

LA SINDROME X FRAGILE: ASPETTI CLINICO-MOLECOLARI E PROSPETTIVE DI TERAPIA FARMACOLOGICA



Elisabetta Tabolacci e Giovanni Neri
Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

RIASSUNTO - La sindrome X fragile (FXS, OMIM #300624) è la causa più frequente di ritardo mentale ereditario, dovuto all'espansione (> 200 ripetizioni, mutazione completa) di una sequenza CGG nella regione 5' UTR del gene FMR1 e successiva metilazione delle citosine. Le due modifiche, una strutturale e una epigenetica, portano il blocco trascrizionale e la conseguente assenza della proteina FMRP, responsabile delle manifestazioni della sindrome. L'esistenza di rari pazienti maschi, portatori di una mutazione completa non metilata, dimostra che solo l'espansione CGG è compatibile con la produzione di FMRP (RNA-binding protein). L'assenza di FMRP causa una sovraregolazione del recettore di glutammato metabotropico 5-mediato, che è parzialmente causa dei disturbi comportamentali e cognitivi. Un recente studio ha mostrato un effetto benefico sul comportamento dei pazienti FXS completamente metilati del farmaco AFQ056, un inibitore di mGluR5.

Parole chiave: sindrome X fragile; ritardo mentale; AFQ056

SUMMARY (*Fragile X syndrome: clinical-molecular aspects and perspectives of a drug-based therapy*) - Fragile X syndrome (FXS, OMIM #300624), the most common cause of inherited mental retardation, is due to expansion (>200 repeats, full mutation) of a CGG sequence in the 5' UTR of the FMR1 gene, followed by methylation of cytosines. The two changes, one structural and one epigenetic, lead to transcriptional silencing and consequent absence of the FMRP protein, responsible for the manifestations of the syndrome. The existence of rare unaffected males, carrying an unmethylated full mutation, proves that CGG expansion alone is compatible with FMRP (RNA-binding protein) production. The absence of FMRP causes an upregulation of metabotropic glutamate receptor 5-mediated signaling pathways, which is partially cause of the behavioral and cognitive impairments observed in FXS. A recent trial demonstrated a beneficial effect of AFQ056, an inhibitor of mGluR5, on the behavior of fully methylated FXS patients.

Key words: Fragile X syndrome; mental retardation; AFQ056

gneri@rm.unicatt.it

La sindrome X fragile (FXS, OMIM #300624), nota in passato anche come sindrome di Martin-Bell, rappresenta la seconda causa più frequente di ritardo mentale dopo la sindrome di Down, e la prima tra quelle ereditarie, con una prevalenza di circa 1 su 3.000. La sindrome è trasmessa come carattere X-linked semidominante, a maggiore penetranza ed espressività nei maschi emizigoti. La prevalenza delle femmine portatrici sane, a rischio di avere figli affetti, è di circa 1 su 250.

La sindrome è causata dalla mutazione del gene FMR1, localizzato sulla banda cromosomica Xq27.3, in corrispondenza del sito fragile FRAXA, descritto originariamente da Lubs nel 1969 in una famiglia

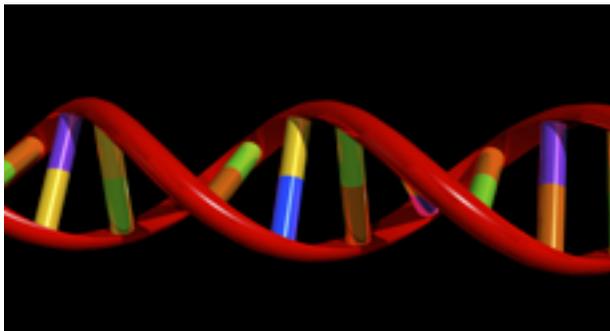
con ritardo mentale X-linked. Nella regione 5' UTR del gene FMR1 è presente una sequenza polimorfica di triplette CGG, la cui espansione e successiva metilazione, estesa alle citosine dell'adiacente isola CpG del promotore, causa un blocco della trascrizione e la conseguente assenza della proteina FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). Questa mutazione si riscontra in più del 95% dei soggetti con FXS. La restante percentuale dei casi è dovuta a mutazioni puntiformi o delezioni di FMR1. L'identificazione di queste mutazioni porta alla conclusione che FMR1 sia il solo gene coinvolto nell'eziologia della FXS e che l'assenza o la perdita di funzione della proteina FMRP ne sia il principale fattore patogenetico. Recentemente, ►

sono state identificate 130 nuove varianti di sequenza del gene FMR1 in una popolazione di circa 1.000 individui maschi affetti da ritardo mentale e privi della tipica espansione della sequenza CGG. Benché il significato patogenetico di queste varianti sia incerto, la loro esistenza suggerisce tuttavia un ruolo causativo importante del gene FMR1 nella patogenesi del ritardo mentale, non strettamente limitato a FXS (1).

