



LM Sc. Biosanitarie Genetica III

Ricerca diagnostica in Genetica Molecolare

2008-2009

**Prof.ssa Nicoletta Archidiacono**



# Introduzione

Lo scopo di questo corso non e' quello di imparare la clinica delle malattie, ma capire come si sceglie un test diagnostico nei casi di malattie che coinvolgono il materiale ereditario. Quindi dovrete rinfrescarvi la Genetica I compresa la citogenetica e la genetica di popolazione e la Genetica II,

Parleremo di diagnostica e quindi necessariamente dovremo parlare di malattie, ma ora come a Genetica II le malattie ci servono come modelli per capire le strategie.

## Cosa significa ricerca delle mutazioni.

Intanto bisogna chiarire il significato del termine, o meglio ricordare il significato del termine. Vi ricordo che nel corso di Genetica II ho spesso sottolineato l'importanza di attribuire il giusto significato ai termini.

Vi ricordo che mutazione significa semplicemente variazione di una sequenza confrontata con una sequenza di riferimento. Da questo ne consegue che mutazione non vuol dire che ci sia un effetto patologico. Vi ricordo la definizione di polimorfismo: **variazione presente nella popolazione con una frequenza superiore a 1%**. Per definizione un polimorfismo e' innocuo, almeno finche' non si dimostra il contrario.

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

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

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

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

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

- ☞ Specificita' della tecnica: quanti sono i falsi positivi e i falsi negativi

Va anche tenuto in conto il rapporto costo/beneficio, il tempo di risposta. Studiate la differenza fra analisi genetica e screening, e le caratteristiche di uno screening (PDF in rete)

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

Per chiarire il concetto di sensibilita' e specificita' : una tecnica come il test delle proteine troncate permette di riconoscere se, a causa della presenza di codoni di stop (non senso), si ha un prodotto piu' corto. Dal momento che questo

tipo di mutazioni sono quasi sicuramente patogenetiche questo test e' altamente specifico.

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

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

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

Ricapitoliamo alcune informazioni che dovrebbero far parte del vostro bagaglio culturale e che non potete dimenticare.

## Le mutazioni

### **Mutazioni di singola base**

Bisogna tener presente che il livello medio di eterozigosita' dell'uomo e' nell'ordine del  $3 \times 1000$ , cioe' in media 1 base ogni 500 si presenta diversa se confronto fra loro due sequenze dello stesso locus. Questi SNPs (single nucleotide polymorphisms) rappresentano circa il 90% della variabilita' presente nel nostro genoma e dal momento che il tasso di mutazione e' basso essi sono quasi totalmente ereditati, e vengono utilizzati in vari campi: studi di evoluzione, di genetica di popolazione, di linkage per la mappatura e il clonaggio di geni, nello studio delle resistenze ai farmaci, e nelle applicazioni diagnostiche e forensi.

Nuove mutazioni possono comunque verificarsi nella linea somatica (tumori) o in quella germinale e quindi venir trasmesse alla progenie. L'origine di

nuove mutazioni può essere dovuta a mutageni presenti nell'ambiente esterno e/o intracellulare o più frequentemente ad errori nei meccanismi di riparo o durante la replicazione.

Ricordate che qualunque punto del DNA può mutare quello che cambia è l'effetto sul prodotto del gene e quindi sull'individuo.

Ricapitoliamo: le mutazioni possono avvenire

- ☛ nelle regioni non codificanti, cioè che non corrispondono ad un trascritto maturo. In questo caso le ritroviamo perché a meno di creare siti di splicing alternativi, non hanno effetto sul prodotto e quindi non sono sotto pressione selettiva.
- ☛ Nelle regioni codificanti o nelle regioni UTR necessarie per la corretta maturazione dell' RNA o inizio di trascrizione. In questo caso l'effetto sul trascritto dipenderà dal tipo di mutazione e dall'eventuale cambio di amminoacido nel prodotto tradotto. Se il prodotto risulterà alterato, per la permanenza nella popolazione entreranno in gioco altri fattori (ricordate Hardy-Weinberg, la deriva genetica effetto del fondatore, vantaggio dell'eterozigote?.....) Il tasso di mutazione del DNA codificante calcolato nella popolazione, risulta più basso rispetto al non codificante in quanto la pressione selettiva agisce eliminando dalla popolazione gli alleli negativi e rendendo di fatto assenti nella popolazione quelle mutazioni che alterano pesantemente la funzione del prodotto genico (per es. le "frameshift" meno frequenti nel codificante). Nel DNA codificante le mutazioni patogenetiche non hanno un pattern casuale perché legate al mantenimento della funzionalità (ricordate genetica II?).

A livello molecolare si distinguono diversi tipi di mutazione:

- ☛ Sostituzioni di base : di solito comportano la sostituzione di singole basi.
- ☛ Delezioni: perdita di uno o più nucleotidi
- ☛ Inserzioni: uno più nucleotidi vengono inseriti in una sequenza.

Le sostituzioni possono essere di due tipi:

☛ transizioni: una pirimidina con un'altra pirimidina, o una purina con un'altra purina

☛ trasversioni sostituzione di una pirimidina con una purina o viceversa

Il codice genetico è degenerato e questo fornisce una certa elasticità. Pertanto i gradi di tolleranza delle sostituzioni sono diversi a seconda dei siti :

- ☛ **siti non degenerati:** tutte e tre le possibili sostituzioni sono non sinonime. Includono la prima base di tutti i codoni eccetto otto, la seconda base di tutti i codoni e la terza base di due. Questo è coerente con la presenza di una forte pressione selettiva
- ☛ **siti degenerati quattro volte:** tutte e tre le possibili sostituzioni sono sinonime. Includono la terza base di circa un terzo dei codoni. Il tasso di sostituzione è paragonabile a quello degli introni : evidentemente queste sostituzioni sono selettivamente neutre
- ☛ **siti degenerati due volte:** una delle tre possibili sostituzioni è sinonima. Includono la terza base di alcuni codoni e la prima di otto codoni. Costituiscono circa il 20% delle sostituzioni. Spesso sono conservative (rispetto alla funzione del trascritto)

Gli effetti sul trascritto di queste mutazioni nella sequenza codificante varieranno se sono:

☛ mutazioni silenziose (sinonime)

## ▶ mutazioni non sinonime

Le mutazioni sinonime vengono considerate neutre e si può originare un polimorfismo di restrizione RFLP (ricordate cos'è? cfr. Genetica I e oltre). Non determinano alcun cambiamento nel prodotto: l'amminoacido resta lo stesso. In qualche caso possono dare origine ad un sito di *splicing* criptico e quindi essere tutt'altro che neutre come la semplice sequenza potrebbe far pensare: infatti viene alterato l'RNA messaggero maturo.

Le non sinonime vengono suddivise in tre classi a seconda dell'effetto che producono:

- ⇒ **senza effetto:** Sostituzione di senso errato conservativa : si origina un codone per un altro amminoacido, il nuovo amminoacido ha caratteristiche chimiche simili al vecchio. Pertanto l'effetto sul prodotto può essere minimo e può essere definito polimorfismo sia a livello di DNA che di prodotto.
- ⇒ **con effetto deleterio:**
  - Sostituzione non senso: si origina un codone di stop. Dal momento che la pressione selettiva è forte su un prodotto troncato prematuramente, sono rare.
  - Sostituzione di senso errato non conservativa: si origina un codone per un altro amminoacido: il nuovo amminoacido è completamente diverso dal primo. Può avere effetti deleteri.
- ⇒ forniscono un vantaggio selettivo in eterozigosi: Anemia falciforme, Talassemie, Fibrosi Cistica (ricordate Genetica II?).

## Anomalie cromosomiche

Le anomalie cromosomiche sia di numero che di struttura sono rare a livello costituzionale e spesso sono patogenetiche. Sono più frequenti quando sono somatiche e spesso si ritrovano nei tumori, dove possono avere siti di riarrangiamento ricorrenti. Questa ricorrenza è legata al vantaggio selettivo che può derivare dall'acquisire una capacità proliferativa superiore alle cellule wild type in quanto svincolata dai normali meccanismi di controllo del ciclo cellulare. (Ricordate la Genetica del cancro?)

## Mutazioni dinamiche

Come detto a Genetica II (Ricordate? se no andate a rivederle) questo tipo di mutazioni si originano dalla presenza nel genoma umano di triplette ripetute. Queste ripetizioni di solito sono stabili e sono considerate polimorfismi. Dal momento che nella popolazione sono presenti molti alleli (originati dal diverso numero di ripetizioni) sono estremamente utili nel forense, negli studi di linkage, nella genetica di popolazione..., e di solito vengono trasmesse senza alterazioni da una generazione all'altra.

Alcune di queste ripetizioni per motivi non ancora completamente chiariti, sono soggette ad errore durante la replicazione del DNA, aumentando il numero di ripetizioni. Se questo evento avviene nelle cellule germinali staminali, si potranno avere dei gameti che portano dei nuovi alleli più lunghi (l'accorciamento non è stato mai descritto), che nelle mitosi successive possono aumentare ulteriormente di numero sia a livello somatico che germinale. La conseguenza di ciò è che a seconda della regione genomica dove mappano, oltre un certo

numero di ripetizioni sia ha la comparsa di un fenotipo patologico perche' le ripetizioni interferiscono con i normali meccanismi di espressione . Vi ricordo che a seguito della scoperta di questo fenomeno e' stato introdotto il concetto di premutazione e mutazione piena.

Le espansioni che portano a fenotipi patologici possono risiedere:

- Nella sequenza codificante, provocando nel prodotto finale un aumento del numero di amminoacidi di solito glutammina o alanina. In questo caso le espansioni sono limitate
- Nelle sequenze non codificanti: promotori, UTR o introni. In questo caso possono raggiungere anche migliaia di copie (Distrofia Miotonica, X-Fragile...). Si ritiene che interferiscano con il normale funzionamento dei geni provocando perdita di funzione.

## Alterazioni dei meccanismi epigenetici

Conviene ricordare cosa sono i meccanismi epigenetici.

☛ **Epigenotipo: informazione ereditabile in grado di influire sul fenotipo senza che vi sia cambiamento di sequenza del DNA.**

I meccanismi epigenetici sono i meccanismi di regolazione dell'espressione genica, per cui se un certo meccanismo funziona correttamente i geni da esso controllati, si esprimono nello spazio (tessuti, cellule) e nel tempo (durante lo sviluppo embrionale, il differenziamento, il ciclo cellulare.....) secondo lo schema necessario al corretto equilibrio. Sono ereditabili sia perche' si esplicano attraverso altri geni, sia perche' se un gruppo di cellule deve svolgere una determinata funzione e saranno attivati i geni necessari e spenti gli altri, questa informazione verra' mantenuta da tutte le cellule che derivano dalle prime.

Se un meccanismo epigenetico viene meno si perde questa regolazione e si avra' la mancata regolazione sia in positivo (espressione di geni silenti) che in negativo (spegnimento di geni attivi). La sequenza dei geni target del meccanismo epigenetico e' pero' immutata: se vengono spenti non avro' il prodotto non perche' c'e' una mutazione patogena nella sequenza, ma semplicemente perche' non possono rispondere ad altri segnali di attivazione.

I meccanismi epigenetici piu' noti sono l'ipoacetilazione degli istoni e la metilazione. Entrambi questi meccanismi provocano il silenziamento dei geni. Una metilazione ectopica (in regioni che non dovrebbero essere metilate), un eccesso di metilazione (per es. X-Fragile) impedendo ai geni di funzionare puo' risultare patogenetica, come pure il venir meno della metilazione che fa esprimere un gene al momento e/o nel posto sbagliato (tumori).

La metilazione allele specifica di alcuni locus e' il meccanismo chiave nel mantenimento dello stato imprintato come pure della inattivazione del cromosoma X.

## Alterazione dell'imprinting

Come certamente ricorderete dalla Genetica II (altrimenti riguardatevelo), l'imprinting e' un meccanismo di regolazione dell'espressione genica attraverso il quale si instaura un'esclusione allelica applicata selettivamente all'allele potenzialmente funzionale di un genitore, per cui si ha **espressione differenziata**

***di un gene perfettamente funzionale legata all'origine parentale, indipendente dal sesso della progenie, che puo' essere limitata nello spazio e nel tempo.*** L'imprinting e' un'eccezione al principio di equivalenza dei gameti, intesa come non equivalenza nell'espressione per motivi non legati ad alterazioni della sequenza, ma ad un processo epigenetico.

Brevemente:

- ☛ Non e' un cambiamento **permanente** del DNA
- ☛ Deve essere abolito prima di trasmettere il genoma
- ☛ Deve essere ripristinato coerentemente al sesso dell'individuo che trasmette
- ☛ Su questa nuova "etichettatura" agiscono i meccanismi di regolazione genica secondo i pattern previsti per cellule, tessuti.....

Quindi l'imprinting implica l'acquisizione di segnali specifici della linea germinale, inducendo attivita' differenziale degli alleli parentali. Errori nella linea germinale impedirebbero l'acquisizione dell'epigenotipo corretto.

Non e' ben chiaro come vengano identificati gli alleli paterni e materni. E' tuttavia accertato che la metilazione garantisce il mantenimento dell'inattivazione del locus imprintato. Alterazioni dell'imprinting a seguito di delezioni, disomie uniparentali o mutazioni nella sequenza deputata all'instaurarsi dell'imprinting (centro di imprinting ricordate?) provocano la comparsa di fenotipi patologici (ricordate quali abbiamo portato come modello perche' ben caratterizzato?)

### **Alterazioni della conformazione della cromatina**

L'espressione di un gene dipende anche dalla sua posizione in un dominio cromatinico, che attraverso i suoi avvolgimenti, permette o meno l'inizio della trascrizione.

Il cambiamento di configurazione, puo' provocare un effetto di posizione per un riarrangiamento, e portare alla manifestazione di fenotipi patologici:

- Aniridia: silenziamento del gene PAX6
- Distrofia Facioscapolomerale: una delezione di 3-4Kb elimina dalla regione compresa fra due geni: FRG1 e FRG2, delle sequenze ripetute denominate D4Z4. La perdita di queste sequenze porta questi due geni normalmente localizzati in due domini diversi, a mappare nello stesso dominio. L'assenza delle ripetizioni che interagiscono con proteine regolatrici per limitare l'espressione di questi geni, comporterebbe un over espressione, con conseguente fenotipo patologico.

## **Il DNA mitocondriale**

Nella Genetica II non ho mai parlato del DNA mitocondriale, ben sapendo che in altri corsi questo argomento veniva affrontato sotto parecchi punti di vista, e perche' per un genetista l'eredita' mitocondriale e' un po' frustrante. Mi spiego: come sicuramente saprete, l'eredita' mitocondriale e' matroclina. I mitocondri vengono trasmessi dal gamete femminile, lo spermatozoo introduce nell'uovo la testa che contiene impacchettato solo il DNA nucleare. Questo rende i mitocondri estraneamente utili per studiare la discendenza matrolineare a fini evolutivisti e forensi, perche' non c'e' commistione fra i genomi parentali, non c'e' crossing over e quindi le variazioni di sequenza che si accumulano derivano solo eventi

mutageni.

Per contro non e' possibile trasformare in modelli matematici l'ereditabilita' del genoma mitocondriale, infatti la segregazione dei mitocondri (che sono numerosissimi nelle nostre cellule, per la funzione che svolgono) e' casuale, e inoltre il DNA mitocondriale si duplica con un tasso di replicazione molto piu' alto, indipendentemente dal nucleare per ripristinare la quantita' necessaria di organelli. Il DNA mitocondriale (16,000 basi, circa 1/200.000 delle dimensioni del genoma nucleare, 37 geni) e' un hot spot di mutazioni patogenetiche dal momento che:

- ⇒ il 93% del DNA mitocondriale e' codificante
- ⇒ ha una struttura cromatinica diversa: non e' protetto dagli istoni
- ⇒ andando incontro a numerosissimi cicli di replicazioni e' piu' soggetto agli errori della macchina replicativa (fonte di mutazioni anche nel nucleare)
- ⇒ i meccanismi di riparo sono meno efficienti rispetto al DNA nucleare.

Tutto cio' fa si che un certo numero di patologie genetiche siano originate da alterazioni della funzione mitocondriale.

Pero' attenzione:

- ☛ molte delle molecole che garantiscono la funzione mitocondriale sono codificate dal DNA nucleare. Quindi alcune patologie mitocondriali sono dovute a mutazioni patogenetiche del DNA nucleare e, secondo le leggi di Mendel nella loro trasmissione, possono essere studiate e diagnosticate come tutte le altre. In questi casi il mitocondrio non e' altro che una delle tante strutture della cellula che dipende dal nucleo per la propria funzione.

La funzione "produzione di energia" puo', quindi, venir compromessa per due ragioni:

1. mutazione dei geni nucleari
2. mutazione dei geni mitocondriali

Nel secondo caso si aggiunge un'ulteriore complicazione: la segregazione casuale dei mitocondri fa si che le cellule figlie non possedano la stessa quantita' di mitocondri mutati (eteroplasmia) e quindi il fenotipo puo' essere diverso da soggetto a soggetto. Solo poche malattie da alterazioni del DNA mitocondriale sono caratterizzate dalla presenza della stessa mutazione in tutte le cellule (omoplasmia).

Le malattie "mitocondriali" si manifestano in quei distretti dell'organismo in cui e' richiesta una piu' alta produzione di energia: sistema nervoso, muscolo, occhi, fegato.... e hanno un'elevata variabilita' clinica anche all'interno della stessa famiglia.

Va considerato tuttavia che la funzione che viene persa e' sempre la stessa: produzione di energia. La vasta gamma di deficit nelle proteine mitocondriali nelle malattie mitocondriali e' legata (oltre all'eteroplasmia che giustifica la diversa gravita') al fatto che dei 37 geni presenti, 22 codificano per tRNA e 2 per rRNA, necessari per la sintesi dei 13 polipeptidi codificati dai restanti geni. E' percio' chiaro il perche' della variabilita' (o no?).

Vi do un aiuto: un tRNA riconosce un amminoacido che entra in piu' polipeptidi, quindi la mutazione di un gene per tRNA provoca alterazioni in piu' polipeptidi, che a loro volta hanno compiti diversi.....(biologia molecolare!). Esempi di patologie mitocondriali sono al capitolo 7 del Korf.

Per chiudere questo discorso direi che la diagnostica di queste mutazioni si avvale sempre delle stesse tecniche utilizzate per il DNA nucleare, complicata dal

fatto che bisogna esaminare piu' tessuti perche' alcuni, a causa dell'eteroplasmia, potrebbero non avere mitocondri mutati, o averne pochissimi (ricordate che dimostrare che una cosa non c'e' e' piu' difficile che dimostrarne la presenza).

## Mutazioni identificate come patogenetiche

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

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

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

## Mosaicismo

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

Nel corso degli anni si sono accumulate numerose dimostrazioni di questo fenomeno. Oltre all'eteroplasmia mitocondriale e' stato dimostrato nei tumori

grazie alla perdita di eterozigosi (LOH ricordate?), e nella linea germinale (ricordate?) dove deve essere sempre sospettato quando ci si trova di fronte ad una famiglia in cui sono presenti piu' figli affetti da una patologia dominante. La lista dei disordini monogenici in cui e' sta dimostrata la presenza di mosaicismo si e' allungata in questi ultimi anni ed e' stato descritto nei disturbi metabolici, nelle displasie scheletriche, nei disturbi della coagulazione, in DMD. E' sicuramente un fenomeno sottostimato dal momento che la ricerca delle mutazioni si effettua estraendo il DNA dal sangue, in cui a meno di un'insorgenza molto precoce nell'embrione, rimane non evidenziabile.

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

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

chi di noi e' portatore?, si puo' fare diagnosi prenatale? si puo' fare prevenzione (nel caso dei tumori familiari)?

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

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

Questo ha portato allo sviluppo di due categorie principali di tecnologie

1. destinate ad un'analisi minuziosa della sequenza in oggetto alla ricerca di mutazioni sconosciute. Sono altamente informative, ma lunghe e incompatibili con una elevata produttivita'
2. destinate ad evidenziare le mutazioni note, sfruttando gli strumenti robotizzati hanno una elevata efficienza, produttivita' e bassi costi. Tuttavia sono utili solo per un numero limitato di mutazioni

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

## Riconoscimento di mutazioni note

Sono disponibili a questo scopo molti test commerciali specifici per numerose mutazioni note. Si basano sulla PCR amplificando semplicemente la sequenza target sia utilizzando primer specifici per la sequenza mutata e quindi

osservando l'avvenuta amplificazione, o evidenziando la mutazione dopo digestione con enzimi di restrizione, o ibridazione dei prodotti di amplificazione con oligonucleotidi specifici, o con i test di ligation tipo MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification cfr. Insensibilita' agli androgeni).

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

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

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

## **Analisi dei prodotto di PCR con enzimi di restrizione**

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

### **Analisi di linkage**

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

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

### **Prerequisiti:**

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

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

### **Procedura :**

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

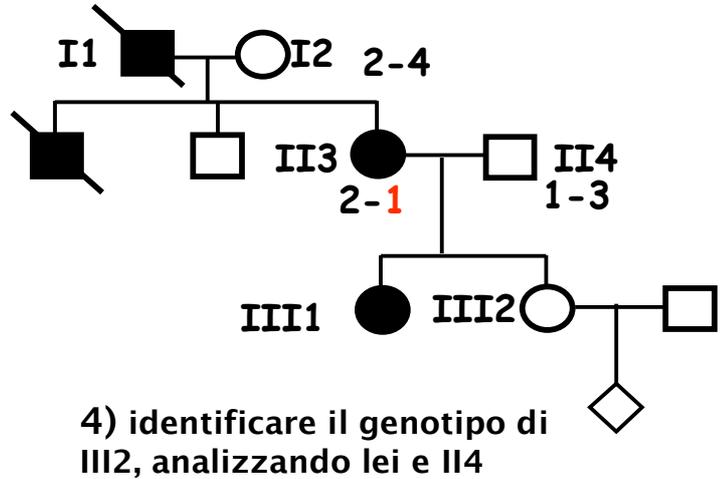
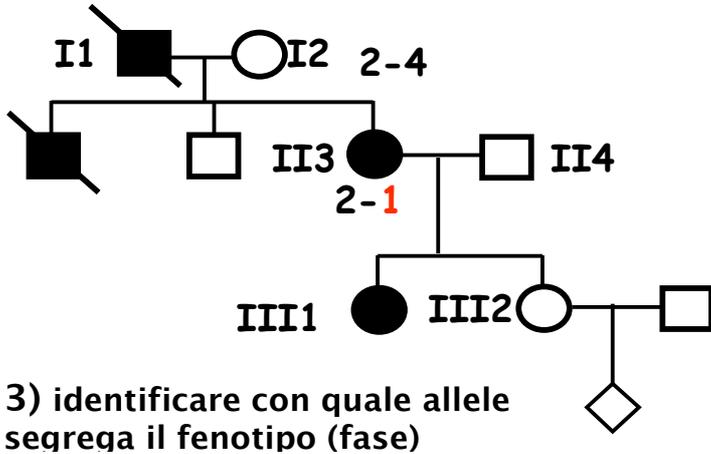
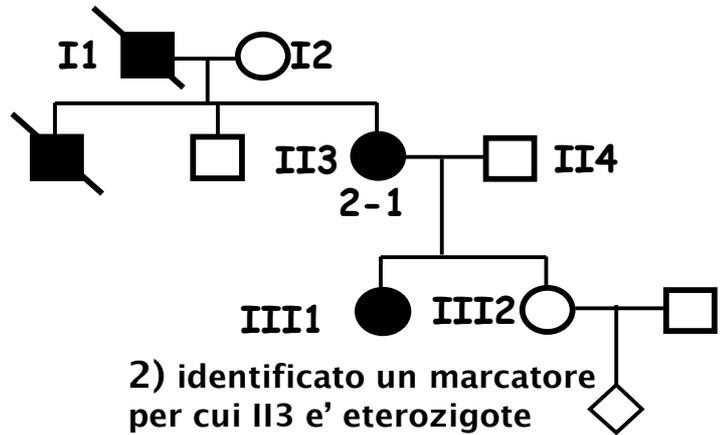
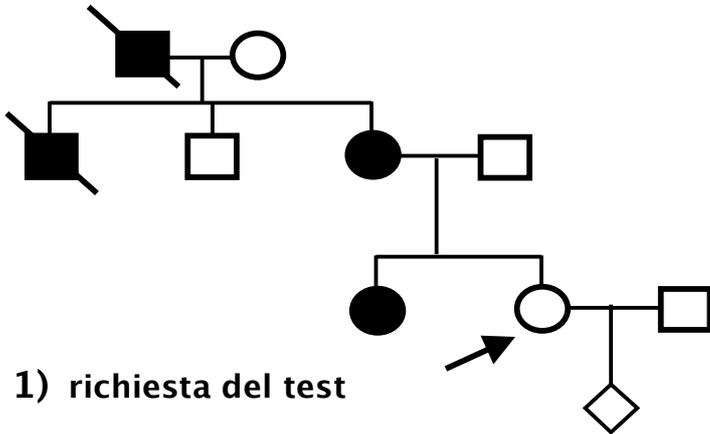
☞ Determinare la fase

⇒ Definire quale aplotipo ha ereditato il probando dai genitori

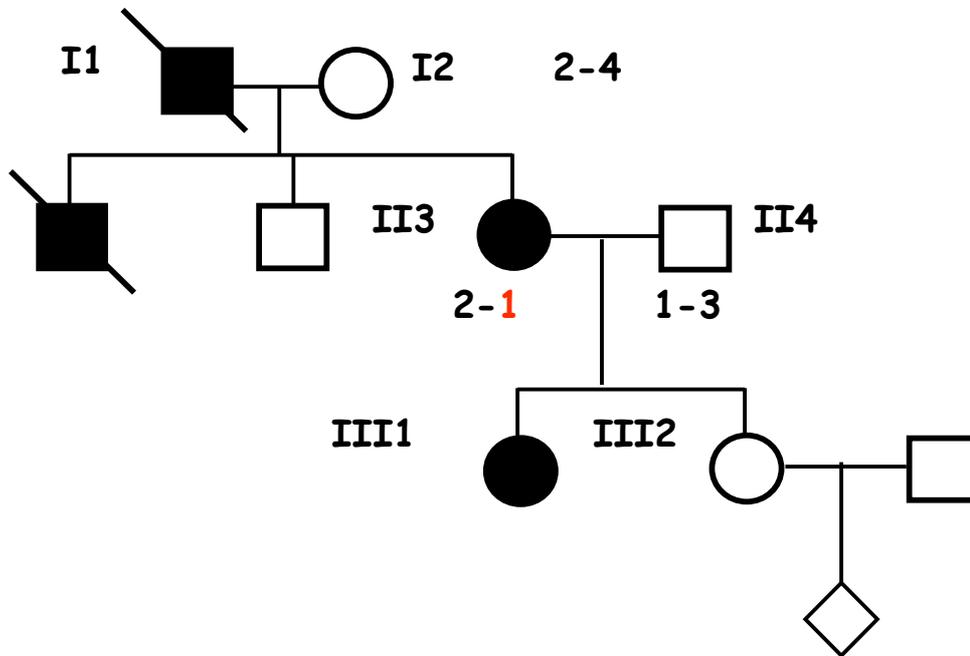
Questa logica si applica a fenotipi con qualunque tipo di ereditarietà  
L'informatività dei marcatori non è più un problema: ci sono oggi microsatelliti altamente informativi mappati su tutto il genoma. Il limite più grosso è dato dalla struttura della famiglia

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

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



**Quali sono i risultati possibili?**

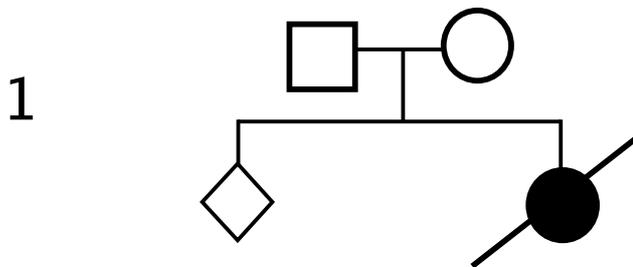


**III2: 2-1 o 2-3 NON e' portatrice, perche' in questa famiglia la regione mutata e' identificata dall'allele 1**

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

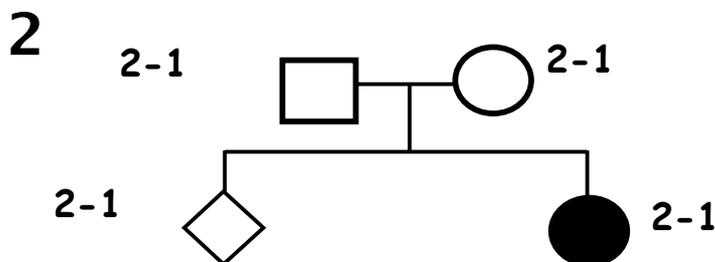
**ATTENZIONE: e' importante la segregazione all'interno della famiglia e non il particolare genotipo: se III2 avesse 2-1 cioe' lo stesso genotipo della madre malata, non sarebbe portatrice, in quanto l'allele 1 deriverebbe dal padre**

## Stesso fenotipo recessivo e segregazione in 4 famiglie diverse



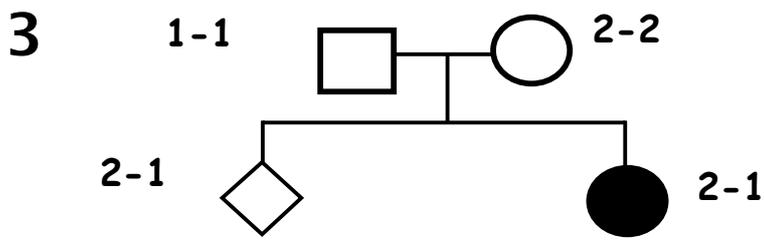
**Impossibile fare il test perche' non c'e' il DNA di riferimento dell'affetto**

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



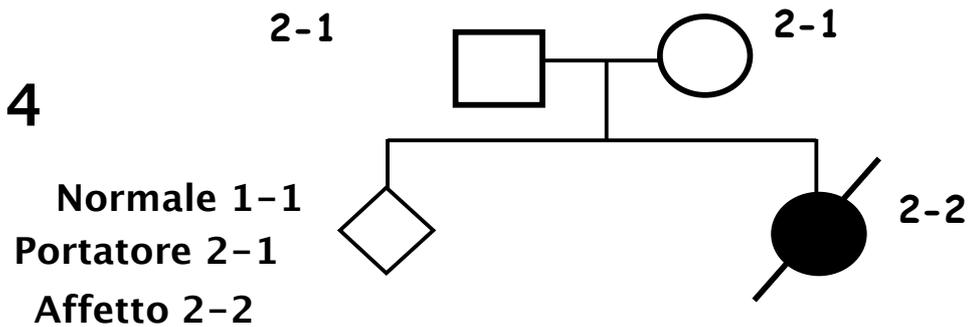
**50%N, 50% affetto: non si puo' definire di chi sono gli alleli ereditati dal feto. L'allele 2 del feto e' lo stesso della sorella?**

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



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

Stessa situazione di prima, anzi peggio nessuna combinazione è informativa



**Massima informatività**

# Fare diagnosi

***N.B. sono esempi utili a capire le problematiche diagnostiche e molti piu' dettagli li trovate su [www.genetests.org](http://www.genetests.org) e/o <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> (molto piu' sintetico, ma si puo' avere anche in italiano)***

## 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 tirosinchinasico 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 tirosinchinasico intracellulare citoplasmatico innescando la trasmissione del segnale. Nel tessuto osseo ad accrescimento endcondrale (sostanzialmente le ossa lunghe) l'attivazione di FGFR3 inibisce la proliferazione dei condrociti

nella piastra di crescita, stimolando così il differenziamento e la crescita in sintonia con le cellule progenitrici del midollo.

