



LM Sc. Biosanitarie Genetica III

Ricerca diagnostica in Genetica Molecolare

2006-2007

Prof.ssa N. Archidiacono



Introduzione

Lo scopo di questo corso non è 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 è innocuo, almeno finché non si dimostra il contrario.

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



Ricerca di mutazioni note (genotyping: genotipizzazione)



Ricerca di mutazioni nella regione di interesse (mutation scanning)

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

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



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



Specificità della tecnica: quanti sono i falsi positivi e i falsi negativi

Va anche tenuto in conto il rapporto costo/beneficio, il tempo di risposta. 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 possibilità di mosaicismi, al perché si fa la diagnosi (conferma diagnostica, ricerca degli eterozigoti, diagnosi prenatale....). Per una particolare famiglia può non bastare l'approccio standard e bisogna cambiare strategia ricorrendo a tecniche aggiuntive.

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

tipo di mutazioni sono quasi sicuramente patogenetiche questo test 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.

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 3×10^{-3} , 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 puo' essere dovuta a mutageni presenti nell'ambiente esterno e/o intracellulare o piu' frequentemente ad errori nei meccanismi di riparo o durante la replicazione.

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

Ricapitoliamo: le mutazioni possono avvenire

- 👉 nelle regioni non codificanti, cioe' che non corrispondono ad un trascritto maturo. In questo caso le ritroviamo perche' 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 dipendera' dal tipo di mutazione e dall'eventuale cambio di amminoacido nel prodotto tradotto. Se il prodotto risultera' 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 piu' 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 alterino 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 silenti (sinonime)
- ➡ mutazioni non sinonime

Le mutazioni sinonime vengono considerate neutre e si può originare un polimorfismo di restrizione RFLP (ricordate cos'è? cfr. Geneticamente 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 ristudiarvelo) 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 si ha la comparsa di un fenotipo patologico perché le ripetizioni interferiscono con i normali meccanismi di espressione. Vi ricordo che a seguito della scoperta di questo fenomeno è 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 perché si esplicano attraverso altri geni, sia perché se un gruppo di cellule deve svolgere una determinata funzione e saranno attivati i geni necessari e spenti gli altri, questa informazione verrà mantenuta da tutte le cellule che derivano dalle prime.

Se un meccanismo epigenetico viene meno si perde questa regolazione e si avrà 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 è però immutata: se vengono spenti non avremo il prodotto non perché c'è una mutazione patogena nella sequenza, ma semplicemente perché non possono rispondere ad altri segnali di attivazione.

I meccanismi epigenetici più 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 può risultare patogena, 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 loci è il meccanismo chiave nel mantenimento dello stato improntato come pure della inattivazione del cromosoma X.

Alterazione dell'imprinting

Come certamente ricorderete dalla Genetica II (altrimenti riguardatevelo), l'imprinting è 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 può essere limitata nello spazio e nel tempo.*** L'imprinting è 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 è 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 attività differenziale degli alleli parentali. Errori nella linea germinale impedirebbero l'acquisizione dell'epigenotipo corretto.

Non è ben chiaro come vengano identificati gli alleli paterni e materni. È tuttavia accertato che la metilazione garantisce il mantenimento dell'inattivazione del locus improntato. 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 evoluzionistici 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 dimensione 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, seguendo le leggi

di Mendel nella loro trasmissione, possono essere studiate e diagnosticate come tutte le altre. In questi casi il mitocondrio non è altro che una delle tante strutture della cellula che dipende dal nucleo per la propria funzione.

La funzione "produzione di energia" può, 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 sì che le cellule figlie non possiedano la stessa quantità di mitocondri mutati (eteroplasmia) e quindi il fenotipo può 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 è richiesta una più alta produzione di energia: sistema nervoso, muscolo, occhi, fegato.... e hanno un'elevata variabilità clinica anche all'interno della stessa famiglia.

Va considerato tuttavia che la funzione che viene persa è sempre la stessa: produzione di energia. La vasta gamma di deficit nelle proteine mitocondriali nelle malattie mitocondriali è legata (oltre all'eteroplasmia che giustifica la diversa gravità) 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. È perciò chiaro il perché della variabilità (o no?).

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

Per chiudere questo discorso dirò che la diagnostica di queste mutazioni si avvale sempre delle stesse tecniche utilizzate per il DNA nucleare, complicata dal fatto che bisogna esaminare più tessuti perché alcuni, a causa dell'eteroplasmia, potrebbero non avere mitocondri mutati, o averne pochissimi (ricordate che dimostrare che una cosa non c'è è più difficile che dimostrarne la presenza).

Mutazioni identificate come patogenetiche

Dal 1979 quando è 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 patogenicità delle mutazioni dipende da un insieme di fattori che più volte abbiamo richiamato:

- ☛ tipo di mutazione e suo effetto sull'espressione del gene:
 - ⇒ perdita di funzione
 - ⇒ aumento di funzione

- ⇒ effetto dominante negativo
 - ⇒ over espressione
 - ⇒ espressione ectopica nello spazio e/o nel tempo
 - ⇒
- ☞ il grado con cui il fenotipo mutato e' espresso nell'eterozigote wt/m: cioe' se ci troviamo di fronte ad un carattere patologico dominante o recessivo
 - ☞ presenza di imprinting, per cui il fenotipo si manifesta a seconda del sesso del genitore che trasmette (ricordate che la probabilita' di tramettere l'allele mutato e' sempre il 50% per entrambi i genitori portatori indipendentemente se manifestano, mentre la probabilita' di trasmettere il fenotipo e' 0 per il genitore che trasmette il locus improntato, e 50% per il genitore che lo trasmette attivo cfr. i testi in rete di Genetica II)
 - ☞ la proporzione e il tipo cellulare in cui il gene mutato e' presente: cioe' tutte le cellule dell'organismo (mutazione ereditata) o solo alcune (mutazione somatica)

Mosaicismo

Il mosaicismo 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'eteroplasma 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 facilità di identificazione nella diagnostica si possono dividere in

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

Questo ha portato allo sviluppo di due categorie principali di tecnologie

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

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

Riconoscimento di mutazioni note

Sono disponibili a questo scopo molti test commerciali specifici per numerose mutazioni note. Si basano sulla PCR amplificando semplicemente la sequenza target sia utilizzando primer specifici per la sequenza mutata e quindi osservando l'avvenuta amplificazione, o evidenziando la mutazione dopo digestione con enzimi di restrizione, o ibridazione dei prodotti di amplificazione con oligonucleotidi specifici, o con i test di ligation.

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

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

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

Analisi del prodotto di PCR con enzimi di restrizione

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

Analisi di linkage

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

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

Prerequisiti:

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

☞ La struttura della famiglia e la disponibilità 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.

