



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

Dottorato di Ricerca (XIX ciclo)
"Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo"
Coordinatore Scientifico: Prof. Stefano De Virgilis
(MED 03)

ANALISI MOLECOLARE IN PAZIENTI ITALIANI
CON SINDROME DI LOWE

Tutor:

Prof. Maria Antonietta Melis

Tesi di dottorato di:

Rita Congiu

Anno Accademico 2005-2006

Indice

- **Introduzione.....pag: 1-11**
- **Obiettivo dello studio.....pag: 12-13**
- **Pazienti e Metodi.....pag: 14-20**
- **Risultati.....pag: 21-30**
- **Discussione.....pag: 31-37**
- **Bibliografia.....pag: 38-45**

Lo studio presentato in questa tesi è stato effettuato grazie al prezioso contributo scientifico della prof.ssa Maria Antonietta Melis, della dott.^{ssa} Marisella Addis ed alla collaborazione della dott.^{ssa} Milena Cau, della dott.^{ssa} Simona Santaniello, della dott.^{ssa} Cristiana Meloni e della dott.^{ssa} Gabriella Sole.

Introduzione

DEFINIZIONE

La sindrome oculo-cerebro-renale di Lowe (OCRL) è una rara malattia genetica X-linked. E' caratterizzata da un fenotipo complesso, che include:

- ✓ Cataratte ad entrambi gli occhi
- ✓ Glaucoma (in circa metà dei casi)
- ✓ Scarso tono muscolare e ritardo dello sviluppo motorio
- ✓ Ritardo mentale, da molto lieve a grave (in alcuni casi l'intelligenza può essere normale)
- ✓ Significativi problemi del comportamento (in molti ma non in tutti i casi)
- ✓ Coinvolgimento renale (acidosi tubulare renale)
- ✓ Bassa statura
- ✓ Tendenza a sviluppare rachitismo, fratture ossee, scoliosi e problemi articolari

Si calcola che la sua incidenza sia di 1-10 casi per milione di abitanti. L'aspettativa di vita è di 35-40 anni a causa dell'insufficienza renale, sebbene si registrino morti in età più precoce per problemi renali o per altre cause. L'aspettativa di

vita aumenta nel tempo grazie alla crescita delle conoscenze ed allo sviluppo di nuove possibilità terapeutiche.

IL GENE E LA PROTEINA

Il gene OCRL1 responsabile della sindrome, clonato nel 1992, mappa sul braccio lungo del cromosoma X in posizione Xq25-q26, contiene 24 esoni, è lungo 58 kb e la regione codificante si estende dall'esone 2 al 23. Esiste un sito di splicing alternativo nell'esone 18a, che produce un trascritto con otto aminoacidi addizionali, che si esprime preferenzialmente nei tessuti neurologici. Codifica per una proteina di 105-kDa contenente due domini altamente conservati, uno centrale inositolo polifosfato/fosfoinositide 5 - fosfatasi e uno nella regione C-terminale omologo al dominio RhoGAP, riscontrato in proteine che legano e stimolano l'attività GTPasica delle proteine Rho GTPase family. Questa proteina, denominata OCRL1, è stata caratterizzata come un fosfoinositide 5-fosfatasi cataliticamente attivo, che ha come substrato preferenziale il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂]. L'enzima è localizzato nella rete trans

dell'apparato del Golgi e nel compartimento endosomiale di una varietà di tipi cellulari, come cervello, muscolo scheletrico, cuore, rene, polmone, ovaio, testicolo, fibroblasti, placenta, villi coriali e amniociti. E' coinvolto nel metabolismo dei fosfoinositidi, regola la concentrazione intracellulare del fosfatidilinositolo (4,5) bifosfato ed è altamente omologo all'inositolo polifosfato 5- fosfatasi, che è coinvolto nel segnale intracellulare. Poiché questo enzima non funziona nei pazienti affetti dalla sindrome di Lowe, tutte le funzioni cellulari regolate tramite questo enzima, sull'apparato del Golgi, sono seriamente compromesse. Il risultato finale di questi malfunzionamenti è costituito dalle note alterazioni patologiche a carico del rene, del cervello e dell'occhio. Non è ancora chiaro come la mancanza della proteina OCRL1, espressa in modo ubiquitario, determini delle alterazioni soprattutto a carico di questi tre tessuti. Una possibile spiegazione potrebbe essere data dalla presenza, nei tessuti non colpiti dalla malattia, di una proteina con proprietà e specificità sovrapponibili a quelle dell'enzima OCRL1. Il miglior candidato risulta essere l'Inpp5b

