

CORSO D'AGGIORNAMENTO: ATASSIE EREDITARIE

S. Di Donato

Le atassie dominanti

Riassunto Le atassie rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie neurologiche, caratterizzato clinicamente da incoordinazione motoria e disturbi dell'equilibrio e del cammino. Questi disturbi possono presentarsi a carico di diverse regioni e/o vie di associazione del sistema nervoso centrale e periferico che partecipano al controllo del movimento quali: il cervelletto, cellule dei gangli dorsali, vie sensitive cordonali posteriori, vie spinocerebellari, contingente sensitivo dei nervi periferici. Nelle atassie cerebellari autosomiche dominanti i disturbi cerebellari del cammino, dei movimenti volontari e la disartria si accompagnano ad anomalie dei movimenti oculari, sintomi piramidali ed extrapiramidali, amiotrofia, disturbi bulbari, neuropatia periferica e demenza. La classificazione clinica, la presentazione fenotipica, e la diagnosi differenziale sono complicate dalla grande variabilità dei genotipi associati a queste patologie.

Parole chiave Triplette CAG • Poliglutamine • Neurodegenerazione • Atassia spinocerebellare dominante • SCA

Introduzione

Le atassie spinocerebellari dominanti (SCA) sono caratterizzate da un'atassia ad andamento progressivo variabilmente associata ad altri sintomi neurologici. Le SCA sono clinicamente e geneticamente assai eterogenee e risultano al momento associate a 27 loci (SCA1–8, 10–23, 25, 26, 27-FGF14, 28 e DRPLA). I geni malattia sono stati identificati ad oggi in 14 diverse forme di SCA (SCA1–8, 10, 12, 13, 14, 17, 27, e DRPLA) (Tabella 1) [1]. Le SCA1–3, 6, 7 e 17 e l'atrofia dentatorubro-pallidoluisiana (DRPLA) sono dovute ad unico tipo di mutazione, presente nei diversi geni, consistente nell'espansione di un tratto ripetuto di CAG in regioni esoniche codificanti; le espansioni CAG vengono trascritte e tradotte in una lunga sequenza di poliglutamine (poliQ) nelle proteine corrispondenti (Tabella 1). Ne consegue che le proteine codificate dall'allele espanso vengono a contenere un tratto con una estesa ripetizione poliQ, fatto che determina un'alterazione della conformazione della proteina (*misfolding*), che diventa patogena per acquisizione di una funzione nuova, tossica per la cellula (*“toxic gain of function”*) e caratterizzata da tendenza alla formazione di aggregati proteici intracellulari.

Il “guadagno” tossico di funzione si associa a complessi, e non del tutto noti, eventi cellulari che interferiscono con i meccanismi omeostatici delle cellule neuronali, principalmente il controllo del *“folding”* proteico, la degradazione delle proteine a livello del proteasoma, il controllo trascrizionale, il trasporto assonale, il metabolismo energetico.

Clinica e neuropatologia

I segni clinici sono l'espressione di una progressiva degenerazione che interessa principalmente il cervelletto, il

S. Di Donato (✉)

IRCCS Neurologico Besta

Via Celoria 11, I-20133 Milano, Italia

e-mail: didonato@istituto-besta.it

Tabella 1 Classificazione genetica delle SCA dominanti

Malattia	Locus	Mutazioni
SCA1	6p23	Ataxin 1-CAG exp
SCA2	12q24	Ataxin 2-CAG exp
SCA3	14q24.3-q31	Ataxin 3-CAG exp
SCA4	16q22.1	Puratrophin, point mutation
SCA5	11p11-q11	Spectrin, point mutation
SCA6	19p13	CACNA1A-CAG exp
SCA7	3p21.1-p12	Ataxin 7-CAG exp
SCA8	13q21	CTG exp (3'UTR)
SCA9	Not assigned	—
SCA10	22q13	Ataxin 10-ATTCT repeat (intronica)
SCA11	15q14-q21.3	?
SCA12	5q31-q33	PPP2R2B-CAG exp (5'UTR)
SCA13	19q13.3-q13.4	KCN4C
SCA14	19q13.4-qter	Protein gamma kinase C
SCA15	3p24.2-pter	?
SCA16	8q22.1-q24.1	?
SCA17	6q27	TBP-CAG exp
SCA18	7q22-q32	?
SCA19	1p21-q21	?
SCA20	11p13-q11	?
SCA21	7p21.3-p15.1	?
SCA22	1p21-q23	?
SCA23	20p13-12.3	?
SCA24	Reserved	-
SCA25	2p15-21	?
SCA26	19p13.3	?
SCA27-FGF14	13q34	FGF14-missense mutations
SCA28	18p11-q2.1	?
DRPLA	12p13.31	Atrophin 1- CAG exp

