

Sintesi di **Genetics of Angelman Syndrome**

Jiang Y. et al. A. J. Hum. Genet 1999 65: 1-6

Negli ultimi due o tre anni diversi studi hanno permesso di compiere notevoli passi avanti nella comprensione della Sindrome di Angelman (AS):

1- l'identificazione del gene nel gene dell'ubiquitina ligasi e la dimostrazione dell'imprinting specifico di questo gene nel cervello.

2- E' stato descritto il centro di imprinting (IC) che regola l'espressione dei geni della regione, e' stato caratterizzato in dettaglio il modello murino, fornendo per la prima volta la prova dell'esistenza nei mammiferi di un gene coinvolto nel mantenimento del potenziale a lungo termine (LTP)(Fenomeno elettrofisiologico per mezzo del quale la stimolazione degli assoni presinaptici aumenta la forza delle connessioni con i neuroni postsinaptici per giorni e settimane ed e' visto come una forma di plasticita' neuronale che e' relativa all'apprendimento e alla memoria. LTP e' il piu forte candidato ad essere il meccanismo cellulare per l'apprendimento e la memoria.)

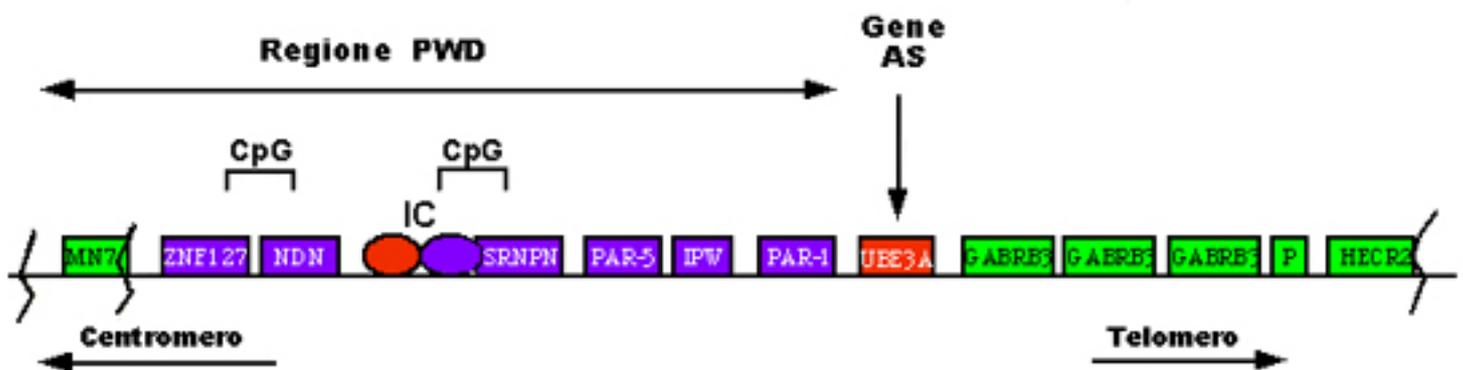


Figura1. Regione AS/PWD. I punti di rottura comuni sono rappresentati con la linea spezzata la distanza fra loro e' di circa 4Mb. La regione e' quasi tutta conservata sul cromosoma 7 di topo, e l'imprinting e' simile quando sono disponibili dati a riguardo. IC e' il centro di imprinting bipartito che agisce in cis. La regione di IC che controlla passaggio da materno a paterno (la delezione provoca PWS) si sovrappone al promotore di SNRPN ed e' colorata in blu come i geni espressi dall'allele paterno. Al contrario UBE3A espresso dall'allele materno e la regione di IC che lo controlla sono colorati in rosso. I geni di cui non si conosce lo stato o che non sono imprintati sono rappresentati in verde