- ⇒ nel topo è stato evidenziato che l'induzione e la repressione della proliferazione e del differenziamento sono modulati sui tempi dello sviluppo
- ⇒ regola negativamente l'ossificazione endocondrale
- ⇒ è 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.

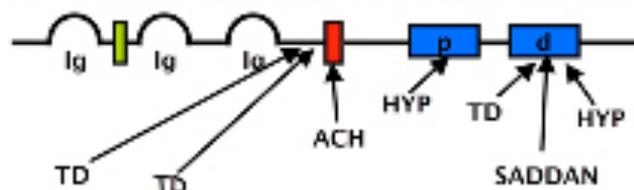
Due alleli patologici rendono ragione del 99% dei casi di Acondroplasia:

- ⇒ 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 gravidanze 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 funzionalità: e' presente in soggetti sani della famiglia?

☛ Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere innocuo sulla funzionalità

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

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

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

## Curiosita' storiche

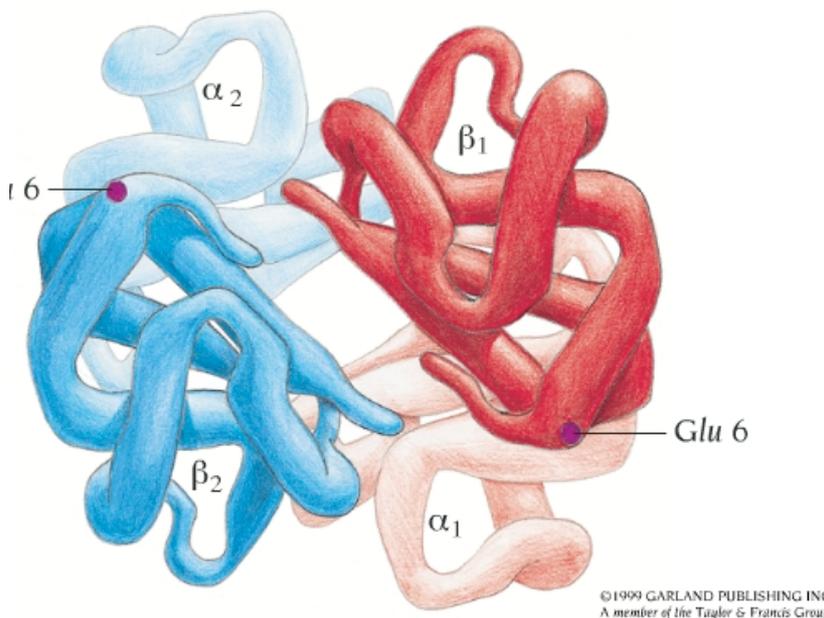
Nel 1912 Wienberg (quello di Hardy-Wienberg) noto' che in una casistica raccolta in quegli anni, i casi sporadici erano piu' spesso gli ultimi nati rispetto ai primi nati (aumento dell'eta' paterna),

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.



## Anemia Falciforme - Falcemia (Sickle cell Disease SCD)



### **Cosa e' la falcemia.**

La falcemia e' una forma di anemia caratterizzata, oltre che da emolisi da episodi di occlusione dei vasi sanguigni con conseguente ischemia dei tessuti e danni agli organi (l'occlusione e' legata alla tendenza alla falcizzazione dei globuli rossi e alla loro scarsa elasticita' dovute alla tendenza delle catene mutanti ad aggregarsi, per cui i globuli rossi non riescono a passare nei vasi periferici) l'occlusione si accompagna ai dolori delle estremita'. La maggior parte degli affetti non hanno segni clinici evidenti alla nascita e cominciano a manifestare i primi segni nell'infanzia e nella fanciullezza, quando l'emoglobina fetale diminuisce fino a scomparire a favore dell'adulto. (ricordate i tempi di espressione delle diverse emoglobine?). L'espressivita' della malattia e' molto variabile si passa da lieve anemia a manifestazioni a carico di milza, fegato, polmoni,... con riduzione dell'aspettativa di vita.

Con il termine SCD si intendono un insieme di malattie legate alla presenza dell'emoglobina mutante S (HbS) in cui e' presente una sostituzione del secondo nucleotide del sesto codone della **catena beta** dell'emoglobina. La sostituzione e' presente in **tutti** gli affetti che pertanto sono **veri omozigoti**. La sostituzione provoca il cambiamento del codone per acido glutamico in valina (E6V)

L'incidenza della malattia varia da popolazione a popolazione, e come molte malattie dovute ad alterazione dell'emoglobina e' piu' frequente nelle regioni malariche. La falcemia e' piu' frequente nelle regioni mediterranee soprattutto in Africa: si ritiene che in Africa nascano circa 120.000 bambini affetti all'anno.

Se si considera la popolazione degli Stati Uniti, dove sono presenti molti gruppi etnici, ed e' presente un consistente gruppo di afroamericani le cui origini sono riconducibili a varie zone dell'Africa:

- Il 60–70% degli affetti hanno la anemia falciforme Hb SS, cui sono presenti due alleli S (cfr. paragrafo alleli)
- Altri affetti hanno forme varianti legate alla presenza di un allele S e di altri alleli patologici, cioè sono **eterozigoti composti**( ricordate?):
  - La forma piu' frequente di questo gruppo e' l'anemia falciforme–emoglobina C: **Hb SC** (cfr. paragrafo alleli)
  - Seguono due forme di anemia falciforme–thalassemia  $\beta$ : **HbS $\beta$ <sup>+</sup>** e **HbS $\beta$ <sup>0</sup>** (ricordate i due tipi di thalassemia  $\beta$ ?)
  - Altre forme sono dovute alla presenza oltre che dell'allele S, di alleli come D–Punjab o O–Arab (il nome di questi alleli indica chiaramente che sono presenti in gruppi etnici distinti:ricordate l'effetto del fondatore?)

Negli eterozigoti composti la clinica puo' essere diversa pero' a noi non interessa.

La diagnostica oltre che delle tecniche per individuare la mutazione, si avvale di test per evidenziare la presenza di emoglobina anomala o di uno striscio di mucosa boccale . Chi fosse interessato trova nei PDF del corso o nel sito [www.genetests.org](http://www.genetests.org) tutti i dettagli sulla diagnostica non a carico del DNA, che non e' l'argomento di questo corso.

## Genetica della Anemia Falciforme

L'Anemia Falciforme si tramette come autosomica recessiva e quindi gli eterozigoti wt/m sono asintomatici dal punto di vista del fenotipo malattia. Tuttavia esprimono la HbS che e' visibile al livello fenotipo dell'emoglobina (ricordate che e' l'operatore a scegliere il fenotipo da studiare). Bisogna anche considerare che la malattia puo' presentarsi in forma lieve soprattutto negli eterozigoti composti **HbS $\beta$ <sup>+</sup>** . Va percio' tenuto presente che in alcune popolazioni i diversi alleli patogenetici possono essere frequenti e quindi la probabilita' che un soggetto sia privo di alleli wt e' piu' elevata. In dettaglio:

**I genitori** del probando (*primo individuo studiato in una famiglia*) affetto genericamente da Anemia Falciforme possono essere:

- Portatori sani perche' entrambi eterozigoti per l'allele S (wt/S), se ci troviamo di fronte ad un malato HbSS
- Portatori sani perche' ognuno e' eterozigote per una diversa mutazione patogenetica della catena  $\beta$ , se il probando e' un eterozigote composto per es. **HbS $\beta$ <sup>0</sup>** o **Hb SC**
- un genitore potrebbe essere eterozigote wt/S e l'altro omozigote SS o eterozigote composto
- Entrambi omozigoti HbSS o eterozigoti composti

Il rischio per i **fratelli** del probando affetto genericamente da Anemia Falciforme dipende da quale è il genotipo dei genitori:

- ➡ Se entrambi i genitori sono portatori sani e quindi eterozigoti per **una** mutazione del gene della catena  $\beta$ , al momento del concepimento: 25% affetti, 50% portatori sani di una delle mutazioni presenti nei genitori, 25% non portatori e quindi wt/wt. I fratelli già nati e non affetti hanno 2/3 di probabilità di essere portatori
- ➡ Se un genitore è eterozigote wt/S e l'altro omozigote SS o eterozigote composto, ciascun fratello prima del concepimento ha 50% di probabilità di essere affetto e 50% di essere portatore sano e quindi wt/m. Fratelli già nati e non affetti 100% portatori.
- ➡ Se i genitori sono entrambi omozigoti HbSS o eterozigoti composti, 100% affetti.

Nel caso dei **figli di un affetto** dipende dal genotipo del partner se wt/wt, o portatore sano di una mutazione patogenetica o affetto e quindi si ripropongono le situazioni riportate prima.

## Il gene HBB (subunità $\beta$ dell'emoglobina adulta)

Il gene HBB, mappa in 11p15.5, nel cluster delle globine non- $\alpha$  (ricordate Genetica II?), è lungo 1.6 kb contiene 3 esoni oltre le regioni 3'UTR e 5'UTR dove è localizzato il promotore, a monte del promotore è presente una LCR (Low Copy Repeat) regolatrice. La proteina 15,6 kDa contiene 146 aa. Tralascio di riportare la funzione di questo gene, perché dovrebbe esservi nota.

## Alleli

Il gene HBB ha numerosi alleli, anche non patogenetici. Una lista aggiornata è reperibile al sito dedicato all'emoglobina dove vengono assegnate alla catena beta 700 varianti: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html> .

Per quello che riguarda l'anemia falciforme :

- ➡ **Allele S** : è presente una sostituzione del secondo nucleotide del sesto codone **mutazione E6V Acido glutammico > Valina**
- ➡ **Allele C**: è presente una sostituzione del secondo nucleotide del sesto codone **mutazione E6K Acido glutammico > Lisina**
- ➡ **Allele D-Punjab** è presente una sostituzione al codone 121 **mutazione E121Q Acido glutammico > Glutamina**
- ➡ **Allele O-Arab** è presente una sostituzione al codone 121 **mutazione E121K Acido glutammico > Lisina**
- ➡ **Alleli Thalessemici** rimando al capitolo talassemia beta

Nella emoglobina deossigenata una interazione fra la  $\beta^6$  valina e le regioni complementari delle molecole vicine può indurre la formazione di polimeri che si aggregano e alterano la forma del globulo rosso, rendendolo fragile e poco flessibile. La presenza dell'emoglobina S altera la membrana cellulare provocando

disidratazione, danno ossidativo e aumentata aderenza alle cellule dell'endotelio vascolare.

## Diagnosi

La diagnosi molecolare è relativamente semplice dal momento che le mutazioni sono poche e ben caratterizzate. La PCR con le sue varianti sono la tecnica d'elezione. La ricerca quando è presente un allele beta-thalassemico (lo si vede dall'alterato rapporto alfa/beta) è complicata dall'elevato numero di questi alleli (cfr. beta-Thalassemia)

Se ci si trova in una situazione di eterozigosi composta in cui l'altro allele non è stato individuato si può ricorrere al sequenziamento tenendo presente che se si trova una mutazione ci sono diverse possibilità:

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

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

Dal momento che il probando è 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 cioè di fronte ad un caso di eterogeneità di locus: fenotipi clinicamente simili, ma dovuti a mutazioni patogenetiche di locus diversi.

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

La diagnosi prenatale sia attraverso l'amniocentesi che la villocentesi è possibile come pure la diagnosi preimpianto, dopo aver individuato gli alleli presenti nella famiglia.

## Curiosità storiche

La prima descrizione della malattia risale al 1910 (*Herrick, J. B. :Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. Arch. Intern. Med. 6: 517-521, 1910.*). Veniva riportato il caso di uno studente in odontoiatria di Chicago, che negli esami di routine previste per gli studenti universitari, presentava un quadro di anemia e alterazioni dei globuli rossi. Il paziente venne seguito per 2 anni prima di pubblicare il dato, dall'autore e da un suo collaboratore, Irons, che per primo aveva notato lo strano quadro ematologico. Il paziente morì 9 anni dopo all'età di 32 anni. La cosa curiosa è che non risulta fra gli autori di quella pubblicazione proprio Irons che individuò per primo e seguì il caso!

## Emofilia



**Famiglia della Regina Vittoria**

### **Cosa e' l'emofilia**

E' una malattia ereditaria dovuta alla assenza o ridotta attivita' di alcuni fattori della coagulazione.

Come sicuramente sapete la coagulazione e' un processo complesso legato all'attivazione di numerose proteine plasmatiche. Nell'emofilia due di queste proteine (prodotte dal fegato) sono difettive. E' chiaro che se parliamo di due proteine vuol dire che esistono due geni le cui mutazioni patogenetiche hanno come effetto la difficolta' di coagulazione.

Bisogna anche aggiungere che il fenotipo difficolta' o assenza di coagulazione e' troppo vasto: vi sono altre patologie della coagulazione legate all'assenza o alla ridotta attivita' di altri elementi del processo, che non tratteremo, ma che rendono la diagnosi su base clinica difficile senza l'ausilio dei test di laboratorio e analisi dell'anamnesi e della storia familiare. Definire quale tipo di difetto della coagulazione e' presente nella singola famiglia e' cruciale per la terapia che consiste nella somministrazione del fattore carente.

Esistono 2 forme di emofilia entrambe ad ereditarieta' X linked recessiva: HEMA carenza del fattore VIII, HEMB carenza del fattore IX. A volte viene indicata

anche una terza forma emofilia C (carenza del fattore XI) piu' lieve e piu' rara delle altre due, ad ereditarieta' autosomica recessiva. In realta' si ritiene che il termine emofilia attribuito a questa sindrome sia scorretto. Sul catalogo OMIM viene indicata come emofilia anche la sindrome di von Willebrand, originata da carenza del fattore di von Willebrand, che si presenta con un quadro clinico meno grave ed e' autosomica recessiva. Noi tratteremo solo la HEMA e HEMB parlando nel dettaglio di ognuna solo per l'aspetto biochimico molecolare che e' quello che le distingue.

In entrambe le forme sia hanno (nei maschi) emorragie spontanee sia interne che esterne (anche nelle articolazioni e nei muscoli) e incapacita' di coagulare dopo traumi anche di piccola entita'. Le femmine manifestano solo raramente i sintomi e comunque le manifestazioni sono molto meno gravi. Si presentano clinicamente identiche: in entrambi i casi esiste una forma lieve e una grave:

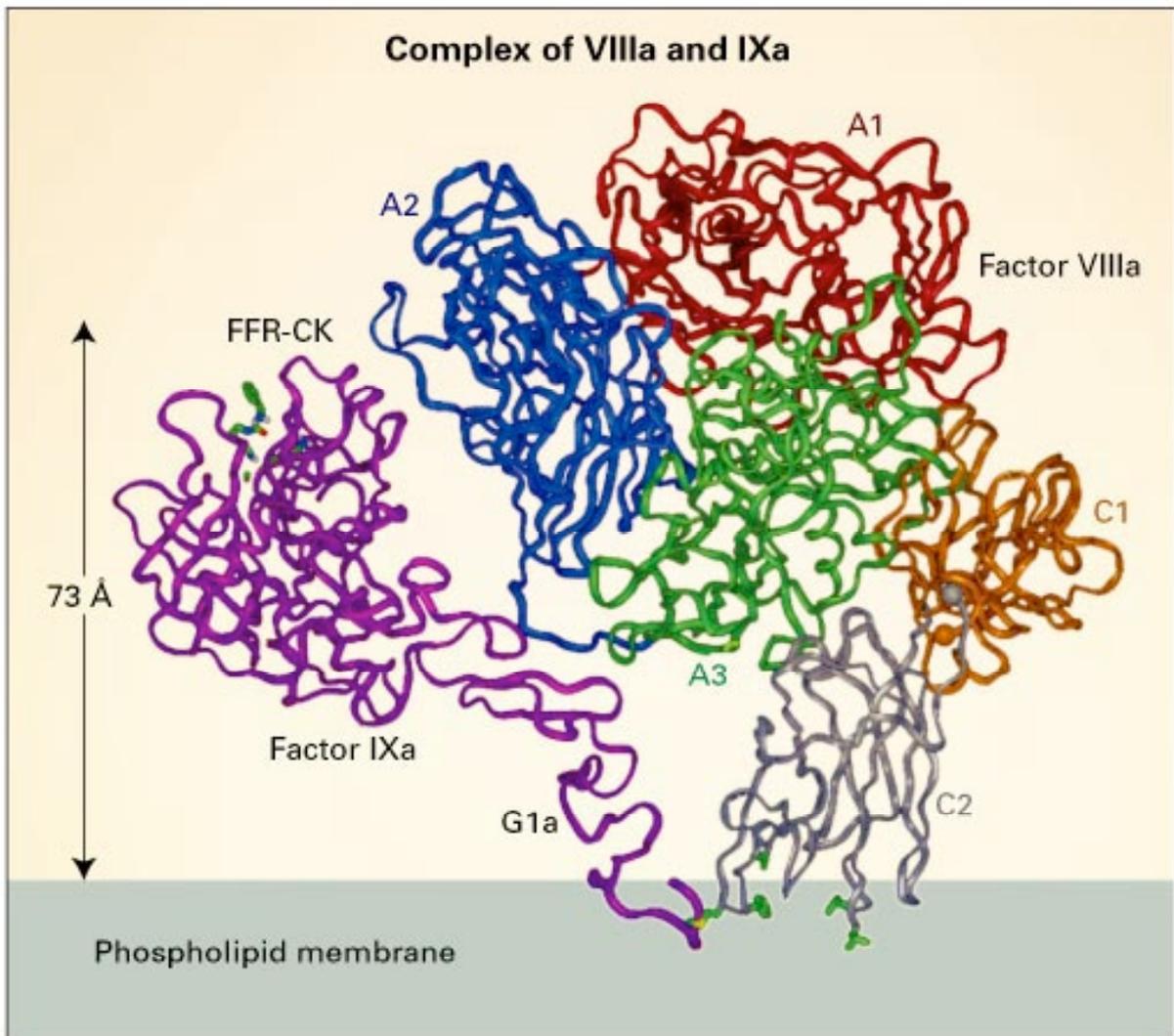
➤ **Forma grave:** attività coagulativa inferiore all'1% del normale. Le persone affette dalla forma grave rischiano di avere gravi emorragie in seguito ad estrazioni dentarie, operazioni chirurgiche o ferite. Un pericolo serio è la possibilità di emorragie interne apparentemente spontanee, anche dopo traumi talmente lievi da passare quasi inosservati. Microtraumi possono causare ripetute emorragie nelle articolazioni (emartri), causando dolori e rigidità articolare. Altri sintomi più rari sono la presenza di sangue nelle urine o emorragie intracraniche, che sono estremamente pericolose. La forma grave colpisce circa il 60-70% delle persone affette da emofilia ed i primi sintomi si verificano in genere quando il bambino comincia a camminare.

➤ **Forma moderata o lieve:** le emorragie spontanee sono molto meno frequenti, così come i problemi articolari. Alcune persone hanno una forma talmente lieve di emofilia che può passare inosservata ed essere diagnosticata per caso in età adulta.

➤ **emofilia B di Leyden:** in questa forma i sintomi si attenuano dopo la pubertà fino a scomparire se era presente una forma moderata.

La penetranza e' completa nei maschi; maschi della stessa famiglia che condividono la stessa mutazione, hanno anche le stesse manifestazioni cliniche, anche se fattori ambientali e il background genetico possono far variare l'espressivita'. Circa il 10% delle femmine portatrici presentano problemi nella coagulazione sia pure lievi.

Non deve stupire che il fenotipo sia indistinguibile infatti la funzione che esplica i prodotti dei due geni coinvolti e' comune: nella cascata di eventi che porta alla formazione del coagulo il FVIII e IX insieme attivano il fattore X che a sua volta attiva altri fattori VIII e IX. Il fattore VIII ha funzione di cofattore, mentre FIX ha attivita' proteolitica.



**Figura 1**

### Genetica dell'emofilia

La frequenza è diversa per le due forme : HEMA 1/4000–5000 dei maschi nati vivi, HEMB più rara (forse perché sotto diagnosticata) 1/20.000 maschi nati vivi.

Come già detto è recessiva X linked, quindi il rischio di essere portatore è presente solo nella madre, nelle sorelle e nelle cugine materne del probando. In dettaglio:

#### Genitori dell'affetto

- ☞ Il padre sano di un affetto non è mai portatore
- ☞ Se nella famiglia è presente anche uno zio materno affetto o un cugino materno affetto, la madre è portatrice certa e le sorelle (nate e non) hanno 50% di probabilità di essere portatrici e altri figli maschi non ancora nati 50% di probabilità di essere affetti. (quelli già 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 (nell' emofilia questa eventualita' si e' rivelata rara), 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 ,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.
  - Nel caso di HEMA in cui la mutazione piu' frequente (43%) e' un inversione intragenica (cfr. oltre) la probabilita' della madre di un probando con questo tipo di mutazione, di essere portatrice varia dall'80% al 98% a seconda della gravita' della espressione della malattia.

### Fratelli dell'affetto

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

### Figli dell'affetto

Dal momento che il probando se opportunamente trattato puo' riprodursi le sue figlie femmine sono tutte portatrici e nessun maschio affetto.

Tutto questo discorso sarebbe pura accademia se il dosaggio dei fattori di coagulazione VII e IX nei sospetti portatori fosse possibile. Il dosaggio di entrambi i fattori non e' attendibile nelle femmine per l'inattivazione del cromosoma X : infatti una portatrice potrebbe avere un dosaggio elevato per effetto di una inattivazione non al 50% nel tessuto esaminato. Un valore basso in una famiglia dove fosse presente un affetto, al contrario, supporta la probabilita' di essere portatrice. Quindi la certezza dello stato di portatrice si ottiene solo con lo studio del DNA per individuare la mutazione o con l'analisi di linkage, qualora non si individuasse la mutazione patogenetica. Lo studio del DNA e' necessario:

- ☞ 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 che tuttavia, vista la possibilita' di terapia (cfr. oltre) e la presenza di forme lievi non e' particolarmente richiesta soprattutto per HEMB

## Diagnosi

La diagnostica biochimica e' complessa, perche' discriminare fra HEMA e HEMB richiede il dosaggio anche di altri fattori. in linea di massima per quello che riguarda la capacita' coagulante *in vitro* si puo' dire che:

- ☞ <1% dei due fattori VIII o IX emofilia grave
- ☞ 1%-5% dei due fattori emofilia moderatamente grave
- ☞ >5% -30% lieve

Per discriminare fra le due forme occorre il test molecolare, cfr. diagnosi nelle singole forme. La strategia diagnostica presenta degli aspetti comuni:

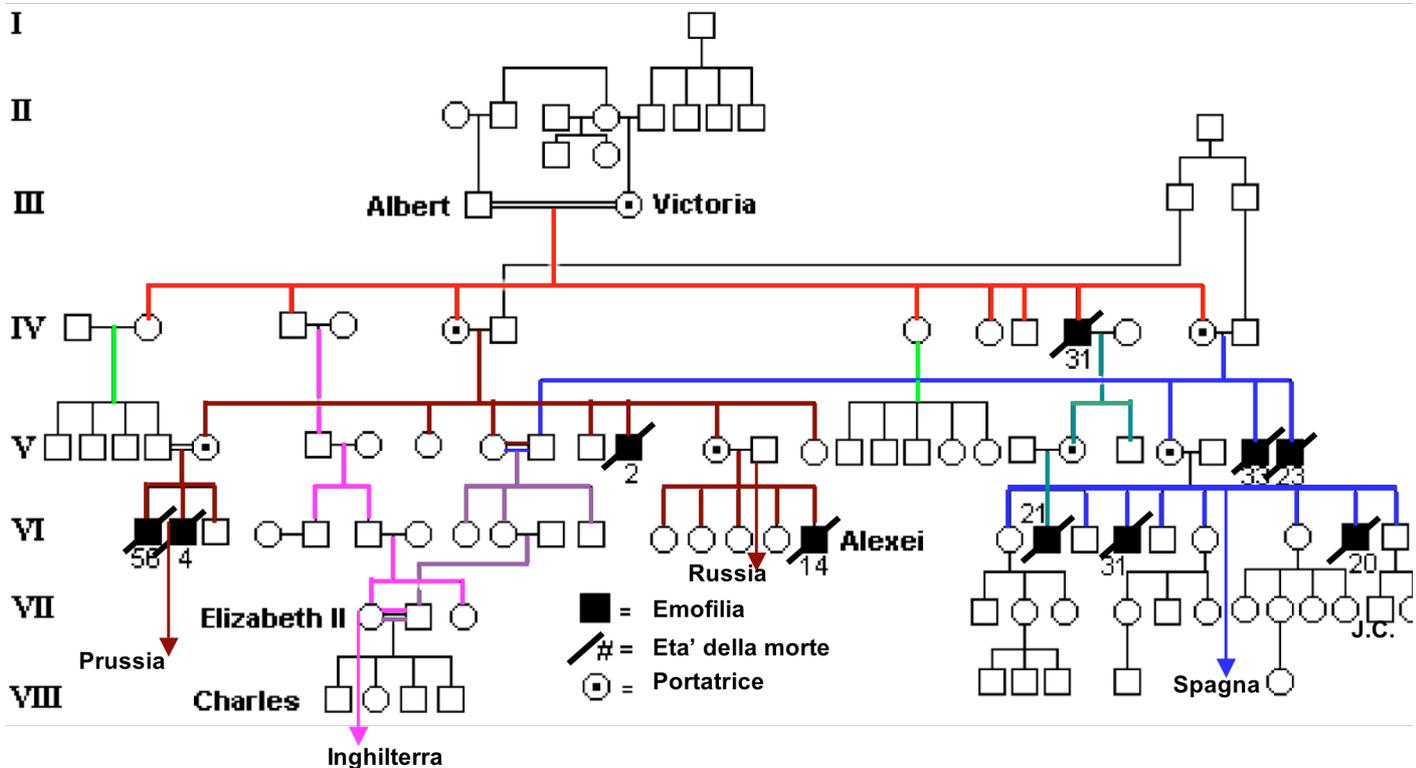
- ☞ Definizione della presenza di emofilia attraverso i test biochimici dei fattori di coagulazione
- ☞ Ricerca a livello del DNA della mutazione presente nel probando per poter impostare una corretta consulenza genetica ed eventuale diagnosi prenatale o preimpianto.

## Curiosita' storiche

La presenza dell'emofilia come difetto della coagulazione nei maschi viene riportata varie volte nella storia:

- ☞ Nel Talmud, scritto nel II secolo AD, viene riportata la morte di bambini dopo la circoncisione rituale. Vengono perciò esonerati dall'operazione i figli di donne che avessero perso un figlio per quella ragione.
- ☞ Un medico arabo Albucasis, nel XII secolo riporta la storia di una famiglia in cui i maschi morivano anche per traumi insignificanti.
- ☞ Nel 1803 un medico di Filadelfia identifica come ereditario e presente essenzialmente nei maschi questo disturbo della coagulazione.
- ☞ Nel 1828 un ricercatore di Zurigo introduce per la prima volta il termine emofilia descrivendo la malattia.
- ☞ Nel 1868 sul British Medical Journal compare la descrizione della malattia del Principe Leopoldo, terzo figlio maschio della Regina Vittoria morto a 31 per emorragia cerebrale. Da questa prima descrizione scaturì la definizione di "Royal Disease" riferito all'emofilia. La regina Vittoria era portatrice di emofilia (cfr. albero genealogico) e per le abitudini matrimoniali delle case regnanti, la malattia si diffuse fra le dinastie europee. La comparsa dell'emofilia nella dinastia dei Romanov ebbe effetti devastanti sulla famiglia. E' nota l'influenza del monaco Rasputin sulla famiglia dello Zar: infatti oltre ai sensi di colpa della zarina per essere lei la causa della malattia del figlio (comuni anche oggi alle madri di affetti da patologie X linked), c'era il fatto che nella Russia dell'inizio del XX secolo la superstizione e l'idea che le malattie fossero punizioni divine erano molto forti: lo Zar capo dello stato e della Chiesa doveva essere immune da qualsiasi difetto

pertanto la malattia di Alexei venne tenuta nascosta. Ci sono alcuni che ritengono che se lo zarevich non fosse stato emofilico, forse lo Zar sarebbe stato piu' attento ai problemi del suo paese e forse la Storia sarebbe andata in un'altra direzione. La storia pero' non si fa con i se. Per inciso ancora oggi non si sa se fosse emofilia A o B.



👉 Nel 1937 due dottori della Harvard University, Patek e Taylor, scoprirono di poter migliorare la condizione dei loro pazienti trasfondendoli con una sostanza ricavata dal plasma di individui normali, chiamarono tale sostanza globulina antiemofilica. Fino ad allora si riteneva che tutti i difetti della coagulazione risiedessero nelle piastrine.

👉 Nel 1944 un medico argentino, Plavoksy, vide che il sangue di alcuni emofilici correggeva il difetto dialtri: esistevano perciò due forme distinte

👉 1952: si identificano le due forme A e B

👉 1964: viene descritta su Nature la cascata di reazioni che porta alla coagulazione

👉 A meta' degli anni '60 si mettono a punto metodi per ottenere crioprecipitati dal plasma: i precipitati contengono i fattori in grado di controllare le emorragie. Nello stesso periodo vengono identificati i fattori della coagulazione.

👉 Anni '70: concentrati in polvere e refrigerati dei fattori VIII e IX permettono una cura anche a casa quando si verificano le emorragie.

