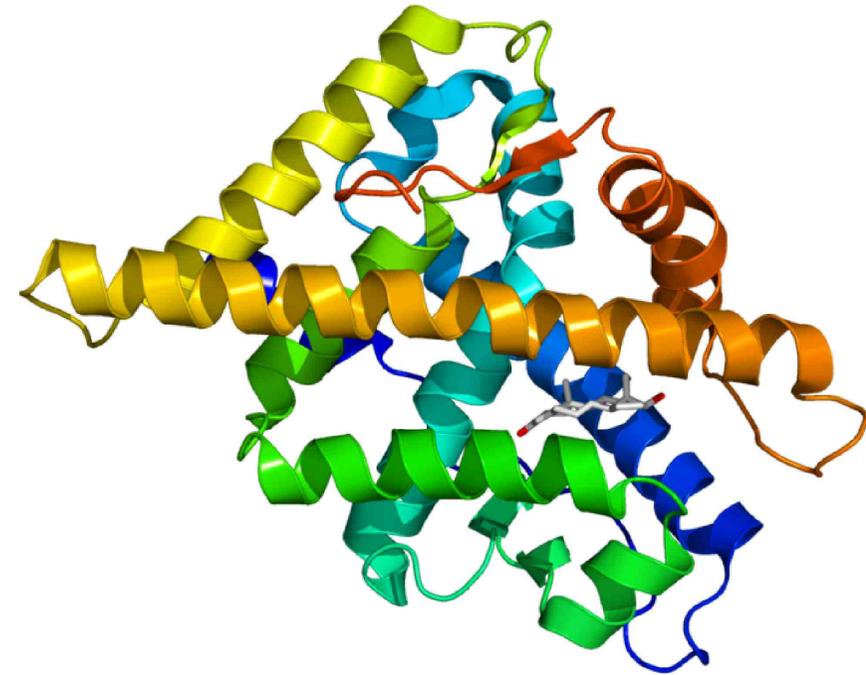




Emofilia

Gene AR



Lezione 8_9



Emofilia





Emofilia

la coagulazione e' un processo complesso legato all'attivazione di numerose proteine plasmatiche. Nell'emofilia due di queste proteine (prodotte dal fegato) sono difettive.

Esistono 2 forme di emofilia entrambe ad ereditarieta' X linked recessiva: HEMA carenza del fattore VIII, HEMB carenza del fattore IX. A volte viene indicata anche una terza forma emofilia C (carenza del fattore XI) piu' lieve e piu' rara delle altre due, ad ereditarieta' autosomica recessiva. In realta' si ritiene che il termine emofilia attribuito a questa sindrome sia scorretto.

Si presentano clinicamente identiche: in entrambi i casi esiste una forma lieve e una grave:



Emofilia

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

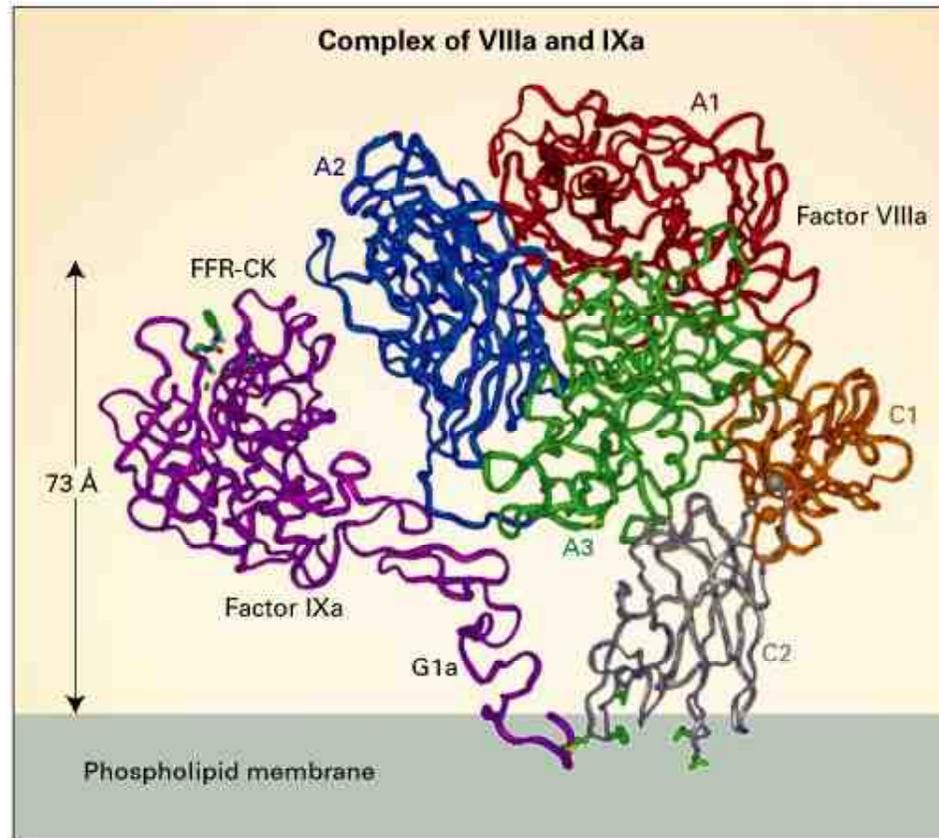
➡ **Forma moderata o lieve:** le emorragie spontanee sono molto meno frequenti, così come i problemi articolari. Alcune persone hanno una forma talmente lieve di emofilia che può passare inosservata ed essere diagnosticata per caso in età adulta.

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



Emofilia

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





Emofilia

Il dosaggio di entrambi i fattori non è attendibile nelle femmine per l'inattivazione del cromosoma X: infatti una portatrice potrebbe avere un dosaggio elevato per effetto di una inattivazione non al 50% nel tessuto esaminato. Un valore basso in una famiglia dove fosse presente un affetto, al contrario, supporta la probabilità di essere portatrice. Quindi la certezza dello stato di portatrice si ottiene solo con lo studio del DNA per individuare la mutazione o con l'analisi di linkage, qualora non si individuasse la mutazione patogenetica.

Lo studio del DNA è necessario:

☞ per confermare la diagnosi,

☞ per individuare la mutazione negli affetti e nella loro famiglia.