tronco e il midollo spinale. SCA1–3, 6, 7, 17 e DRPLA sono associate ad un'espansione di un tratto ripetuto di CAG tradotto in lunghe sequenze poliQ. Le espansioni maggiori sono associate, nelle generazioni successive, ad un'età di esordio più precoce e un quadro sintomatologico più grave. La presentazione clinica più comune delle SCA è una forma di atassia “plus” trasmessa con modalità autosomica dominante, caratterizzata da un'associazione variabile di sintomi cerebellari, oftalmoplegia sopranucleare, movimenti oculari saccadici lenti, atrofia ottica, segni piramidali ed extrapiramidali, demenza lieve-moderata, amiotrofia e neuropatia periferica. Tale presentazione corrisponde alla classificazione ADCA I di Harding [2]. Il quadro neuropatologico più frequente è quello di un'atrofia olivopontocerebellare [3]. Entità genetiche

diverse in questa categoria possono condividere caratteristiche patologiche comuni, come ad esempio SCA1 e SCA2. I soggetti affetti da queste patologie presentano una perdita estesa delle cellule del Purkinje e una degenerazione dei nuclei pontini e delle olive inferiori. La sostanza nera è interessata nei pazienti affetti da SCA2 ma non in quelli con SCA1, fatto che si associa con relativa frequenza a presenza di una sindrome parkinsoniana nella SCA2. Nella SCA3 le cellule del Purkinje e le olive inferiori sono meno colpite, ma è presente una marcata degenerazione dei nuclei della colonna di Clarke e dei nuclei vestibolari e pontini. Nella SCA6 è presente una consistente perdita di cellule del Purkinje, di cellule dei granuli e dei nuclei dentati, ma il tronco e il midollo non sono generalmente interessati. Nei soggetti affetti da SCA7, le cellule del Purkinje, le olive inferiori e i nuclei dei nervi cranici sono gravemente interessati. Sono inoltre colpite le cellule gangliari della retina, il tratto ottico e la corteccia visiva, determinando un fenotipo unico associato a questo genotipo. Nella SCA17 si verifica, nel cervelletto, un'importante perdita di cellule del Purkinje che si associa ad una degenerazione dei neuroni corticali e una, meno pronunciata, dei nuclei olivari. La DRPLA determina una perdita marcata di cellule nel globo pallido, striato, corteccia cerebrale, nucleo subtalamico, rosso e dentato. La perdita cellulare dello strato cerebellare delle cellule del Purkinje è quindi una caratteristica presente nella maggior parte delle SCA, ma la neuropatologia “fine” differisce tra i diversi tipi di malattia [1, 3].

Patogenesi

Studi recenti hanno dimostrato che la neurodegenerazione correlata alle SCA potrebbe trarre origine direttamente dall'espansione della sequenza di poliglutamine poiché:

- (i) la gravità della malattia e l'estensione dell'interessamento del SNC sono correlate positivamente con la lunghezza del tratto poliQ;
- (ii) modelli cellulari e transgenici con proteine complete o frammenti proteici contenti il tratto espanso mostrano rispettivamente morte cellulare e neurodegenerazione;
- (iii) in un modello di topo transgenico l'introduzione di un tratto poliQ nell'enzima citosolico *house keeping* ipoxantina-fosforibosil-trasferasi (HPRT) conferisce alla proteina una tossicità che è causa di neurodegenerazione negli animali transgenici [1].