👉 Fine anni'90: dopo la scoperta della trasmissione attraverso la somministrazione degli emoderivati naturali di malattie virali come l'epatite e l'AIDS, si mette a punto l'utilizzo di Fattore VIII e IX ottenuti attraverso l'ingegneria genetica.

## Emofilia A-HEMA (F8)

Il gene F8 le cui mutazioni patogenetiche provocano l'emofilia A e' lungo 186 kb ed e' composto da 26 esoni e mappa in Xq28. Quando fu clonato nei primi anni '80 era il gene piu' lungo mai identificato. Dall'analisi della sua struttura e della regione genomica che lo circonda sono emerse una serie di particolarita' :

➡ l'introne 22 contiene un isola CpG che funziona come promotore per due geni interni al gene F8 (gene che codifica per il fattore VIII) F8A trascritto in direzione inversa di F8 e F8B trascritto nella stessa direzione. Abbiamo quindi altri due trascritti entrambi ubiquitari con funzione non ben chiara

➡ Il gene F8A, privo di introni, lungo meno di 2 kb e interamente contenuto nell'introne 22, appartiene ad una famiglia genica, che presenta altri due membri nella stessa regione genomica circa 500 kb a valle del F8 (verso il telomero). Questi due geni strettamente correlati a F8A sono regolarmente trascritti in direzione opposta al gene F8A e nella stessa direzione di F8.(figura 2)

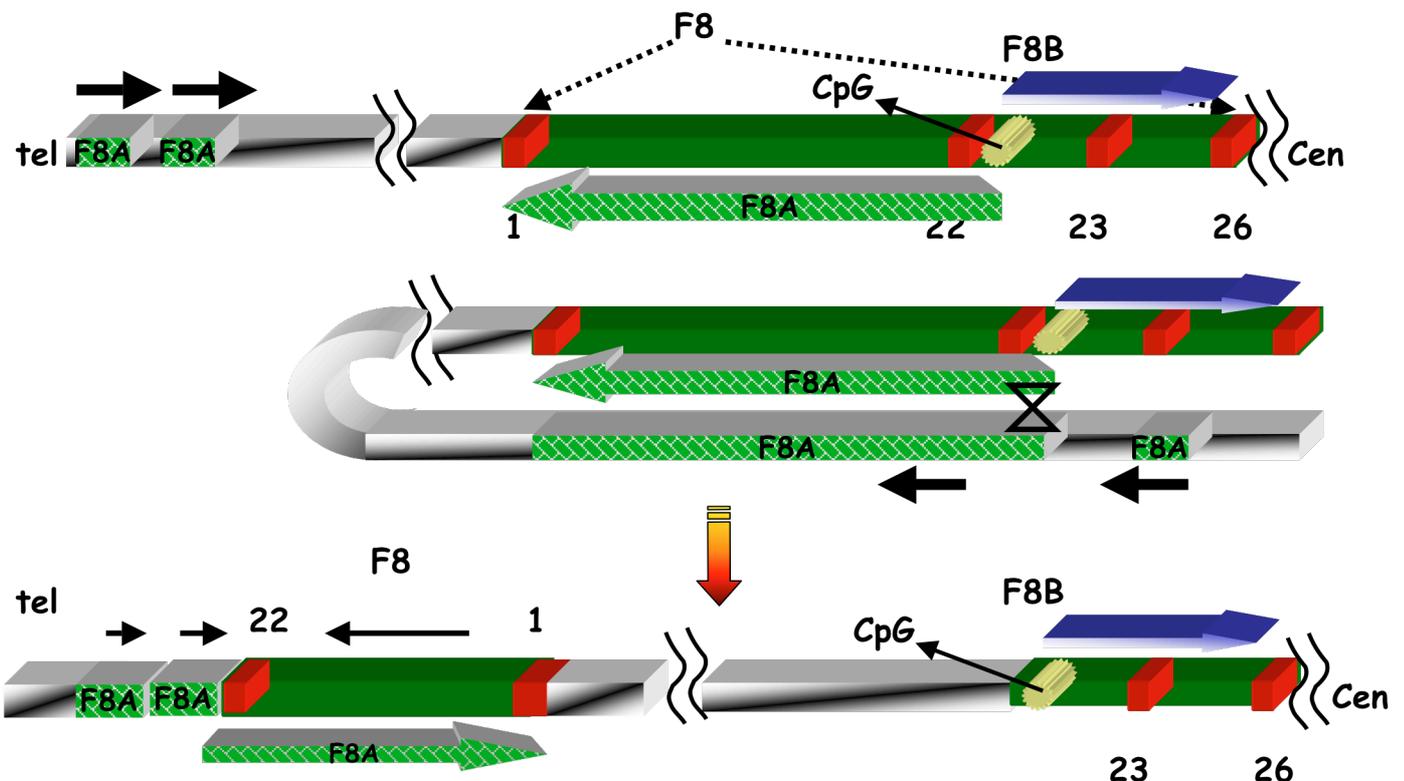
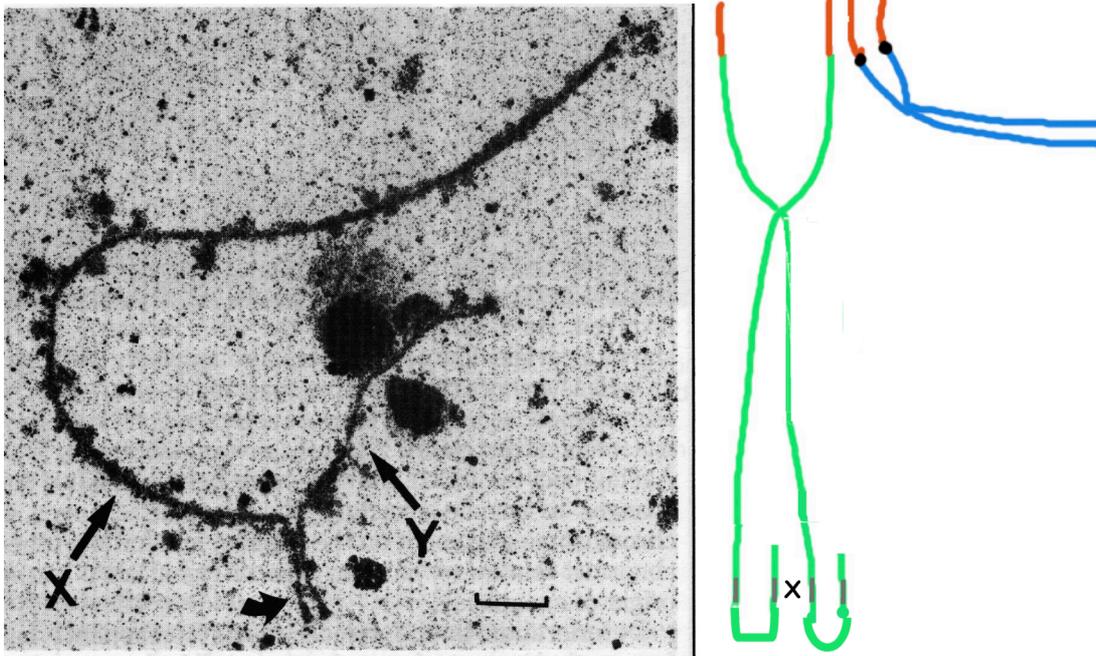


Figura 2

La presenza di questi due geni rende la regione suscettibile ad inversioni: attraverso un appaiamento intracromosomico fra i 3 geni F8A e con un

meccanismo di rottura e riunione si origina un cromosoma invertito con conseguente rottura del gene F8 e sua inattivazione. Questo evento potrebbe teoricamente avvenire tanto nelle cellule uovo quanto negli spermatozoi.

Studi in famiglie in cui e' presente l'inversione hanno evidenziato come la quasi totalita' delle inversioni avvenga negli spermatociti al momento della meiosi I. Perche'? Durante la meiosi maschile il cromosoma X non puo' appaiarsi per tutta la sua lunghezza dal momento che non ha un omologo, l'appaiamento avviene solo al livello della regione pseudoautosomica: telomero del braccio corto dei cromosomi X e Y. Questa situazione lascia libero il braccio lungo di appaiarsi con se stesso. (figura3)



**Figura 3**

Gli spermatociti primari non vanno piu' incontro alla mitosi: ecco spiegato perche' il mosaicismo germinale e' assente: ogni evento ricombinativo vale per un solo concepimento.

Il prodotto di F8 (FVIII) e' un cofattore sintetizzato principalmente nel fegato; e' una grande glicoproteina che subisce una maturazione complessa prima di legarsi con il fattore di von Willebrand che agisce come carrier e come stabilizzatore, dal momento che non legata a questo fattore ha una emivita molto breve. Consiste di 2332 aa, ha una struttura con 6 domini, il dominio B viene eliminato come conseguenza dell'attivazione. L'attivazione avviene in presenza di tracce di trombina, provoca il rilascio del fattore di von Willebrand e permette il legame con la membrana delle piastrine. Qui interagisce con il fattore IX anch'esso attivato e insieme attivano il fattore X dando origine alla via intrinseca della coagulazione (per i dettagli del processo di coagulazione vi rimando al corso di patologia generale).

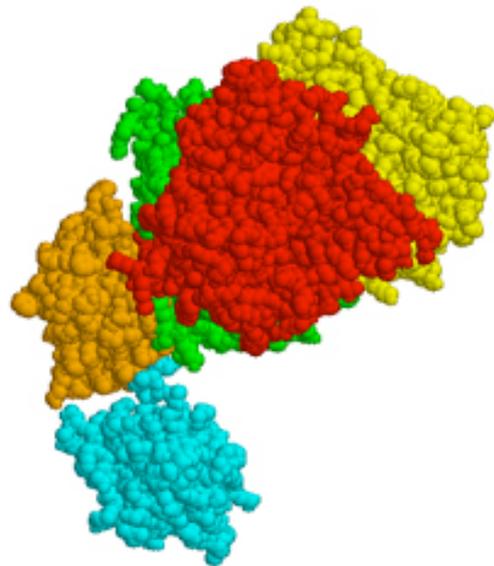
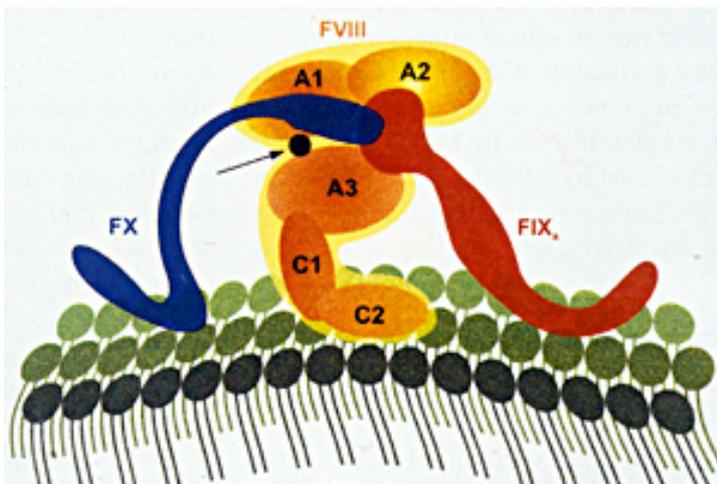


Figura 4

## Alleli

Sono presenti alcuni polimorfismi sia nella regione codificante che negli introni, che sono utili per la diagnostica con il linkage. Per quello che riguarda gli alleli patologici:

➤ 1a Inversione: crossingover intracromosomico fra l'introne 22 e i due geni omologhi presenti all'estremità telomerica della regione (figura 2). Nonostante l'alta omologia fra le sequenze la ricombinazione avviene più spesso con la sequenza più telomerica. Nella popolazione è presente una variante di questa inversione originata dalla presenza aggiuntiva di una terza sequenza F8A. In tutti i casi l'inversione genera la distruzione della ORF con conseguente assenza di proteina funzionante.

➤ 2a Inversione: originata dalla presenza di una duplicazione invertita di parte dell'introne 1 a 140 kb a valle del gene F8.

➤ Delezioni, inserzioni-duplicazioni che accompagnano l'inversione.

➤ Il resto degli alleli è rappresentato da tutte le possibili mutazioni: delezioni, inserzioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi missenso, non senso, di splicing, frameshift.

Il risultato di queste mutazioni è non solo l'assenza del prodotto, ma anche la presenza di una proteina malfunzionante: questo non stupisce visto il delicato meccanismo di attivazione di più fattori legato alla presenza di un corretto fattore VIII. Da ricordare anche che il FVIII è instabile in circolo e alcune mutazioni possono provocare la prematura degradazione della proteina.

## Relazione genotipo fenotipo

➤ Le inversioni originate dal crossing over fra le copie di F8A sono associate alla forma grave: circa il 45% dei malati gravi ha questa mutazione.

- L'inversione originata da crossing over all'interno dell'introne 1 e' associata alla forma grave : circa il 5% dei malati gravi ha questa inversione.
- Mutazioni puntiformi che originano codoni di stop o frameshift sono associate al fenotipo grave
- Mutazioni che provocano alterazioni nello splicing possono essere associate sia alle forme gravi che moderata: dipende dalla modifica che originano e dalla localizzazione nel gene. Dipende se c'e' un prodotto in qualche modo funzionante.
- Mutazioni missenso: nell'80% circa sono riscontrate in casi lievi. Nell'altro 20% alle forme gravi. Di nuovo, dipende dall'effetto sul prodotto.

## Diagnosi

A parte i test biochimici la diagnostica sul DNA inizia dalla ricerca delle mutazioni note:

- Inversione mediata dall'introne 22: tramite southern blot o con una Long PCR o PCR inversa. Da notare che quando si comincio' ad usare la PCR per la ricerca delle mutazioni, la presenza dell'inversione era ignota e nel 50% dei casi non si trovavano mutazioni negli esoni amplificati mentre non si riusciva ad amplificare la regione compresa fra gli esoni 22 e 23 (questi due esoni integri si sono allontanati per effetto dell'inversione), si riteneva percio' che la mutazione principale fosse una delezione.
- Inversione dell'introne 1 essendo piu' piccola si puo' evidenziare con PCR classica.
- Scanning delle mutazioni e sequenziamento: si evidenziano fino al 98% delle mutazioni in probandi che non hanno l'inversione.
- Ricerca delle delezioni con PCR, possibile anche nelle probabili portatrici.

In teoria i microarray potrebbero permettere di evidenziare fino al 96% di mutazioni , tuttavia la presenza di molte mutazioni private lo rende un metodo economicamente non valido.

Per quello che riguarda le portatrici lo scanning delle mutazioni e il sequenziamento non permettono di evidenziare delezioni o riarrangiamenti, solo la RT-PCR che non e' comunque un test diagnostico routinario.

Ricordate che nel caso dello scanning delle mutazioni e del sequenziamento ci sono una serie di problemi legati al fatto che queste tecniche evidenziano una differenza nella sequenza che potrebbe anche non essere patogenetica, quindi ci sono varie 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....

L'analisi di linkage puo' essere eseguita quando non e' stata identificata la mutazione nel probando. Naturalmente bisogna avere la certezza della diagnosi e di una storia familiare accurata. Se 6 polimorfismi intragenici uniti ad uno estragenico sono informativi il linkage risulta informativo per quasi il 90% delle famiglie che lo richiedono.

Con il linkage e' inoltre possibile nei casi *de novo* dopo avere identificato nel probando l'aplotipo che porta la nuova mutazione, identificare in quale genitore si e' originata (questo ha solo valore per la ricerca).

## **Emofilia B–HEMB (F9)**

Il gene, F9, le cui mutazioni patogenetiche provocano l'emofilia B (HEMB) o Christmas disease dal nome del primo paziente (1952), e' lungo 34 kb, ha otto esoni e mappa in Xq27. La sua struttura genomica non e' complessa come quella del Fattore VII

Il suo prodotto e' una glicoproteina vitamina K dipendente, sintetizzata nel fegato; va incontro a notevoli modificazioni per originare la proteina matura, che e' un precursore ancora inattivo, che andra' incontro a sua volta a modificazioni durante l'attivazione che consiste nell'interazione con il fattore VIII attivato e al legame con le piastrine (figura 1). Tutto il complesso costituisce l'attivatore del fattore X innescando la via intrinseca della coagulazione (per i dettagli del processo di coagulazione vi rimando al corso di patologia generale).

### **Alleli**

Sono presenti alcuni polimorfismi sia nella regione codificante che negli introni, che sono utili per la diagnostica con il linkage. Per quello che riguarda gli alleli patologici sono presenti tutte le possibili mutazioni:

- ➡ Alleli missenso : circa la meta' di queste sono ricorrenti, e alcune presentano un chiaro effetto del fondatore
- ➡ Delezioni dell'intero gene o di esoni (costituiscono circa il 3% delle mutazioni totali)
- ➡ Mutazioni frameshift, alterazioni della giunzione di splicing, nonsense

Il risultato sulla funzionalita' dipende dal sito di mutazione e quindi se si produce o meno una proteina, e se la sua attivita' e' conservata almeno in parte.

## Relazione genotipo fenotipo

- Grandi delezioni, mutazioni non senso e la maggior parte delle frameshift provocano le forme gravi
- Mutazioni missenso possono provocare tutte le forme da grave a lieve a seconda del sito di mutazione. Nel caso della sindrome di Leyden, le mutazioni sono concentrate nel promotore di F9 in un “androgen-responsive element”.

## Diagnosi

A parte i test biochimici la diagnostica sul DNA inizia dalla ricerca delle mutazioni note:

➤ Scanning delle mutazioni e sequenziamento: si evidenziano fino al 97% delle mutazioni, la ricerca delle mutazioni si estende anche alle regioni promotrici per individuare l'emofilia di Leyden.

Per quello che riguarda le portatrici lo scanning delle mutazioni e il sequenziamento non permettono di evidenziare delezioni o riarrangiamenti, solo la RT-PCR che non e' comunque un test diagnostico routinario.

➤ Ricerca delle delezioni: si presume la presenza di delezioni complete o parziali quando uno o piu' esoni non vengono amplificati dopo PCR. Nel caso delle portatrici la diagnosi richiede analisi di linkage, analisi dei breakpoint, o RT-PCR.

Ricordate che nel caso dello scanning delle mutazioni e del sequenziamento ci sono una serie di problemi legati al fatto che queste tecniche evidenziano una differenza nella sequenza che potrebbe anche non essere patogenetica, quindi ci sono varie 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....

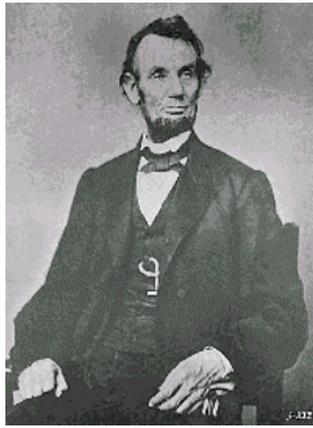
L'analisi di linkage puo' essere eseguita quando non e' stata identificata la mutazione nel probando. Naturalmente bisogna avere la certezza della diagnosi e di una storia familiare accurata. Se ipolimorfismi intragenici uniti ad uno

estragenico sono informativi il linkage risulta informativo con una accuratezza di oltre il 99%. E' presente tuttavia una differenza nell'informativita' del linkage a seconda dell'origine etnica legata alla diversa frequenza dei polimorfismi nelle popolazioni, sono informative: il 95% delle famiglie afro-amicane, 85%-90% delle caucasiche e il 60% delle asiatiche/native americane.

Con il linkage e' inoltre possibile nei casi *de novo* dopo avere identificato nel probando l'aplotipo che porta la nuova mutazione, identificare in quale genitore si e' originata (questo ha solo valore per la ricerca).



Amenophis IV



Abramo Lincoln



Nicolo' Paganini



Sergej V. Rachmaninov

## Marfan

### **Cosa e' la sindrome di Marfan (dettagli si trovano nel Korf)**

E' una patologia sistemica, a carico del connettivo, con un elevato grado di variabilita' nelle manifestazioni cliniche. Le mutazioni patogenetiche di FBN1 (unico gene coinvolto nella sindrome) sono associate con uno spettro ampio quanto continuo di manifestazioni cliniche, da singoli segni alla grave sindrome neonatale. La frequenza e' 1/5-10.000, non e' descritto nessun aumento di frequenza in gruppi etnici.

Proprio per l'ampia gamma di manifestazioni a livello del singolo individuo la diagnosi e' basata sulla storia familiare e su un rigido protocollo diagnostico (non lo riporto dal momento che non siamo medici). I test molecolari permettono di identificare le mutazioni patogenetiche in circa il 90% dei pazienti.

### **Genetica della Sindrome di Marfan**

La sindrome di Marfan si trasmette come dominante. il 75% degli affetti ha un genitore affetto, il restante 25% e' *de novo*. Dal momento che il rischio di ricorrenza per gli altri membri della famiglia dipende da quale e' la situazione bisogna prendere in considerazione con estrema attenzione la storia familiare.

Giova ricordare che nella fase di diagnostica ogni famiglia fa storia a se. Accoppiare piu' famiglie serve nella fase di ricerca, dall'esame complessivo delle famiglie si ricavano informazioni sulle modalita' di trasmissione, sulla presenza o meno di penetranza, sull'espressivita' della sindrome, sulla frequenza dell'allele malattia....

Nel caso di una patologia come la Marfan che presenta un ampio spettro di espressivita' bisogna, esaminando la famiglia che richiede il test, appurare se la mancanza di altri affetti nella famiglia corrisponde al vero o se ci sono altri affetti (per es. un genitore potrebbe essere morto prima che si manifestassero i problemi vascolari che costituiscono uno dei "microsintomi").

Se un genitore e' affetto i fratelli hanno un rischio del 50% di ereditare l'allele, non e' prevedibile pero' quanto grave sara' la manifestazione della

malattia. Stesso discorso per i figli di tutti gli affetti. Se la storia familiare e' veramente negativa (mutazione *de novo*), il rischi di ricorrenza per i genitori dell'affetto o per eventuali fratelli e' basso, ma sempre piu' alto rispetto alla popolazione generale, per la probabilita' di un mosaicismo germinale, che nel caso della Marfan e' stato riportato sia pur raramente.

## Il gene FBN1 (Fibrillina 1)

E' l'unico gene le cui mutazioni sono state messe in relazione alla sindrome di Marfan. E' un gene abbastanza grande e' composto da 65 esoni, ha un'ampia regione al 5' e la presenza di una forte conservazione dell'introne all'estremita' 5' suggerisce la presenza in questa regione di un elemento regolatorio. Mappa in 15q21.1 e sono state descritte circa 400 mutazioni patogenetiche, di cui nessuna specifica per particolari popolazioni.

Il suo prodotto e' una proteina extra cellulare che contribuisce con la fibrillina2 alla formazione di miofibrille coinvolte nel mantenimento dell'elasticita' delle fibre e nell'ancoraggio delle cellule epiteliali alla matrice interstiziale. Secondo il modello murino potrebbe anche essere coinvolta nella captazione e attivazione di un fattore di crescita.

## Alleli

Sono descritti circa 400 alleli patogeni la quasi totalita' dei quali e' dovuta alla formazione di un codone missenso a carico dei numerosi residui di cisteina o della sequenza consenso per il legame con il calcio dei motivi EGF (ne sono presenti 47 di cui 43 per il calcio).

Le mutazioni missenso comportano interferenze con il prodotto normale, dal momento che il prodotto finale e' una microfibrilla. Da qui l'effetto dominante negativo. Le mutazioni che comportano la formazione di un codone di stop, riducono la quantita' di prodotto e l'aploinsufficienza puo' contribuire alle manifestazioni cliniche. Nel modello murino la presenza di aploinsufficienza porta provoca difficolta' nell'iniziare l'assemblaggio delle microfibrille.

La relazione genotipo fenotipo non e' ben definita anche se si e' cercato di stabilire una relazione fra le diverse regioni del gene e l'effetto sul fenotipo della loro mutazione patogenetica, tenendo sempre presente che l'espressivita' e' diversa anche all'interno della stessa famiglia. Generalizzando:

- ➡️ quelli che presentano il fenotipo neonatale (+grave) di solito hanno mutazioni nella parte centrale del gene (regione mutata tuttavia anche in alcuni con forma lieve o canonica).
- ➡️ Le inserzioni, delezioni o errori di splicing senza perdita della frame, della regione centrale sono associate a manifestazioni piu' gravi.
- ➡️ Mutazioni che provocano un trascritto piu' corto che viene degradato rapidamente o che impediscono la maturazione post traduzionale del C-terminale, sostituzioni aa che modificano le interazioni con altre molecole hanno fenotipi da lievi a canonici

## Diagnosi

Analisi di mutazioni: utilizzando i test di ricerca di mutazioni note sul genomico e/o sequenziando il cDNA e/o il g(genomico)DNA si ottiene un'efficienza pari 70%–93%.L'efficienza e' legata a:

- ☛ accuratezza della diagnosi: se i soggetti hanno storia familiare positiva alla MArfan e rientrano in un protocollo diagnostico molto accurato e stringente, e' piu' probabile riuscire a trovare la mutazione
- ☛ tipo di mutazione : alcune possono non essere evidenziate dai test routinari:
- ☛ efficienza del test

☛ sequenziare il cDNA permette di evidenziare tutte quelle mutazioni che comportano splicing errato (sul gDNA non sarebbero evidenziabili)

☛ sequenziare il gDNA permette di evidenziare quelle mutazioni che portano ad una rapida degradazione dell'RNA

Se non si trova niente e si e' sicuri della diagnosi, l'analisi di linkage con polimorfismi interni al gene, e' informativa al 100% ed e' utile per la predittiva (Test a cui si sottopongono individui asintomatici, con una storia familiare di malattia genetica, per eventualmente mettere in atto una serie di interventi volti a scongiurare gli effetti piu' dannosi)), ma l'analisi di linkage non puo' essere utilizzata:

☛ quando il probando e' l'unico affetto della famiglia

☛ quando la famiglia presenta fenotipo atipico, infatti per le caratteristiche sistemiche della sindrome, alcune altre patologie del connettivo hanno delle sovrapposizioni con la MFS, ma FBN1 non e' mutato e la mutazione patogenetica e' in un altro locus.

Tuttavia in famiglie in cui la diagnosi e' certa e ci sono piu' membri affetti si puo' al 100% identificare l' "*allele Marfan*", cioe' quale e' la regione genomica che porta la mutazione patogenetica (qualunque essa sia).

La diagnosi prenatale e preimpianto sono possibili dopo aver identificato la mutazione o l'aplotipo Marfan presente nella famiglia, tuttavia e' raro che venga richiesta.

## Curiosita' storiche

La sindrome venne descritta per la prima volta nel 1896 da Marfan in una bambina di circa 5 anni Gabrielle P.

Negli anni '50 McKusik (guru della genetica umana) esaminando la casistica accumulata definì la presenza di pleiotropismo (una causa molteplici effetti) e la variabilità della sindrome, e stabilì definitivamente la trasmissione autosomica dominante. Inoltre poiché la sindrome si esprime negli eterozigoti si ritenne probabile che il difetto fosse a carico del connettivo e fosse strutturale e non enzimatico.

Sempre McKusik nel 1956 scriveva " Che cosa abbiano in comune il legamento del cristallino con l'aorta (*la lussazione del cristallino e l'aneurisma*

*aortico sono due dei segni tipici della Marfan), e' oscuro. Se fosse noto, il difetto di base della sindrome potrebbe venir identificato"*

Infatti quando si dimostra l'abbondanza della fibrillina nel legamento del cristallino, nel tessuto vascolare e nel periostio, si trova la chiave per focalizzare l'attenzione su questa proteina connettivale e giungere al clonaggio del suo gene.

E' stato suggerito che che Abramo Lincoln e Paganini fossero affetti dalla sindrome di Marfan, solo per citare alcuni personaggi storici noti a tutti.

A proposito di Paganini e' stato suggerito, che a parte il suo genio, fosse avvantaggiato nel poter prendere e tenere accordi impossibili per altri, dall'aver le dita molto lunghe e iperestensibili.

# **Rene policistico autosomico dominante ADPKD** (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease)

## **Cosa e' il rene policistico dominante**

Prima di tutto e' necessario dire che esiste anche un forma recessiva di cui parleremo in seguito.

L'ADPKD (per brevit  usero' sempre il suo acronimo) e' una malattia sistemica di solito ad insorgenza tardiva, caratterizzata da cisti renali bilaterali, da cisti in altri organi come fegato pancreas e membrana aracnoide, anomalie vascolari che possono portare ad aneurismi. La compromissione renale a seguito della formazione delle cisti porta ad insufficienza renale e ipertensione. Si riteneva che fosse una patologia solo dell'adulto, mentre oggi utilizzando criteri diagnostici piu' stringenti si e' dimostrato la sua presenza anche nei bambini. La sua frequenza e' fra 1/400 e 1/1000 nati vivi. La diagnosi clinica si basa sulla diagnostica per immagini del rene, e sulla storia familiare.

## **Genetica di ADPKD**

ADPKD si trasmette come autosomica dominante e circa il 10% degli affetti sono *de novo*. La malattia e' originata nel ~85% dei casi da mutazioni del gene PKD1, il ~15% del gene PKD2, si ritiene che il restante siano dovuti a mutazioni di almeno un altro gene.

La maggior parte degli affetti ha un genitore che manifesta la malattia, ma nella quota di apparentemente nuove mutazione bisogna tener conto della possibilit  che un genitore potrebbe essere morto prima di manifestare i segni o che la malattia si manifester  piu' tardi.

**Attenzione** stiamo parlando del rischio malattia: nel caso di ADPKD abbiamo eterogeneita' di locus quindi l'assenza nei genitori del probando di mutazioni patogenetiche ad un locus non esclude la possibilit  di mutazioni nell'altro e quindi il rischio per altri figli.

Se un genitore e' affetto i fratelli hanno un rischio del 50% di ereditare l'allele. Se e' una nuova mutazione il rischio e' basso, il mosaicismo germinale non e' mai stato riportato, ma non puo' essere escluso.

Da notare che la diagnostica molecolare nei familiari asintomatici (la malattia ha espressivita' variabile sia per l'eta' di insorgenza che per gravita') e' utile per identificare chi e' a rischio per la comparsa della malattia (cioe' e' predittiva), ma non puo' dire come e quando si esprimer . Tuttavia la conoscenza dello stato di portatore della mutazione consente di adottare stili di vita che possono riuscire a contenere gli effetti piu' gravi.