Ovviamente l'identificazione della mutazione è indispensabile per una diagnosi prenatale che tuttavia, vista la possibilità di terapia e la presenza di forme lievi non è particolarmente richiesta soprattutto per HEMB



Emofilia

Diagnosi

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

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



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

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



Emofilia

Curiosita' storiche

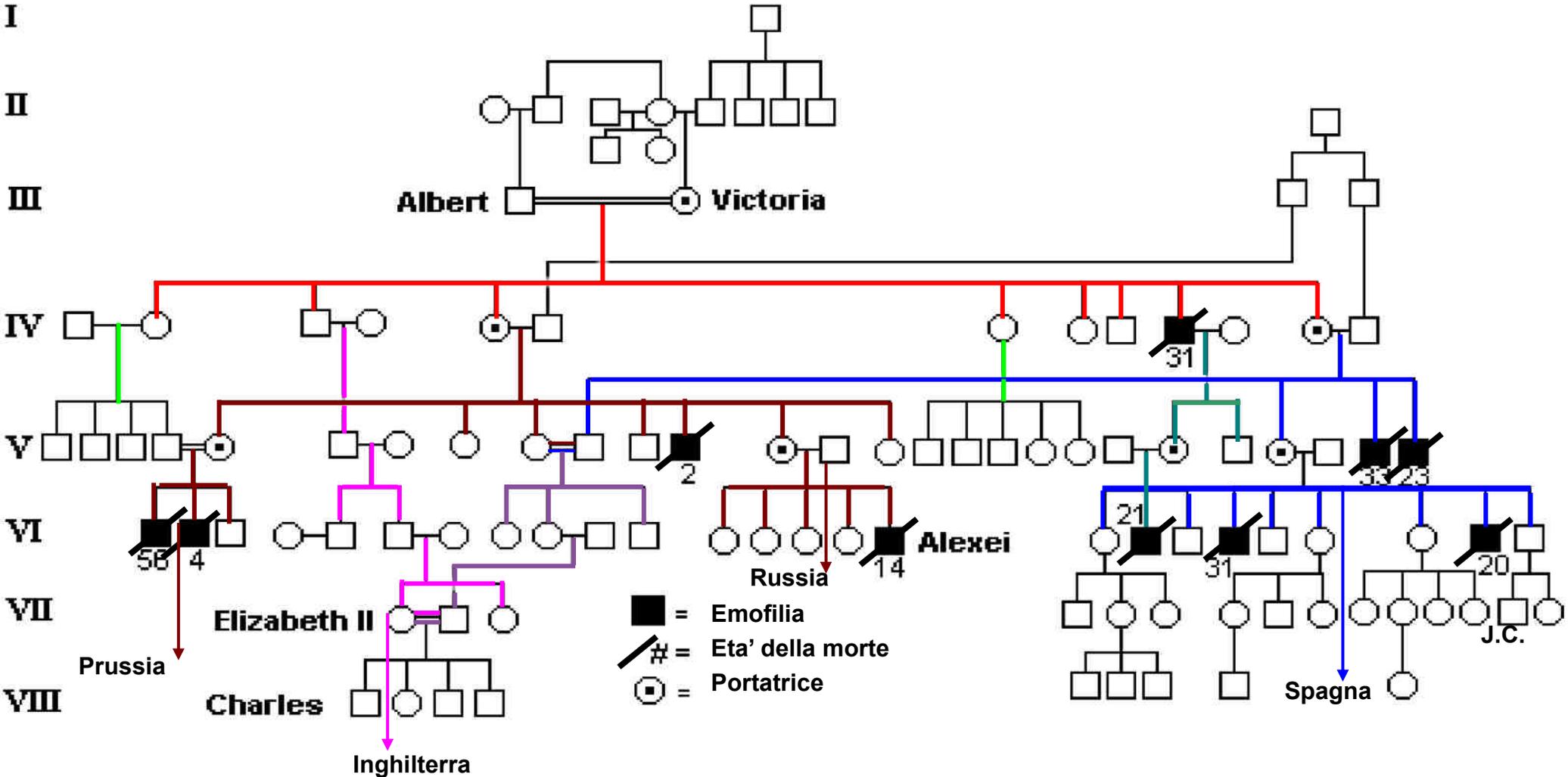
La presenza dell'emofilia come difetto della coagulazione nei maschi viene riportata varie volte nella storia:

- ✓ Nel Talmud, scritto nel II secolo AD, viene riportata la morte di bambini dopo la circoncisione rituale. Vengono perciò esonerati dall'operazione i figli di donne che avessero perso un figlio per quella ragione.
- ✓ Un medico arabo Albucasis, nel XII secolo riporta la storia di una famiglia in cui i maschi morivano anche per traumi insignificanti.
- ✓ Nel 1803 un medico di Filadelfia identifica come ereditario e presente essenzialmente nei maschi questo disturbo della coagulazione.
- ✓ Nel 1828 un ricercatore di Zurigo introduce per la prima volta il termine emofilia descrivendo la malattia.

Nel 1868 sul British Medical Journal compare la descrizione della malattia del Principe Leopoldo, terzo figlio maschio della Regina Vittoria morto a 31 per emorragia cerebrale. Da questa prima descrizione scaturì la definizione di "Royal Disease" riferito all'emofilia.



Emofilia





Emofilia

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

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

➡ 1952: si identificano le due forme A e B

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

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

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

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



Emofilia A

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

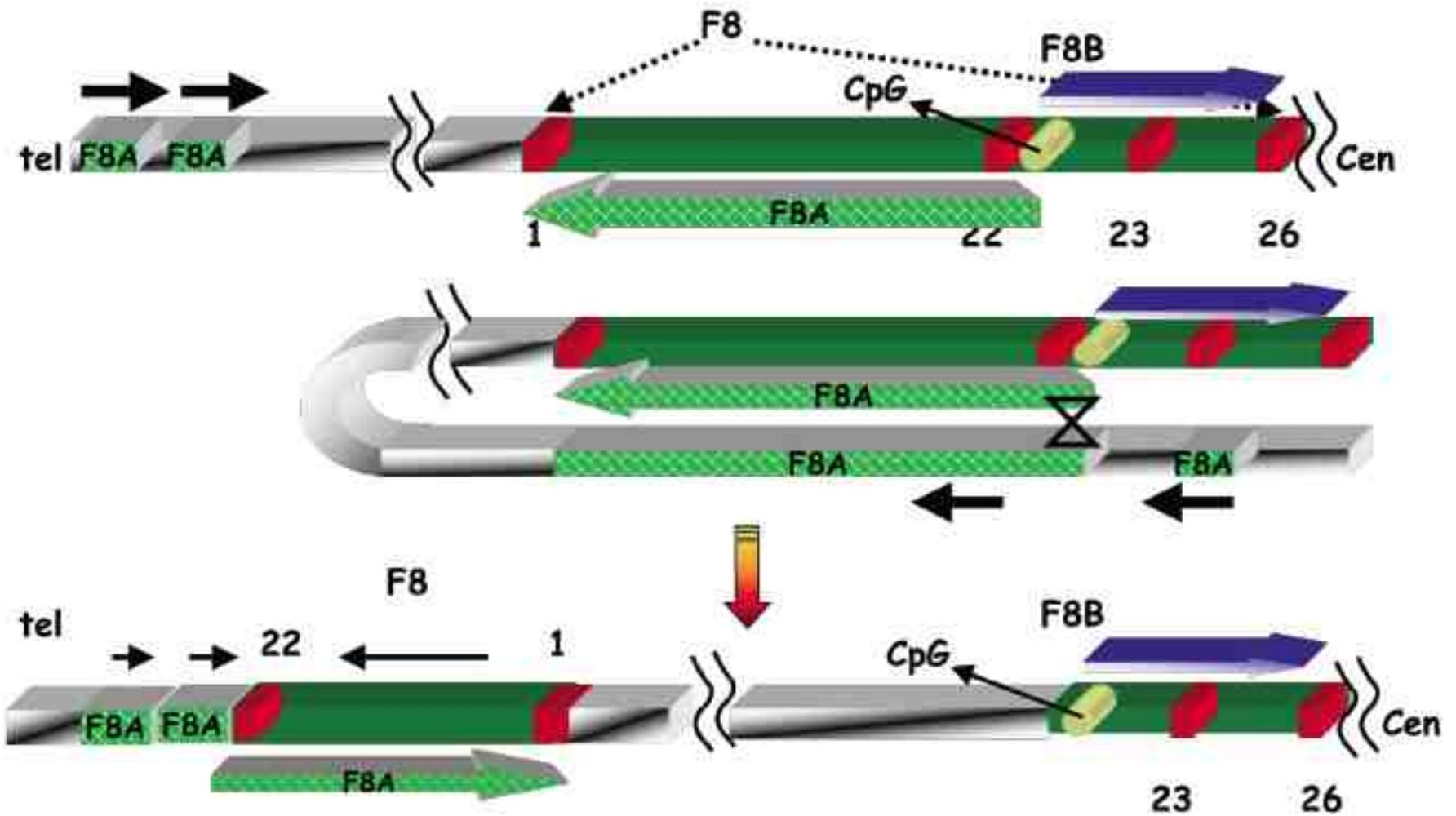
➤ l'introne 22 contiene un'isola GpC che funziona come promotore per due geni interni al gene F8 (gene che codifica per il fattore VIII) F8A trascritto in direzione inversa di F8 e F8B trascritto nella stessa direzione. Abbiamo quindi altri due trascritti entrambi ubiquitari con funzione non ben chiara