Quindi le proteine mutate potrebbero “guadagnare” una nuova funzione tossica del tutto indipendente dalla funzione originaria della proteina *wild type*. Questa ipotesi patogenetica unificante sulle malattie da poliQ è stata proposta da Perutz, il quale ha dimostrato che polipeptidi sintetici con estesi tratti poliQ aggregano sponta-

S. Di Donato: Le atassie dominanti

neamente, subendo una variazione conformazionale da alfa-eliche a foglietti beta, legati tra loro da ponti idrogeno tra le catene amidiche laterali. L'alterazione conformazionale comporta proprietà adesive della proteina mutata, che determinano la formazione di aggregati proteici insolubili e resistenti alle proteasi sia nel neuropilo che nei nuclei [4].

Alcuni dati contraddicono, peraltro, la radicalità di un'ipotesi meramente basata sulla espansione poliQ:

- (i) in diverse malattie umane, è presente un grado di correlazione variabile tra lunghezza del tratto poliQ e patogenicità: la maggior parte dei tratti di poliQ diventa patogena quando contiene 35–36 ripetizioni CAG, ma questo varia da 21 ripetizioni nella SCA6 a 60 ripetizioni o più nella SCA3;
- (ii) nelle malattie umane da poliQ (e nei modelli cellulari e animali) la suscettibilità delle diverse popolazioni neuronali, e il fenotipo corrispondente, presentano differenze che dipendono non solo dall'estensione del frammento contenente il tratto di poliQ ripetute, ma anche dalle proprietà intrinseche di ogni proteina;
- (iii) i modelli di topo *knock-in* delle malattie da poliQ, modelli che presentano un livello di espressione della proteina patogena uguale a quello dei soggetti affetti, tendono a riprodurre il quadro neuropatologico delle malattie umane più fedele dei modelli transgenici che sovraesprimono la proteina mutante [1].

Queste osservazioni sottolineano l'importanza del *contesto proteico* nella patogenesi della malattia. In particolare le proteine che presentano tratti espansi di poliQ diventerebbero neurotossiche per specifici sottogruppi cellulari, a seguito di interazioni proteina–proteina altamente selettive, interazioni che sono regolate dalle specifiche proprietà della proteina patogena [5]. Questa ipotesi rivisitata potrebbe spiegare il motivo per il quale la patologia è ristretta al SNC e a specifici sottogruppi neuronali, nonostante le proteine patogeniche poliQ siano espresse nella maggior parte delle cellule.

Ruolo degli aggregati proteici

Nella maggior parte delle malattie da poliQ è presente un'evidenza microscopica di aggregati proteici nel citoplasma e nei nuclei dei neuroni affetti. Le inclusioni intranucleari neuronali (IIN) sono segni caratteristici di neurodegenerazione del tessuto cerebrale di pazienti affetti da SCA1, SCA3, SCA7, SCA17 e DRPLA. Aggregati sono anche presenti nel SNC di pazienti affetti da SCA2 e SCA6, ma solo, rispettivamente, nel citoplasma o nelle regioni citoplasmatiche perinucleari.

Non è ancora stato definito con certezza il ruolo degli aggregati. I neuroni che presentano gli aggregati non sono sempre i più suscettibili alla morte cellulare; inoltre

aggregati di proteine con poliQ e tossicità neuronale possono essere dissociati. Nei tessuti cerebrali di pazienti affetti da SCA17, le IIN poliQ-positive sono largamente distribuite nei neuroni della sostanza grigia cerebrale che non muoiono, mentre le cellule di Purkinje, le più colpite dal processo degenerativo, sono completamente prive di IIN. In modelli transgenici di topo e *Drosophila* che sovraesprimono l'atassina 3 mutata, la correlazione tra neurodegenerazione e IIN è scarsa. In un modello di topo *knock-in* della SCA17, l'alterazione della funzione neuronale è stata rilevata prima della comparsa delle IIN, indicando l'assenza di correlazione tra i due eventi. Pertanto le IIN potrebbero non avere un ruolo patogenico nella neurodegenerazione, bensì avere un ruolo protettivo attraverso l'efficiente sequestro di proteine patogene e la riduzione del loro potenziale neurotossico [6].