## **I geni PKD1 (Policistina 1) e PKD2 (Policistina 2)**

**PKD1** e' il gene le cui mutazioni patogenetiche si ritrovano in circa l'85% degli affetti. Mappa in 16p13.3, occupa una regione di circa 52 kb, ha 46 esoni e almeno 6 pseudogeni nella regione vicina. La presenza di questi pseudogeni che conservano una similarita' elevata con il gene PKD1 ha reso piu' complicata la messa a punto di protocolli di diagnostica molecolare. Il suo trascritto lungo circa 14 kb, presenta 3 isoforme dovute a splicing alternativo, la cui funzione non e'

nota. Il gene e' conservato nella scala zoologica e geni ortologhi sono stati trovati sia negli anfibi che nei pesci.

Il suo prodotto la policistina 1, e' una proteina transmembrana, lunga 4303 aa, del peso di circa 460 kDa. Ha numerosi domini. in particolare: 11 domini transmembrana, il C-terminale citoplasmatico breve che potrebbe costituire il dominio di interazione con PKD2, il segmento extracellulare (N-terminale) piuttosto lungo, ha due repeat ricchi in leucina.

La funzione di questa proteina non e' ben chiara, vista la sua struttura potrebbe avere la funzione di recettore per diverse proteine e carboidrati, come pure avere una funzione nella trasmissione del segnale, e/o essere un regolatore di canali ionici, e/o funzioni per mantenere l'adesione cellulare, di sicuro forma un eterodimero con PKD2. Da cui la dominanza.

## **Alleli di PKD1**

Sono presenti numerosi alleli patogenetici distribuiti in tutta la sequenza codificante e non, il che non stupisce vista la complessita' della molecola. Molti degli alleli patogenetici sono presenti in singole famiglie, hanno in comune pero' la caratteristica di originare proteine troncate con conseguente non utilizzo della stessa. Sono presenti anche delezioni di varia entita' (circa il 3%)

Questa complessita' rende difficile e poco efficiente l'analisi diretta delle mutazioni. Pertanto per la diagnosi nei soggetti asintomatici si ricorre al linkage (vedi oltre)

## **PKD2**

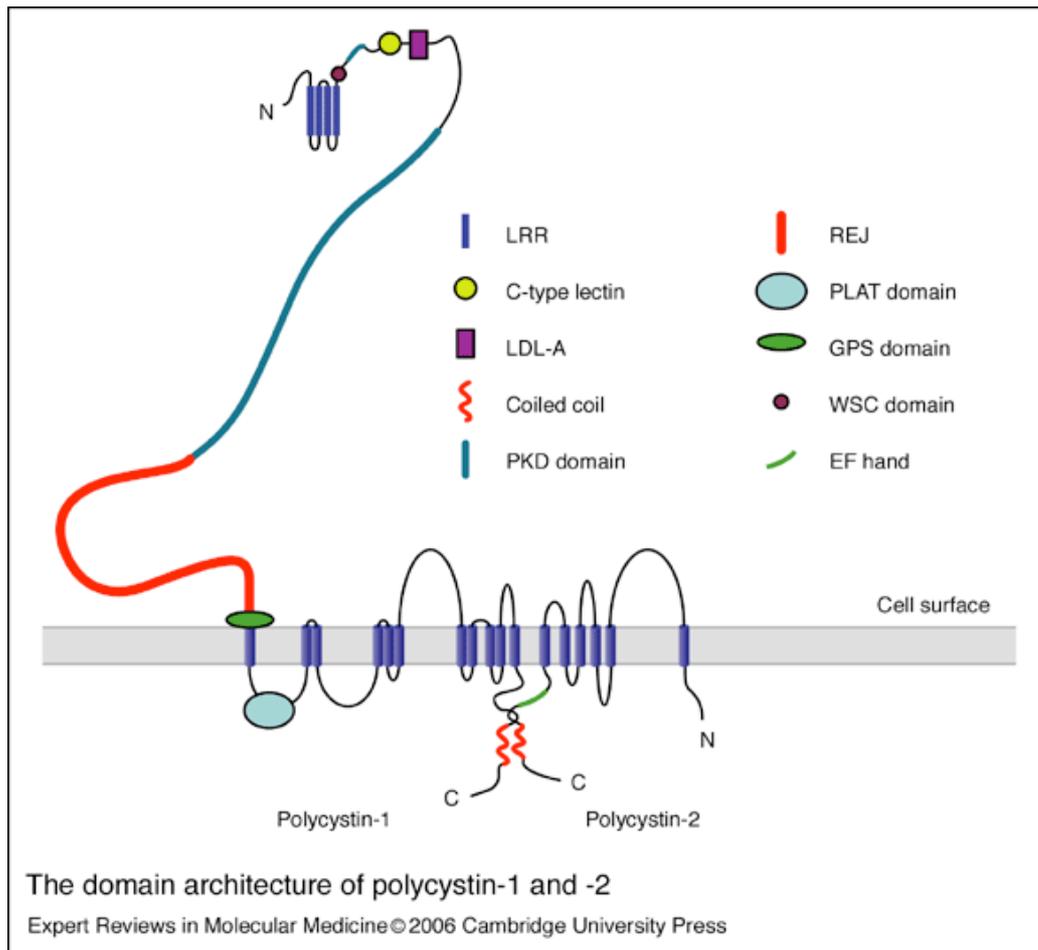
**PKD2** e' il secondo gene coinvolto nel ADPKD, nel 15% gli affetti presentano mutazioni patogenetiche a suo carico. Mappa in 4q22, occupa una regione genomica di 70 kb, ha 15 esoni.

Il suo prodotto e' la policistina 2, che contiene 968 aa e ha un peso di circa 110kDa. E' una proteina transmembrana con 6 domini transmembrana, il C e N terminali sono entrambi citoplasmatici, e l'N-terminale dovrebbe giocare un ruolo importante nel mantenimento della morfologia del glomerulo e del tubulo.

La sua funzione dovrebbe essere quella di regolare la permeabilita dello ione calcio, attraverso il suo C-terminale eterodimerizza con il corrispondente di PKD1

## **Alleli di PKD2**

Anche in questo caso ci si trova di fronte ad una allelia multipla (75), con mutazioni private (mutazioni che si riscontrano in una singola famiglia) distribuite lungo tutta la sequenza. La maggior parte hanno come conseguenza la formazione di una molecola troncata, non funzionale.



## Diagnosi

Come già detto la diagnosi molecolare è complessa per la complessità di PDK1. Sembra tuttavia che con il sequenziamento si possano individuare circa l'85% delle mutazioni patogenetiche a carico di entrambi i geni coinvolti. L'analisi di linkage per identificare i soggetti portatori, ma preasintomatici, ha il grosso limite di essere informativa solo se le famiglie sono ampie e se la diagnosi è sicura.

Dal momento che circa il 3% delle mutazioni di PDK1 sono delezioni si può ricorrere alla FISH o ai microarray, tuttavia il livello di riuscita di questi metodi è basso.

Per riassumere in questa patologia che è sicuramente genetica ed ereditaria l'indagine molecolare ha molto meno importanza delle indagini strumentali come l'ecografia e altre tecniche che possono mettere in evidenza piccoli segni clinici che sono il primo segnale della presenza dell'allele mutato. In effetti sono stati messi a punto dei protocolli diagnostici molto stringenti che permettono di identificare i portatori e mettere in atto una serie di comportamenti che riducono sensibilmente i danni come l'insufficienza renale e problemi vascolari. La diagnostica molecolare è utile nel momento che un soggetto voglia donare un rene al familiare affetto: un portatore asintomatico non può donare, perché non solo dona un rene che successivamente può andare incontro a cisti, ma si espone lui stesso a gravi problemi, qualora più tardi manifesti la patologia. Naturalmente trovare la mutazione in un asintomatico non permette di prevedere la gravità o i tempi della comparsa della malattia.

# **Rene policistico autosomico recessivo ARPKD** (Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease)

## **Cosa e' il rene policistico recessivo**

E' una patologia sistemica che coinvolge sostanzialmente due organi: il rene e il fegato, le altre manifestazioni sono secondarie alla patologia renale ed epatica. E' distinta dalla forma dominante, anche se coinvolge primariamente lo stesso organo. A differenza della forma dominante questa patologia compromette pesantemente le aspettative di vita. Circa il 30% degli affetti muore nel periodo neonatale. La sopravvivenza fino un anno e' circa l'85%, di quelli che superano l'anno di vita circa l'80% raggiunge i 10 anni, mentre raggiungono l'adolescenza circa il 70%. di solito la sopravvivenza non supera i 50 anni.

La maggior parte degli affetti presenta la patologia fin dal periodo neonatale, gli altri vengono diagnosticati nell'infanzia o nella adolescenza a seguito delle complicanze epatiche.

La penetranza e' 100% con una espressivita' variabile fra le famiglie. L'incidenza della patologia e' ritenuta essere compresa fra 1/20.000 e 1/40.000. Questo ampio margine si ritiene sia dovuto al fatto che i neonati muoiono prima di poter fare una diagnosi certa e che altri si aggiungono solo durante l'adolescenza a seguito della diagnostica molecolare, e quindi non risultano nel conteggio degli affetti alla nascita.

Si ritiene che i portatori nella popolazione generale siano 1/70.

## **Genetica di ARPKD**

La patologia si trasmette come autosomica recessiva, da cui deriva che i genitori del probando sono eterozigoti obbligati e sono asintomatici. Dal momento che soprattutto in quei casi in cui la malattia viene diagnosticato nell'adolescenza, c'e' il rischio di confonderla con altra patologie renali soprattutto ADPKD, e' necessaria un'accurata diagnostica clinica (oramai ben definita).

Rischio di ricorrenza: i genitori sono eterozigoti e portatori sani. Al momento del concepimento: 25% affetti m/m, 50% portatori sani wt/m, 25% non portatori e quindi wt/wt. I fratelli gia' nati e non affetti hanno 2/3 di probabilita' di essere portatori

Nel caso di affetti che raggiungono l'eta' riproduttiva dipende dal genotipo del partner: la frequenza dei portatori nella popolazione e' 1/70 (1,42%). Quindi:

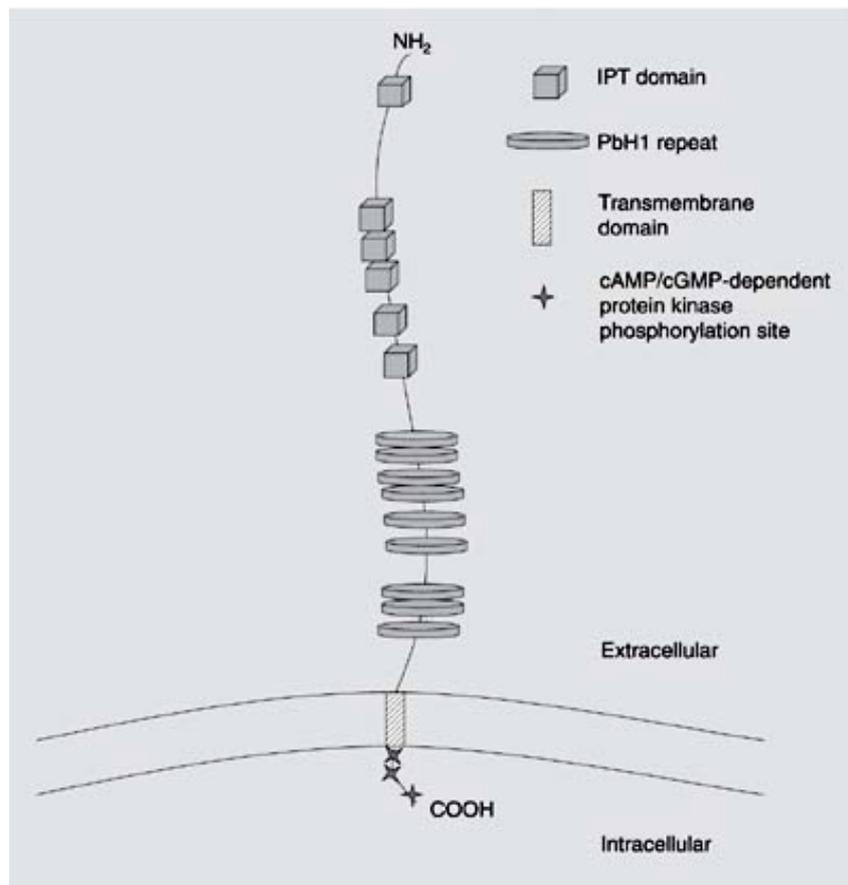
➡ La probabilita' per un affetto di avere un figlio affetto nel caso di partner wt/wt e' 0, mentre e' 100% di averli portatori.

➡ La probabilita' nel caso di partner portatore e' circa 0,7% sia malato che portatore:  $1,42(\text{probabilita' di eterozigosi}) \times 1$  (il proposito e' portatore dell'allele)  $\times 50$  (e' un incrocio Aa x aa:  $1/2$  Aa,  $1/2$  aa)

Naturalmente nelle famiglie in cui si e' identificata la mutazione, lo stato di portatore dei fratelli viene definito in maniera inequivocabile dal test genetico. Mentre per la presenza di alleia multipla non e' possibile individuare l'eterozigote nella popolazione.

## Il gene PKHD 1 (Poliductina/Fibrocistina)

E' l'unico gene le cui mutazioni sono state associate al ARPKD. Mappa in 6p12, e' lungo 472,28 kb ed e' composto da 67 esoni e produce almeno 4 trascritti. Il suo prodotto, la fibrocistina, e' un recettore di membrana lungo 4072 aa del peso di 447 kDa, ha parecchi domini di cui uno Ig-like presente in almeno 6-7 copie. La regione N-terminale, molto ampia e altamente glicosilata e' extracellulare, mentre la C-terminale e' breve, citoplasmatica e contiene dei siti potenziali di fosforilazione, ha un unico dominio transmembrana. La sua funzione non e' chiara, sembrerebbe agisca durante il differenziamento nei dotti collettori e biliari.



## Alleli

Gli alleli patogenetici sono molti e spesso sono privati (presenti in una sola famiglia), distribuiti lungo tutto il gene, e non c'e' nessun "hot spot". La maggior parte di esse sono missenso o non senso, che portano alla formazione di una proteina troncata nel 45% delle famiglie studiate.

Una chiara correlazione genotipo-fenotipo non e' possibile visto il gran numero di mutazioni, sembra tuttavia che le non senso provochino il fenotipo piu' grave e due alleli non senso sono letali in epoca neonatale. Le missenso sembrano meglio tollerate e l'eterozigote composto nonsenso/missenso non e' letale.

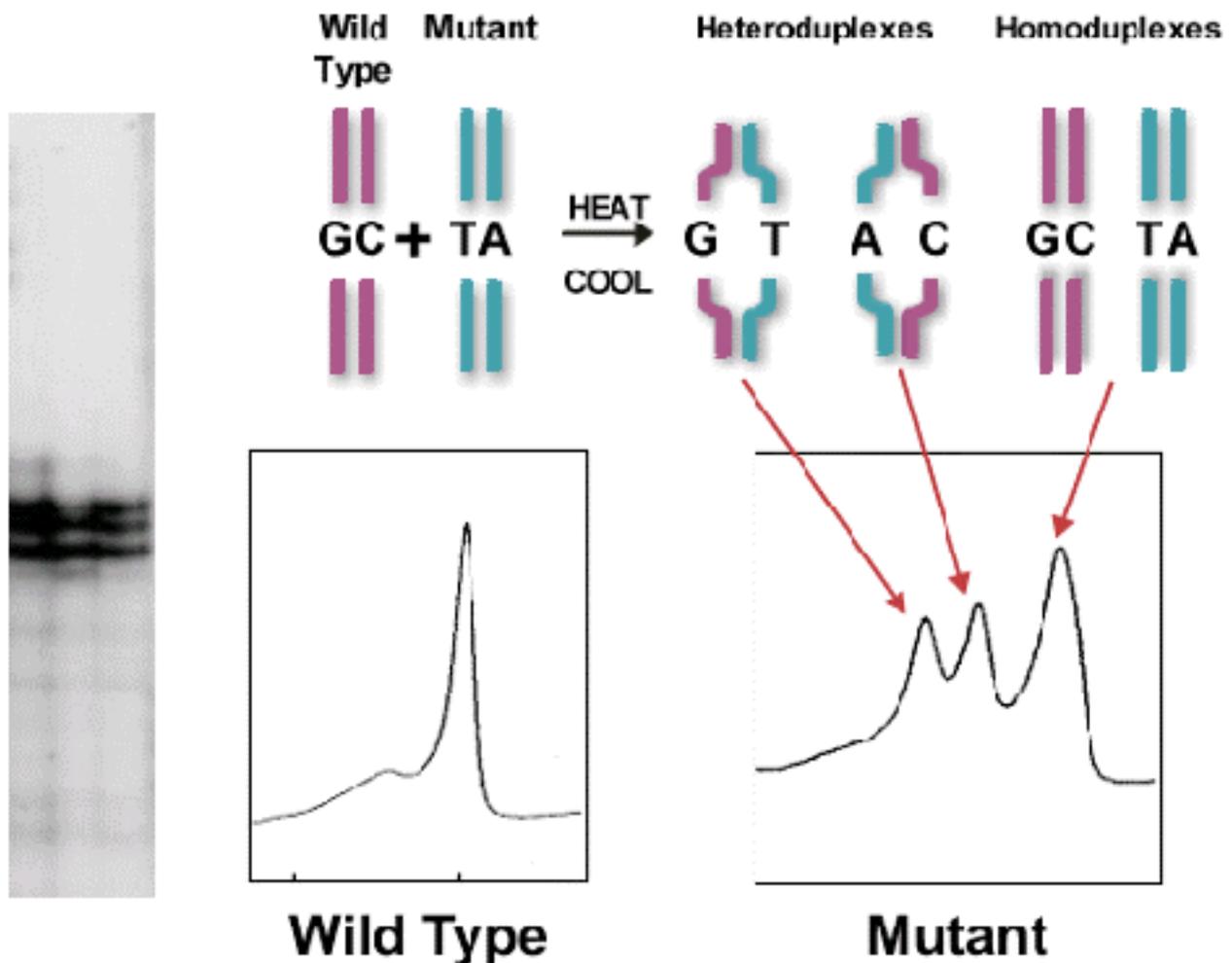
## Diagnosi

La diagnosi molecolare e' complicata dal gran numero di mutazioni, e dalla grandezza del gene, l'identificazione delle mutazioni e' tuttavia indispensabile per poter eseguire una diagnosi prenatale, che viene richiesta visto l'alto tasso di mortalita' infantile di ARPKD.

La tecnica di elezione e' la DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography)(vedi PDF). Questa tecnica, evidenziando eteroduplex di frammenti amplificati con PCR, permette di limitare il sequenziamento a queste regioni. La tecnica permette di identificare almeno una mutazione in circa il 92-98% di affetti, il limite e' quello legato alla difficile interpretazione di eventuali variazioni nella sequenza che potrebbero essere dei polimorfismi e non mutazioni patogenetiche.

Un'altra possibilita' viene dagli studi di linkage che in teoria dovrebbero essere facilitati dal fatto che la patologia e' recessiva e quindi sicuramente familiare e dalla presenza di polimorfismi intragenici, che possono permettere di identificare senza dubbi l'aplotipo che porta l'allele ARPKD. In effetti e' cosi, ma c'e' un limite che e' costituito dal fatto che bisogna essere certi che non ci sia un genitore affetto dalla forma dominante che non ha ancora manifestato la malattia. In questo caso l'affetto sarebbe una forma di rene policistico dominante. Per fugare i dubbi di diagnosi sbagliata ci sono protocolli di diagnostica per immagine molto stringenti.

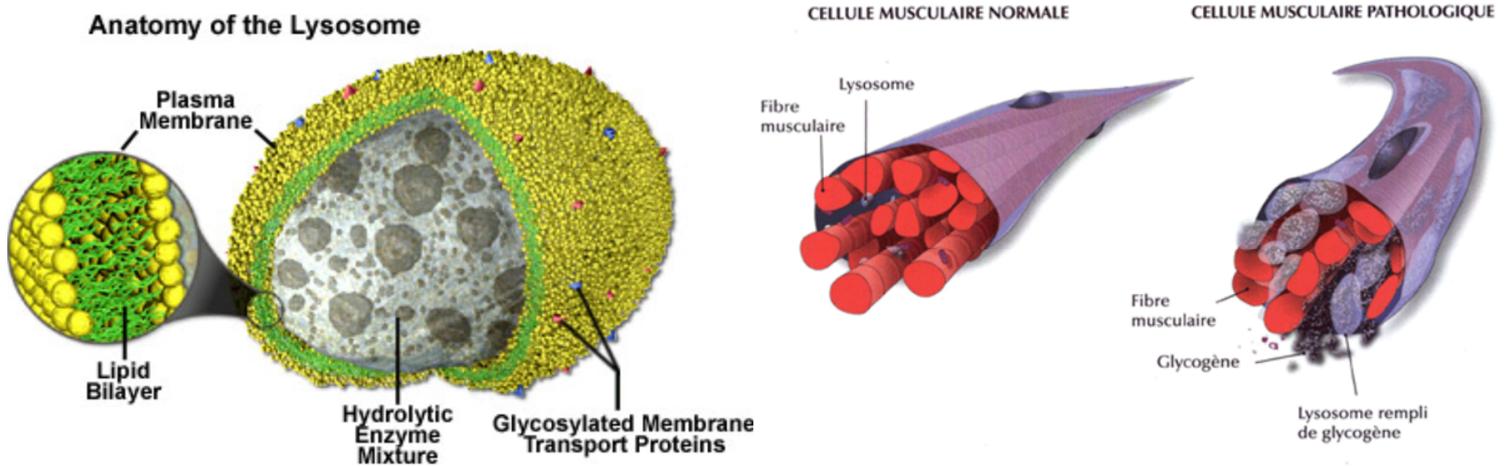
## DHPLC



# 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. Se vi ricordate ho insistito molto sul fatto che l'eterogeneità genetica (cfr. Genetica II) 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.

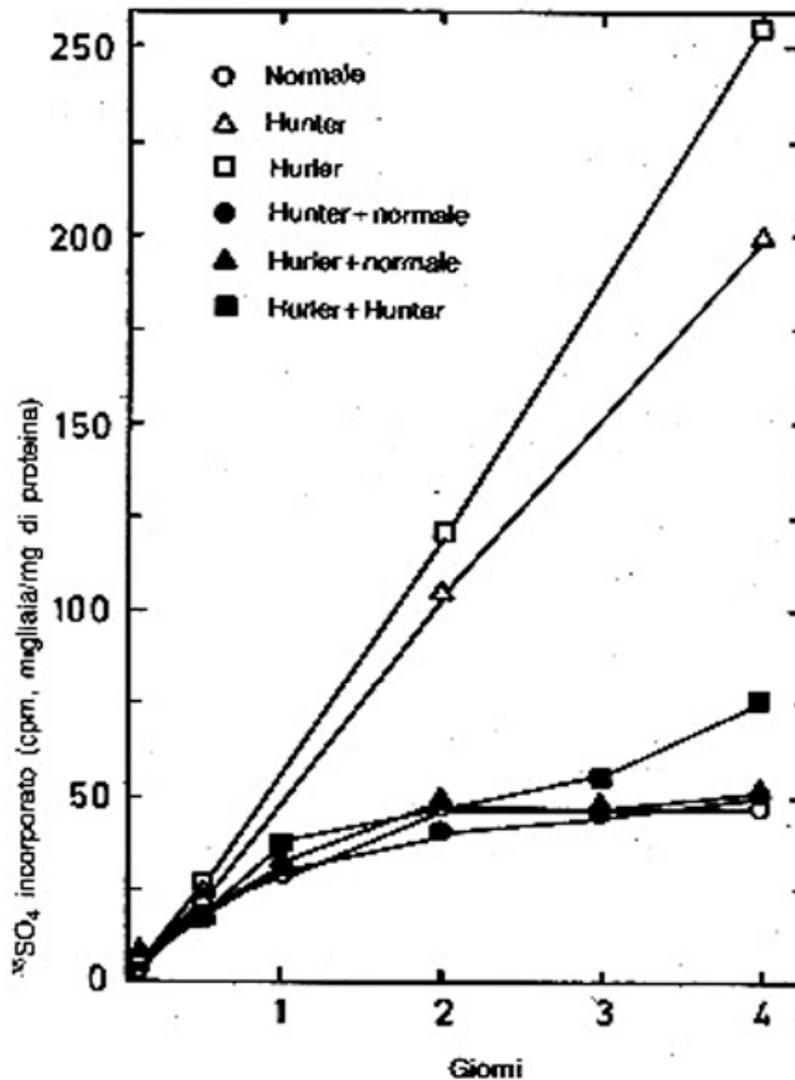
I danni sono dovuti all'accumulo progressivo nei diversi tessuti dei polisaccaridi solforati, gli stessi glicosamminoglicani vengono poi escreti nelle urine. La classificazione storica (fino a MPSVII) si basava sulle diverse manifestazioni cliniche, sul tipo di sostanza escreta nelle urine, e nel caso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

**Tabella1**

Mucopolisaccaridosi Classificazioni 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 e' dato vacante perche' inizialmente si riteneva sulla base della clinica che la sindrome di Scheie fosse un'entita' a se' e aveva il numero V. Gli studi di complementazione evidenziarono che non c'era complementazione fra Hurler e Scheie quindi dovevano essere alleliche. (perche'? ricordate Genetica I? e Genetica II serie allelica?) La spiegazione del diverso fenotipo clinico la troverete quando parleremo in dettaglio di MPSI.



**Incorporazione anomala 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 evidenzio' chiaramente il fatto che lo stesso fenotipo clinico corrisponde ad entita' biochimiche e quindi genetiche diverse (eterogeneita' genetica), come ipotizzato ancora prima di conoscere le differenze enzimatiche confrontando la scarsa variabilita' 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-acetilglucosamina-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>galattosamina-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-acetilgalattosamina -4-solfatasi (arilsolfatasi 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 rcaratterizzati 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 diro' a proposito di MSP I e MSP 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 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 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 IIIC Sanfilippo tipo D**

Il gene (GNS), mappa in 12q14 e codifica per N-acetilglucosamina-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 percio' di fronte ad un caso di serie allelica, legato alle diverse funzioni che il prodotto del gene svolge. Infatti la proteina con attività catalica 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 piu 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 una 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 IDS1		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.

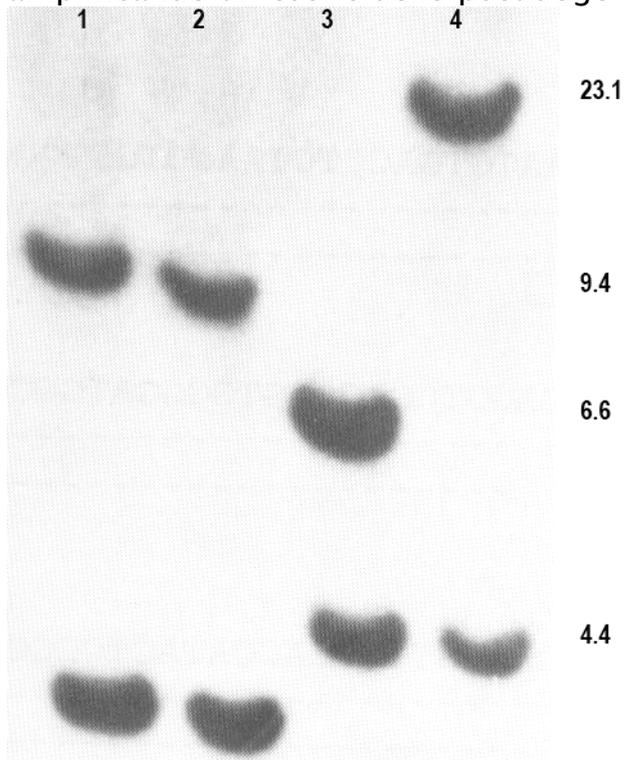
Per definire lo stato di portatrice che, ricordo, e' asintomatica, e' necessario:

- 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.

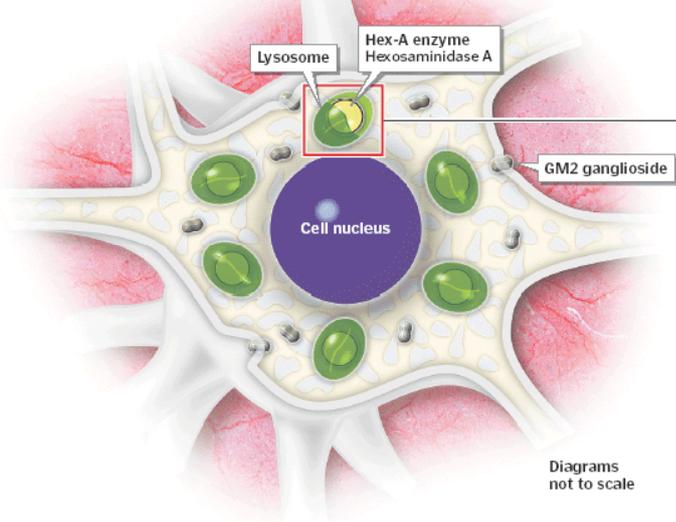
Le due osservazioni vennero considerate riferite alla stessa patologia che venne

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

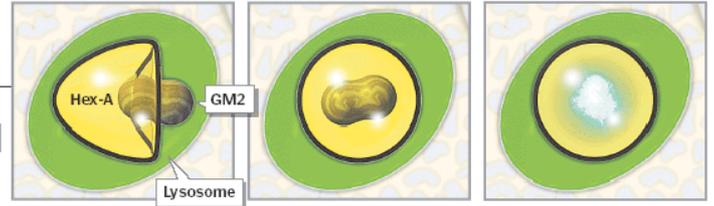


SOURCES: University Hospitals; The National Tay-Sachs & Allied Diseases Association; healthline.com; howstuffworks.com

#### 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.

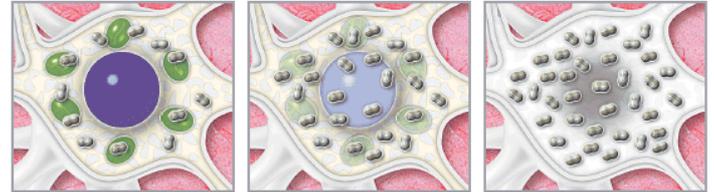
GM2 enters the lysosome ... .. where it is engulfed ... .. and digested by the Hex-A.