Come si manifesta

FXS si manifesta con ritardo psicomotorio di grado medio-grave. Gli individui affetti manifestano inoltre un deficit di attenzione e iperattività, associato a stato di ansia e umore instabile e nei casi più gravi ad autismo. Durante l'infanzia può presentarsi epilessia che generalmente tende a scomparire prima della pubertà. Sotto il profilo fisico i maschi affetti presentano alta statura, macrocefalia relativa, viso stretto e allungato, fronte e mandibola prominenti, ipotelorismo, orecchie grandi, palato ogivale, macrorchidismo, iperestensibilità delle articolazioni, piedi piatti e persistente ipotonia muscolare. Più raro è il riscontro di un prollasso della valvola mitrale. Queste manifestazioni sono in parte riconducibili all'ipotonia muscolare generalizzata, ma probabilmente anche a una displasia connettivale. Un dato interessante viene dagli studi sui cervelli *post-mortem* di individui affetti da FXS e consiste nella presenza, a livello neuronale, di spine dendritiche allungate, sottili e più dense rispetto ai controlli normali, compatibili con un'immaturità di sviluppo. Le femmine affette mostrano in generale un fenotipo più lieve e la gravità del quadro clinico è correlata al grado di inattivazione del cromosoma X mutato.

Il gene FMR1 è costituito da 17 esoni e 16 introni che si espandono lungo un tratto genomico di circa 38 kb. Il gene è trascritto in un mRNA di circa 4,4 kb con una open reading frame (ORF) di 1,9 kb. Nel



promotore del gene è presente un'isola CpG e nella regione 5' UTR a monte del primo esone è localizzata la sequenza polimorfica di triplette CGG. In base all'ampiezza della sequenza espansa, è possibile definire 4 classi di alleli: wild type (WT), con un numero di triplette variabile fra 5 e 55, premutazione (PM) con 56-200 triplette, mutazione completa (FM) e mutazione completa non metilata (UFM, unmethylated full mutation) con più di 200 triplette.

Nella mutazione completa l'alterazione strutturale (espansione) è accompagnata da modificazioni epigenetiche a carico sia del DNA (metilazione delle citosine della sequenza espansa e dell'isola CpG del promotore) (2), che degli istoni (deacetilazione degli istoni H3 e H4, metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9), demetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4) e aumento della forma trimetilata della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3)). Queste modificazioni conferiscono al gene FMR1 una conformazione eterocromatica che ne determina il silenziamento trascrizionale e la conseguente assenza della proteina FMRP, nonostante la sequenza codificante del gene rimanga intatta.

Come si trasmette

Le diverse classi di alleli sopra indicate presentano una stabilità di trasmissione differente: gli alleli normali (5-55 CGG) sono trasmessi in modo stabile da una generazione a quella successiva; gli alleli premutati (56-200 CGG) sono instabili e possono espandersi a mutazione completa. L'amplificazione avviene esclusivamente in caso di trasmissione materna. I momenti critici per il passaggio da premutazione a mutazione completa sono due: la gametogenesi femminile e la fase precoce dello sviluppo embrionale. Nelle famiglie FXS non è mai stata dimostrata l'espansione diretta di un allele normale a uno con mutazione completa. Il rischio che nella meiosi materna si verifichi un'espansione da premutazione a mutazione completa è proporzionale al numero di ripetizioni. Quindi, le mutazioni complete non possono originare da un allele normale, ma solo da premutazioni. Per quanto riguarda lo sviluppo embrionale, le amplificazioni post-zigotiche potrebbero essere responsabili dei mosaicismi somatici tra alleli premutati e alleli con mutazione completa. Poiché il numero delle triplette tende ad aumentare a ogni generazione, la penetranza della sindrome, ovvero il rischio di manifestazioni cliniche, aumenta nelle

generazioni successive. L'espansione della sequenza di triplette spiega il paradosso di Sherman, che si manifesta clinicamente come un aumento del numero di individui con FXS col passare delle generazioni.

