



# Acondroplasia Malattie lisosomiali Gene AR

Prof.ssa Nicoletta Archidiacono



AA 2008-2009

# Acondroplasia

## Cosa e' l'Acondroplasia

L'Acondroplasia, e' caratterizzata da un anormale sviluppo osseo, che ha come conseguenza una bassa statura con arti corti, testa grande, e facies caratteristica legata alla prominenza dell'osso frontale. E' la piu comune forma di dispalsia ossea con bassa statura : la sua frequenza e' compresa fra 1/15000 e 1/40000 nati vivi . La diagnostica clinica di solito non difficile si avvale di radiografie, nei bambini la ricerca delle mutazioni del gene FGFR3 permette di fare diagnosi certa nel 99% dei casi.

## Genetica dell'Acondroplasia

La malattia si trasmette come autosomica dominante, oltre l'80% degli affetti hanno genitori con statura normale e quindi sono originati da una mutazione *de novo*. Sembrerebbe che le nuove mutazioni avvengano principalmente durante la spermatogenesi, con l'aumentare dell'eta' paterna. I rari casi di ricorrenza si ritiene siano dovuti a mosaicismo germinale. Il restante 20% hanno almeno un genitore affetto.

Il rischio di ricorrenza nelle famiglie con genitori con statura normale e' estremamente basso, per non dire nullo. Nel caso di un genitore affetto il rischio di ricorrenza e' 50%. Se sono entrambi affetti : 25% con statura normale, 50% acondroplasi, 25% omozigoti (letale).

## Il gene FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor 3)

E' l'unico gene le cui mutazioni provocano l'acondroplasia. Mappa sul braccio corto del cromosoma 4, nella banda 4p16.3, cioe' nella regione telomerica, curiosamente il suo cDNA venne clonato durante la ricerca del gene per la Corea di Huntington che mappa nella stessa regione. (Questo non e' un fenomeno raro, specie agli inizi del clonaggio dei geni umani, cercando un gene se ne trovava un altro). E' un gene la cui azione si esplica durante lo sviluppo. E' lungo 14,98 kb ed e' composto di 15 esoni.

Il suo prodotto e' un recettore di membrana coinvolto nella trasmissione del segnale composto di 806 aa, 87.7 kDa:

- ⇒ e' un recettore tirosinchinasi di classe IV, regola negativamente l'accrescimento delle ossa, attraverso il controllo della proliferazione e differenziamento dei condrociti (processo critico per lo sviluppo dello scheletro). Il legame con il fattore di crescita attiva il dominio tirosinchinasi intracellulare citoplasmatico innescando la trasmissione del segnale. Nel tessuto osseo ad accrescimento endocondrale (sostanzialmente le ossa lunghe) l'attivazione di FGFR3 inibisce la proliferazione dei condrociti nella piastra di crescita, stimolando cosi' il differenziamento e la crescita in sintonia con le cellule progenitrici del midollo.
- ⇒ nel topo e' stato evidenziato che l'induzione e la repressione della proliferazione e del differenziamento sono modulati sui tempi dello sviluppo
- ⇒ regola negativamente l'ossificazione endocondrale

- ⇒ e' coinvolto nella degradazione lisosomiale tramite l'ubiquitinizzazione c-CBL mediata (meccanismo infatti difettivo nell'Acondroplasia)
- ⇒ complessato con il proprio ligando (FGF18) e' un potenziale target molecolare per il riparo e la rigenerazione della cartilagine danneggiata



### Complesso FGFR3 e il suo attivatore

#### Alleli

Sono stati identificati almeno tre polimorfismi, originati da:

- ⇒ una transizione G > C al 5' dell'introne 9
- ⇒ una trasversione C > T nell'introne 10
- ⇒ delezione di una G in uno stretch di 11 G nell'introne 9

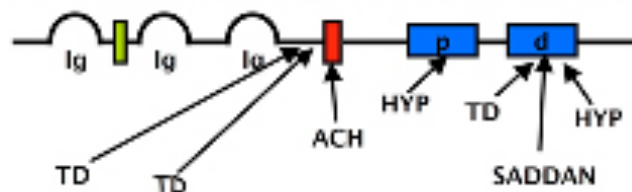
I primi due originano un RFLP, tutti mappano molto vicini al sito di mutazione per l'Acondroplasia.

Due alleli patologici rendono ragione del 99% dei casi di Acondroplasia:

- ⇒ una transizione G > A al nucleotide 1138
- ⇒ una trasversione G > C allo stesso nucleotide

Entrambe provocano una sostituzione della glicina 380 in arginina (G380R), nel dominio transmembrana. Le mutazioni patogenetiche sembra mantengano costitutivamente attivo il recettore che e' un repressore della proliferazione e differenziamento dei condrociti e pertanto il loro effetto puo' essere identificato come un aumento di funzione con effetto dominante negativo.

**Struttura della proteina prodotta da FGFR3 e principali siti di mutazione:**  
**Ig:** domini Ig-like, **Acid box**, **dominio transmembrana**,  
**dominio tirosinchinasico prossimale e distale**



**ACH:** achondroplasia, **HYP:** hypochondroplasia,  
**TD:** thanatophoric dysplasia, **SADDAN:** severe achondroplasia  
 with developmental delay and acanthosis nigricans.

## Diagnosi

La tecnica e' la ARMS o analoghe: la sequenza wt e mutata sono note.

La diagnosi prenatale puo' venir richiesta quando uno o entrambi i genitori sono affetti (gravidezze ad alto rischio). La diagnosi puo' essere eseguita dopo l'estrazione del DNA sia da villi coriali alla 10-12ma settimana di gestazione, o dopo amniocentesi alla 16-18ma settimana. In entrambi i casi bisogna aver prima identificato le mutazioni presenti nella famiglia.

Le indagini di routine tramite ecografia possono evidenziare anche in gravidezze non a rischio eventuali difetti nello sviluppo delle ossa degli arti e far sospettare la presenza di Acondroplasia. In questo caso si puo' ricorrere all'amniocentesi per la ricerca delle mutazioni patogenetiche, che nel caso dell'acondroplasia sono per fortuna limitate.

La diagnosi preimpianto e' naturalmente possibile.

E se non si riesce ad identificare la mutazione?

Sequenziamento tenendo 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 funzionalita'.

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....

## Curiosita' storiche

Nel 1912 Wienberg (quello di Hardy-Wienberg) noto' che in una casistica raccolta in quegli anni, i casi sporadici erano piu' spesso gli ultimi nati rispetto ai primi nati (aumento dell'eta' paterna),

Un altro autore (Kozma) nel 2006, ha descritto attraverso lo studio delle mummie egizie la presenza di affetti da acondroplasia fin dal 4500AC.

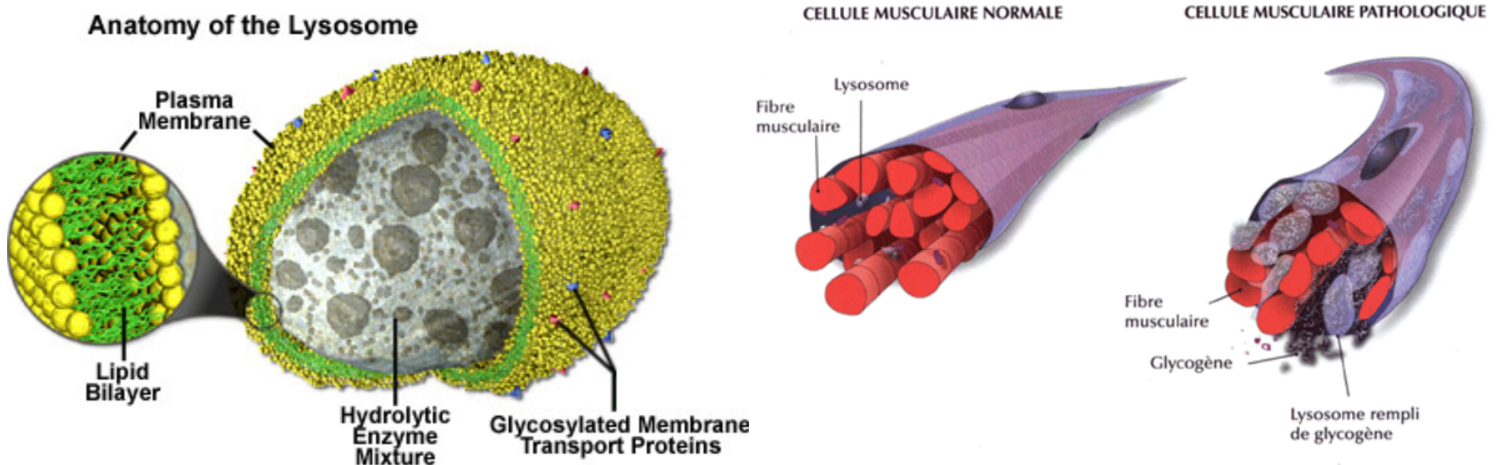
Bernal e Briceno nel 2006, riportano lo studio di una terracotta di epoca precolombiana (datata circa 2500 anni fa), in cui e' raffigurato un soggetto con le caratteristiche di un affetto da Acondroplasia. Gli autori ritengono che sia la piu' antica rappresentazione delle caratteristiche fenotipiche della malattia.



# Malattie lisosomiali

Vengono definite lisosomiali un insieme di malattie causate dalla mancanza di uno dei numerosi enzimi contenuti nei lisosomi. Questa assenza provoca l'accumulo dei prodotti non degradati all'interno degli organelli, non rendendoli utilizzabili dalla cellula. In realtà in questo gruppo di malattie pur avendo clonato il gene, identificato e studiato il prodotto compresa la sua funzione, non è ben chiaro il meccanismo patogenetico che porta alla comparsa di malattie che nella quasi totalità sono incurabili e sono caratterizzate da una degenerazione neurologica grave e da un esito letale anche nei primi anni di vita. Per l'aspetto biochimico vi rimando a quei corsi.

Si conoscono oltre 40 malattie lisosomiali che vengono raggruppate in base al tipo di enzima che manca. Considerate come un'unica entità la loro frequenza è 1/5000, in realtà prese singolarmente alcune sono molto rare, anche se possono essere più frequenti in alcuni gruppi etnici.



## Lisosoma

## Sindrome di Pompe

- ☞ Mucopolisaccaridosi (MPS) difetto nella degradazione dei mucopolisaccaridi (glicosoaminoglicani)
- ☞ Sfingolipidosi (glicolipidosi) mancano gli enzimi per la degradazione delle sfingomieline, dei cerobrosidi e dei gangliosidi, tutti componenti delle cellule nervose.
- ☞ Oligosaccaridosi in cui mancano gli enzimi per il metabolismo degli zuccheri a catena corta e delle proteine a loro legate (glicoproteine)
- ☞ Malattie legate al mancato trasporto all'interno dei lisosomi di sostanze che dovrebbero essere degradate
- ☞ Malattie legate al mancato trasporto all'interno dei lisosomi degli enzimi lisosomiali
- ☞ Malattie sempre legate a deficit di enzimi lisosomiali specifici per singole molecole: per esempio la malattia di pompe: la maltasi acida che è deputata alla degradazione del glicogeno

## Mucopolisaccaridosi

## Cosa sono le mucopolisaccaridosi

Le Mucopolisaccaridosi (MPS) sono un gruppo di patologie riconducibili ad un difetto della degradazione dei mucopolisaccaridi (o glicosamminoglicani). Rappresentano un ottimo esempio del concetto di eterogeneità genetica di locus e di serie allelica. L'eterogeneità genetica è un concetto legato tutto sommato alla nostra ignoranza del difetto di base e alla nostra incapacità di definire in modo analitico il fenotipo.

In Italia in media 1 ogni 100.000 nati vivi presenta una MPS, i sintomi possono manifestarsi più o meno precocemente e con gravità diversa. Si tratta di patologie molto difficili da diagnosticare, poiché i bambini che ne soffrono non manifestano alcun segno clinico alla nascita. Nonostante i grandi sforzi terapeutici, solo per tre delle sette forme della malattia è attualmente disponibile una terapia specifica in grado di determinare un rallentamento della progressione, altrimenti inesorabile.

I danni sono dovuti all'accumulo progressivo nei diversi tessuti dei polisaccaridi solforati, gli stessi glicosamminoglicani vengono poi escreti nelle urine. La classificazione storica (fino a MPSVII) si basava sulle diverse manifestazioni cliniche, sul tipo di sostanza escreta nelle urine, e nel caso della MPS I (Hurler) e MPSII (Hunter) sul modello di trasmissione (autosomica la prima, Xlinked la seconda).

