



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO  
E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO MALATTIE RARE

CICLO XX

## **ANALISI MOLECOLARE DI GENI COINVOLTI NELLO SPETTRO FENOTIPICO ANGELMAN-RETT**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Supervisore :** Dott.ssa Alessandra Murgia

**Dottoranda :** ANESI

LAURA

31 gennaio 2008

## INDICE

PRESENTAZIONE .....	4
INTRODUZIONE.....	6
<u>LA SINDROME DI RETT (RTT).....</u>	<u>6</u>
<u>LA SINDROME DI ANGELMAN (AS).....</u>	<u>15</u>
CASISTICA.....	20
MATERIALI E METODI.....	22
Estrazione, quantificazione e valutazione qualitativa del DNA genomico: .....	22
<u>ANALISI DEL GENE MECP2.....</u>	<u>22</u>
<u>ANALISI DEL GENE CDKL5.....</u>	<u>34</u>
<u>ANALISI IN SILICO DELLE VARIANTI IDENTIFICATE.....</u>	<u>35</u>
<u>RICERCA DI ALTERAZIONI A CARICO DELLA REGIONE 15q11-q13.....</u>	<u>35</u>
RISULTATI.....	37
<u>Ricerca di alterazioni del gene MECP2.....</u>	<u>37</u>
<u>Ricerca di alterazioni del gene UBE3A.....</u>	<u>39</u>
<u>Ricerca di alterazioni del gene CDKL5.....</u>	<u>39</u>
<u>Ricerca di alterazioni della regione 15q11-q13.....</u>	<u>40</u>
INTRODUZIONE.....	43
<u>LA REGIONE CRITICA PRADER-WILLI/ANGELMAN.....</u>	<u>43</u>
<u>INVDUP15.....</u>	<u>47</u>
<u>DELEZIONI DEL GENE UBE3A.....</u>	<u>49</u>
MATERIALI E METODI.....	50
<u>MESSA A PUNTO DELLA STRATEGIA DI PCR REAL TIME.....</u>	<u>50</u>
<u>Analisi di microsatelliti per ricerca di UPD.....</u>	<u>52</u>
RISULTATI.....	54
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	58
BIBLIOGRAFIA.....	67



## PRESENTAZIONE

In questo lavoro di tesi sono presentati gli argomenti che hanno costituito il principale ambito di studio durante il periodo di Dottorato in Biologia dello Sviluppo e Scienze della Programmazione, svolto presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova (anni accademici 2005 – 2007).

Oggetto dello studio di questo Dottorato di ricerca è stata l'analisi di geni coinvolti nel ritardo mentale e in particolare nel fenotipo “allargato”, caratterizzato da disturbi neurologici e dello sviluppo, che comprende le sindromi di Rett e Angelman e i fenotipi considerati associati a questi quadri patologici. A questo proposito si è scelto di dividere la ricerca in due grandi capitoli: analisi dei geni implicati in questi quadri fenotipici (MECP2, UBE3A e CDKL5) e messa a punto di una strategia molecolare che consente di effettuare l'analisi molecolare della regione 15q11-q13.

Al fine di rendere più veloce ed completa la ricerca, nel corso del Dottorato sono state messe a punto e utilizzate in un'ampia casistica clinicamente selezionata, metodiche di diagnostica molecolare in grado di rilevare e caratterizzare variazioni della sequenza o alterazioni di dose genica a livello delle regioni genomiche studiate.



# ANALISI DI GENI COINVOLTI NEL RITARDO MENTALE

## INTRODUZIONE

### LA SINDROME DI RETT (RTT)

La sindrome di Rett [prevalenza 1/15.000, OMIM [#312750](#)], nella sua definizione clinica classica, è una malattia da arresto globale dello sviluppo neurologico con andamento progressivo ed è caratterizzata da condizione di normalità alla nascita e sviluppo psicomotorio apparentemente normale durante i primi 6-18 mesi di vita. Fra il primo e il secondo anno di vita le bambine affette entrano in un periodo cosiddetto di "stagnazione" dello sviluppo psicomotorio seguito da una fase di rapida regressione del linguaggio e delle capacità motorie. Caratteristiche aggiuntive del fenotipo Rett includono un profilo autistico, attacchi simili a panico, atassia, tremori e microcefalia acquisita. Dopo un primo periodo di rapido deterioramento, il quadro clinico diviene relativamente stabile, ma le bambine sviluppano spesso distonia e deformità a mani e piedi man mano che crescono. Convulsioni si presentano nel 50% delle femmine con la sindrome di Rett; gli episodi convulsivi insorgono frequentemente dopo la fase di stabilizzazione della malattia.

Nel 1998, prima della scoperta delle basi genetiche della sindrome di Rett, furono stabiliti i seguenti criteri diagnostici per la definizione della malattia [Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group (1998)] :

1. Periodo prenatale apparentemente normale\*
2. Normale circonferenza del capo alla nascita
3. Sviluppo apparentemente normale fino all'età di sei mesi\*
4. Decelerazione della crescita del capo in qualsiasi momento tra i 3 e i 48 mesi
5. Perdita del movimento delle mani acquisito e del controllo delle mani utilizzato fino all'età di 5 e 30 mesi, con conseguente sviluppo di movimenti stereotipati delle mani

6. Grave impedimento del linguaggio espressivo e recettivo congiunto a grave ritardo psicomotorio
7. Sviluppo di aprassia locomotoria e atassia del tronco tra l'età di 12 e 48 mesi

\*i criteri clinici 1 e 3 possono essere non applicabili a femmine gravemente affette.

Questi criteri sono correntemente utilizzati per porre diagnosi di sindrome di Rett nella forma classica. In realtà solo pochi casi soddisfano pienamente questi criteri clinici, di fatto esiste un'ampia variabilità fenotipica che pone la diagnosi clinica di Rett classica nella mediana di una curva di Gauss con estremi che si sovrappongono largamente ad altri fenotipi nell'ambito dei "disturbi pervasivi dello sviluppo".

## GENETICA DELLA SINDROME DI RETT

Ad oggi mutazioni del gene MECP2 [Xq28] sono rinvenute nella maggioranza (90%) dei casi di Rett classica e nel 30% circa dei casi di Rett atipica. L'esistenza di tanti soggetti in cui, a fronte di un sospetto clinico anche ben documentato di RTT non vengano identificate alterazioni del gene MECP2 ha portato a supporre l'esistenza di eterogeneità genetica. Tra il 2004 e il 2005 sono state identificate mutazioni su un altro un'altro gene, il gene CDKL5 [OMIM \*300203], anch'esso situato sul cromosoma X a livello della banda citogenetica Xp22 in soggetti affetti da una forma di Rett atipica caratterizzata dall'insorgenza precoce di epilessia farmaco-resistente (variante di Hanfield). [Weaving et al. (2004); Tao et al. (2004); Scala et al. (2005)]

## IL GENE MECP2

Il gene MECP2 [OMIM \*300005] è stato descritto per la prima volta nel 1992 [Meehan et al. (1992)]. MECP2 è situato sul braccio lungo del cromosoma X in corrispondenza della banda citogenetica q28 ed è soggetto all'inattivazione dell'X [Adler et al. (1995); D'Esposito et al. (1996); Vilain et al. (1996)]. Il gene MECP2 occupa una porzione di DNA genomico di circa 76 Kb e viene trascritto in direzione telomero-centromero. Benché sia espresso in modo ubiquitario i suoi livelli di

espressione sembrano essere regolati in modo tessuto e sviluppo specifico in particolare a livello cerebrale e neuronale [Jung et al. (2003); Balmer et al. (2003); Cohen et al. (2003); Kishi et al. (2004); Mullaney et al. (2004); Shahbazian et al. (2002b)].

MECP2 consta di 4 esoni che codificano 2 diverse isoforme della proteina, indicata come MeCP2, dovute a splicing alternativo dell'esone 2. Le due isoforme di MeCP2 differiscono quindi solo nella porzione N-terminale. L'isoforma più abbondante, MeCP2B, contiene gli esoni 1-3 e 4, l'isoforma MeCP2A contiene gli esoni 2, 3 e 4., [Kriaucionis and Bird (2004); Mnatzakanian et al. (2004)]. La porzione 3'UTR dell'esone 4 di questo gene è insolitamente lunga (circa 8.5 Kb) e filogeneticamente ben conservata [Coy et al. (1999)]. Poliadenilazioni alternative originano un trascritto di 1.8 Kb ed altri trascritti lunghi oltre 10 Kb differenzialmente espressi nei vari tessuti e contenenti 3'UTR di differenti dimensioni. La notevole conservazione filogenetica di blocchi di sequenze del 3'UTR fa ipotizzare un ruolo di questa regione nel ripiegamento tridimensionale conservato dell'RNA [Coy et al.(1999)].

#### MUTAZIONI DEL GENE MECP2

Fino a oggi sono state identificate più di 300 differenti varianti patogene di questo gene. Lo spettro di mutazioni identificate comprende mutazioni missense, nonsense, mutazioni frameshift, come anche grandi delezioni e duplicazioni dell'intero gene (RETT Base , HGMD). Le mutazioni MECP2 sono distribuite lungo l'intera sequenza codificante del gene e il 70% delle alterazioni finora riportate è riconducibile a 8 varianti ricorrenti, tutte transizioni C>T [Lee et al. (2001)], probabilmente risultanti dalla deaminazione spontanea dei residui citosina a livello dei nucleotidi: (c.316C>T, c.397C>T, c. 473C>T, c.502C>T, c.763C>T, c. 808C>T, c. 880C>T, c. 916C>T).



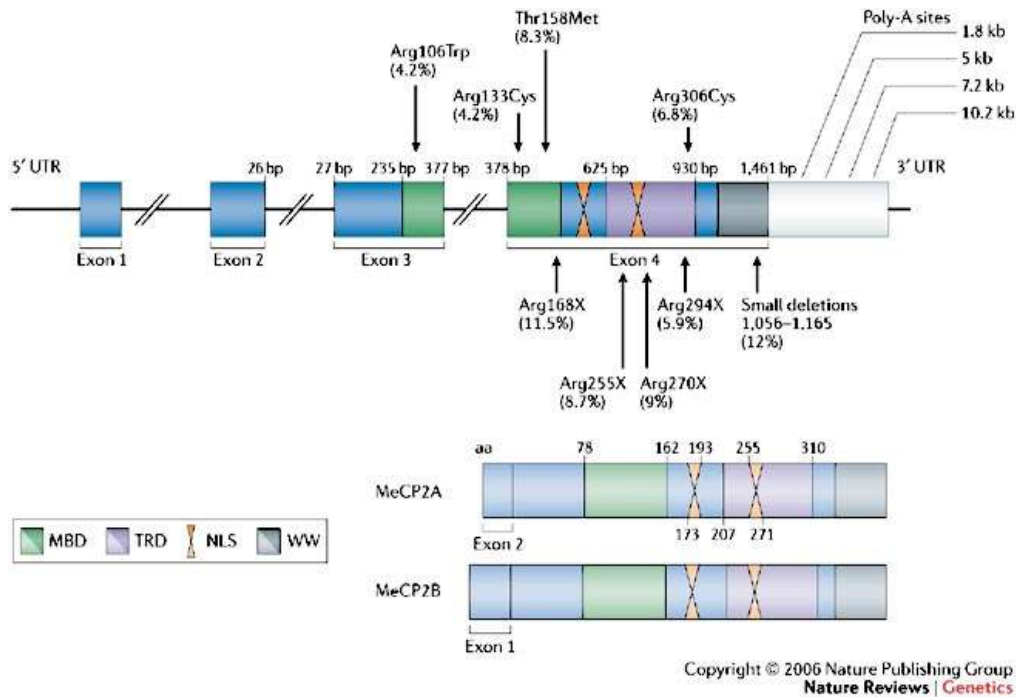


Figura 1: Gene MECP2. Nella parte alta della figura è rappresentato il gene MECP2 con i suoi domini funzionali, le frecce indicano le mutazioni “hot-spot”. Nella parte inferiore della figura sono rappresentati le due isoforme MeCP2A e MeCP2B. Immagine tratta e modificata da Bienvenue et al. 2006.

## LA PROTEINA MECP2

La proteina MeCP2 [Swiss-Prot P51608] è costituita da un unico polipeptide, è localizzata nel nucleo e presenta tre domini funzionali:

- un dominio funzionale per il legame alle citosine metilate (Methyl-binding-domain, MBD) di 85 aminoacidi (aminoacidi 78-162) [Lewis et al. (1992); Nan et al. (1993)];

- un dominio per la repressione della trascrizione (Transcriptional Repression Domain, TRD) di 100 aminoacidi (aminoacidi 207-310) necessario per il reclutamento delle altre componenti del complesso repressore [Nan et al. (1997)]
- un dominio C-terminale la cui funzione non è ancora stata caratterizzata.

All'interno del dominio TRD sono presenti due segnali di localizzazione nucleare. (Nuclear Signal Localization, NLS).

La proteina MeCP2 fa parte di un complesso repressore della trascrizione contenente il corepressore Sin3A e le istone-deacetilasi HDAC1 e HDAC2 . Il modello del funzionamento di questo complesso prevede che MeCP2 reprima la trascrizione attraverso un meccanismo che coinvolge il legame ai residui mCpG e il reclutamento del co-repressore Sin3A e delle HDACs per modificare la struttura della cromatina. MeCP2 riconosce e lega i siti CpG metilati presenti nei promotori dei geni target, le HDACs deacetilano le code degli istoni (le proteine attorno alle quali è avvolta la catena del DNA) e ciò consente al DNA di avvolgersi più strettamente attorno ai nucleosomi causando il compattamento della cromatina. In queste condizioni la macchina trascrizionale perde l'accesso al promotore e quindi il genoma non viene più trascritto. [Jones et al. (1998), Nan et al. (1998)].

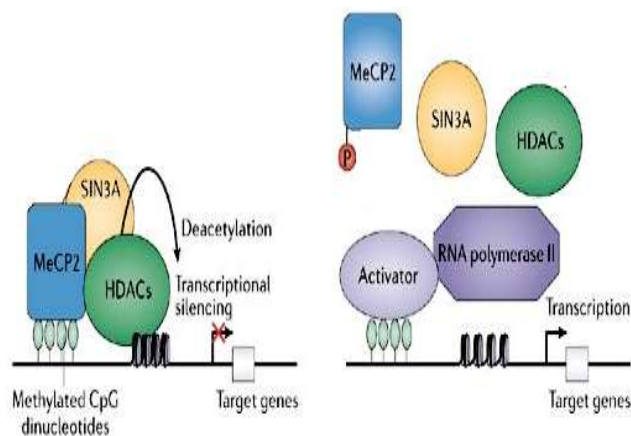


Figura 2: Modello di funzionamento della proteina MeCP2. MeCP2 riconosce e lega le CpG e, tramite il reclutamento dei cofattori SIN3A e HDACs causa la deacetilazione degli istoni e quindi il compattamento del DNA attorno ai nucleosomi. In questo modo i geni target non vengono trascritti. *Immagine tratta e modificata da Bienvenue et al. 2006*

In realtà la proteina MeCP2 appartiene a un network complesso in cui molti altri fattori interagiscono per modulare l'espressione genica: a questo network sembrano appartenere la componente catalitica del complesso per il rimodellamento della cromatina SWI/SNF Brahma, la methyltransferasi del DNA DNMT1, la methyltransferasi degli istoni Suv39H1, i fattori di trascrizione TFIIB e PU.1, il corepressore c-Ski e N-CoR,LANA e le ATPase/DNA elicasi SWI2/SNF2. Le precise conseguenze funzionali delle interazioni di MeCP2 con queste proteine sono ancora largamente sconosciute. [Harikrishnan et al. (2005); Kaludov and Wolffe, (2000); Kimura and Shiota, (2003); Kokura et al. (2001); Nan et al. (2007)].

A questo network sembra appartenere anche la proteina CDKL5: in vitro essa si autofosforila e fosforila MeCP2; è questa attività catalitica che viene meno in caso di presenza di varianti patogenetiche della sequenza del gene CDKL5.[Mari et al. (2005)] Inizialmente si pensava che MeCP2 fosse un repressore della trascrizione globale, tuttavia gli studi dei profili trascrizionali eseguiti utilizzando tessuti cerebrali di “null mice” non hanno rivelato cambiamenti evidenti nell'espressione genica [Tudor et al. (2002)] Questo fatto potrebbe essere giustificato dall'ipotesi che l'azione di MECP2 sia finemente regolata a livello tessuto e sviluppo specifico. Mediante studi di geni candidati in tessuti sia di uomo che di topo sono stati individuati dei possibili target di MeCP2 (tabella 1).

