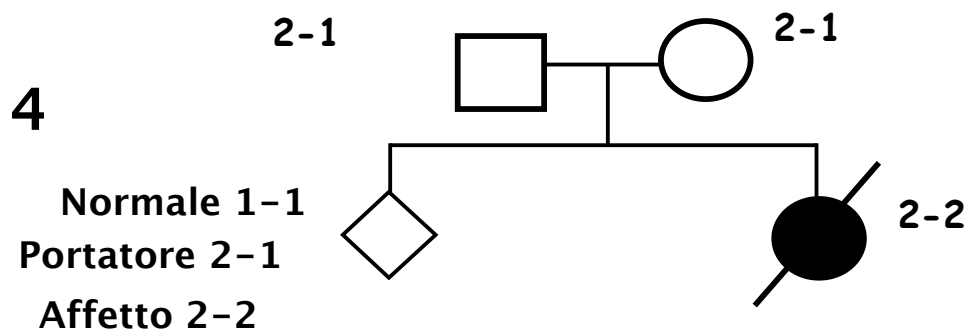
50%N, 50% affetto: non si puo' definire di chi sono gli alleli ereditati dal feto. L'allele 2 del feto e' lo stesso della sorella?

Non e' informativa anche se ho identificato la mutazione in uno dei genitori, per es. il padre. Infatti so che il padre gli ha dato la mutazione nota, ma non so su quale aplotipo si trova e dato che le due informazioni non si possono fondere la famiglia non e' informativa. Lo sarebbe stata se l'affetto fosse stato 22 o 11 o in questa stessa situazione il feto 22 o 21 o 11 vedi la famiglia 4



50%N, 50% affetto: non si può definire di chi sono gli alleli ereditati dal feto. L'allele 2 del feto è lo stesso della sorella?

Stessa situazione di prima, anzi peggio nessuna combinazione è informativa



Massima informatività

Sindromi da mutazione del gene AR

Ho dato questo titolo alle sindromi che descrivono perché non è possibile raggrupparle se non sotto il nome del gene che, una volta mutato, provoca le malattie.

Ci troviamo di fronte ad un esempio molto chiaro e estremamente utile sul piano della comprensione della complessità della ricerca e della diagnostica in genetica umana: è un chiaro caso di serie allelica o eterogeneità allelica.

Vi ricordo che con serie allelica/eterogeneita' allelica si intende quel fenomeno per cui due fenotipi, assolutamente non collegati fra loro, sono originati da mutazioni diverse (alleli) dello stesso gene.

Il gene in questione e' il gene AR, le due patologie sono:

- ➡ Insensibilita' agli androgeni AIS (Androgen Insensitivity Syndrome).
- ➡ Atrofia muscolare spino-bulbare, SBMA (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy, sindrome di Kennedy).

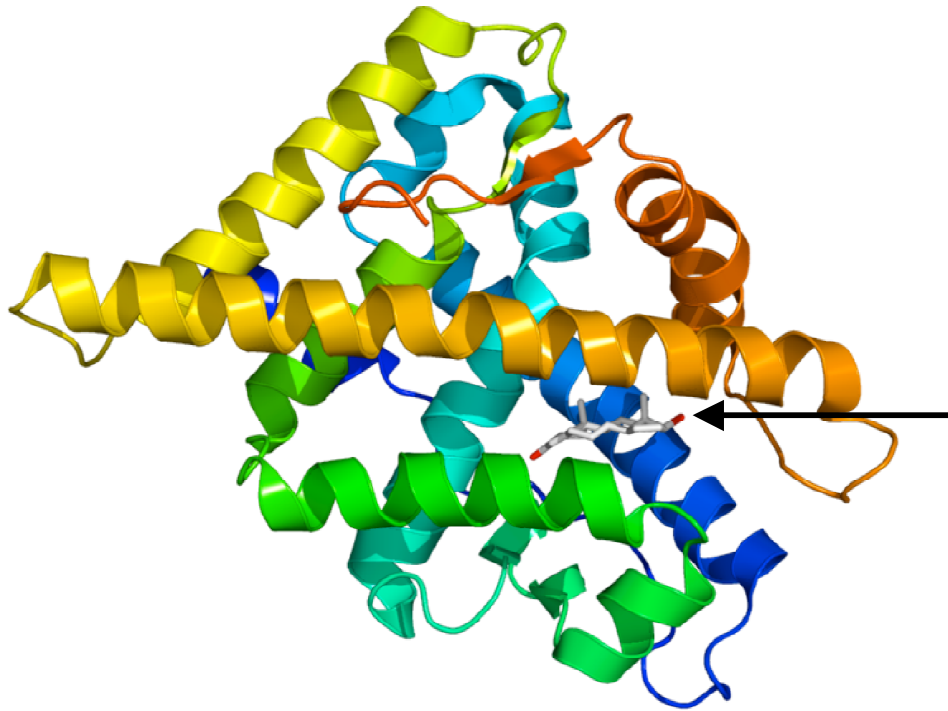
Descrivero' prima il gene dal punto di vista molecolare e poi passero' alla descrizione delle due sindromi.