**Tabella1**

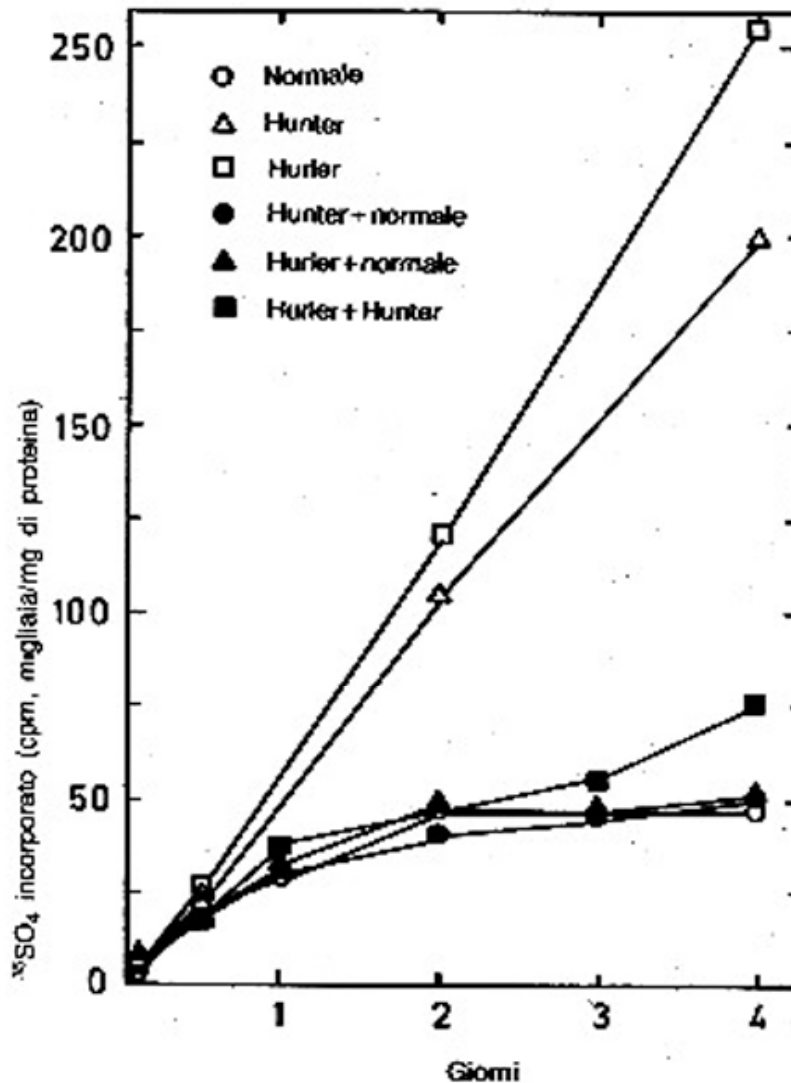
Mucopolisaccaridosi Classificazione primi anni '80		Ritardo Mentale	Ritardo Crescita	Facies grossolana	Displasia ossea	Rigidità Articolare	Epatospleno megalia	Opacità corneale	Ereditarietà
Tipo	Nome								
I H	Hurler	+++	++	+++	+++	++	++	+	Autosomica Recessiva
I S	Scheie	-	-	+/-	+	+	+/-	+	
I H/S	Compound Hurler/Scheie	+/-	+	++	++	++	+	+	
II A	Hunter grave	+	+	+	++	+	+	+/-	Xlinked recessiva
II B	Hunter lieve	+/-	+	+	++	+	+		
III A	Sanfilippo A	+++	-	+	+	+/-	++	-	Autosomica recessiva
III B	Sanfilippo B	+++	-	+	+	+/-	++	-	
III C	Sanfilippo C	+++	-	+	+	+/-	++	-	
III D	Sanfilippo D	+++	-	+	+	+/-	++	-	
IV A	Morquio A	-	+++	+	++	+	+	+	Autosomica recessiva
IV B	Morquio B	-	++	+	++	+	+	+	
V	VACANTE								
VI A	Maroteaux- Lamy classica	-	++	++	++	+	+	+	Autosomica recessiva
VI B	Maroteaux- Lamy lieve	-	+	+	+	+	+	+	
VII	Sly	+	+/-	+/-	+	-	++	+/-	Autosomica recessiva
assente -	occasionale +/-	lieve +	meno grave ++	grave +++					

Alla fine degli anni sessanta grazie alla possibilità di testare la complementazione in colture di fibroblasti di pazienti affetti da MSP (n.b. testare la complementazione vuol dire vedere se facendo crescere in coltura mista cellule derivati da pazienti con due diverse sindromi l'accumulo nel mezzo dei mucopolisaccaridi veniva meno) si pote' suddividere ulteriormente in sottogruppi i pazienti. Inizialmente si provò con cellule di affetti di Hurler e Hunter (che erano chiaramente dovute a



mutazioni di locus diversi) e poi si proseguì con le altre.

Da notare nella tabella 1 che MPS V è dato vacante perché inizialmente si riteneva sulla base della clinica che la sindrome di Scheie fosse un'entità a sé e aveva il numero V. Gli studi di complementazione evidenziarono che non c'era complementazione fra Hurler e Scheie quindi dovevano essere alleliche. (perché? serie allelica?) La spiegazione del diverso fenotipo clinico la troverete quando parleremo in dettaglio di MPSI.



**Incorporazione anormale di  $^{35}\text{SO}_4$  in cellule di pazienti Hunter e Hurler.** La coltivazione in vitro di cellule di Hunter e di Hurler con cellule normali così come quella di cellule di Hunter con cellule di Hurler porta alla riduzione di  $^{35}\text{SO}_4$  incorporato ed i risultati sono simili a quelli ottenuti con cellule di un individuo normale. (Fratantoni et al., 1968)

Successivamente si definirono quali fossero i difetti enzimatici corrispondenti e si evidenziò chiaramente il fatto che lo stesso fenotipo clinico corrisponde ad entità biochimiche e quindi genetiche diverse (eterogeneità genetica), come ipotizzato ancora prima di conoscere le differenze enzimatiche confrontando la scarsa variabilità all'interno delle famiglie con la notevole



variabilita' fra famiglie (perche'?)

<b>Mucopolisaccaridosi Classificazione attuale da OMIM</b>			
<b>Tipo</b>	<b>Nome</b>	<b>sostanza maggiormente accumulata</b>	<b>difetto enzimatico</b>
<b>I H</b> <b>I S</b> <b>I H/S</b>	<b>Hurler</b> <b>Scheie</b> <b>Compound Hurler/Scheie</b>	<b>Dermatan solfato ed eparan solfato (3:1)</b>	<b><math>\alpha</math>-L-iduronidasi</b>
<b>II A</b> <b>II B</b>	<b>Hunter grave</b> <b>Hunter lieve</b>	<b>Dermatan solfato ed eparan solfato (1:1)</b>	<b>Iduronato 2-solfatasi</b>
<b>III A</b> <b>III B</b> <b>III C</b> <b>III D</b>	<b>Sanfilippo A</b> <b>Sanfilippo B</b> <b>Sanfilippo C</b> <b>Sanfilippo D</b>	<b>Eparan solfato</b>	<b>eparan N-solfatasi</b> <b><math>\alpha</math>-N-acetilglucosaminidasi</b> <b><math>\alpha</math>-glucosaminide acetiltransferase</b> <b>N-acetilglucosaminia-6-solfato solfatasi</b>
<b>IV A</b> <b>IV B</b>	<b>Morquio A</b> <b>Morquio B</b>	<b>Cheratan solfato</b>	<b>galattosammina-6-solfato solfatasi</b> <b><math>\beta</math>-galattosidasi</b>
<b>V</b>	<b>VACANTE</b>		
<b>VI A</b> <b>VI B</b>	<b>Maroteaux-Lamy classica</b> <b>Maroteaux-Lamy lieve</b>	<b>Dermatan solfato</b>	<b>N-acetilgalattosammina -4-solfatasi (arilsofatasi B)</b>
<b>VII</b> <b>VIII</b>	<b>Sly</b> <b>VACANTE</b>	<b>Dermatan solfato ed eparan solfato</b>	<b><math>\beta</math>-glucuronidasi</b>
<b>IX</b>			<b>ialunoridasi</b>

Notare la sindrome di Sanfilippo: quattro tipi enzimatici, 4 locus, fenotipo identico sia sul piano clinico che sul piano della sostanza accumulata: come si spiega? I glicosaminoglicani sono lunghe molecole saccaridiche costituite da un disaccaride che si ripete, la cui degradazione richiede la rimozione di un monosaccaride terminale ad opera di un enzima specifico e a volte il singolo enzima partecipa al catabolismo di piu' di un GAG, con conseguenze ovvie (o no?).

Oggi nella classificazione delle MPS si e' arrivati a IX (cfr. oltre), saltando MPSVIII che era stata descritta in un solo paziente nel 1977 e si ritiene fosse una diagnosi sbagliata o piu' probabilmente un falso del laboratorio....

Entreremo nel dettaglio di MPS I e MPS II, ma prima vi daro' alcuni cenni sulle altre. Caratteristica clinica comune a tutte le MPS con l'eccezione della MPS III (Sanfilippo) e' il cambiamento dell'aspetto fisico dei pazienti che alla nascita sono normali e che con il progredire della malattia, a causa delle deformazioni ossee assumono un'aspetto grossolano dei lineamenti.

In tutte le MPS il ritardo mentale puo' essere importante ed e' progressivo, ad iniziare dai primi anni di vita che invece sono caratterizzati da assenza di segni neurologici e fenotipici significativi.

L'aspettativa di vita e' ridotta. La diagnostica in tutte si basa sui dosaggi biochimici e sulla ricerca delle mutazioni a livello del DNA, infatti di tutte si

conosce il gene coinvolto. Una volta identificata la mutazione nel probando la diagnostica, soprattutto prenatale, si basa sul DNA. Quello che dirò a proposito di MPS I e MPS II, vale anche per tutte le altre dal momento che tutte si presentano come autosomiche recessive e con allelia multipla e quindi tutte presentano le stesse problematiche

Per quello che riguarda la terapia le possibilità sono legate al trapianto di midollo osseo (il primo riuscito fu nel 1981) e da qualche anno alla sostituzione dell'enzima mancante.

Il trapianto di midollo è stato limitato finora dalla scarsità di donatori compatibili e dai trattamenti detti di condizionamento (servono ad eliminare dai tessuti le cellule non in grado di svolgere la fusione corretta). Questi ostacoli sono stati ridotti in questi anni sia grazie alle migliorate terapie antirigetto che permettono di ricorrere anche a donatori non del tutto compatibili e dai migliori protocolli di condizionamento. Uno studio europeo retrospettivo avrebbe però mostrato la validità del trapianto essenzialmente nella MPS I e non nelle II e III, per motivi ancora da definire; inoltre questo trattamento va effettuato in fase precoce di malattia, come dovrebbe avvenire in modo ottimale anche per la terapia enzimatica sostitutiva

L'Italia è stato il primo paese europeo a consentire la terapia sostitutiva nelle MPS I e VI con il SSN. I risultati clinici mostrano miglioramenti della qualità di vita, specie quando non è coinvolto il sistema nervoso centrale. Il problema è infatti, nelle forme a grave coinvolgimento neurologico, riuscire a far passare l'enzima mancante attraverso la barriera emato-encefalica (sistema di difesa messo in atto dall'organismo per evitare attacchi al cervello): per questo si sperimentano anche la somministrazione intracerebrale diretta, o quella di virus modificati o di cellule staminali che lo producono.

## Genetica delle MPS

Eccetto MPS II Hunter (cfr.oltre) sono tutte autosomiche recessive:

☛ entrambi i genitori sono portatori sani e eterozigoti, il rischio per i loro figli al momento del concepimento:

- ☞ 25% affetti, 50% portatori sani di una delle mutazioni presenti nei genitori, 25% non portatori e quindi wt/wt. I figli già nati e non affetti hanno 2/3 di probabilità di essere portatori.

Dal momento che gli affetti dalle forme attenuate possono riprodursi, il rischio di avere un figlio affetto è legato al genotipo del partner:

- ☞ se non è portatore 0, se lo è 50%. Gli zii di un affetto, in assenza di altri affetti nella famiglia (cugini dell'affetto che indicherebbero che entrambi i nonni erano portatori) hanno il 50% di probabilità di essere portatori.

## Dettaglio delle diverse MPS

### MPS III Sanfilippo

MPS III comprende, come già sottolineato, quattro fenotipi biochimici e quindi 4 locus. La sintomatologia è caratterizzata da una grave compromissione del sistema nervoso centrale e da lievi alterazioni fenotipiche, fatto che rappresenta un'eccezione nel panorama clinico delle Mucopolisaccaridosi.

L'inizio delle manifestazioni cliniche avviene tra i 2 e i 4 anni, in un bambino che precedentemente sembrava normale. Lo sviluppo del linguaggio è solitamente ritardato, con povertà di contenuti e di articolazione; alcuni pazienti non imparano mai a parlare.

Nell'insieme, il tipo A è il più grave, con insorgenza più precoce, più rapida progressione dei sintomi e minor sopravvivenza, mentre è noto che i pazienti affetti dal tipo B rimangono operativi fino alla terza o anche alla quarta decade di vita. I tipi C e D sembrano essere clinicamente eterogenei. L'andamento della malattia è progressivo, e la maggior parte dei pazienti muore prima dei 20 anni.