<b>Gene</b>	<b>Function</b>
Bdnf	neuronal development and survival
xHairy2a	neuronal repressor
DLX5/ Dlx5	neuronal transcription factor
Sgk1	hormone signaling
Fkbp5	hormone signaling
Uqcrc1	mitochondrial respiratory chain
ID1-3/ Id1-3	neuronal transcription factors
FXVD1/ Fxyd1	ion channel regulator
IGFBP3/ Igfbp3	hormone signaling
Crh	neuropeptide
UBE3A	ubiquitin ligase
GABRB3	GABA-A receptor

Tabella 1: MeCP2 Target Genes. In tabella sono riportati alcuni dei geni considerati target di MeCP2.[Chahrouh et al. (2007)]

## FENOTIPI CON MUTAZIONI DEL GENE MECP2

Se, come risulta dalle recenti evidenze, la proteina MeCP2 ha un ruolo fondamentale nella repressione della trascrizione di numerosi geni target durante il differenziamento neuronale, non stupisce che alterazioni MECP2 siano state rinvenute in un'ampia gamma di fenotipi in soggetti di entrambi i sessi in cui sono presenti alterazioni neurologiche. Alterazioni di questo gene sono state identificate in quadri di autismo, mild learning disability e MR X-linked ed anche in soggetti con fenotipo Angelman-like.

In realtà l'intera gamma di fenotipi in cui alterazioni di MECP2 potrebbero avere un ruolo patogenetico rimane ancora da investigare; è lecito ipotizzare che alterazioni di questo gene siano alla base sia di patologie con caratteristiche cliniche che rientrano nello spettro fenotipico Angelman-Rett come anche di altre forme di disturbi pervasivi dello sviluppo .

La conoscenza dell'importanza del coinvolgimento di alterazioni di questo gene in fenotipi che si discostano dal fenotipo clinico RTT è fondamentale per comprendere il ruolo della proteina MECP2 nel complesso network funzionale che soggiace alla corretta maturazione neuronale .

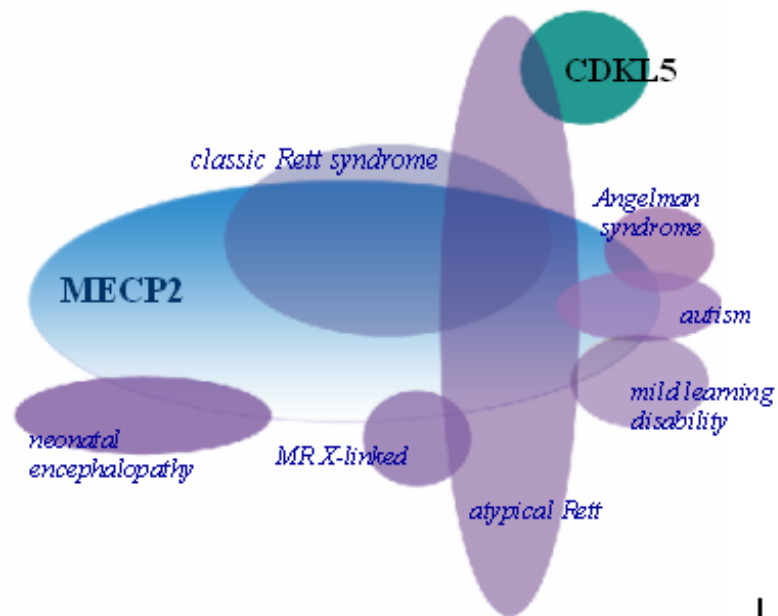
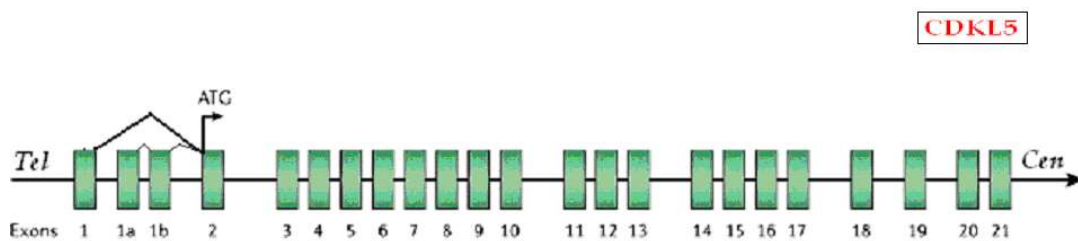


Figura 3: Rappresentazione virtuale del coinvolgimenti di MeCP2 in vari fenotipi. Le elissi blu e verdi rappresentano rispettivamente le mutazioni dei geni MECP2 e CDKL5, le elissi viola rappresentano i fenotipi coinvolti.

## IL GENE CDKL5

Il gene CDKL5 [OMIM \*300203] è localizzato sul braccio corto del cromosoma X a livello della banda citogenetica Xp22 e comprende 23 esoni [Montini et al. (1998), Kalscheuer et al. (2003)]. I primi tre esoni sono trascritti ma non tradotti e sembra contengano due siti di inizio della trascrizione alternativi che distano tra loro circa 19 kb. L'ATG d'inizio è localizzato all'interno dell'esone due (figura 4). Sono state individuate due isoforme dell'RNA del gene CDKL5: una contiene gli esoni 1a e 1b e viene trascritta con bassi livelli d'espressione nei testicoli e nei tessuti cerebrali fetali ma non nelle linee cellulari linfoblastoidi (isoforma II); l'altra isoforma contiene l'esone 1 ed è espressa in un ampio range di tessuti, inclusi i fibroblasti e le linee cellulari linfoblastoidi.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Genetics

Figura 4: Gene CDKL5. . Immagine tratta e modificata da Bienvenue et al. 2006

Il gene CDKL5 codifica per una proteina del gruppo delle cosiddette MAP chinasi (Microtubule Associated Protein) considerate importanti nella regolazione della formazione delle sinapsi tra i neuroni. Alterazioni del gene CDKL5 sono state rinvenute in alcuni soggetti affetti da un variante della Sindrome di Rett caratterizzata dall'insorgenza precoce dell'epilessia (variante di Hanfield) [Weaving et al. (2004); Tao et al. (2004); Scala et al. (2005), Bienvenu et al. (2006), Archer et al. (2006)]. L'esistenza di soggetti aventi fenotipo Rett con mutazioni del gene CDKL5 fa supporre l'appartenenza dei prodotti proteici di questi due geni al medesimo pathway patogenetico : dati recenti hanno infatti dimostrato che CDKL5 interagisce con MeCP2, inoltre è stato dimostrato che CDKL5 e MeCP2 hanno lo stesso pattern di distribuzione sia temporale che regionale nel sistema nervoso durante la sinaptogenesi e la maturazione neuronale [Mari et al. (2005)]. Benché la ricerca di alterazioni del gene CDKL5 sia rimasta per ora limitata , è lecito supporre che mutazioni di questo gene potrebbero essere coinvolte nell'eziopatogenesi di soggetti affetti da disturbi pervasivi dello sviluppo.

#### MUTAZIONI DEL GENE CDKL5

Ad oggi sono state riportate nello Human Gene Mutation Database 10 differenti mutazioni del gene CDKL5, di cui 5 piccole delezioni, 2 mutazioni missense e una variante del sito di splicing. Le due varianti restanti sono costituite da riarrangimenti complessi [HGMD]

#### INTERAZIONE MECP2 CDKL5

Poiché mutazioni del gene CDKL5 causano un fenotipo simile a quello causato da mutazioni del gene MECP2, sussiste l'ipotesi che entrambi questi geni appartengano allo stesso network funzionale. Dati recenti hanno dimostrato che il pathway d'espressione tessuto e sviluppo specifica del gene CDKL5 si sovrappone in maniera significativa al pathway d'espressione del gene MECP2 e che i prodotti proteici di questi geni interagiscono in vivo e in vitro. Attualmente si pensa che la proteina CDKL5 medi in modo indiretto la fosforilazione (e quindi l'inattivazione) di MeCP2.[Mari et al. (2005)]

## LA SINDROME DI ANGELMAN (AS)

Le caratteristiche principali della sindrome di Angelman [incidenza 1/20.000, OMIM #105830] sono grave ritardo psicomotorio, assenza del linguaggio o utilizzo di poche parole, problemi di equilibrio e movimenti scoordinati (atassia) con tremore agli arti. Un'altra caratteristica è la tendenza a ridere in modo eccessivo e senza motivo accompagnata da ipereccitabilità, iperattività e scarsa attenzione. Altri tratti frequenti (presenti in più dell' 80% dei pazienti) sono la microcefalia, che si rende evidente dopo i 2 anni di vita, e la presenza di crisi convulsive che insorgono entro i 3 anni. Frequenti sono anche i disturbi del sonno.

Nel 1995 sono stati riassunti i criteri diagnostici necessari per la definizione della malattia [Williams et al. (1995)]

1. Storia prenatale e nascita apparentemente normali.. In alcuni neonati sono presenti difficoltà di nutrizione.
2. Ritardo dello sviluppo motorio evidente da 6-12 mesi, a volte associato a ipotonia del tronco.
3. Sviluppo motorio ritardato ma non associato a perdita delle capacità acquisite
4. Profili metabolici, ematologici e chimici normali
5. Struttura del cervello normale all'analisi MRI o CT.

La maggior parte degli individui affetti presenta inoltre:

- Decelerazione della crescita del capo (microcefalia) intorno ai due anni d'età.
- Epilessia che normalmente insorge prima dei tre anni d'età
- EEG anormale con pattern caratteristico .

Questi criteri sono correntemente utilizzati per porre diagnosi di sindrome di Angelman nella forma classica, ma deviazioni cliniche non escludono la diagnosi. Di fatto esiste, come per la sindrome di Rett un'ampia variabilità fenotipica (fenotipi AS-like) che pone anche la diagnosi clinica di Angelman classica nella mediana di una curva di Gauss con estremi che si sovrappongono largamente ad altri fenotipi nell'ambito dei "disturbi pervasivi dello sviluppo".

## GENETICA DELLA SINDROME DI ANGELMAN

La sindrome di Angelman è dovuta, nella maggioranza dei casi, ad alterazioni dell'espressione del gene UBE3A collocato in una regione cromosomica [15q11-13] soggetta a imprinting (è essenziale per il corretto sviluppo la presenza dell'allele materno del gene). Alterazioni del corretto pattern d'espressione di UBE3A sono causate nell'80% dei casi da anomalie genetiche ricorrenti che coinvolgono tutta la regione q11-q13 del cromosoma 15 di origine materna.

Le più note cause genetiche della sindrome di Angelman sono [Jang et al. (1999)]:

- Delezione della regione 15q11-q13. E' la causa più frequente della malattia (75% dei casi AS),
- Disomia uniparentale (circa 7% dei casi). Disomia indica che il numero di cromosomi 15 è normale (2) ma che entrambe le copie provengono da un solo genitore [Robinson et al. (2000)].
- Alterazioni dei meccanismi di 'imprinting (3% dei casi) Questa situazione è dovuta all'instaurarsi di un anomalo pattern di metilazione a livello del cromosoma 15. Circa il 50 % dei soggetti con imprinting difettoso presentano mutazioni in una zona esterna alla regione genomica 15q11-q13, denominata centro di imprinting (IC). Il centro di imprinting regola la struttura della cromatina, la metilazione del DNA e, quindi, l'espressione genica nella regione 15q11-q13 attraverso elementi regolatori agenti in cis. Nel restante 50% dei casi di alterato imprinting non sono state sinora identificate le cause precise del difetto di metilazione [Buiting et al. (1998)].
- Alterazioni di sequenza del gene UBE3A (10% dei casi)

Un'alta percentuale di casi di AS (circa il 10% dei casi), sia sporadici che familiari, resta ancora oggi senza una apparente spiegazione molecolare [Jang et al. (1999)]. Alterazioni puntiformi del gene MECP2 sembrano essere responsabili di una quota dei casi (circa il 3%) in cui non sia stata rinvenuta nessuna delle anomalie precedentemente descritte. [Williams et al. (2007)]

## IL GENE UBE3A



Il gene UBE3A [OMIM \*601623] occupa circa 120 kb e viene trascritto in direzione telomero – centromero. Il gene consta di 10 esoni codificanti (esoni 7-16) e di 6 esoni non codificanti localizzati nel 5' non tradotto (5'UTR). La regione 3' UTR occupa circa 2 kb.

L'estremità 5' del gene è soggetta a splicing alternativo che genera 9 prodotti diversi nell'adulto e due nel feto. Questi vari mRNA codificano tre isoforme della proteina Ube3a che utilizzano diversi ATG d'inizio e quindi differiscono riguardo alla loro porzione N-terminale (Yanamoto et al. 1997, Kishino et al. 1997, Rougelle et al. 1997, Vu & Hoffman 1997, Kishino & Wagstaff 1998).

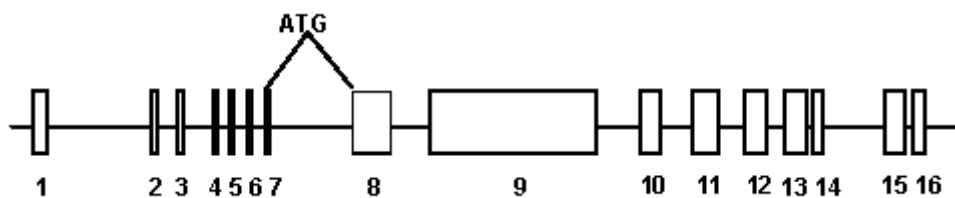


Figura 5: Gene UBE3A.

Alterazioni del gene UBE3A sono state identificate circa nel 5% dei soggetti affetti da Sindrome di Angelman. Finora sono state riportate 53 diverse mutazioni patogene. Lo spettro di mutazioni identificate comprende mutazioni missense, nonsense, mutazioni frameshift, piccole inserzioni e delezioni prevalentemente localizzate nell'eson 9. Sono state riportate due varianti UBE3A che alterano siti consensus dello splicing [HGMD Database]. Alcuni lavori (Buerger et al. 2002, Lawson-Yuen et al. 2006) riportano la presenza di grandi delezioni di questo gene, ma solo questi laboratori hanno utilizzato nella ricerca di mutazioni tecniche necessarie per individuarle: delezioni dell'intero gene potrebbero rispondere di una quota dei casi di soggetti affetti da sindrome di Angelman in cui il test di metilazione o l'analisi di sequenza del gene non sono stati in grado di rilevare alterazioni.

## LA PROTEINA UBE3A

Il prodotto del gene UBEA, la proteina E6-AP ubiquitin protein ligase, [Scheffner et al. (1990)] fa parte del gruppo di enzimi E3 che sono importanti nel riconoscimento del substrato e nel trasferimento dell'ubiquitina nel sistema di degradazione proteica ubiquitina-proteasoma. Mediante questo sistema la cellula controlla la degradazione proteica: le proteine target vengono marcate con delle molecole di ubiquitina e quindi degradate dal macchinario del proteasoma, [Glotzer et al. (1991); Scheffner et al. (1995); Hochstrasser (1996b); Ciechanover et al. (1998), Hershko et al. (1998); Vu et al. (2000)]

La proteina Ube3a occupa circa 120 KD e presenta almeno 6 domini funzionali, tre dei quali sono coinvolti nell'attività ubiquitina ligasi:

- E6-binding domain (aminoacidi 391-408)
- P53 binding domain (aa 280-781)
- Hect domain ( gli ultimi 350 aa all'estremità' carbossi terminale.)

L'hect domain, altamente conservato, viene codificato dagli esoni 9-16. [Huitbregtse et al. (1995)] Questo dominio funzionale e' di fondamentale importanza perché contiene, nel segmento di 88 aa dell'estremità' C-term., [Huitbregtse et al. (1993b)] la regione minima necessaria per l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione delle proteine target.

E' probabile che nella sindrome di Angelman sia la perdita dell'ubiquitinazione delle proteine target nei tessuti dove unicamente l'allele UBE3A di derivazione materna è attivo a condurre al fallimento della degradazione di tali proteine o ad altre alterazioni funzionali . Ad oggi non sono comunque ancora note delle proteine specifiche rappresentanti il target di E6-AP ubiquitin protein ligase implicato nella patogenesi della sindrome di Angelman.