La figura 1 mostra l'organizzazione della regione Prader-Willi (PWS) e AS, localizzata nella regione q11-13 del cromosoma 15 umano. Una delezione interstiziale di circa 4Mb e' comune alle due sindromi, ma i due fenotipi sono distinti come lo e' il modo di trasmissione: la delezione del cromosoma paterno e' alla base di PWS, mentre quella sul cromosoma materno origina AS. Coerentemente con questo effetto parentale, molti anche se non tutti i geni della regione sono sottoposti ad imprinting genomico. Percio' SNRPN (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N) e' espresso sul cromosoma paterno, ma silente su quello materno in tutti i tessuti esaminati e rappresenta un punto di riferimento chiave nella regione. Il promotore di SNRPN e' localizzato vicino ad una isola CpG completamente metilata sul cromosoma materno e sottometilata in quello paterno. Il centro bipartito di imprinting si sovrappone a questo promotore; piccole delezioni di IC sono coinvolte nei difetti di imprinting che provocano AS e PWS. Altri loci sono presenti in questa regione: IPW, ZNF127 e NDN che sono espressi dal locus paterno; UBE3A il cui imprinting e' tessuto specifico e la cui delezione del locus materno provoca AS (pertanto e' espresso da questo locus); e' invece ancora incerto lo stato di imprinting del cluster dei geni GABAA; il locus dell'albinismo (P) invece, non e' sottoposto ad imprinting; il gene HECR2 che codifica per una proteina gigante e MN7 localizzato vicino al punto di rottura comune nelle delezioni PWS/AS.

AS ha una frequenza di 1: 15000 nati vivi, e la sua base genetica e' molto complessa

Tipo	meccanismo	%	Metilazione*	Ricorrenza
Ia	4 Mb del 15mat intestiziale	65-75	anomala	molto bassa
Ib	trasloc.sbilanc. o delezione ereditata	<1	norm/anom	significativa
IIa	UPDpat con crom. norm.	3-5	anomala	molto bassa
IIB	UPD da traslocazione famil.	<1	anomala	significativa
IIIa	delezione IC	3-5	anomala	significativa
IIIb	mutazione di IC senza delez.	3-5	anomala	bassa
IV	mutazione di UBE3A	4-6	normale	significativa
V	AS senza anomalie molec.	10-14	normale	rara

* "Anomalo" vuol dire che nella regione del promotore di SNRPN e' stato messo in evidenza solo il pattern sottometilato del cromosoma paterno.

La maggior parte degli affetti (65%-75%), indicati in tabella come Ia, presentano una delezione de novo sul cromosoma materno. Si ritiene che queste delezioni siano originate da un crossing over ineguale fra le copie complete o troncate del gene HERC2, che formano alcuni set di ripetizione a basso numero di copie [n. d. t. Il gene HERC2 e' un gene che ha subito nel corso dell'evoluzione una serie di duplicazioni /trasposizioni: vi e' uno pseudogene sul crom. 16, e sul crom. 15 immediatamente adiacente al gene funzionale vi sono alcune copie troncate, altre copie sono presenti nella regione centromerica del locus PWD].

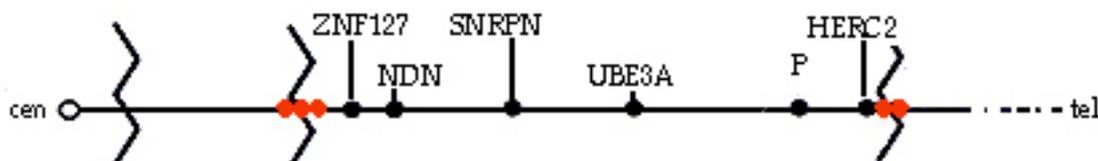


Figura 2. La figura riporta in rosso gli pseudogeni di HERC2. Solo alcuni dei geni della regione sono indicati (Ji Y. et al 1999 Hum. Mol. Genet. vol. 8 n. 3 533-542) Le linee spezzate indicano i punti di rottura più frequenti.

I punti di rottura più frequenti cadono nelle regioni degli pseudogeni. [Questa organizzazione genomica giustifica l'alto numero di delezioni nella regione]. La delezione per la sua grandezza e' facilmente evidenziata dalla FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), e la sua origine parentale puo' essere messa in evidenza analizzando lo stato di metilazione; nelle delezioni di origine materna, tipica di AS, l'isola CpG localizzata vicino al promotore di SNRPN, e che si presenta metilata in modo preferenziale, risulta ipometilata secondo il pattern paterno. Il rischio di ricorrenza per questi pazienti e' molto basso. Il gruppo Ib, molto più raro (<1%), e' strettamente correlato con il primo. Infatti a questo gruppo appartengono pazienti portatori di traslocazioni sbilanciate o delezioni interstiziali familiari. [n. t. d. La possibilita' di ereditare in forma sbilanciata senza conseguenze fenotipiche una delezione interstiziale e' legata proprio alla presenza dell'imprinting]. Una situazione di questo tipo si e' verificata in una famiglia giapponese: una delezione interstiziale veniva ereditata senza problemi fenotipici quando veniva trasmessa da un uomo, ma provocava AS se trasmessa da una donna. Il fatto che se trasmessa per via paterna non provocasse PWS costitui' una prova che le regioni critiche per queste due sindromi erano distinte.