(inositolo polifosfato 5 fosfatasi di tipo II), che mostra un'identità di sequenza del 45% ed una analoga organizzazione in domini funzionali con la proteina in questione. A dimostrazione di ciò, alcuni studi hanno mostrato, come l'Inpp5b sia espresso in quantità ridotte proprio in quei tessuti colpiti preferenzialmente dalla sindrome di Lowe. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che i processi cellulari regolati dall'OCRL1 siano importanti soprattutto nelle cellule dell'epitelio lenticolare, del cervello e dei tubuli renali prossimali. Le modalità con cui il deficit dell'enzima determini i difetti caratteristici di questa sindrome, non sono ancora note, anche se una ridotta attività o l'assenza del prodotto genico, inositolo polifosfato 5-fosfatasi OCRL1, porta ad elevati livelli intracellulari del suo substrato, fosfatidilinositolo (4,5) bifosfato. Questo enzima sembra essere coinvolto nella regolazione della formazione delle vescicole, nel traffico delle proteine nell'apparato del Golgi e nell'assemblaggio del citoscheletro con l'actina. Sebbene gli esatti meccanismi non siano chiari, elevati livelli di

fosfatidilinositolo (4,5) bifosfato possono interferire con questi processi, influenzando la composizione delle membrane cellulari, e in definitiva determinando una anormale migrazione e differenziazione delle cellule nei diversi tipi cellulari, come i tubuli renali o l'epitelio lenticolare. Il ritardo mentale, presente in questi pazienti, sembra essere determinato da un difetto nell'attività RhoGAP della proteina che altera la dinamica dell'actina. Tali cambiamenti potrebbero risultare nella nascita dei difetti e/o di altre manifestazioni cliniche caratteristiche della sindrome di Lowe (Fig.1 e Fig.2)

Fig.1

La figura mostra un possibile modello per la funzione della proteina OCRL1 nel traffico delle proteine dagli endosomi al TGN e viceversa (da Traffic 6:711-719, 2005).

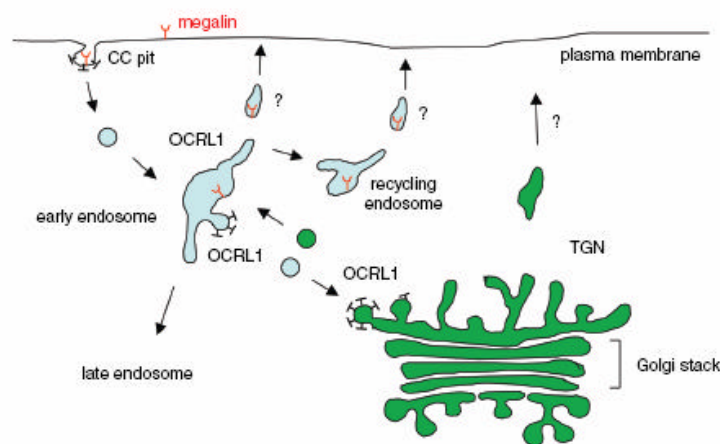
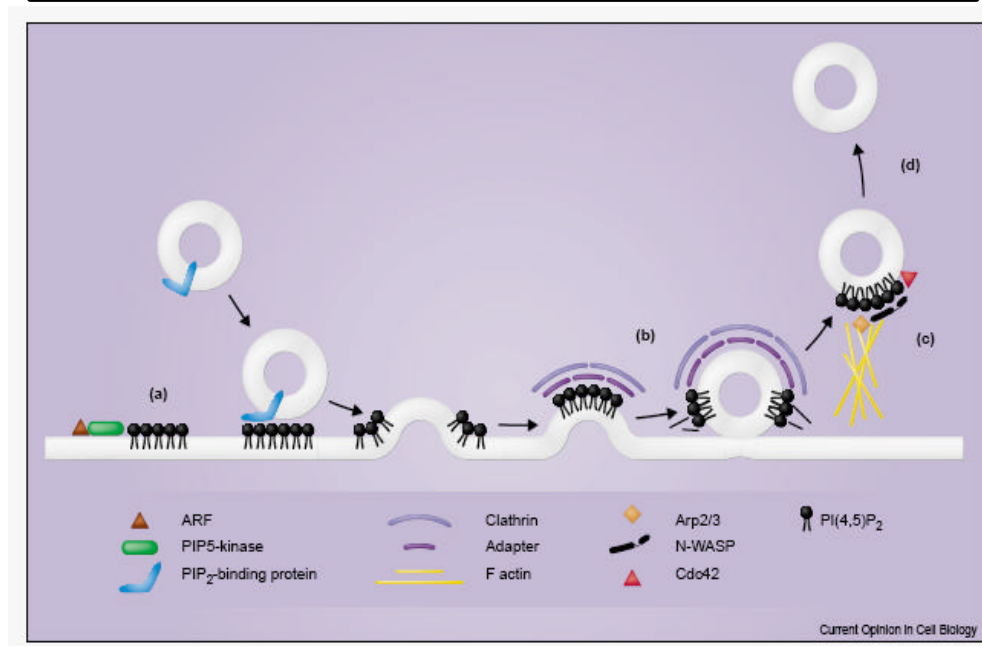