È più frequente in Olanda e in Australia, con una prevalenza rispettivamente di 1/53.000 e 1/67.000. La frequenza dei vari sottotipi cambia nelle diverse nazioni: il sottotipo A è più frequente in Inghilterra, in Olanda e in Australia e il sottotipo B è più frequente in Grecia e Portogallo, mentre i tipi IIIC e IIID sono molto meno comuni. In totale hanno una prevalenza di 1-9/100.000 (dati da Orphanet <http://www.orpha.net> )

#### **MPS IIIA Sanfilippo tipo A**

Il gene coinvolto (SGSH), mappa in 17q25.3, codifica per l'enzima eparan N-solfatasi e' composto da 8 esoni ed e' lungo 11 Kb. Il suo prodotto e' una proteina del peso di 56.7 KDa, lunga 502 aa.

Sono state descritte almeno 62 mutazioni patogenetiche diverse di SGSH, ciascuna delle quali ha una frequenza bassa. Tutte provocano una grave compromissione del SNC, ma solo lievi alterazioni fenotipiche, l'insorgenza dei sintomi di solito e' fra i 2-6 anni e la sopravvivenza non va oltre la terza decade

#### **MPS IIIB Sanfilippo tipo B**

È dovuta a mutazioni patogenetiche del gene NAGLU. NAGLU codifica per l'enzima  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasi, mappa in 17q21.1, e' lungo 8.52 Kb ed e' composto da 6 esoni. Il prodotto e' una proteina di 743 aa del peso di 82,2 kDa. Sono state descritte almeno 86 mutazioni patogenetiche diverse (tutte con una bassa frequenza), la cui conseguenza e' un fenotipo grave con sopravvivenza non oltre la seconda decade di vita

#### **MPS IIIC Sanfilippo tipo C**

Il gene (HGSNAT), mappa in 8p11 e codifica per l' $\alpha$ -glucosaminide acetiltransferase. E' lungo 62,3 Kb ed ha 18 esoni. La proteina pesa 73 kDa ed e' lunga 653 aa. Anche in questo caso vi sono piu' mutazioni patogenetiche che provocano una grave forma ad insorgenza precoce. E' piu' rara delle prime due

#### **MPS IIID Sanfilippo tipo D**

Il gene (GNS), mappa in 12q14 e codifica per N-acetilglucosaminia-6-solfato solfatasi. E' lungo 43.25 Kb ed ha 14 esoni. La proteina pesa 62,1 kDa ed e' lunga 552 aa. Anche in questo caso vi sono piu' mutazioni patogenetiche che provocano una grave forma ad insorgenza precoce. E' piu' rara delle prime due

## **MPS IV Morquio**

E' caratterizzata da una displasia spondilo-epifiso-metafisaria progressiva a partire dai primi anni (in poche parole significa che ci sono deformazioni ossee dovute all'ispessimento delle stesse con arresto dello sviluppo e deformazione anche a carico del viso), le complicanze neurologiche sono secondarie alle deformità scheletriche. L'intelligenza è normale.

Se ne conoscono due forme, A e B. La prevalenza è circa 1/250.000 per il tipo IVA, anche se l'incidenza varia molto tra i diversi paesi. La MPS IVB è molto rara.

Da notare che nel caso della MPS IVB e' presente una serie allelica: vi ricordo che per serie allelica si intende quel fenomeno per cui mutazioni in punti diversi di un gene possono provocare fenotipi diversi che possono essere collegati fra loro solo dopo l'identificazione del gene e della sua funzione(cfr.oltre)

### **MPS IVA MORQUIO tipo A**

Il gene coinvolto(GALNS) mappa in 16q24.2, codifica per l'enzima galattosammina-6-solfato solfatasi(altrimenti definita N-acetilgalattosammina-6-solfato solfatasi). E' lungo 43,2 kb e composto da 14 Esoni. La proteina e' lunga 522 aa, pesa 58,02 kDa. Sono state identificate 118 mutazioni patogenetiche (non e' poco per una malattia rara).

### **MPS IVB MORQUIO tipo B**

E' causata dalla mancato funzionamento del gene (GLB1) che codifica per la  $\beta$ -galattosidasi. Questo gene lungo circa 100kb e composto da 16 esoni, codifica per una proteina del peso di 76 kDa composta da 677aa e presente in due isoforme per effetto di una variante di splicing. La variante S-GAL non ha attività enzimatica, ma ha un ruolo funzionale nella formazione della elastina e nello sviluppo del connettivo.

GLB1 e' mutato anche in un'altra malattia lisosomiale: la gangliosidosi GM1 in cui sono sempre presenti deformazioni scheletriche, ma anche deterioramento del SNC. Test di complementazione hanno dimostrato che cellule di MPS IVB non complementano con cellule della gangliosidosi GM1. Ci troviamo perciò di fronte ad un caso di serie allelica, legato alle diverse funzioni che il prodotto del gene svolge. Infatti la proteina con attività catalitica taglia anche il residuo terminale di galattosio presente nel ganglioside GM1. Solo 9 delle circa 60 mutazioni patogenetiche di GLB1 sono riscontrate in pazienti affetti da MPS IVB, ad indicare che quei siti mutati alterano il metabolismo del cheratan solfato, ma non entrano nel catabolismo del ganglioside GM1: gli affetti da MPS IVB non hanno compromissione cerebrale e hanno una sopravvivenza più lunga.

## **Curiosita' storiche**

La sindrome e' stata identificata nel 1929 indipendentemente e contemporaneamente a Montevideo (Paraguay) da Morquio, L.(Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. Bull. Soc. Pediat. Paris 27: 145-152, 1929) e a Birmingham (Inghilterra) da Brailsford, J. F. (Chondro-osteo-dystrophy: roentgenographic and clinical features of child with dislocation of

vertebrae. Am. J. Surg. 7: 404–410, 1929). Il nome del secondo autore però non compare nella denominazione della sindrome.

Nel 2006 Bernal, J. E. e Briceno, I. esaminando il vasellame appartenente alla cultura Tumaco-La Tolita (cultura precolombiana sviluppatasi 2500 anni fa al confine fra Ecuador e Colombia) hanno rinvenuto statuine (15) raffiguranti un soggetto di bassa statura, con viso dai lineamenti grossolani, naso e collo corti, torace carenato e spalla sinistra più alta della destra, caratteristiche riconducibili alla sindrome di Morquio. (Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. Clin. Genet. 70: 188–191, 2006.)



### **MPS VI MAROTEAUX-LAMY**

È caratterizzata da un grave coinvolgimento somatico e dall'assenza di deficit cognitivo. La prevalenza varia tra 1/250.000 e 1/600.000 nati. Nelle forme gravi, i primi sintomi clinici compaiono tra i 6 e i 24 mesi di vita e si accentuano gradualmente con la comparsa di dismorfismi facciali anche molto accentuati, di solito lo sviluppo mentale è normale o quasi normale, ma i disturbi dell'udito e della vista possono portare a difficoltà dell'apprendimento. I sintomi e la gravità della malattia variano molto tra i pazienti e sono stati descritti casi intermedi o molto lievi.

La malattia è dovuta al deficit dell'enzima N-acetilgalattosamina-4-sulfatasi (o arilsulfatasi B), che determina l'accumulo lisosomiale di dermatan solfato (DS). Il gene (ARSB) è stato mappato in 5q14.1 e sono state identificate più di 54 mutazioni. È lungo 209,32 kb, e' costituito da 8 Exoni, la proteina corrispondente pesa 59.7 kDa ed e' composta da 533aa

### **MPS VII SLY**

Dopo la prima descrizione della malattia, fatta da Sly nel 1973, sono stati descritti meno di 40 pazienti con un esordio neonatale o intermedio, sono noti anche casi molto lievi, che vengono diagnosticati durante l'adolescenza o la vita adulta dopo la comparsa di cifosi toracica. La malattia è causata dal deficit dell'enzima beta-D-glucuronidasi.

Il gene(GUSB) è stato localizzato in 7q21 e sono state identificate più di 40 mutazioni patogenetiche, e' lungo 21,5 kb, ha 12 esoni, la proteina corrispondente pesa 74,7 kDa ed e' lunga 651aa

### **MPS IX DEFICIT DI IALURONIDASI**

E' l'ultima MPS descritta in ordine di tempo (1996), e' causata da mutazioni patogenetiche di HYAL1. Il gene mappa in 3p21.3-p21.2 e' lungo 12,5 kb ha 6 esoni e codifica per l'enzima ialuronidasi (57 kDa e 435 aa)

## **MPS I HURLER-SCHEIE (deficit $\alpha$ -L-iduronidasi)**

### **Cosa e' MPS I**

Questa patologia, considerata il prototipo delle patologie lisosomiali, presenta uno spettro ampio e continuo di sintomi. I pazienti hanno una facies caratteristica con volto deformato al punto che, come per gli affetti da MPS II (Hunter), venivano definiti affetti da *gargoilismo* (da gargolla o gargoyle all'uso anglosassone, figura iconografica che si vede scolpita in molte chiese cristiane medioevali. Il vocabolo deriva dal latino gurgulium).

Tradizionalmente soggetti con il deficit di  $\alpha$ -L-iduronidasi sono stati classificati come affetti da sindrome di Hurler (MPS IH), Hurler-Scheie (MPS IH/S), o Scheie (MPS IS) sulla base della gravita' delle manifestazioni cliniche dal momento che non ci sono differenze fenotipiche caratteristiche delle diverse forme (cfr.Tabella 1): MPS IH piu'grave-MPS IH/S intermedia-MPS IS piu' lieve.

- ☛ MPS IH Hurler e' la forma piu' grave, viene di solito diagnosticata nei primi due anni in bambini che alla nascita sono normali. Con il progredire della malattia, si ha un cambiamento del viso che assume l'aspetto di maschera, nel corso degli anni si aggiungono deformazioni scheletriche e arresto della crescita. Tutti presentano un grave ritardo mentale progressivo e muoiono nella prima decade di vita per arresto cardiorespiratorio.
- ☛ MPS IH/S Hurler-Scheie, gli affetti presentano segni meno evidenti della MPS IH, hanno bassa statura, ma le deformazioni sono piu' lievi. Il ritardo mentale non e' presente e raggiungono l'eta' adulta.
- ☛ MPS S Scheie, gli affetti presentano lievi segni dismorfici e non hanno ritardo mentale al punto che a volte la diagnosi viene fatta nell'eta' adulta. La loro aspettativa di vita non e' molto ridotta anche se possono avere problemi cardiocircolatori.

Oggi si preferisce dividerli in due gruppi: grave e attenuato che si ritiene corrispondano meglio al difetto biochimico di base

### **Genetica di MPS I**

E' autosomica recessiva, la frequenza nei nati vivi e' 1/100.000 la IH e

1/500.000 la IS, ma la frequenza di alcuni alleli patologici e' diversa fra le popolazioni indicando la presenza di un effetto del fondatore anche se meno evidente rispetto alla Tay-Sachs:

- L'allele p.Trp402X ha una frequenza dell'11% fra i portatori italiani e del 55% fra quelli dell'Oceania;
- L'allele p.Gln70X e' presente nel 7% dei portatori in Inghilterra e nel 65% in Scandinavia.

Essendo autosomica recessiva entrambi i genitori sono portatori sani e eterozigoti, il rischio per i loro figli al momento del concepimento: 25% affetti, 50% portatori sani di una delle mutazioni presenti nei genitori, 25% non portatori e quindi wt/wt. I figli gia' nati e non affetti hanno 2/3 di probabilita' di essere portatori.

Dal momento che gli affetti dalla forma IS possono riprodursi, il rischio di avere un figlio affetto e' legato al genotipo del partner: 0% se non e' portatore (evento probabile vista la rarita' della malattia eccetto nel caso di matrimoni fra consanguinei), se lo e' 50%. Gli zii di un affetto, in assenza di altri affetti nella famiglia (cugini dell'affetto che indicherebbero che entrambi i nonni erano portatori) hanno il 50% di probabilita' di essere portatori.

Per MPS I il test dell' $\alpha$ -L-iduronidasi nei leucociti e' discriminante negli affetti in cui nella quasi totalita' c'e' totale assenza dell'attivita' enzimatica, ma non e' affidabile per i sospetti portatori e non permette l'attuazione di screening diversamente da Tay-Sachs (cfr.), cosa che vista la rarita' della malattia non e' comunque un'opzione praticabile. (cfr. definizione di screening). La difficolta' di interpretazione del test enzimatico e' dovuta sia a problemi di interpretazione del dosaggio dell'attivita', sia alla presenza di pseudodeficiency alleli (cfr. Alleli e Diagnosi)

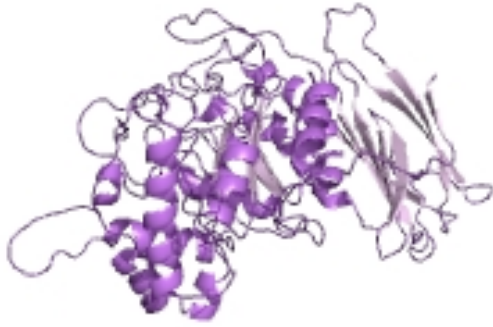
La certezza dello stato di portatore si ottiene solo con lo studio del DNA che e' appropriato:

- per confermare la diagnosi,
  - per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia.
- Ovviamente l'identificazione della mutazione e' indispensabile per una diagnosi prenatale (cfr. Diagnosi)

## Il gene IDUA ( $\alpha$ -L-iduronidasi)

E' l'unico gene le cui mutazioni patogenetiche producano il fenotipo MPS I nelle sue due forme. Mappa in 4p16.3, e' lungo circa 19kb e ha 14 esoni, la sua reading frame e' di circa 2kb, presenta al suo interno un polimorfismo VNTR nell'introne 2. Il suo prodotto, una proteina lunga 653 aa e pesa 72.7 kDa, catalizza l'idrolisi del residuo terminale non riducente di due glicosamminoglicani: dermatan solfato ed eparansolfato, innescando la loro degradazione.