Circa il 3%-5% dei pazienti AS hanno disomia uniparentale (UPD) con assenza del contributo materno. (IIa). Il rischio di ricorrenza e' basso a meno che non sia presente una traslocazione che predispone alla UPD (IIB).

Ai gruppi IIIa - IIIb appartengono circa il 7%-9% dei pazienti AS, che presentano "mutazioni dell'imprinting", dal momento che presentano sul cromosoma materno un pattern di espressione e di metilazione caratteristico del cromosoma di tipo paterno. Circa la meta' di questi pazienti (IIIa) hanno piccole delezioni che coinvolgono la porzione più centromerica

del bipartito IC situato vicino al promotore di SNRPN. Questo rende il cromosoma incapace di convertire da paterno a materno il pattern di metilazione e di espressione [n. d. t. nella meiosi femminile], molti dei casi di questa categoria sono familiari.

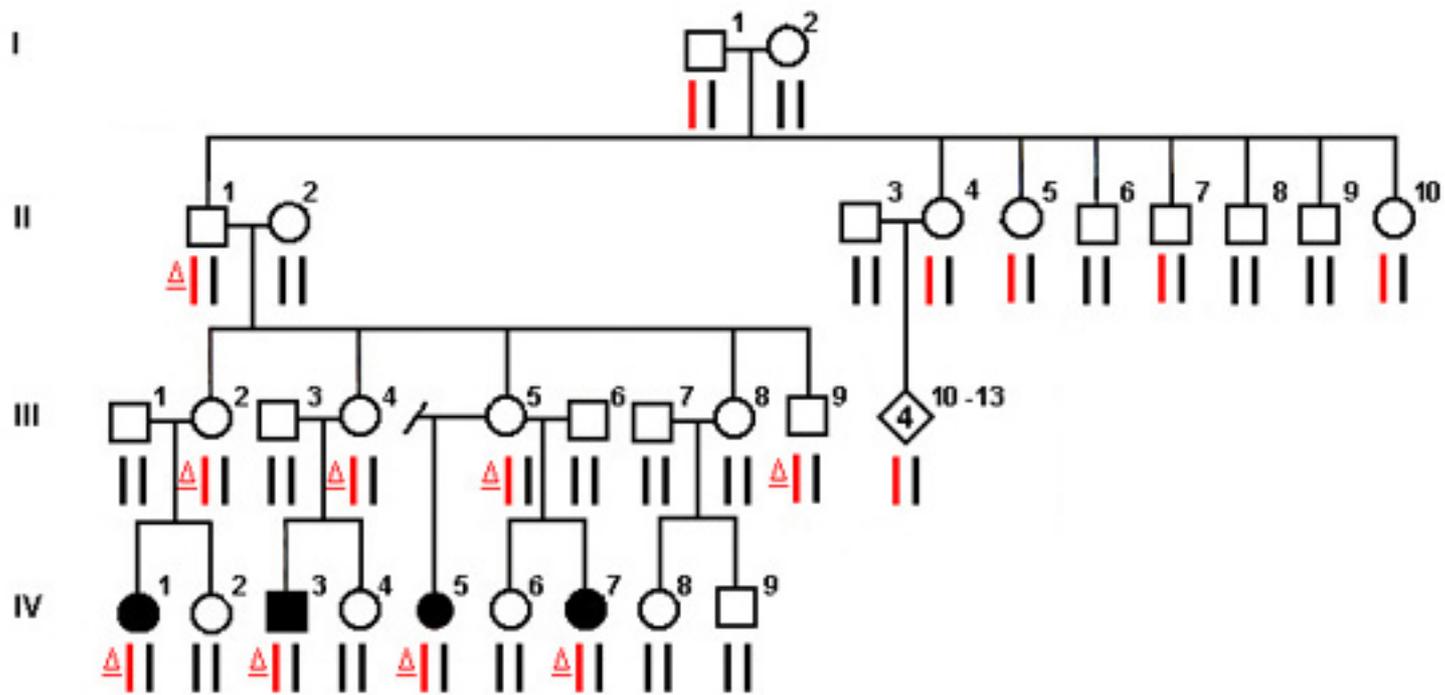


Figura 3. La figura riporta un albero genealogico di una famiglia descritta da Ohta et al. 1999 Am. J. Hum. Genet. 64 n2 385-396. Questa e' la famiglia che ha permesso agli autori di restringere a 1. 15 Kb la SRO (Shortest Region of Overlap) di AS. E' presente un'altra particolarita': l'individuo II-1 e' una nuova mutazione, infatti ha la delezione **D** sull'aplotipo (indicato in rosso) ricevuto dal padre che ne e' privo. Inoltre l'uso dei microsatelliti ha permesso di evidenziare che lo stesso aplotipo e' stato ereditato da 4 fratelli, a loro volta privi della delezione. Secondo gli autori questo puo' essere spiegato con una mutazione nella linea germinale di II-1, dopo che era avvenuto il settaggio dell'epigenotipo paterno. [n. d. t.: Secondo me esiste un'altra ipotesi: dal momento che non e' stato possibile risalire ulteriormente, se l'aplotipo mutato era quello che I-1 a sua volta aveva ricevuto dal padre la delezione potrebbe anche essere avvenuta prima dell'istaurarsi dell'imprinting].

[n. d. t. il rischio di ricorrenza dipende dal sesso del genitore e va calcolato anche considerando la terza generazione: un uomo portatore di una mutazione di tipo IIIa non ha nessun rischio di avere un figlio affetto, pur avendo la probabilita' del 50% di trasmettergli la mutazione. Le sue figlie che avessero ereditato la mutazione senza effetto fenotipico, avranno un probabilita' del 50% di avere un figlio affetto da AS in quanto portatore della mutazione del nonno. Pertanto la mutazione di AS puo' rimanere latente nella popolazione quando passa da padre portatore a figlio maschio, quando viene ereditata da una femmina si perde: se viene trasmessa ai figli, questi sono affetti e non si riproducono, se non viene ereditata da nessuno dei figli si estingue]. Gli altri casi (IIIb) vengono identificati come mutazioni di imprinting sulla base del pattern di metilazione, ma non sono riscontrabili delezioni nel IC, non sono riportati casi familiari e il meccanismo molecolare che e' alla base del fenotipo non e' noto.