#### INTERAZIONE MECP2 UBE3A

Il ruolo esatto svolto dalle proteine MeCP2 e Ube3a nel cervello non è ancora stato ben chiarito, tuttavia la parziale sovrapposizione dei fenotipi AS e RTT e l'esistenza di

soggetti AS il cui fenotipo è dato da mutazioni del gene MECP2 fanno ipotizzare che entrambe queste proteine appartengano allo stesso network funzionale. Alcuni lavori hanno riportato un decremento dell'attività di MeCP2 nel cervello di soggetti aventi AS e autismo e inoltre ridotti livelli di espressione dei geni UBE3A e GABRB3 sono stati riscontrati in soggetti affetti da RTT, AS e autismo. Questi dati supportano l'ipotesi di uno stretto connubio tra i prodotti proteici di questi due geni, anche se non è noto il meccanismo attraverso cui essi interagiscono. [Samaco et al. (2004); Samaco et al. (2005); Makedonski et al. (2005)].

## CASISTICA

Lo studio è stato rivolto a un campione di 203 individui non relati giunti al Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova con indicazioni cliniche di Sindrome di Rett [RTT], Sindrome di Angelman [AS] o un fenotipo appartenente allo spettro dei disturbi pervasivi dello sviluppo [DPS].

Per ogni soggetto è stato raccolto un prelievo di sangue periferico ed è stata richiesta l'autorizzazione allo studio mediante adeguato consenso informato.

Tutti i soggetti affetti da Sindrome di Rett classica (18) o aventi fenotipo DPS (105) sono stati avviati all'indagine molecolare per ricerca di alterazioni del gene MECP2.

Un test di metilazione per la regione 15q11-q13 è stato eseguito in tutti i casi di sospetto clinico di sindrome di Angelman per l'identificazione di eventuali delezioni o alterazioni del pattern di metilazione della regione [15q11-q13].

Il test di metilazione, eseguito già da anni presso il laboratorio malattie Rare del Dipartimento di Pediatria, ha permesso di raccogliere un'ampia casistica di individui negativi al test di metilazione dalla quale sono stati selezionati 17 soggetti il cui sospetto clinico di Sindrome di Angelman era particolarmente suggestivo e 67 le cui caratteristiche fenotipiche erano più sfumate e quindi meglio ascrivibili al quadro fenotipico AS-RTT like. Nei soggetti appartenenti alla prima categoria sono state quindi ricercate alterazioni del gene UBE3A e solo in caso di negatività (16) è stata eseguita l'indagine molecolare per ricerca di alterazioni del gene MECP2, indagine eseguita anche nei soggetti appartenenti al quadro fenotipico AS-RTT like.

Nei casi in cui è stato ritenuto opportuno, le indagini sono state estese, ove possibile, ai familiari dei probandi al fine di studiare la segregazione di varianti di dubbia patogenicità.



## MATERIALI E METODI

Estrazione, quantificazione e valutazione qualitativa del DNA genomico:

L'estrazione di DNA genomico ad alto peso molecolare, è stata condotta con metodo convenzionale

“salting-out” a partire da 3-5 ml di sangue periferico anticoagulato con EDTA. La quantificazione del DNA genomico è stata ottenuta mediante lettura spettrofotometrica (spettrofotometro Gene Quant pro).

## ANALISI DEL GENE MECP2

La ricerca di alterazioni del gene MECP2 è stata effettuata su di un totale di 194 soggetti. A un'indagine di tipo qualitativo in grado di rilevare la presenza di mutazioni puntiformi e piccole e delezioni è stata affiancata un'indagine quantitativa in grado di rilevare la presenza di grandi delezioni e duplicazioni. L'indagine di tipo qualitativo è stata inizialmente eseguita tramite sequenziamento diretto; a questo tipo di analisi è stata in seguito affiancata la metodica DHPLC (Denaturigh High Pressure Liquid Cromatography) messa a punto nel corso del secondo anno di dottorato.

### Analisi qualitativa

La regione codificante, comprese le sequenze di giunzione tra esone ed introne, è stata suddivisa in diversi frammenti da amplificare mediante PCR. La scelta della frammentazione della sequenza da analizzare risponde alle esigenze delle metodiche di analisi del prodotto amplificato

Sono stati per questo utilizzati primers modificati rispetto a quanto riportato in letteratura da Amir et al (1999) e da Mnatzakanian et al. (2004) e sono state sviluppate condizioni di amplificazioni originali ( tabella 2)

## SEQUENZIAMENTO DIRETTO

### Condizioni di amplificazione

ESONE	AMPLICONE	PRIMER	PCR	
1	X1F	CCATCACAGCCAATGACG	MECP2 57	
2	X1R	AGGGGGAGGGTAGGAGGGAG	MECP2 52	
	IIF	TCAATGGGCTTTCAACTTAC		
3	IIR	GTTATGTCCTTTAGTCTTTGG	MECP2 58	
	3AF	CCTGCCTCTGCTGACTTGT		
4	IIIR	GGGCACTACATTTTCCTGCT	MECP2 58	
	4AF	TTTGTCTAGCGCGTTGTCACC		
	4BR	CTGCACAGATCGGATAGAAGG		MECP2 62
	4CF	GGCAGGAAGCGAAGCTGAG		
	4DR	CTCCCTCCGCTCGGTGTTTG		MECP2 58
	4EF	GGAGAAGATGCCAGAGGAG		
	4ER	CGGTAAGAAAAACATCCCCAA		

Tabella 2 : Primers utilizzati per il l'analisi mediante sequenziamento diretto, Le sequenze sono indicate in direzione 5' - 3'.

Ogni amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl in presenza di 1x PCR buffer II Pelkin Elmer (50 mM KCL, 10 mM Tris HCL, 0.1% w/v gelatin), dNTPs (2 mM), Taq Gold

Polymerase Pelkin Elmer (0.5 U) e primers (20 pMoli). Per l'amplificazione dei frammenti I e III è stato utilizzato MgCl<sub>2</sub> a concentrazione 1 mM, nei frammenti AB, CD ed E è stato aggiunto MgCl<sub>2</sub> in concentrazione 1.5 mM. Per l'amplificazione del frammento X1 sono state aggiunte 10% betaina e 10% DMSO.

Programmi di PCR

## PCR DI MECP2

95°C x12	95°C x12'	95°C x12	95°C x12	95°C x12'
95°C x1'	95°C x1'	95°C x1'	95°C x1'	95°C x1'
57°C x40*	58°C x1'	60°C x1'	62°C x1'	52°C x1'
72°C x45*	72°C x1'	72°C x1'	72°C x1'	72°C x1'
72°C x10'	72°C x10'	72°C x10'	72°C x10'	72°C x10'
4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞
MECP2	MECP2	MECP2	MECP2	MECP2
57	58	60	62	52

Il sequenziamento diretto è stato condotto su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems) utilizzando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute sono state comparate alla sequenza di riferimento pubblicata [gi 22830571] utilizzando il programma fornito da NCBI “Blast-two-sequence”.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

Ogni variante identificata è stata confermata mediante almeno due amplificazioni indipendenti.

## ANALISI DHPLC

### Messa a punto dell'analisi DHPLC

Per ogni amplificato sono state messe a punto le temperature del forno adeguate per ottenere l'ottimale separazione dell'eteroduplex in condizioni di parziale denaturazione. Per calcolare/visualizzare le curve di melting e stabilire le temperature di analisi è stato utilizzato il software Navigator fornito dalla Transgenomic. Sono state messe a punto solo le analisi di quei frammenti le cui caratteristiche intrinseche della sequenza nucleotidica sono state ritenute adeguate a questo tipo di indagine. All'analisi in silico è quindi seguita la messa a punto sperimentale del metodo: per ogni amplicone sono state testate differenti condizioni di eluizione Utilizzando in maniera combinata i dati ottenuti



dall'analisi in silico e dalle prove sperimentali, sono quindi state stabilite le condizioni di corsa più idonee per rilevare la presenza di eventuali alterazioni in ogni frammento. L'affidabilità e riproducibilità del metodo è stata testata analizzando 11 soggetti portatori di mutazioni la cui presenza era stata precedentemente identificata mediante sequenziamento diretto. In tutti i casi è stato possibile rilevare in modo altamente riproducibile la presenza di un'alterazione nel pattern di eluizione del frammento

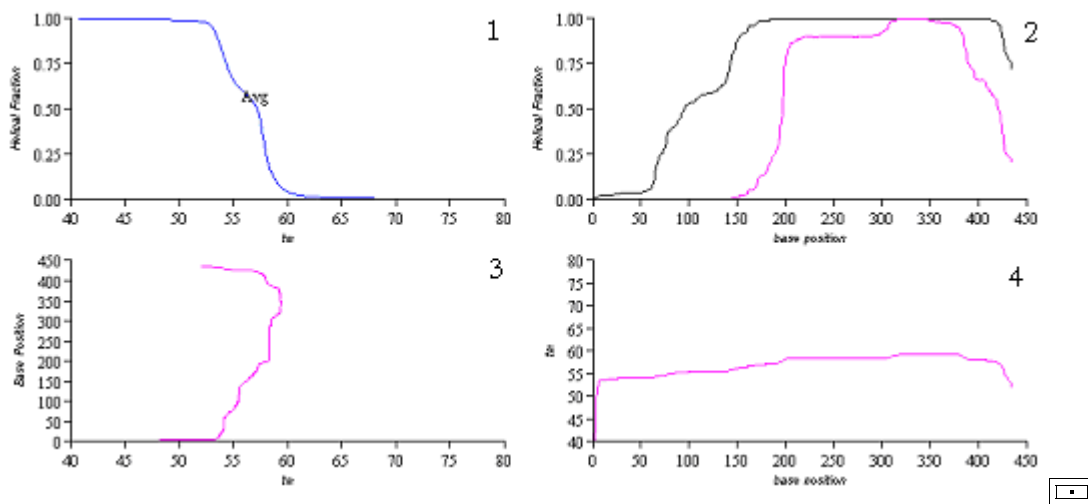


Figura 6: Analisi in Silico di una sequenza di amplificato operata dal Software Navigator.

Grafico 1: Helical Fraction vs. Temperature Melt

Grafico 2: Helical Fraction vs. Base Position

Grafico 3: Base Position vs. Temperature Melt

Grafico 4: Temperature Melt vs. Base Position

Dall'analisi risultano presenti 2 differenti domini di melting all'interno della molecola (indicati con le frecce rosse nel primo grafico). Dal programma vengono predette (grafici 2, 3 e 4) le due temperature necessarie per aprire la molecola a livello di entrambi i domini.

### Condizioni di Amplificazione

ESON	AMPLICONE	PRIMER	PCR
E			
3	3AF	CCTGCCTCTGCTGACTTGTT	MECP2 58

	3AR	GGGGTCATCATAACATGGGGTC	
	3BF	AGCCCGTGCAGCCATAGCC	MECP2 62
	3BR	GTTCCCCGACCCACCT	
4	4AF	TTTGTGAGCGCGTTGTACC	MECP2 58
	4AR	CTTCCCAGGACTTTTCTCCA	
	4BF	ACCACCTAAGAAGCCCAA	MECP2 58
	4BR	CTGCACAGATCGGATAGAAGG	
	4CF	GGCAGGAAGCGAAGCTGAG	MECP2 62
	4CR	TTGAGTGGTGGTGTGGTGGTG	
	4DF	GGTGAAGCCCCTGCTGGTG	MECP2 62
	4DR	CTCCCTCCGCTCGGTGTTTG	
	4EF	GGAGAAGATGCCAGAGGAG	MECP2 58
	4ER	CGGTAAGAAAAACATCCCAA	

Tabella 3: Primers utilizzati per l'analisi mediante DHPLC. Le sequenze sono indicate in direzione 5' - 3'.

Ogni amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl in presenza di 1x PCR buffer II Pelkin Elmer (50 mM KCL, 10 mM Tris HCL, 0.1% w/v gelatin), dNTPs (2 mM), Taq Gold

Polymerase Pelkin Elmer (0.5 U) e primers (10 pMoli). Per l'amplificazione dei 3a 4a 4b 4c e 4e è stato utilizzato MgCl<sub>2</sub> a concentrazione 1.5 mM, nel frammento 4d è stato aggiunto MgCl<sub>2</sub> a concentrazione 1.7 mM e nel frammento 3b è stato aggiunto MgCl<sub>2</sub> a concentrazione 1 mM Per l'amplificazione del frammento X1 sono state aggiunte 10% betaina e 10% DMSO.

#### Programmi di PCR

Sono state utilizzati i medesimi programmi di PCR messi a punto per l'analisi in sequenza ma per ogni frammento sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione al fine di aumentare la quantità dei prodotti di amplificazione.

#### Condizioni di eluizione

Per ogni corsa il DNA è stato eluito dalla colonna mediante un gradiente lineare di acetonitrile in buffer con pH 7 di trietilamino-acetato 0.1mM (TEAA, Transgenomic) ad un tasso di flusso pari a 0.9 mL/min. Il gradiente è determinato dal miscelamento del buffer A (0.1 mM TEAA) con il buffer B (0.1 mM TEAA, 25% v/v acetonitrile). Il gradiente analitico aveva durata di 4 minuti e il buffer B è stato incrementato del 2% al

minuto. Per ciascun frammento, le concentrazioni iniziali del buffer B sono state aggiustate per ottenere un tempo di ritenzione di quattro o cinque minuti.

Ad ogni nuova eluizione la colonna è stata lavata con buffer D (acetonitrile 100%) ed equilibrata per 6 secondi secondo le condizioni d'inizio per l'iniezione successiva. L'eluizione del DNA è stata monitorata dall'assorbanza UV a 260 nm.

Al fine di consentire la formazione degli eteroduplex, prima dell'analisi in DHPLC i frammenti sono stati denaturati a 95° per 5 min, il reannealing graduale dei filamenti di DNA è stato poi ottenuto lasciando i campioni per 40 min a temperatura ambiente.

Per indurre la formazione di eteroduplex anche nel caso della presenza di eventuali alterazioni in omozigosi ad ogni campione è stata aggiunta anche una quota di amplificato di un soggetto normale (rapporto: 1/3 amplificato normale - 2/3 amplificato d'interesse). Lo stesso amplificato è stato aggiunto anche ai controlli normali per rendere comparabili i profili d'eluizione.

<b>AMPLICONE</b>	<b>TEMP</b>
MECP2 3A	58,6-61,1-63,6
MECP2 3B	58,6-60,6-63,6
MECP2 4A	58,2-60,2
MECP2 4B	62,8
MECP2 4C	62,3
MECP2 4D	62,6
MECP2 4E	55,8-58,8-61,8- 64,8

Tabella 4: Temperature del forno impiegate per l'eluizione degli amplificati del gene MECP2.

L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il software Navigator fornito dalla Transgenomic.

Gli ampliconi il cui profilo è risultato eteroduplice sono stati successivamente riamplicati e sequenziati per caratterizzare la variante.

## Analisi quantitativa

### Real time PCR

L'analisi PCR Real Time Quantitativa è stata eseguita su strumento ABI PRISM 7000® utilizzando chimica SYBR® Green .

La reazione di PCR è stata effettuata con 25 ng di DNA template in un volume finale di 15 µl; primers a concentrazione di 300 nM , SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems).

Le condizioni di amplificazione della reazione prevedono uno step di denaturazione iniziale di 10' a 95°C seguito da 40 cicli di 2 step (denaturazione: 15 secondi a 95°C, annealing: 60 secondi a 60°C).

Come gene housekeeping di riferimento è stato utilizzato il gene TERT (Telomerase Reverse Transcriptase). [OMIM +187270].

I primers utilizzati per l'analisi, indipendentemente sviluppati, sono riportati nella tabella 5.

<b>AMPLICONE</b>	<b>PRIMER</b>
TERT-FW	GGCACACGTGGCTTTTCG
TERT-RW	GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA
904- FW	CCCATCAAGAAGCGCAAGA
1033-RW	TCCGCCAGGGCTCTT

Tabella 5: Sequenza dei primers utilizzati per la Real-Time PCR quantitativa. Le sequenze sono indicate in direzione 5' - 3'.

In ogni piastra di Real-Time, per ogni frammento amplificato, sono stati utilizzati campioni di DNA genomico normali di controllo (Standard) a concentrazione nota e diluizioni progressive, al fine di ottenere una curva standard.

Sono state considerate valide solo reazioni con una pendenza della curva standard compreso tra -3.1 e -3.7

Per valutare i risultati della Real-Time PCR quantitativa è stato considerato un limite di tolleranza di  $\pm 10\%$  rispetto al valore teorico atteso di un ipotetico campione normale

ottenuto con il metodo “delta-delta Ct” utilizzato per calcolare il dosaggio genico relativo.

Per escludere la presenza di possibili aspecifici dovuti all'utilizzo di SYBR® Green (che si lega a qualsiasi DNA a doppio filamento presente nella reazione) è stato utilizzato il protocollo “Dissociation Protocol”.