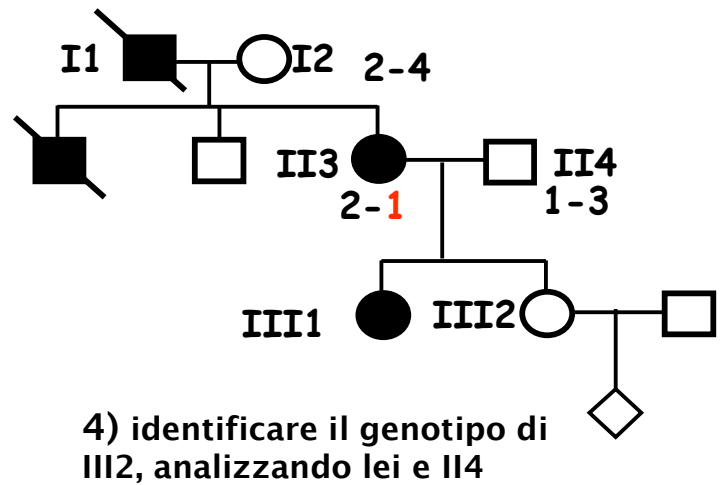
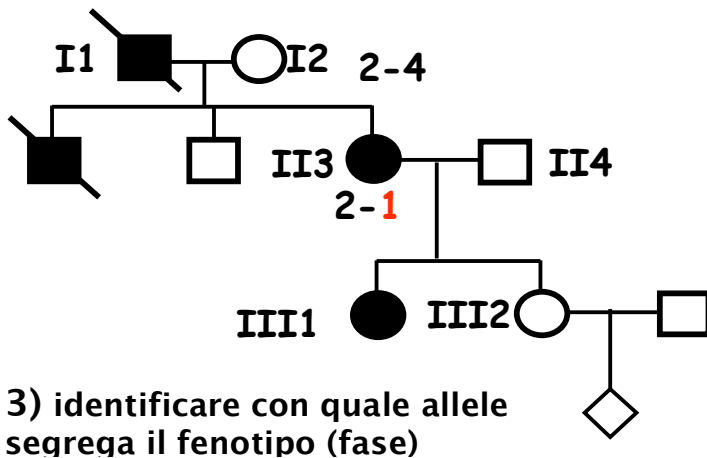
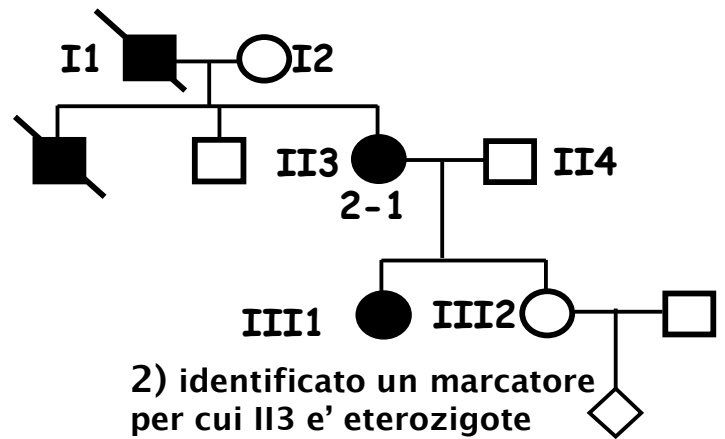
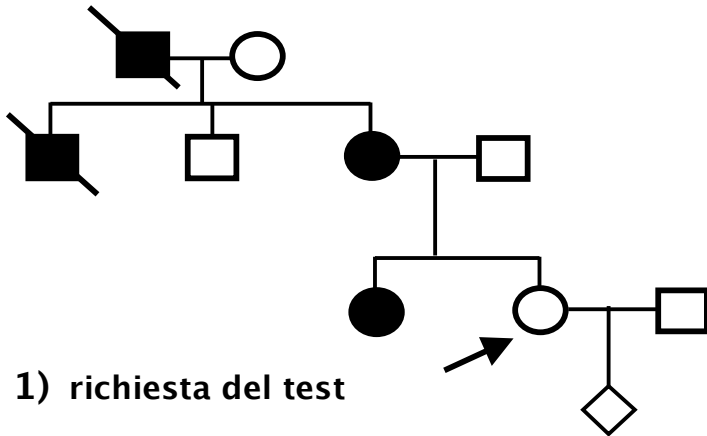
☞ Determinare la fase

☞ Definire quale aplotipo ha ereditato il probando dai genitori

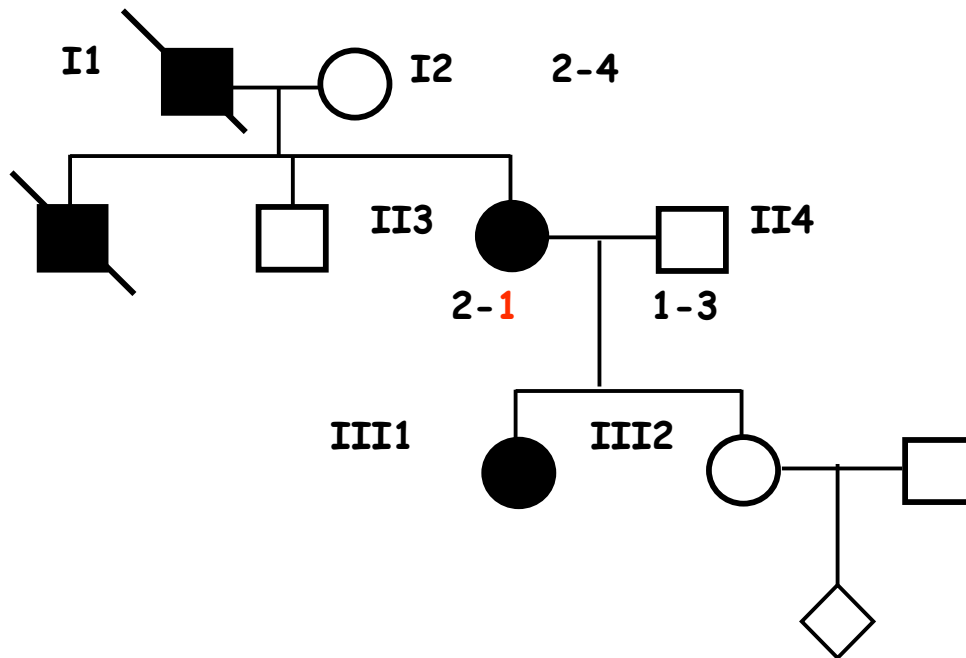
Questa logica si applica a fenotipi con qualunque tipo di ereditarietà. L'informatività dei marcatori non è più un problema: ci sono oggi microsatelliti altamente informativi mappati su tutto il genoma. Il limite più grosso è dato dalla struttura della famiglia

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

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



Quali sono i risultati possibili?