## $\alpha$ -L-iduronidasi

### Alleli

Sono presenti due alleli che vengono definiti **pseudodeficiency alleles** di cui non si conosce ne' la frequenza ne' la sequenza. Sono stati identificati per la presenza di individui normali che al test su substrato sintetico (utilizzato per i test) presentavano ridotta o assente attivita'. Questi stessi individui non presentavano pero' alterato metabolismo dei glicosamminoglicani quando veniva eseguito il test con GAG marcati con S<sup>35</sup>. Anche in Tay-Sachs esistono pseudodeficiency alleli, ma sono stati ben caratterizzati dal punto di vista molecolare (cfr. Tay-Sachs). La presenza nella popolazione di questi alleli rende piu' difficile la diagnosi dei portatori (cfr. Diagnosi).

Gli alleli patogenetici sono molti (108) e di tutti i tipi, missenso, nonsenso, delezioni, inserzioni, mutazioni di splicing.....

### Relazione genotipo fenotipo

Dal momento che circa il 70% degli alleli patogenetici sono ricorrenti negli affetti, la presenza di uno o due di questi in un affetto possono essere predittivi del fenotipo. Tuttavia la presenza di molti alleli non ricorrenti e/o di mutazioni private (presenti solo in un individuo) possono rendere difficile la correlazione genotipo-fenotipo. Un quadro di massima, tenendo presente che si basa piu' sulla frequenza con cui un certo allele si ritrova associato al fenotipo, che sulla comprensione dell'effetto della mutazione sulla funzionalita' della molecola, puo' essere:

- ➡ Alleli definiti "gravi" (in inglese severe): sono quegli alleli che in omozigosi vera, cioe' l'affetto ha due alleli identici dal punto di vista della mutazione patogenetica, o in eterozigosi composta con un allele gia' riconosciuto come grave, producono nell'affetto la sintomatologia piu' grave.
- ➡ Alleli "lievi" (in inglese attenuate ) sono quelli che associati con un allele grave producono un fenotipo attenuato con permanenza di una residua attivita' enzimatica.

Da notare che l'ipotesi avanzata da McKusick nel 1972, che il fenotipo IH e IS fossero dovuti alla presenza in omozigosi di particolari mutazioni e l'intermedio IH/IS a combinazioni delle stesse, si e' rivelata poco probabile. A giustificazione dell'errore di McKusick (che di errori ne ha fatti pochi) si puo' addurre il fatto che allora non si poteva immaginare che l'allelia multipla fosse cosi spinta: oggi sappiamo, grazie al sequenziamento, che a meno dell'effetto del fondatore in popolazioni circoscritte, il vero omozigote per mutazioni patogenetiche e' raro.

La nomenclatura attualmente accettata suddivide la malattia in due categorie: grave e attenuato, e riflette la consapevolezza che la variabilita' fenotipica dipende dalla presenza di prodotti degli alleli che possano o meno produrre una attivita' enzimatica residua: se entrambi hanno questa caratteristica il fenotipo si collochera' all'estremo attenuato, se nessuno dei due consente di avere un enzima anche parzialmente funzionante, si avra' fenotipo grave. Nel caso di un allele lieve e uno grave il fenotipo sara' tanto piu' attenuato quanto maggiore sara' l'attivita' enzimatica garantita dall'allele lieve.

## Diagnosi

Data la variabilita' nelle manifestazioni cliniche negli affetti, queste non sono diagnostiche prese da sole: viene sospettata in presenza di deformazioni ossee, associate ad epatosplenomegalia, opacita' corneale, lineamenti grossolani. Tutte questi segni sono tuttavia condivisi anche dalle altre MPS.

I test biochimici che permettono di fare diagnosi di laboratorio partono dalla determinazione della presenza di mucopolisaccaridi nelle urine: a seconda di quali GAG sono presenti ci si indirizza verso una o l'altra MPS. Nel caso di MPS I si ritrovano eparan e dermatan solfato (Tab.1). Questa misurazione puo' essere sia quantitativa che qualitativa (elettroforesi dei GAG), ( per i dettagli delle tecniche vi rimando al corso di Biochimica), vi segnalo che nessuno dei due metodi, che possono presentare una ridotta sensibilita', e' in grado di diagnosticare una specifica malattia lisosomiale, tuttavia indicano la verosimiglianza di una MPS e indirizzano verso altri test. L'elettroforesi dei GAG puo' escludere o confermare la presenza di particolari forme di MPS, ma la diagnosi definitiva richiede la determinazione dell'enzima.

## Test per $\alpha$ -L-iduronidasi

Negli affetti:

- In quasi tutti i malati l'enzima non e' individuabile.
- Anche se non completamente accertato, sembrerebbe che lo 0.13% di attivita' enzimatica sia sufficiente per avere un fenotipo piu' lieve.

**Ricerca dei portatori:** l'analisi biochimica e' secondaria a quella sul DNA per problemi di identificazione del range di normalita'. Bisogna considerare che il test dell' $\alpha$ -L-iduronidasi, all'interno della popolazione generale, presenta delle difficolta' dovute al considerevole overlap esistente fra l'estremo inferiore del range di normalita' e l'estremo superiore dei livelli presenti negli eterozigoti. A questo va aggiunto che sono presenti nella popolazione i pseudodeficiency allele, il cui prodotto pur essendo perfettamente funzionante *in vivo*, non e' in grado di reagire correttamente con il substrato sintetico utilizzato nel test.

Pertanto, non e' possibile eseguire uno screening, dal momento che a differenza della Tay-Sachs (cfr.) non si conosce la sequenza di questi alleli e quindi non si puo' confermare se una mancata attivita' dell'enzima sia dovuta alla loro presenza con conseguente diagnosi di **non portatore**, o alla presenza di un allele patogenetico con conseguente diagnosi di **portatore**.

Vista la rarita' della malattia e conseguente rarita' dei portatori il problema si pone in modo stringente solo per i familiari dell'affetto. In questo caso se la ricerca delle mutazioni di IDUA non ha dato esito nell'individuare entrambe le mutazioni nel probando, si ricorre al test biochimico confrontando il livello di attivita' dell'enzima dei portatori certi (i genitori) con quello della popolazione normale, se i due valori sono nettamente distinguibili si analizzano i soggetti a rischio.

Quale e' la logica di questo confronto? Se non si e' trovata la mutazione, questo non vuol dire che non c'e', infatti il paziente ha MPS I e quindi ha ricevuto la mutazione da entrambi i suoi genitori che sono portatori certi. Il loro livello di attivita' enzimatica mi dice cosa devo aspettarmi nei fratelli sani del probando che potrebbero aver ereditato una o l'altra mutazione patogenetica dai genitori ed essere quindi portatori.

### Diagnosi molecolare

Si basa sulla ricerca delle mutazioni note di IDUA (oltre 100), nell'affetto e nei genitori. Se l'affetto fosse gia' deceduto si possono ricercare nei genitori che sono portatori certi; in questo caso se si trovano entrambe le mutazioni non solo si conferma la diagnosi di MPS I, ma si puo' definire lo stato di portatore o meno in altri membri della famiglia. Nel caso se ne individuasse una sola, il non trovarla nei fratelli non sarebbe diagnostico (potrebbero essere portatori perche' hanno la mutazione dell'altro genitore), ma lo sarebbe per i familiari (fratelli cugini...) del genitore in cui e' stata individuata.

Attraverso la ricerca di mutazioni note associata alla scansione (scanning) del gene, secondo uno studio del 2001, si possono individuare le due mutazioni patogenetiche nel 95% delle famiglie, nel 3,5% una mutazione mentre circa l' 1% delle famiglie non riesce a conoscere le proprie mutazioni. In totale possono essere individuati il 97% degli **alleli** patogenetici.

Una volta che siano state individuate entrambe le mutazioni patogenetiche presenti nella famiglia e' possibile eseguire una diagnosi preimpianto o prenatale anche attraverso la villocentesi o amniocentesi.

La diagnosi prenatale con il test biochimico e' piu' problematica e non ha molto senso se si conoscono le mutazioni. Nel caso di una sola mutazione identificata il discorso e' piu' complesso e richiede una consulenza genetica piu' specifica (argomento che esula dai contenuti di questo corso).

### Curiosita' storiche

Nel 2006 Bernal, J. E. e Briceno, I. esaminando il vasellame appartenente alla cultura Tumaco-La Tolita (cultura precolombiana sviluppatasi 2500 anni fa al confine fra Ecuador e Columbia) hanno rinvenuto 3 statuine raffiguranti un soggetto di bassa statura, con viso dai lineamenti grossolani, sopracciglia sporgenti, bocca larga ed ernia ombelicale caratteristiche riconducibili alla sindrome di Hurler. (Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. Clin. Genet. 70: 188-191, 2006.)



## MPS II HUNTER (Deficit iduronato 2-solfatasi)

### Cosa e' MPS II

E' una malattia progressiva polisistemica, come le altre mucopolisaccaridosi, a differenza delle altre e' Xlinked e quindi risultano affetti solo i maschi. L'eta' di insorgenza, la gravita' delle manifestazioni cliniche e la velocita' di progressione sono variabili. Il fenotipo e' sovrapponibile a MPS I (tabella1), nella forma grave il ritardo mentale e' uno dei segni che si manifesta prima ed e' sempre grave, problemi respiratori e cardiaci portano a morte entro i 20 anni. Nella forma attenuata il ritardo mentale puo' mancare e l'aspettativa di vita e' migliore (possono raggiungere anche i 60 anni)

### Genetica di MPS II

Ha una frequenza di circa 1/72.000 e 1/132.000 nati maschi; come gia' detto e' recessiva X linked, quindi il rischio di essere portatore e' presente solo nella madre, nelle sorelle e nelle cugine materne del probando. In dettaglio:

#### Genitori dell'affetto

- ☞ Il padre sano di un affetto non e' mai portatore
- ☞ Se nella famiglia e' presente anche uno zio materno affetto o un cugino materno affetto, la madre e' portatrice certa e le sorelle (nate e non) hanno 50% di probabilita' di essere portatrici e altri figli maschi non ancora nati 50% di probabilita' di essere affetti. (quelli gia' nati e non malati ovviamente non hanno la mutazione!!)
- ☞ Se una donna ha piu' di un figlio affetto potrebbe non essere portatrice, potrebbe essere un mosaico germinale, il rischio per altri figli di entrambi i sessi non e' quantizzabile. Solo il test con il DNA permette di discriminare fra le due ipotesi.
- ☞ Anche se il probando e' l'unico affetto della famiglia non e' possibile senza l'analisi del DNA definire lo stato di portatrice della madre, infatti ci sono piu' possibilita':
  - ☞ L'affetto e' una nuova mutazione quindi la madre non e' portatrice, nessun rischio di trasmettere
  - ☞ La madre e' portatrice di una nuova mutazione
    - ☞ La nuova mutazione e' presente in tutte le cellule allora e' una portatrice e le sue figlie femmine hanno/avranno la probabilita' del 50% di essere portatrici, i figli maschi non ancora nati 50% di avere la malattia
    - ☞ La mutazione e' presente a mosaico solo nella linea germinale, il rischio per altri figli di entrambi i sessi non e' quantizzabile.
  - ☞ La madre e' portatrice di una mutazione che le deriva da un antenato e che non ha avuto modo di manifestarsi perche' comunque solo il 50% dei figli maschi e' affetto (il 25% dei figli considerati *in toto*) e nelle famiglie umane il numero dei figli e' limitato. Questo significa che le sue figlie femmine, nate e non, hanno 50% di probabilita' di essere portatrici.

Naturalmente in questo caso si pone il problema per i familiari di sesso femminile (sorelle, zie e cugine materne) di questa madre portatrice.

### **Fratelli dell'affetto**

Il rischio dipende dallo stato di portatrice della madre (cfr. sopra). Nel caso del mosaicismo germinale hanno un rischio più elevato di essere portatrici le femmine, e di nascere malati i maschi.

### **Figli dell'affetto**

Dal momento che nelle forme attenuate il probando può riprodursi (non è presente ritardo mentale) le sue figlie femmine sono tutte portatrici e nessun maschio affetto.