#### 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.

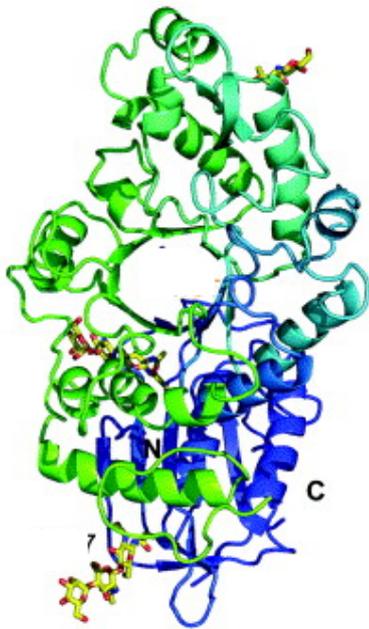
In realta' questo e' un discorso accademico perche' la diagnosi di portatore e' sicura e relativamente semplice : si puo' testare la presenza dell'attivita' enzimatica anche senza aver eseguito la diagnosi molecolare.

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

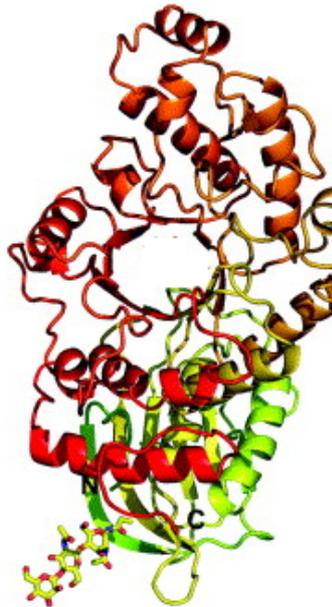
- ☞ per confermare la diagnosi,
- ☞ per individuare il genotipo dei portatori individuati con lo screening: testando le tre mutazioni comuni si individuano fra il 92 e il 94% di mutazioni fra gli Ebrei Askenaziti,
- ☞ per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia. Ovviamente l'identificazione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



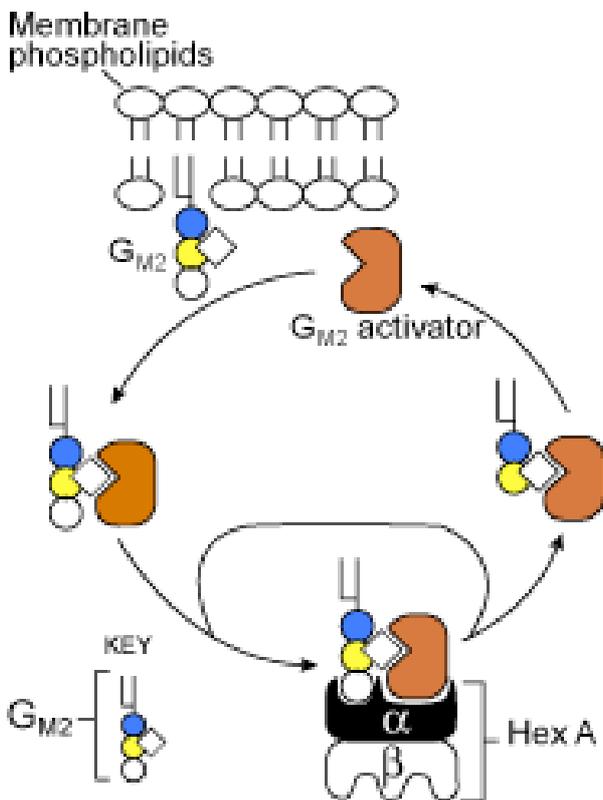
Subunita' alfa



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.

## Difetti dell'imprinting (Prader-Willi, Angelman)

Vi ricordo che dell'imprinting come meccanismo di regolazione abbiamo parlato lungamente durante il corso di Genetica II. Vi invito a riguardarvi sia le lezioni che il materiale (presenti in rete) e la parte introduttiva di queste dispense. Per poter illustrare come fare diagnostica per le sindromi che si originano da difetti di imprinting, riassumerò brevemente i concetti che sono alla base delle strategie diagnostiche.

Il termine "imprinting" è stato adoperato in generale per indicare qualsiasi tipo di modificazione del comportamento conseguente ad esperienze particolari. Più recentemente, si adopera il termine di "**imprinting genomico**" per riferirsi all'espressione differenziata di materiale genetico, a seconda che esso derivi dal genitore di sesso maschile oppure dal genitore di sesso femminile. L'imprinting genomico deve implicare modificazioni del DNA nucleare di cellule somatiche affinché possa produrre delle differenze fenotipiche; è un concetto questo, che contraddice l'assioma mendeliano secondo il quale l'origine dell'informazione genetica non influenza l'espressione dei geni. In questo contesto il termine imprinting è usato anche per indicare che un qualcosa accade durante il periodo "critico o sensibile" dello sviluppo. Nel caso dell'imprinting genomico lo stadio in cui si formano le cellule germinali, potrebbe rappresentare il periodo critico durante il quale le informazioni genetiche vengono "etichettate" o "marcate", vale a dire che esse vengono temporaneamente modificate per permettere una espressione differenziata.

L'imprinting genomico è un processo che, in maniera temporanea e reversibile, lascia un'impronta di diverso tipo nei geni trasmessi dal genitore di sesso maschile e in quelli trasmessi dal genitore di sesso femminile. Di conseguenza, la prole che riceve geni marcati dalla madre sarà dal punto di vista funzionale geneticamente diversa da quella che riceve geni marcati dal padre. In poche parole, è in qualche caso importante il fatto che un gene venga trasmesso da un genitore piuttosto che dall'altro.

Credo sia utile sottolineare che l'ereditarietà del locus è comunque mendeliana e segue la segregazione dei cromosomi alla meiosi, cioè il locus si eredita nella maniera canonica e la sua espressione che non lo è: posso ereditare il locus, ma non il fenotipo corrispondente. (ricordate quel bel pedigree in cui si chiariva perché salta le generazioni? se no andate a vederlo).

In realtà, sono note da molti anni alcune eccezioni al principio della equivalenza funzionale degli incroci reciproci, ma in generale esse sono sempre state fatte rientrare nell'una o nell'altra di due categorie.

☛ Caratteri legati ai geni localizzati sui cromosomi sessuali, X e Y. Le femmine dei mammiferi hanno due cromosomi sessuali X in tutti i nuclei cellulari, mentre nei maschi questi cromosomi sono diversi: X e Y. La trasmissione ereditaria e la manifestazione del carattere legato al sesso dipende dal sesso della prole, ma non direttamente dal sesso del genitore che presenta quel carattere.

☛ Caratteri controllati da geni situati al di fuori del nucleo cellulare. Alcuni organelli subcellulari (i mitocondri nelle cellule animali, e i mitocondri e i cloroplasti nelle cellule vegetali) possiedono una propria informazione genetica;

poiché vengono trasmessi di generazione in generazione col citoplasma della cellula uovo i loro geni vengono ereditati esclusivamente per via materna.

L' imprinting genomico, che costituisce il terzo tipo di eccezione al principio dell' equivalenza degli incroci reciproci (e quello scoperto più di recente), differisce nettamente dagli esempi riportati in precedenza. I caratteri che esso influenza non sono necessariamente determinati da geni localizzati sui cromosomi sessuali (anche se possono esserlo) e neppure sono associati a organelli ereditati per via materna. Le eccezioni legate al sesso e agli organelli materni si basano su un ineguale contributo genetico da parte di ciascun genitore. Per contro, a causa dell' imprinting genomico, anche se i genitori trasmettono alla prole geni assolutamente identici, gli effetti di questi geni non saranno uguali se sarà stato esercitato su di essi un imprinting diverso.

## Quando avviene l' imprinting?

L' imprinting è un processo che può modificare la sua forma da una generazione alla successiva; vale a dire che non è una mutazione permanente del DNA, ma piuttosto un' alterazione temporanea della funzione di una parte del DNA (sebbene duri per tutta la vita). La differenza funzionale fra il genoma di origine materna e quello di origine paterna, deve possedere una base molecolare ben stabilita. Il meccanismo di imprinting implica:

- ☞ abolizione di ogni imprinting precedente;
- ☞ nuove modificazioni del genoma parentale nelle cellule germinali di ciascun sesso;
- ☞ nuova etichettatura del cromosoma come paterno o come materno (ciò potrebbe avvenire nello stesso momento in cui avvengono delle nuove modificazioni del genoma);
- ☞ l'espressione fenotipica diversa tessuto-specifica del nuovo imprinting nella prole.

## Come avviene l' imprinting?

Il lavoro compiuto sui topi transgenici suggerisce che l' espressione differenziale del transgene imprintato sia associata alla metilazione. Le modifiche del DNA attraverso la metilazione potrebbero fornire una modalità per determinare se un particolare allele di un gene sia in un certo momento inattivo. In generale, la metilazione sembra essere un fenomeno secondario nella regolazione dei geni, e potrebbe essere secondario anche in questo caso.

## Effetti dell' imprinting.

Gli effetti dell' imprinting appaiono in stadi precoci ed esplicano la loro azione sulla crescita e sul comportamento. Anche gli incroci tra specie diverse suggeriscono che l' imprinting possa avere effetti sulla crescita di diverse aree del corpo; basti pensare che nell' incrocio tra cavallo ed asino si osservano chiare differenze a seconda se il cavallo è il padre ( mulo ) o la madre (bardotto).

## Espressione fenotipica delle deficienze cromosomiche nell'uomo in relazione a sindrome specifiche

La Sindrome di Prader-Willi,(cfr nel capitolo dedicato), è dovuta ad una delezione del cromosoma 15q11-13. E' stato determinato che il cromosoma 15 deleto è derivato dal padre in quasi tutti, se non tutti, i casi osservati. E' stato dimostrato che in parecchi casi di Prader-Willi in cui non è possibile dimostrare una delezione, entrambi i cromosomi 15 sono stati ereditati dalla madre. Questi dati suggeriscono che è la mancanza del cromosoma 15 paterno (o almeno della parte critica della regione 15q11-13 ) a causare il fenotipo della Prader-Willi.

Una situazione analoga e' stata riscontrata in pazienti affetti da Sindrome di Angelman. La Sindrome di Angelman (cfr nel capitolo dedicato). La metà circa dei pazienti ha delezioni evidenziabili citogeneticamente del cromosoma 15q11-13, simili a quelle osservate nella sindrome di Prader-Willi. Tuttavia, nella sindrome di Angelman, le delezioni coinvolgono il cromosoma 15 ereditato dalla madre.

E' sorprendente che due malattie con quadri clinici diversi possano essere collegate ad un imprinting differenziale di regioni genomiche localizzate sullo stesso cromosoma.: la sindrome di Prader-Willi e quella di Angelman non si possono spiegare facilmente come facce opposte di una stessa medaglia, causate da un eccesso o da una carenza degli stessi prodotti genici. Infatti le due sindromi non sono dovute a mutazioni dello stesso locus, ma a mutazioni di geni diversi fisicamente associati che subiscono un imprinting diverso. Lo studio di questi mutanti ha permesso di individuare una regione definita centro di imprinting sul cromosoma 15 (vedi Genetica II)

### **Conservazione dei segmenti imprintati?**

Esperimenti genetici effettuati con il topo hanno aiutato a stabilire una mappa delle regioni del cromosoma imprintato. Potrebbe essere che solo un piccolo numero di geni all' interno di ciascun segmento sia in realtà soggetto ad imprinting. Si pone la questione, nei topi e negli uomini, se ci sia conservazione delle regioni imprintate oppure no. I confronti sono basati sulle recenti relazioni a proposito della omologia o della sintenia fra cromosomi umani e murini. Tali attribuzioni sono fin troppo abbozzate, tuttavia rilevano una reale tendenza dei loci delle malattie imprintate a sovrapporsi con i segmenti imprintati di quattro o cinque cromosomi murini, che si sa essere imprintati. Non possono essere dedotte conclusioni sulla base delle comparazioni, tuttavia queste suggeriscono che veramente possa esistere una conservazione dei segmenti imprintati tra i mammiferi.

## Prader-Willi (PWS)

### Cosa e' la Sindrome di Prader -Willi

La Sindrome di Prader-Willi e' una malattia che coinvolge principalmente il sistema nervoso provocando un certo grado di ritardo mentale, difficolta' di linguaggio e disturbi comportamentali. Alla nascita e' presente ipotonia, difficolta' a nutrirsi e letargia. Durante l'infanzia si sviluppa un iperfagia: impulso incontrollato a mangiare e atteggiamenti ossessivo compulsivi. L'aspettativa di vita di per se' non e' diminuita, i problemi vengono dall'impulso a mangiare che altera il metabolismo complessivo, portando all'obesita' con tutti i problemi collaterali. La prevalenza e' stimata essere compresa fra 1/10.000 e 1/25.000.

### Genetica di PWS

LA PWS e' causata dalla mancata espressione della regione 15q11.-13 di origine paterna. Questa regione e' sottoposta ad imprinting genomico materno (vi ricordo: significa che l'allele materno e' ipermetilato e quindi silenziato, e percio' l'unico allele che garantisce la funzione e' quello paterno).

I meccanismi che portano alla mancata espressione dell'allele paterno sono:

- nel ~75% anomalie citogenetiche di cui ~70% delezioni fino a 4Mb anche visibili citogeneticamente
- nel ~20% Disomia uniparentale
- nel ~ 2% errori di imprinting

Pertanto il rischio di ricorrenza empirico dipende a quale gruppo appartiene il probando.

➤ Anomalie cromosomiche :Delezione se *de novo* <1% . Se originata da una traslocazione bilanciata del padre il rischio di ricorrenza e' ~5-10% come tutte le traslocazioni bilanciate. Un riarrangiamento cromosomico bilanciato *de novo* potrebbe allontanare la regione dal centro di imprinting e impedirne l'azione appropriata (il centro di imprinting agisce in cis) <1%.

➤ Disomia uniparentale < 1%, perche' la disomia uniparentale e' il risultato di un doppio errore di disgiunzione.

➤ Fra gli errori di imprinting bisogna distinguere fra quelli in cui l'errore si e' verificato a seguito di una microdelezione presente nel padre in questo caso il rischio e' 50% (uguale alla probabilita' di trasmettere un allele). Se non c'e' la microdelezione e la metilazione del cromosoma paterno e' errata (ipermetilato) viene ritenuta una *de novo* per cui il rischio e' ~1%

Quindi il rischio di ricorrenza tranne che nei rari casi di microdelezione familiare e' basso. Nonostante questo le coppie che abbiano avuto un figlio PWS richiedono la diagnosi prenatale (cfr.Diagnosi). Per quello che riguarda i fratelli gia' nati di un affetto il loro rischio e' praticamente nullo: se non hanno la sindrome vuol dire che non hanno nessuna mutazione, se alla base c'e' un malsegregazione di una traslocazione il rischio e' che siano portatori bilanciati e quindi hanno un rischio di progenie sbilanciata come un qualunque portatore di traslocazione.

Diverso il discorso per i fratelli del padre portatore. A proposito, credo vi sia chiaro perché continuo a parlare di padre portatore e non genericamente genitore. Se così non fosse ve lo rispiego così sarà più chiaro il rischio per i fratelli del padre.

Dunque: se è nato un bambino PWS vuol dire che il cromosoma deletato è quello paterno e lui è ammalato perché l'unico allele che doveva funzionare (quello materno è inattivato per l'imprinting) non funziona, se la stessa mutazione è presente nel padre, vuol dire che:

➡ Il padre è una nuova mutazione che è avvenuta sul suo cromosoma materno, altrimenti se fosse avvenuta su quello paterno anche lui sarebbe malato e non sarebbe il padre di nessuno (i soggetti PWS raramente si riproducono per la presenza di ipogonadismo, sia nei maschi che nelle femmine). Se questo è il caso e la mutazione non è presente in **sua madre** (non può essere presente nel padre perché altrimenti lui sarebbe malato), per i suoi fratelli non c'è rischio.

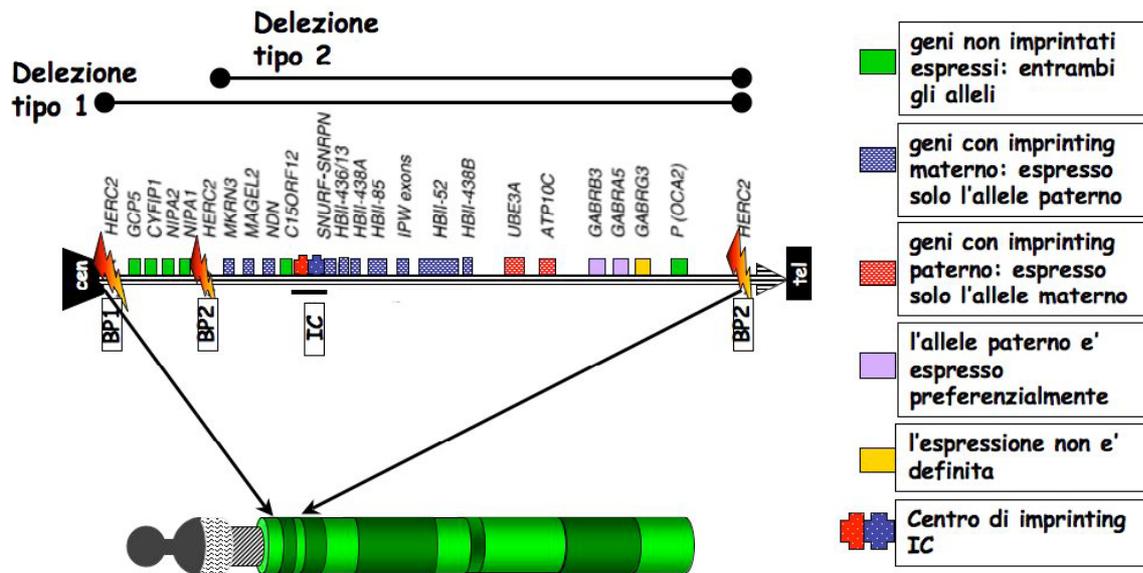
➡ La mutazione è presente nella nonna paterna allora il rischio per i suoi figli (zii del probando) di essere portatori è 50%. Se sono maschi avranno il 50% di trasmettere sia l'allele che la malattia, se sono femmine 50% di trasmettere la mutazione e 0% di avere figli malati: infatti non saranno malati neanche i figli che ricevessero la mutazione perché la madre passa il gene comunque inattivato e quindi mutato o wt non fa differenza.

Naturalmente questo è un discorso accademico perché se ho trovato la mutazione, basta cercarla negli individui a rischio. Tutto il discorso serve a chiarire quali siano i soggetti a rischio e farvi capire il meccanismo.

## Regione PWS

Non è stato trovato un gene la cui mutazione sia riconducibile alla comparsa della sindrome. Si parla perciò di regione PWS intendendo la regione minima condivisa da tutti i pazienti deletati.

La regione comprende un ventina di geni che si prestano "imprintati" in modo differenziale. Ci sono geni ipermetilati sul cromosoma materno, altri ipermetilati sul cromosoma paterno e infine geni con uguale pattern di metilazione, di alcuni di questi pur sapendo che sono trascritti si ignora la funzione. Questa situazione articolata indica un preciso meccanismo di inattivazione molto modulato. In questa stessa regione nel primo esone del gene SNURF-SNRPN risiede il centro di imprinting che gestisce questo meccanismo.



## Alterazioni della regione

In questo caso non si può parlare di alleli patogenetici, dal momento che la sindrome deriva nella quasi totalità da una delezione di un'estesa regione, o da una "anomalia cromosomica" come la disomia uniparentale.

➤ La delezione "classica" riguarda quella che viene definita Prader-Willi critical region (PWCR). Le delezioni sono di due tipi che hanno in comune il punto di rottura distale (BP3) mentre quelli prossimali sono due distanziati da ~500 Kb (figura). All'interno di questi breakpoint ci sono 4 geni non sottoposti ad imprinting ed espressi nel sistema nervoso centrale.

➤ Piccole delezioni del promotore e della regione a monte del gene SNRPN (regione in cui è compreso il centro di imprinting). Questo tipo di delezione visibile solo con le tecniche molecolari si ritrovano in quei soggetti che non hanno né la delezione canonica, né la disomia uniparentale, ma hanno un pattern di metilazione di tipo materno su entrambi i cromosomi. Questi affetti vengono considerati portatori di un difetto di imprinting.

➤ Rari soggetti hanno pattern di metilazione di tipo materno, ma non hanno nessuna delle precedenti alterazioni né variazioni di sequenza della regione del centro di imprinting. Anche questi vengono considerati portatori di un difetto di imprinting dovuto ad epimutazione cioè errore nell'apparato che porta al controllo epigenetico.

## Diagnosi

Dal momento che oltre il 70% degli affetti ha una delezione ampia, il primo livello di diagnosi è citogenetico sia cariotipo a 650 bande (cromosomi allungati) che FISH. Tenendo conto che piccole delezioni non sono comunque evidenziabili con queste tecniche.

Qualora non si evidenziasse niente si ricerca l'alterato pattern di metilazione, utilizzando sia southern che PCR. questo è diagnostico

indipendentemente dal fatto che la metilazione sia materna su entrambi i cromosomi per disomia uniparentale o errore di imprinting.

Per distinguere fra i due si ricorre allo studio dei marker polimorfici: se l'alterata metilazione deriva da una disomia uniparentale manca l'aplotipo paterno.

Vorrei sottolineare che sebbene di solito si inizia con la citogenetica, se si facesse subito la ricerca del pattern di metilazione, si confermerebbe o escluderebbe la diagnosi nel 100% dei casi di sospetta PWS. Infatti quale che sia la causa comunque il pattern di metilazione è alterato.

La diagnosi si fa per capire quale è l'origine della sindrome e escludere la pur scarsa probabilità di rischio di ricorrenza (cfr. Genetica di PWS), oltre che tranquillizzare le famiglie che dopo la nascita di un figlio PWS richiedono la diagnosi prenatale. La diagnosi prenatale si esegue con gli stessi metodi della postnatale la differenza è che si sa cosa cercare.

## Curiosità storiche

Langdon-Down (1828-1896), che per primo descrisse la sindrome che lui definì "mongolismo" e noi oggi chiamiamo Sindrome di Down in suo onore, descrisse nel 1887 quella che definì "polisarcia" (accumulo di tessuto adiposo, oggi diremo obesità) in una ragazza di 13 anni alta 1,32 m e 84 Kg di peso. Egli la seguì fino all'età di 25 anni quando riporta aver raggiunto i 94 Kg di peso e la descrive: "Le sue mani e i suoi piedi sono rimasti piccoli, e contrastano in modo evidente con le dimensioni degli arti corrispondenti. Non ha peli ascellari, e scarsi peli pubici. Non ha mai menstruato né manifesta desideri sessuali" (*'Her feet and hands remained small, and contrasted remarkably with the appendages they terminated. She had no hair in the axillae, and scarcely any on the pubis. She had never menstruated, nor did she exhibit the slightest sexual instinct.'* ***Mental Affections of Childhood and Youth. London: Churchill (pub.) 1887. Pp. 172 only.***)

Settanta anni dopo la sindrome venne descritta in dettaglio studiando 9 casi da Prader, A., Labhart, A., Willi, H. (**Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. Schweiz. Med. Wschr. 86: 1260-1261, 1956.**)

Per alcuni anni il nome della sindrome conteneva i nomi dei tre autori, ma oggi viene sempre riportata solo come Sindrome di Prader-Willi.

## Angelman (AS)

### Cosa e' la Sindrome di Angelmann

Le caratteristiche principali della sindrome di Angelman sono un grave ritardo psicomotorio, l'assenza di linguaggio o l'utilizzo di poche parole, problemi di equilibrio e movimenti scoordinati (atassia) con tremore agli arti. Altre caratteristiche comuni a tutte le persone affette sono: la tendenza a ridere in modo eccessivo e senza motivo, ipereccitabilità, iperattività, scarsa attenzione. Altri tratti frequenti (presenti in più dell' 80% dei pazienti) sono la microcefalia (testa piccola rispetto al resto del corpo, che si rende evidente dopo i 2 anni di vita, e la presenza di crisi convulsive che insorgono entro i 3 anni. Frequenti sono anche i disturbi del sonno. I bambini tendono a nascere più piccoli del normale, hanno frequentemente problemi di alimentazione, con difficoltà di suzione o rigurgito, la scoliosi può essere un problema negli adulti.

La prevalenza e' compresa fra 1/12.000 e 1/20.000. Questa forbice viene giustificata dal fatto che l'insieme dei segni clinici compaiono solo dopo alcuni anni dalla nascita e possono sovrapporsi ad altre sindromi neurologiche. La diagnostica molecolare anche se non efficiente al 100% per la natura dell' origine e' dirimente nei dubbi diagnostici.

### Genetica di AS

LA AS e' causata dalla mancata espressione della regione 15q11.-13 di origine materna. Questa regione e' sottoposta ad imprinting genomico paterno (vi ricordo: significa che l'allele paterno e' ipermetilato e quindi silenziato, e perciò l'unico allele che garantisce la funzione e' quello materno).

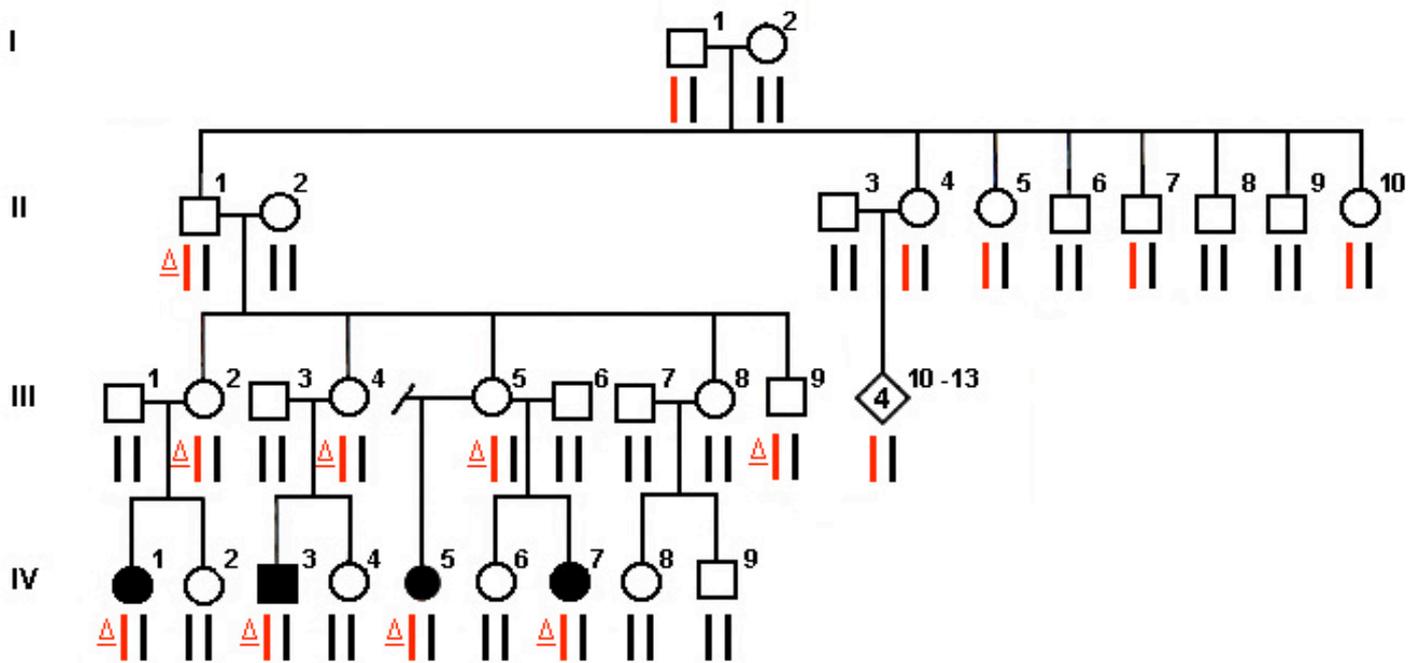
I meccanismi che portano alla mancata espressione dell'allele materno sono cinque e il rischio di ricorrenza per i fratelli ancora non nati e per i loro figli dipende da quale e' presente nell'affetto:

- **I** nel ~75% anomalie citogenetiche di cui ~70% delezioni fino a 4Mb anche visibili citogeneticamente
  - **Ia** - 4Mb del 15q11-13mat: ~70% -ereditabilità' <1%
  - **Ib**- delezioni interstiziali familiari: <1% - ereditabilità' elevata fino al 50%
- **II** nel 3-7% Disomia uniparentale paterna
  - **IIa**- UPDpat e cromosomi normali: 4%-ereditabilità' <1%
  - **IIb**- UPDpat da traslocazione:<1% - ereditabilità' >5%
- **III** nel 3% errori di imprinting
  - **IIIa**- mutazione dell'IC con delezione:0.5%- ereditabilità' 50% se la madre ha la stessa delezione
  - **IIIb**- mutazione dell'IC :~2.5%- ereditabilità' <1%
- **IV** in ~10% mutazioni nel gene UBE3A - ereditabilità' 50% se la madre e' portatrice
- **V** in~ 10% meccanismi diversi non immediatamente riconducibili alla regione 15q11-13 o al gene UBE3A in presenza di storia familiare 50%

Il rischio di ricorrenza e' legato alla presenza nella madre e nella sua famiglia della mutazione riscontrata nell'affetto. Naturalmente i fratelli gia' nati non essendo malati, non hanno nessun rischio di trasmettere la malattia.

Nel caso degli zii materni dipende se la mutazione e' *de novo* (nella quasi totalita' delle grandi inversioni) o meno. Nel caso venisse identificata la mutazione nel **nonno materno**, allora il rischio e' 50% di aver ereditato la mutazione, se donne 50% di trasmettere sia la malattia che la mutazione, se maschi 50% di trasmettere la mutazione 0% la malattia. Vi riporto il pedigree di AS familiare che chiarisce il concetto.

Naturalmente questo e' un discorso accademico perche' se ho trovato la mutazione, basta cercarla negli individui a rischio. Tutto il discorso serve a chiarire quali siano i soggetti a rischio e farvi capire il meccanismo.



Il soggetto II1 e' una nuova mutazione (microdelezione), perche' i suoi fratelli hanno ereditato dal padre lo stesso aplotipo (identificato con i polimorfismi) e non hanno la delezione. Le sue 3 figlie portatrici hanno avuto figli AS, e la mutazione morira' con loro. Invece il soggetto III9 potra' trasmetterla senza danno ai propri figli: se saranno femmine la mutazione dopo un'altra generazione scomparira' se saranno maschi si continuera'.

Nel caso del tipo IV mutazioni puntiformi di UBE3A ci troviamo di fronte ad un fenotipo mendeliano classico, in cui una sequenza e' mutata e il gene non si puo' piu' esprimere. Nel caso di UBE3A il problema e' che se il wt e' paterno non si esprime perche' e' inattivato, ed ecco che compare la malattia. Naturalmente se il wt e' materno la malattia non compare, come nel caso delle microdelezioni, infatti se il gene e' mutato sul cromosoma paterno non funzionerebbe comunque.