Per ogni campione sono state eseguite in ogni piastra 4 ripetizioni sia per il gene MECP2 che per il gene TERT.

### Studio dello stato di X-inattivazione

In tutti i soggetti di sesso femminile aventi un'alterazione della sequenza del gene MECP2 ritenuta patogenetica è stato svolto uno studio dello stato di X-inattivazione, elemento fondamentale nella determinazione della gravità del fenotipo in tutte le patologie X-linked

Lo studio dello stato di X-inattivazione è stato eseguito utilizzando il protocollo pubblicato da Allen [Allen et al.1992].

Per ogni campione sono state amplificate con primer fluorescenti (fluorocromo 6-FAM™ legato al 5' del primer forward) due aliquote di 100 ng di DNA, una delle quali precedentemente digerita per un overnight utilizzando un enzima sensibile alla metilazione (HpaII-New English Biolabs).

L'amplicone così ottenuto contiene sia un sito di taglio HpaII che una tripletta ripetuta altamente polimorfica localizzata all'interno del gene androgen-receptor [OMIM \*313700].

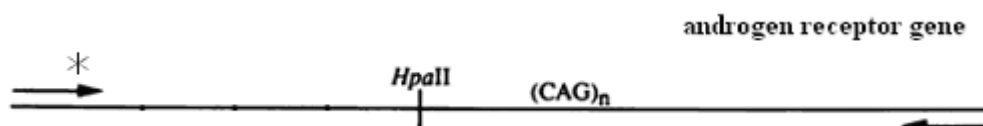


Figura 7: Amplificazione dell'Androgen receptor gene. All'interno del gene sono presenti una tripletta ripetuta e un sito di taglio HpaII. L'amplificazione viene eseguita utilizzando un primer marcato (indicato con l'asterisco). *Immagine tratta e modif. da Allen et al. 1992.*

Dopo l'incubazione con l'enzima è possibile amplificare solo il cromosoma X inattivo il cui sito di digestione, protetto dalla metilazione, non viene tagliato dall'enzima.

Poiché lo stato di metilazione dell'STR (Short Tandem Repeats) correla con l'X inattivazione, è possibile quantizzare con una corsa elettroforetica -condotta su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems) l'area dei picchi corrispondenti a ogni allele e, data la natura altamente polimorfica di questa ripetizione, conoscendo il numero di ripetizioni degli alleli dei genitori è possibile attribuire l'origine parentale all'allele "skewed" del probando. Per l'analisi dei picchi è stato utilizzato il software GENESCAN® (Applied Biosystems) .

#### ANALISI DEL GENE UBE3A

La ricerca di alterazioni del gene UBE3A è stata effettuata su un totale di 17 soggetti.

A un'indagine di tipo qualitativo in grado di rilevare la presenza di mutazioni puntiformi e piccole e delezioni è stata affiancata un'indagine quantitativa in grado di rilevare la presenza di grandi delezioni e duplicazioni. L'indagine di tipo qualitativo è stata inizialmente svolta tramite sequenziamento diretto, in seguito è poi stata affiancata dalla metodica DHPLC (Denaturigh High Pressure Liquid Cromatography) messa a punto nel corso del terzo anno di dottorato.

#### Analisi qualitativa

La regione codificante [esoni 7-16] comprese le giunzioni esone-introne è stata suddivisa in 14 diversi frammenti amplificati mediante PCR utilizzando primers pubblicati in letteratura con condizioni precedentemente descritte [Rappako et al. (2004)].

Dei nuovi primer per l'esone nove sono stati disegnati utilizzando il programma Primer Express 2.0 per impedire, mediante una variante di ARMS-PCR, la coamplificazione dello pseudogene processato del gene UBE3A (UBE3AP2) .

ESON E	AMPLICON E	PRIMER	SIZE	T°a
7	UB7	GCTAACTGTTTCTCAATTGC ATAAGAACCACAGTCTCAAC	105bp	55
8	UB8A	GCCTTGATGATATGTTGAGC	365bp	60

8	UB8B	AATTCTAGCGCCTTTCTTGT GCCTGCACGAATGAGTTTTGT	385bp	62
9	UB9A	AGTTATTATTCCTGTCCGTTACCA TGTTTGGCTGTTTTACTTTTAGAA	436bp	60
9	UB9B	GGCATCAATATCCACAGACACA ATGTTCTGCTGCTGCTATGG	424bp	55
9	UB9C	TCTCCGAATCTGGTCTGC CAATGAATTTAACAGTCGCA	546BP	52
9	UB9D	CATCATCTATGATATGGTCACG CGCATGTACAGTGAACGAAGAA	282BP	60
10	UB10	TGCACAGGAACAACAAAAGTAT GTTTGCTTTCTGTTTCCATTTAC	392bp	50
11	UB11	ATCCTTTGGCTTCATAA TGGTACTTCGGTCAGATT	587bp	50
12	UB12	AACTATTTGGGGGACTGGAG ACACCCTGCTTCTTGCTTTAT	592bp	60
13	UB13	GAAATTGTTAAGAAGTAGGTG ATATGTCTTAGTTATCTGCTA	394bp	53
14	UB14	AGGTGCTGCAAAAAGTC TTAGCTCTGAAAAATGGTG	332bp	57
15	UB15	ATAATGAATGCCAAACTGAA ATATGTATGTGACGAGGAATG	256bp	53
16	UB16	TATTTCCCATGACTTACAG AAAATTTATCCCTCGTTA	264bp	50

Tabella 6: Primers utilizzati per l'analisi mediante sequenziamento diretto/DHPLC. Le sequenze sono indicate in direzione 5' - 3'.

#### Condizioni di amplificazione:

Ogni amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl in presenza di 1x PCR buffer II Pelkin Elmer (50 mM KCL, 10 mM Tris HCL, 0.1% w/v gelatin), dNTPs (2 mM), Taq Gold

Polymerase Pelkin Elmer (0.5 U) e primers (20 pMoli). Per l'amplificazione dei frammenti 15, 11, 16 e 9c è stato utilizzato MgCl<sub>2</sub> a concentrazione 2 mM, nei frammenti restanti è stato aggiunto MgCl<sub>2</sub> in concentrazione 1.5 mM.

#### Programma di PCR

## PCR DI UBE3A

### UBE3A

94°C x 10'  
94°C x 30"  
T<sub>a</sub>°C x 30"  
72°C x 30"  
72°C x 7'  
4°C ∞

} x 30 cy

Il sequenziamento diretto è stato condotto su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems) utilizzando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute sono state comparate alla sequenza di riferimento [gi:30316443] utilizzando il programma fornito da NCBI “Blast two sequence” ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/w\\_blast2.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/w_blast2.cgi)).

Ogni variante identificata è stata confermata mediante almeno due amplificazioni indipendenti.

## ANALISI DHPLC

### Messa a punto dell'analisi DHPLC

La metodica è stata messa a punto secondo le modalità precedentemente descritte (pag. 23) .

### Condizioni di analisi DHPLC

Per ogni corsa il DNA è stato eluito dalla colonna mediante un gradiente lineare di acetonitrile in buffer con pH 7 di trietilamino-acetato 0.1mM (TEAA, Transgenomic) ad



un tasso di flusso pari a 0.9 mL/min. Il gradiente viene determinato dal miscelamento del buffer A (0.1 mM TEAA) con il buffer B (0.1 mM TEAA, 25% v/v acetonitrile). Il gradiente analitico dura 4 minuti e il buffer B è incrementato del 2% al minuto. Per ciascun frammento, le concentrazioni iniziali del buffer B sono state aggiustate per ottenere un tempo di ritenzione di quattro o cinque minuti.

La colonna viene quindi lavata con buffer D (acetonitrile 100%) ed equilibrata per 6 secondi secondo le condizioni d'inizio per l'iniezione successiva. L'eluizione del DNA è monitorata dall'assorbanza UV a 260 nm.

AMPLICONE	ESONE	TEMP
UB8A	8	57,0-58,0
UB8B	8	54,4-56,4-56,4
UB9A	9	53,3-55,3-57,3
UB9B	9	55,3-56,3
UB9D	9	54,9-56,9
UB10	10	53,9-55,0-56,0
UB11	11	51,5-52,5-55,5-56,5
UB12	12	52,8-53,8
UB13	13	53,6-54,6-55,6
UB14	14	54,4-56,4
UB15	15	55,8-56,8
UB16	16	52,6-54,6-55,6

Tabella 7: Temperature del forno impiegate per l'eluizione degli amplificati del gene MECP2

Gli ampliconi il cui profilo è risultato eteroduplice sono stati successivamente analizzati mediante sequenziamento automatico (ABI prism3100) per caratterizzare la variante.

### Analisi quantitativa

#### Real- Time PCR

L'analisi PCR Real-Time quantitativa è stata eseguita su strumento ABI PRISM 7000® utilizzando chimica SYBR® green. utilizzando le condizioni descritte altrove ( pag 26)

## ANALISI DEL GENE CDKL5

La ricerca di alterazioni del gene CDKL5 è stata effettuata su un totale di 15 soggetti.

La ricerca di mutazioni puntiformi e piccole e delezioni è stata effettuata tramite una strategia sequenziamento diretto e DHPLC.

La regione codificante [esoni 2-21] e parte del 3'UTR [esoni 1, 1a e 1b] sono state suddivise in 24 diversi frammenti amplificati mediante PCR utilizzando primers pubblicati in letteratura con condizioni precedentemente descritte [Kalscheuer et al. (2003)].

L'analisi dei frammenti è stata eseguita con una strategia combinata DHPLC/sequenziamento diretto (tabella 8).

<b>ESONE</b>	<b>ANALISI</b>	<b>ESONE</b>	<b>ANALISI</b>
1	63,3 - 65,3	12a	58,1 - (59,1)
1a/b	56,6 - 58,6	12b	sequenziamento
2	54,2 - 56,2 - 57,2	12c	sequenziamento
3	52 - 53 - 55	13	56,1 - 57,1
4	sequenziamento	14	sequenziamento
5	sequenziamento	15	53,9 - 55,9
6	53,2 - 55,2	16	sequenziamento
7	(51,8)	17	sequenziamento
8	55,8 - 56,8	18	sequenziamento
9	(55,1) - 56,1 - (57,1) - 58,1	19	(57,6) - 58,6
10	55,1 - 56,1	20	59,3 - 60,3
11	sequenziamento	21	sequenziamento
12	sequenziamento		

Tabella 8: Condizioni impiegate per l'analisi del gene CDKL. Per i frammenti per cui l'analisi è stata eseguita mediante DHPLC sono riportate le temperature del forno a cui sono stati fatti eluire gli amplificati.

Il sequenziamento diretto è stato condotto su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems) utilizzando Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Le sequenze ottenute sono state comparate alla sequenza di riferimento [gi:89161218] utilizzando il programma fornito da NCBI “Blast-two-sequence” .

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

Ogni variante identificata è stata confermata mediante almeno due amplificazioni indipendenti.

L’analisi DHPLC è stata condotta secondo le condizioni precedentemente descritte (pag. 25) e temperature di corsa riportate nella tabella 8.

Gli ampliconi il cui profilo è risultato eteroduplice sono stati successivamente analizzati mediante sequenziamento automatico (ABI prism3100) per caratterizzare la variante.

#### ANALISI IN SILICO DELLE VARIANTI IDENTIFICATE

Nei casi di identificazione di varianti di dubbia patogenicità di cui non è stato possibile seguire la segregazione nella famiglia (o perché insorte “de novo” o perché i familiari non erano disponibili all’indagine), è stata effettuata l’indagine in silico mediante opportuni software , per ottenere possibili indicazioni riguardo la natura della variante.

:

- Revisione della letteratura (Entrez-PubMed)
- Analisi della conservazione tra specie (Clustlw, Blast, Ensembl Genome Browser)
- Ricerche di putativi elementi ESE (ESE finder, NetGene2 Server, SpliceView)

#### RICERCA DI ALTERAZIONI A CARICO DELLA REGIONE 15q11-q13

La ricerca di alterazioni a carico della regione 15q11-q13 è stata effettuata su un totale di 61 soggetti. L’indagine è stata eseguita mediante Test di metilazione basato su modificazione del DNA con sodio metabisolfito secondo il protocollo pubblicato da Kenjiro Kosaki et al. (1997).

Il trattamento di DNA con sodiometabisolfito comporta una conversione delle basi di citosina non metilata in uracile, mentre le citosine metilate sono resistenti a questo tipo di modificazione. Dopo modificazione i filamenti di DNA che differiscono per lo stato

di metilazione non sono più complementari, per cui è possibile amplificare specificatamente l'allele metilato e l'allele non metilato.

Mediante MSPCR (Methylation Specific PCR) viene quindi amplificato il promotore dell'esone 1 del gene SNRPN, il cui stato di metilazione è rappresentativo per l'intera regione 15q11-q13.

L'analisi dei prodotti dell'amplificazione è stata condotta mediante corsa elettroforetica in gel di acrilammide al 10% e successiva colorazione Silver-Staining.

Tale indagine è in grado di rilevare la presenza di alterazioni del corretto stato di imprinting della regione 15q11-q13 (come conseguenza di grandi delezioni, disomia uniparentale, mutazioni a carico del centro di imprinting).

Nei campioni risultati positivi al test di metilazione l'identificazione del difetto molecolare (grande delezione dell'intera regione o piccola delezione del centro di imprinting) è stata effettuata mediante PCR Real Time con il protocollo messo a punto nel corso del Dottorato ( pag. 49) e analisi di microsatelliti ( pag. 51).

## RISULTATI

### Ricerca di alterazioni del gene MECP2

La ricerca alterazioni del gene MECP2 è stata condotta su 195 campioni di DNA di soggetti aventi indicazioni cliniche di Sindrome di Rett (18), Sindrome di Angelman (5) o un fenotipo appartenente allo spettro dei disturbi pervasivi dello sviluppo (105). In tutti i soggetti aventi fenotipo AS o RTT-AS like è stata esclusa la presenza di anomalie a carico della regione 15q11-q13, in tutti i soggetti DPS è stata esclusa la presenza di X-Fragile.

Dei 18 soggetti con diagnosi di Sindrome di Rett, 12 (67%) sono risultati portatori di mutazione-malattia su uno dei due alleli del gene.

In queste pazienti sono state identificate 4 mutazioni missense (c.455 C>G, c. 916 C>T, c. 473 C>T, c.401 C>G) 2 mutazioni nonsense (c.502 C>T, c.880 C>T), 4 mutazioni frameshift (1202\_1203 ins G, c.806delG, c.738\_739 ins AT, c.753delC) e una grande delezione.

Tutti i soggetti con quadro clinico Angelman sono risultati negativi all'indagine molecolare MECP2 (0 %).

Dei 105 soggetti aventi fenotipo DPS, 1 (1%) è risultato portatore di una variante missense patogena del gene MECP2 (p.P152R). Tale variante è stata rilevata anche in un soggetto avente fenotipo AS\_RT-T-like, l'unico (1.5%) trovato portatore all'interno della casistica di 67 individui aventi fenotipo AS-RTT-like.

In totale, sono state rinvenute 11 differenti varianti patogene, tutte precedentemente riportate in letteratura. In tutti i casi le mutazioni sono eterozigoti e nei soggetti in cui è stato possibile testare i genitori (5) sono sempre risultate essere insorte de novo. Nel corso dell'indagine sono state rinvenute anche 10 varianti considerate non patogene: 4 varianti introniche, 4 varianti missense, 3 varianti della sequenza del 3' UTR e 3 varianti missense.

In tutti i casi è stata (per quanto possibile) esclusa l'eventuale patogenicità della variante esaminando i familiari del probando, valutando i dati in letteratura e operando l'analisi in silico dell'alterazione.

Tabella varianti patogene

<b>SOSPETTO CLINICO</b>	<b>MUTAZIONE</b>	<b>NUCLEOTIDE</b>	<b>CATEGORIA</b>
RTT	FRAMESHIFT	1202_1203 ins G	frameshift
RTT	p.G269fs	c.806delG	frameshift
RTT	p.M246 fs	c.738_739 ins AT	frameshift
RTT	p.P251fs	c.753delC	frameshift
RTT	delezione		delezione
DPS, AS/RTT	p.P152R	c.455 C>G	missense
RTT	p.R306C	c. 916 C>T	missense
RTT	p.T158M	c. 473 C>T	missense
RTT	pS134C	c.401 C>G	missense
RTT	P.R168X	c.502 C>T	nonsense
RTT, RTT, RTT	p.R294X	c.880 C>T	nonsense

Tabella 9: In tabella sono riportate le varianti patogene identificate. Per ciascuna variante sono riportate variazione nucleotidico e aminoacidica, fenotipo coinvolto e categoria di mutazione.