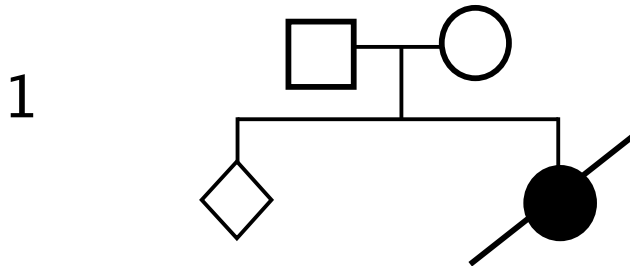


III2: 2-1 o 2-3 NON e' portatrice, perche' in questa famiglia la regione mutata e' identificata dall'allele 1

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

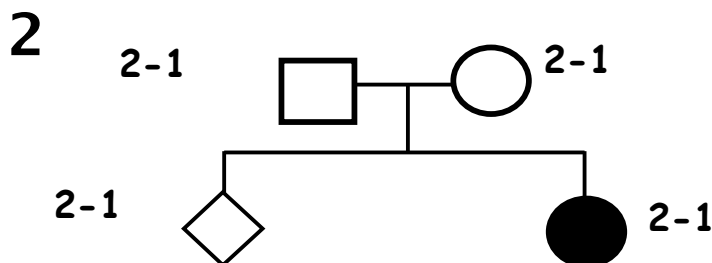
ATTENZIONE: e' importante la segregazione all'interno della famiglia e non il particolare genotipo: se III2 avesse 2-1 cioe' lo stesso genotipo della madre malata, non sarebbe portatrice, in quanto l'allele 1 deriverebbe dal padre

Stesso fenotipo recessivo e segregazione in 4 famiglie diverse



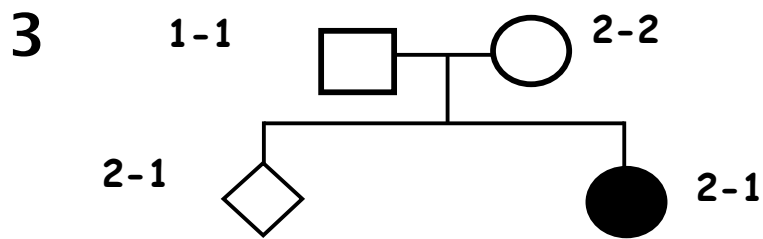
Impossibile fare il test perche' non c'e' il DNA di riferimento dell'affetto

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



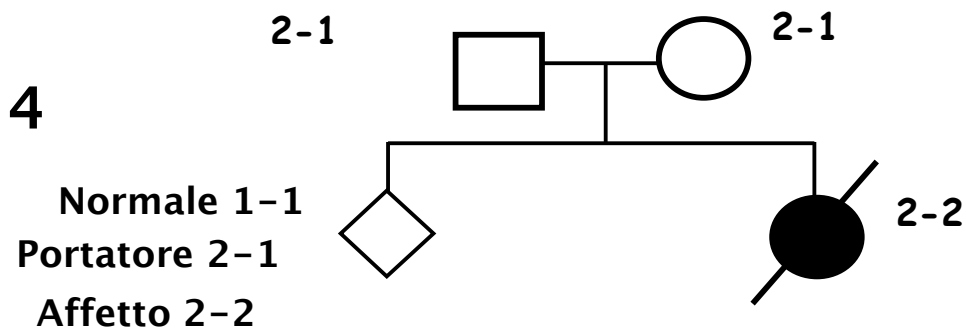
50%N, 50% affetto: non si puo' definire di chi sono gli alleli ereditati dal feto. L'allele 2 del feto e' lo stesso della sorella?

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



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

Stessa situazione di prima, anzi peggio nessuna combinazione è informativa



Massima informatività

Fare diagnosi

N.B.sono esempi utili a capire le problematiche diagnostiche e molti piu' dettagli li trovate su www.genetests.org

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 tirosin-

chinasi intracellulare citoplasmatica innescando la trasmissione del segnale. Nel tessuto osseo ad accrescimento endocondrale (sostanzialmente le ossa lunghe) l'attivazione di FGFR3 inibisce la proliferazione dei condrociti nella piastra di crescita, stimolando 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:

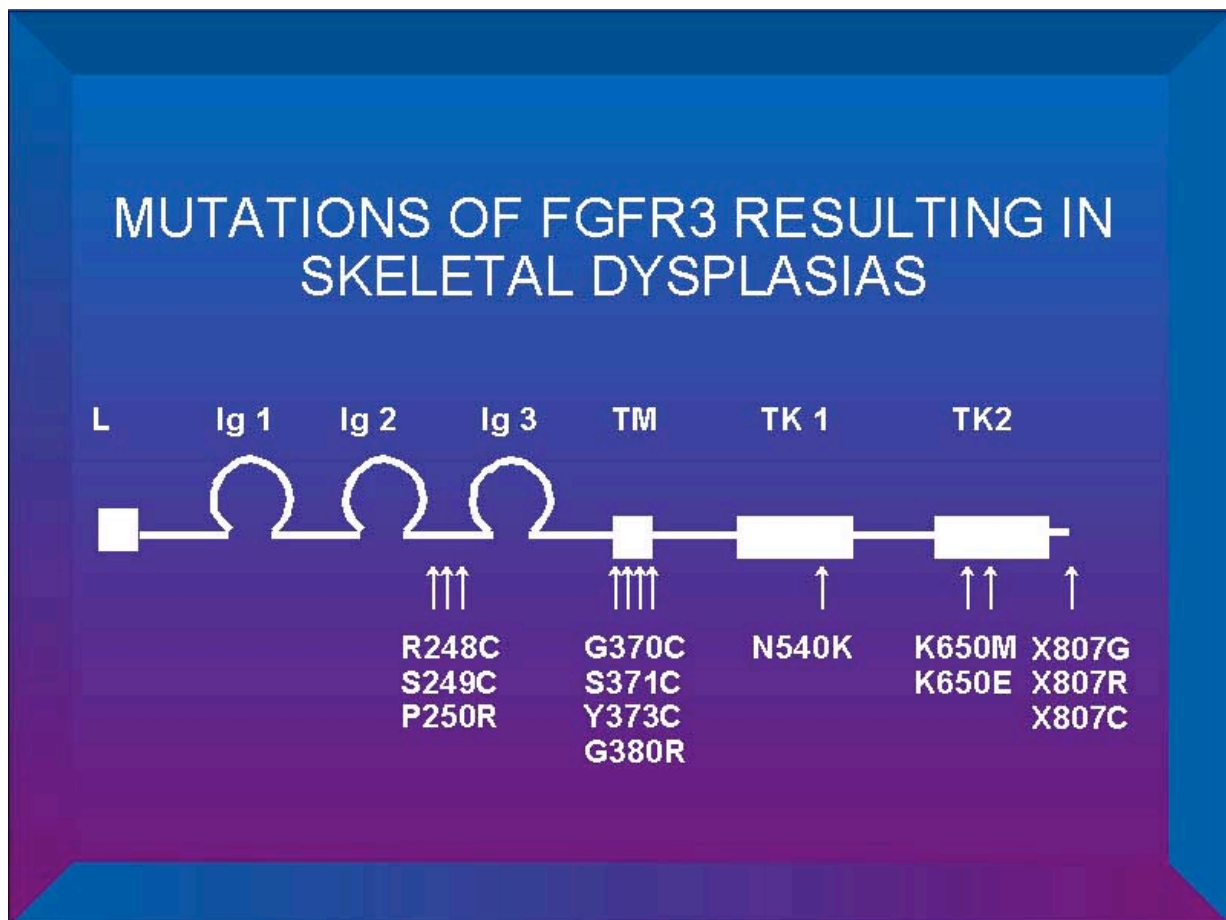
- ⇒ una transizione G > C al 5' dell'introne 9
- ⇒ una trasversione C > T nell'introne 10
- ⇒ delezione di una G in uno stretch di 11 G nell'introne 9

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.



