

# PROPOSTA DI LINEE GUIDA PER LA DIAGNOSI MOLECOLARE DELLA SINDROME DELL'X FRAGILE

## Gruppo di lavoro SIGU:

Grasso Marina – Laboratorio di Genetica Umana – Ospedale Galliera –Genova

Melis Maria Antonietta –Lab. Ematologia Dip.Scienze Biomediche e Biotecnologiche Università Cagliari

Murgia Alessandra – Laboratorio di Biologia Molecolare – Dip. Pediatria, Università Padova

Neri Giovanni, Pomponi M.G. – Istituto Genetica Medica – Università Cattolica “Sacro Cuore”- Roma.

## INTRODUZIONE

La sindrome del cromosoma X fragile è la forma più frequente di ritardo mentale ereditario, con una prevalenza stimata di 1:4000 maschi<sup>1</sup>; è dovuta alla mutazione del gene *FMRI* localizzato in Xq27.3. Questa mutazione (FRAXA) consiste in una amplificazione e successiva metilazione di una sequenza di triplette CGG, localizzata nella porzione trascritta ma non tradotta del primo esone del gene, ed è responsabile di un blocco della trascrizione. Gli alleli normali hanno un numero di triplette compreso fra 5 e 44; negli alleli mutati questo numero è superiore a 200. Alleli con un numero di triplette compreso fra 56 e 200 (premutazioni) sono normalmente espressi ma risultano instabili, con forte tendenza alla transizione verso la mutazione completa nel corso della meiosi femminile. Alleli con un numero di triplette compreso fra 41 e 55 occupano una “zona grigia” di incerto significato, con un possibile rischio di diventare alleli premutati nelle successive generazioni. Questa difficoltà di poter distinguere con certezza gli alleli “instabili” da quelli “normali” si riflette sulla stima di prevalenza delle portatrici di premutazione. Quella più ampiamente citata riporta un valore di 1:259 femmine nella popolazione generale<sup>2</sup>.

L'analisi della mutazione FRAXA è ormai entrata nella routine diagnostica del laboratorio di genetica molecolare e il numero di esami richiesti, sia prenatali che post-natali, è in continuo aumento. Benché l'analisi, di per sé, non presenti particolari difficoltà di esecuzione, tuttavia alcune peculiarità quali il polimorfismo del gene, la sua possibile configurazione in forma metilata o non metilata, l'esistenza di mosaicismi sia di lunghezza che di metilazione, rendono necessario che essa venga effettuata in laboratori con esperienza e competenza e in grado di attuare sia la metodica della reazione polimerasica a catena (PCR) che quella del Southern blotting. Quest'ultima in particolare non può essere sostituita da alcun'altra metodica ed è ancora da considerarsi quella di elezione, nonostante i costi relativamente alti.

La proposta di linee guida per l'analisi molecolare della sindrome X fragile e dello stato di portatore sano vuole essere un contributo per la corretta applicazione di una diagnostica destinata ad espandersi ulteriormente, se si considera che è ormai ritenuto indispensabile sottoporre ad analisi per X fragile ogni paziente, maschio o femmina, che sia affetto da una forma di ritardo mentale non altrimenti diagnosticata. La proposta, in quanto tale, è aperta a contributi che portino ad un suo miglioramento qualitativo ed una sua più efficace applicabilità pratica.

## DEFINIZIONE DELLE CATEGORIE DEGLI ALLELI

**Alleli Normali** sono quelli compresi nell'intervallo tra 5 - 44 CGG. I più comuni nella popolazione generale sono 29 e 30 CGG. Gli alleli normali sono stabili sia durante la meiosi che la mitosi.

Alleli normali stabili hanno la sequenza ripetuta CGG interrotta da una tripletta AGG ogni 9 o 10 CGG. Il significato di queste interruzioni AGG sembra essere quella di favorire il corretto appaiamento durante la replicazione e quindi impedire lo slittamento dei due filamenti di DNA. L'analisi diretta delle interruzioni AGG non è eseguita nella diagnostica di routine.