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

Cen



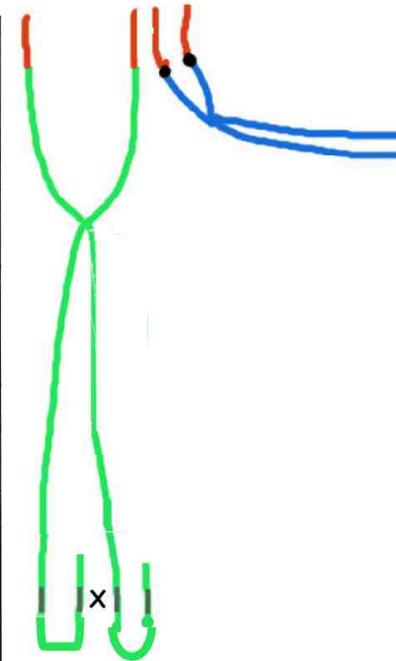
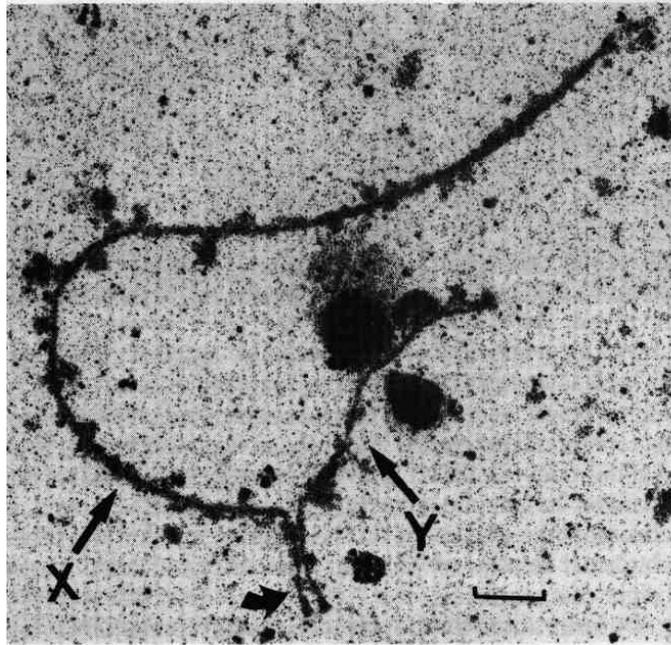
Emofilia A





Emofilia A

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





Emofilia A

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

- ✓ 1a Inversione: crossingover intracromosomico fra l'introne 22 e i due geni omologhi presenti all'estremità telomerica della regione (figura 2). Nonostante l'alta omologia fra le sequenze la ricombinazione avviene più spesso con la sequenza più telomerica. Nella popolazione è presente una variante di questa inversione originata dalla presenza aggiuntiva di una terza sequenza F8A. In tutti i casi l'inversione genera la distruzione della ORF con conseguente assenza di proteina funzionante.
- ✓ 2a Inversione: originata dalla presenza di una duplicazione invertita di parte dell'introne 1 a 140 kb a valle del gene F8.
- ✓ Delezioni, inserzioni-duplicazioni che accompagnano l'inversione.
- ✓ Il resto degli alleli è rappresentato da tutte le possibili mutazioni: delezioni, inserzioni, duplicazioni, mutazioni puntiformi missenso, non senso, di splicing, frameshift.

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



Emofilia A

Relazione genotipo fenotipo

- Le inversioni originate dal crossing over fra le copie di F8A sono associate alla forma grave: circa il 45% dei malati gravi ha questa mutazione.
- L'inversione originata da crossing over all'interno dell'introne 1 e' associata alla forma grave : circa il 5% dei malati gravi ha questa inversione.
- Mutazioni puntiformi che originano codoni di stop o frameshift sono associate al fenotipo grave
- Mutazioni che provocano alterazioni nello splicing possono essere associate sia alle forme gravi che moderata: dipende dalla modifica che originano e dalla localizzazione nel gene. Dipende se c'e' un prodotto in qualche modo funzionante.
- Mutazioni missenso: nell'80% circa sono riscontrate in casi lievi. Nell'altro 20% alle forme gravi. Di nuovo, dipende dall'effetto sul prodotto.



Emofilia A

Diagnosi

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

➡ Inversione mediata dall'introne 22: tramite southern blot o con una Long PCR o PCR inversa. Da notare che quando si comincio' ad usare la PCR per la ricerca delle mutazioni, la presenza dell'inversione era ignota e nel 50% dei casi non si trovavano mutazioni negli esoni amplificati mentre non si riusciva ad amplificare la regione compresa fra gli esoni 22 e 23 (questi due esoni integri si sono allontanati per effetto dell'inversione), si riteneva perciò che la mutazione principale fosse una delezione.

➡ Inversione dell'introne 1 essendo piu' piccola si puo' evidenziare con PCR classica.

➡ Scanning delle mutazioni e sequenziamento: si evidenziano fino al 98% delle mutazioni in probandi che non hanno l'inversione.

➡ Ricerca delle delezioni con PCR, possibile anche nelle probabili portatrici.