Il gene UBE3A che codifica per E6-AP ubiquitin-protein ligasi (anche denominata ubiquitin ligasi 3A), era stato mappato nella regione di AS nel 1994, ma il suo coinvolgimento nella patogenesi di AS non era considerato come probabile dal momento che non sembrava essere improntato. In seguito, mutazioni puntiformi sono state trovate in una piccola ma significativa percentuale (4%-6%) di pazienti con AS (gruppo IV). Alcune di queste erano nuove mutazioni, ma parecchie erano ereditate, e in alcune famiglie il numero degli affetti era elevato. Il pattern di trasmissione in larghi pedigree in cui e' presente AS di tipo III o IV, e' caratteristico: gli eterozigoti hanno fenotipo normale se il cromosoma mutante e' di origine paterna, ma sono affetti se e' di origine materna. Il fenotipo dei pazienti di tipo IV e' quello tipico di AS.

Il gruppo di pazienti identificato come V, costituisce circa il 10%-15% dei pazienti con una diagnosi clinica di AS, ma privi di alcun difetto molecolare nella regione. Questi pazienti potrebbero essere suddivisi in tre gruppi:

- 1) essere portatori di una mutazione nella regione 15q11-13 non ancora identificata che intereggisca con il locus UBE3A;
- 2) essere portatori di una mutazione in un'altro locus non localizzato in 15q, ma la cui azione interferisca con l'espressione di UBE3A;
- 3- rappresentare delle fenocopie o genocopie in nessun modo collegate a UBE3A. Una diagnosi errata sarebbe alla base della loro identificazione come AS. In questo gruppo di pazienti il calcolo del rischi di ricorrenza e' impossibile [n. d. t.

come in tutte le patologie di cui non si conosce il modo di trasmissione e il tipo di mutazione]

Effetto modificatore

Il locus P (cfr figura 1) non e' imprintato, ma si trova all'interno della regione di circa 4Mb comunemente deleta e in questo caso modifica il fenotipo per cui i pazienti di tipo Ia presentano una lieve ipopigmentazione. La presenza di mutazioni con perdita di funzione in entrambi i locus P provoca sia nell'uomo che nel topo (gene *p*) la comparsa di una forma di albinismo. Il fenotipo dell'eterozigote e' piu' evidente nel topo, ma anche nell'uomo puo' provocare una leggera ipopigmentazione. L'ipopigmentazione non e' una componente del fenotipo AS nei tipi II, III e IV dovuti a UPD, mutazioni di imprinting e mutazioni puntiformi di UBE3A.