**Alleli Intermedi** (Gray Zone) sono quelli compresi tra  $\cong 45$  e  $\cong 55$  CGG. A tutt'oggi non è ancora stata osservata l'espansione a mutazione completa in una generazione, senza prima il passaggio a premutazione. Per questo motivo gli alleli intermedi possono essere considerati come normali nel senso che non sono state segnalate donne, con alleli in questo intervallo, che abbiano figli affetti. Può accadere comunque che alleli intermedi possano subire piccole espansioni e/o regressioni quando vengono trasmessi, per cui non si può escludere che nelle generazioni successive possano portare a premutazioni e mutazioni complete. Infine gli alleli intermedi possono essere trattati come piccole premutazioni se l'analisi familiare evidenzia la presenza di un soggetto con diagnosi accertata di mutazione FRAXA.

**Premutazione** è considerata un'espansione compresa tra 56 e 200-230 CGG circa.

In questo intervallo di espansione non è stata dimostrata instabilità somatica, così come non c'è ipermetilazione del promotore e la premutazione non è associata di norma a ritardo mentale; ciò nonostante sono stati recentemente segnalati alcuni maschi premutati con ritardo mentale, la cui interpretazione patogenetica è ancora di incerta. Donne eterozigoti per una premutazione devono essere considerate a rischio di avere figli affetti, sebbene fino ad oggi è riconosciuto che l'allele più piccolo che abbia generato una mutazione completa è di 59 ripetizioni CGG. L'entità del rischio di espansione da premutazione a mutazione è generalmente proporzionale alle dimensioni della premutazione.

La variabilità del limite superiore della premutazione (200-230) deriva dalla stima approssimativa, valutata su Southern blot e calcolata come differenza rispetto ad un allele normale di 500-600 bp. Tale differenza corrisponde a circa 170-200 triplette in più rispetto al normale ( $\cong 30$  CGG). Lo stato della metilazione può aiutare a definire la categoria: infatti è generalmente accettato che è premutazione un'espansione fino a 230 CGG NON metilata, e mutazione completa un'espansione di almeno 200 CGG metilata.

**Mutazione Completa** (Full mutation) comprende espansioni metilate superiori a 200-230 ripetizioni CGG, generalmente tra diverse centinaia e qualche migliaio di triplette CGG. Generalmente è presente un'ampia variabilità somatica che si traduce nella tipica diffusione dei frammenti ("smear") visibili in Southern blot. L'ipermetilazione del promotore di FMR1 (e anche della stessa sequenza ripetuta CGG) è l'evento mutazionale epigenetico che, insieme all'espansione della sequenza ripetuta, caratterizza la maggior parte delle mutazioni complete.

In alcuni tessuti come i villi coriali (CVS) il processo di metilazione del DNA può non essere ancora completato specialmente nell'epoca gestazionale durante la quale si effettua la villocentesi (11° settimana); per cui l'ipermetilazione può non essere presente entro la 12° settimana di gestazione. Per questo motivo nella diagnosi prenatale di s. dell'X Fragile è prudente effettuare la villocentesi dopo la 12° settimana ecografica. Inoltre nella diagnosi molecolare su CVS è presente anche un'alto grado di eterogeneità somatica (v. capitolo Diagnosi prenatale).

**Mosaici:** in questa categoria rientrano mosaici di lunghezza della tripletta CGG e di metilazione:

Mosaici di lunghezza della tripletta CGG : con questo termine ci si riferisce a sottopopolazioni cellulari con mutazione completa o con premutazione ( $\cong$ 15-20% dei soggetti con mutazione completa). Occasionalmente sono stati osservati pazienti con sottopopolazioni di mutazione completa e di alleli normali e/o deleti ( $\cong$  1% dei soggetti con mutazione completa). N.B. quest'ultima categoria di pazienti sfugge alla diagnosi molecolare (Falso negativo) se quest'ultima è condotta solo mediante PCR (v. capitolo Metodi di analisi molecolare).