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

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

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



Emofilia B

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

Alleli

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

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

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



Emofilia B

Relazione genotipo fenotipo

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

Diagnosi

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



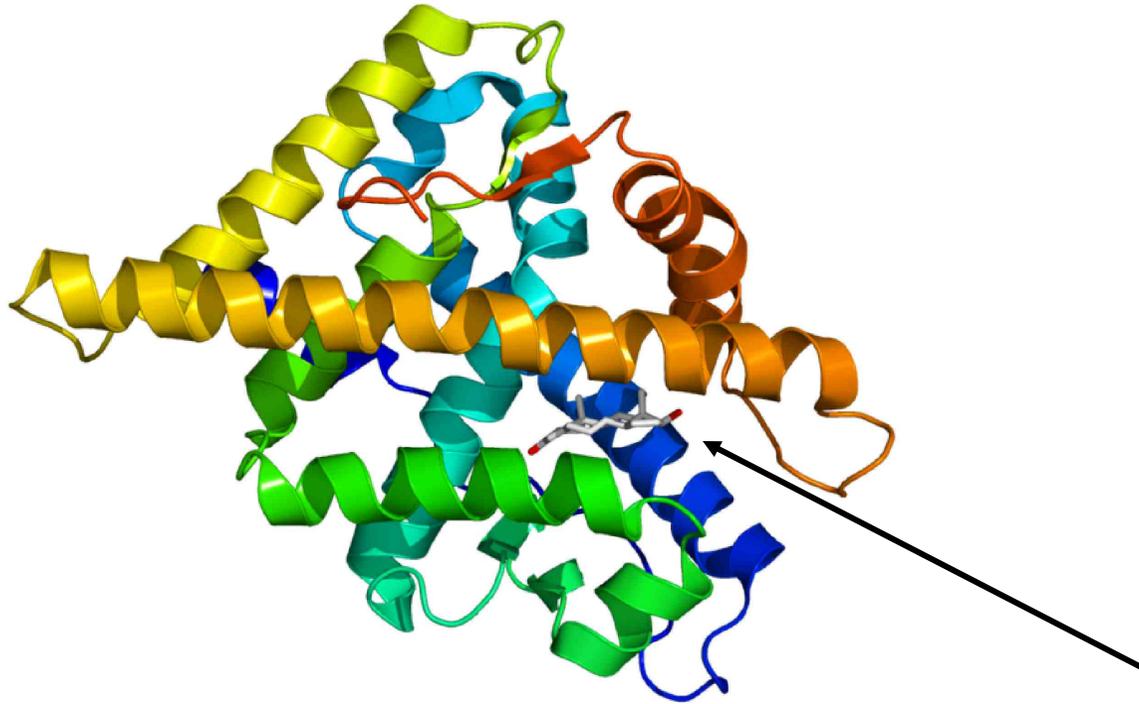
- Scanning delle mutazioni e sequenziamento: si evidenziano fino al 97% delle mutazioni, la ricerca delle mutazioni si estende anche alle regioni promotrici per individuare l'emofilia di Leyden.

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

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



Il gene AR



Recettore degli androgeni complessato con il testosterone



Il gene AR

Ci troviamo di fronte ad un esempio di eterogeneita' allelica o serie allelica: vi ricordo cosa significa

Eterogeneita' allelica e' quel fenomeno per cui due fenotipi non collegati fra loro sono originati da due alleli dello stesso gene

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

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



Il gene AR

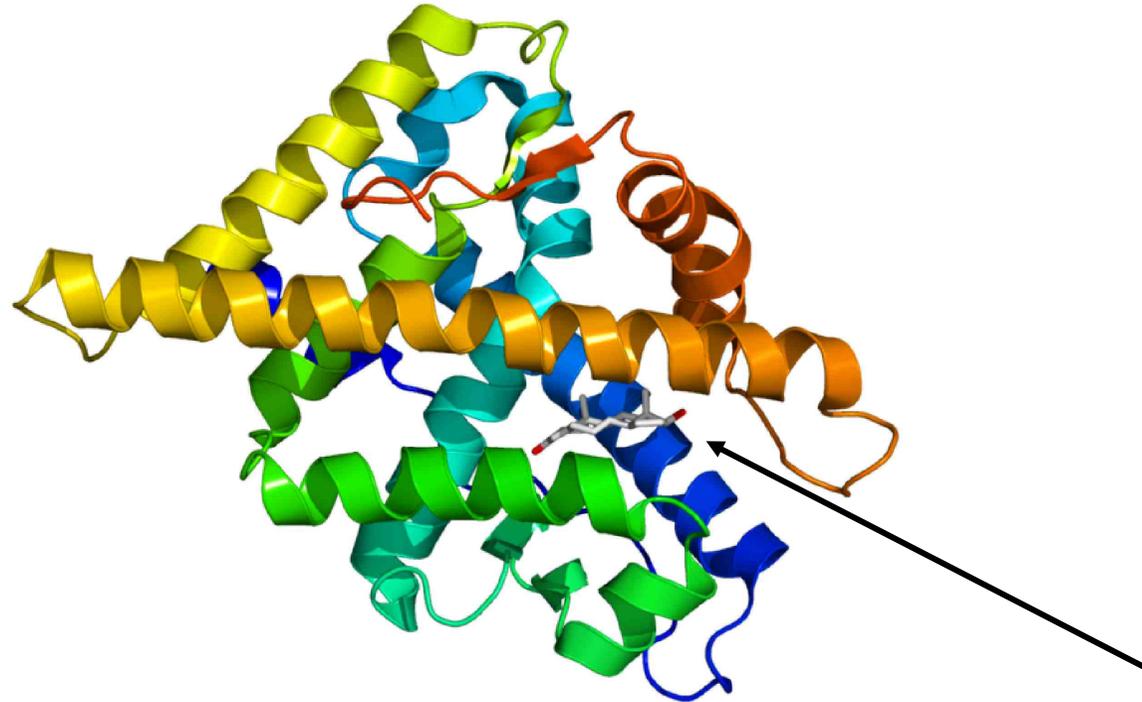
Consideriamo la struttura del gene e la sua proteina:

Mappa in Xq12, e' lungo 180,25 kb, ed ha 8 esoni. Il suo prodotto e' una proteina idrofobica composta da 919 aa, del peso di 99 kD. Appartiene alla superfamiglia dei recettori degli steroidi ed e' percio' composta dai domini caratteristici di questa superfamiglia

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



La proteina AR



La proteina e' un fattore di trascrizione attivato dagli ormoni steroidei: si lega con l'ormone, trasloca nel nucleo, si dimerizza e controlla il livello di trascrizione dei geni target degli steroidi con il contributo di altre proteine, secondo lo schema classico dei recettori degli ormoni steroidei



Gli alleli di AR

Sono presenti degli alleli polimorfici:

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



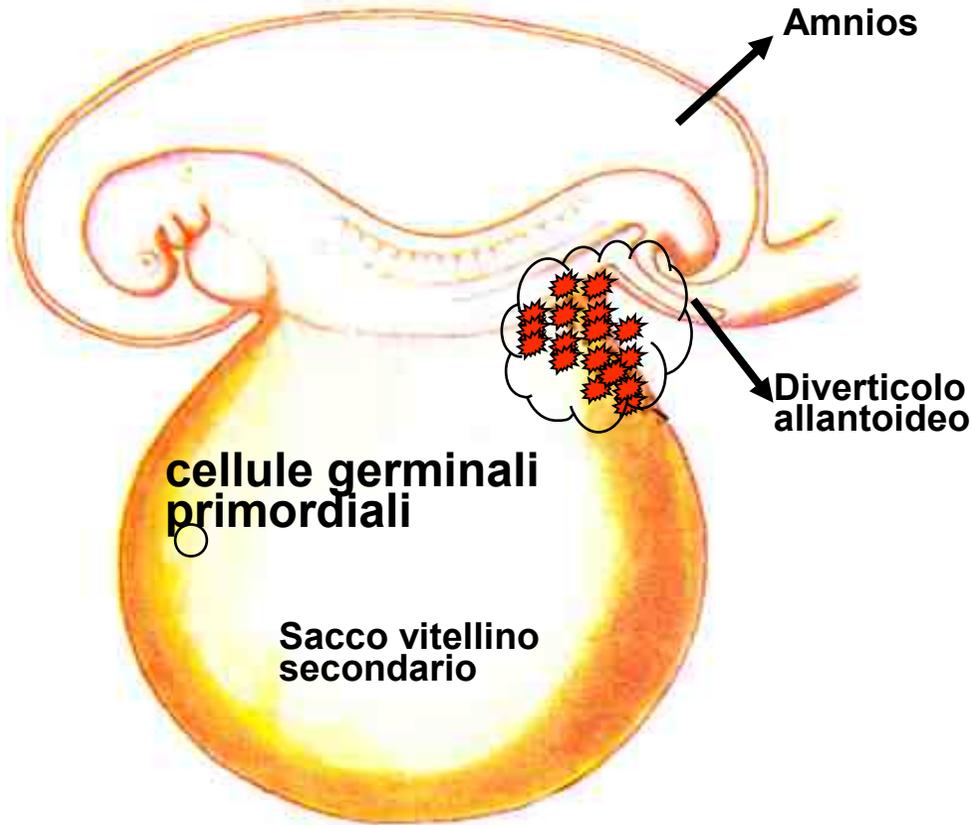
Insensibilita' agli androgeni AIS

E' una sindrome che riguarda lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, che sono sotto il controllo degli ormoni secreti dalle gonadi

Penso sia utile a questo proposito ricordare alcuni concetti di embriologia: fino alle 8-9 settimane di gestazione l'embrione e' sessualmente indifferenziato. A partire da questo periodo le gonadi indifferenziate (originatesi dalle creste genitali) cominciano a differenziarsi coerentemente con il genotipo presente: se e' assente SRY (gene che controlla il differenziamento in testicoli delle gonadi indifferenziate) si sviluppano le ovaie, se SRY e' presente i testicoli. La presenza di SRY e' legata di solito alla presenza di un cromosoma Y.



Embrione di 3-settimane



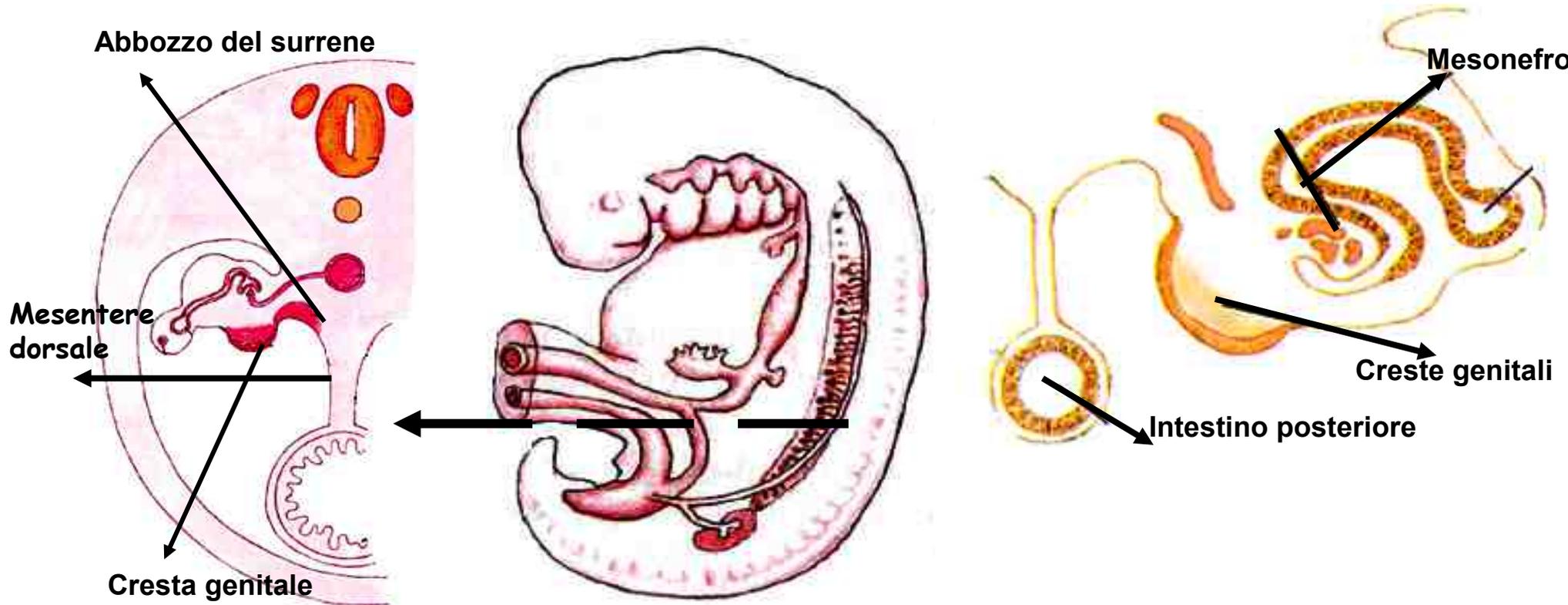
A questo stadio iniziano a differenziarsi le cellule germinali. La loro collocazione e' all'estremita' caudale dell'embrione in prossimita' dell'allantoide.

L'embrione sta cominciando a sollevarsi durante la IV settimana parte del sacco vitellino verra' inglobata nell'intestino e le cellule migreranno lungo il mesentere fino a raggiungere le creste genitali