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 (gravidanze 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 funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?

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

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

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

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

Curiosita' storiche

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

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

Bernal e Briceno nel 2006, riportano lo studio di una terracotta di epoca precolombiana (datata circa 2500 anni fa), in cui e' disegnata una figura 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, cioe' sono **eterozigoti composti**(ricordate?):

➡ La forma piu' frequente di questo gruppo e' l'anemia falciforme-emoglobina C: **Hb SC** (cfr. paragrafo alleli)

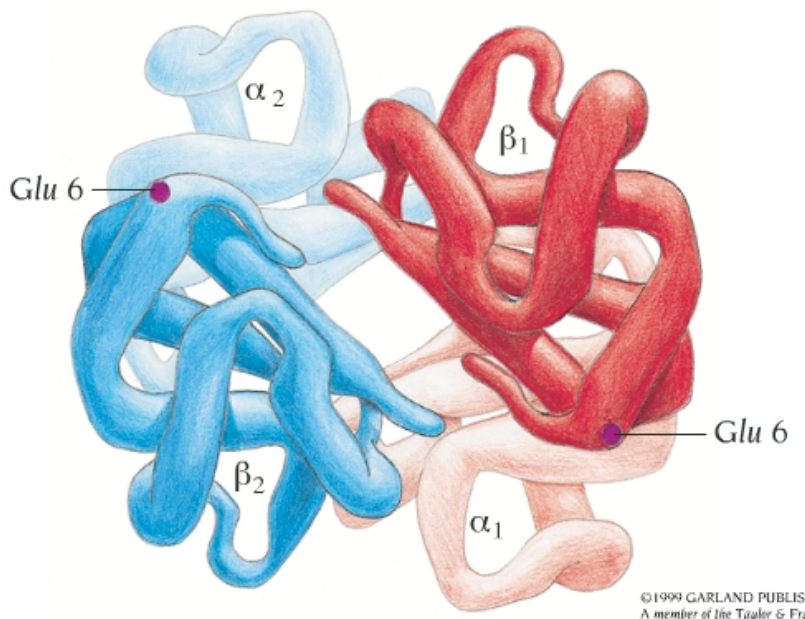
➡ Seguono due forme di anemia falciforme-thalassemia β : **HbS β^+** e **HbS β^0** (ricordate i due tipi di thalassemia β ?)

➡ 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 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 **HbSβ⁺**. 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 β, se il probando e' un eterozigote composto per es. **HbSβ⁰** 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 e' il genotipo dei genitori:

- Se entrambi i genitori sono portatori sani e quindi eterozigoti per una mutazione del gene della catena β , 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 β dell'emoglobina adulta)

Il gene HBB, mappa in 11p15.5, nel cluster delle globine non- α (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 β^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 e' 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 e' presente un allele beta-thalassemico (lo si vede dall'alterato rapporto alfa/beta) e' 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 e' stato individuato si puo' ricorrere al sequenziamento tenendo presente che se si trova una mutazione ci sono diverse possibilita':

- Mutazione mai descritta in letteratura, ma che potrebbe essere patogenetica (il meccanismo di azione del prodotto e' noto): e' presente in altri soggetti sani della famiglia?

- Mutazione mai descritta in letteratura, con effetto ignoto sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?

- Mutazione mai descritta in letteratura, ma il cui effetto si ritiene innocuo sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?

- Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere innocuo sulla funzionalita'

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

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

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

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

Curiosita' 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 mori 9 anni dopo all'eta' di 32 anni. La cosa curiosa e' che non risulta fra gli autori di quella pubblicazione proprio Irons che individuo' per primo e segui' il caso!

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. Accorpare 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 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 è sicuri della diagnosi, l'analisi di linkage con polimorfismi interni al gene, è informativa al 100% ed è 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 più dannosi), ma l'analisi di linkage non può essere utilizzata:

➤ quando il probando è 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 è mutato e la mutazione patogenetica è in un altro locus.

Tuttavia in famiglie in cui la diagnosi è certa e ci sono più membri affetti si può al 100% identificare l' "*allele Marfan*", cioè quale è 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 è raro che venga richiesta.

Curiosità 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*), è oscuro. Se fosse noto, il difetto di base della sindrome potrebbe venir identificato"

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

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

A proposito di Paganini è 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 espressivit  variabile sia per l'eta' di insorgenza che per gravit ) 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 similarit  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 è conservato nella scala zoologica e geni ortologhi sono stati trovati sia negli anfibi che nei pesci.

Il suo prodotto la policistina 1, è 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 è 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 complessità della molecola. Molti degli alleli patogenetici sono presenti in singole famiglie, hanno in comune però la caratteristica di originare proteine troncate con conseguente non utilizzo della stessa. Sono presenti anche delezioni di varia entità (circa il 3%)

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

PKD2

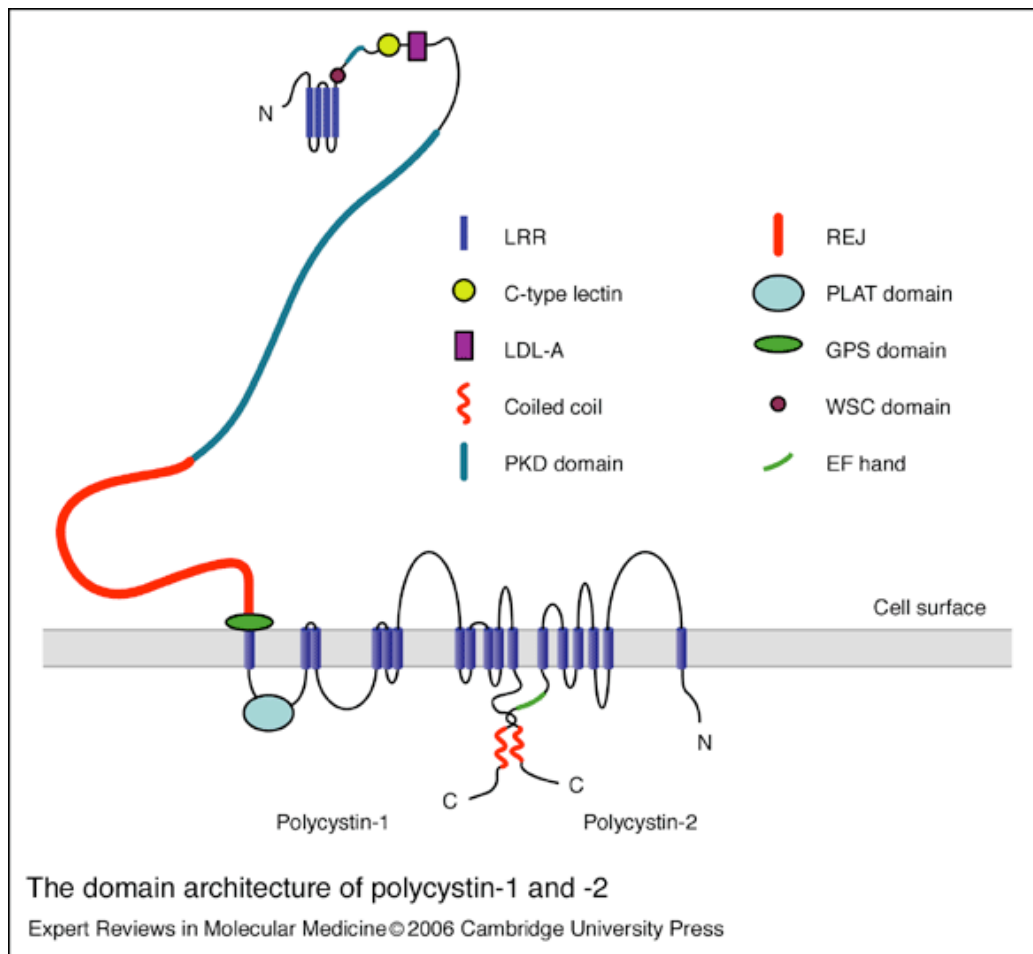
PKD2 è il secondo gene coinvolto nel ADPKD, nel 15% gli affetti presentano mutazioni patogenetiche a suo carico. Mappa in 4q22, occupa una regione genomica di 70 kb, ha 15 esoni.