Mosaici di metilazione : esistono pazienti nei quali sono presenti sottopopolazioni di cellule nelle quali la mutazione è metilata e altre nelle quali non è metilata ( $\cong$  5-8% dei soggetti con mutazione completa). Raramente sono stati osservati maschi emizigoti per espansioni CGG ampiamente superiori a 200 CGG, ma che mantengono il promotore del gene FMR1 non metilato, per cui non presentano il ritardo mentale ("high-functioning males")<sup>3</sup>.

## METODI DI ANALISI MOLECOLARE DELLA MUTAZIONE FRAXA

### Considerazioni generali:

Il test genetico finalizzato alla diagnosi molecolare della sindrome dell'X Fragile viene eseguito mediante **Southern blot** e **PCR**. Le due metodologie forniscono informazioni complementari: ciascun metodo non riconosce tutti i tipi di mutazione FRAXA con la stessa sensibilità; per questo motivo è generalmente riconosciuta la necessità di applicare in modo complementare entrambe le tecniche di indagine per l'identificazione dei soggetti normali, dei portatori sani, e degli affetti (comprese le atipie che la caratterizzano).

Il laboratorio che offre il servizio di diagnosi molecolare dovrebbe indicare nel referto in modo opportuno, rispetto al quesito diagnostico, le informazioni relative all'ampiezza dell'espansione CGG e relative allo stato di metilazione della mutazione.

Per fare qualche esempio:

- 1) piccole premutazioni <100 CGG vengono riconosciute in Southern blot, ma devono essere analizzate anche in PCR per una più precisa valutazione del numero di repeats.
- 2) per espansioni >100 CGG è sufficiente il risultato in Southern blot, riportando il risultato in termini di differenza di paia di basi (bp) rispetto all'allele normale (es.  $\Delta$ = 250 bp oppure  $\Delta$ >600 bp).
- 3) per espansioni al limite tra la premutazione e la mutazione è invece indispensabile testare lo stato di metilazione in Southern blot.

Nel primo caso, è evidente che sulla base del numero delle ripetizioni CGG, dipende la valutazione del rischio procreativo di una donna portatrice, nel secondo invece il rischio non cambia tra una donna con una espansione di 250 o di 350 bp o tra un soggetto con 600 bp o 1200 bp; nel terzo esempio l'analisi dello stato di metilazione può aiutare a capire se l'espansione è da considerarsi premutazione o mutazione completa.

Recentemente sono stati descritti test basati su analisi in PCR (**test di metilazione** e **MS-PCR**) che consentono di valutare anche lo stato di metilazione delle isole CpG nel promotore del gene FMR1 situato a monte della sequenza ripetuta CGG.

Infine, nel 1997 è stato messo a punto il test immunoistochimico che consente l'evidenziazione diretta della **proteina FMRP** mediante uso di un anticorpo monoclonale<sup>4-5</sup>. Tale test non viene applicato, nella diagnostica di routine ma è stato utilizzato per lo screening a scopo epidemiologico di maschi affetti da RM non diagnosticato.

\*\*\*\*\*

### **Southern blot:**

**Quelle che seguono sono indicazioni valide per l'analisi in epoca POSTNATALE.**

**Per l'analisi su CVS e Amniociti si rimanda al capitolo DIAGNOSI PRENATALE.**

Il DNA viene digerito con enzimi di restrizione, separato su gel di agarosio e dopo trasferimento su membrana viene ibridato con sonde marcate con isotopi radioattivi ( $^{32}\text{P}$ ) oppure con metodi non radioattivi (digoxigenina) (Tab.1).