La lunghezza dell'embrione CR(crown-rump) e' di circa **3mm**



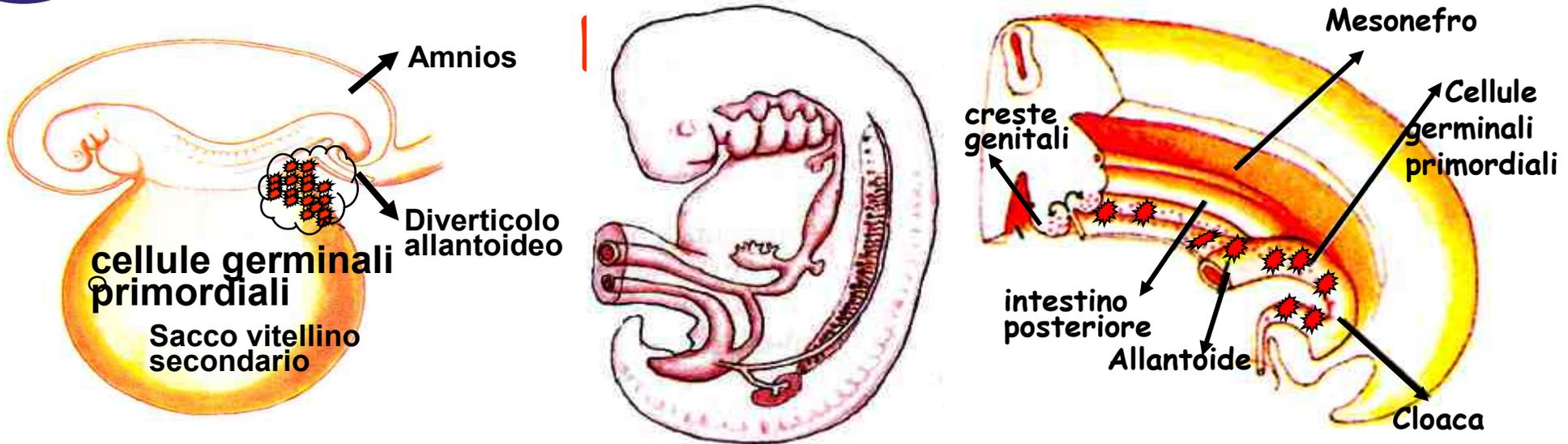
Creste genitali 5 settimane



Le creste genitali e il surrene derivano da un ispessimento dei cordoni nefrogeni (originatesi dal mesonefro) che concorreranno alla formazione dell'apparato urinario. Le cellule germinali stanno migrando all'interno delle creste risalendo lungo il mesentere dorsale



Migrazione delle cellule germinali



Embrione di 3 settimane
circa 3mm

Embrione di 5 settimane
circa 5mm

Una volta raggiunte le creste, iniziano a proliferare. Il sesso genetico e' gia' definito perche' e' determinato al momento della fecondazione. Il sesso gonadico si instaura adesso: a seconda del sesso genetico inizia un differenziamento delle creste genitali che portera' alla formazione dei testicoli o delle ovaie e al completamento del differenziamento sessuale



Dopo la migrazione

Le creste genitali sono il risultato della proliferazione dell'epitelio germinativo e del mesenchima sottostante. Si formano dei cordoni epiteliali denominati *cordoni sessuali primari* in cui migrano le cellule germinali primordiali. La gonade indifferenziata presenta uno strato esterno *cortex* e uno interno *medulla*. Sono presenti inoltre due paia di dotti: *mesonefrici (di Wolff)* e *paramesonefrici (di Muller)*.

Se l'embrione ha il cromosoma Y i cordoni epiteliali si addensano e penetrano nella medulla e formano i cordoni seminiferi, mentre la cortex forma la *tonaca albuginea*. (7 settimane). I cordoni seminiferi si sviluppano in tubuli seminiferi separati dal mesenchima, in cui si sviluppano le *cellule interstiziali (di Leydig)*. Le pareti dei tubuli sono costituite dalle *cellule nutrici di Sertoli* e dagli spermatogoni

Se l'embrione ha il cromosoma X lo sviluppo è più tardivo: l'ovaio non è riconoscibile come tale prima delle 10 settimane. I cordoni non si sviluppano, mentre la cortex aumenta di spessore e si formano dei cordoni corticali che circondano gli oogoni penetrati nello medulla. Le cellule dei cordoni formano uno strato di cellule epiteliali follicolari. La struttura costituita dalle cellule follicolari e dall'oogonio viene denominata *follicolo primario*.



Il maschio

Grazie all'azione degli ormoni prodotti dal testicolo viene stimolato lo sviluppo dei dotti di Wolff e la degenerazione dei dotti di Muller. Dai dotti wolffiani si originano l'epididimo, la vescicola seminale.

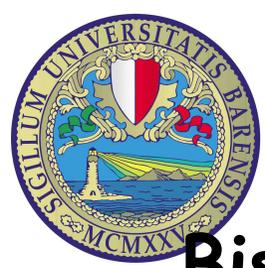
I genitali esterni, indifferenziati fino allo sviluppo della gonade, si mascolinizzano grazie agli androgeni prodotti dal testicolo. Si forma il pene dal tubercolo genitale, il cercine labiocrotale si fonde per formare lo scroto, in cui migreranno a 32 settimane i testicoli.



La femmina

In presenza di un ovaio i dotti wolfiani degenerano, mentre si sviluppano dai dotti mesonefrici i derivativi mulleriani: Le tube dalla porzione craniale, mentre le ghiandole e l'epitelio uterino derivano dalle porzioni caudali fuse. Lo stroma uterino deriva dal mesenchima che circonda i dotti.

In assenza di androgeni i genitali esterni evolvono al femminile: Il tubercolo genitale si differenzia nel clitoride, mentre i cercine labioscrotali rimangono non fusi e costituiscono le grandi labbra



I diversi tipi di sesso

Bisogna distinguere fra i diversi tipo di sesso

Sesso cromosomico: determinato dal tipo di cromosomi presenti nello zigote

Sesso genetico: determinato dal/dai geni deputati alla trasformazione della gonade indifferenziata in gonade funzionante.

Sesso gonadico: determinato dal/dai geni deputati al corretto sviluppo della gonade differenziata

Sesso genitale: determinato dal/dai geni deputati al corretto differenziamento dei genitali esterni

Sesso comportamentale: determinato dal/dai geni che influenzano il comportamento nei confronti del sesso opposto



Insensibilita' agli androgeni AIS il fenotipo

Si riconoscono tre fenotipi principali a livello fenotipico e clinico:

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



Insensibilita' agli androgeni AIS il fenotipo

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

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

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



Insensibilita' agli androgeni AIS la genetica

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

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

Genitori dell'affetta

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

Per quello che riguarda la madre:

- se ha una figlia affetta e un'altro membro della sua famiglia affetto e' portatrice certa.
- Se ha piu' di una figlia affetta e non e' stata trovata la mutazione patogenetica nel DNA estratto dai leucociti, ha un mosaicismo germinale.



Insensibilita' agli androgeni AIS la genetica

- ☞ Se ha una sola figlia affetta e storia familiare negativa:
 - ☞ L'affetta ha una mutazione *de novo* nel gene AR, perche' nella madre la mutazione non si e' trovata: il meccanismo alla base di questa situazione puo' essere:
 - ☞ Una mutazione germinale nell'uovo che ha dato origine alla proposita, percio' la mutazione e' presente in tutte le sue cellule, il rischio di ricorrenza per le successive gravidanze della madre e' basso, ma piu' alto di quello della popolazione generale: essendo l'unico caso della famiglia non si puo' escludere il mosaicismo germinale (infatti potrebbe essere un caso che la mutazione non si sia manifestata prima), per le altre donne della famiglia materna(zie e cugine della proposita) il rischio e' zero
 - ☞ Mosaicismo somatico dovuto all'insorgenza della mutazione in una cellula embrionale. La proposita ha la mutazione solo in alcuni tessuti: essendo un evento avvenuto nell'embrione il rischio di essere portatrice e' nullo per tutte le donne della famiglia comprese le sorelle della affetta.