Nel 2001 (Schulze et al 2001) e' stato riportato un caso di una donna PWS (in cui la fertilita' e' vicino allo 0) che aveva ereditato la delezione canonica da suo padre, e ha avuto un figlio AS con la stessa delezione. Come mai?

Dunque lei era PWS, (normalmente non hanno figli sia per la infertilita' legata all'ipogonadismo che per il ritardo mentale, tuttavia in questo caso ha avuto un figlio) aveva la delezione che coinvolgeva anche UBE3A; pero' UBE3A nel padre e' spento comunque, quindi deleto o no e' come non averlo. Quando lei ha concepito il figlio gli ha passato la regione PWS deleta che comunque sarebbe stata inattiva e UBE3A deleta che invece avrebbe dovuto funzionare: ecco perche' AS.

## Il gene UBE3A

Mutazioni puntiformi di UBE3A di origine materna provocano la sindrome di Angelman e pertanto puo' essere considerato il principale gene coinvolto nella genesi della sindrome. La sua struttura genomica e' complessa infatti oltre agli esoni (11) che codificano per la proteina (875aaa, 100,6 kDa) che e' un'ubiquitina: E6-AP ubiquitin-protein ligasi (anche denominata ubiquitin ligasi 3A) ha almeno altri 6 esoni a monte del sito di inizio della ORF della proteina. La regione genomica e' nel suo insieme 120 kb. Ha circa 9 trascritti nell'adulto e due nel feto che si traducono in 3 isoforme di diversa lunghezza.

UBE3A inizialmente non era stato preso in considerazione come gene coinvolto in AS perche' il suo pattern di metilazione non e' diverso nei due alleli, tuttavia attraverso la RT-PCR e i polimorfismi dell'RNA eseguiti su cellule fetali e' stato dimostrato che i due alleli sono entrambi espressi in tutti i tessuti tranne che nel cervello dove e' espresso solo il materno in accordo con quanto trovato nel topo.

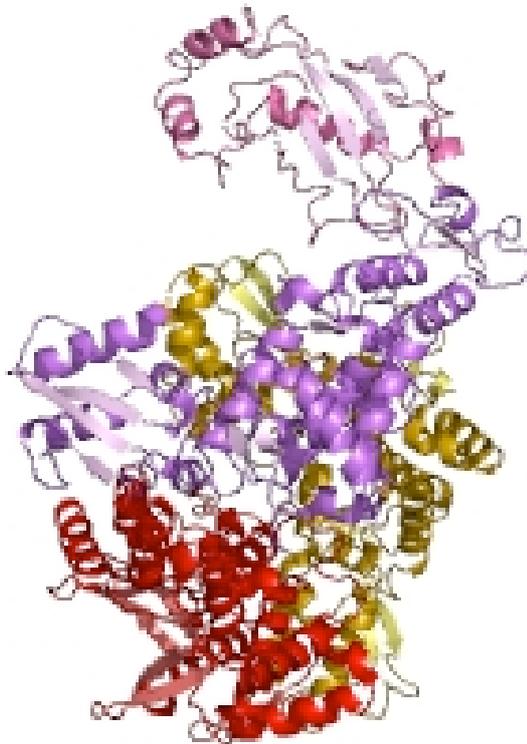
Lo stesso comportamento e' stato dimostrato per un gene adiacente a UBE3A: ATP10C, nessuna differenza di metilazione ma espressione solo dell'allele materno nel cervello. E' stato dimostrato che esiste un trascritto antisenso che inizia dal centro di imprinting SNURF-SRNPN e termina circa 460 kb piu' a valle almeno fino all'estremita' 5' di UBE3A. Si ritiene che questo trascritto blocchi l'espressione dell'allele paterno. Chi fosse interessato ad approfondire questo argomento trova la bibliografia sul PDF corrispondente.

La proteina E6-AP, prodotta dal gene UBE3A, e' stata inizialmente identificata per la sua capacita' di interagire con la proteina E6 del papilloma virus umano, per indurre la ubiquitinazione e la degradazione di p53. L'ubiquitinazione coinvolge 4 classi di proteine che agiscono insieme per "marcare" le proteine destinate alla degradazione.

La proteina E6-AP fa parte della classe E3: e' la proteina accettrice dell'ubiquitina da parte degli enzimi E2 e probabilmente i suoi target sono numerosi. Il dominio coinvolto e' il C-terminale. L'N-terminale sembrerebbe avere attivita' regolatoria della trascrizione dei recettori degli ormoni steroidei. In realta' questo non sembra entrarci molto con i danni neurologici di AS. Nei fatti anche utilizzando il modello murino non si e' riusciti a chiarire perche' un difetto nel processo di ubiquitinizzazione nel cervello provochi quel tipo di patologia.

Topi con UPDpat del cromosoma 7 e con delezioni che coinvolgono *p* e *Ube3a* sono considerati un modello per AS. Il topo con mutazione silente ha una serie di alterazioni del sistema nervoso centrale con particolare coinvolgimento della LPT: Long Term Potentiation fenomeno elettrofisiologico attraverso il quale la stimolazione degli assoni presinaptici aumenta le connessioni con i neuroni postsinaptici. viene considerato il principale artefice dell'apprendimento e della

memoria a lungo termine.



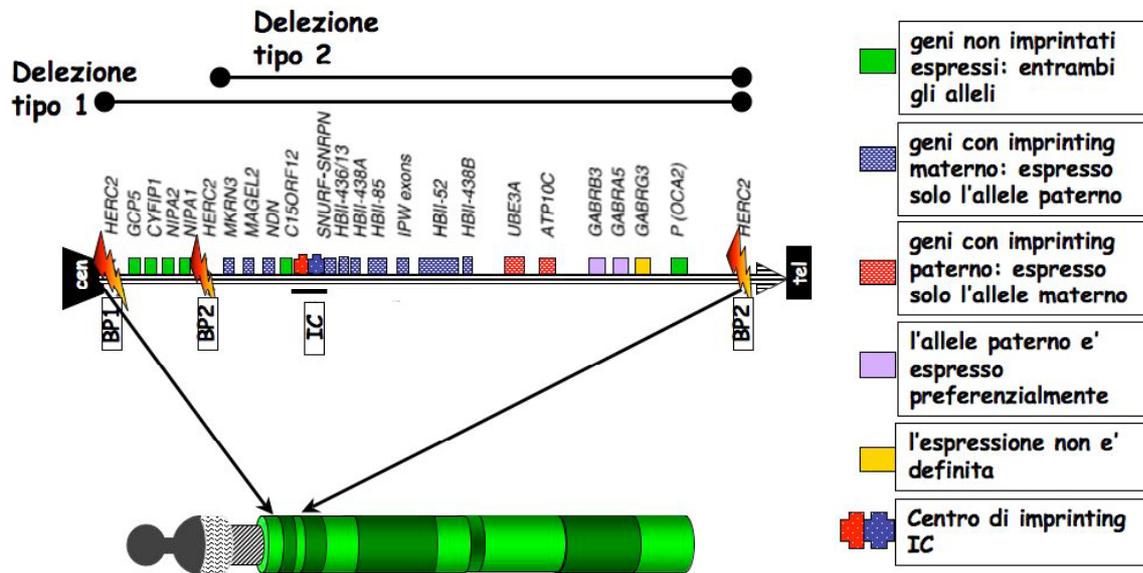
## Alterazioni della regione

Riferendosi alle cinque classi di meccanismi all'origine di AS:

- Classe I :Delezioni in 15q11.2–q13 comprese fra 3–5Mb. Costituiscono circa il 75% delle mutazioni. Le delezioni sono di due tipi che hanno in comune il punto di rottura distale (BP3) mentre quelli prossimali sono due distanziati da ~500 Kb (figura). All'interno di questi breakpoint ci sono 4 geni non sottoposti ad imprinting ed espressi nel sistema nervoso centrale. (cfr.Figura )
- Classe II : UPD paterna costituiscono il 3–7% delle mutazioni
- Classe III : Errori nell'imprinting 3% delle mutazioni. Sono descritte piccole delezioni nel centro di imprinting. La regione minima di overlap per AS e' stata identificata in 880 kb e sono state descritte microdelezioni comprese fra 6 e 200 kb. Queste mutazioni provocano il mancato reset dell'imprinting paterno durante la gametogenesi.
- Classe IV: Mutazioni di UBE3A. Costituiscono circa il 10% delle mutazioni. In questo caso la mutazione coinvolge direttamente la sequenza del gene e la metilazione non e' coinvolta. I soggetti AS di questa classe presentano il pattern di metilazione corretto, e UBE3A materno viene nella

maggioranza dei casi trascritto generando proteine troncate. In alcuni casi in cui la mutazione e' missenso o nel promotore (riducendo ma non abolendo l'attivita') il fenotipo presenta solo alcuni segni della sindrome.

- ☛ Classe V: circa 10–20% .Soggetti con AS, ma con normale metilazione, assenza di UPD , nessuna delezione del centro di imprinting, nessuna mutazione in UBE3A. Si ritiene che potrebbero essere originati da mutazioni di altri geni coinvolti nel processo di ubiquitinizzazione nel cervello.



## Diagnosi

Dal momento che oltre il 70% degli affetti ha una delezione ampia, il primo livello di diagnosi e' citogenetico sia cariotipo a 650 bande (cromosomi allungati) che FISH. Tenendo conto che piccole delezioni non sono comunque evidenziabili con queste tecniche.

La diagnosi si fa per capire quale e' l'origine della sindrome e escludere la probabilita' di rischio di ricorrenza nei casi in cui questo rischio sia elevato (cfr. Genetica di AS), oltre che tranquillizzare le famiglie che dopo la nascita di un figlio AS richiedono la diagnosi prenatale. La diagnosi prenatale si esegue con gli stessi metodi della postnatale la differenza e' che si sa cosa cercare.

Nel caso di AS la ricerca del pattern di metilazione non serve nella classe IV, tuttavia in questo caso la ricerca della mutazione nell'affetto permette di fare una consulenza appropriata.

## Curiosita' storiche

La prima descrizione della sindrome risale al 1965, quando il pediatra inglese Harry Angelman descrisse tre bambini con ritardo psico-intellettuale, crisi convulsive, atassia con movimenti a scatto, assenza di linguaggio e una postura simile, che ricordava quello di una bambolina sorridente ("happy puppet").

**Angelman, H. (1965). "Puppet" children: A report of three cases.**

**Developmental Medicine and Child Neurology, 7, 681–688.**

Racconta Harry Angelman che tre suoi piccoli pazienti presentavano caratteristiche particolari che lo incuriosirono. Il loro quadro clinico era sostanzialmente simile ed egli ebbe il forte presentimento che fossero affetti dalla stessa patologia, sconosciuta perché mai descritta in precedenza. In seguito, visitando il museo di Castelvecchio a Verona, il medico si trovò di fronte una tela dell'artista Giovanni Francesco Caroto (pittore del Cinquecento), che raffigurava un giovane sorridente con in mano il disegno di una bambola (o di un burattino). Quel sorridente Ritratto di fanciullo con disegno gli riportò alla mente quei tre ragazzi, che a loro volta ridevano moltissimo, oltre ad avere movimenti a scatti degli arti e del tronco. Si decise dunque a descriverli nella letteratura medica con il saggio *Puppet Children* (letteralmente "ragazzi burattino"). Solo dopo molti anni di ricerche si scoprì che nel mondo esistevano parecchi di questi pazienti, affetti da quella che venne da allora chiamata sindrome di Angelman.

Williams e Frias (1982), suggerirono di chiamare la sindrome con il nome del suo scopritore e di abolire la denominazione "burattino felice (happy puppet)" perché il termine sembrava derisorio e denigratorio nei confronti dei pazienti e delle loro famiglie.

## 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.

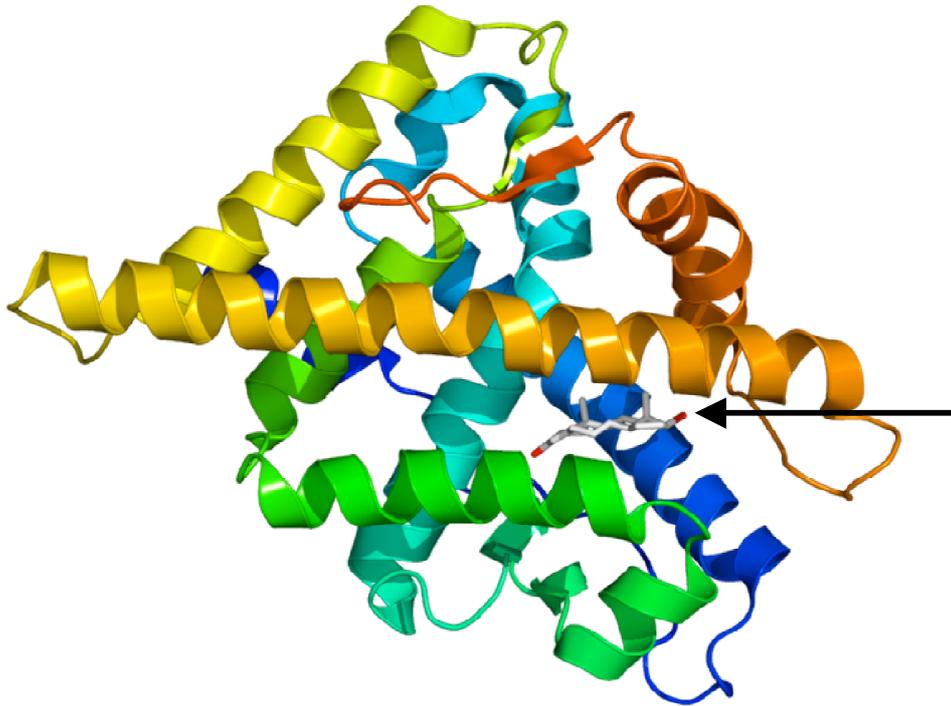
### **Il gene AR (Androgen Receptor)**

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 ceco, sono amenorroiche alla puberta' e hanno scarso sviluppo pilifero, possono presentare gia' alla nascita ernie inguinali o masserelle nelle grandi labbra, che si rivelano essere i testicoli ritenuti nell'addome. Nei maschi i testicoli alla nascita o subito dopo scendo lungo il canale inguinale e si posizionano nello scroto. Questi soggetti essendo femmine non hanno uno scroto e quindi i testicoli rimangono nel canale.

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

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

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

## Genetica dell'AIS

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

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

### Genitori dell'affetta

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

Per quello che riguarda la madre:

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

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

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

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

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

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

- ✓ La mutazione potrebbe essere insorta nell'uovo o nello spermatozoo, la mutazione che le ha dato origine puo' anche essere avvenuta nello spermatozoo perche' la madre di una affetta ha due cromosomi X e quindi non risente della mutazione. In questo caso le sue sorelle e parenti femmine non dovrebbero essere a rischio, a meno che non ci fosse un mosaicismo germinale nella generazione precedente (vedi oltre)

- ✓ La mutazione e' insorta allo stadio embrionale: se e' stata evidenziata nel DNA estratto dai linfociti vuol dire che comunque e' diffusa e potrebbe esserci piu' di un oocita portatore, ai fini del rischio per altre figlie in fondo non cambia nulla la madre e' comunque portatrice, per le sorelle se fosse vera questa ipotesi il rischio sarebbe pari a zero.

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

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

Per quello che riguarda i fratelli e le sorelle della proposita dipende dallo stato di portatrice o meno della madre. Bisogna distinguere tra quelli gia' nati e in eta' prepubere, quelli che hanno gia' passato la puberta' e quelli che ancora devono nascere. Per quelli nati e prepuberi i maschi sono sicuramente sani, le femmine potrebbero essere affette se 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:



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 piu' di una volta ho sottolineato che quello che conta e' l'effetto della mutazione sulla funzione!

## Diagnosi

La diagnosi clinica risponde a precisi protocolli diagnostici che permette di distinguere le tre forme e questo non e' competenza del corso. Chi fosse interessato ai dettagli clinici puo' trovarli sul sito [www.genetests.org](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 illustrerò brevemente più' 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 capacità' di legame del recettore? Le cause di una risposta non conclusiva sono più' di una:

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

➤ Gene AR normale, ma 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 più' 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 differenza è che l'asportazione delle gonadi si esegue di solito prima della pubertà, per evitare un ingrossamento del clitoride che creerebbe problemi psicologici aggiuntivi.

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

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

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

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

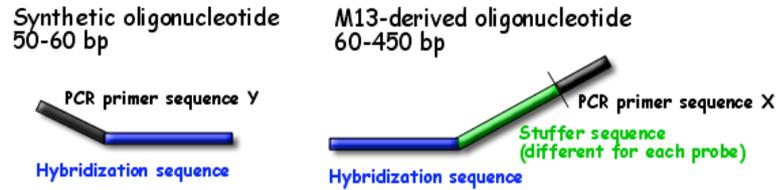
(Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;30(12)).

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 e' che disegnare i probes per la diagnostica non e' conveniente. Esistono in commercio Kit gia' testati e pronti per la diagnostica per esempio per CFTR, DMD etc...

1) Creazione dei probe



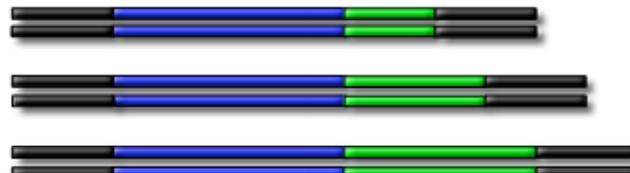
2) Ibridazione



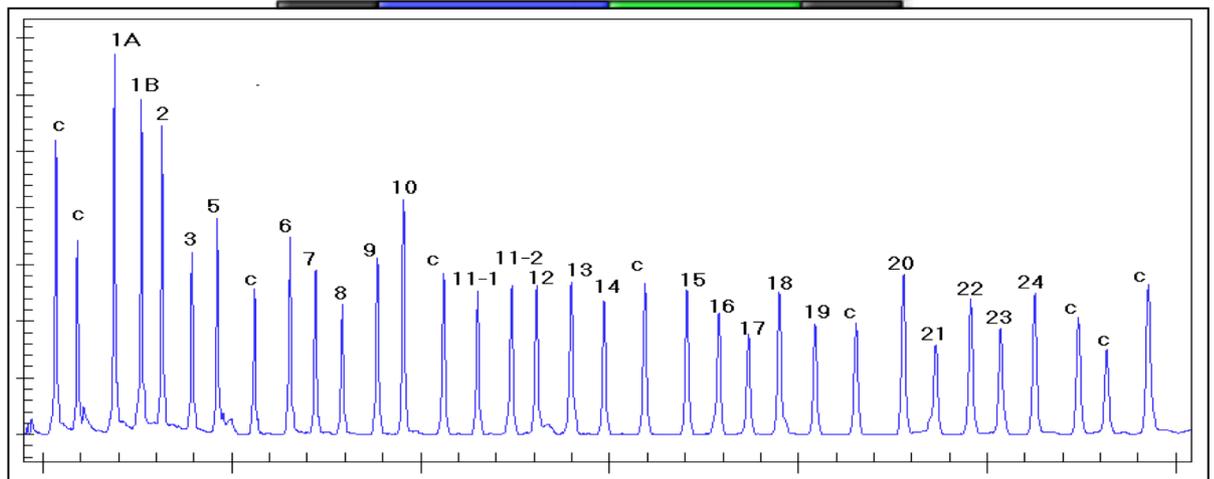
3) Ligation



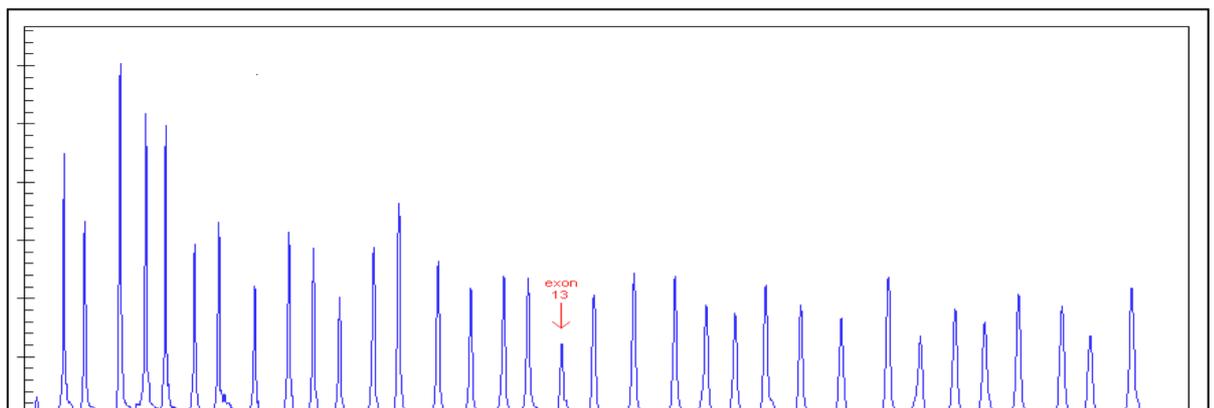
4) Amplificazione



Cont

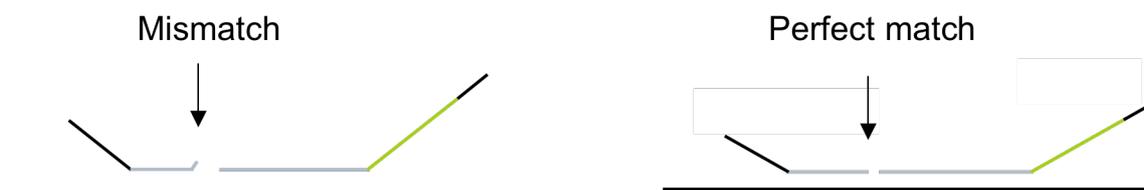


malato

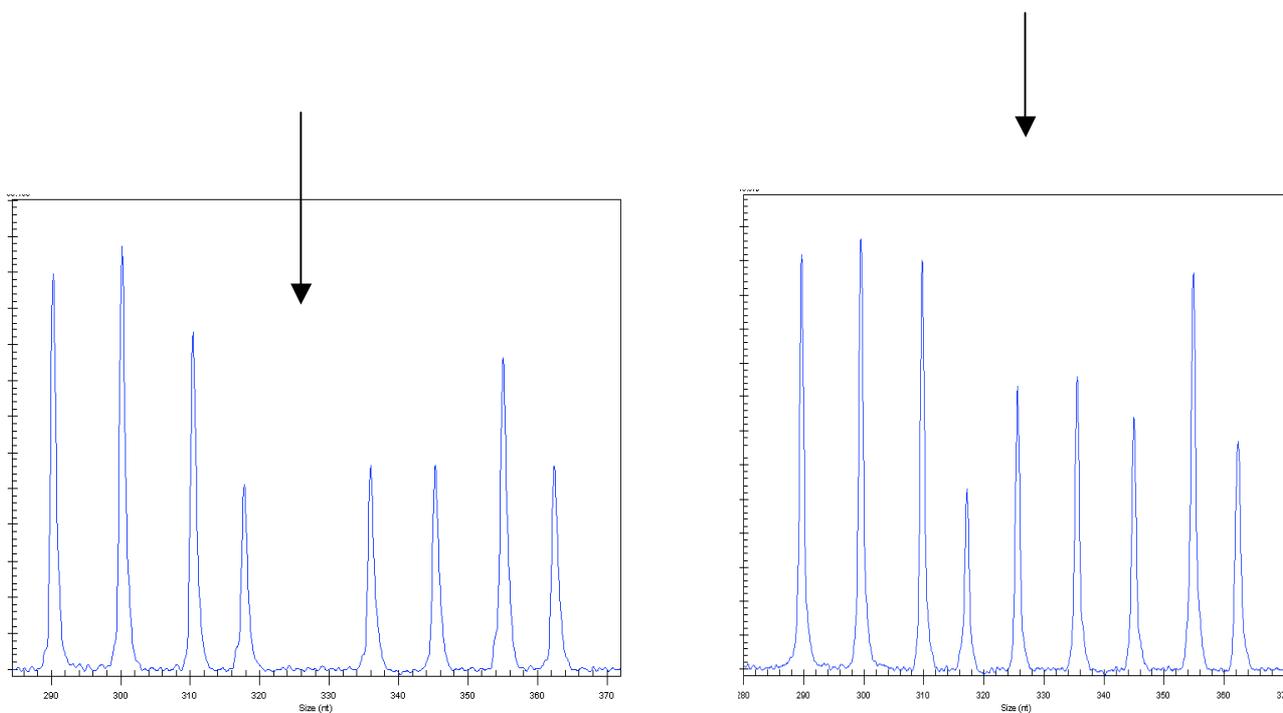


L'altezza diversa nel picco indica una diversa quantità di copie dell'esone 13 (gene qualunque)

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 puo' assumere che le madri siano sempre portatrici: 50% di probabilita' di aver ereditato l'allele o di ereditarlo se ancora devono nascere (improbabile vista l'eta' di insorgenza).

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

Dal momento che gli affetti possono riprodursi anche se con difficolta': 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 piu' corti, gli asiatici quelli piu' lunghi, i caucasici lunghezze intermedie. Studi epidemiologici hanno mostrato che gli alleli piu' corti sono correlati con cancro alla prostata piu' aggressivi.

L'espansione delle triplette CAG oltre le 34 nella regione codificante dell'esone 1 del gene AR e' l'unico tipo di mutazione ritrovata nella SBMA. Alleli di 37 ripetizioni sono considerati avere effetto meno penetrante, nel senso che l'eta' di insorgenza e' 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 e' ampia: oscilla fra 1 tripletta aggiuntiva a 3 riducendo sensibilmente il fenomeno dell'anticipazione (ricordate che cosa e'? 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 e' la sintesi di un dominio N-terminale piu' lungo per la presenza di una coda di poliglutamina. Questa serie di poliglutamine probabilmente altera la conformazione della proteina e provoca neurodegenerazione, come e perche' questo avvenga non e' chiaro. La genesi del danno neurologico legato alla poliglutamina non e' chiara neanche nelle altre patologie legate allo stesso fenomeno: SBMA appartiene infatti alle cosiddette malattie da espansione di poliglutamine, fra queste malattie non esiste similarita' nelle proteine alterate per quello che riguarda la funzione o la localizzazione cellulare, quello che le accomuna e' il tipo di mutazione e la neurodegenerazione che per altro e' variabile fra le diverse malattie.

Un'ipotesi per quello che riguarda AR suggerisce che la coda di poliglutamine subisca una digestione dando origine ad un peptide che contiene la serie di poliglutamine, questo peptide permane nel nucleo del neurone formando delle inclusioni, la sua permanenza nel nucleo potrebbe causare la

patologia interagendo con antri co-attivatori trascrizionali come le proteine CREB (cAMP response element-binding) che sono importanti per la sopravvivenza del neurone.

### **Relazione genotipo fenotipo**

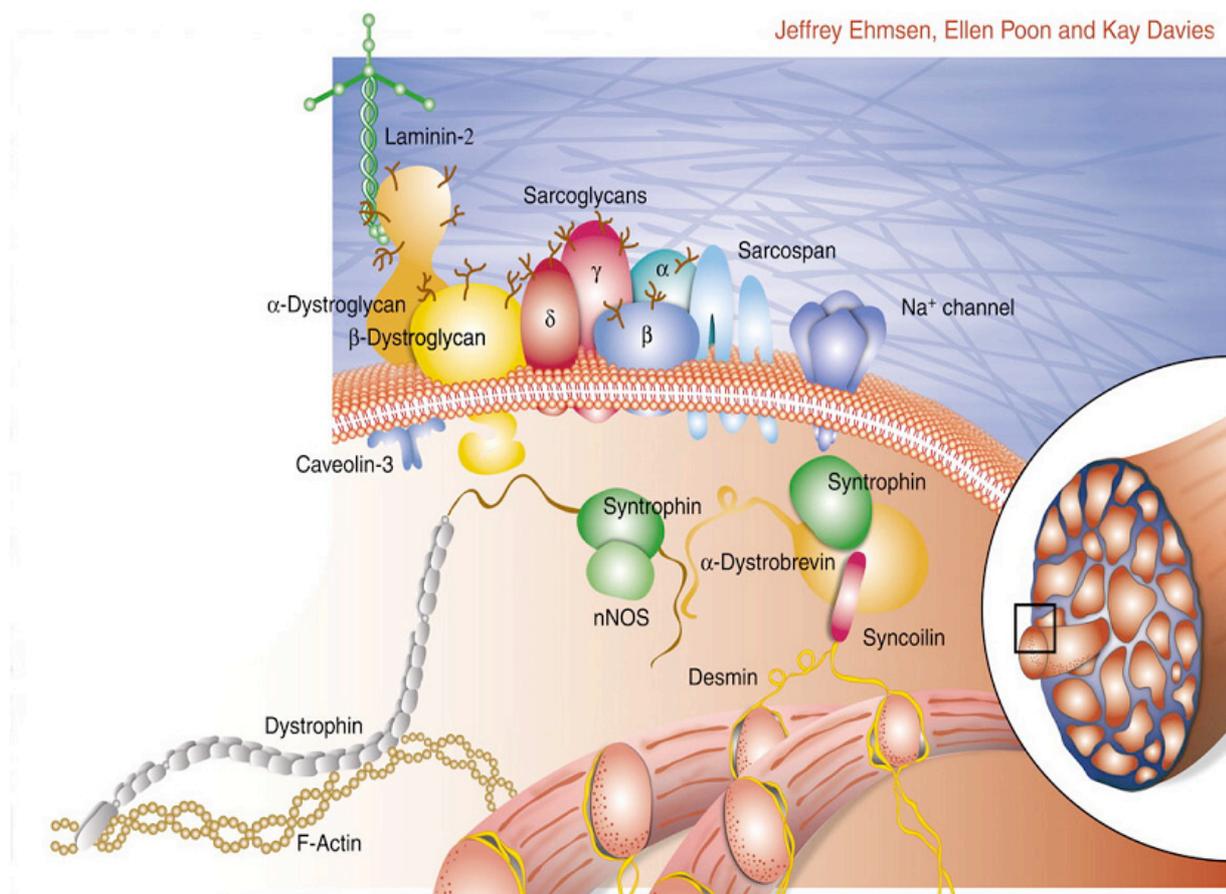
C'è una relazione fra lunghezza del repeat e gravità della malattia: in generale l'espansione è inversamente proporzionale all'età di insorgenza e alla gravità dell'atrofia. Tuttavia un nesso stringente manca perché ci sono dati riportati da cui si ricava che solo il 60% della variabilità clinica riscontrata 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.