Enzimi di restrizione	Dimensioni frammento normale (Kb)	Sonde Molecolari	Enzimi di restrizione associati sensibili alla metilazione	Dimensioni frammenti normali		Sonde Molecolari
				maschi	femmine	
EcoRI, HindIII	5.2	StB12.3 <sup>(6)</sup> , Ox1.9 <sup>(7)</sup> , pE5.1 <sup>(8)</sup>	EagI, BssHI, NruI, NotI	2.8	2.8+5.2	StB12.3
BglII	12	StB12.3, Ox1.9, pE5.1	EagI, BssHI, NruI, NotI	2.5	2.5+5.2	Ox1.9
PstI,	1.0	pfxa3, Ox 0.55	EagI, BssHI, NruI	2.8	2.8+5.4	pE5.1

**Tab. 1**

- L'analisi mediante Southern blot richiede un'alta qualità del DNA (che generalmente si ottiene estraendolo con fenolo-cloroformio) estratto da circa 2-3 ml di sangue periferico; sono necessari almeno 8 µg per ogni digestione enzimatica.
- L'esecuzione del test richiede almeno 12 giorni per ottenere il risultato.
- Il Southern blot è la tecnica di elezione per l'identificazione delle mutazioni complete, dei mosaicismi e delle delezioni.
- In ogni blot deve essere incluso un campione di controllo normale, (generalmente femmina nella doppia digestione), ed uno standard con bande di peso molecolare noto (generalmente frammenti di lambda digerito con HindIII).
- La corsa elettroforetica deve essere sufficientemente prolungata (20 ore a 1,8 V/cm su gel agarosio 0.8% TAE1x) in modo da consentire il riconoscimento anche di piccole premutazioni; se il quesito diagnostico è l'identificazione di una possibile portatrice sana deve essere effettuata anche l'analisi in PCR.
- Nelle femmine può succedere che se i due alleli differiscono tra loro notevolmente, si possano avere risultati apparentemente identici, ma sostanzialmente diversi, per esempio tra una femmina normale (20 e 44 CGG) ed una eterozigote per una piccola premutazione (35 e 60 CGG) per questo motivo è opportuno analizzare in parallelo una femmina di controllo con espansione nota ed effettuare l'analisi in PCR ogniqualvolta si evidenzia un "doppietto" di bande in una femmina.
- L'analisi in Southern blot mediante doppia digestione con enzima sensibile alla metilazione può essere molto utile per definire se un'espansione è da ritenersi premutazione o mutazione completa: es. è da considerarsi mutazione completa un'espansione di 200 CGG ( $\Delta = 600$  bp) metilata, mentre è da considerarsi premutazione un'espansione di 230 CGG ( $\Delta = 700$  bp) che risulti non metilata.
- Nelle femmine, piccole premutazioni sono più facilmente evidenziabili se l'allele normale è piccolo e/o la migrazione elettroforetica è prolungata, mentre espansioni CGG ampie o diffuse sono facilmente identificabili se la migrazione elettroforetica è più breve.
- Poichè una mutazione completa può dare un segnale autoradiografico talvolta molto diffuso e debole, diventa importante che il segnale specifico di fondo sia basso. E' bene sottolineare che in un maschio la mutazione completa si manifesta con il tipico «smear» di bande ad alto peso molecolare, e con la contemporanea assenza della banda normale di 2.8 kb, mentre in una femmina eterozigote per una mutazione completa lo «smear» della mutazione

completa, può essere coperto dal segnale di fondo se questo è alto («filtro sporco») portando quindi ad una errata diagnosi di normalità.

- Poiché l'analisi in Southern blot mediante doppia digestione con enzima sensibile alla metilazione, indica indirettamente il sesso dell'individuo in esame, può talvolta essere utile per l'identificazione di aneuploidie coinvolgenti il cromosoma X (es. 45,X e 47,XXY).

\*\*\*\*\*

## PCR

Dal 1991 ad oggi sono molteplici i protocolli di analisi in PCR che sono stati pubblicati usando differenti sets di primers, condizioni di amplificazione e metodi di separazione dei frammenti<sup>9-12</sup>.