Tabella varianti polimorfiche

<b>SOSPETTO CLINICO</b>	<b>MUTAZIONE</b>	<b>NUCLEOTIDE</b>	<b>CATEGORIA</b>
DPS	polim 3' UTR	C.1559-1560 ins a*	3' UTR
RTT	polim 3' UTR	c. 1474 C>T*	3' UTR
DPS	polim 3' UTR*	c.1554G>A*	3' UTR
DPS	IVS3+22 C>G*	c.377+22*	intronica
RTT	IVS3-66C>T;	378-66 C>T ,	intronica
DPS		c.378-37 C>G	intronica
AS/RTT	IVS3-19delT	polimorfismo	intronica
RTT	p.A201V	c.602 C>T*	missense
DPS	p.T197M*	c.590C>T*	missense
RTT	Pro 405 Leu	c.1214 C>T	missense
AS/RTT	p.S194S*	c.582C>T	samesense
DPS	p.P379P*	c. 1137 C>T*	samesense
DPS	p.I125I*	c.375 C>A*	samesense
DPS	p.Ile125Ile	c.C375A	samesense

Tabella 10: In tabella sono riportate le varianti polimorfiche identificate. Per ciascuna variante sono riportate variazione nucleotidico e aminoacidica, fenotipo coinvolto e categoria di mutazione.

#### Studio dell'X-inattivazione

In 10 soggetti portatori di alterazioni patogene del gene MECP2 è stato operato lo studio dello stato di inattivazione del cromosoma X. Tra questi, quattro individui presentavano un' inattivazione “skewed”, tre un' inattivazione “sbilanciata” e i restanti tre risultavano essere inattivati random. In 5 dei casi è stato possibile esaminare anche i genitori dei probandi per stabilire l' origine dell' allele preferenzialmente espresso, in tutti e 5 i casi l'allele prevalentemente inattivo è risultato essere quello di origine materna.

#### Ricerca di alterazioni del gene UBE3A

La ricerca alterazioni del gene UBE3A è stata condotta su 17 campioni di DNA di soggetti aventi indicazioni cliniche di Sindrome di Angelman. In tutti i soggetti è stata esclusa la presenza di anomalie a carico della regione 15q11-q13.

L'indagine ha permesso di verificare la presenza dell'alterazione [IVS10+1 G>A] in un soggetto affetto (6%), le cui caratteristiche cliniche soddisfavano pienamente i criteri diagnostica della Sindrome di Angelman

La mutazione UBE3A da noi identificata, mai precedentemente riportata in letteratura, causa l'alterazione della sequenza di consenso del sito di splice-donor dell'esone 10 (confermato da GeneNet2, confidence 0.88, e SpliceView).

I genitori non sono risultati essere portatori di tale variante.

Nel corso dell'indagine sono state rinvenute anche 2 varianti [c.346C>T e c.417A>T] riportate in letteratura come non patogene, entrambe presenti in un unico soggetto.

Nessun individuo è risultato essere portatore di una grande delezione del gene UBE3A.

#### Ricerca di alterazioni del gene CDKL5

La ricerca alterazioni del gene CDKL5 è stata condotta su 15 campioni di DNA di soggetti aventi epilessia ad esordio precoce le cui caratteristiche cliniche erano parzialmente riconducibili a un fenotipo Rett. In un soggetto maschio è stata individuata la presenza di una variante nonsense della sequenza aminoacidica a livello dell'esone 12 (c.1674 C>T; p. R558X) mai riportata nei database. L'individuo portatore di tale variante è affetto da Sindrome di Klinefelter (cariotipo XXY) documentata citogeneticamente. L'analisi dello stato di X-inattivazione ha permesso di identificare la presenza di disomia uniparentale paterna e di stabilire che l'X-inattivazione in tale soggetto è bilanciata. Nel corso dell'indagine è stata rinvenuta anche una variante non patogena (c.2372 A>C; p.Q791P), riportata nei database. Tale variante è presente nel 20% della popolazione generale.

#### Ricerca di alterazioni della regione 15q11-q13

Il test di metilazione è stato condotto su 61 campioni di DNA di soggetti aventi indicazioni cliniche di Sindrome di Angelman. Cinque soggetti (8%) sono risultati positivi all'indagine. L'analisi differenziale eseguita mediante Real-Time PCR su questi campioni ha consentito di identificare la presenza di delezione dell'intera regione in 4 di questi soggetti (80%) e di escludere la presenza di grande delezione e piccola delezione del centro di imprinting nel soggetto restante (20%). In questo ultimo soggetto è stata verificata la presenza di disomia uniparentale del cromosoma di origine paterna mediante analisi di microsatelliti.

**La parte del lavoro riguardante l'alterazione del gene UBE3A è stata presentata come poster dal titolo: "NUOVA MUTAZIONE DEL GENE UBE3A IN UN CASO SPORADICO DI SINDROME DI ANGELMAN" al IX Congresso nazionale di Genetica Umana (SIGU) Venezia 8-10 Novembre 2006.**



Il lavoro, accettato per pubblicazione è attualmente “in press” sulla rivista *Journal of Child Neurology*, con il titolo “Angelman syndrome due to a novel splicing mutation of the UBE3A gene”, Autori: Sartori S, Anesi L, Polli R, Toldo I, Casarin A, Drigo P, Murgia A.

La parte del lavoro riguardante la ricerca di alterazioni del gene MECP2 e del gene CDKL5 è stata presentata come poster dal titolo “Molecular diagnosis in Rett Syndrome: the experience of a referring centre for rare disease in the north-east of Italy.” all’ European Working Group on Rett Syndrome April 19-20, 2007 e come poster dal titolo “Molecular diagnosis in Rett Syndrome: the experience of a referring centre for rare disease in the north-east of Italy.” al 13<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and X-Linked Mental Retardation XLMR 13 3-6 October 2007 Venezia Lido, Italy. (Anesi L, Polli R, Martella M, Leonardi E, Bettella E, Toldo I, Battistella PA, Drigo P, Sartori S, Laverda AM, Murgia A.)



## **ANALISI DELLA REGIONE 15q11-q13**

### INTRODUZIONE

#### LA REGIONE CRITICA PRADER-WILLI/ANGELMAN

La regione 15q11-q13 è altrimenti conosciuta come regione critica Prader-Willi/Angelman (PWS/AS); tale regione è infatti soggetta a imprinting genomico e anomalie a carico di questa sono responsabili, a seconda che coinvolgano l'allele di origine materna o quello di origine paterna, di due disturbi neurologici clinicamente distinti: la Sindrome di Angelman e la Sindrome di Prader-Willi. La figura 8 mostra l'organizzazione della regione PW/AS, localizzata a livello della banda citogenetica q11-13 del cromosoma 15 umano. All'interno della regione è presente un Centro bipartito di imprinting (Imprinting Center Region, ICR), ovvero una regione di controllo organizzata in due unità funzionalmente distinte in grado di controllare e mantenere l'instaurarsi del corretto stato di metilazione e quindi dell'effetto parentale sull'espressione dei geni della regione. Il gene SNRPN (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N), espresso sul cromosoma paterno ma silente su quello materno rappresenta un punto di riferimento chiave della regione. Il promotore di SNRPN infatti è localizzato vicino ad una isola CpG completamente metilata sul cromosoma materno e ipometilata su quello paterno; lo stato di metilazione di tale promotore è considerato rappresentativo dello stato di metilazione dell'intera regione 15q11-q13. Parte del centro bipartito di Imprinting (la porzione che controlla l'allele di origine paterna) si sovrappone a questa regione. Altri geni identificati nella regione critica PW/AS sono: IPW, ZNF127 e NDN, espressi dal locus paterno, il "gene Angelman" UBE3A, il cui imprinting materno è tessuto specifico e il cluster dei geni GABAA, il cui stato di imprinting è ancora incerto. Il gene (P), la cui delezione è associata alle caratteristiche di ipopigmentazione in soggetti PW o AS, non è sottoposto ad imprinting.

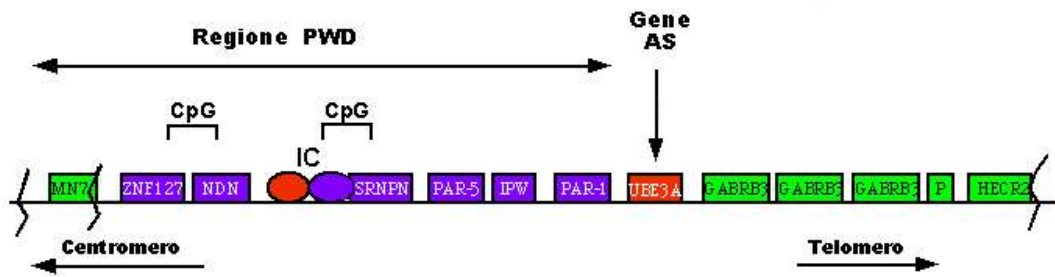


Figura 8: Regione PW/AS. IC e' il centro di imprinting bipartito che agisce in cis. La regione di IC che controlla passaggio da materno a paterno (la delezione provoca PWS) si sovrappone al promotore di SNRPN ed e' colorata in blu come i geni espressi dall'allele paterno. Al contrario UBE3A espresso 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 soggetti a imprinting sono rappresentati in verde. *Immagine tratta e modificata da Jiang Y. et al 1999.*

L'intera regione 15q11-q13 è spesso soggetta a delezione, sono stati infatti individuati dei breakpoint comuni che distano tra loro circa 4 Mb. Il gene HECR2 è localizzato vicino al punto di rottura telomerico. Questo gene ha subito nel corso dell'evoluzione una serie di duplicazioni /trasposizioni: vi e' uno pseudogene sul cromosoma 16 e, sul cromosoma 15, immediatamente adiacente al gene funzionale, vi sono alcune copie troncate; altre copie sono presenti nella regione centromerica del locus PWD. Si ritiene che le delezioni interstiziali della regione PW/AS siano originate da crossing-over ineguale fra le copie complete o troncate del gene HECR2, la cui sequenza comprende numerosi elementi ripetuti in basso numero di copie (low-copy-repeats).

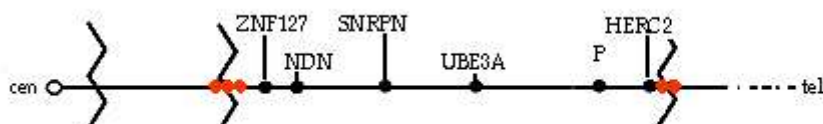


Figura 9: La figura riporta in rosso gli pseudogeni di HERC2. Solo alcuni dei geni della regione sono indicati. Le linee spezzate indicano i punti di rottura più frequenti *Immagine tratta e modificata da Jiang Y. et al 1999.*

Sebbene la delezione dell'intera regione sia la causa molecolare più frequente della perdita del corretto contributo parentale, questa perdita può anche essere una conseguenza di eventi di disomia uniparentale o di piccole delezioni a carico dei centri di controllo che regolano il corretto instaurarsi dell'imprinting. Delezioni del Centro di Imprinting determinano un'inversione dello schema di metilazione nella regione critica PWS/AS che risulta nella presenza di due alleli con identico pattern di espressione e dunque apparente contributo monoparentale.

Evidenze sperimentali [Butting et al. (1995) e (1999); Dittrich et al. (1996, Saitoh et al. 1996 ] hanno permesso di individuare per entrambe le unità, PWS e AS, del centro di imprinting bipartito la più piccola regione di sovrapposizione delle delezioni, definita come "short region of overlap" (SRO). PWS-SRO consta di 4.3 kb ed è localizzato parte nel promotore e parte nel primo esone del gene SNRPN, AS-SRO consta di 880 bp ed è localizzata 35 kb a valle del promotore del gene SNRPN.

Raramente a fronte di un pattern di metilazione errato non è possibile identificare la presenza di grosse delezioni, disomia uniparentale, o microdelezioni a livello del centro di imprinting, in questi casi il meccanismo molecolare rimane sconosciuto, potendo essere rappresentato da mutazioni puntiformi della regione IC come persino da alterazioni dei meccanismi che regolano lo stesso instaurarsi dell'imprinting.

MECCANISMO	% PW	% AS	METILAZIONE*	RICORRENZA
4 Mb del 15q11-q13	70	68	anomala	molto bassa
UPD	25	7	anomala	molto bassa
delezione IC	1	3	anomala	significativa
mutazione di singoli geni	0	11	normale	Significativa
Eziologia molecolare sconosciuta	1	10-14	normale	rara

\* "Anomalo" vuol dire che nella regione del promotore di SNRPN e' stato messo in evidenza solo un unico tipo di pattern di metilazione (completamente mutilato o sottometilato).

Tabella 11: In tabella sono riportate le frequenze di incidenza delle diverse anomalie molecolari responsabili delle sindromi di Prader-Willi e Angelman. Per ogni alterazione sono indicati lo stato di metilazione del promotore di SNRPN e il rischio di ricorrenza. [Williams et al 2007]

Nella tabella 11 sono riportate le frequenze con cui si presentano le differenti alterazioni nelle due sindromi e una misura indicativa del rischio di ricorrenza nei fratelli di un affetto per ciascun caso. La grande delezione interstiziale e la disomia uniparentale sono nella maggioranza dei casi eventi sporadici, le piccole delezioni del centro di imprinting sono spesso familiari. In questi casi il rischio di ricorrenza dipende dal sesso del genitore e va calcolato anche considerando la terza generazione: un uomo portatore di una delezione del centro di imprinting AS-SRO non ha nessun rischio di avere un figlio affetto, pur avendo la probabilità del 50% di trasmettergli la mutazione. Figli del probando di sesso femminile che avessero ereditato la mutazione senza effetto fenotipico, avranno un probabilità del 50% di avere un figlio affetto da AS in quanto portatore della mutazione del nonno. Pertanto la mutazione di AS può 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. Lo stesso ragionamento può essere posto nel caso di soggetti portatori di delezioni del PWS-SRO. A seconda dell'origine molecolare del difetto genico oltre a variare il rischio di ricorrenza cambia anche la gravità del fenotipo, soggetti aventi la grande delezione presentano quadri fenotipici più complessi rispetto a soggetti in cui la mancanza del corretto contributo parentale è determinata da disomia uniparentale emerge quindi l'importanza di una diagnosi molecolare completa in ogni soggetto affetto.

La tecnica comunemente utilizzata per rilevare le classiche anomalie che sono causa dei fenotipi Prader-Willi e Angelman è il Test di metilazione. Questo test si basa sull'amplificazione allele specifica del DNA genomico precedentemente modificato con sodio metabisolfito (Methylation Specific PCR/MSPCR), oppure sull'uso di tecnica Southern-blot con l'impiego di enzimi sensibili alla metilazione. Il test di metilazione è un metodo diagnostico rapido e efficiente, esso tuttavia non è in grado di discriminare tra le differenti cause che possono essere alla base del contributo monoparentale (grande delezione, alterazione dell'imprinting e disomia uniparentale). In caso di positività deve

quindi comunque essere seguito da ulteriori indagini, tipicamente mediante tecniche di citogenetica standard o molecolare che richiedono tempi di esecuzione e costi relativamente elevati. [Williams et al. (2007)]

Nel 2004 alcuni autori [Raca et al. (2004)] hanno pensato di utilizzare la metodica Real-Time PCR per individuare la presenza di piccole delezioni del centro di imprinting, nel corso dell'attività di Dottorato tale idea è stata ripresa e ampliata per elaborare una strategia veloce di analisi delle delezioni della regione. All'analisi quantitativa del centro di imprinting è stata affiancata l'analisi quantitativa della porzione prossimale della regione critica PW/AS: l'amplificazione Real-Time combinata del centro di imprinting e della porzione prossimale consente di escludere o confermare la presenza sia della grande delezione della regione che delle piccole delezioni interstiziali a livello delle SRO. Poiché tali delezioni costituiscono complessivamente più del 70% delle anomalie molecolari che sottendono alla positività del test di metilazione, la strategia di indagine elaborata risulta essere lo step successivo maggiormente conveniente per discriminare tra le cause molecolari dei fenotipi PWS e AS. In caso di negatività dell'indagine quantitativa, l'unica ricerca che rimane da operare è l'analisi dei microsatelliti per verificare l'eventuale presenza di disomia uniparentale.