Tutto questo discorso sarebbe pura accademia se, come in Tay-Sachs, il test enzimatico nei sospetti portatori fosse possibile. Nel caso di MPS II alle difficoltà già descritte per MPS I sulla attendibilità del test enzimatico nei portatori, si aggiunge l'inattivazione del cromosoma X che rende il test non affidabile. Infatti una portatrice potrebbe avere un'attività enzimatica nel range di normalità per effetto di una inattivazione non al 50% nel tessuto esaminato. (andate a rivedere l'inattivazione del cromosoma X). Quindi la certezza dello stato di portatrice si ottiene solo con lo studio del DNA che è appropriato:

- ☞ per confermare la diagnosi,
  - ☞ per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia.
- Ovviamente l'identificazione della mutazione è indispensabile per una diagnosi prenatale (cfr. Diagnosi)

### **Il gene IDS (iduronato 2-solfatasi)**

È l'unico gene le cui mutazioni patogenetiche provochino la MPS II. È lungo 26,5 kb, presenta 9 esoni e mappa in Xq28. Il suo prodotto è una proteina enzimatica di 550 aa del peso di 61,873 kDa. Uno pseudogene IDSP1 è presente a 20kb a valle del gene funzionante, la sua presenza è la causa dell'origine di delezioni e riarrangiamenti intragenici. (cfr. alleli). Questo enzima catalizza il primo step nella degradazione dell'eparan solfato e del dermatan solfato che pertanto, vengono escreti tal quali nelle urine (cfr. Diagnosi)

### **Alleli**

Sono stati descritti oltre 300 alleli patogenetici molti dei quali privati: la maggior parte sono mutazioni puntiformi o piccole delezioni, le altre mutazioni (fino al 25%) ricadono nei riarrangiamenti genomici dovuti alla presenza a valle di IDS dello pseudogene IDSP1. L'alta omologia con lo pseudogene induce eventi di ricombinazione ineguale che generano delezioni di varie dimensioni o alterazioni della ORF.

Non sono descritti pseudodeficiency allele

### **Relazione genotipo fenotipo**

Non è stata stabilita nessuna relazione fra particolari mutazioni e il fenotipo più o meno grave, l'unica relazione è stata evidenziata nel caso delle delezioni ampie: in questo caso la compromissione del SNC è sempre presente. Non è stata stabilita nessuna relazione diretta fra presenza di attività enzimatica residua e variabilità clinica.

## Diagnosi

Data la variabilita' nelle manifestazioni cliniche negli affetti, queste non sono diagnostiche prese da sole: viene sospettata in presenza di deformazioni ossee, associate ad epatosplenomegalia, lineamenti grossolani. Tutte questi segni sono tuttavia condivisi anche dalle altre MPS, come gia' detto per MPS I.

I test biochimici che permettono di fare diagnosi di laboratorio partono dalla determinazione della presenza di mucopolisaccaridi nelle urine: a seconda di quali GAG sono presenti ci si indirizza verso una o l'altra MPS. Nel caso di MPS I si ritrovano eparan e dermatan solfato (Tab.1). Questa misurazione puo' essere sia quantitativa che qualitativa (elettroforesi dei GAG), ( per i dettagli delle tecniche vi rimando al corso di Biochimica), vi segnalo che nessuno dei due metodi, che possono presentare una ridotta sensibilita', e' in grado di diagnosticare una specifica malattia lisosomiale, tuttavia indicano la verosimiglianza di una MPS e indirizzano verso altri test. L'elettroforesi dei GAG puo' escludere o confermare la presenza di particolari forme di MPS, ma la diagnosi definitiva richiede la determinazione dell'enzima

### Test per iduronato 2-solfatasi (I2S)

La conferma di diagnosi per MPS II viene dalla dimostrazione di assenza di attivita' dell'enzima nel siero, nei fibroblasti o nei leucociti. La maggior parte degli affetti non presentano attivita' enzimatica. Bisogna comunque documentare la presenza di livelli normali di almeno un'altra solfatasi, dal momento che bassi livelli di I2S sono presenti in altre sindromi da deficienza di solfatasi che condividono alcuni segni clinici con MPS II.

**Ricerca delle portatrici:** come gia' detto per effetto dell'inattivazione del cromosoma X, il test biochimico non e' attendibile, quindi si ricorre alla diagnostica molecolare.

### Diagnosi molecolare

La difficolta' dell'analisi molecolare risiede nell'alto numero delle mutazioni patogenetiche (oltre 300), spesso private e nel fatto che per identificare la mutazione presente nella famiglia bisogna avere il DNA del proposito. La presenza di due cromosomi X infatti rende piu' laboriosa la ricerca nelle portatrici. La diagnostica si basa su:

- Analisi di sequenza della regione codificante, permette il riconoscimento dell'82% delle mutazioni sia nei maschi che nelle femmine. Con questo metodo vengono individuate
  - singole mutazioni puntiformi e mutazioni di splicing (65% in tutto)
  - piccole delezioni e inserzioni (17%)

Bisogna tuttavia notare :

- la sequenza da sola non e' sufficiente, infatti a causa della ricombinazione con lo pseudogene sequenze che derivano da questo evento possono essere considerate normali (non so che sto guardando un gene ibrido composto dal gene e dallo pseudogene). Bisogna, quindi, affiancare il Southern blot.



- La sequenza dell'intera regione codificante permette di individuare nei maschi (ma non nelle femmine) il 9% delle mutazioni
- L'analisi di sequenza dell'RNA permette di individuare mutazioni nel promotore mutazioni introniche che alterano lo splicing.
- Ricerca delle delezioni esoniche e dell'intero gene. Possono essere utilizzati piu' test quantitativi (RT-PCR) per individuare la presenza di grandi delezioni. Questo approccio sia pure laborioso e' utile per definire lo stato di portrice.
- Southern blot: si utilizza dopo aver digerito con enzimi appropriati, per evidenziare riarrangiamenti complessi che alterino il pattern dei frammenti digeriti. Individua il 9% delle mutazioni.

### Tabella riassuntiva

Metodo	mutazione identificata	% nei maschi	%nelle femmine
Analisi di sequenza	splicing, delezioni intraesoniche, puntiformi, inserzioni	82	82
	delezioni esoniche, intero gene	9	non si possono individuare
Ricerca delezioni	delezioni esoniche, intero gene	non necessario si vedono con la sequenza	9
Southern blot	Riarrangiamenti che coinvolgono IDS1P		9

Da questo si puo' capire che le tecniche sono routinarie, ma la strategia diagnostica, al contrario, si puo' rivelare complessa:

Nel probando una volta accertata la diagnosi con i dosaggi biochimici, bisogna poi ricercare la mutazione nel DNA, che si rivela utile nei casi clinicamente dubbi ed e' il primo passo per una consulenza genetica.

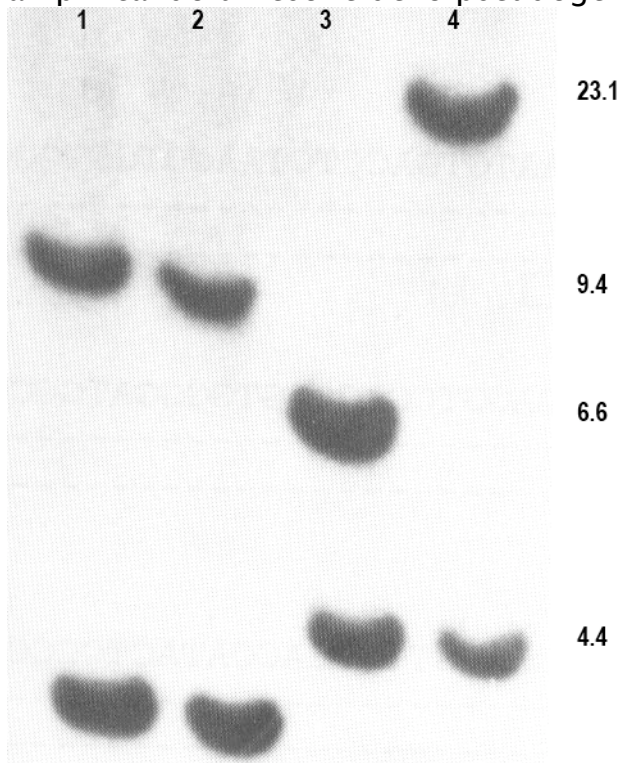
Per definire lo stato di portatrice che, ricordo, e' asintomatica, e' necessario:

- Cercare la mutazione trovata nel probando
- Se la mutazione non e' stata identificata o non c'e' il probando
  - Analisi di sequenza
  - Se non si trova niente cercare con i test per delezioni al fine di identificare eventuali delezioni intrageniche o esoniche
  - Se ancora non si trova niente utilizzare il Southern blot per individuare i riarrangiamenti fra IDS1 e IDS1P.

La diagnosi prenatale o preimpianto richiedono la conoscenza della mutazione, dal momento che il test biochimico non è affidabile. La ricerca della mutazione nel caso di villocentesi o amniocentesi si esegue dopo aver appurato che il feto è maschio attraverso l'analisi del cariotipo. Nel caso del preimpianto si procede direttamente.

### Southern Blot

DNA genomici digeriti con EcoRI o HindIII e ibridati con una sonda ottenuta amplificando un esone dello pseudogene



lane 1 e2 EcoRI 3-4 HindIII. Lane 1-3 femmina normale Lane 2-4 paziente MPSII con riarrangiamento fra il gene e lo pseudogene.

Il riarrangiamento ha alterato i frammenti di restrizione la madre del paziente, se portatrice, avrebbe 4 bande elettroforetiche invece di due.

**Terapia:** Nel 2007, è stata rilasciata dall'UE l'autorizzazione di immissione in commercio della terapia enzimatica sostitutiva con infusione dell'enzima ricombinante (idursulfasi) in qualità di farmaco orfano finalizzato al trattamento a lungo termine dei pazienti. La terapia ancora sperimentale ha mostrato un miglioramento della deambulazione e del quadro respiratorio e miglioramenti significativi a livello epatico, splenico e cardiaco. Tuttavia, non sono stati descritti miglioramenti del quadro neurologico.

### Curiosità storiche

Nel 1917 Charles Hunter, docente di medicina, a Manitoba (Canada) descrisse per la prima volta due fratelli con la malattia che poi prese il suo nome.

Nel 1919 in Germania Gertrude Hurler descrisse due ragazze con quadro clinico sovrapponibile ai precedenti eccetto che l'opacità corneale.

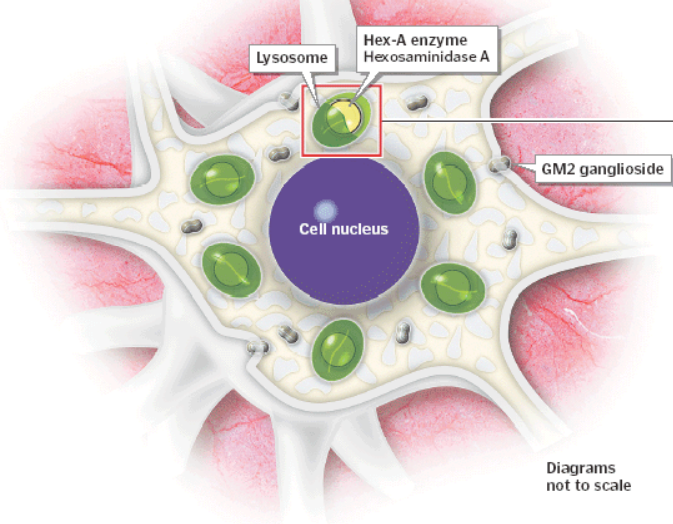
Le due osservazioni vennero considerate riferite alla stessa patologia che venne

denominata Hurler–Hunter, finche' ~50 anni dopo non si scopri' che le basi biochimiche erano diverse e quindi che si trattava di 2 malattie diverse.

# Sfingolipidosi

## Tay Sachs ( deficit di esosaminidasi A)

### Inside a nerve cell



SOURCES: University Hospitals; The National Tay-Sachs & Allied Diseases Association; healthline.com; howstuffworks.com

#### Cells in healthy children

In a healthy child, a lipid, or fat, called GM2 ganglioside enters the nerve cell as a source of food. Among the components of the cell are lysosomes, which might be thought of as the "stomachs" of the cell. They contain an enzyme called Hexosaminidase A, or Hex-A, that digests the GM2.

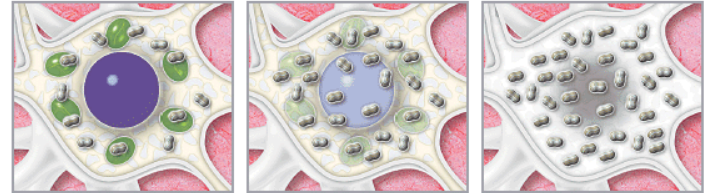
GM2 enters the lysosome ... .. where it is engulfed ... .. and digested by the Hex-A.



#### Cells in children with Tay-Sachs disease

Children with Tay-Sachs lack Hex-A, so the GM2 proliferates to such a degree that it eventually kills the cell, gradually shutting down the central nervous system.

If Hex-A enzyme is not present ... .. GM2 accumulates ... .. and in time chokes off the cells.



REID BROWN | THE PLAIN DEALER

## Cosa e' la malattia di Tay-Sachs

Il deficit di esosaminidasi A provoca l'accumulo di gangliosidi GM2 nei lisosomi. E' considerata insieme alle mucopolisaccaridosi il prototipo delle malattie lisosomiali.