## Distrofie muscolari



il sarcolemma e le relazioni fra alcune delle proteine

### **Cosa sono le distrofie muscolari**

Con questo termine vengono definite le miopatie di origine genetica la cui evoluzione è progressiva. Le distrofie muscolari costituiscono il gruppo più significativo quanto a numero, delle affezioni muscolari primitive, e quello con le conseguenze funzionali o vitali più gravi. (Primitiva è definita una patologia del muscolo in cui questo si altera in quanto tale, come conseguenza delle alterazioni delle molecole che garantiscono l'integrità e la funzionalità del tessuto muscolare, tutti gli altri eventi della malattia sono conseguenze dell'alterazione muscolare primitiva.) Sul piano clinico la compromissione muscolare si traduce in una diminuzione di forza, a volte con una modifica del volume, della consistenza, dell'estensibilità e della contrattilità del muscolo (amiotrofia o al contrario ipertrofia). Le conseguenze funzionali variano a seconda della gravità, della topografia e dell'evoluzione della malattia. Il tipo di deficit motorio è specifico per ogni distrofia. Alcune toccano in maniera diffusa l'insieme della muscolatura, altre ne colpiscono selettivamente determinate aree. vedi figura

Sotto questa definizione sono raggruppate malattie che si trasmettono sia come autosomiche dominanti e recessive che X linked recessive (di nuovo l'eterogeneità genetica che è ovvia dal momento che, quando si parla genericamente di distrofie siamo su un piano clinico troppo generico). Alle X linked appartengono le distrofinopatie legate a mutazioni del gene Duchenne, una forma della distrofia di Emery-Dreifuss (di cui parleremo più oltre).



## **Distrofie dei cingoli (Limb-Girdle Muscular Dystrophy-LGMD)**

### **Cosa sono le distrofie dei cingoli**

In questo gruppo vengono raggruppate numerose patologie a trasmissione autosomica sia dominante LGMD1 che recessiva LGMD2. Non di tutte si conosce il gene coinvolto e/o la proteina interessata solo 16 (6 LGMD1 e 10 LGMD2) sono identificabili con il test molecolare.

Dal punto di vista clinico si presentano con debolezza e deterioramento della muscolatura degli arti compresa la muscolatura dei plessi più prossimali (spalle, anche), la gravità, la progressione e l'età di insorgenza sono legate al gene coinvolto.

La prevalenza non è nota, soprattutto per l'eterogeneità che caratterizza questo gruppo di malattie e la mancanza di una specificità diagnostica clinica fra le diverse forme. Una stima è stata fatta nel 2005 per le sarcoglicanopatie (LGMD2 C>F) da cui risulta una prevalenza di circa 1/170.000 con un frequenza dei portatori di circa 1/200 (non pochi). Solo la diagnosi molecolare consente di distinguere fra le diverse forme anche se non è semplice.

Infatti è richiesta una storia clinica accurata, una altrettanto accurata storia familiare e una serie di test biochimici su siero e immunoistochimici dopo biopsia muscolare. L'insieme di informazioni che si ricava indirizza verso un gene o un numero ristretto di geni escludendo altre forme di distrofia e indirizzando la ricerca delle mutazioni, quando possibile. L'identificazione della mutazione è indispensabile per eventuali diagnosi prenatale.

Esaminiamo prima le recessive LGMD2, da notare che in alcune di loro esiste un chiaro effetto del fondatore.

### **Genetica delle LGDM2**

Essendo autosomiche recessive entrambi i genitori del caso indice sono portatori sani ed 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 alcune forme sono ad insorgenza relativamente tardiva alcuni fratelli di forme dell'adulto, potrebbero anche essere affetti, se troppo piccoli per manifestare il danno. La diagnosi molecolare, quando possibile, dissipa i dubbi in merito.

Dal momento che gli affetti possono riprodursi, il rischio di avere un figlio affetto è legato al genotipo del partner: 0% se non è portatore, se lo è 50% e 50% figli portatori, mentre sono tutti portatori, nel caso di partner wt/wt. 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.

% affetti con AR LGMD	Malattia	Etnie con effetto del fondatore	Nome del locus	Gene	Mappa	Prodotto
68% di quelli con insorgenza infantile ~10% con insorgenza adulta	$\alpha$ -sarcoglicanopatia	=	LGMD 2D	SGCA	17q12-21	$\alpha$ -sarcoglicano
	$\beta$ -sarcoglicanopatia	Amish	LGMD 2E	SGCB	4q12	$\beta$ -sarcoglicano
	$\gamma$ -sarcoglicanopatia	Nord africani Zingari	LGMD 2C	SGCG	13q12	$\gamma$ -sarcoglicano
	$\delta$ -sarcoglicanopatia	Brasiliani	LGMD 2F	SGCD	5q33	$\delta$ -sarcoglicano
~10-80%	Calpainopatia	Amish, isola reunion Baschi, Turchi	LGMD 2A	CAPN3	15q15-q21	Calpaina-3
~10%	Disferlinopatia	Ebrei Libanesi Giapponesi	LGMD 2B	DYSF	2p13	Disferlina
3%	Telethoninopatia	Italiani(?)	LGMD 2G	TCAP	17q12	Telethonina
n.d.	LGMD2H	Utteriti di Manitoba (canada)	LGMD 2H	TRIM 32	9q31-34	Proteina32
6%	LGMD2I	??	LGMD 2I	FRKP	19q13	Proteina Fukutin-related
n.d	LGMD2J	Finlandesi	LGMD 2J	TTN	2q24	Titina
n.d	LGMD2K	Turchi	LGMD 2K	PONT1	9q34	protein O-mannosyltransferase-1

### **Sarcoglicanopatie LGMD C>F**

I sarcoglicani costituiscono un complesso tetramerico e, pur non legando direttamente la distrofina, fanno parte del complesso distrofina-proteine associate (DGC), i sarcoglicani insieme stabilizzano la membrana durante i continui cicli di allungamento e accorciamento. I quattro geni sono distinti, ma presentano un'elevata omologia, al punto che gamma e delta con il 55% di identità e il 70% di similarità sono distinguibili solo tramite IEF/SDS-PAGE. Hanno una struttura comune composta dalla regione extracellulare molto estesa, in contrasto con il dominio citoplasmatico più ridotto e dominio transmembrana. Le manifestazioni cliniche sono simili e presentano un ampio spettro di espressione, il che non stupisce visto la stretta relazione funzionale che esiste fra le proteine del complesso.

La relazione genotipo fenotipo è stata stabilita da alcuni studi che si concentrano sulle etnie in cui è presente l'effetto del fondatore e che pertanto risultano omogenee dal punto di vista genetico e in cui è presente una mutazione comune e gli affetti sono veri omozigoti..

Nelle popolazione non imbred, cioè quelle senza effetto del fondatore, la frequenza relativa del coinvolgimento dei 4 geni identificati nell'ambito delle sarcoglicanopatie è:  $\alpha \gg \beta \gg \gamma \gg \delta$  in un rapporto 8:4:2:1. In queste popolazioni non c'è una mutazione comune eccetto per un allele della forma  $\alpha$ : transizione CGC>TGC nell'esone 3 che produce una sostituzione  $\text{arg77} \rightarrow \text{cys}$  (R77C) e che costituisce un terzo degli alleli patogenetici di questa forma.

Proteina	Gene
$\alpha$ -sarcoglicano 50 kDa, 387 aa	SGCA 10 esoni, 9.9 kb
$\beta$ -sarcoglicano 43 kDa 318 aa	SGCB 6 esoni, 12.2 kb
$\gamma$ -sarcoglicano 35 kb 291 aa	SGCG 8 esoni 144,21 kb
$\delta$ -sarcoglicano 35 kDa 290 aa	SGCD 9 esoni 432,38 kb

### **Calpainopatia LGMD2A**

La Calpaina 3 è una proteina enzimatica del peso di circa 94kDa e composta da 821aa anche identificata come p94, è un membro della famiglia delle proteasi neutre attivata dagli ioni  $\text{Ca}^{++}$ . Presenta 4 domini: il primo ha funzioni regolatrici, il secondo funzioni proteolitiche, il terzo presenta un dominio C2-like e il quarto lega gli ioni  $\text{Ca}^{++}$ . È espressa prevalentemente nel muscolo scheletrico e si localizza sia nel nucleo che nel citoplasma, dove si lega alla proteina titina (cfr.LGMD2J) e alla filamina C. Il suo ruolo non è ben definito, ma si ritiene che sia coinvolta nel processamento di proteine coinvolte nella trasmissione del segnale, di fattori di trascrizione, e di proteine del citoscheletro, cioè in quel processo che viene definito di rimodellamento del sarcomero.

Il gene che codifica per questa proteina è CAPN3, è lungo 64,21 kb, è composto da 28 esoni, che hanno la caratteristica di essere molto corti: 10 esoni sono lunghi fra 58 e 86 pb, gli esoni 12, 14, e 15 sono lunghi 12, 37 e 18 pb rispettivamente, gli introni viceversa sono molto lunghi: l'introne 1 è lungo 24.3 kb occupando quasi la metà del gene.

### **Alleli**

Sono state descritte più 130 mutazioni patogenetiche, la maggior parte delle quali private, sono distribuite lungo tutta la sequenza anche se pochi esoni sono più frequentemente coinvolti. La maggior parte delle mutazioni sono sostituzioni: circa il 70% sono missenso, le rimanenti sono mutazioni nulle cioè piccole delezioni o inserzioni che producono frameshift e codoni di stop. Raramente sono mutazioni genomiche e mutazioni sinonime. Alcune mutazioni sono ripetutamente riportate in più popolazioni, mentre altre evidenziano l'effetto del fondatore per alcune popolazioni, come riportato nella tabella iniziale.

Tutte producono perdita di funzione, la maggior parte degli affetti presenta un'assenza totale o parziale della proteina (evidenziata attraverso la biopsia) dovuta a mutazioni che provocano proteine tronche o instabili. Circa il 20% degli affetti hanno normale quantità della proteina indicando che la proteina ha probabilmente perso l'attività catalitica e quindi è inattiva.

La calpainopatia è la forma più frequente delle LGMD (cfr.tabella) in media il 40% delle LGMD è costituita dalla calpainopatia. L'ampia forbice è legata alle

differenze nelle diverse popolazioni: studi a livello molecolare, che sono gli unici in grado di discriminare con certezza di quale forma di distrofia dei cingoli si tratta, indicano che fra gli affetti da LGMD caucasici testati negli USA il 10% e' affetto da calpainopatia, mentre lo sono il 21% nei Baesi Bassi, il 26% in Giappone, il 50% in Turchia e 80% nei paesi Baschi, Russia. In Italia si ritiene sia 1/100.000 abitanti con una frequenza degli eterozigoti pari a 1/160.

### **Relazione genotipo fenotipo**

Dal momento che, a parte quelli appartenenti alle popolazioni in cui c'e' l'effetto del fondatore, la maggior parte degli affetti sono eterozigoti composti, una relazione fra particolari mutazioni e manifestazioni cliniche e' difficile da stabilire. Si puo' dire che la maggior parte delle mutazioni nulle portano ad un fenotipo piu' grave con totale assenza della proteina, mentre per le missenso non c'e' una relazione definita anche perche' e' presente variabilita' fenotipica fra soggetti omozigoti per la stessa mutazione, a volte anche all'interno della stessa famiglia.

Non e' stata ritrovata neanche una relazione diretta fra quantita' di calpaina-3 definita attraverso l'immunoblot e gravita' della patologia.

### **Diagnosi**

La diagnosi e' complessa e richiede una serie di test, per definire se ci si trova di fronte alla LGMD2A o ad un'altra forma. La biopsia muscolare e l'analisi attraverso immunoblot identificano un alterato livello di calpaina-3 nell'80% degli affetti, anche se esistono i falsi negativi e falsi positivi, l'analisi dell'attivita' catalitica non e' attuata sul piano diagnostico. Una volta circoscritta la diagnosi, la conferma viene dal test molecolare: si attua attraverso scanning delle mutazioni e degli esoni, considerando che le mutazioni patogenetiche tendono a concentrarsi in alcuni esoni. In Italia l'87% delle mutazioni sono concentrate negli esoni 1, 4, 5, 8, 10, 11, e 21.

Il sequenziamento dell'intera sequenza codificante (24 esoni) e' eseguita a scopo diagnostico e, tenendo a mente le difficolta' di interpretazione collegate con questa tecnica (cfr. parte introduttiva), si mettono in evidenza ~ il 99% delle variazioni di sequenza.

### **Disferlinopatia LGMD2B**

La disferlina, localizzata a livello della membrana sarcolemmatica e' una proteina di 237,3 kDa, lunga 2080 aa, la cui funzione non e' completamente chiarita, ma che sembra coinvolta nei processi di fusione di membrana, calcio-dipendenti, e nei meccanismi di riparo della membrana.

Il gene DYSF, e' l'unico coinvolto nella LGMD2B, e' composto da 55 esoni ed e' lungo 233,13 kb. E' stato clonato nel 1998 da due gruppi indipendenti che si erano concentrati ognuna sulle due forme alleliche della patologia: Miopatia di Miyoshi (MM con coinvolgimento prevalente di distretti muscolari distali) e la distrofia muscolare dei cingoli tipo 2B (LGMD2B a prevalente interessamento a carico della muscolatura prossimale). Che fossero alleliche, cioe' mutazioni diverse dello stesso locus era emerso dagli studi di linkage che evidenziavano la mappatura nella stessa regione del 2p e dalla presenza di due famiglie molto ampie in cui erano presenti entrambi i quadri clinici (e quindi non complementavano come avrebbero dovuto essendo una recessiva) e in cui i pazienti condividevano lo stesso aplotipo della regione (quindi o erano due geni

molto vicini o lo stesso gene). L'ipotesi piu' ovvia, visto che il quadro clinico e' praticamente lo stesso con differenze solo nei distretti muscolari colpiti, era che fossero alleliche e che le differenze nelle manifestazioni cliniche fossero dovute ad altri fattori.

	Miopatia di Miyoshi	LGMD2b
Eta' di insorgenza (range)	14-37 anni	14-41 anni
Deambulazione con bastone (# anni dopo l'inizio)	~35 anni (~16)	~39 anni (~13)
Uso sedia a rotelle (# anni dopo l'inizio)	~43 anni (~23)	~45 anni (~21)

Il clonaggio del gene ha chiarito definitivamente che il gene e' lo stesso.

E' stata descritta in una famiglia un'altra forma clinica definita miopatia distale con insorgenza nel muscolo tibiale anteriore (Distal Myopathy with Anterior Tibial onset DMAT), anche questa e' allelica alle prime due dal momento che il gene mutato e' sempre DYSF.

## Alleli

Per quello che riguarda i polimorfismi nel gene sono presenti delle ripetizioni (CA)<sub>n</sub> in tre introni e al 3' UTR. Per quello che riguarda le mutazioni patogenetiche ne sono state descritte circa 200 associate indifferentemente a LGMD-2B e MM in omozigosi od eterozigosi composta. La stessa mutazione e' stata descritta in associazione con fenotipi clinicamente diversi (sempre tuttavia identificati come LGMD), anche nell'ambito della stessa famiglia. Si tratta di mutazioni puntiformi missenso, nonsenso o frameshift legate a delezioni, distribuite in tutti gli esoni del gene.

E' riportata la presenza di un effetto fondatore in alcune popolazioni, in cui si ritrovano una o piu' mutazioni ricorrenti per esempio:

➤ 1624delG in 12 famiglie ebreo libanesi

➤ 4 mutazioni danno ragione del 60% degli affetti da MM in Giappone (C1939G, G3370T, 3746delG, and 4870delT)

➤ Nel 2003 e' stata riportata l'esistenza in Italia dell'effetto del fondatore per la mutazione C2785T.

La prevalenza non e' nota, gli affetti costituiscono circa il 10% degli affetti da distrofia dei cingoli.

Non e' riportata nessuna correlazione genotipo fenotipo, cosa che non stupisce visto che gli affetti spesso sono eterozigoti composti e non differiscono molto sul piano clinico dai veri omozigoti. Uno studio giapponese del 2003 sulla forma MM, correla una mutazione (G3210A) localizzata in una regione idrofilica con un fenotipo grave, gli autori ritengono percio' che questa regione sia critica per la funzione.

Informazioni possono venire da organismi modello: nel 2003 e nel 2004 studi sul topo affetto da LGMD2B per una mutazione nulla mostrano la distruzione della membrana dovuta al venir meno del sistema di riparo del muscolo e la conseguente degenerazione del muscolo. Nel 2005 un altro studio eseguito su biopsie di pazienti affetti dal LGMD2B utilizzando tecniche istologiche, immunoistologiche e analisi ultrastrutturali, mette in evidenza la presenza di processi infiammatori e degenerativi che suggeriscono un meccanismo di riparo e rigenerativo inefficiente confermando i risultati ottenuti nel topo.

## Diagnosi

Come in tutte le distrofie i primi test partono dalla biopsia muscolare su cui eseguire le analisi istologiche, immunoistologiche con anticorpi specifici per le diverse proteine, e immunoblot che è considerata l'analisi più affidabile. L'esame del DNA viene eseguito per confermare la diagnosi, per la ricerca dei portatori e per un eventuale diagnosi prenatale, consiste in:

- Ricerca delle mutazioni note, e' quindi importante la provenienza etnica dei pazienti, dal momento che questa informazione consente di restringere il numero di mutazioni da testare
- Analisi della sequenza con i limiti che dovrebbero esservi a questo punto noti (cfr. parte introduttiva). Con questo metodo si individuano circa l'80% delle mutazioni.

## Telethoninopatia LGMD2G

La telethoina è una proteina di 19 kDa costituita da 167 aa, presente esclusivamente nel muscolo striato e nel cuore (che è striato anche se involontario), costituisce il substrato di una altra proteina, la titina coinvolta nella LGMD2J. La funzione del telethonina non è nota.

Il gene che codifica la proteina è TCAP, è lungo 1,21 kb e ha 2 esoni. Lo studio di quattro famiglie brasiliane in cui gli affetti (14) erano tutti omozigoti per la stessa mutazione ha evidenziato variabilità fenotipica e non ha chiarito la patogenesi della malattia. In Italia è stata riportata una famiglia in cui gli affetti sono eterozigoti composti.

## Assenza di TRIM32 LGMD2H

Questa forma di distrofia non particolarmente invalidante (gli affetti mantengono la capacità di camminare autonomamente fino ai 60 anni) è stata descritta in una comunità utterita residente a Manitoa in Canada dove oltre 60 persone sono risultate affette.

Gli Utteriti sono un gruppo minoritario religioso di derivazione anabattista (circa 30 mila persone). Sono emigrati dal Tirolo e dalla Moldavia. Dopo varie peregrinazioni si sono stabiliti, alla fine del 1800 (1874-1879) in Sud Dakota ed in Canada. L'origine etnica tirolese è impressa nei 14 cognomi presenti nella comunità (tra cui Hofer, Gross, Mandel). Gli Utteriti vivono in *Bruderhof*, fattorie comunitarie, dove vige la comunione dei beni.

La proteina 32 è una proteina appartenente alla famiglia delle proteine caratterizzate da un dominio tripartito (tripartite-motif TRIM) e sembra essere una E3-ubiquitina ligasi, cioè una proteina coinvolta nel meccanismo della regolazione posttrascrizionale delle proteine. È lunga 653 aa e pesa 71,9 kDa.

Il gene TRIM32 è lungo 13,4 kb ha 2 esoni, la mutazione presente in questa comunità è 1459G>A che si traduce in un cambio di amminoacido: asp487>asn. Naturalmente tutti gli affetti sono veri omozigoti.

## LGMD2I

Questa forma presenta un'ampia variabilità clinica che va da forme gravi fortemente invalidanti Duchenne-like a un fenotipo più lieve a progressione lenta a forme asintomatiche fino ai 50-60 anni.

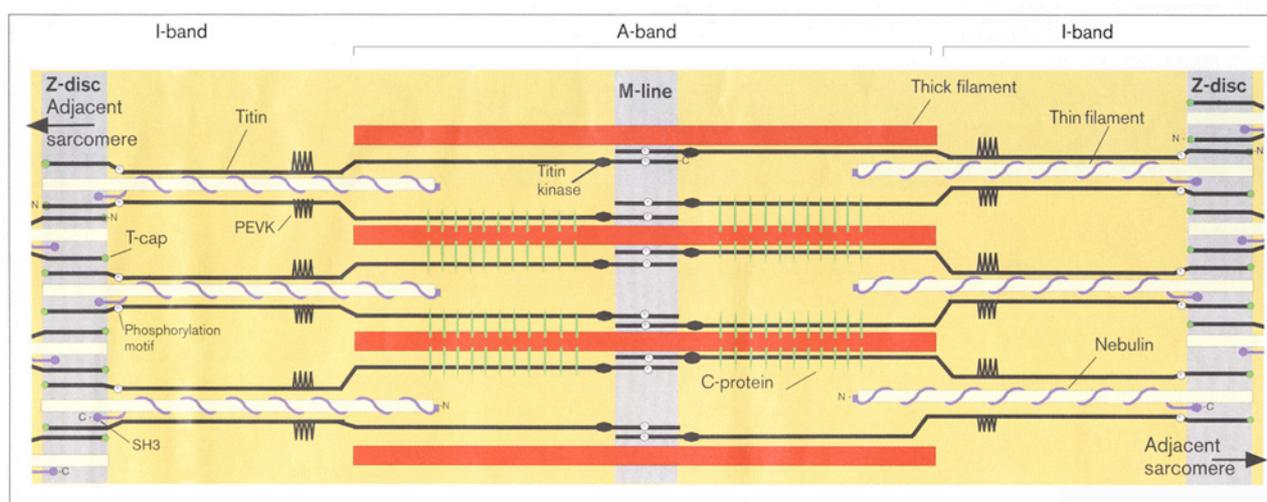
Il gene coinvolto e' FKR, lungo 12,4 kb, ha quattro esoni, ma i primi 3 non sono codificanti, mentre il quarto, lungo 3.8 kb contiene il 5'UTR, la ORF completa e il 3'UTR. Dall'analisi del cDNA si deduce una proteina di 495 aa, con una struttura analoga alle glicosiltransferasi. La funzione della proteina e' ancora non definita.

Le mutazioni patogenetiche sono di tutti i tipi: missenso, nonsense, delezioni e gli affetti possono essere eterozigoti composti.

## **LGMD2J**

Questa forma descritta in Finlandia, si presenta come una distrofia relativamente grave che inizia nei primi venti anni e conduce nel corso dei venti anni successivi all'insorgenza alla sedia a rotelle.

Il gene TTN, lungo circa 281 kb e composto da 313 esoni, codifica per la titina, una proteina del peso di 4.200 kDa e composta da 38138 aa, non a caso chiamata anche proteina gigante sarcomerica considerato il piu' grande polipeptide finora identificato, organizzato in circa 300 domini (si chiama titin da titano). Occupa meta' sarcomero dalla linea Z alla linea M, e' coinvolta in molteplici funzioni come "molecular ruler" nell'allineare gli altri componenti del sarcomero, nello sviluppo del muscolo, nel trasmettere i segnali nella contrazione e nel mantenimento del tono a riposo. (Inserisco una figura per questa proteina perche' mi sembra veramente grandiosa!)



Per quello che riguarda le mutazioni patogenetiche tutti gli affetti sono omozigoti per una delezione/inserzione di 11pb nell'ultimo esone del gene, la mutazione altera 4 amminoacidi ed e' vicina al sito di legame della calpaina.

Questa mutazione e' stata ritrovata in omozigosi (ovviamente) in 8 membri di un estesa famiglia finlandese con un elevato grado di consanguineita' e gli eterozigoti(12) presentano quella che in passato era stata definita miopatia tibiale distale ad insorgenza tardiva autosomica dominante. La mutazione e' relativamente frequente nella popolazione finlandese dal momento che nel 2002 sono stati riportati 81 affetti eterozigoti in 12 famiglie non correlate.

## **LGMD2K**

Questa forma molto rara e' stata descritta in Turchia in pazienti nati da consanguinei, si manifesta anche con un certo grado di ritardo mentale, e' originata da una mutazione del gene POMT1 ed e' stato dimostrato mediante l'analisi dell'aplotipo essersi originato in un comune ancestore delle famiglie

coinvolte. Nel 2005 e' stato definito che questa sindrome e' allelica alla piu' grave Walker-Warburg syndrome 1 che porta a morte i pazienti nel primo anno di vita con gravi danno oltre che muscolari anche al sistema nervoso centrale..

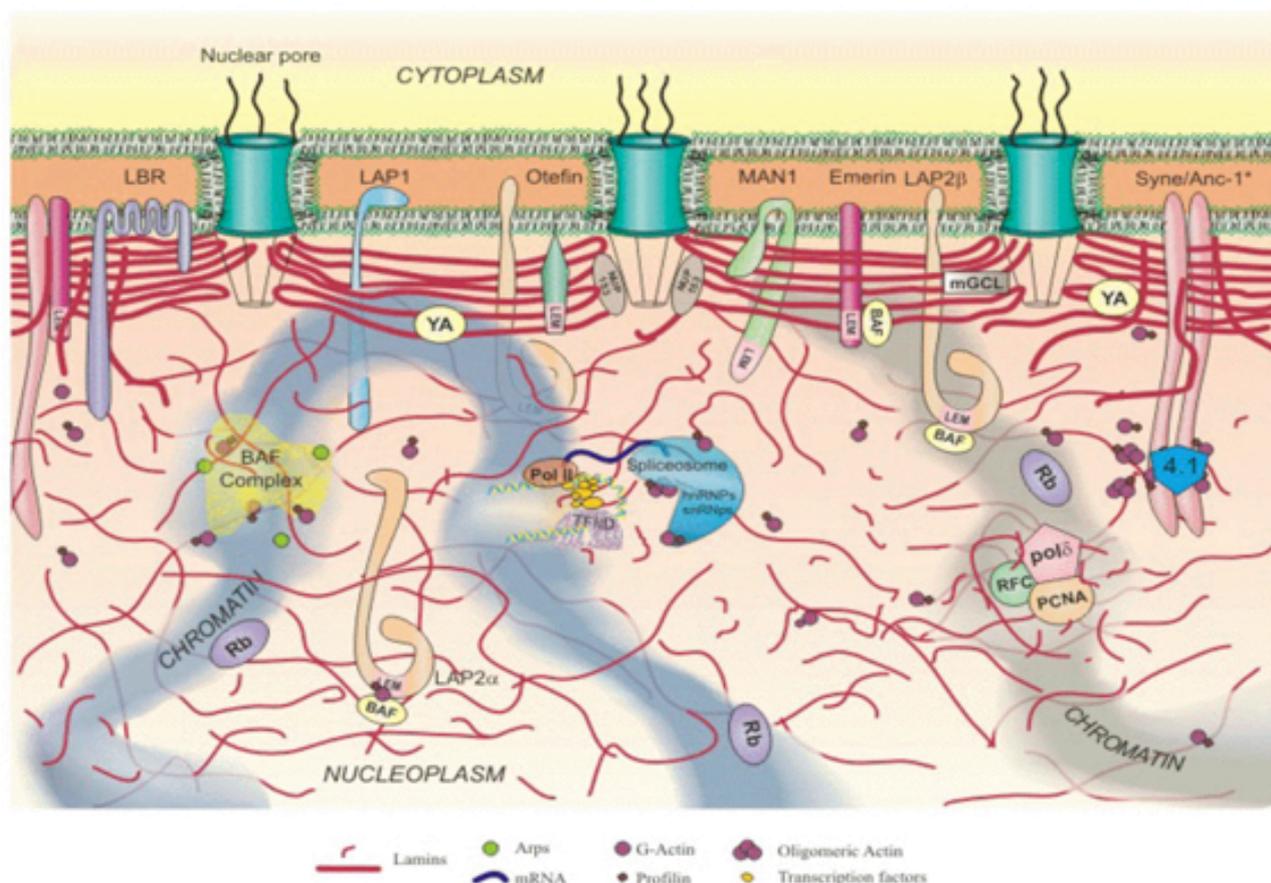
Il gene POMT1 lungo 20,88 kb e composto da 20 esoni, codifica per la O-mannosiltransferasi1, composta da 725 aa.,con funzione enzimatica nell O-mannosilazione delle proteine.

La mutazione patogenetica all'origine della LGMD2K e' una sostituzione amminoacidica al residuo 200 da alanina a prolina che impedisce la corretta glicosilazione del substrato. Nel caso della sindrome di Walker-Warburg1 le mutazioni sono di vario tipo e oltre all'assenza dell'attivita' enzimatica provocano difetti di migrazione dei neuroni durante il differenziamento del cervello.

### Genetica delle LGDM1

Le forme dominanti sono state descritte in singole famiglie anche se estese e sono considerate rare. Dal punto di vista della genetica essendo dominanti hanno un rischio di ricorrenza del 50% nei figli di un affetto. Solo di tre di loro e' stato identificato il gene e il prodotto corrispondente. Non entrero' nel dettaglio e riporto solo la tabella. Riprendero' il discorso su LGMD1B trattando della distrofia di Emery-Dreifuss (cfr.oltre).

Malattia	Nome del locus	Gene	Mappa	Prodotto
LGMD1A miotilinopatia	LGMD1A	TTID (MYOT)	5q31	Miotilina
LGMD1B	LGMD1B	LMNA	1q21	Lamina A/C
Caveolinopatia	LGMD1C	CAV3	3p25	Caveolina-3
LGMD1D	CMD1F	???	6q23	???
LGMD1E	LGMD1E	???	7q	???
LGMD1F	LGMD1F	???	7q31	???
LGMD1G	LGMD1G	???	4q21	???



## La Distrofia di Emery–Dreifuss EDMD

### **Cosa e' la distrofia di Emery–Dreifuss**

E' meglio dire cosa sono le distrofie di Emery–Dreifuss, infatti sotto questo nome sono raggruppate tre forme cliniche a ereditarieta' diversa: due forme autosomiche, dominante e recessiva originate da mutazioni nel gene che codifica per la Lamina A/C , e una X linked recessiva originata dal gene della emerina.

La forma recessiva e' stata descritta nel 2000 in un paziente che presentava una forma grave di EDMD ed era omozigote per una transizione C>T al codone 664, che origina la sostituzione dell'istidina 122 con una tirosina (H112Y). I genitori entrambi non affetti erano cugini primi ed entrambi eterozigoti. Questa mutazione non e' stata ritrovata in 200 aplotipi di soggetti non affetti da EDMD.