Tuttavia le IIN non contengono unicamente aggregati di polipeptidi con tratti espansi di poliQ, ma comprendono anche proteine funzionalmente rilevanti quali ubiquitina, chaperonine (*heat-shock proteins*) e componenti del proteasoma coinvolti nel controllo di qualità del sistema di sorveglianza proteica. È interessante notare come anche diversi fattori di trascrizione vengano costantemente rilevati nelle IIN contenenti ubiquitina [5, 6]. La definitiva rilevanza di questi aggregati cellulari in rapporto ai processi di morte cellulare non è quindi ancora chiara. Infatti, la presenza di ubiquitina negli aggregati intranucleari, che contengono chaperonine e componenti del proteasoma, potrebbe essere un meccanismo per prevenire la neurotossicità degli aggregati di poliQ. D'altra parte, le IIN potrebbero rappresentare l'espressione visibile di una via patogena estesa che recluta i componenti del proteasoma, chaperonine e attivatori trascrizionali, riduce la disponibilità di questi componenti essenziali e causa disfunzione ed eventuale apoptosi neuronale. Il sequestro all'interno degli aggregati nucleari di fattori di trascrizione e attivatori trascrizionali, quali la proteina legante la CREB (CBP), il fattore trascrizionale TFII130 e la proteina attivatrice della trascrizione Sp1, è stato descritto in modelli cellulari SCA3, SCA7 e DRPLA [1, 5].

SCA1

Il gene *SCA1* codifica una proteina di 87-kDa di funzione sconosciuta, denominata atassina-1. L'atassina-1 mutata innesca di per sé una cascata di eventi che conducono verso la neurodegenerazione. Topi transgenici per l'intera lunghezza della proteina mutata sviluppano aggregati nucleari contenenti atassina-1 ed estesa degenerazione delle cellule del Purkinje. Significativamente, in questi topi, la sovraespressione di chaperonine è in grado di promuovere una riconformazione della proteina che sopprime l'aggregazione della atassina-1, e previene parzialmente

la patologia, indicando il ruolo primario dell'alterazione conformazionale nella patogenesi [5].

La comprensione di questi eventi è stata largamente speculativa fino all'identificazione del nucleo dei neuroni come il sito subcellulare privilegiato per gli eventi patogenici. Infatti, topi che esprimono l'atassina-1 con un segnale di localizzazione nucleare (NLS) mutato non sviluppano i sintomi di malattia, dimostrando che la localizzazione nucleare è cruciale per la patogenesi. Inoltre, i topi transgenici che esprimono la proteina atassina-1 priva di una regione che determina auto-associazione, sviluppano atassia e patologia delle cellule del Purkinje, ma non aggregati nucleari di atassina-1. Quindi sembra che la localizzazione nucleare, ma non l'aggregazione, di atassina-1 sia l'evento cruciale per innescare la patogenesi. Zoghbi e Orr hanno dimostrato che la fosforilazione della serina 776 dell'atassina-1 mutata da parte della Akt, una chinasi nota come una molecola di segnale antiapoptotico, è una fase fondamentale nella patologia. La sostituzione della serina 776 con l'alanina nell'atassina-1-82Q (atassina-1 con 82 residui glutamina) previene la fosforilazione e impedisce lo sviluppo di IIN e la patologia, evidenziando il ruolo cruciale di questo residuo aminoacidico. Inoltre, solo l'atassina-1 mutata e fosforilata può interagire con differenti isoforme delle proteine 14-3-3, interazioni che stabilizzano l'atassina-1 mutata ed incrementano il suo potenziale neurotossico [5].

Attualmente, nella SCA1, non è stata ancora chiarita la completa sequenza di eventi che conducono alla disfunzione e alla morte cellulare. Sono probabilmente coinvolte due fasi indipendenti. La prima, che in modo indiscutibile dà inizio alla patologia, è l'oligomerizzazione della proteina contenente tratti espansi di poliQ. Questo processo di oligomerizzazione è stato osservato anche in modelli cellulari di malattia di Huntington. Sostanze chimiche che preferenzialmente legano le regioni *beta-sheet* e ne spezzano la conformazione, sono in grado di inibire la oligomerizzazione delle poliQ e prevenire la neurodegenerazione.