Ne esistono tre forme:

- ☞ Tipo 1 Infantile acuta: compare fra i 3 e i 6 mesi di vita. Il ritardo si manifesta dopo gli 8 mesi, accompagnato da ipotonia, paralisi e danno neurologico progressivo fino a portare a morte dopo aver raggiunto uno stato vegetativo prima dei 4 anni.
- ☞ Tipo 2 Giovanile sub acuta compare nella prima decade e a seguito della neurodegenerazione si cominciano a perdere le capacita' acquisite fino a raggiungere uno stadio vegetativo. La sopravvivenza non va oltre i 15 anni.
- ☞ Tipo 3 Adulta cronica e' presente una residua attivita' dell'enzima che ritarda fino alla seconda decade la comparsa della compromissione neurologica, anche se segni di mancato coordinamento possono comparire prima. Si possono sviluppare disturbi psichiatrici. In questo tipo si puo' avere una diversa espressivita' anche all'interno della stessa famiglia per cui alcuni soggetti possono raggiungere i 50-60 anni con segni solo neuromuscolari o psichiatrici .

## Genetica di Tay-Sachs

E' autosomica recessiva, la frequenza e' 1/320.000 nati vivi se si considera la popolazione mondiale, ma sale di 100 volte se si conderano alcuni gruppi

etnici. Prima dello screening di massa per i portatori la frequenza fra gli Ebrei Askenaziti (europa dell'est e centro) era 1/3600 e la frequenza dei portatori circa 1/30 (nel resto del mondo: fra 1/250 e 1/300). A seguito delle campagne di prevenzione attraverso la ricerca degli eterozigoti e il monitoraggio delle gravidanze a rischio la frequenza degli affetti e' scesa di oltre il 90%.

In altre popolazioni che sono state o sono tuttora isolate geneticamente come gli Amish della Pensilvania, i Cajuns della Louisiana e i canadesi francofoni del Quebec la frequenza dei portatori e' comparabile se non piu' alta a quella degli Askenaziti. E' quindi evidente un tipico effetto del fondatore.

Essendo autosomica recessiva entrambi i genitori sono portatori sani e eterozigoti, il rischio per i loro figli al momento del concepimento: 25% affetti, 50% portatori sani di una delle mutazioni presenti nei genitori, 25% non portatori e quindi wt/wt. I figli gia' nati e non affetti hanno 2/3 di probabilita' di essere portatori.

Dal momento che gli affetti dalla forma cronica possono riprodursi, il rischio di avere un figlio affetto e' legato al genotipo del partner: se non e' portatore 0, se lo e' 50%. Gli zii di un affetto, in assenza di altri affetti nella famiglia (cugini dell'affetto che indicherebbero che entrambi i nonni erano portatori) hanno il 50% di probabilita' di essere portatori.

In realta' questo e' un discorso accademico perche' la diagnosi di portatore e' sicura e relativamente semplice : si puo' testare la presenza dell'attivita' enzimatica anche senza aver eseguito la diagnosi molecolare.

La diagnosi enzimatica e' alla base degli screening e viene eseguita su siero o su leucociti. La diagnosi molecolare e' appropriata:

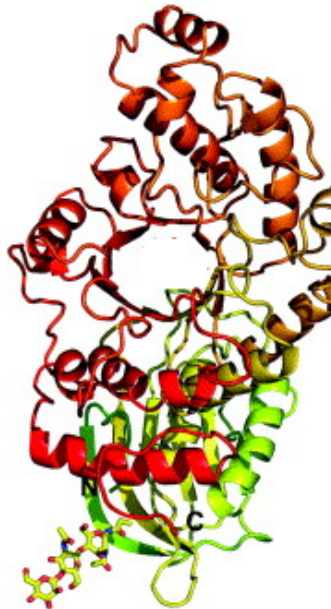
- ☞ per confermare la diagnosi,
- ☞ per individuare il genotipo dei portatori individuati con lo screening: testando le tre mutazioni comuni si individuano fra il 92 e il 94% di mutazioni fra gli Ebrei Askenaziti,
- ☞ per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia. Ovviamente l'identificazione della mutazione e' indispensabile per una diagnosi prenatale

## **Il gene HEXA (subunita' a della esosaminidasi A)**

Il gene HEXA, mappa in 15q23-24, e' lungo 32,6 kb e contiene 14 esoni. Il suo prodotto e' una proteina di 529 aa, del peso di 60,7 kDa. Concorre con la catena beta codificata dal gene HEXB alla formazione di un eterodimero: la esosaminidasi A (Gm2 gaggliosidasi). Questo eterodimero in presenza di un attivatore rimuove l'N-galattosammina terminale del gagglioside GM2. I gangliosidi sono localizzati sulla membrana cellulare di tutte le cellule, ma sono piu' abbondanti nel cervello in quantita' diversa a seconda del tipo cellulare, della regione cerebrale, dei domini della superficie cellulare. In particolare sono abbondanti sulla membrana dei neuroni a livello delle terminazioni dendritiche e degli assoni.



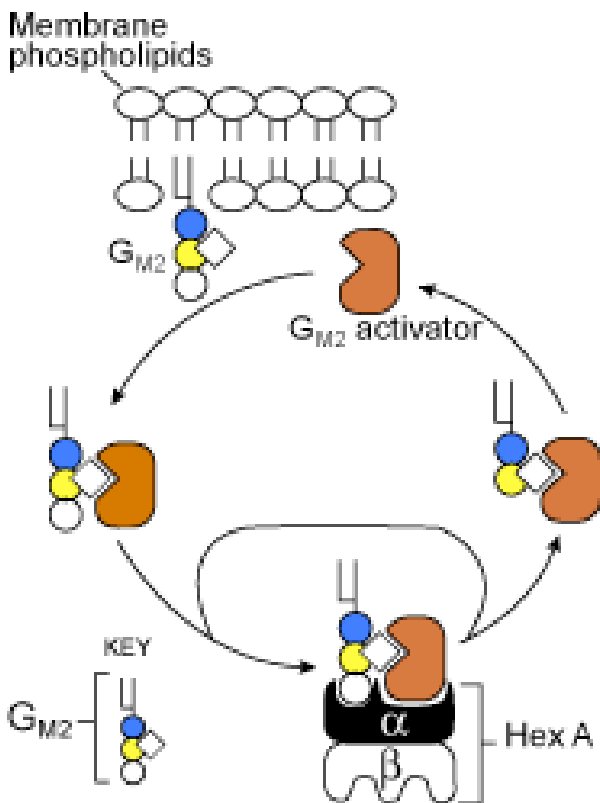
Subunita' alfa



Subunita' beta



Esosaminidase A



schema che mostra il meccanismo di azione della esosaminidase A. L'attivatore si lega al ganglioside GM2 presente sulla membrana fosfolipidica dei lisosomi, si forma il complesso con l'enzima legandosi alla subunita' alfa. Una volta che il complesso si e' formato puo' avvenire la reazione, che porta alla formazione del ganglioside GM3, che viene rilasciato dall'attivatore

## Alleli

Sono presenti due alleli che vengono definiti **pseudodeficiency alleles**: **R247W** (codone 247 Arginina > Triptofano) e **R249W** (codone 249 Arginina > Triptofano). Questi due alleli che non sono patologici e che possono essere considerati polimorfismi in relazione alla malattia, producono una proteina che non e' in grado di metabolizzare il substrato sintetico che viene utilizzato negli screening (vedi Diagnosi), ma che e' perfettamente funzionante in vivo. In



soggetti non Ebrei il 35% dei soggetti identificati come portatori con il test enzimatico sono in realta' eterozigoti wt/pseudo e quindi non a rischio. Fra gli Ebrei la percentuale e' 10 volte piu' bassa (~3%).

Sono stati descritti oltre 100 alleli patogenetici di vario tipo di cui oltre il 90% associati con la forma acuta infantile. Questi alleli non sono distribuiti uniformemente fra gli affetti, ma e' riscontrabile un chiaro effetto del fondatore evidente per es., per il limitato numero di mutazioni fra gli Ebrei Askenaziti : due sole mutazioni costituiscono il 95% degli alleli, mentre ~il 3% e' costituito da un allele per le forme piu' tardive (**G269S**: codone 269 Glicina > Serina), il restante 2% sono i due pseudodeficiency alleles. Le due mutazioni vengono definite nulle (assenza di prodotto finale) e sono :

- la piu' frequente, ~85%, un'inserzione di 4pb nell'esone 11 (+**TATC1278**) che provoca una frameshift con conseguente codone di stop a valle. Il gene viene trascritto, ma l'RNA non e' rilevabile con il Northern Blot.
- La seconda, ~ il 15%, e' una mutazione al sito donatore di splicing dell'introne 12 (**G>C**), che produce una serie aberrante di mRNA

Fra i canadesi francofoni l'allele piu' frequente e' invece una delezione di circa 7 kb al 5' del gene che porta alla mancata produzione di mRNA.

Altre mutazioni compromettono la conformazione della proteina con conseguente alterato assemblaggio nel dimero o la maturazione del polipeptide neosintetizzato. Altre ancora sono localizzate al 3' della proteina, dove pero' e' stato identificato un dominio nelle vicinanze del C-terminale , coinvolto nel trasporto.

Dal momento che l'esosaminidasi A e' un eterodimero alfa/beta esiste una variante indistinguibile dai segni neurologici: la malattia di Sandoff che e' dovuta alle mutazioni sulla catena beta. Questa patologia non presenta differenze fra le popolazioni, in particolare e' rara fra gli Ebrei Askenaziti.

## Relazione genotipo fenotipo

Per quello che riguarda la relazione genotipo fenotipo va tenuto presente che il livello di attivita' dell'enzima HEXA e' inversamente proporzionale alla gravita' della malattia:

- Soggetti affetti dalla forma letale nell'infanzia hanno due alleli nulli, cioe' non hanno attivita' dell'enzima
- Soggetti con la forma giovanile di solito sono eterozigoti composti per un allele nullo e un allele che produce un enzima con attivita' residua (variante Tay-Sacs B1). L'allele piu frequente di questo tipo e' **R178H** (codone Arginina > Istidina) trovato in pazienti di origine portoghese. Soggetti omozigoti per un allele della variante B1 hanno il doppio di attivita' enzimatica rispetto all'eterozigote composto e presentano il fenotipo cronico ad insorgenza tardiva piu' lieve.
- Soggetti con insorgenza tardiva, sono state descritte anche mutazioni private. Quelle piu' frequenti che sono associate a questo fenotipo sono
  - la **G269S**: codone 269 Glicina > Serina, che provoca un precursore instabile della sub unita' alfa incapace di dimerizzare.



- La **G250D** codone 250 (esone 7) Glicina > ac. Aspartico. Entrambi questi alleli sia in omozigosi che in eterozigosi con un allele nullo provocano la forma lieve
- Soggetti con pseudodeficiency alleles: in omozigosi e in eterozigosi sia con il wt che con alleli nulli non hanno nessuna sindrome. La loro attività enzimatica in vivo (dove conta) è normale.

## Diagnosi

La diagnosi di portatore nei casi di screening si esegue mediante dosaggio dell'attività enzimatica su substrato sintetico, dal momento che il ganglioside GM2 naturale non è stabile in vitro. Questo tipo di test non ha falsi negativi, è rapido e poco costoso e' quindi un test ideale per lo screening, tuttavia per la presenza dei pseudodeficiency alleles ha i falsi positivi (cfr. sopra). Viene comunque utilizzato su vasta scala nelle popolazioni ad alto rischio, successivamente i positivi a questo test vengono esaminati con i test molecolari, in cui vengono ricercati anche i pseudodeficiency alleles.

La diagnosi molecolare viene eseguita su:

- ☞ Individui con segni clinici, e attività borderline
- ☞ Soggetti risultati positivi allo screening per discriminare fra i veri eterozigoti e gli pseudo.
- ☞ Nei malati e nei membri della loro famiglia per individuare la mutazione presente nelle singole famiglie.
- ☞ In diagnosi prenatale per individuare feti affetti, una volta che sia stata individuata la mutazione presente nei genitori.

I test che si usano sono quelli classici per evidenziare mutazioni note, si comincia da quelle note comprese quelle degli pseudodeficiency alleles, soprattutto se si conosce l'origine etnica di coloro che richiedono l'analisi: per esempio nei Canadesi francofoni si cerca la delezione, per poi passare allo scanning e al sequenziamento quando non si fossero trovate le altre (tenendo sempre presenti le difficoltà legate a questo approccio).

Sia la diagnosi prenatale con villocentesi che amniocentesi che la diagnosi preimpianto sono possibili quando sia stata identificata la mutazione presente nella famiglia.

## Curiosità storiche

La malattia deve il suo nome ai cognomi dei due medici che per primi la descrissero.

Warren Tay (1843–1927) era un oftalmologo inglese che descrisse nel 1881 la macchia cilegia presente sulla retina di un paziente con problemi neurologici: questo spot sulla retina è uno dei segni diagnostici, anche se da solo non è conclusivo perché può avere altre cause.