Sono caratterizzate da contratture delle articolazioni dovute alla retrazione dei tendini, indebolimento e atrofia dei muscoli che iniziano dalle estremita' per progredire ai plessi piu' prossimali, e compromissione cardiaca a partire dalla seconda decade. L'eta' di insorgenza e le manifestazioni variano fra le diverse famiglie e anche all'interno delle famiglie. La distinzione fra le diverse forme avviene sulla base della storia familiare, dell'eta' d insorgenza, dei test di immunostochimici e dall'analisi molecolare (cfr oltre). Da notare che il 45% di pazienti diagnosticati clinicamente Emery–Dreifuss hanno Emerina normale e nessuna mutazione nei geni coinvolti. Si ritiene pertanto che siano errori di diagnosi o che ci siano altri geni le cui mutazioni patogenetiche provochino un fenotipo EDMD.

Tutte le forme non compromettono la sopravvivenza anche se la compromissione cardiaca, che inizia precocemente puo' portare all'istallazione di

un pace-maker e le contratture tendinee a carico anche dei tendini dei muscoli post cervicali portano a limitazioni dei movimenti della colonna vertebrale, e deformazioni della colonna la perdita della deambulazione e' rara nella forma X linked e puo' verificarsi nella forma autosomica dominante.

La prevalenza nel loro insieme non e' nota, si ritiene che la X-linked sia 1/100.000, e che costituiscano nell'abito delle distrofie muscolari la terza categoria in termine di numero di affetti, seconde solo alle due distrofinopatie (Duchenne e Becker).

Dopo aver descritto le due sindromi riporterò le ipotesi sulla patogenesi molecolare delle due sindromi trattandole insieme dal momento che, come vedrete, i prodotti dei due locus sono strettamente collegati nell'organizzazione della membrana nucleare e nelle loro funzioni.

## **Emery-Dreifuss autosomica AR/AD EDMD**

### **Genetica di AD/AR EDMD**

Il 76% degli affetti della forma dominante sono nuove mutazioni, pertanto il rischio per i fratelli e' basso, anche se sono stati descritti casi di mosaicismo germinale: piu' di un figlio affetto e mancanza di mutazioni nel DNA dei genitori.

Una storia familiare negativa potrebbe essere dovuta alla variazione di espressivita' all'interno della famiglia, per cui un genitore non risulta affetto perche' l'insorgenza potrebbe essere piu' tardiva, o perche' deceduto prima dell'inizio dei segni. Naturalmente il test molecolare puo' fugare i dubbi.

Essendo dominante se e' presente un genitore affetto il rischio per i fratelli e' 50%, come per i figli del probando. Nel caso venga dimostrata la familiarita' il rischio si estende ai membri della famiglia del genitore affetto.

### **Il gene LMNA**

Le mutazioni patogenetiche di questo gene provocano una serie di patologie tutte a carico del muscolo striato alleliche (ovviamente fra loro) fra cui la gia' citata LGMD1B, che vanno sotto il nome di laminopatie.

Il gene, mappa in 1q21, ha 12 esoni ed e' lungo 25,37 kb, il suo prodotto e' una proteina ubiquitaria localizzata nella membrana nucleare, lamina A e C, lunga 664 aa e di 74.1 kDa. appartiene ad una grande famiglia di proteine definite IF (Intermediate Filament protein) che costituiscono la lamina nucleare, foglietto fibroso posto dal lato nucleare della membrana interna del nucleo.

Il suo prodotto, e' presente in 4 isoforme di cui due principali a seguito di splicing alternativo, che subiscono una maturazione post traduzionale prima di essere incorporate nella struttura della lamina. Ha molteplici funzioni che spiegano bene perche' risulta coinvolta in diversi fenotipi clinici:

- media le interazioni con la membrana nucleare, anche legando fra loro la membrana nucleare e la cromatina

- ha un ruolo nella organizzazione della cromatina, nella replicazione del DNA e nell'espressione dei geni RNA polimerasi II dipendenti e quindi piu' in generale nella stabilita' del nucleo, della struttura della cromatina e nell'espressione genica

- ha un ruolo chiave nel mantenimento dell'integrita' cellulare

- e' coinvolta nella produzione del collagene
- agisce come inibitore del differenziamento degli adipociti, probabilmente intervento nella trasmissione del segnale per l'insulina
- e' coinvolta nell'invecchiamento
- attraverso il suo C-terminale ha un ruolo critico nella struttura del nucleo
- e' coinvolta nel differenziamento del muscolo.

## Alleli

Sono state descritte oltre 237 mutazioni, l'85% sono missenso, le altre sono non senso, piccole delezioni/inserzioni sia in frame che non, mutazioni nei siti di splicing, sono presenti in tutta la lunghezza del gene e solo poche sono ricorrenti (questo non stupisce visto che la maggior parte degli affetti sono *de novo*).

La maggior parte delle missenso porta ad una proteina normalmente espressa, mentre le non senso provocano aploinsufficienza per assenza di espressione della proteina mutata che puo' essere dovuta a mancata traduzione o instabilita' della proteina.

## Relazione genotipo fenotipo

Non e' stata stabilita una relazione fra particolari mutazioni e fenotipo, i motivi risiedono nell'accentuata variabilita' fra le famiglie e all'interno delle famiglie anche fra i portatori della stessa mutazione. Per esempio all'interno della stessa famiglia la stessa mutazione puo' esprimersi provocando la AD-EDMD, LGMD1B o DCM-CD (una forma di cardiomiopatia dilatativa con difetto di conduzione) cioe' una delle laminopatie a carico del muscolo striato

Per la forma recessiva che e' stata riportata in un solo individuo (vedi sopra) ovviamente non si puo' dire niente.

## Diagnosi

La presenza di emerina identificata con immuno fluorescenza o Western blot (dal momento che ubiquitaria, si puo' fare su qualunque tessuto) indirizza verso le laminopatie, come pure la storia familiare nei casi che lo sono. Gli stessi test non si possono fare direttamente per la lamina A/C perche' quest'ultima e' comunque presente anche negli affetti.

La diagnosi molecolare ricercando le mutazioni nel gene LMNA e' diagnostica, permette di identificare i portatori che non manifestano (utile per tenere sotto controllo i problemi cardiaci), per una eventuale diagnosi prenatale.

Si esegue l'analisi della sequenza con lo scanning delle mutazioni che permette di identificare il 100% delle mutazioni puntiformi, per identificare le mutazioni di splicing e', invece, necessario sequenziare il c-DNA.

Vi ricordo che il sequenziamento alla ricerca delle mutazioni presenta le solite difficolta' che e' inutile ricordare qui: potete vedere la parte introduttiva.

## Emery-Dreifuss X linked XL-EDMD

### Genetica di XL-EDMD

Essendo una recessiva X linked, solo i maschi sono affetti, mentre le femmine portatrici sono di solito asintomatiche anche se possono talvolta manifestare alcuni dei segni e il rischio viene dalla compromissione cardiaca.

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

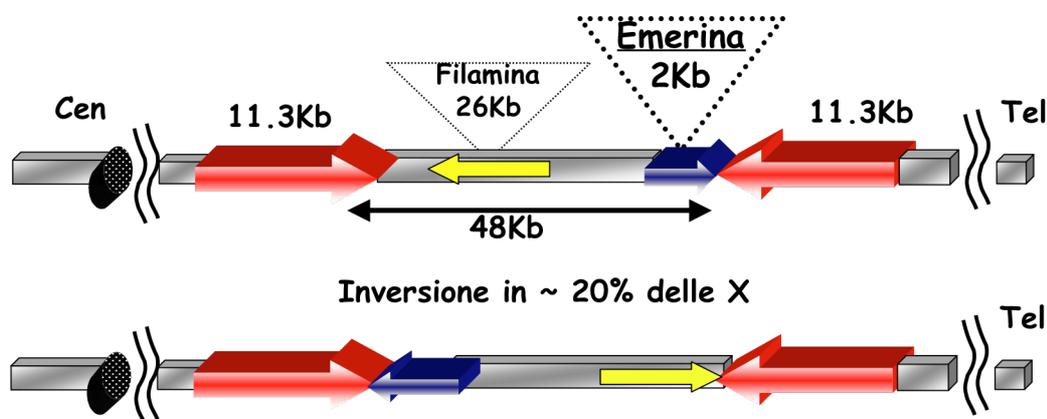
### Figli dell'affetto

Dal momento che il probando può riprodursi le sue figlie femmine sono tutte portatrici e nessun maschio affetto.

### Il gene EMD

Il gene EMD è lungo 2,1 kb e ha 6 esoni, e' fiancheggiato insieme al gene FLNA (Filamina) da due copie di un repeat di 11,3 kb, questa regione

di circa 48 kb, risulta invertita nel 20% dei cromosomi X. Tuttavia a differenza del gene del F8, questa inversione è un polimorfismo, e la presenza dei repeat non induce particolari riarrangiamenti a carico dei due geni, infatti delezioni del gene EMD sono rare (cfr. oltre).



Il suo prodotto è l'emierina, proteina del peso di 29 kDa e composta da 254 aa, ricca di serine, espressa in molti tessuti. La sua localizzazione è nucleare (vedi fig iniziale), ancorata alla membrana interna per mezzo della sua estremità idrofobica, mentre il resto della proteina idrofilica sporge nel nucleo dove interagisce con la lamina nucleare legandosi alla lamina A/C e a BAF, un'altra proteina coinvolta nell'assemblaggio del nucleo, nell'organizzazione della cromatina e nell'espressione genica, funzioni condivise anche dall'emierina e dalla lamina A/C. Infatti il legame con BAF è necessario al complesso emierina/lamina per ricostruire la membrana durante la telofase e garantirne la stabilità durante l'interfase. L'emierina è specificatamente coinvolta nell'espressione genica nella muscolatura striata.

## Alleli

Sono state descritte quasi 100 mutazioni patogenetiche il più delle volte private e distribuite su tutto il gene. Il 95% circa, sono mutazioni nulle cioè non senso, delezioni/insertioni, di splicing che producono exon skipping frameshift ..., in cui il risultato è assenza di prodotto, alcune mutazioni missenso e delezioni in-frame sono state riportate, in questi casi si produce una proteina non funzionale o espressa a livelli ridotti.

L'effetto delle rare mutazioni missenso è una proteina che pur essendo presente nella membrana nucleare ha interazioni più deboli con le altre componenti della stessa. Nel caso delle altrettanto rare delezioni in-frame, il risultato è una proteina che manca del dominio transmembrana ed è incapace di ancorarsi alla membrana e perciò rimane delocalizzata nel nucleo o nel citoplasma.

## Relazione genotipo fenotipo

La maggior parte delle mutazioni sono nulle e portano ad assenza dell'emierina il fenotipo è ci si aspetterebbe un fenotipo con manifestazioni costanti sia fra le famiglie che al loro interno, ma è presente una variabilità nella gravità della malattia anche all'interno della stessa famiglia in cui la mutazione è la stessa. Una differenza è presente quando si considerano i casi,

rari, in cui la proteina e' presente anche se in quantita' ridotta, in questi casi la sintomatologia e' piu' lieve.

## Diagnosi

Test di immunofluorescenza e/o Western blot permettono di evidenziare l'assenza di emerina, e dato che l'emerina e' ubiquitaria qualunque tipo cellulare puo' essere utilizzato: linfociti, cellule della mucosa orale, biopsie cutanee o muscolari; sono diagnostici nel 95% degli affetti, mentre non sono utili per la diagnosi delle eterozigoti.

La diagnosi molecolare e' utile per confermare la diagnosi, per individuare le eterozigoti e per la diagnosi prenatale, se richiesta.

Attraverso il sequenziamento della intera sequenza genomica: sei introni, cinque piccoli introni, e la regione promotrice si individuano mutazioni di EMD in oltre il 99% dei soggetti affetti che presentano eredita' X linked e/o assenza di emerina utilizzando i test immunoistochimici, i risultati dello scanning genomico vanno interpretati tenendo sempre presenti i problemi che si presentano in questo tipo di approccio. Si ricercano anche delezioni/duplicazioni anche se questo tipo di mutazione e' raro.

La strategia che si applica comune per tutte le distrofie di Emery-Dreifuss prevede lo studio della storia familiare per cercare di distinguere fra le due forme autosomica e X linked. Se la storia familiare non permette di discriminare fra le due forme, i test immunoistochimici per testare la presenza/assenza di emerina (sempre presente nelle laminopatie) permettono di eseguire i test sul gene appropriato.

## Patogenesi molecolare delle distrofie di Emery- Dreifuss

Avendo chiarito la base molecolare di questo gruppo di malattie e' utile trattare insieme la loro patogenesi dal momento che le proteine coinvolte svolgono la loro funzione in uno schema di stretta collaborazione reciproca, coinvolgendo anche altre molecole sulle quali tuttavia non e' il caso di soffermarsi.

La definizione della fisiopatologia di queste sindromi richiede la completa definizione del ruolo che emerina e lamina svolgono nella organizzazione funzionale della membrana nucleare, l'analisi degli effetti delle mutazioni sulla cellula possono chiarire questi ruoli. Vediamo cosa ci dicono le mutazioni dei due geni:

➡ le mutazioni del gene EMD provocano nella quasi totalita' dei casi assenza di emerina, le poche volte che e' presente manca o e' alterato il contatto con la membrana interna e il legame con le lamine

➡ le mutazioni di LMNA portano a laminaA/C alterata (le missenso) o ad aploinsufficienza per una quantita' ridotta della stessa (le nonsenso). Il risultato di questi eventi e' simile: lo studio dei tessuti o delle cellule degli affetti mostrano una membrana nucleare anomala, fragile e alterazione della distribuzione della cromatina. Alcuni autori ipotizzano che questo effetto porti ad una maggiore suscettibilita' all'apoptosi, tuttavia questa potrebbe non essere l'unica spiegazione del danno progressivo che si riscontra negli affetti.

Si possono ipotizzare altri due meccanismi patogenetici non escludentesi a vicenda:

➤ alterazioni strutturali legate allo stress meccanico a cui sono sottoposti i muscoli striati, cuore compreso

➤ alterazioni dell'espressione genica, legata alla anomala organizzazione della cromatina, con conseguenti problemi nel differenziamento e nella riproduzione delle cellule muscolari.

Bisogna infatti, tener presente le interazione fra le nostre due proteine con la cromatina e le altre proteine associate alla matrice nucleare. Entrambe le proteine interagiscono con l'actina nucleare (componente del complesso proteico associato alla membrana nucleare, coinvolto nel rimodellamento della cromatina), questa interazione suggerisce che la distribuzione della cromatina e/o la trascrizione potrebbero essere la causa della malattia.

Recentemente sono stati identificati come binding partner della lamina A/C numerosi fattori di trascrizione a supporto della seconda ipotesi di meccanismo patogenetico, che chiama in causa problemi nel differenziamento e nella riproduzione delle cellule muscolari.

## Curiosita' storiche

La distrofia di Emery-Drefuss e' probabilmente nota come entita' clinica fin dall'inizio del 1900, ma solo negli anni '60 e' stata delineata chiaramente come malattia distinta da altre distrofie.

Nel 1961 Dreifuss e Hogan riportano un'ampia famiglia in cui segregava una forma X-linked che gli autori considerarono una variante benigna di Duchenne.

Nel 1966 Emery e Dreifuss riesaminando la famiglia definirono trattarsi di una malattia distinta

## **La Distrofia muscolare facio–scapolo–omerale (FSHD)**

### **Cosa e' la Distrofia muscolare facio–scapolo–omerale (FSHD)**

E' una forma di distrofia che si presenta di solito (nel 90%) intorno ai 20 anni, e' progressiva anche se lentamente, non riduce l'aspettativa di vita e porta alla sedia a rotelle il 20% degli affetti. Il suo nome fa riferimento alla distribuzione del difetto di forza. Esso infatti è localizzato sui muscoli facciali, sulla muscolatura della parte posteriore della spalla (cingolo scapolare), sugli arti superiori e sulla parte inferiore della schiena (cingolo pelvico). Alcuni hanno forme piu' gravi gia' presenti alla nascita, mentre altri rimangono asintomatici per tutta la vita e solo il test molecolare li riconosce come affetti (penetranza ridotta). Di solito i primi segni compaiono a carico della muscolatura facciale con difficoltà a serrare le labbra (come per fischiare) o ad alzare gli angoli della bocca per sorridere e con il dormire con gli occhi parzialmente aperti. La parte superiore delle braccia va incontro ad atrofia, mentre gli avambracci rimangono di dimensioni normali il risultato sono delle braccia che vengono definite "Popeye arms."

La prevalenza e' stimata essere compresa fra 4 e 10/100.000, la forbice ampia e' legata alla presenza di affetti asintomatici ed e' la terza distrofia in termini di frequenza dopo Duchenne e la distrofia miotonica considerando tutte le distrofie indipendentemente dalle modalita' di trasmissione.

Viene ereditata come autosomica dominante a penetranza ridotta con differenze fra i due sessi e nelle fasce di eta': circa 83% considerando gli affetti intorno ai 30 anni, cioe' se considero tutti i portatori della mutazione entro i 30 anni 83/100 manifestano i segni. Se suddivido questi portatori trentenni per sesso risultano affetti il 95% dei maschi e il 69% delle femmine il motivo di questa differenza e' ignoto. Dopo i 50 anni la penetranza e' ridotta al 2%. Studi di popolazione condotti nel 2004 ipotizzano che la non penetranza sia clusterizzata in famiglie riconducendola ad altri fattori genetici concomitanti.

Non e' chiaro se sia presente anche il fenomeno dell'anticipazione. Studi della fine anni '90 riportano l'aumentare della gravita' della malattia nel corso delle generazioni anche se studi su ampie famiglie condotti nel 2001 non riscontrano alcuna anticipazione. Inoltre piu' recentemente (2004) altri dati suggeriscono che il fenomeno sia solo apparente perche' legato alla diversa penetranza nei due sessi. Infatti la progenie maschile di una donna affetta potrebbero manifestare una gravita' maggiore a causa del sesso e non dell'anticipazione.

### **Genetica di FSHD**

La maggioranza degli affetti (70–90%) hanno un genitore che manifesta la malattia e/o presenta la mutazione. Il 10–30% sono *de novo* perche' non ha ereditato la mutazione, il fatto che i genitori siano asintomatici non e' significativo vista la penetranza ridotta, infatti prima di dire che ci si trova di fronte ad una nuova mutazione bisogna fare il test molecolare.

Una storia familiare negativa potrebbe essere dovuta alla variazione di penetranza all'interno della famiglia, per cui un genitore non risulta affetto perche' l'insorgenza potrebbe essere piu' tardiva, o perche' deceduto prima dell'inizio dei segni. Naturalmente il test molecolare puo' fugare i dubbi.

Essendo dominante se e' presente un genitore affetto o portatore della mutazione non penetrante, il rischio per i fratelli e' 50%, come per i figli del probando. Nel caso venga dimostrata la familiarita' il rischio si estende ai membri della famiglia del genitore affetto. Non e' nota l'incidenza del mosaicismo germinale. Perche' si possa parlare di mosaicismo germinale e' necessario individuare famiglie con piu' di un figlio affetto e genitori privi della mutazione, dal momento che la malattia e' praticamente sempre familiare e' raro trovare situazioni del genere e non si hanno dati statistici.

## Il gene FSHD

Questo gene non esiste o meglio non l'hanno ancora trovato e forse non esiste proprio, inteso come singolo gene molecolare (vedi oltre patogenesi molecolare), infatti praticamente tutti gli affetti hanno una delezione all'interno di una sequenza composta di unita' di 3,3kb (D4Z4) ripetute in tandem in 4q35 (regione sub telomerica braccio lungo del cromosoma 4), ma anche se sono stati individuati un certo numero di geni a valle del repeat non e' stato ancora chiarito come e perche' la delezione di D4Z4 provochi la malattia (vedi patogenesi molecolare )

D4Z4 e' una sequenza di 3.3 kb presente da minimo 14-15 fino a 150 copie fra la popolazione normale. Ci troviamo percio' di fronte ad un classico polimorfismo di lunghezza del DNA (VNTR). Vengono considerati:



alleli normali: regioni lunghe 42 kb ed oltre fino a 150 repeat



alleli borderline: quelli fra 38-41 kb. Nel 2003 alcuni Autori hanno descritto un insieme di soggetti che presentavano questi alleli, ma che dal punto di vista fenotipico erano rappresentativi di tutto lo spettro fenotipico dal completamente normale al tipico quadro FSHMD passando attraverso tutte le sfumature cliniche possibili. Ad oggi non e' stato definito un cut-off diagnostico relativo alle dimensioni del repeat D4Z4, il che crea qualche problema dal punto di vista diagnostico.(cfr.Diagnosi)



alleli anormali: circa il 95% degli alleli anormali sono lunghi 34 kb o meno risultando in soli 11 o meno repeat.

In realta' la situazione di questa regione e' piu' complicata di come presentata finora. Il repeat e' presente con elevata similarita' anche sul cromosoma 10 in posizione anche qui subtelomerica, ma variazioni di lunghezza di quest'ultima regione non provocano fenotipi patologici.(N.B.la presenza di questa similarita' complica la diagnosi vedi oltre). A complicare le cose nel 2002 e' stata riportata la presenza nella regione 4q35 di un altro polimorfismo a carico di un segmento di 10kb. Vi ricordo che le sequenze telomeriche e subtelomeriche sono molto polimorfiche e sono costituite da sequenze ripetute e duplicazioni si parla genericamente di eterocromatina telomerica e subtelomerica intendendo che sono sequenze non espresse.

Tornando al nuovo polimorfismo questo viene identificato da due alleli 4qA e 4qB, questi due alleli differiscono per la presenza di un ulteriore sequenza ripetuta di 6,2 kb, un beta-satellite a valle di D4Z4: 4qA ha il beta satellite, 4qB no, quindi nella popolazione ci sono due tipi di cromosoma 4 . Un aspetto interessante e' che questo satellite e' presente, nella regione subtelomerica di 10q ma sul telomero del cromosoma 10 e' presente solo la sequenza simile al

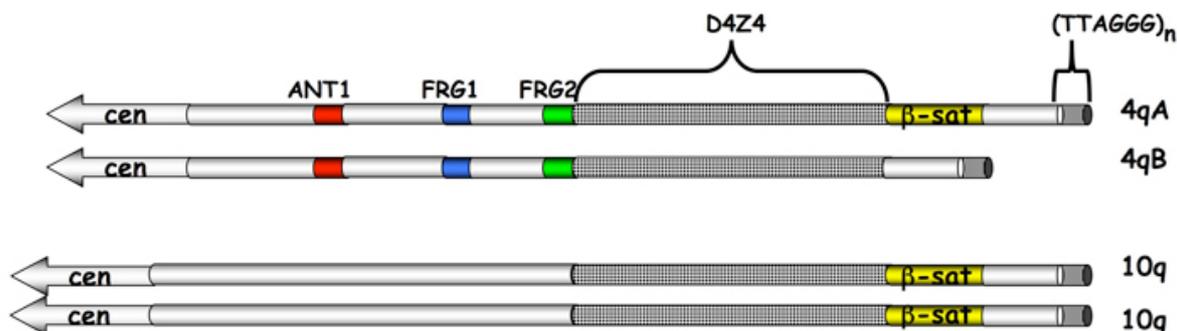
4qA, cioè il telomero del cromosoma 10 non è polimorfico relativamente al beta satellite.

Un lavoro pubblicato nel 2002 evidenzia come la delezione del repeat avviene sempre a carico dell'allele 4qA. Vediamo in dettaglio:

➤ In 80 soggetti, non imparentati, non affetti, i due alleli del cromosoma 4 sono presenti con una frequenza più o meno equivalente 42% 4qA e 58% 4qB.

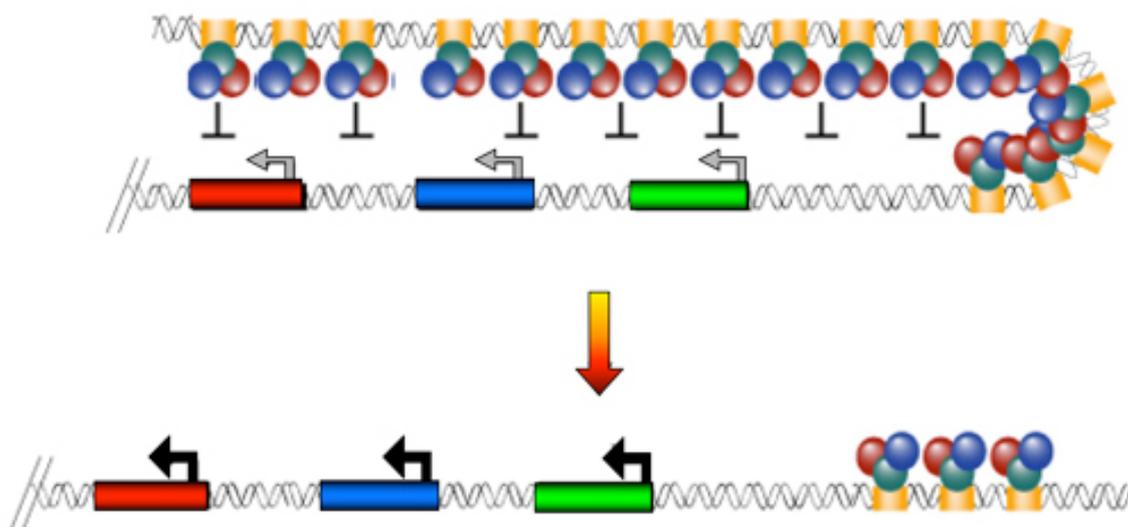
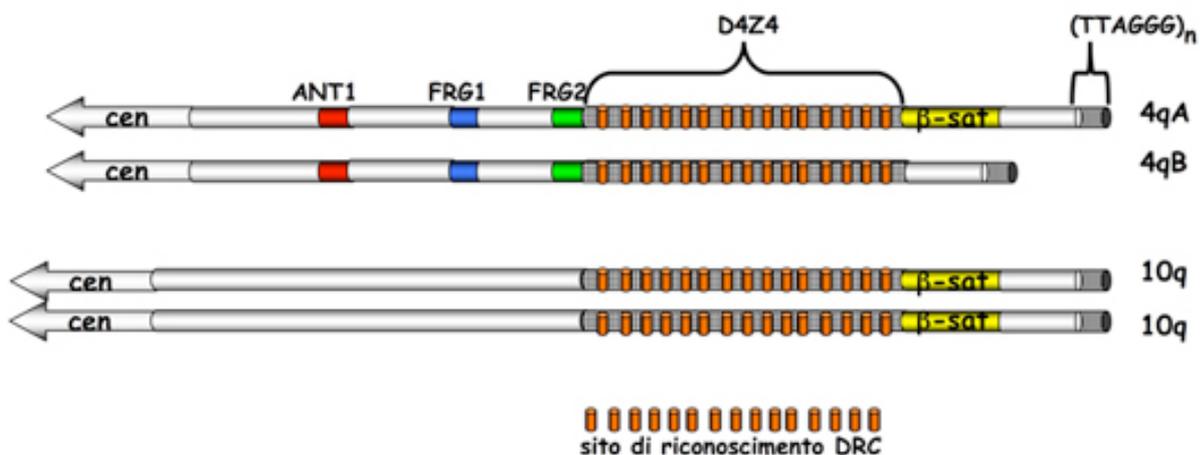
➤ In 80 affetti non imparentati sia con forme *de novo* che famigliari la contrazione del repeat è solo a carico dell'allele 4qA. Inoltre nei casi *de novo* si è risaliti all'aplotipo dei genitori per capire se fossero presenti entrambi gli alleli. A fronte di una larga percentuale di genitori eterozigoti 4qA/4qB la contrazione è sempre avvenuta su 4qA. Rimane da chiarire il perché di questa differenza, gli autori propendono per il coinvolgimento del beta satellite, visto che la sua presenza è l'unica differenza significativa fra i due alleli.

Chiariamo: la presenza del beta satellite potrebbe facilitare il riarrangiamento genomico che provoca la perdita di D4Z4, ma non ha niente a che fare con l'insorgenza della malattia, la patologia è legata alla riduzione dei repeat e si ritiene abbia a che fare con la regolazione dei geni situati a monte del repeat.



## Patogenesi molecolare della distrofia facio-scapolo-omerale

Ricerche degli ultimi anni hanno messo in evidenza che nelle 3.3 kb di D4Z4 è presente un elemento che lega un complesso di proteine definito DRC (D4Z4 binding Repressor Complex). Questo complesso è costituito da un repressore della trascrizione YY1, una proteina del gruppo ad alta mobilità HMGB2, e la nucleina. Questo complesso sembra reprimere l'espressione dei geni localizzati a monte del repeat: ANT1, FRG1, e FRG2, questa repressione e la sua mancanza è stata dimostrata almeno per FRG1 nel topo transgenico. quindi la perdita oltre un certo limite degli elementi potrebbe portare ad una over espressione dei geni e quindi alla malattia ci troviamo di fronte ad un effetto di posizione (PEV) cioè al cambiamento dello stato funzionale di geni eucromatici quando il contesto genomico che li circonda cambia.



## Relazione genotipo fenotipo

Con questo quadro complesso dell'aspetto molecolare e' difficile stabilire una relazione genotipo fenotipo, una relazione diretta sembra esserci fra brevità del segmento e velocità di progressione della malattia anche se non sembra univoca. La presenza di penetranza ridotta e la differenza fra i sessi non e' legata a differenti alleli, anche perché nella stessa famiglia abbiamo variabilità'.

Questa e' una sindrome che puo' essere definita da geni contigui, cioè all'espressione alterata di piu' geni, quindi il background individuale puo' giocare un ruolo chiave.

## Diagnosi

La diagnosi si basa sulla ricerca delle delezioni, cioè sulla definizione della lunghezza del VNTR, il problema è che questa sequenza non è singola nel genoma, ma si trova anche sul cromosoma 10q e bisogna riuscire a distinguerle visto che la riduzione di numero sul cromosoma 10 non è patogenetica.

Per far questo si ricorre a digestioni mirate dal momento che il contesto genomico in cui si trovano i repeat nei diversi cromosomi è diverso ed è possibile conoscendolo attraverso la scelta di enzimi e sonde appropriate arrivare ad un risultato utilizzando southern blot o PFGE

Nel 5% dei casi ci si trova di fronte ad alleli non deleti in soggetti malati le cause possono essere:

- Falsi negativi per i problemi tecnici accennati sopra
- Eterogeneità genetica: si ritiene che esista almeno un'altro locus che mutato provoca un fenotipo analogo indistinguibile clinicamente.
- Mutazioni *de novo* a mosaico

## Curiosità storiche

Landouzy e Dejerine descrissero nel 1884 e 1885 dei casi di miopatia che colpiscono il viso e i muscoli del tronco e degli arti. Questa fu la prima miopatia nella quale venne dimostrata l'integrità anatomica del sistema nervoso centrale e periferico.