La seconda fase patogenetica coinvolge, probabilmente, interazioni specifiche proteina-proteina nel nucleo, alterazioni che in definitiva causano la morte selettiva di sottogruppi neuronali. Gli effetti ultimi dell'accumulo nel nucleo dell'atassina-1 contenente le espansioni sono sconosciuti. È noto che proteine espresse ad alti livelli nelle cellule del Purkinje interagiscono con l'atassina mutata, e diversi geni neurono-specifici presentano una ridotta espressione nel tessuto cerebrale di modelli murini SCA1 prima dell'esordio della patologia. Diversi geni che modificano positivamente o negativamente il processo che conduce alla morte neuronale indotta dall'atassina-1 sono stati identificati nei modelli di SCA1 in *Drosophila*. Come in altre malattie poliQ, questi geni codificano per proteine che sono coinvolte nella detossificazione proteica e nella regolazione trascrizionale.

SCA3

L'atassina-3, la proteina mutata nella SCA3, è localizzata diffusamente nel citosol delle cellule cerebrali [7]. È interessante notare che alcune proteine implicate nelle SCA, come l'atassina-1 e l'atassina-7, si localizzano nel nucleo mentre altre, come l'atassina-3 e l'atrofina-1, sono normalmente rilevate nel citoplasma. Soltanto l'atassina-7 peraltro, contiene una sequenza NLS riconosciuta: per questo non sono chiari i motivi per le diverse localizzazioni subcellulari delle atassine in condizioni fisiologiche o patologiche. In particolari condizioni cellulari le atassine potrebbero spostarsi tra il compartimento nucleare e quello citoplasmatico. Le proteine citoplasmatiche atassina-3 e atrofina-1 possono ricollocarsi all'interno del nucleo in seguito ad espansione dei loro tratti di poliglutamine, fatto che indicherebbe che la mutazione determina una variazione della normale localizzazione subcellulare della proteina.

Nonostante l'espressione dell'atassina-3 nel tessuto cerebrale sia diffusa, nella SCA3 la neurodegenerazione è specifica e selettiva. L'atassina-3 mutata si accumula infatti in IIN contenenti ubiquitina, specificamente in neuroni presenti nelle regioni cerebrali affette dalla patologia. Topi transgenici atassici sono stati creati attraverso l'espressione selettiva di atassina-3-Q79 nelle cellule del Purkinje. Warrick, Paulson e Bonini hanno generato modelli SCA3 in *Drosophila* attraverso l'espressione selettiva di un frammento troncato di atassina-3 contenente una ripetizione espansa (atassina-3-Q78) nell'organo della visione del moscerino [7]. Questi insetti sviluppano atassia e degenerazione retinica: la gravità del fenotipo è correlata al livello di espressione del transgene. Tuttavia, non tutte le cellule sono ugualmente sensibili agli effetti dannosi dell'atassina-3 mutata. Il frammento Q-78 dell'atassina-3 forma abbondanti IIN nei tessuti dove gli effetti degenerativi sono più evidenti, ma le IIN risultano presenti anche nei neuroni che non degenerano. Nei modelli di *Drosophila* SCA3, sia l'espressione fenotipica, sia la progressione della malattia sono soppressi dalla sovraespressione della chaperonina Hsp70 e, in modo meno significativo, della Hsp40. Come nella SCA1, questi effetti positivi della sovraespressione di chaperonine non riguardano la formazione di aggregati. Infatti, un numero uguale di IIN con le stesse dimensioni si forma in assenza di sovraespressione di chaperonine e in condizioni di soppressione del fenotipo mediato dalle chaperonine. Questi dati sottolineano che la formazione di aggregati nel nucleo potrebbe non essere sufficiente a determinare la neurodegenerazione *in vivo* [7].