Bernard Sachs (1858– 1944) era un neurologo statunitense, che parecchi anni dopo Tay descrisse i danni cellulari nei suoi pazienti. Egli individuò, osservando numerosi casi, anche la natura familiare della malattia e il fatto che i bambini affetti provenissero da famiglie con origine Askenazita. Non è un caso che lavorasse a New York dove è presente una folta comunità ebraica.

## 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/eterogeneità 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 è il gene AR, le due patologie sono:

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

Descriverò prima il gene dal punto di vista molecolare e poi passerò alla descrizione delle due sindromi.

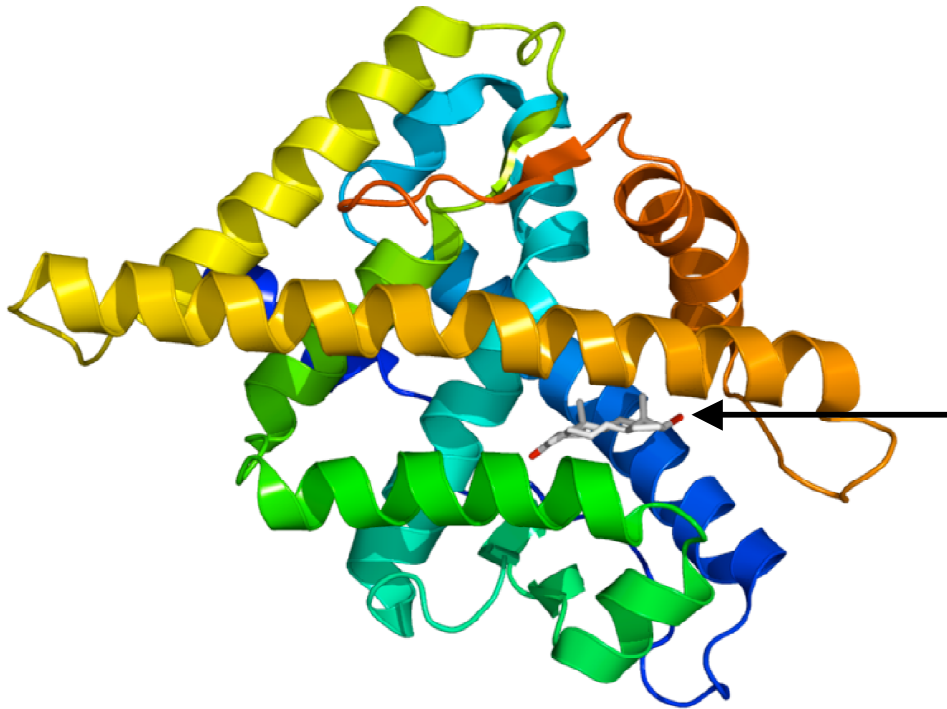
### **Il gene AR (Androgen Receptor)**

Il gene AR è l'unico le cui mutazioni provocano la sindrome di insensibilità agli androgeni, ed è anche l'unico che mutato provoca la atrofia muscolare spino-bulbare. Mappa in Xq12, è lungo 180,25 kb, ed ha 8 esoni. Il suo prodotto è una proteina idrofobica composta da 919 aa, del peso di 99 kD. Appartiene alla superfamiglia dei recettori degli steroidi ed è perciò 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 è dovuto al fatto che in questa regione sono presenti due siti poliformici per numero di triplette: il primo (CAG)<sub>n</sub> inizia al nucleotide 172 con n=10-33, codifica una serie di glutammine e può dare origine alla mutazione dinamica causa della SBMA. Il secondo (GGT)<sub>n</sub> inizia a nt 1350 con n=4-25, è 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 è 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 e' 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 cieco, 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 scendono 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 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 le 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:

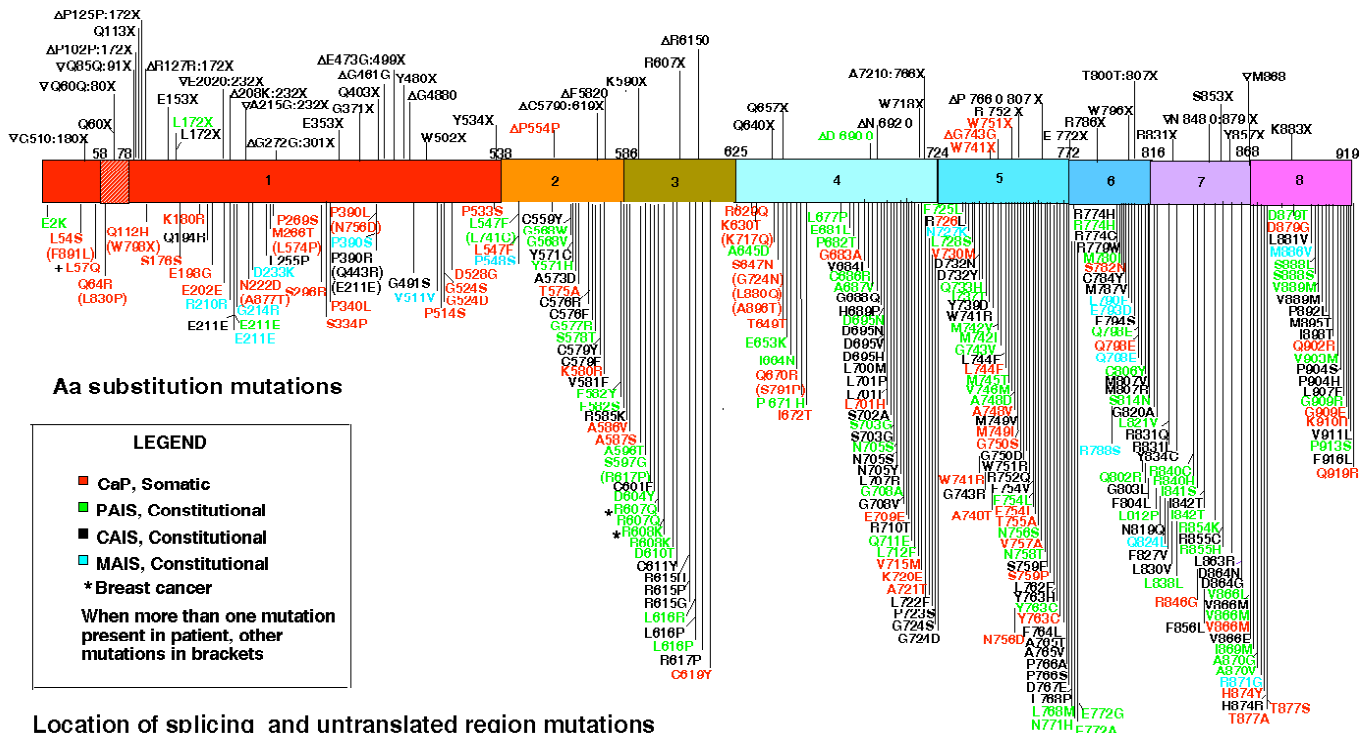
- ☞ mutazioni missenso che alterano i siti di legame con il DNA o l'ormone,
- ☞ mutazioni nell'esone 1 (che codifica per il dominio N-terminale di transattivazione) sono poco frequenti, la maggior parte sono non senso o piccole delezioni o inserzioni che producono frameshift o non senso
- ☞ delezioni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

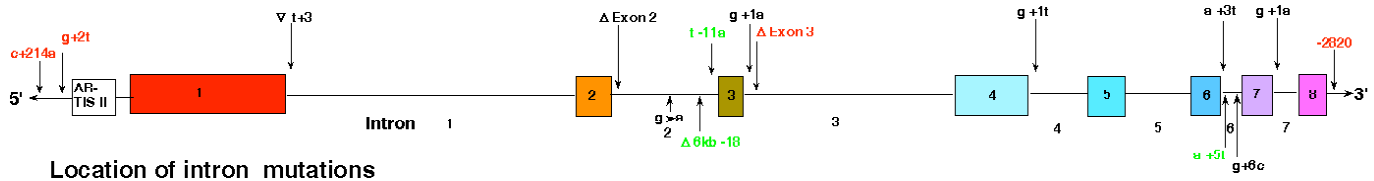
➤ Quasi tutte le mutazioni nel dominio di legame con gli androgeni impediscono la loro transattivazione AR mediata. Alcune alterano l'equilibrio nell'affinita' e/o nella dissociazione, sia per tutti gli androgeni o solo per alcuni, altre provocano una instabilita' della molecola che diventa termolabile o si degrada piu' 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 cosi 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 e' 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 e' meno evidente, anche perche' c'e' variabilita' fra le famiglie che in alcuni casi condividono la stessa mutazione. Questa variabilita' 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 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](http://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

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.

➤ 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, e' relativamente semplice (ricordate i multiplex in Duchenne?), per le portatrici si ricorre alla MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) che illustro' brevemente piu' oltre a vantaggio di chi non sapesse cosa e'.

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

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

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

➤ Gene AR normale, ma la mutazione e' 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 e' 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 intersessualita'), ritengo sia utile spendere un po' di tempo per indicare per sommi capi quali sono i modi di presentare e di gestire questa patologia.

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

Nelle forme complete, che nei casi non famigliari o presunti tali (potrebbe non essersi manifestata prima perche' non sono stati concepiti maschi o comunque quelli nati avevano ereditato la X normale) vengono diagnosticati di solito alla puberta', il problema piu' grosso, in realta', e' psicologico ed e' molto importante la consulenza psicologica e un' informazione corretta: le

proposte sono donne a tutte 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'eccezione 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.

## **MLPA Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification**

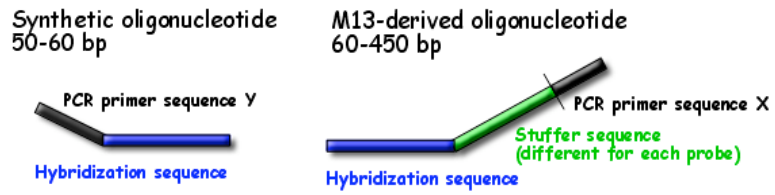
È stato descritto la prima volta da Schouten JP et al. nel 2002.

(Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12)).

È una variante della PCR che permette in un'unica reazione di testare la variazione in 45 sequenze, discriminando variazioni di singola base, stato di metilazione con l'aggiunta di uno step di digestioni con endonucleasi sensibili alla metilazione, e variazione di numero di copie.

Vengono utilizzate sonde corrispondenti alla regione da testare che hanno subito un'aggiunta sia al 5' che al 3', dopo l'ibridazione vengono legate con una reazione di ligation, l'amplificazione utilizza i primer universali e si ottengono prodotti di PCR di lunghezza nota e diversa per ogni regione amplificata o assenza nel caso di delezione. Il risultato viene evidenziato attraverso un'elettroferogramma. Lo svantaggio principale è che disegnare i probes per la diagnostica non è conveniente. Esistono in commercio Kit già testati e pronti per la diagnostica per esempio per CFTR, DMD etc...