Insensibilita' agli androgeni AIS la genetica

- ☛ Se la madre ha la mutazione presente nella figlia affetta e' una portatrice, il momento in cui si e' originata la mutazione fa la differenza per le sue sorelle e altre parenti femmine (naturalmente analizzare il DNA darebbe la risposta) questo discorso e' importante perche' ci troviamo di fronte ad una patologia X linked in cui la diagnosi di portatrice non e' immediata neanche con il DNA .
- ☛ La mutazione potrebbe essere insorta nell'uovo o nello spermatozoo, la mutazione che le ha dato origine puo' anche essere avvenuta nello spermatozoo perche' la madre di una affetta ha due cromosomi X e quindi non risente della mutazione. In questo caso le sue sorelle e parenti femmine non dovrebbero essere a rischio, a meno che non ci fosse un mosaicismo germinale nella generazione precedente
- ☛ La mutazione e' insorta allo stadio embrionale: se e' stata evidenziata nel DNA estratto dai linfociti vuol dire che comunque e' diffusa e potrebbe esserci piu' di un oocita portatore, ai fini del rischio per altre figlie in fondo non cambia nulla la madre e' comunque portatrice, per le sorelle se fosse vera questa ipotesi il rischio sarebbe pari a zero.



Insensibilita' agli androgeni AIS la genetica

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

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

Le sorelle che abbiano già superato la pubertà, sicuramente non sono affette, altrimenti sarebbero amenorroiche, ma potrebbero essere portatrici.



Insensibilita' agli androgeni AIS alleli

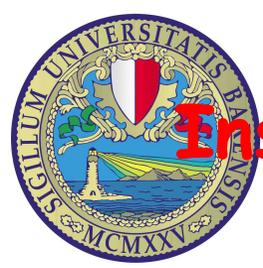
Sono state descritte 300 mutazioni che causano una delle forme di insensibilita' agli androgeni. Si ritrovano:

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



Insensibilita' agli androgeni AIS la proteina mutata

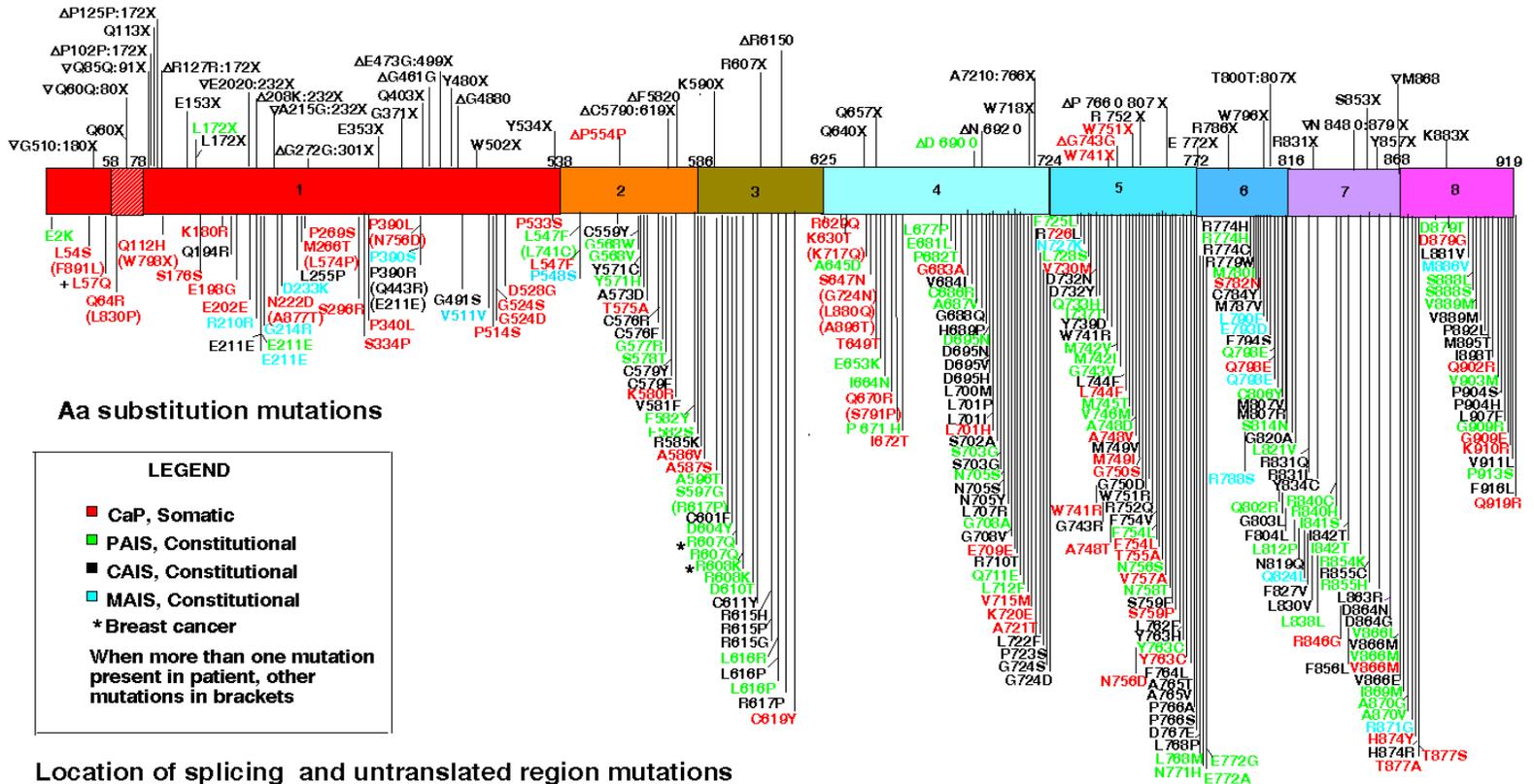
- ⇒ Quasi tutte le mutazioni nel dominio di legame con gli androgeni impediscono la loro transattivazione AR mediata. Alcune alterano l'equilibrio nell'affinita' e/o nella dissociazione, sia per tutti gli androgeni o solo per alcuni, altre provocano una instabilita' della molecola che diventa termolabile o si degrada piu' velocemente in presenza degli androgeni.
- ⇒ Le mutazioni nel dominio di legame con il DNA impediscono il legame con l'ARE (Androgen Responsive Element), e impediscono cosi alla molecola di esercitare il suo ruolo regolatorio sulla trascrizione dei geni target.