Il gene AR (Androgen Receptor)

Il gene AR e' l'unico le cui mutazioni provocano la sindrome di insensibilita' agli androgeni, ed e' anche l'unico che mutato provoca la atrofia muscolare spino-bulbare. Mappa in Xq12, e' lungo 180,25 kb, ed ha 8 esoni. Il suo prodotto e' una proteina idrofobica composta da 919 aa, del peso di 99 kD. Appartiene alla superfamiglia dei recettori degli steroidi ed e' percio' composta dai domini caratteristici di questa superfamiglia (per i dettagli vi rimando alla Biochimica e alla Fisiologia-Endocrinologia):

- ➡ Dominio N-terminale di transattivazione, codificato interamente dall'esone 1, di ~537 aa. Il circo vicino al numero degli amminoacidi e' dovuto al fatto che in questa regione sono presenti due siti poliformici per numero di triplette: il primo (CAG)_n inizia al nucleotide 172 con n=10-33, codifica una serie di glutamine e puo' dare origine alla mutazione dinamica causa della SBMA. Il secondo (GGT)_n inizia a nt 1350 con n=4-25, e' stabile e codifica per una serie di glicine.
- ➡ Dominio DNA-binding, codificato dall'esone 2 e parte del 3, composto di 59 aa.
- ➡ Dominio per la localizzazione del segnale nucleare bipartito, codificato da parte dell'esone 3 e da parte del 4, composto da 19 aa.
- ➡ Dominio di legame con l'ormone, codificato da parte dell'esone 4 fino alla fine della sequenza.

La proteina e' un fattore di trascrizione attivato dagli ormoni steroidei: si lega con l'ormone, trasloca nel nucleo, si dimerizza e controlla il livello di trascrizione dei geni target degli steroidi con il contributo di altre proteine, secondo lo schema classico dei recettori degli ormoni steroidei (per i dettagli vi rimando al corso triennale di Fisiologia-Endocrinologia).



Recettore complessato con il testosterone (freccia)

Alleli

Sono presenti degli alleli polimorfici:

- ➡ due siti di triplette, come già detto, $(CAG)_n$ con $n=10-33$ e $(GGT)_n$ con $n=4-25$. Del polimorfismo legato alla tripletta CAG parleremo in dettaglio nella parte specifica di SBMA
- ➡ una transizione G>A silent
- ➡ un RFLP HindIII
- ➡ due siti di poliadenilazione distanti circa 220pb

Degli alleli patogenetici parlerò nella parte specifica per ogni sindrome

Insensibilità agli androgeni – AIS (Androgen Insensitivity Syndrome).

Cosa è l'insensibilità agli androgeni – AIS

È una sindrome che riguarda lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, che sono sotto il controllo degli ormoni secreti dalle gonadi: vi ricordo per sommi capi (embriologia) che fino alle 8-9 settimane di gestazione l'embrione è sessualmente indifferenziato. A partire da questo periodo le gonadi indifferenziate (originatesi dalle creste genitali) cominciano a differenziarsi coerentemente con il genotipo presente: se è assente SRY (gene che controlla il differenziamento in testicoli delle gonadi indifferenziate) si sviluppano le ovaie, se

SRY e' presente i testicoli. La presenza di SRY e' legata di solito alla presenza di un cromosoma Y.

Una volta che le gonadi si sono differenziate iniziano a secernere gli ormoni specifici del sesso corrispondente. Nel caso di un feto XY i testicoli secernono gli androgeni che, di concerto con l'azione del MIF (fattore inibitore dei derivativi Mulleriani: utero e tube) danno origine ai derivativi di Wolff cioe' ai genitali interni maschili, il differenziamento prosegue poi con i genitali esterni.