- La quantità di DNA richiesta per un'analisi in PCR è sicuramente minore (50-100 ng) rispetto a quella in Southern blot (8 µg), ma deve essere DNA ad alto peso molecolare, non degradato.
- Siccome la quantità di DNA necessaria è inferiore può essere estratto da tessuti ottenuti con modalità meno invasive del prelievo di sangue come le cellule di desquamazione della mucosa buccale.
- I tempi di esecuzione sono più brevi (3-4 giorni)
- Il numero delle ripetizioni CGG è determinato in modo più preciso mediante l'amplificazione della sequenza ripetuta CGG con l'uso di primers che la fiancheggiano.
- Qualora si voglia disegnare una nuova coppia di primers è importante tenere presente la regione indicata come «hot spot» per le delezioni<sup>13</sup>.
- I prodotti dell'amplificazione possono essere evidenziati mediante colorazione con etidio bromuro dopo separazione elettroforetica su gel agarosio ad alta risoluzione (es. Agaroso Metaphore), ma questo tipo di separazione produce una scarsissima risoluzione dei frammenti (apparentemente co-migrano alleli che differiscono anche di 3-4 triplette/9-12 bp).
- I prodotti dell'amplificazione possono essere ottenuti usando invece primers marcati con isotopi radioattivi (e l'analisi richiede il tempo aggiuntivo per il trasferimento e l'autoradiografia) oppure con primers marcati con fluorocromi e il prodotto di amplificazione separato e analizzato su sequenziatore automatico. La separazione sul gel di poliacrilammide consente un'ottima risoluzione anche di alleli che differiscono per 1 tripletta.
- Indipendentemente dalle modalità di separazione dei prodotti di amplificazione, è indispensabile usare un appropriato standard con frammenti di peso molecolare noto e amplificare nelle stesse condizioni almeno un campione di controllo positivo con espansioni di dimensioni note.
- L'analisi in PCR non identifica mutazioni complete e le premutazioni che superano 100-120 CGG non si amplificano.
- I maschi affetti da RM che presentano un mosaicismo mutazione completa/allele normale (1% circa dei soggetti con mutazione completa) possono sfuggire ad una corretta diagnosi se analizzati solo mediante PCR. Infatti se l'allele normale è presente anche in una piccola percentuale di cellule, si amplifica conducendo ad una diagnosi errata di normalità (falso negativo). Tali mosaici sono identificabili correttamente mediante analisi in Southern blot.
- Se in un maschio con RM si evidenzia mediante PCR una premutazione è indispensabile procedere con l'analisi in Southern blot per escludere un mosaicismo premutazione/mutazione completa (mosaicismo presente nel 15-20% dei soggetti con mutazione completa).
- Femmine eterozigoti per una premutazione (es. 30/170 CGG) e femmine omozigoti per un allele normale (es. 30/30 CGG) possono generare lo stesso risultato in PCR: cioè

l'identificazione di un solo allele di 30 CGG. Nel primo caso la preferenziale amplificazione dell'allele normale può impedire l'identificazione dell'allele premutato, nel secondo caso i due alleli di 30 CGG co-migrano. Per questo motivo in tutte le femmine se non sono evidenziabili due alleli distinti è indispensabile procedere all'analisi in Southern blot.

- Le femmine omozigoti per uno stesso allele sono circa il 20-30%.

\*\*\*\*\*

### **Test di metilazione mediante PCR:**

Questo test<sup>14</sup> prevede di effettuare una prima digestione del DNA con un enzima di restrizione sensibile alla metilazione (es. EagI) e successivamente una reazione di PCR utilizzando una coppia di primers immediatamente fiancheggianti il sito di restrizione in esame, che è nel promotore del gene FMR1 cioè a monte della sequenza ripetuta e quindi esterno ad essa.

- 1) Se il sito EagI è metilato (paziente con mutazione completa) l'enzima non ha tagliato il DNA.
- 2) Se il sito EagI non è metilato (maschio normale) l'enzima taglia in corrispondenza del sito EagI.

Nel primo caso i primers fiancheggianti amplificano la sequenza comprendente il sito EagI e nei pazienti sarà visibile il prodotto di amplificazione; nel secondo caso l'avvenuta digestione del DNA impedisce nei maschi normali la visualizzazione dell'amplificato.