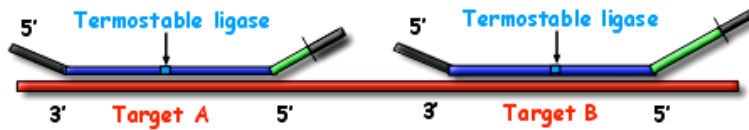
1) Creazione dei probe



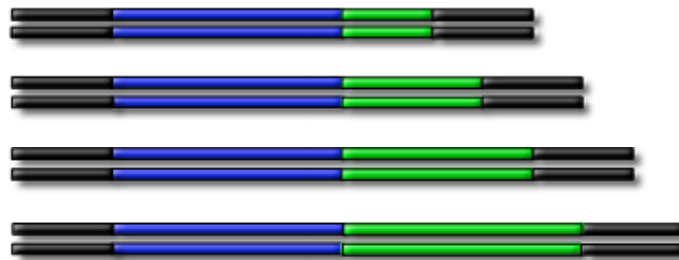
2) Ibridazione



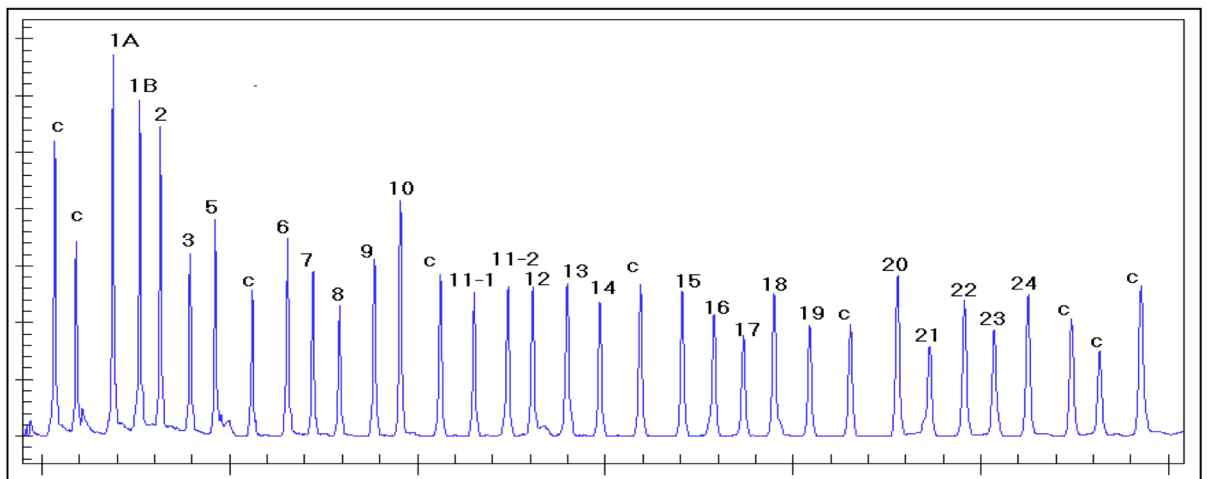
3) Ligation



4) Amplificazione

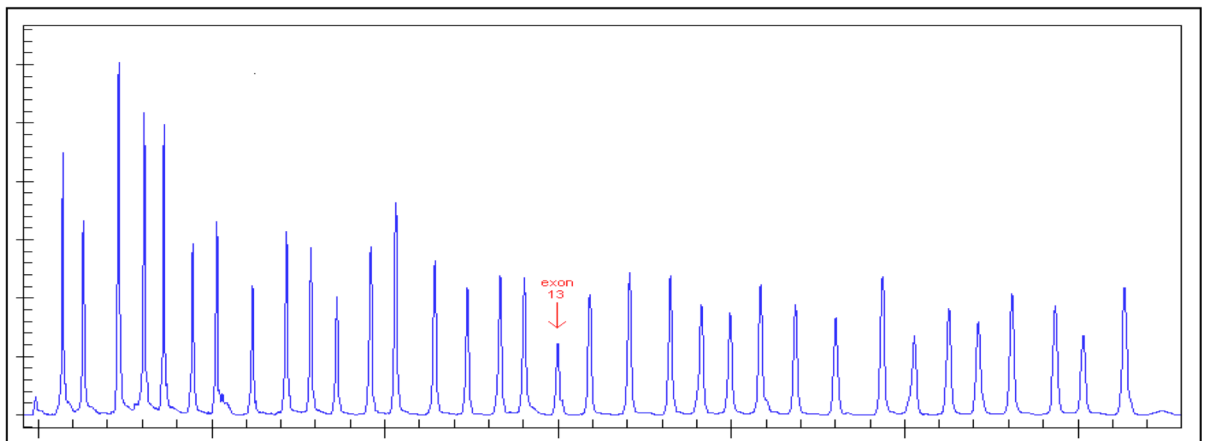


Cont



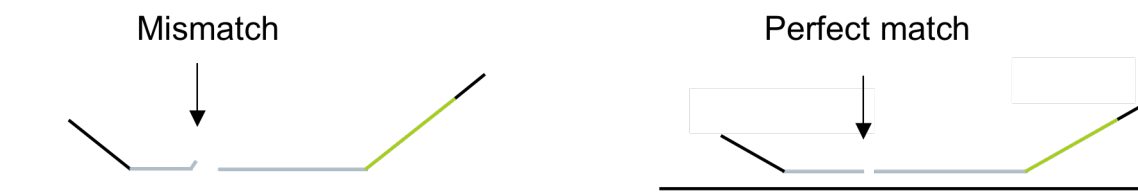
malato

L'altezza diversa nel picco indica una

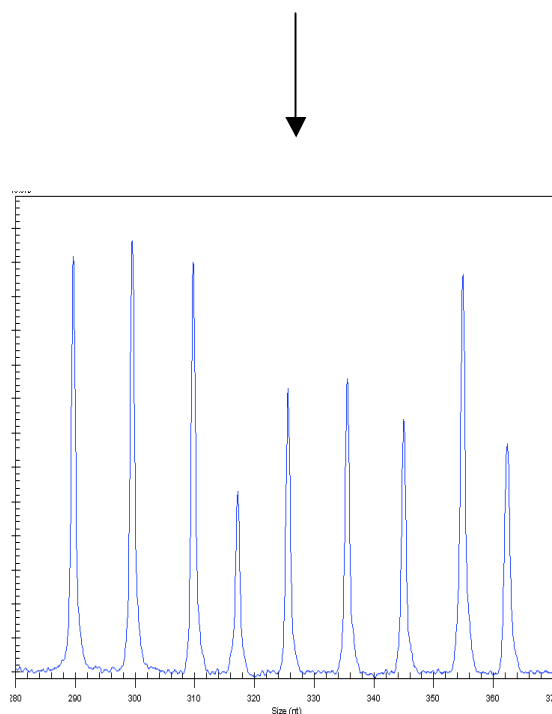
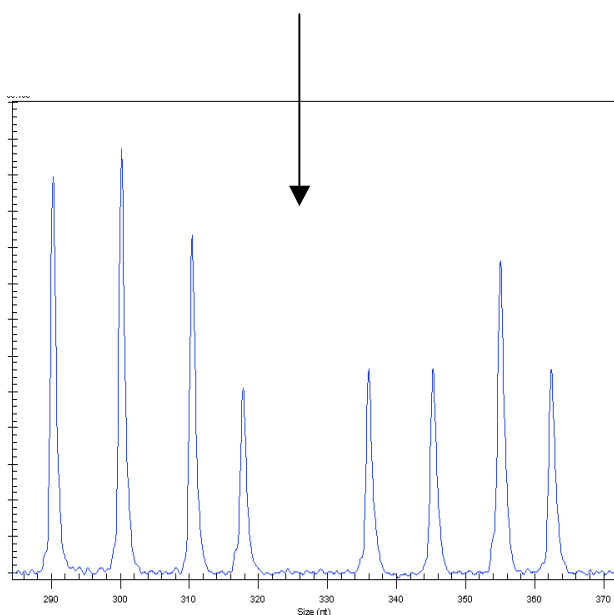


diversa quantita' di copie dell'esone 13 (gene qualunque)

SNPs



In presenza di SNP la ligation non puo' avvenire e non si avra' amplificazione



## **Atrofia muscolare spino-bulbare (sindrome di Kennedy Spinal and Bulbar Muscular Atrophy –SBMA)**

### **Cosa e' l'atrofia muscolare spino-bulbare SBMA**

La SBMA o sindrome di Kennedy, dal nome del neurologo che la descrisse nel 1968, e' una forma ad insorgenza tardiva, lentamente progressiva di atrofia (Riduzione del volume del muscolo legata al danneggiamento del motoneurone nelle sue diverse componenti) muscolare X linked accompagnata da una lieve insensibilita' agli androgeni.(n.b. per atrofia si intende la riduzione del volume del muscolo legata al danneggiamento del motoneurone nelle sue diverse componenti).

L'eta' d'insorgenza e' compresa fra i 20 e i 50 anni, l'esito, anche se richiede una ventina d'anni dall'insorgenza per concretizzarsi, e' l'incapacita' a camminare e quindi a dover ricorrere alla sedia a rotelle. Molti degli affetti hanno interessamento dei muscoli bulbari che controllano la fonazione e in parte la deglutizione, e quindi mostrano difficolta' in queste due funzioni. Tuttavia l'aspettativa di vita non e' ridotta e raramente la morte sopravviene per cause collegate alla malattia.

L'insensibilita' agli androgeni di lieve entita' si puo' manifestare alla puberta' con ginecomastia, barba rada e oligospermia e talvolta azospermia, questo ultimo aspetto e' quello che puo' essere percepito dagli affetti come piu' grave rispetto agli altri segni clinici.

Per quello che riguarda le eterozigoti, sono asintomatiche anche se qualcuna lamenta tremori o crampi; per quello che riguarda l'aspetto di insensibilita' agli androgeni, data la scarsa quantita' di questo tipo di ormoni in circolo nelle donne, anche nel caso di inattivazione della X non casuale con prevalenza della X mutata attiva, non si ha alcuna manifestazione. Si ritiene che SBMA sia una patologia limitata dal sesso: patologia che non ha modo per le sue peculiarita' di esprimersi in un sesso.

### **Genetica della SBMA**

La prevalenza e' di circa 1/50.000 maschi nati vivi, e' presente in quasi tutti i gruppi etnici, anche se per un effetto del fondatore e' piu' frequente fra i giapponesi.

Essendo X linked recessiva ad insorgenza tardiva che non compromette la fitness degli affetti e' una patologia ad andamento dichiaratamente familiare come anche altre patologie legate all'espansione di triplette (Huntington, distrofia miotonica ...)

### **Famigliari dell'affetto**

Il padre non e' affetto e neanche portatore.

Per quello che riguarda la madre: a tutt'oggi le madri degli affetti si sono rivelate tutte portatrici, il che fa si che non sono descritte mutazioni "de novo". Tuttavia bisogna tener presente che essendo ad insorgenza tardiva, le madri dell'affetto potrebbero non essere piu' reperibili per la diagnosi molecolare e quindi le nuove mutazioni essere sottostimate.

Per quello che riguarda le sorelle, dal momento che si può assumere che le madri siano sempre portatrici: 50% di probabilità di aver ereditato l'allele o di ereditarlo se ancora devono nascere (improbabile vista l'età di insorgenza).

Per quello che riguarda i fratelli: 50% di probabilità di avere ereditato l'allele e potrebbero essere ancora asintomatici.

Dal momento che gli affetti possono riprodursi anche se con difficoltà: le sue figlie sono portatrici certe mentre i maschi sono sicuramente sani.

Le eventuali zie materne potrebbero essere portatrici a seconda della storia familiare delle generazioni precedenti: se il nonno materno era affetto lo saranno sicuramente, altrimenti lo potrebbero essere al 50% e i loro figli sono soggetti allo stesso rischio delle sorelle e fratelli del probando.

## Alleli

Per quello che riguarda gli alleli polimorfici vi rimando alla parte generale di descrizione del gene AR, il polimorfismo da triplette CAG presente nella popolazione varia senza effetti da 10 a 33. Da notare che la frequenza dei diversi alleli varia nei diversi gruppi etnici: gli africani hanno gli alleli più corti, gli asiatici quelli più lunghi, i caucasici lunghezze intermedie. Studi epidemiologici hanno mostrato che gli alleli più corti sono correlati con cancro alla prostata più aggressivi.

L'espansione delle triplette CAG oltre le 34 nella regione codificante dell'esone 1 del gene AR è l'unico tipo di mutazione ritrovata nella SBMA. Alleli di 37 ripetizioni sono considerati avere effetto meno penetrante, nel senso che l'età di insorgenza è elevata. Da 38 ripetizioni in su vengono definiti alleli completamente penetranti.

Diversamente da altre patologie originate da questo tipo di mutazione l'aumento di lunghezza da una generazione all'altra non è ampia: oscilla fra 1 tripletta aggiuntiva a 3 riducendo sensibilmente il fenomeno dell'anticipazione (ricordate che cosa è? Se no andatevelo a rivedere nel corso di genetica II o nella parte introduttiva del corso). Studi sullo sperma di soggetti affetti hanno mostrato che il 20% degli spermatozoi hanno lo stesso numero di triplette dei tessuti somatici, il 56% contiene un ulteriore allungamento del repeat, mentre un 24% contiene una contrazione dello stesso.

Il risultato di questa mutazione è la sintesi di un dominio N-terminale più lungo per la presenza di una coda di poliglutammina. Questa serie di poliglutammine probabilmente altera la conformazione della proteina e provoca neurodegenerazione, come e perché questo avvenga non è chiaro. La genesi del danno neurologico legato alla poliglutammina non è chiara neanche nelle altre patologie legate allo stesso fenomeno: SBMA appartiene infatti alle cosiddette malattie da espansione di poliglutammine, fra queste malattie non esiste similarità nelle proteine alterate per quello che riguarda la funzione o la localizzazione cellulare, quello che le accomuna è il tipo di mutazione e la neurodegenerazione che per altro è variabile fra le diverse malattie.

Un'ipotesi per quello che riguarda AR suggerisce che la coda di poliglutammine subisca una digestione dando origine ad un peptide che contiene la serie di poliglutammine, questo peptide permane nel nucleo del neurone formando delle inclusioni, la sua permanenza nel nucleo potrebbe causare la patologia interagendo con altri co-attivatori trascrizionali come le proteine CREB (cAMP response element-binding) che sono importanti per la sopravvivenza del neurone.

## **Relazione genotipo fenotipo**

C'è una relazione fra lunghezza del repeat e gravità della malattia: in generale l'espansione è inversamente proporzionale all'età di insorgenza e alla gravità dell'atrofia. Tuttavia un nesso stringente manca perché ci sono dati riportati da cui si ricava che solo il 60% della variabilità clinica riscontrata nella sindrome è dovuta alla diversa lunghezza dei vari alleli: sono stati descritti affetti di una stessa famiglia che condividono il numero di triplette, ma fenotipi considerevolmente diversi.

## **Diagnosi**

Dal momento che tutti gli affetti e le portatrici hanno senza eccezione espansione di tripletta CAG, la diagnostica è semplice e richiede una PCR per evidenziare il numero di triplette e ha una resa del 100%.

Il test molecolare viene utilizzato oltre che per confermare la diagnosi per identificare gli eventuali affetti asintomatici e le portatrici. Essendo una malattia che non altera le capacità cognitive e la vita di relazione la richiesta di diagnosi prenatale non è frequente.