## INVDUP15

La presenza dei breakpoints posti ai lati della porzione critica 15q11-q13 oltre che essere causa comune di delezione determina in generale un'elevata instabilità della regione [Donlon et al. (1986)]. La rottura e duplicazione a livello della porzione prossimale del cromosoma 15 possono portare sia alla presenza di copie ripetute della regione che alla formazione di un marker cromosomico soprannumerario dicentrico costituito dall'unione di due copie ripetute e invertite del braccio corto e parte del braccio lungo del cromosoma 15. Se la rottura ha coinvolto il breakpoint prossimale della regione critica PWS/AS allora tale marker è polimorfico [Maraschio et al. (1988); Cheng et al. (1994)], se invece quello coinvolto è il breakpoint distale, il marker contiene la copia della regione 15q11-q13 e in questo caso l'anomalia cromosomica è patogenetica [Robinson et al. (1993); Blennow et al. (1995)]

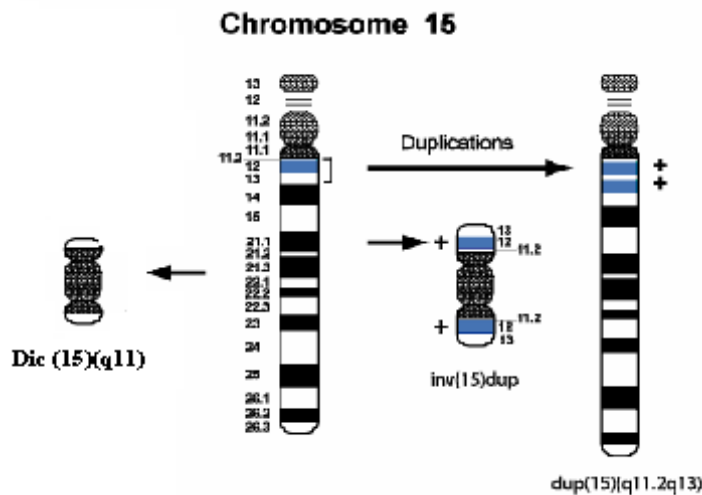


Figura 10: Anomalie strutturali del cromosoma 15. La regione 15q11-q13 è colorata in azzurro. A sinistra è rappresentato il marker extracromosomico polimorfico (non contiene la regione 15q11-q13) a destra sono rappresentate la anomalia INVDUP15 e una duplicazione della regione.

Il fenotipo che risulta dalla duplicazione della regione 15q11-q13 prende il nome di INVDUP15, i suoi tratti clinici sono ritardo mentale, epilessia, presenza di problemi comportamentali e di malformazioni strutturali.

L'indagine quantitativa elaborata nel corso del Dottorato consente di individuare variazioni di dose genica a livello delle regioni analizzate, quindi anche la presenza di duplicazioni. Anche se una Real-Time PCR non è in grado di distinguere la localizzazione cromosomica delle regioni duplicate, l'informazione della presenza di duplicazione costituisce di per sé la causa della patogenicità, sia essa presente in un marker cromosomico soprannumerario o risultato di trasposizioni all'interno del cromosoma 15 o di altri cromosomi. La metodica messa a punto può dunque venire utilizzata per ricercare anomalie di dose delle porzioni critiche della regione 15q11-q13 sia nella casistica PW/AS che in soggetti le cui caratteristiche cliniche siano assimilabili a quelle del fenotipo invdup 15.



## DELEZIONI DEL GENE UBE3A

Come precedentemente accennato (pag. 17) alcuni lavori [Buerger et al. (2002), Lawson-Yuen et al. (2006)] hanno riportato la presenza di delezioni del gene UBE3A quale causa molecolare dell'eziopatogenesi di individui affetti da Sindrome di Angelman. L'incidenza di tali alterazioni nella sindrome di Angelman rimane ad oggi ancora da indagare, infatti solo due laboratori hanno utilizzato metodiche adatte a individuare la presenza di grandi delezioni. L'analisi Real-Time PCR della porzione distale della regione 15q11-q13 è stata messa a punto a livello dell'esone 7 del gene UBE3A: il frammento di amplificazione scelto è localizzato nel primo esone codificante del gene e sovrappone tutte le delezioni precedentemente riportate.

Poiché delezioni dell'intero gene potrebbero rispondere di una quota dei casi di soggetti affetti da sindrome di Angelman in cui il test di metilazione o l'analisi di sequenza del gene non sono stati in grado di rilevare alterazioni è lecito suggerire che l'analisi Real-Time PCR dovrebbe essere aggiunta alle correnti metodiche diagnostiche.

## MATERIALI E METODI

### MESSA A PUNTO DELLA STRATEGIA DI PCR REAL TIME

Sono stati selezionati tre frammenti la cui analisi potesse assicurare una valutazione completa quantitativa della regione critica 15q11-q13 in funzione sia di delezioni/duplicazioni di grosse dimensioni che di piccole delezioni a carico del centro di imprinting (IC). I frammenti sono stati scelti in modo da essere localizzati prossimalmente a livello del centro bipartito di imprinting, sia nella regione di delezione SRO (Smallest Region of Overlap) Prader-Willi (PWS-SRO) che in quella Angelman (AS-SRO) e distalmente a livello della sequenza codificante del gene UBE3A (UB).

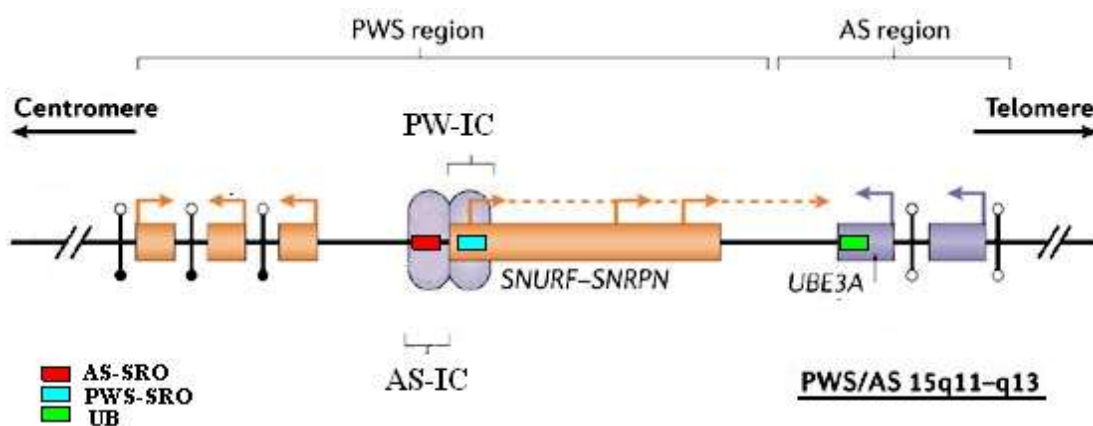


Figura 10: Rappresentazione della regione 15q11-q13 in cui è indicata la posizione dei 3 frammenti per i quali è stata messa a punto la metodica di PCR Real Time (in Rosso amplicone AS-SRO, in azzurro amplicone PWS-SRO, in verde amplicone UB).

L'analisi PCR Real Time Quantitativa è stata eseguita con ABI PRISM 7000® utilizzando chimica SYBR® Green .

Per poter adottare le condizioni di amplificazione standard precedentemente descritte (pag. 26) sono stati scelti dei primers la cui  $T_m$  fosse compatibile con quella del gene TERT già utilizzato come gene housekeeping di riferimento e che producessero un unico amplicone di dimensioni inferiori alle 150 bp. I primers per l'amplificazione del centro di imprinting Angelman (primers AS-SRO) con tali caratteristiche sono stati ricavati dalla letteratura [Raca et al. 2004] mentre i primers per l'amplificazione del centro di imprinting Prader-Willi (primers PWS-SRO) sono stati disegnati con il programma Primer Express®.

Per l'amplificazione in Real-Time del gene UBE3A è stato utilizzato il medesimo amplicone dell'analisi quantitativa dell'esone 7 del gene (primers UBE3A 7). Oltre ad avere le caratteristiche di amplificazione adatte, questo amplicone si colloca infatti esattamente nella regione di sovrapposizione delle delezioni UBE3A riportate in letteratura; l'analisi di tale frammento può quindi essere utilizzata sia per indagare sulla presenza di grandi delezioni dell'intera regione, che per identificare eventuali delezioni del gene UBE3A in soggetti aventi fenotipo Angelman e risultati negativi al test di metilazione. Concentrazioni di lavoro ottimali per i primers da usare in Real-Time e differenti temperature di annealing che non escludessero la co-amplificazione con il gene TERT sono state testate sperimentalmente emulando, in un Thermal Cycler convenzionale (2720 Applied Biosystem), le condizioni di amplificazione utilizzate per la Real-Time PCR con lo strumento ABI PRISM 7000. Come master mix è stata utilizzata la Taq-Man® 2x PCR Master Mix (Applied Biosystem), questa master mix corrisponde al SYBER®Green Master Mix ma non contiene fluorocromi.

L'impiego di questa emulazione consente di valutare in modo efficiente ed economico le condizioni migliori da utilizzare in Real-Time PCR, specificità e intensità dei prodotti di amplificazione possono infatti venire accuratamente stabilite mediante corsa elettroforetica in acrilammide 10% seguita da colorazione Silver-Staining.

PRIMER	FORWARD	REVERSE
TERT	GGCACACGTGGCTTTTCG	GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA
AS-SRO	AGAGGTGGGATTCGGGTTC	CAGCCTTGAGGGGGTTTGA
PWS-SRO	GCAACCTCTGAACATTCC	TGACGCATCTTGTCTGAGGA
UB	TGACGCATCTTGTCTGAGGA	GCTAACTGTTTCTGAATTGC

Tabella 12: Sequenza dei primers utilizzati per la Real-Time PCR quantitativa. Le sequenze sono indicate in direzione 5' - 3'.

#### Condizioni di amplificazione

H2O fino a Vf di 15  $\mu$ l  
Master Mix 7,5  $\mu$ l  
Primers 300-600 nM  
DNA 25 ng

Programma di PCR "Emulazione Real-Time":

94 x 12'  
94 x 15"  
56°/58°/60° x 1' (per 40 cicli)  
72 x 10'  
4  $\infty$

#### Analisi di microsatelliti per ricerca di UPD

L'eventuale presenza di Disomia Uniparentale è stata verificata analizzando un set di microsatelliti sul DNA dei soggetti negativi all'analisi Real Time PCR e dei loro genitori. Sono stati selezionati dal database GDB 7 marcatori ad elevata eterozigosità localizzati sia a livello della regione 15q11-q13 che in posizione più distale sul braccio lungo del cromosoma 15.

MARKER	MAX HET.
D15S11	0.74
D15S131	0.82
D1S113	0.73
D15S117	0.78
CYP19	0.91
GABRB3	0.83
D15S984	0.92

Tabella 13: Marker utilizzati per l'analisi della disomia uniparentale. Per ogni marker è riportata la massima eterozigosità osservata

L'analisi dei microsatelliti è stata condotta su ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer ® (Applied Biosystems), per l'analisi dei picchi è stato utilizzato il software GENESCAN® (Applied Biosystems) .

## RISULTATI

Per ogni amplicone è stata messa a punto una reazione di PCR Real-Time con le seguenti caratteristiche;

### Condizioni di amplificazione

Sono risultate ottimali per l'analisi le seguenti condizioni di amplificazione:

Vf di 15  $\mu$ l

SYBR® Green Master Mix 7,5  $\mu$ l

Primers 300 nM

DNA 25 ng

### Programma di Amplificazione

94 x 12'

94 x 15''

60° x 1' (per 40 cicli)

72 x 10'

4 ∞

Come risulta dall'analisi delle curve standard (rette di regressione) e del protocollo di dissociazione tutti gli amplificati sono senza aspecifici (FIGURA) e hanno efficienze di reazione con valori di pendenza della curva standard compresi tra 3.1 e -3.7 . L'efficienza di reazione dell'amplificato del gene housekeeping è paragonabile (rette parallele) a quelle degli amplificati di interesse.

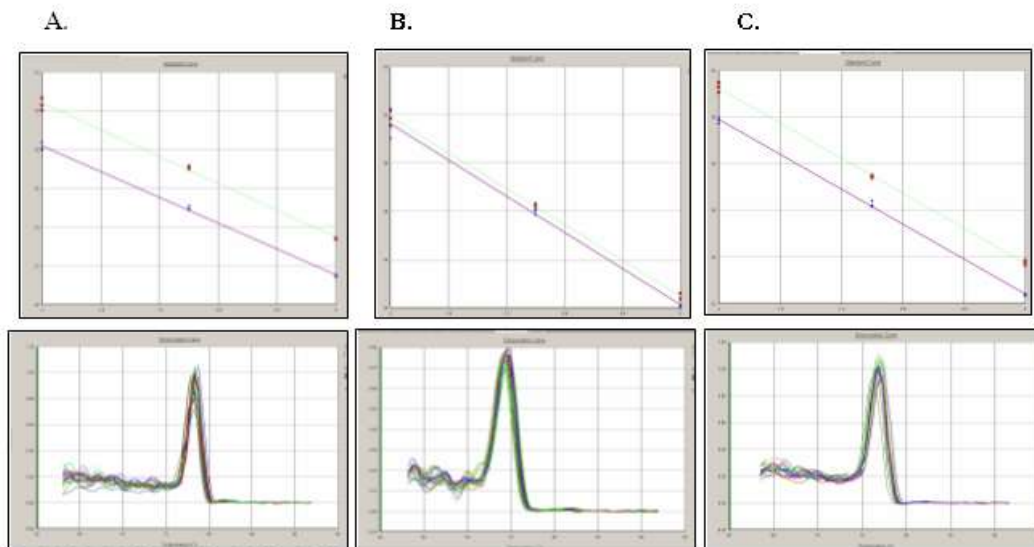


Figura 11: Curve standard e di dissociazione degli ampliconi. Per ogni amplicone sono riportate in alto le rette di regressione dell'amplicato d'interesse (in verde) e del gene di riferimento (in viola) e in basso le curve di dissociazione. Come si può vedere le rette sono parallele (il che corrisponde a efficienze di reazione paragonabili) e le curve di dissociazione presentano un unico picco (corrispondente all'assenza di aspecifici).

A: curve standard e di dissociazione per l'amplicone AS-SRO

B: curve standard e di dissociazione per l'amplicone PWS-SRO

C: curve standard e di dissociazione per l'amplicone UB.

Il metodo descritto è stato testato per la sua validazione su 14 campioni di DNA precedentemente risultati positivi al test di metilazione, di cui 10 casi di Sindrome di Angelman e 4 casi di Sindrome di Prader-Willi.

Lo stesso protocollo è stato applicato in 1 campione con INVDUP(15) documentata citogeneticamente e su 12 soggetti AS ma risultati negativi sia al test di metilazione che alla ricerca di mutazioni puntiformi del gene UBE3A.

Per ogni soggetto è stato raccolto un prelievo di sangue periferico ed è stata richiesta l'autorizzazione allo studio mediante adeguato consenso informato.

Il sistema messo a punto ha permesso di identificare con in modo preciso e altamente riproducibile la presenza/assenza di alterazioni strutturali della regione 15q11-13 di ciascun campione.

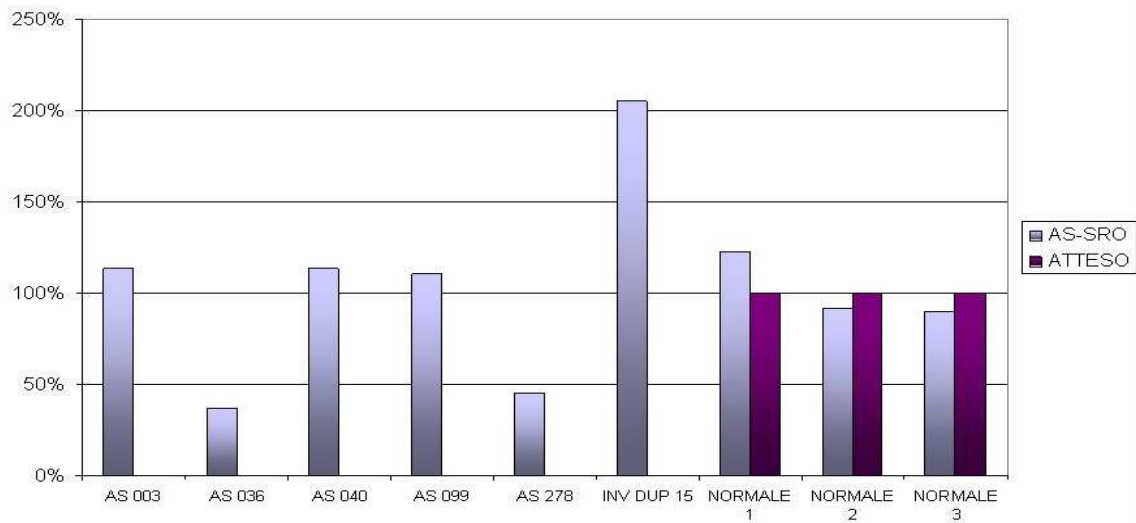


Figura 12 : Istogramma che rappresenta graficamente i risultati dell'analisi RT-PCR su 5 campioni di soggetti Angelman, 3 controlli normali e 1 campione con inv dup 15 (colonne azzurre). La presenza di singola dose a livello del centro di imprinting AS (AS-SRO) è evidente in due soggetti clinicamente affetti (colonne 2 e 5); sono presenti 3 soggetti clinicamente affetti in cui non c'è stata delezione (colonne 1, 3 e 4) e un soggetto con inv dup (15) in cui la dose figura raddoppiata rispetto al normale (colonna 6). I 3 soggetti normali di controllo (colonne 7, 8 e 9) presentano valori compatibili con l'atteso (colonne viola).