Questo test solitamente viene associato all'analisi in PCR con primers fiancheggianti la sequenza ripetuta mediante la quale si ottengono risultati esattamente opposti: mancata amplificazione nei pazienti, e prodotto di amplificazione nei normali.

Limiti nell'applicazione:

- è applicabile solo ai maschi
- in caso di digestione parziale si possono avere dei falsi positivi.

\*\*\*\*\*

### **MS-PCR :**

La Methylation-Sensitive PCR è un metodo che si basa sulla capacità del bisulfite di convertire i residui di Citosina non metilata in Uracile su uno dei due filamenti del DNA, e sulla successiva amplificazione del filamento antisenso con primers specifici per i residui di Citosina metilata; questa amplificazione avverrà solo nei maschi affetti.

Nel 2001 è stato descritto un test MS-PCR<sup>15</sup> che mediante l'uso di un set di 7 coppie di primers associa la MS-PCR alla amplificazione del tratto di sequenza ripetuta CGG permettendo così di avere informazioni sia sulla lunghezza del repeat CGG che sullo stato di metilazione dell'isole CpG nel promotore a monte del gene FMR1. Questo metodo, secondo gli Autori, consentirebbe di riconoscere sia nei maschi sia nelle femmine tutte le condizioni al locus FRAXA: da quella di normalità a quella di premutazione, mutazione completa compresi i mosaicismi e le delezioni. Per ora il metodo non ha trovato diffusione nella diagnostica di routine.

## DIAGNOSI PRENATALE

La diagnosi prenatale (D.P.) di sindrome dell'X Fragile va effettuata solo a donne nelle quali sia stato precedentemente accertato lo stato di portatrice di premutazione e/o mutazione completa e va eseguita mediante Southern blot. L'analisi in PCR può essere effettuata a completamento dell'indagine per la valutazione più precisa di alleli intermedi e/o piccole premutazioni. La D.P. può essere eseguita sia su DNA estratto da amniociti che da villi coriali (CVS); nel secondo caso è bene conoscere le peculiari caratteristiche del tessuto in esame e quindi osservare alcune precauzioni.

- Generalmente a 11-12 settimane di gestazione l' inattivazione del cromosoma X nei CVS non è ancora completata, e la metilazione associata alla mutazione può essere o non essere presente. In letteratura sono descritti casi di discordanza tra lo stato di metilazione di una mutazione completa su CVS e sui tessuti fetali. Per questo motivo la valutazione dell'espansione della sequenza ripetuta CGG diventa di fondamentale importanza. Peraltro, l'incompleta inattivazione del cromosoma X nei villi coriali consente di riconoscere un'eventuale contaminazione materna, nel caso fosse piuttosto intensa la banda corrispondente al cromosoma X inattivo.
- Per i motivi sopradescritti la villocentesi è bene che venga effettuata non prima della 12° settimana ecografica compiuta.
- Il grado di instabilità somatica può essere molto variabile nei CVS, per cui è possibile osservare espansioni che originano sia bande "discrete" sia "smears" così diffusi da essere scarsamente visibili in Southern blot. Gli "smears" diffusi possono essere resi più visibili dopo digestione con enzimi HindIII o BglII e riducendo le ore di corsa elettroforetica.
- In Southern blot è opportuno allestire parallelamente sia la doppia digestione (generalmente EcoRI+EagI o HindIII+EagI) che la digestione con un solo enzima che consenta la sola valutazione dell'espansione CGG (es. HindIII o EcoRI o BglII).
- Se si ottengono risultati che, sulla sola base della dimensione dell'espansione CGG, sono al limite tra premutazione e mutazione, è bene prendere in considerazione una ripetizione dell'indagine molecolare su amniociti o su sangue funicolare.
- Sebbene raramente, siano stati descritti mosaicismi tra CVS e altri tessuti fetali, quando su CVS si evidenzia una premutazione è bene valutare l'opportunità di un controllo su amniociti o su sangue funicolare per escludere la presenza di una mutazione completa nei tessuti fetali.