Nei soggetti XY affetti da questa sindrome non si ha la risposta dei tessuti interessati all'azione degli androgeni, prodotti correttamente dai testicoli. Come conseguenza la gonade e' un testicolo normale, ma tutti gli altri elementi del sistema riproduttivo maschile non si formano e il sesso visibile alla nascita e' femminile (presenza di genitali esterni femminili). Alla puberta' si ha amenorrea, per la mancanza dei derivati mulleriani, anche se lo sviluppo esterno e' completamente femminile come pure il sesso di comportamento e l'identita' sessuale.

Si riconoscono tre fenotipi principali a livello fenotipico e clinico:



Completa insensibilita' agli androgeni: **CAIS** (Complete Androgen Insensitivity syndrome una volta veniva chiamata femminilizzazione testicolare, sindrome di Morris completa). I soggetti affetti hanno genitali esterni femminile, vagina a fondo ceco, sono amenorroiche alla puberta' e hanno scarso sviluppo pilifero, possono presentare gia' alla nascita ernie inguinali o masserelle nelle grandi labbra, che si rivelano essere i testicoli ritenuti nell'addome. Nei maschi i testicoli alla nascita o subito dopo scendo lungo il canale inguinale e si posizionano nello scroto. Questi soggetti essendo femmine non hanno uno scroto e quindi i testicoli rimangono nel canale.



Parziale insensibilita' agli androgeni: **PAIS** con genitali esterni femminili predominanti. Il fenotipo e' quasi sovrapponibile al precedente, ma si possono presentare dei segni di mascolinizzazione dei genitali esterni tipo clitoride ingrossato e/o parziale fusione delle grandi labbra.



Parziale insensibilita' agli androgeni: **PAIS** con genitali esterni maschili predominanti o ambigui. Nel caso di ambiguita' il problema sorge nel decidere il sesso del neonato e la conseguente educazione, infatti non e' dato di sapere quale sara' il sesso di comportamento e l'identita' sessuale.(cfr oltre). Quando i genitali sono dichiaratamente maschili il problema non si pone con la stessa forza.



Leggera insensibilita' agli androgeni: **MAIS** (undervirilized male syndrome). Questi pazienti non presentano ambiguita' alla puberta' hanno ginecomastia, scarso sviluppo pilifero e pene piccolo. La spermatogenesi a volte e' alterata e a volte l'infertilita' e' l'unico sintomo.

Genetica dell'AIS

La prevalenza della forma completa oscilla fra 2/100.000 e 5/100.000 calcolata sul numero di donne normali che presentino testicoli istologicamente normali ritenuti nell'addome o nell'inguine. La forma parziale e' piu' rara mentre non sono presenti statistiche per la forma MAIS.

Il gene e' X linked e la patologia e' X linked recessiva quindi il rischio di ricorrenza e lo stato di portatore riguarda solo la componente femminile della famiglia materna. In dettaglio:

Genitori dell'affetta

Ovviamente il padre non e' affetto (altrimenti sarebbe una donna) e neanche portatore.

Per quello che riguarda la madre:

➡ se ha una figlia affetta e un'altro membro della sua famiglia affetto e' portatrice certa.

➡ Se ha piu' di una figlia affetta e non e' stata trovata la mutazione patogenetica nel DNA estratto dai leucociti, ha un mosaicismo germinale.

➡ Se ha una sola figlia affetta e storia familiare negativa ci sono diverse possibilita' per lo stato di portatrice della madre e delle donne della sua famiglia:

☞ L'affetta ha una mutazione *de novo* nel gene AR, perche' nella madre la mutazione non si e' trovata: il meccanismo alla base di questa situazione puo' essere:

- ✓ Una mutazione germinale nell'uovo che ha dato origine alla proposita, percio' la mutazione e' presente in tutte le sue cellule, il rischio di ricorrenza per le successive gravidanze della madre e' basso, ma piu' alto di quello della popolazione generale: essendo l'unico caso della famiglia non si puo' escludere il mosaicismo germinale (infatti potrebbe essere un caso che la mutazione non si sia manifestata prima), per le altre donne della famiglia materna(zie e cugine della proposita) il rischio e' zero , per le sorelle vedi oltre.
- ✓ Mosaicismo somatico dovuto all'insorgenza della mutazione in una cellula embrionale. La proposita ha la mutazione solo in alcuni tessuti: essendo un evento avvenuto nell'embrione il rischio di essere portatrice e' nullo per tutte le donne della famiglia comprese le sorelle della'affetta.