La maggior parte dei pazienti di tipo IV presentano epilessia, che viene descritta in forma grave anche in alcuni pazienti con la delezione. La differenza viene attribuita alla presenza di un cluster di geni GABAA localizzati fra UBE3A e P, a riprova di questo il topo knockout per la mutazione di uno di questi geni (*Gabrb3*) presenta crisi epilettiche. Lo stato di imprinting genomico del cluster GABAA e' ancora non ben definito, tuttavia la mancanza di GABRB3 materno potrebbe avere un effetto modificatore del fenotipo epilessia, spiegando la maggiore gravita' del fenotipo AS nei casi da delezione. Percio' mentre AS di tipo IV e' "single-gene disorder" perche' e' legata a mutazioni puntiformi del gene UBE3A, il tipo I piu' comune e' in realta' una sindrome da geni contigui in cui contribuiscono al fenotipo piu' geni: UBE3A, P e forse anche GABRB3. [n. d. t.: e' per questo motivo che nel caso di mutazioni genomiche come la tipo I e' difficile correlare il fenotipo con un locus e la prova che il fenotipo e' originato da un locus presente nella regione viene solo dal ritrovamento di mutazioni puntiformi in un gene, vedi anche il caso della Distrofia Miotonica in cui la mutazione e' un'espansione di triplette al di fuori di un gene, e dal momento che vi sono almeno due geni in quella regione in nessuno dei quali e' stata trovata una mutazione puntiforme si parla di regione DM. Inoltre non si puo' correlare il fenotipo con una funzione alterata di un prodotto, nel caso di DM ricordo che si ritiene che la mutazione potrebbe avere un effetto sulla regolazione della regione]. Nonostante la complessita' del pattern di ereditarieta' di AS, si puo' affermare che i maggiori effetti fenotipici [n. d. t. che permettono di inquadrare una serie di segni nel fenotipo AS] derivano da alterata funzione o espressione del prodotto del gene UBE3A di origine materna.

Imprinting specifico nel cervello di UBE3A

Sebbene non vi sia imprinting di UBE3A nelle cellule umane in coltura [n. d. t. ricordo che questo dato aveva fatto escludere questo gene dalla rosa dei geni candidati per AS], la scoperta di mutazioni puntiformi che provocavano AS ha portato rapidamente ad evidenziare che UBE3A di origine paterna e' spento nel cervello. Dati piu' dettagliati ottenuti con l'ibridazione in situ nel topo hanno indicato che *Ube3a* e' espresso dall'allele materno mentre quello paterno e' inattivato nelle cellule di Purkinje, nei neuroni dell'ippocampo e nelle cellule mitrali olfattorie, nella maggior parte degli altri tipi cellulari del cervello e negli altri tessuti non vi e' imprinting. La tessuto specificita' dell'imprinting e' stata descritta la prima volta in un topo UPD ed e' stata confermata usando una mutazione gene-targeting (vedi oltre nel modello murino di AS). La mancanza del *Ube3a* materno nelle cellule del Purkinje murine potrebbe spiegare l'atassia [n. d. t. incapacita' di coordinare i movimenti] e il tremore presenti nei pazienti AS, mentre il deficit nell'ippocampo potrebbe spiegare i difetti di apprendimento e l'epilessia, tuttavia nonostante queste possibili correlazioni la tessuto specificita' dell'imprinting nell'uomo non e' stata ancora determinata. Per le cellule del Purkinje vi e' l'evidenza indiretta che anche nell'uomo vi sia imprinting, legata all'aumento di p53 citoplasmatica nei soggetti AS (vedi oltre nella patogenesi di AS).