In conclusione si raccomanda che ogni donna che si sottopone a diagnosi prenatale per la sindrome dell'X Fragile sia adeguatamente informata in maniera semplice ma esauriente; il consenso informato scritto, deve essere discusso con personale qualificato e con adeguato anticipo rispetto alla data fissata per il prelievo (villocentesi o amniocentesi). Nel consenso informato dovrà essere anche specificato che, in caso di riscontro di mutazione completa in un feto di sesso femminile, è praticamente impossibile predire se questa sarà o no affetta da ritardo mentale.

## CONCLUSIONI

A undici anni dall'identificazione del gene FMR1 e della conseguente applicazione nella routine di laboratorio dell'analisi molecolare su DNA, è comunemente riconosciuto che non esiste un singolo test che riesca a riconoscere tutte le caratteristiche molecolari della mutazione FRAXA <sup>(I-IV)</sup>. Per questo motivo PCR e Southern blot vanno utilizzati opportunamente, in base alle informazioni specifiche che possono fornire.

Molti sono i laboratori che utilizzano l'analisi in PCR come primo screening, seguita dall'analisi in Southern blot solo nei casi in cui non si osserva il prodotto di amplificazione nei maschi, oppure si osserva una sola banda elettroforetica nelle femmine. Questo approccio diagnostico, può indurre a diagnosticare come normali (falsi-negativi) i pazienti emizigoti per la mutazione completa a mosaico con un allele normale (1% dei pazienti con mutazione completa testati in Southern blot). Una recente indagine ha evidenziato che 7 su 738 maschi nei quali era stata identificata la mutazione della sindrome dell'X Fragile presentavano un tale mosaicismo (<http://www.emqn.org/guidelines/frax.html> Barton'98 <sup>III</sup>). Questo dato combinato con il dato di frequenza attesa di mutazione completa in pazienti con ritardo mentale non diagnosticato ( $\cong 5\%$ ) porta a concludere che questi mosaici si possono presentare circa 1 volta ogni 2000 soggetti con RM ai quali viene effettuato il test genetico a scopo diagnostico. Tali osservazioni devono indurre ad attenta riflessione poichè non è etico applicare tecniche per le quali è dimostrato un rischio di errore, quando sono disponibili alternative che permettono di offrire una diagnosi affidabile.

Infine, tenuto conto che la metilazione rappresenta un caratteristica fondamentale della mutazione FRAXA e considerato il frequente riscontro di atipie nello stato di metilazione del gene FMR1, il test genetico a scopo diagnostico è completo solo se viene analizzato anche lo stato di metilazione degli alleli con espansioni CGG nell'ambito della premutazione e mutazione.

In conclusione, la diagnosi molecolare di sindrome dell'X Fragile deve essere eseguita presso laboratori con esperienza e competenza, ai quali pervengano un numero di richieste pari ad almeno 300 soggetti /anno e che siano in grado di completare l'intero iter diagnostico, compresa la tecnica di Southern blotting. La diagnosi molecolare deve essere sempre accompagnata da una consulenza genetica che spieghi agli interessati, in maniera semplice ma esauriente, il significato dei risultati ottenuti, gli eventuali rischi riproduttivi connessi e gli aspetti prognostici. Particolarmente delicato è il problema della consulenza in diagnosi prenatale quando venga diagnosticata una mutazione completa in un feto di sesso femminile, in quanto in questo caso è impossibile predire se lo sviluppo psicomotorio sarà normale oppure lievemente ritardato.