☞ Se la madre ha la mutazione presente nella figlia affetta e' una portatrice, il momento in cui si e' originata la mutazione fa la differenza per le sue sorelle e altre parenti femmine (naturalmente analizzare il DNA darebbe la risposta (cfr. Diagnosi), questo discorso e' importante perche' ci troviamo di fronte ad una patologia X linked in cui la diagnosi di portatrice non e' immediata neanche con il DNA come detto anche in altre patologie X linked:

- ✓ La mutazione potrebbe essere insorta nell'uovo o nello spermatozoo, la mutazione che le ha dato origine puo' anche essere avvenuta nello spermatozoo perche' la madre di una affetta ha due cromosomi X e quindi non risente della mutazione. In questo caso le sue sorelle e parenti femmine non dovrebbero essere a rischio, a meno che non ci fosse un mosaicismo germinale nella generazione precedente (vedi oltre)
- ✓ La mutazione e' insorta allo stadio embrionale: se e' stata evidenziata nel DNA estratto dai linfociti vuol dire che comunque e' diffusa e potrebbe esserci piu' di un oocita portatore, ai fini del rischio per altre figlie in fondo non cambia

nulla la madre e' comunque portatrice, per le sorelle se fosse vera questa ipotesi il rischio sarebbe pari a zero.

Questo discorso si puo' ripetere risalendo indietro nella generazione precedente esaminando il DNA della nonna materna dell'affetta, qualora la mutazione fosse presente nella madre, se la mutazione non e' presente nel DNA della madre della paziente e' superfluo risalire indietro e/o allargare alle parenti materne.

Uno studio condotto alla fine degli anni '90 riporta la presenza della mutazione nelle madri di 22 famiglie nucleari (una sola generazione oltre la paziente). Tre delle otto pazienti rimaste presentavano un mosaicismo somatico.

Per quello che riguarda i fratelli e le sorelle della proposita dipende dallo stato di portatrice o meno della madre. Bisogna distinguere tra quelli gia' nati e in eta' prepubere, quelli che hanno gia' passato la puberta' e quelli che ancora devono nascere. Per quelli nati e prepuberi i maschi sono sicuramente sani, le femmine potrebbero essere affette se la madre fosse portatrice, per definirlo basta fare il cariotipo (cfr. Diagnosi). Le sorelle 46 XX potrebbero essere portatrici.

Le sorelle che abbiano gia' superato la puberta', sicuramente non sono affette, altrimenti sarebbero amenorroiche, ma potrebbero essere portatrici.

Per quello che riguarda i figli non ancora nati una donna portatrice ha il 25% di rischio di avere:

- ✓ 46 XY affetta
- ✓ 46 XY maschio normale
- ✓ 46 XX femmina normale
- ✓ 46 XX femmina portatrice

Il fenotipo dei 46 XY affetti dalla forma completa CAIS o lieve MAIS e' prevedibile, mentre e' piu' difficile prevedere l'esito fenotipico delle mutazione nei casi di PAIS dal momento che una relazione genotipo fenotipo non e' stata definita (cfr. relazione genotipo fenotipo)

Alleli

Per quello che riguarda gli alleli polimorfici vi rimando alla parte generale di descrizione del gene AR. Sono state descritte 300 mutazioni che causano una delle forme di insensibilita' agli androgeni. Si ritrovano:

- ☞ mutazioni missenso che alterano i siti di legame con il DNA o l'ormone,
- ☞ mutazioni nell'esone 1 (che codifica per il dominio N-terminale di transattivazione) sono poco frequenti, la maggior parte sono non senso o piccole delezioni o inserzioni che producono frameshift o non senso
- ☞ delezioni ampie o alterazioni degli introni sono state descritte anche se raramente

Il risultato di queste mutazioni e' sia una incapacita' a svolgere la funzione per alterazione dei diversi domini sia una instabilita' della molecola. In dettaglio:

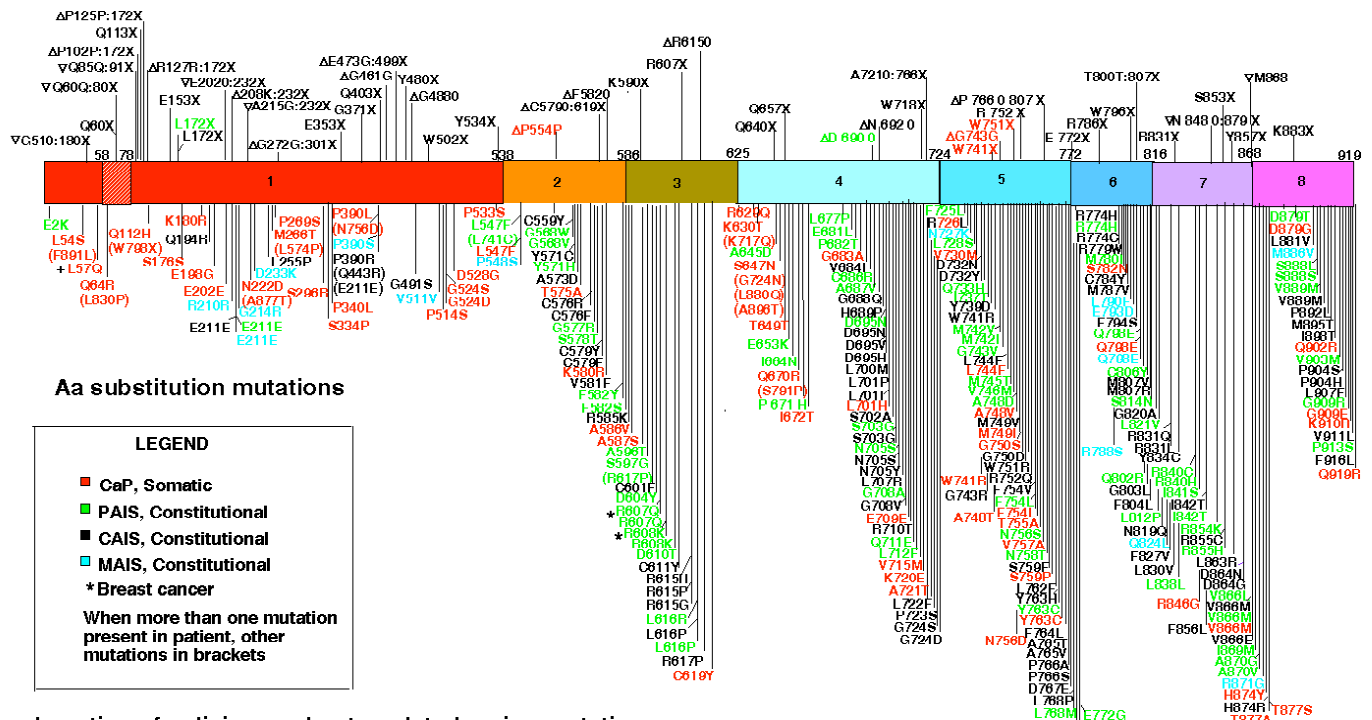
- ☞ Quasi tutte le mutazioni nel dominio di legame con gli androgeni impediscono la loro transattivazione AR mediata. Alcune alterano l'equilibrio nell'affinita' e/o nella dissociazione,

sia per tutti gli androgeni o solo per alcuni, altre provocano una instabilit  della molecola che diventa termolabile o si degrada pi  velocemente in presenza degli androgeni.

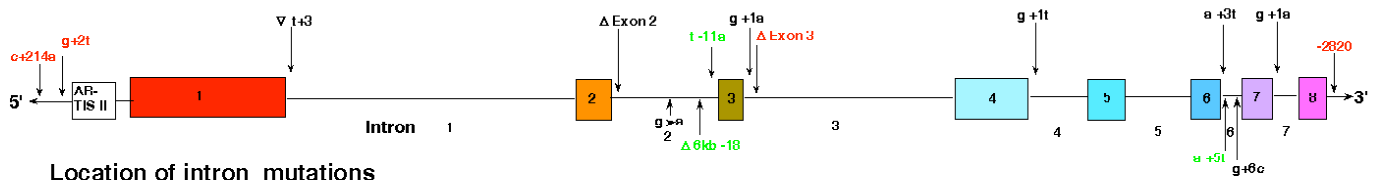


Le mutazioni nel dominio di legame con il DNA impediscono il legame con l'ARE (Androgen Responsive Element), e impediscono cos  alla molecola di esercitare il suo ruolo regolatorio sulla trascrizione dei geni target.