La base molecolare dell'imprinting tessuto specifica non e' nota, ma potrebbe essere simile a quella di altri locus imprintati o all'inattivazione del cromosoma X [n. d. t. a questo argomento si puo' collegare il commento di Mann e Bartolomei: Maintaining imprinting Nat. Genet. volume 25 may 2000, sulla presenza di una mutazione post zigotica in PWS: in quell'articolo si parla di mantenimento dell'imprinting, ma ritengo che si possa stabilire un nesso fra i due fenomeni. Infatti come un mutazione post zigotica altera il mantenimento di un imprinting avvenuto nella gametogenesi, segnalando la presenza di un meccanismo di mantenimento postzigotico di cui si ignorava l'esistenza, cosi sembrerebbe ovvio che un imprinting potrebbe essere instaurato, utilizzando in un tessuto specifico un meccanismo analogo se non lo stesso, inattivando un gene che non aveva subito imprinting nei gameti. L'imprinting in questo modo costituirebbe un meccanismo di controllo pre-trascrizionale che si instaurerebbe a partire dalla gametogenesi per alcuni geni per esempio housekeeping o piu' tardi per altri che sono tessuto specifici o hanno funzioni diverse in tessuti diversi {cfr. Biochimica del prodotto di UBE3A} Questa ipotesi rende ovviamente difficile dimostrare il coinvolgimento di un gene in una patologia qualora il tessuto bersaglio fosse difficile da testare nell'uomo, come il cervello; sempre piu' per chiarire questi fenomeni e' richiesto l'uso dei modelli animali. Solo il modello animale permetterebbe di testare i vari geni candidati che si sospettano essere sottoposti l'imprinting dal pattern di ereditarieta': UBE3A e' in questo senso e' paradigmatico]. UBE3A utilizza promotori multipli ed e' sottoposto ad un pattern complesso di splicing alternativi a livello degli esoni non tradotti al 5'; c'e' un precedente descritto a carico di promotori alternativi coinvolti nell'imprinting tessuto specifico di IGF2 (Insulin-like growth factor-II). Sono descritte nella genesi di AS alterazioni molecolari che modificano gli elementi di controllo separati dal gene strutturale anche parecchie megabasi. Un elemento in *cis* localizzato in 1. 15kb della regione piu' proximale del bipartito IC e' necessario per la conversione dall'epigenotipo paterno a quello materno.

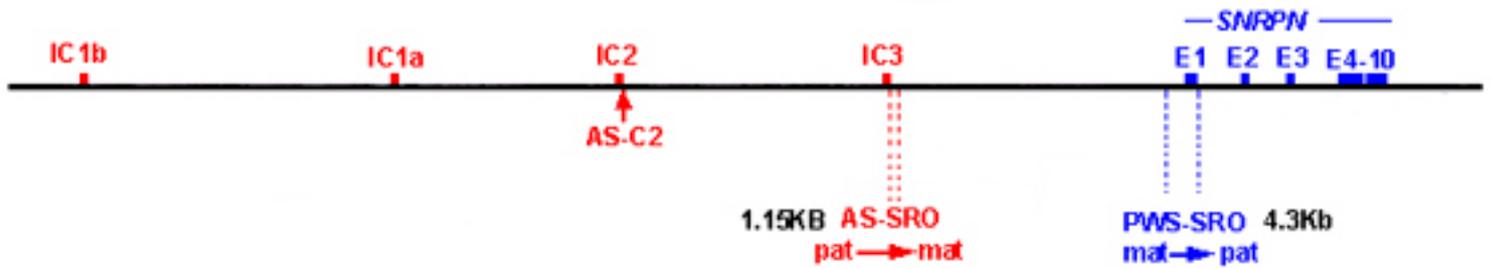


Figura 4. In figura sono rappresentate le SRO con le loro dimensioni sia per AS che PWS. La freccia indica il sito della mutazione puntiforme trovata da Dittrich et al 1996, nella famiglia AS [cfr. tesina sul centro di inattivazione]