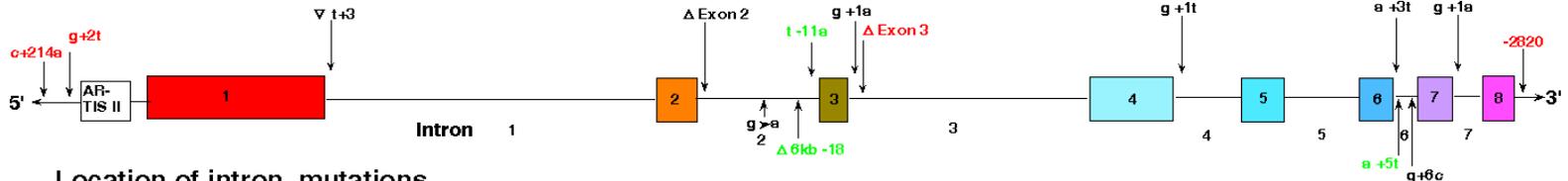
Insensibilita' agli androgeni AIS figura mutazioni

ANDROGEN RECEPTOR GENE MUTATIONS, 30-7-03

Premature termination mutations or 1-6 bp Δ or ∇



Location of splicing and untranslated region mutations





Insensibilita' agli androgeni AIS diagnosi

Per quello che riguarda la diagnostica di laboratorio sono previste una serie analisi sia a livello biochimico e analisi del cariotipo: la presenza di $46 XY$ associato ad un fenotipo femminile in cui siano presenti o meno ambiguita' dei genitali interni ed esterni, e' diagnostica.

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



Insensibilita' agli androgeni AIS diagnosi

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

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



Insensibilita' agli androgeni AIS diagnosi

➤ ricerca delle delezioni/duplicazioni esoniche.
Questi test si effettuano se il primo non ha dato risultati, tenendo conto che questo tipo di mutazioni sono rare: nell'affetta, avendo un solo cromosoma X e conoscendo la sequenza, e' relativamente semplice, per le portatrici si ricorre alla MLPA.

Se non ho trovato niente cosa significa, visto che la diagnosi clinica e' certa ed e' presente una diminuita o assente capacita' di legame del recettore?



- Le cause di una risposta non conclusiva sono piu' di una:
- Mutazioni nella regione regolatoria o negli introni che con i normali test di routine non vengono testati
 - Gene AR normale, ma e' presente un problema di "timing": bisogna tenere presente che la finestra temporale in cui deve avvenire il differenziamento dei genitali interni e/o esterni e' stretta. Questo significa che se lo stabilirsi della sintesi del testosterone o della risposta allo stesso e' ritardata oltre quel periodo, il risultato e' identico a quello che si ottiene avendo un recettore anomalo.
 - Gene AR normale, ma la mutazione e' presente in un altro gene il cui prodotto interagisce con il recettore (se ricordate il meccanismo di azione degli ormoni sapete che ce ne sono tanti).
 - Mosaicismo somatico, per cui la mutazione e' presente solo nei tessuti dei genitali e non nel sangue che costituisce il tessuto di elezione per l'analisi del DNA.



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

La SBMA o sindrome di Kennedy, e' una forma ad insorgenza tardiva, lentamente progressiva di atrofia muscolare X linked accompagnata da una lieve insensibilita' agli androgeni. L'eta' d'insorgenza e' compresa fra i 20 e i 50 anni, l'aspettativa di vita non e' ridotta e raramente la morte sopravviene per cause collegate alla malattia. 

Per quello che riguarda le eterozigoti, sono asintomatiche

Si ritiene che SBMA sia una patologia **limitata dal sesso**: patologia che non ha modo per le sue peculiarita' di esprimersi in un sesso.



SBMA genetica

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

Essendo X linked recessiva ad insorgenza tardiva che non compromette la fitness degli affetti e' una patologia ad andamento dichiaratamente familiare

A tutt'oggi le madri degli affetti si sono rivelate tutte portatrici, il che fa si che non sono descritte mutazioni "de novo".

Tuttavia bisogna tener presente che essendo ad insorgenza tardiva, le madri dell'affetto potrebbero non essere piu' reperibili per la diagnosi molecolare e quindi le nuove mutazione essere sottostimate.



SBMA genetica

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

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

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



SBMA Alleli

Il polimorfismo da triplette CAG presente nella popolazione varia senza effetti da 10 a 33. Da notare che la frequenza dei diversi alleli varia nei diversi gruppi etnici: gli ^{OLE} africani hanno gli alleli piu' corti, gli asiatici quelli piu' lunghi, i caucasici lunghezze intermedie.

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



SBMA la proteina mutata

il risultato di questa mutazione e' la sintesi di un dominio N-terminale piu' lungo per la presenza di una coda di poliglutammina. Questa serie di poliglutammine probabilmente altera la conformazione della proteina e provoca neurodegenerazione, come e perche' questo avvenga non e' chiaro.

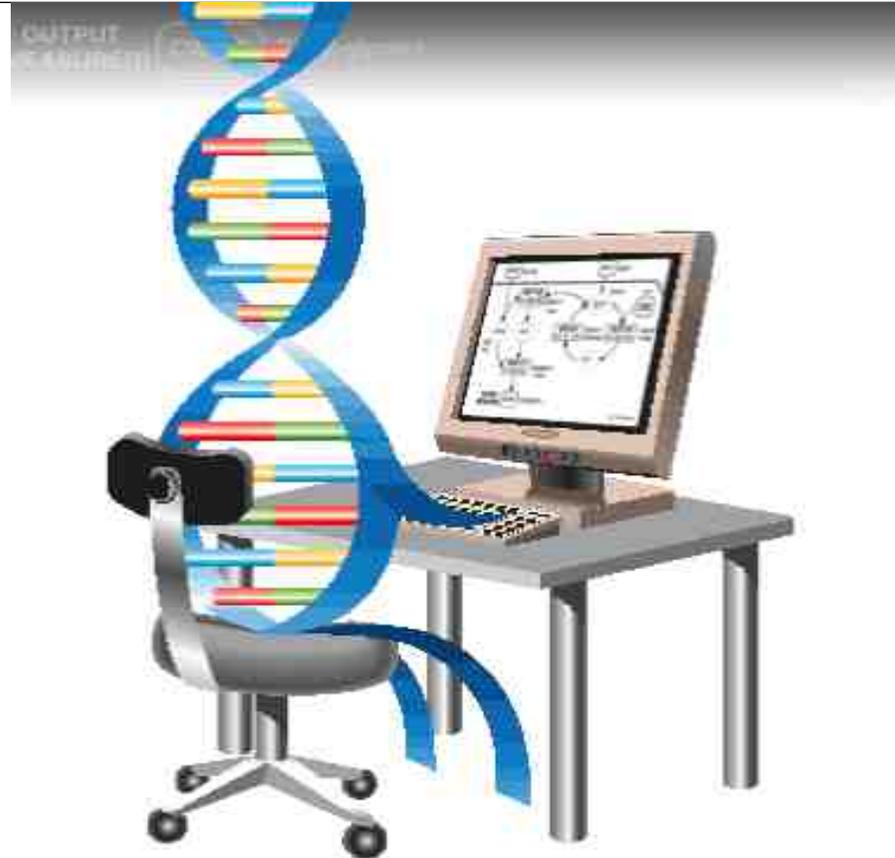
Un'ipotesi suggerisce che la coda di poliglutammine subisca una digestione dando origine ad un peptide che contiene la serie di poliglutammine, questo peptide permane nel nucleo del neurone formando delle inclusioni, la sua permanenza nel nucleo potrebbe causare la patologia interagendo con antri co-attivatori trascrizionali importanti per la sopravvivenza del neurone.



SBMA la proteina mutata

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

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



NON sono dispense, ma un ausilio allo studio sul libro