Trasporto assonale

I nervi nelle larve di *Drosophila* SCA3 facilitano efficientemente il trasporto assonale rapido di proteine, inclusa

S. Di Donato: Le atassie dominanti

l'atassina-3 con normale lunghezza del tratto poliQ. Il trasporto assonale rapido è compromesso solo quando è espressa nelle larve la atassina-3-Q78 (espansa). Questa compromissione dipende dalla localizzazione subcellulare della proteina mutata. La atassina-3-Q78 con un segnale di localizzazione intranucleare si localizza nel nucleo e induce morte neuronale apoptotica, mentre abbiamo visto che la localizzazione assoplasmatica dell'atassina-3 mutata è associata con la formazione di "blocchi assonali" e cessazione del trasporto assonale. Così, diversi processi contribuiscono a determinare la disfunzione neuronale (trasporto assonale difettivo) e la morte neuronale. Dal momento che due eventi avvengono in due differenti compartimenti subcellulari è plausibile che differenti interazioni proteina-proteina determinino la geografia e le modalità della neurodegenerazione [8].

È interessante sottolineare che difetti del trasporto assonale, come conseguenza di espressione di proteine poliQ, sono stati provati anche in modelli di malattia di Huntington e l'atrofia muscolare spinale bulbare.

Considerazioni finali sulla patogenesi delle SCA con poliQ

È ancora da stabilire quale delle interazioni tra proteine poliQ e proteine neuronali svolga il ruolo principale nel determinare la disfunzione e l'apoptosi cellulare. La ricerca futura dovrebbe precisare quali *pathways* siano determinanti dal punto di vista patogenico tra regolazione trascrizionale, ruolo esercitato dalle chaperonine e dal proteasoma su qualità del controllo delle proteine e loro degradazione e risintesi (ciclo proteico), attivazione delle caspasi, trasporto assonale, e altri meccanismi quale il metabolismo dell'RNA aberrante.

In questo contesto di incertezza, è tuttavia evidente che alcune proteine responsabili di diverse forme di SCA sono implicate nella trascrizione [9]. La proteina legante TATAbox (TBP), interessata nella SCA17, è un fattore trascrizionale, mentre l'atrofina-1 implicata nella DRPLA è un corepressore trascrizionale. L'atassina-3 e l'atassina-7 sono implicate nella trascrizione attraverso le loro interazioni con i regolatori trascrizionali TAFII130 e CBP. In questa direzione vanno i dati ottenuti in un modello di

topo transgenico della SCA7, una malattia caratterizzata da atassia e degenerazione retinica. La diffusa neurodegenerazione osservata nei topi atassici era accompagnata da una forma di grave distrofia dei coni e dei bastoncelli. L'atassina-7 mutata risultava localizzata nel nucleo delle cellule affette, determinando interazioni specifiche con il fattore trascrizionale CRX, una proteina *cone-rod homeobox* che si lega a sequenze di consenso nei promotori di diversi geni che regolano l'espressione nelle cellule fotorecettoriali. L'interazione dell'atassina-7 espansa con l'attivatore trascrizionale rappresenta un modello distinto di interferenza trascrizionale, responsabile della degenerazione retinica. Inoltre, in un modello di topo *knock-in* nella SCA7 è stata osservata una drastica riduzione della trascrizione di un *set* di geni specifici per le cellule dei coni e dei bastoncelli.

Quindi alterazioni trascrizionali, selettivamente regolate nei differenti sottogruppi neuronali, possono contribuire in modo rilevante ai processi di neurodegenerazione nelle SCA e in altri modelli di malattie poliQ, determinandone anche la specificità temporale e locale [9].

Bibliografia

1. Taroni F, Di Donato S (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nature Rev Neurosci* 5: 641–655
2. Harding AE (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1:1151–1155
3. Koeppen AH (1998) The hereditary ataxias. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:531–543
4. Perutz MF (1996) Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 6:848–858
5. Zoghbi HY, Botas J (2002) Mouse and fly models of neurodegeneration. *Trends Genet* 18:463–471
6. Sisodia SS (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell* 95:1–4
7. Bonini NM (2002) Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99[Suppl 4]:16407–16411
8. Gunawardena S, Her LS, Brusch RG et al (2003) Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in *Drosophila*. *Neuron* 40:25–40
9. Freiman RN, Tjian R (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science* 296:2149–2150