Premature termination mutations or 1-6 bp Δ or V



Location of splicing and untranslated region mutations



Location of intron mutations

Relazione genotipo fenotipo

Una chiara relazione fra le mutazioni e fenotipo non   ben definita, anche se la maggior parte delle missenso, come pure quelle nell'esone 1 provocano la forma completa (come atteso visto la funzione che svolge il dominio N-terminale).

Nelle forme parziali la relazione   meno evidente, anche perche' c'  variabilit  fra le famiglie che in alcuni casi condividono la stessa mutazione. Questa variabilit  fra le famiglie viene ricondotta, in alcuni casi, alla presenza di mosaicismo oltre che alla diversita' del " background" genetico.

Non e' ben chiara inoltre la relazione funzionale di alcune mutazioni con le forme di MAIS in cui il sesso e' maschile e il problema riguarda in alcuni casi solo la fertilita' e non manifestazioni di non virilizzazione (ginecomastia, voce acuta, impotenza...).

Bisogna infine notare che mutazioni di AR sono state associate ad alcuni tumori prostatici: in questi casi AR si comporta da protooncogene con effetto dominante, la mutazione provoca un aumento di funzione e **non** una perdita di funzione come nelle diverse forme di AIS. Questo non dovrebbe essere una sorpresa, visto che piu' di una volta ho sottolineato che quello che conta e' l'effetto della mutazione sulla funzione!

Diagnosi

La diagnosi clinica risponde a precisi protocolli diagnostici che permette di distinguere le tre forme e questo non e' competenza del corso. Chi fosse interessato ai dettagli clinici puo' trovarli sul sito www.genetests.org.

Per quello che riguarda la diagnostica di laboratorio sono previste una serie analisi sia a livello biochimico (dosaggi ormonali per definire la quantita' di ormoni prodotti e quantificazione dell'attivita' di legame della proteina anche nei fibroblasti derivati da prelievi di pelle nei genitali e vi rimando alla biochimica) e analisi del cariotipo: la presenza di 46 XY associato ad un fenotipo femminile in cui siano presenti o meno ambiguita' dei genitali interni ed esterni, e' diagnostica.

Nel caso della forma completa la storia familiare non e' indispensabile, lo e' invece per le forme lievi e parziali. La storia familiare indaga sulla presenza di altri membri della famiglia che possano presentare un fenotipo analogo cioe' altri soggetti 46 XY con gli stessi problemi e la presenza di soggetti 46 XX, donne normali, che presentino alcuni segni come scarsita' di peluria ascellare o pubica: il 10% delle portatrici ha infatti questi segni. Una volta raccolta la storia familiare, questa deve essere compatibile con un ereditarieta' X linked per poter parlare di AIS.

Per quello che riguarda la diagnosi molecolare che ha lo scopo di confermare la diagnosi e di individuare le portatrici, si basa su:

➡ ricerca delle mutazioni mediante sequenziamento degli otto esoni. La tecnica permette di individuare la mutazione in circa il 95% delle affette dalla forma completa. La percentuale di identificazione della mutazione scende a meno del 50% nelle forme parziali e si ritiene ancora meno nelle forme MAIS, anche se non ci sono statistiche in merito. La probabilita' di trovare la mutazione patogenetica nelle forme non complete puo' arrivare al 40% nei casi in cui non c'e' l'attivita' del recettore o e' alterata nella cute dei genitali, mentre scende al 10% o meno nel caso di normale attivita' del recettore. applicando il sequenziamento bisogna tenere presente che se si trova una mutazione ci sono diverse possibilita':

- ✓ Mutazione mai descritta in letteratura, ma che potrebbe essere patogenetica (il meccanismo di azione del prodotto e' noto): e' presente in altri soggetti sani della famiglia?
- ✓ Mutazione mai descritta in letteratura, con effetto ignoto sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ✓ Mutazione mai descritta in letteratura, ma il cui effetto si ritiene innocuo sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?
- ✓ Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere

innocuo sulla funzionalità

Ovviamente dipende da come si risponde alle domande. Se la risposta è 'Sì' a tutte, significa che non si è trovato niente di chiaramente patogenetico.