Potrebbero esistere degli enhancer tessuto specifici o delle regioni di controllo fra IC e UBE3A o fiancheggianti questi siti, potrebbe essere anche rilevante ai fini del meccanismo dell'imprinting la presenza di un trascritto antisense della regione non tradotta al 3' di UBE3A evidenziato da alcuni autori. Va sottolineato che se è vero che potrebbero esistere altre mutazioni degli elementi di controllo in *cis* e' anche vero che e' l'inattivazione di UBE3A paterno che e' tessuto specifico, l'attivazione dell'allele materno non e' in gioco in quanto questo e' espresso ubiquitivamente [n. d. t. Credo che questo vada spiegato: alterazioni degli elementi di controllo dovrebbero coinvolgere tutti i tessuti in cui UBE3A e' espresso e coinvolgere le altre funzioni che sembra avere {vedi dopo}. In realta' quello che succede e' che ci sono due alleli che funzionano entrambi in tutti i tessuti, evidenziando che i meccanismi di controllo non sono mutati anche in AS, ma in alcune regioni del cervello uno dei due viene preferenzialmente inattivato, e' l'alterazione di questo meccanismo di inattivazione che provoca AS, resta inoltre da capire come mai l'inattivazione non e' casuale come per la X, ma interessa solo l'allele paterno e come venga scelto. Questo interrogativo vale anche per la X in quanto alcuni geni non vengono inattivati].

Biochimica di E6-AP, prodotto da UBE3A

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

L'enzima E1 inizia il processo formando un legame tioestere ad alta energia fra una cisteina del suo sito attivo e l'amminoacido C-terminale dell'ubiquitina. L'ubiquitina cosi' attivata viene complessata mediante altri legami tioesterici-like con una serie di enzimi E2. L'ubiquitina a questo punto viene legata covalentemente direttamente da un enzima E2 o trasferita ad una ubiquitina ligasi (E3), che a sua volta ubiquitina la proteina bersaglio. Le proteine E3, compresa la E6-AP, riconoscono specificatamente le proteine substrato. E6-AP e' l'elemento fondatore di una famiglia di proteine E3 omologhe al dominio C-terminale di E6-AP (homologous to E6-AP C-terminal: hect): fino ad ora sono state descritte 20 diverse proteine hect.

Altre tre famiglie di ligasi E3 sono state descritte:

- 1- E3 denominate "Anaphase-Promoting Complex" (APC) coinvolte nel controllo del ciclo cellulare.
- 2- E3 membri della famiglia "phosphoprotein-ubiquitin ligase" definite anche Skp1-Cullin-F box-protein SCF.
- 3- E3 membri della famiglia "N-end rule" coinvolte nel riconoscimento dei substrati sulla base della sequenza N-terminale.

Un'ultima classe di fattori per l'ubiquinazione, denominata E4 e' coinvolta nel favorire il passaggio delle proteine target dallo stato oligo-ubiquinato, provocato dal dominio hect delle ligasi di tipo E3, a quello multiubiquinato e alla degradazione proteosomica.

E6-AP puo' accettare l'ubiquitina da piu' enzimi E2 interagendo con parecchi di essi, compresi UbcH5, UbcH6, UbcH7 e UbcH8. Come conseguenza E6-AP ubiquitina almeno 4 proteine, ma i suoi target potrebbero essere dozzine o centinaia. Oltre a p53, fra i target si ritrova HHR23A, proteina omologa ad un fattore di riparo del lievito; MCM-7, proteina coinvolta nella replicazione cromosomica; e E6-AP stessa. Oltre che nell'ubiquitinizzazione, E6-AP puo' essere utilizzata come coattivatore trascrizionale per i recettori degli ormoni steroidei. Le due funzioni sono completamente indipendenti, dal momento che la regolazione trascrizionale viene mediata dal dominio N-terminale e l'ubiquitinizzazione da quello C-terminale.

Modello murino della sindrome di Angelmann

Sono stati ottenuti topi con UPD del cromosoma 7 [contiene la regione omologa a quella del 15p11-13 umana] e topi portatori di larghe delezioni, in entrambi i casi tuttavia piu' geni potevano essere coinvolti. Utilizzando la strategia del gene targeting e' stato originato un topo portatore di una mutazione che annullava l'espressione di *Ube3a*. L'assenza dell'allele materno funzionante provoca totale assenza di espressione del locus nei neuroni dell'ippocampo e nelle cellule del Purkinje. Il topo affetto aveva disturbi motori, convulsioni da induzione, difetti di apprendimento e nel LTP dell'ippocampo. Il difetto in LTP e' relativamente importante nel topo AS e rappresenta la prima prova di un coinvolgimento dell'ubiquitina nel LTP dei mammiferi. Nella lepore marina (*Aplysia*, mollusco gasteropode, organismo studiato a fondo per definire il