Studi compiuti negli ultimi anni hanno evidenziato la presenza di fenotipi patologici anche negli individui portatori di premutazione del gene FMR1, ritenuti in precedenza portatori clinicamente sani di FXS. La premutazione è caratterizzata da livelli trascrizionali più alti e livelli di proteina più bassi rispetto ai soggetti con alleli normali. In individui premutati di età superiore ai 50 anni sia maschi che, più raramente, femmine, è stata descritta una patologia neurodegenerativa caratterizzata da tremore intenzionale progressivo, atassia cerebellare, parkinsonismo, demenza e disfunzioni autonome, indicata come sindrome tremore e atassia associata all'X fragile (Fragile X Tremor Ataxia Syndrome, FXTAS) (3). La penetranza e l'espressività dei disturbi neurologici sono maggiori in presenza di alleli con un elevato numero di ripetizioni CGG. La FXTAS è causata da un eccesso di FMR1-mRNA, che precipita formando inclusioni intranucleari nei neuroni e negli astrociti degli individui premutati con conseguente degenerazione neuronale e manifestazioni cliniche correlate. Nelle donne la premutazione del gene FMR1 si associa, inoltre, a disfunzione ovarica e ad aumentato rischio di menopausa precoce (Premature Ovarian Insufficiency, POI), definita come cessazione completa dei cicli mestruali prima dei 40 anni (4). Il meccanismo responsabile della POI non è ancora noto. Analogamente a quanto proposto per la patogenesi di FXTAS, anche nella POI si può ipotizzare un meccanismo di tossicità dell'mRNA. La penetranza e l'età di esordio sono correlate con le dimensioni della premutazione, con un picco nell'intervallo fra 80 e 100 ripetizioni, mentre premutazioni più grandi sembrerebbero correlate a un rischio inferiore.

Complessivamente, si può quindi parlare di "sindromi da mutazioni del gene FMR1" o di "FRAXopatie" (5), sebbene i meccanismi molecolari e il quadro clinico di ogni condizione siano completamente diversi l'uno dall'altro.

Va ancora segnalato che sono stati descritti rari individui portatori della mutazione completa del gene ma con un'intelligenza pressoché normale, i quali hanno mostrato una completa mancanza di metilazione del gene FMR1 e modificazioni istoniche analoghe

a quelle degli alleli normali, con livelli di trascrizione aumentati ed espressione di FMRP leggermente ridotta. Questi individui dimostrano, in modo inequivocabile, che l'espansione della sequenza di triplette CGG è necessaria ma non sufficiente a determinare il blocco trascrizionale di FMR1 con la conseguente assenza di FMRP e quindi la manifestazione clinica di FXS che ne deriva (6).

La proteina

La proteina FMRP è costituita da 632 aminoacidi e ha un peso molecolare di 70-80 kDa. Lo splicing alternativo al 3 del gene produce più di 20 diversi trascritti, ma solo 4-5 isoforme della proteina sono state realmente osservate nei vari tessuti. L'isoforma 7 (ISO7) è la più cospicua ed è particolarmente espressa nel soma e nelle spine dendritiche delle cellule nervose e negli spermatozoni, in accordo con il quadro clinico che si riscontra nella sindrome. Si tratta di una proteina legante RNA e altre proteine, formando un grosso complesso ribonucleoproteico, che agisce soprattutto a livello delle vescicole post-sinaptiche delle spine dendritiche inibendo la traduzione di mRNA. Oltre a domini comuni ad altre proteine leganti l'RNA, FMRP possiede un dominio di localizzazione nucleare, NLS (Nuclear Localization Signal) ed uno di esportazione dal nucleo, NES (Nuclear Export Signal), che ne facilitano il traffico fra nucleo e citoplasma. Molti degli mRNA legati da FMRP codificano per proteine coinvolte nella funzione sinaptica e nello sviluppo neuronale.