Fig.2

La figura mostra un possibile ruolo del substrato di OCRL1 ($PI(4,5)P_2$), nel processo di formazione delle vescicole per endo ed esocitosi (da *Current Opinion in Cell Biology* 13:493-499, 2001)

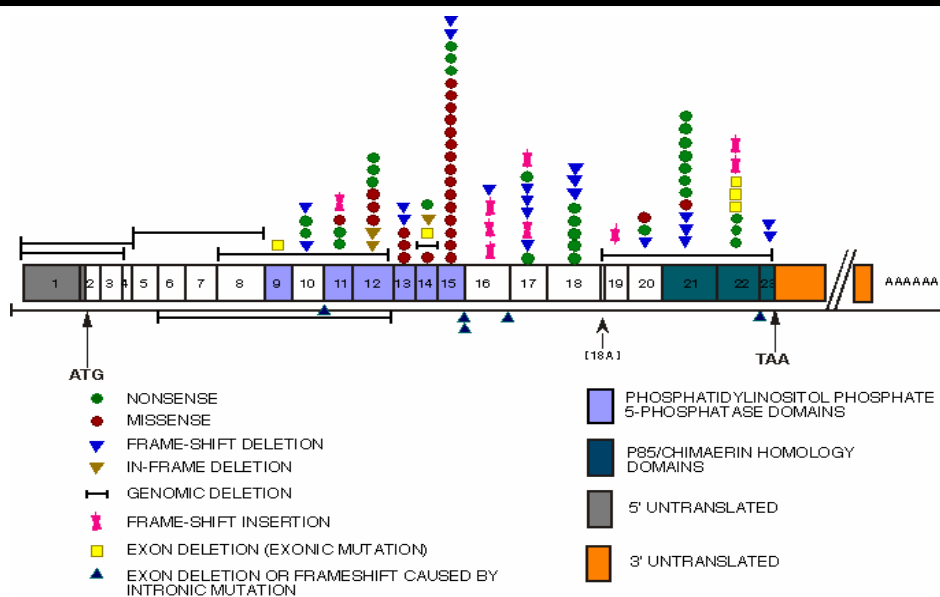


GENETICA

Le mutazioni, sinora identificate, sono più di 70 e poiché la sindrome di Lowe è una malattia X-linked recessiva letale è caratterizzata da un gran numero di nuove mutazioni presenti in famiglie singole non correlate. La maggior parte delle mutazioni

è rappresentata da sostituzioni nucleotidiche nonsense o piccole delezioni che risultano in un frameshift con prematura interruzione della proteina. Sono state descritte, inoltre, mutazioni missense e macrodelezioni. La maggior parte delle mutazioni sinora descritte nel gene OCRL1 (93%) è localizzata negli esoni 10-18 e negli esoni 19-23, con una maggiore frequenza nell'esone 15. Rimane inspiegata e senza significato clinico la scarsità di mutazioni riscontrabili negli esoni 1-9. Nel 6% dei casi, circa, la malattia è causata da grosse delezioni che coinvolgono parzialmente o completamente il gene OCRL1 (Fig.3).