Il suo prodotto è la policistina 2, che contiene 968 aa e ha un peso di circa 110kDa. È 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 permeabilità 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'855 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:

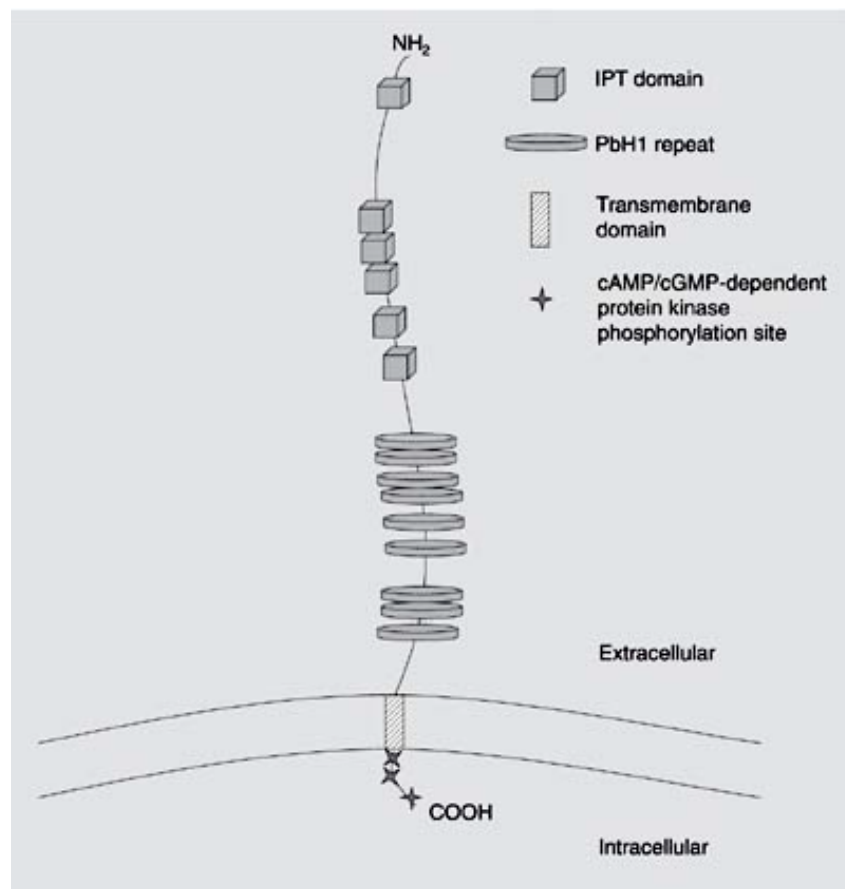
➡ La probabilita' per un affetto di avere un figlio affetto nel caso di partner wt/wt e' 0, mentre e' 100% di averli portatori.