## Bibliografia

1. Turner et al., Prevalence of Fragile X syndrome. *Am J med Genet* 1996; 64(I):196-197
2. Rousseau et al., Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene and amplifications for the population genetics of the Fragile X Syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 57:1006-1018
3. Hagerman R.J. et al., High functioning Functioning Fragile X males: demonstration of an unmethylated fully expanded FMR1 mutation associated with protein expression. *Am.J.Med.Genet.* 1994; 51:298-308.
4. Willemsen R, Smits A, Mohkamsing S, et al. Rapid antibody test for diagnosing fragile X syndrome: A validation of the technique. *Hum.Genet.* 1997; 99: 308-311
5. Willemsen R, Anar B, de Diego Otero Y, et al. Non invasive test for Fragile X syndrome, using hair root analysis. *Am.J.Hum.Genet.* 1999; 65:98-103.
6. Rousseau F, Heitz D, Biancalana B, Blumenfeld S, Kretz C, Boue J, Tommerup N, Van Der Hagen C, Delozier-Blanchet C, Croquette MF et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N.Engl.J Med.* 1991; 325:1673-1681
7. Nakahori Y, Knight S, Holland K, Schwartz C, Roche A, Tarleton K, Wong S, Flint T, Froster-Iskenius U, Bentley D, Davies K, Hirst M. Molecular heterogeneity of the fragile X syndrome. *Nucleic Acid Res.* 1991; 19:4355-4359
8. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu JH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Vittoria MF, Zhang FP et al. Identification of a gene (FMR1) countaining a CGG repeat coincident with a break point cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991; 65:905-914
9. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJMH, Holden J, Fenwick RG, Warren ST, et al. Variation of the CGG repeats at the Fragile X site results in genetic instability: resolution of Sherman paradox. *Cell* 1991; 67:1047-1058.
10. Yu S, Mulley J, Loesch D, Turner G, Donnelly A, Gedeon A, Hillen D, Kremer E, Lynch M, Pritchard M, Sutherland CR, Richards RI. Friagile X syndrome: unique genetics of the heritable element. *Am.J.Hum.Genet.* 1992; 50:968-980.
11. Erster SH, Brown WT, Goonewaedena P, Dobkin CS, Jenkins EC, Pergolizzi RG. Polymerase Chain Reaction analysis of fragile X mutations. *Hum. Genet.* 1992; 90:55-61.
12. Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, Levinson FN, Ding X, Dobkin CS, Xhong N, Henderson , Brooks SS, Jenkins EC. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a non-radioactive PCR test. *JAMA* 1993; 270:1569-1575.
13. Hammond LS, et al. Fragile X syndrome and deletions in FMR1 : new case and review of the literature. *Am.J.Med.Genet.* 1997;72: 430-434.
14. Wang Q, Green E, Bobrow M, Mathew G. A rapid, non -radioactive screening test for fragile X mutations at the FRAXA and FRAXE loci. *J.Med. Genet.* 1995; 32: 170-173.
15. Weinhäusel A, Haas OA. Evaluation of the fragile X (FRAXA) syndrome with methylation-sensitive PCR. *Hum.Genet.* 2001; 108:450-458.

**Linee guida pubblicate:**

- I. Maddalena A., Richards C.S., McGinniss M.J., Brothman A., Desnick R.J., Grier R.E., Hirsch B., Jacky P., McDowell G.A., Popovich B., Watson M., Wolff D.J.  
**Technical Standards and Guidelines for Fragile X.** Genet. Med. 2001; 3 (3):200-205.  
(Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics)
1. Pembrey M.E., Barnicoat A.J., Carmichael B., Bobrow M., Turner G.  
**An Assessment of Screening Strategies for Fragile X syndrome in the UK.**  
Health Technol. Assess. 2001; 5 (7):1-95.
2. Barton D.  
**Draft Best Practise Guidelines for Molecular Analysis of Fragile X Syndrome.**  
These guidelines are the product of a best practise meeting organized by the UK Clinical Molecular Society (CMGS) and are published on the EMQN website :  
<http://www.emqn.org/guidelines/frax.html>
3. Oostra B.A., Willemsen R.  
**Diagnostic Tests for Fragile X Syndrome**  
Expert Rev. Mol. Diagn. 2001; 1 (2): 89-95.