**Lavoro presentato come poster "Real time pcr quantitativa per l'identificazione di anomalie strutturali della regione q11-q13 del cromosoma 15. " al IX Congresso nazionale di Genetica Umana (SIGU) Venezia 8-10 Novembre 2006 (Anesi L., Casarin A, Leonardi E, Martella M, Polli R, Murgia A.)**





## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni sta emergendo in modo sempre più evidente che i disturbi dello sviluppo neurologico Sindrome di Rett e Sindrome di Angelman non sono semplicemente due disordini distinti ma devono venir considerati come le punte di due “iceberg” le cui basi si uniscono in un continuum fenotipico di forme cliniche intermedie. Alterazioni del gene MECP2 (inizialmente considerato “gene Rett”) sono state rinvenute in un’ampia gamma di fenotipi quali autismo, ritardo mentale X-linked, encefalopatia neonatale e Sindrome di Angelman. Un capitolo aperto rimane ancora la determinazione dell’incidenza delle alterazioni di questo gene nello spettro fenotipico Angelman-Rett, quando ci si discosti dalle forme “classiche” delle due sindromi, fino a giungere a quadri clinici di difficile inquadramento definibili generalmente come disturbi pervasivi dello sviluppo. In questo contesto si possono immaginare le mutazioni del gene MECP2 distribuite lungo una curva di Gauss la cui mediana corrisponde alla sindrome di Rett classica; la quota di mutazioni del gene diminuisce quindi allontanandosi verso gli estremi della curva attraverso forme varianti RTT, spettro fenotipico AS-RTT e generico fenotipo Disturbi Pervasivi dello Sviluppo.

Oggetto della tesi è stato lo studio dei geni coinvolti nell’eziopatogenesi della Sindrome di Rett [RTT], della Sindrome di Angelman [AS] e di fenotipi appartenenti allo spettro dei disturbi pervasivi dello sviluppo [DPS]; lo scopo del lavoro era quello di contribuire ad una migliore conoscenza circa le basi molecolari di queste patologie verificando il ruolo relativo dei diversi geni-malattia.

È verosimile che le caratteristiche parzialmente sovrapponibili di questi fenotipi siano il risultato di una complessa interazione tra i prodotti proteici di geni solo in parte noti: i dati recenti della letteratura suggeriscono l’appartenenza ad un medesimo network funzionale del “gene Rett” MECP2, del “gene Angelman” UBE3A, e del più recentemente identificato CDKL5, che per questo motivo diventano i geni di maggior interesse.

Nella convinzione di dover approntare, per affrontare questo studio, strategie molecolari che consentissero di identificare sia varianti di sequenza che delezioni, inserzioni o riarrangiamenti più complessi, l’approccio molecolare adottato ha

previsto l'uso di diversi strumenti, indipendenti, di analisi di tipo qualitativo e quantitativo per rilevare, con la massima efficienza e sensibilità, le possibili anomalie molecolari della sequenza codificante in ciascuno di questi geni.

La maggior parte delle alterazioni riportate in questo studio sono state individuate utilizzando tecniche DHPLC (Denaturing High Pressure Liquid Chromatography), e di Real-Time PCR, la cui messa a punto per lo studio delle regioni di interesse è stata interamente svolta durante il corso del dottorato.

Nella nostra esperienza entrambe le metodiche si sono rivelate altamente affidabili e riproducibili, consentendo l'azione combinata dei due strumenti di effettuare un'indagine completa delle regioni analizzate.

Dall'analisi della nostra casistica è emersa una positività per mutazioni-malattia del gene MECP2 di circa 67% nei soggetti presentati con diagnosi di sospetta sindrome di Rett.

I nostri dati sono sostanzialmente in accordo con le percentuali di positività, comprese tra il 70% e il 90%, riportate in letteratura. Il range di variabilità così elevato corrisponde verosimilmente alla "stringenza" dei criteri clinici con cui viene posta la diagnosi; le percentuali più alte di positività per alterazioni del gene MECP2 riguardano infatti solo soggetti aventi RTT "classica". La nostra casistica era costituita da soggetti in età pediatrica per i quali il quadro clinico poteva spesso consentire solo un sospetto di sindrome di Rett.

Al di fuori del fenotipo Rett classico, mutazioni malattia del gene MECP2 in questo lavoro sono state rinvenute in un soggetto avente fenotipo AS-RTT like e in un soggetto il cui fenotipo era stato considerato privo di caratteristiche sindromiche precise e definito più genericamente come DPS. Anche se numericamente modesti, e forse proprio perché ottenuti in una casistica a relativa bassa numerosità, questi risultati contribuiscono a sottolineare l'importanza di estendere l'analisi del gene MECP2 all'ampia casistica delle varie forme di disturbi pervasivi dello sviluppo compreso lo spettro AS-RTT like.

Al di là dell'indubbia rilevanza di una diagnosi eziologica nel caso di malattie rare, le relazioni fra basi molecolari e fenotipo clinico in questi casi, ed in particolare per le mutazioni del gene MECP2, restano ancora controverse; in linea generale, come per molti altri geni, viene indicata una maggior gravità delle mutazioni troncanti rispetto

alle mutazioni missense e il fatto che fenotipi più gravi tendono a correlare con mutazioni nonsense che causano interruzioni precoci della sequenza aminoacidica.

Alcune eccezioni a questa regola di fondo sono tuttavia note: la mutazione MECP2 p.R294X ad esempio, a dispetto della sua natura di mutazione troncante precoce, correla con un fenotipo lieve. In questo studio la mutazione p.R294X è stata trovata in tre soggetti, due con quadro clinico di maggiore compromissione neurologica ed uno invece con buona conservazione delle acquisizioni motorie e relative capacità relazionali. In entrambi i soggetti “non RTT classica” della nostra casistica con mutazione MECP2 è stata rinvenuta la variante p.P152R che viene comunemente riportata in letteratura come tipica mutazione associata a sindrome di Rett.

Questi dati di estrema variabilità nella correlazione genotipo-fenotipo suggeriscono l'ipotesi che le alterazioni di questo gene non debbano essere considerate individualmente ma piuttosto all'interno di una complessa rete funzionale multigenica nella quale possibili varianti nella sequenza di geni diversi possano interagire modulando il risultato fenotipico finale

A sostegno di questa ipotesi funzionale complessa vanno dati molto recenti, comunicati al congresso “ 13<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and X-Linked Mental Retardation XLMR “ che sembrano indicare un possibile effetto modificatore sul fenotipo Rett in soggetti con mutazioni MECP2, da parte di una variante polimorfica del gene BDNF.

Un'ulteriore fonte di variabilità fenotipica da considerare, essendo MECP2 un gene del cromosoma X, è naturalmente lo stato di X-inattivazione. Anche in questo caso i dati riportati in letteratura sono incerti: nella nostra casistica, il 70% delle femmine aventi mutazioni MECP2 presentava inattivazione dell'X sbilanciata. In 5 dei casi è stato possibile esaminare anche i genitori delle probande per stabilire l'origine dell'allele preferenzialmente espresso. e in tutti i casi l'allele prevalentemente attivo risultava essere quello di origine materna. Questo dato, unito al fatto che il 99% delle alterazioni MECP2 insorgono sul cromosoma di origine paterna, porta a ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di protezione che tenda a portare ad inattivazione preferenziale dell'allele mutato. In letteratura sono riportati altri casi di geni legati all'X in cui questo evento sia stato rilevato, sebbene i meccanismi di questo non siano stati chiariti. Un'altra possibile ipotesi per spiegare un preferenziale sbilanciamento a favore del cromosoma X normale è che la presenza di un allele mutato

prevalentemente attivo possa essere motivo letalità prenatale, analogamente a quanto sembra avvenire nel caso di soggetti maschi con mutazioni MECP2.

Nel corso dello studio sono state rinvenute anche numerose mutazioni apparentemente polimorfiche a carico della sequenza MECP2; per studiare la patogenicità di tali varianti si è provveduto a seguire la segregazione di queste alterazioni attraverso l'albero genealogico fino all'identificazione di un portatore maschio sano. L'esistenza di femmine sani portatrici eterozigoti non esclude infatti una possibile patogenicità della variante considerata; trattandosi di un gene X-linked, l'effetto "mosaicismo" dato dalla presenza dei due cromosomi X e quindi di due copie del gene una delle quali non mutata, potrebbe nelle femmine mascherare il reale effetto funzionale dell'alterazione genomica. In un maschio, in presenza di singolo cromosoma X, questo fenomeno non può avvenire; in questo caso se l'unica copia espressa del gene è mutata e ciò non ha effetti sull'organismo, la variante può essere ragionevolmente definita polimorfica.

Nei casi in cui non sia stato possibile studiare la famiglia o risalire ad un portatore maschio, l'eventuale natura non patogenetica della variante è stata ipotizzata sulla base dei dati riportati in letteratura e di analisi "in silico". Quest'ultima analisi prevede l'uso di programmi bioinformatici per valutare ad esempio la conservazione filogenetica della sequenza e l'eventuale presenza di elementi ESE (Exonic Splicing Enhancer) importanti per la corretta esecuzione dello splicing genomico. Questo tipo di analisi, pur estremamente utile, fornisce informazioni indicative ma non consente la totale esclusione del coinvolgimento della alterazione in esame nell'eziopatogenesi della malattia nel soggetto affetto. Varianti di questo tipo, in assenza di esperimenti funzionali che possano caratterizzarne l'impatto in vitro, vanno forse meglio definite come "unknown" (o "di significato sconosciuto") piuttosto che come polimorfiche. Sempre più spesso infatti sono riportati casi di mutazioni introniche, o di mutazioni delle sequenze codificanti apparentemente innocue, che in realtà compromettono la funzionalità del prodotto proteico.

L'elevata quota di varianti diverse rilevate, anche da questo lavoro, e la loro distribuzione su tutta la sequenza MECP2, indica da una parte le caratteristiche di sequenza particolarmente prona a mutazioni del gene e dall'altra la necessità di ricercare alterazioni lungo l'intera sequenza codificante e certamente non solo a livello delle regioni sede delle mutazioni riportate come più frequenti, cosiddetti "hot-spots"

mutazionali; queste nella nostra casistica corrispondono a solo il 36% del totale delle mutazioni-malattia, rispetto all'80% teoricamente atteso. E' possibile che anche questi dati di frequenza riflettano le caratteristiche cliniche delle diverse popolazioni studiate.

In questo studio è stata rilevata, mediante RT-PCR quantitativa, una delezione a livello dell'esone 4 del gene, all'interno della regione riportata in letteratura come "prona a delezioni." La scoperta di una tale regione spiega il fatto che grandi delezioni dell'estremità ammino-terminale del gene vengano ricercate in soggetti RTT di sesso femminile per i quali la gravità della perdita completa del gene MECP2 può essere in qualche modo controbilanciata dalla presenza di due alleli.

L'analisi quantitativa del gene MECP2 è stata da noi estesa anche ai soggetti di sesso maschile aventi fenotipo AS/RTT like e DPS, in seguito alla recente pubblicazione di dati che documentano, in maschi, la presenza di duplicazioni della regione Xq28 associate ad alterazioni dello sviluppo psico-motorio. Sebbene non siano state rinvenute duplicazioni del gene MECP2 in questa casistica, l'impiego della Real-Time PCR ha comunque rilevato correttamente la presenza di duplice dose allelica in un soggetto Klinefelter (dato confermato citogeneticamente) il cui fenotipo Rett-like è risultato, in un secondo momento come descritto in seguito, essere dovuto alla presenza di mutazione del gene CDKL5.

Nei soggetti aventi fenotipo altamente suggestivo di sindrome di Angelman, prima di effettuare la ricerca di alterazioni del gene MECP2, è stata sempre esclusa la presenza di alterazioni del gene UBE3A.

Lo studio del gene UBE3A ha portato all'identificazione, in un soggetto con quadro di Sindrome di Angelman classico, benché non tra i più severi, di una sostituzione di singola base a livello del primo nucleotide dell'introne 10 (c.1693+1 G>A).

Per tale variante, mai precedentemente riportata in letteratura, l'analisi in silico prevede l'abolizione del sito di splice-donor dell'esone 10 e dunque la caratterizza come mutazione-malattia.; E' ipotizzabile che il processo di trascrizione, procedendo attraverso l'introne produca in questo caso una proteina non corretta, probabilmente priva della porzione amminotermine e sicuramente non funzionale (Sartori et al Journal of child Neurology, in press).

In questo studio sono state identificate a carico del gene UBE3A anche due varianti precedentemente riportate in letterature come polimorfiche; le alterazioni sono state identificate nel medesimo campione e lo studio famiglia della probanda dimostra la presenza di entrambe le varianti sull'allele di origine paterna escludendo così ulteriormente un loro possibile coinvolgimento nell'eziopatogenesi della malattia.

Nella casistica testata in questo lavoro, nessuno dei soggetti aventi diagnosi clinica di Sindrome di Angelman e risultati negativi al test di metilazione e alla ricerca di alterazione del gene UBE3A, si è rivelato essere portatore di alterazioni di MECP2, lasciando aperto il possibile coinvolgimento eziologico in questi casi di uno o più geni non ancora identificati.

Nel nostro studio, in soggetti con fenotipo Rett-like negativi all'indagine molecolare MECP2, è stata effettuata anche la ricerca di alterazioni a carico del gene CDKL5 che viene descritto come verosimilmente appartenente allo stesso network funzionale che coinvolge MECP2. La ricerca di alterazioni in CDKL5 ha permesso di identificare una nuova variante nonsense, e per questo sicuramente patogenetica, nel soggetto precedentemente diagnosticato come Klinefelter a seguito dell'analisi di Real-Time PCR quantitativa su MECP2. Il quadro clinico di questo soggetto veniva riferito come di Rett-like con presenza di crisi convulsive e manifestazioni epilettiche precoci, che sembra essere la caratteristica presentazione fenotipica associata a mutazioni CDKL5. La mutazione da noi identificata, la prima in un soggetto Klinefelter ed una delle poche mutazioni-malattia sinora descritte per questo gene, rappresenta una conferma della correlazione fra sindrome di Rett nella sua variante a convulsioni precoci e il gene CDKL5. Considerata la bassa numerosità della casistica da noi analizzata, risulta importante il coinvolgimento di tale gene nell'eziopatogenesi del fenotipo Rett-like; sarebbe interessante estendere anche per il gene CDKL5 come per il gene MECP2 l'analisi ad altri fenotipi nell'ambito dello spettro dei disturbi pervasivi dello sviluppo.

Parte dell'attività svolta nel corso del dottorato è stata dedicata all'ideazione o al possibile miglioramento di strategie molecolari esistenti per lo studio di geni-malattia o di regioni di particolare rilevanza per le patologie studiate. In particolare è stato messo a punto un sistema, basato su analisi Real-Time PCR quantitativa, in grado di rilevare la presenza di eventuali duplicazioni, delezioni o riarrangiamenti più complessi, a livello della regione cromosomica 15q11-q13, nota come regione critica Prader-Willi/Angelman. Nel 2004

alcuni autori [Raca et al. (2004)] avevano già pensato di utilizzare la metodica Real-Time PCR per individuare delezioni del centro di imprinting, porzione funzionalmente fondamentale della regione PWS/AS. Nel corso dell'attività di Dottorato l'idea iniziale è stata modificata e ampliata e, con lo studio e la messa a punto di nuovi frammenti di amplificazione, è stata elaborata una strategia rapida ed efficiente in grado di misurare la dose di DNA genomico a livello delle porzioni cruciali della regione 15q11-q13.