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

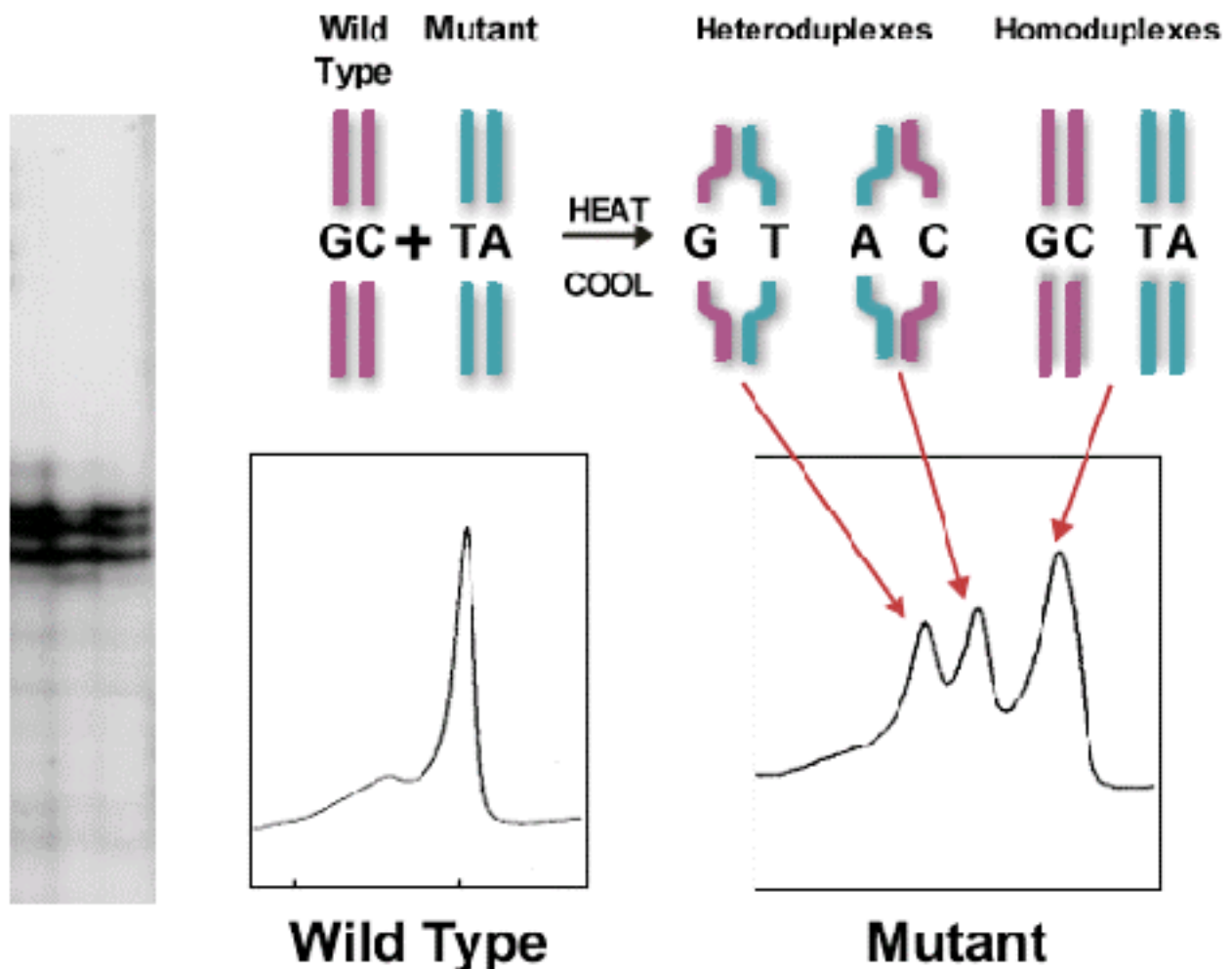
Diagnosi

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.

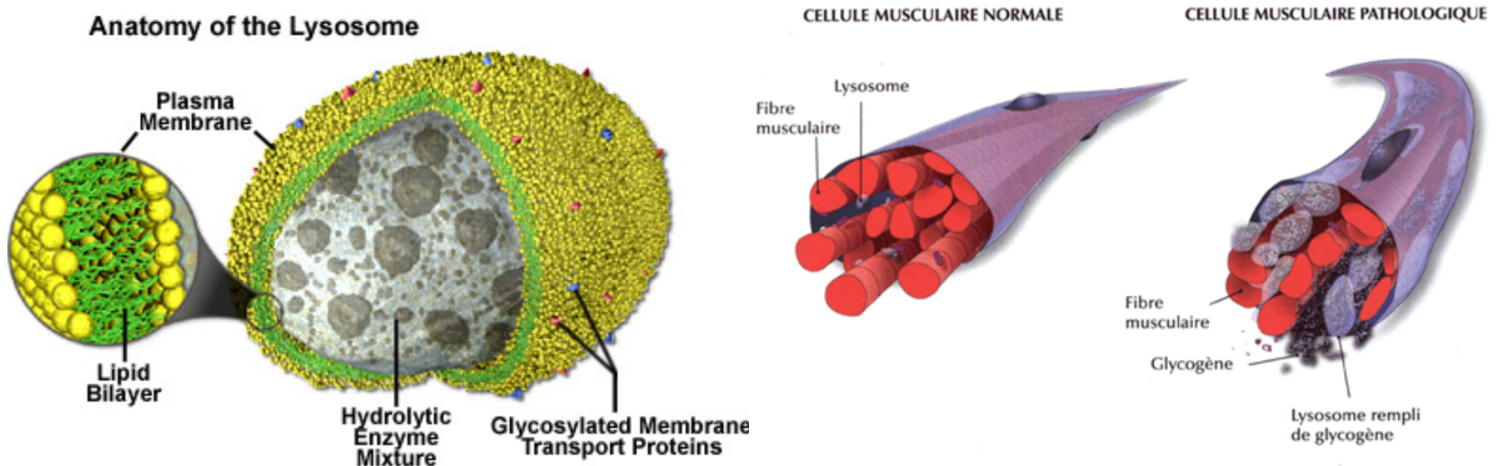
DHPLC



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..

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.



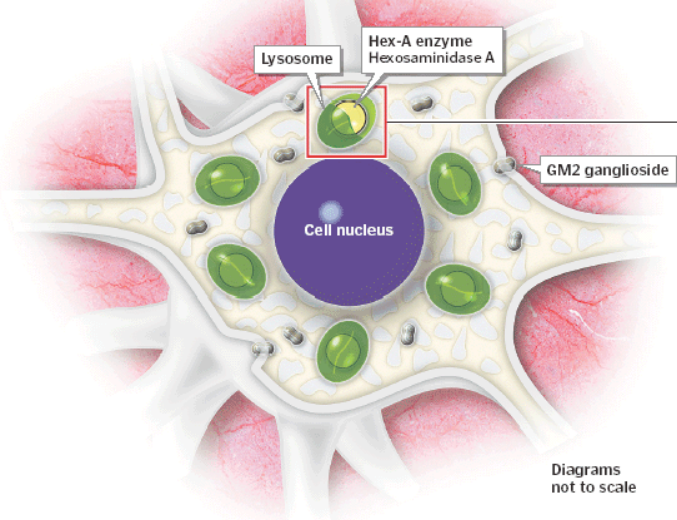
Lisosoma

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

Tay Sachs (deficit di esosaminidasi A)

Inside a nerve cell

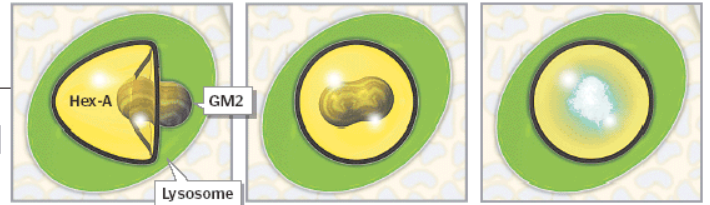


SOURCES: University Hospitals; The National Tay-Sachs & Allied Diseases Association; healthline.com; howstuffworks.com

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.

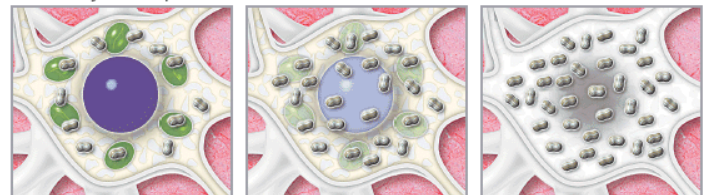
GM2 enters the lysosome where it is engulfed and digested by the Hex-A.



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:

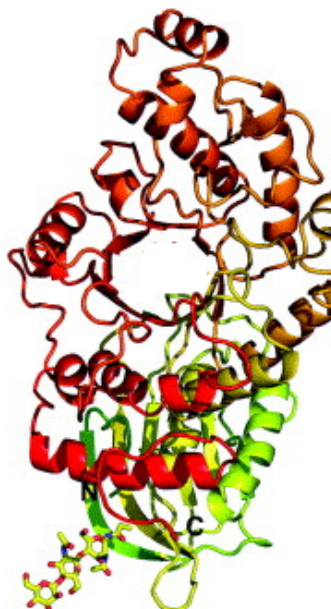
- ✎ per confermare la diagnosi,
- ✎ per individuare il genotipo dei portatori individuati con lo screening: testando le tre mutazioni comuni si individuano fra il 92 e il 94% di mutazioni fra gli Ebrei Askenaziti,
- ✎ per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia. Ovviamente l'identificazione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