➤ ricerca delle delezioni/duplicazioni esoniche. Questi test si effettuano se il primo non ha dato risultati, tenendo conto che questo tipo di mutazioni sono rare: nell'affetta, avendo un solo cromosoma X e conoscendo la sequenza, è relativamente semplice (ricordate i multiplex in Duchenne?), per le portatrici si ricorre alla MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) che illustro brevemente più oltre a vantaggio di chi non sapesse cosa è.

Per chiudere il capitolo diagnosi: se non ho trovato niente cosa significa, visto che la diagnosi clinica è certa ed è presente una diminuita o assente capacità di legame del recettore? Le cause di una risposta non conclusiva sono più di una:

➤ Mutazioni nella regione regolatoria o negli introni che con i normali test di routine non vengono testati

➤ Gene AR normale, ma è presente un problema di "timing": bisogna tenere presente che la finestra temporale in cui deve avvenire il differenziamento dei genitali interni e/o esterni è stretta. Questo significa che se lo stabilirsi della sintesi del testosterone o della risposta allo stesso è ritardata oltre quel periodo, il risultato è identico a quello che si ottiene avendo un recettore anomalo.

➤ Gene AR normale, ma la mutazione è presente in un altro gene il cui prodotto interagisce con il recettore (se ricordate il meccanismo di azione degli ormoni sapete che ce ne sono tanti).

➤ Mosaicismo somatico, per cui la mutazione è presente solo nei tessuti dei genitali e non nel sangue che costituisce il tessuto di elezione per l'analisi del DNA.

Visto il fenotipo particolare che deriva dalle mutazioni di AR (AIS nelle sue forme appartiene a quella categoria che viene definita intersessualità), ritengo sia utile spendere un po' di tempo per indicare per sommi capi quali sono i modi di presentare e di gestire questa patologia.

È ovvio che la presenza di incongruenza fra il sesso genico, cromosomico, gonadico e quello fenotipico genera sconcerto e turbamento nella proposita e nella sua famiglia. La gestione di questi casi coinvolge un'équipe di esperti in vari campi: endocrinologo, chirurgo, genetista medico, psicologo. La gestione è diversa a seconda della forma.

Nelle forme complete, che nei casi non familiari o presunti tali (potrebbe non essersi manifestata prima perché non sono stati concepiti maschi o comunque quelli nati avevano ereditato la X normale) vengono diagnosticati di solito alla pubertà, il problema più grosso, in realtà, è psicologico ed è molto importante la consulenza psicologica e un'informazione corretta: le proposita sono donne a tutti gli effetti, non sono dei maschi mancati. A volte anche nelle forme complete la diagnosi viene fatta in età prepubere o nei primi anni per la presenza di ernie inguinali in cui si mettono in evidenza i testicoli. L'aspetto endocrinologico richiede la somministrazione di estrogeni se i

testicoli vengono tolti prima della pubertà a causa delle ernie, altrimenti si lasciano in sede per garantire la produzione di estrogeni (che vengono comunque prodotti dai testicoli funzionanti) fino alla pubertà. Verranno poi rimossi per evitare la degenerazione in gonadoblastoma che può sopravvenire per la posizione ectopica (è un rischio anche per i maschi criptorchidi).

Nel caso delle forme parziali la situazione è più complessa soprattutto nei casi con genitali ambigui: il problema della definizione del sesso al momento della nascita può essere cruciale per il corretto sviluppo e la terapia.

Nelle forme parziali con genitali femminili predominanti la gestione è analoga quella della forma completa, un' differenza è che l'asportazione delle gonadi si esegue di solito prima della pubertà, per evitare un ingrossamento del clitoride che creerebbe problemi psicologici aggiuntivi.

Nelle forme parziali con genitali maschili predominanti e/o ambigui, la situazione è complicata e richiede una collaborazione estesa per decidere quale sarà il sesso dell'affetto di solito il problema si pone alla nascita: al di là dell'aspetto psicologico, la decisione comporta scelte terapeutiche sia farmacologiche che chirurgiche. L'analisi molecolare del gene AR non aiuta vista la difficoltà della relazione genotipo-fenotipo, tuttavia prima di iniziare una terapia ormonale in direzione maschile bisogna chiarire la capacità del recettore di rispondere alla terapia: è inutile somministrare testosterone se non viene recepito dalle cellule!

Per quello che riguarda la diagnosi prenatale come la preimpianto sono naturalmente possibili una volta identificata la mutazione, ma dal momento che non c'è compromissione intellettuale ed è possibile un trattamento raramente viene richiesta.