Questa strategia, interamente basata su metodi di amplificazione PCR, rende possibile un'analisi strutturale della porzione q11-q13 del cromosoma 15 consentendo di identificare qualunque alterazione di dose genomica a questo livello. E' possibile stabilire in tempi brevissimi quali siano le basi molecolari di una Sindrome di Prader-Willi o di Angelman, discriminando con alta precisione e sensibilità la presenza di una delezione dell'intera regione, i cui limiti possono venire definiti, da una condizione di disomia uniparentale, o identificando piccole delezioni esclusivamente confinate alla regione del centro di imprinting. E' possibile altresì identificare alterazioni complesse, spesso associate con quadri clinici di ritardo psico-motorio, come nel caso della inversione/duplicazione della porzione pericentromerica del cromosoma 15, cosiddetta "inv dup 15".

Con questa metodica l'analisi differenziale della regione 15q11-q13 è completamente eseguibile in un laboratorio di analisi molecolare (in alternativa erano necessarie tecniche di citogenetica) il che minimizza i tempi necessari a effettuare l'indagine.

Il frammento più distale scelto per l'analisi quantitativa della regione q11-q13 del 15 si situa a livello della regione codificante, esone 7 del gene UBE3A, e può per questo essere utilizzata per la ricerca, in soggetti affetti da Sindrome di Angelman negativi al test di mutilazione, di delezioni di questo gene che possono, in alternativa alle mutazioni puntiformi, essere causa della malattia. Alcune delezioni UBE3A sono state riportate in letteratura, ma solo pochi laboratori hanno utilizzato tecniche adatte a rilevarle.

Il fatto che l'analisi Real-Time PCR del gene UBE3A messa a punto non abbia evidenziato variazioni quantitative nei campioni testati è probabilmente spiegabile in base alla bassa numerosità della casistica studiata; resta senz'altro opportuna la scelta di affiancare di routine l'analisi quantitativa a quella qualitativa per questo e in generale per tutti i geni-malattia studiati come sembrano anche suggerire i dati pubblicati recentemente in letteratura. Le tecniche di analisi genomica più avanzate, come la metodica CGH-array, stanno mettendo in evidenza l'importanza delle variazioni di dose



nell'eziopatogenesi di moltissime malattie; l'impiego quasi esclusivo, fatto sinora, di metodiche di analisi qualitativa ha verosimilmente mascherato le reali basi molecolari di alcune patologie.

In conclusione, pensiamo di poter affermare che il lavoro svolto in questo corso di dottorato rappresenti, sebbene con tutti i limiti del caso, un contributo, da una parte allo studio della patologia molecolare di geni di particolare rilevanza per il ritardo mentale, in particolare nello spettro fenotipico Angelman-Rett , e dall'altra allo sviluppo di strategie originali che migliorino l'analisi del DNA sia a scopo di ricerca che per applicazioni diagnostiche.



## BIBLIOGRAFIA

1. Adler DA, Quaderi NA, Brown SD, Chapman VM, Moore J, Tate P, Distèche CM. (1995) The X-linked methylated DNA binding protein, Mecp2, in subject to X inactivation in the mouse. *Mamm Genome*;6:491-2.
2. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genet*;23:185-8.
3. Allen RC, Zoghbi HY, Moyley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. (1992) Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlate with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51: 1229-39.
4. Archer HL, Evans J, Edwards S, Colley J, Newbury-Ecob R, O'Callaghan F, Huyton M, O'Regan M, Tolmie J, Sampson J, Clarke A, Osborne J. (2006) CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients. *J Med Genet*. Sep;43(9):729-34. Epub Apr 12.
5. Balmer D, Goldstine J, Rao YM and LaSalle JM. (2003) Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J. Mol. Med.* 81: 61-68.
6. Bienvenue T and Chelly J. (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nature Reviews* Jun; Vol 5.
7. Blennow E, Nielsen KB, Telenius H, Carter NP, Kristoffersson U, Holmberg E, et al. (1995) Fifty probands with extra structurally abnormal chromosomes characterized by fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 55:85-94.
8. Buerger J, Horn H, Toennies H, Neitzel H, Reis A. (2002) Familial Interstitial 570 kbp Deletion of the UBE3A Gene Region Causing Angelman Syndrome but Not Prader-Willi Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 111:233-237.
9. Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995). Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting center.
10. Cheng SD, Spinner NB, Zackai EH, Knoll JH. (1994) Cytogenetics and molecular characterization of inverted duplicate chromosomes 15 from 11 patients. *Am J Hum Genet*; 55:753-759.
11. Chahrour M and Zoghbi HY. (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*. Nov 8;56(3):422-37
12. Ciechanover A and Schwartz AL (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of protein death. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2727-2730.
13. Cohen DR, Matarazzo V, Palmer AM, Tu Y, Jeon OH, Pevsner J and Ronnett GV. (2003) Expression of MeCP2 in olfactory receptor neurons is developmentally regulated and occurs before synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 22: 417-429.
14. Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poutska A. (1999) A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MECP2) suggest a regulatory role in gene expression. *Hum Mutat*;15:7-12.

15. D'Esposito M, Quaderi NA, Ciccodicola A, Bruni P, Esposito T, D'Urso M, Brown SD. (1996) Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein MECP2. *Mamm Genome*;7:533-35.
16. Donlon TA, Lalande M, Wyman A, Bruns G, Latt SA.. (1986) Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83:4408-12.
17. Glotzer M, Murray AW and Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138.
18. Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S and El-Osta A, (2005) Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing, *Nat Genet. Mar*;37(3):254-64. Epub 2005 Feb 6
19. Hershko A AND Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
20. Hochstrasser M (1996b) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Ann Rev Genet* 30: 405-439.
21. Huibregtse JM, Scheffner M AND Howley PM (1993a): Cloning and expression of the cDNA for E6- AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* 13: 775-784.
22. Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM (1993b) Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol* 13: 4918-4927.
23. Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL.(1999 ) Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet. Jul*;65(1):1-6
24. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet*;19:187-191.
25. Jung et al., 2003 B.P. Jung, D.G. Jugloff, G. Zhang, R. Logan, S. Brown and J.H. Eubanks. (2003) The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells, *J. Neurobiol.* 55: 86–96
26. Kaludov and Wolffe, 2000 N.K. Kaludov and A.P. Wolffe. (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery, *Nucleic Acids Res.* 28: 1921–1928
27. Kalscheuer VM, Jiong Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH and Géczy J (2003) Disruption of the Serine/Threonine Kinase 9 Gene Causes Severe X-Linked Infantile Spasms and Mental Retardation. *Am J Hum Genet. June*; 72(6): 1401–1411
28. Kimura and Shiota, 2003 H. Kimura and K. Shiota. (2003) Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1, *J. Biol. Chem.* 278
29. Kishi and Macklis, 2004 N. Kishi and J.D. Macklis. (2004) MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions, *Mol. Cell. Neurosci.* 27: 306–321.
30. Kishino T and Wagstaff J (1998) Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes. *Genomics* 47: 101-107.

31. Kishino T, Lalande M and Wagstaff J (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 15: 70-73.
32. Klose et al., 2005 R.J. Klose, S.A. Sarraf, L. Schmiedeberg, S.M. McDermott, I. Stancheva and A.P. Bird. (2005) DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG, *Mol. Cell* 19: 667–678
33. Kokura K, Kaul SC, Wadhwa R, Nomura T, Khan MM, Shinagawa T, Yasukawa T, Colmenares C and Ishii S. (2001) The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression, *J. Biol. Chem.* 276: 34115–34121
34. Kosaki K, McGinniss MJ, Veraksa AN, McGinnis WJ, Jones KL. (1997) Prader-Willi and Angelman syndromes: diagnosis with a bisulfite-treated methylation-specific PCR method. *Am J Med Genet.* Dec 19;73(3):308-13.
35. Kriaucionis K and Bird A. (2004) The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing, *Nucleic Acids Res.* 32 : 1818–1823.
36. Lawson-Yuen A, Wu B, Lip v, Sahoo T, Kimonis V. (2006) Atypical Cases of Angelman Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 140A:2361-2364
37. Lee SS, Wan M, Francke U. (2001) Spectrum of MECP2 mutations in Rett syndrome. *Brain Dev*;23 Suppl 1:S138-S143.
38. Lewis JD; Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*;69:905-914.
39. Makedonski K, Abuhatzira L, Kaufman Y, Razin A, Shemer R. (2005) MeCp2 deficiency in Rett syndrome causes epigenetics aberrations at the PE/AS imprinting center that affects UBE3A expressions. *Hum Mol Genet* 14: 1049-1058.
40. Maraschio P, Cuococ C, Gimelli G, Zuffardi O, Tiepolo L. (1986) Origin and clinical significance of inv dup (15). In: Danil A, editor. *The cytogenetics and mammalian autosomal rearrangements.* New York: Alan R. Liss; p:615-634.
41. Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C, Ariani F, Hayek G, Balestri P, Bergo A, Badaracco G, Zappella M, Broccoli V, Renieri A, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. (2005) CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* Jul 15;14(14):1935-46. Epub 2005 May 25.
42. Mari, F. et al. Germline mosaicism in Rett syndrome identified by prenatal diagnosis. *Clin. Genet.* 67, 258–260 (2005).
43. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, T. Yamada T, MacLeod PJ, J.R. Jones JR, Scherer SW, Schanen NC and Friez MJ et al., (2004) A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome, *Nat. Genet.* 36: 339–341.
44. Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A., Franco B. (1998) Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* 51: 427-433.
45. Mullaney BC, Johnston MV and Blue ME. (2004) Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain, *Neuroscience* 123 : 939–949.
46. Nan X, Hou J, Maclean A, Nasir J, Lafuente MJ, Shu X, Kriaucionis S and Bird A. (2007) Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is

- disrupted by mutations that cause inherited mental retardation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 .
47. Nan X, Campo JF, Bird A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*;88:471-81.
  48. Nan X, Meehan RR, Bird A. (1993) Dissection of the methyl-CpG-binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21:4886-92.
  49. Nectoux J, Heron D, Tallot M, Chelly J, Bienvenu T. (2006) Maternal origin of a novel C-terminal truncation mutation in CDKL5 causing a severe atypical form of Rett syndrome. *Clin Genet*. Jul;70(1):29-33.
  50. Raca G, Buiting K, Das S. (2004) Deletion analysis of the imprinting center region in patients with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome by real-time quantitative PCR. *Genet Test*. Winter;8(4):387-94.
  51. Rapakko K, Kokkonen H, Leisti J. (2004) UBE3A gene mutations in Finnish Angelman syndrome patients detected by conformation sensitive gel electrophoresis. *Am J Med Genet A*. Apr 30;126(3):248-52.
  52. RETbase      IRSA      MECP2      Variation      Database:  
<http://mecp2.chw.edu.au/mecp2/>
  53. Robinson WP, Binkert F, Gine R, Vazquez C, Muller W, Rosenkranz W, et al. (1993) Clinical and molecular analysis of five inv dup (15) patients. *Eur J Hum Genet* 1:37-50.
  54. Rougeulle C, Glatt H and Lalande M (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* 17: 14-15.
  55. Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM (2005). Epigenetics overlap in autism-spectrum disorders: MECP2 deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14:483-492.
  56. Samaco RC, Nagarajan RP, Braunschweig D, et al. (2004). Multiple pathways regulate MeCP2 expression in normal brain development and exhibit defects in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet* 13:629-639.
  57. Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. (2005) CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet*. Feb;42(2):103-107.
  58. Scheffner M, Nuber U and Huibregtse JM. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83.
  59. Scheffner, M, Werness JM, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of 53. *Cell* 63: 1129-1136.
  60. Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL and Zoghbi HY. (2002) Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation, *Hum. Mol. Genet.* 11: 115–124.
  61. Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gécz J, Ropers HH, Kalscheuer VM. (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet*. Dec;75(6):1149-54.
  62. The GDB Human Genome Database (GDB) <http://www.gdb.org/gdb/>
  63. The Human Gene Mutation Database (HGMD)  
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

64. Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. (2002) Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15536-15541.
65. Vilain A, Apiou F, Vogt N, Dutrillaux B, Malfoy B. (1996) Assignment of the gene for methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) to human chromosome band Xq28 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*;74:293-94.
66. Vu PK and Sakamoto KM (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis and human disease. *Mol Genet Metab* 71: 261-266.
67. Vu TH and Hoffman AR (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* 17: 12-13.
68. Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Géczy J. (2004) Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2004 Dec;75(6):1079-93. Epub Oct 18.
69. Williams CA and Driscoll DJ (2007) Angelman Syndrome. GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2008. Available at <http://www.genetests.org>. Accessed [2007].
70. Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, Zori RT. 1995. Angelman syndrome: Consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* 56: 237-238.
71. Yamamoto Y, Huibregtse JM and Howley PM (1997) The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* 41: 263-266.

## riassunto

### ANALISI MOLECOLARE DI GENI COINVOLTI NELLO SPETTRO FENOTIPICO ANGELMAN-RETT

Nell'ambito del ritardo mentale sono da tempo noti e descritti i fenotipi clinici della sindrome di Rett e della sindrome di Angelman. Le basi molecolari di entrambe queste patologie sono state identificate: alterazioni del gene MECP2 sono presenti nell'80% dei casi di Rett classica e anomalie nell'espressione del gene UBE3A –perlopiù dovute a difetti a carico della regione 15q11-q13 -sono presenti nel 90% dei soggetti aventi fenotipo Angelman. Rimane comunque una percentuale di soggetti con entrambi i disturbi in cui l'indagine genetica risulta negativa, fatto che testimonia la presenza di eterogeneità genetica.

D'altra parte è segnalato un numero crescente di soggetti in cui non sono soddisfatti pienamente i criteri diagnostici e che presentano caratteristiche di entrambi i fenotipi clinici. L'esistenza di uno spettro fenotipico AS/RTT-like ha fatto intuire l'esistenza di un pathway patogenetico comune che coinvolge a livelli diversi i prodotti proteici dei geni MECP2 e UBE3A. Tale ipotesi è supportata dall'esistenza di soggetti aventi sindrome di Angelman ma con mutazioni del gene MECP2.

La ricerca di alterazioni del gene MECP2 risulta quindi opportuna in soggetti affetti da sindrome di Rett Classica, Sindrome di Angelman, in soggetti AS/RTT like e in tutti i fenotipi che possano appartenere ad una famiglia di "MECP2 related disorder".

Tra il 2005 e il 2006 è apparso chiaramente come un altro gene del cromosoma X, detto CDKL5 o STK9, sia mutato in alcuni pazienti Rett affetti da una forma della malattia caratterizzata da una precoce comparsa di crisi epilettiche.

Obiettivo di questo studio è stata, assieme alla messa a punto di nuove strategie di indagine molecolare per le regioni analizzate, la precisazione del ruolo e del coinvolgimento dei geni MECP2, UBE3A e CDKL5 nel fenotipo "allargato", caratterizzato da disturbi neurologici e dello sviluppo, che comprende le sindromi di Rett e Angelman e i fenotipi considerati associati a questi quadri patologici.



## abstract

### MOLECULAR ANALYSIS OF THE GENES INVOLVED IN THE ANGELMAN- RETT PHENOTYPIC SPECTRUM

Within mental retardation, the clinical phenotypes of Rett syndrome and Angelman syndrome have been known and described for a long time. The molecular basis of both these pathologies have been identified: alterations of the MECP2 gene are detected in 80% of the Rett cases and anomalies in the expression of the UBE3A gene – in most of cases due to defects altering the 15q11-q13 cytogenetic region – can be observed in 90% of the subjects with Angelman phenotype. Nevertheless, there is a percentage of subjects with both disorders, for whom the genetic investigation resulted negative, and this testify the presence of genetic heterogeneity.

On the other hand, it has been observed that in an increasing number of subjects, who present with characteristics of both the clinical phenotypes, the diagnostic criteria for either disease are not satisfied. The existence of an AS/RTT-like phenotypic spectrum suggests the existence of a common pathogenetic pathway that involves, at different levels, the protein products of the MECP2 gene and of the UBE3A gene. This hypothesis is supported by the description of cases of Angelman syndrome with mutations of the MECP2 gene.

Alterations of the MECP2 gene should therefore be searched for in subjects affected by the classic Rett syndrome or by Angelman syndrome, as well as in AS/RTT like subjects and in all phenotypes that could belong to the "MECP2 related disorder" family.

Between 2005 and 2006 it was observed that another gene located on the X chromosome, called CDKL5 or STK9, may be mutated in Rett patients affected by a form of the disease characterised by early onset of seizures.

The scope of this study, together with the development of new original strategies for the molecular analysis of the regions involved, is to precise the role and involvement of the MECP2 gene, UBE3A gene, and CDKL5 gene in the "extended" phenotype, characterised by neurological and developmental disorders, which include Rett syndrome and Angelman syndrome as well as in associated phenotypes.