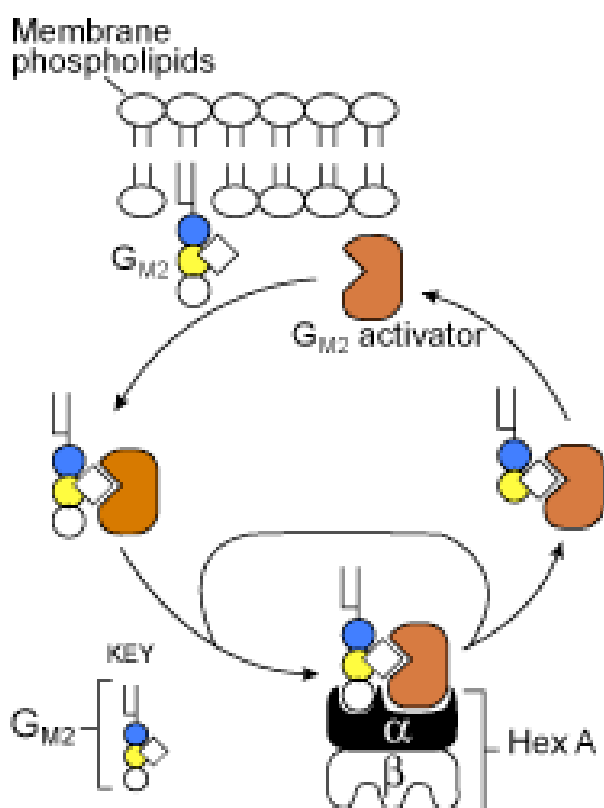
Subunita' alfa



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 realt  eterozigoti wt/pseudo e quindi non a rischio. Fra gli Ebrei la percentuale   10 volte pi  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   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%   costituito da un allele per le forme pi  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 pi  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   rilevabile con il Northern Blot.
- La seconda, ~ il 15%,   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 pi  frequente   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' non   stato identificato un dominio nelle vicinanze del C-terminale , coinvolto nel trasporto.

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

Per quello che riguarda la relazione genotipo fenotipo va tenuto presente che il livello di attivita' dell'enzima HEXA   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-Sachs B1). L'allele pi  frequente di questo tipo   **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 pi  lieve.
- Soggetti con insorgenza tardiva, sono state descritte anche mutazioni private. Quelle pi  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.

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 improntato 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. È stato determinato che il cromosoma 15 deletato è derivato dal padre in quasi tutti, se non tutti, i casi osservati. È 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 è 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.

È 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, difficoltà di linguaggio e disturbi comportamentali. Alla nascita e' presente ipotonia, difficoltà 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'obesità 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

già nati di un affetto il loro rischio è praticamente nullo: se non hanno la sindrome vuol dire che non hanno nessuna mutazione, se alla base c'è un malsegregazione di una traslocazione il rischio è 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.

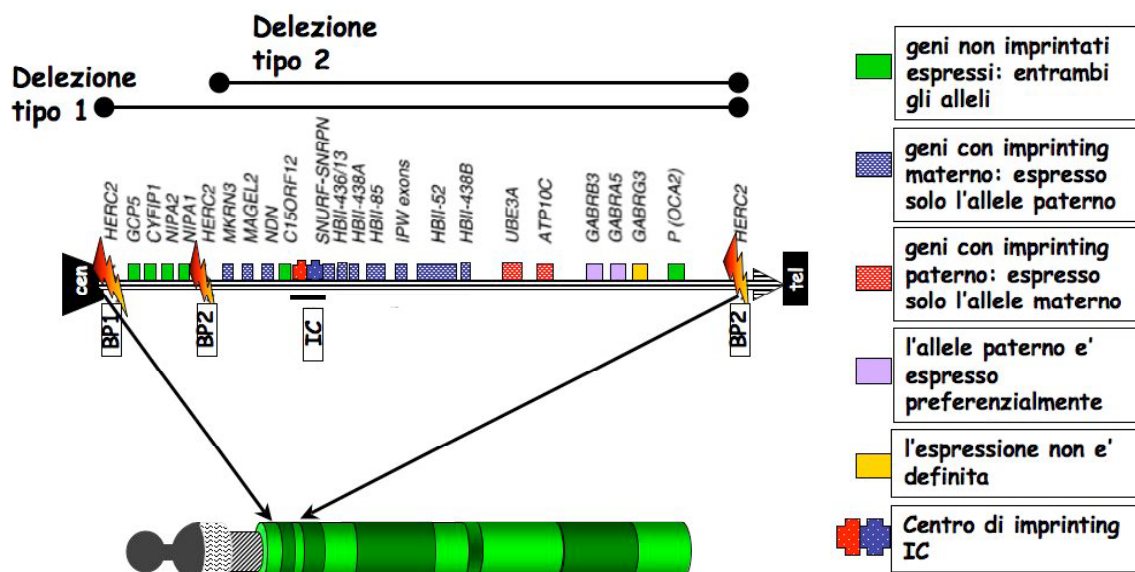
➡ La mutazione è presente nella nonna paterna allora il rischio per i suoi figli (zii del probando) di essere portatori è 50%. Se sono maschi avranno il 50% di trasmettere sia l'allele che la malattia, se sono femmine 50% di trasmettere la mutazione e 0% di avere figli malati: infatti non saranno malati 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 "imprantati" 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 puo' parlare di alleli patogenetici, dal momento che la sindrome deriva nella quasi totalita 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 breackpoint 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 e' compreso il centro di imprinting). Questo tipo di delezione visibile solo con le tecniche molecolari si ritrovano in quei soggetti che non hanno ne la delezione canonica, ne' 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 ne' variazioni di sequenza della regione del centro di imprinting. Anche questi vengono considerati portatori di un difetto di imprinting dovuto ad ad epimutazione cioe' 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 e' 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 e' 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 e' alterato.

La diagnosi si fa per capire quale e' l'origine della sindrome e escludere la pur scarsa probabilita' 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 e' che si sa cosa cercare.

Curiosita' 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 1867 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 Myotonieartigem 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 percio' 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% -ereditabilita' <1%

➡ Ib- delezioni interstiziali familiari: <1% - ereditabilita' elevata fino al 50%

➡ II nel 3-7% Disomia uniparentale paterna

➡ IIa- UPDpat e cromosomi normali: 4%-ereditabilita' <1%

➡ IIb- UPDpat da traslocazione: <1% - ereditabilita' >5%

➡ III nel 3% errori di imprinting

➡ IIIa- mutazione dell'IC con delezione:0.5%- ereditabilita' 50% se la madre ha la stessa delezione

➡ IIIb- mutazione dell'IC :~2.5%- ereditabilita' <1%

➡ IV in ~10% mutazioni nel gene UBE3A - ereditabilita' 50% se la madre e' portatrice