Recenti studi hanno evidenziato il coinvolgimento di FMRP nell'induzione di una depressione post-sinaptica a lungo termine (LTD) in risposta all'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato di gruppo I (mGluR1 e 5). Questa forma di LTD richiede la rapida sintesi di proteine a livello della sinapsi, a sua volta controllata dall'effetto inibitore esercitato da FMRP sulla traduzione di mRNA legati ai polisomi. Da studi effettuati su topi knock-out per FMR1 è emerso che in assenza di FMRP l'attivazione dei mGluR si associa a un eccesso di sintesi proteica nelle vescicole post-sinaptiche delle spine dendritiche, con conseguente aumento della LTD. L'esacerbazione della LTD potrebbe spiegare alcune delle anomalie neurologiche della FXS, quali epilessia, alterazioni comportamentali e anomalie morfologiche delle spine dendritiche.





Il trattamento

Questo modello, definito “teoria dei mGluR” (7), è supportato anche dal fatto che il trattamento con antagonisti selettivi di mGluR (ad esempio, 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine o MPEP) riporta alla norma i difetti comportamentali e neurologici in topi knock-out per FMR1. Recentemente, nei topi l’uso del farmaco AFQ056, inibitore selettivo di mGluR5, ha dimostrato un recupero del fenotipo comportamentale. Questo studio ha supportato l’uso *in vivo* di AFQ056 in un trial clinico su 30 individui affetti da FXS. In 7 di questi pazienti, portatori di una mutazione di FMR1 completamente metilata e totale assenza di trascrizione, si è osservato un miglioramento significativo del comportamento dopo trattamento (8). Questi risultati hanno posto le basi per un trial clinico su più ampia scala, al momento in corso.

In generale, questo approccio terapeutico cerca di “recuperare” il fenotipo neurologico dei pazienti affetti da FXS bypassando l’assenza della proteina FMRP. Un secondo possibile approccio terapeutico è quello che tenta di “riaccendere” il gene FMR1, che nei pazienti affetti non è assente o mutato strutturalmente, ma solo “spento”. Studi effettuati *in vitro*, trattando linee cellulari di pazienti FXS con un agente demetilante il DNA, la 5-azadeossicitidina (5-azadC), hanno dimostrato il ripristino della trascrizione del gene con recupero parziale della proteina FMRP (9). Studi successivi hanno dimostrato che la regolazione dell’attività del gene FMR1 dipende non solo dalla metilazione del DNA, ma anche da modificazioni epigenetiche della

struttura degli istoni, cioè delle proteine sulle quali si avvolge la doppia elica del DNA. In un trial clinico la somministrazione dell’acetil-L-carnitina (ALC), un composto che ha un effetto iperacetilante sugli istoni, ha ridotto l’iperattività in bambini affetti da FXS (10).

L’obiettivo di questi studi è quello di trasferire *in vivo* i risultati ottenuti *in vitro*, secondo il modello della medicina traslazionale, nella speranza che ciò possa portare a una cura farmacologica efficace della sindrome. ■

Ringraziamenti

Questo lavoro è supportato in parte dalla Fondazione Telethon Onlus (GGP10150) e dalla Fondazione FRAXA.

Riferimenti bibliografici

- Collins SC, Bray SM, Suhl JA, *et al.* Identification of novel FMR1 variants by massively parallel sequencing in developmentally delayed males. *Am J Med Genet* 2010;152A(10):2512-20.
- Pietrobono R, Pomponi MG, Tabolacci E, *et al.* Quantitative analysis of DNA demethylation and transcriptional reactivation of the FMR1 gene in fragile X cells treated with 5-azadeoxycytidine. *Nucleic Acids Res* 2002;30(14):3278-85.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, *et al.* Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 2001;57:127-30.
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, *et al.* Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study-preliminary data. *Am J Med Genet* 1999;83:322-25.
- Pirozzi F, Tabolacci E, Neri G. The FRAXopathies: definition, overview and update. *Am J Med Genet* 2011;155A(8):1803-16.
- Tabolacci E, Moscato U, Zalfa F, *et al.* Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *Eur J Hum Genet* 2008;16:1487-98.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 2004;27:370-7.
- Jacquemont S, Curie A, des Portes V, *et al.* Epigenetic modification of the FMR1 gene in fragile X syndrome is associated with differential response to the mGluR5 antagonist AFQ056. *Sci Transl Med* 2011;3:64ra1.
- Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, *et al.* In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 1998;7(1):109-13.
- Torrioli MG, Vernacotola S, Peruzzi L, *et al.* A double-blind, parallel, multicenter comparison of L-acetylcarnitine with placebo on the attention deficit hyperactivity disorder in fragile X syndrome boys. *Am J Med Genet* 2008;146A(7):803-12.