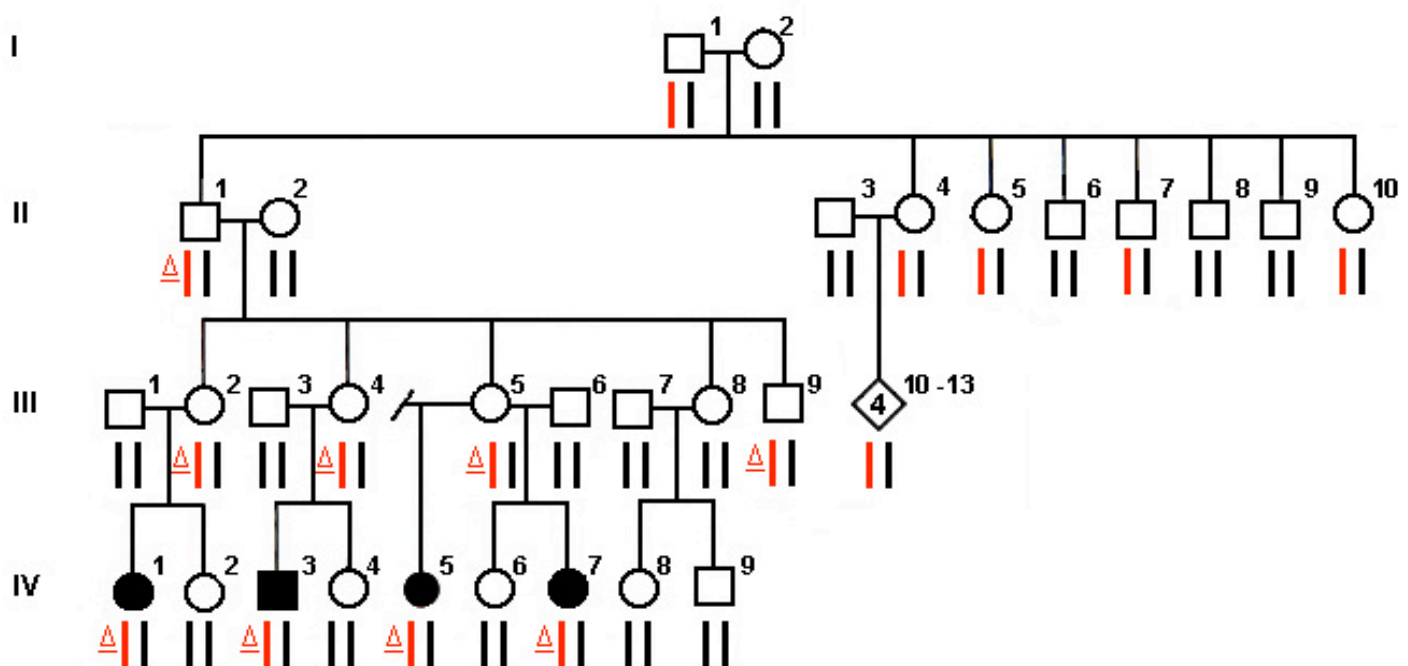


V in~ 10% meccanismi diversi non immediatamente riconducibili alla regione 15q11-13 o al gene UBE3A in presenza di storia familiare 50%

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 perché è inattivato, ed ecco che compare la malattia. Naturalmente se il wt è materno la malattia non compare, come nel caso delle microdelezioni, infatti se il gene è mutato sul cromosoma paterno non funzionerebbe comunque.

Nel 2001 (Schulze et al 2001) è stato riportato un caso di una donna PWS (in cui la fertilità è 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 infertilità legata all'ipogonadismo che per il ritardo mentale, tuttavia in questo caso ha avuto un figlio) aveva la delezione che coinvolgeva anche UBE3A; però UBE3A nel padre è spento comunque, quindi deleta o no è 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 perché AS.

Il gene UBE3A

Mutazioni puntiformi di UBE3A di origine materna provocano la sindrome di Angelman e pertanto può essere considerato il principale gene coinvolto nella genesi della sindrome. La sua struttura genomica è complessa infatti oltre agli esoni (11) che codificano per la proteina (875aaa, 100,6 kDa) che è 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 è 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 perché il suo pattern di metilazione non è diverso nei due alleli, tuttavia attraverso la RT-PCR e i polimorfismi dell'RNA eseguiti su cellule fetali è stato dimostrato che i due alleli sono entrambi espressi in tutti i tessuti tranne che nel cervello dove è espresso solo il materno in accordo con quanto trovato nel topo.

Lo stesso comportamento è stato dimostrato per un gene adiacente a UBE3A: ATP10C, nessuna differenza di metilazione ma espressione solo dell'allele materno nel cervello. È stato dimostrato che esiste un trascritto antisense che inizia dal centro di imprinting SNURF-SRNPN e termina circa 460 kb più a valle almeno fino all'estremità 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, è stata inizialmente identificata per la sua capacità 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: è la proteina accettrice dell'ubiquitina da parte degli enzimi E2 e probabilmente i suoi target sono numerosi. Il dominio coinvolto è il C-terminale. L'N-terminale sembrerebbe avere attività regolatoria della trascrizione dei recettori degli ormoni steroidei. In realtà questo non sembra entrarci molto con i danni neurologici di AS. Nei fatti anche utilizzando il modello murino non si è riusciti a chiarire perché 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.

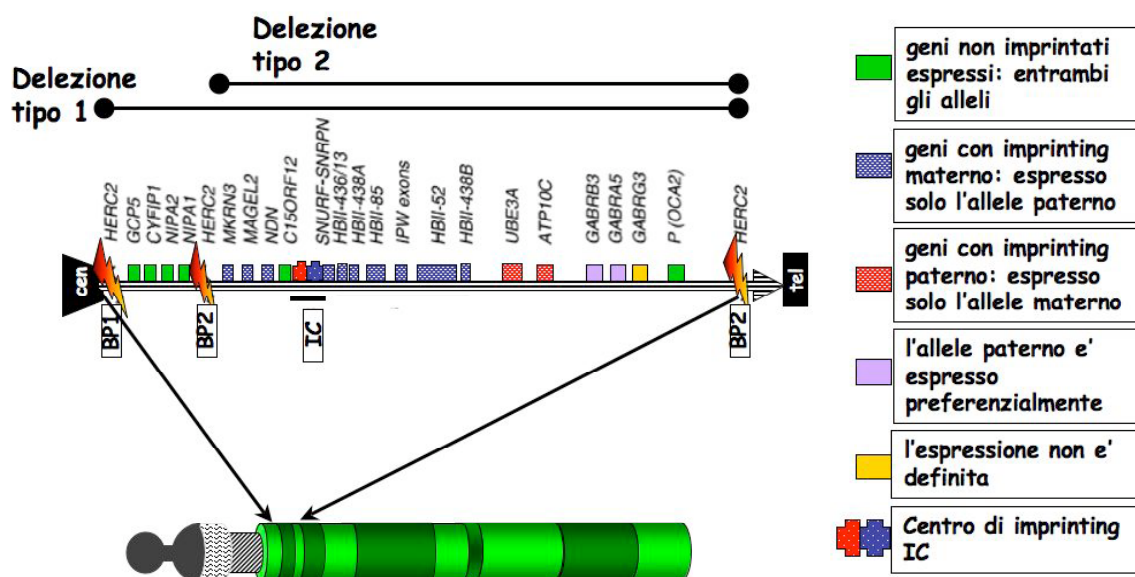


Alterazioni della regione

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.