Fig.3
DISTRIBUZIONE DELLE MUTAZIONI NEL GENE OCRL1



Pur essendo la sindrome di Lowe una malattia recessiva legata all'X, sono state descritte alcune femmine che mostrano tutte le manifestazioni cliniche caratteristiche della malattia. In due di questi casi è stata identificata una traslocazione bilanciata "de novo", X - autosoma [46,t(X;20), 46,t(X;3)]. L'analisi del punto di rottura in questi due casi ha permesso di mappare e clonare il gene OCRL1. Nelle malattie X-linked recessive la presenza del fenotipo clinico nelle femmine, può dipendere da diverse cause: anomalie citogenetiche, come traslocazioni reciproche che coinvolgono il cromosoma X o il cariotipo 45,X; la disomia uniparentale e l'inattivazione sbilanciata del cromosoma X.

La compensazione del dosaggio dei geni X-linked nei mammiferi è assicurata da un silenziamento trascrizionale di uno dei due cromosomi X nelle femmine, che avviene durante le prime fasi dello sviluppo embrionale. La scelta del cromosoma X da inattivare è solitamente casuale, ma diversi meccanismi possono influenzare questa scelta, determinando una inattivazione completamente sbilanciata del cromosoma X. Il principale locus genetico proposto per il controllo del processo

di inattivazione del cromosoma X, è denominato XIC (X Inactivation Centre), ed è localizzato in una regione di circa 1Mb nella banda Xq13.2. Questa regione include sequenze regolatorie e il gene XIST, che rappresenta un elemento chiave nel pathway di inattivazione in cis. L'RNA non codificante trascritto da XIST situato sull'X inattivo circonda il cromosoma stesso inducendo modificazioni della cromatina e il suo silenziamento trascrizionale (Fig.4 e Fig.5). Mutazioni del promoter minimo di XIST sono state viste associate ad una preferenziale inattivazione del cromosoma X portante la mutazione. Come conseguenza di questa inattivazione sbilanciata, alcune femmine eterozigoti, per malattie recessive X-linked, possono manifestare il fenotipo clinico caratteristico della malattia.

Fig.4

La figura mostra i possibili meccanismi responsabili del processo di inattivazione del cromosoma X (da Science 295:287-288, 2002)

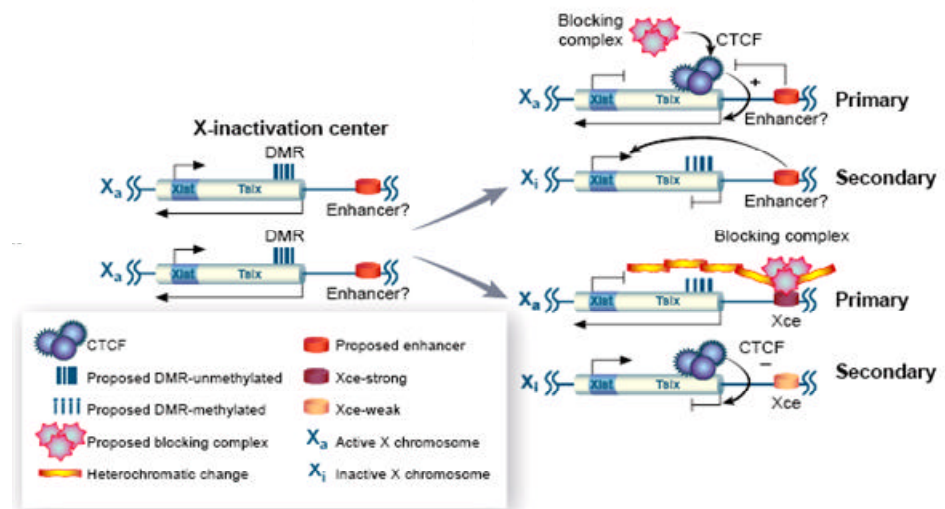
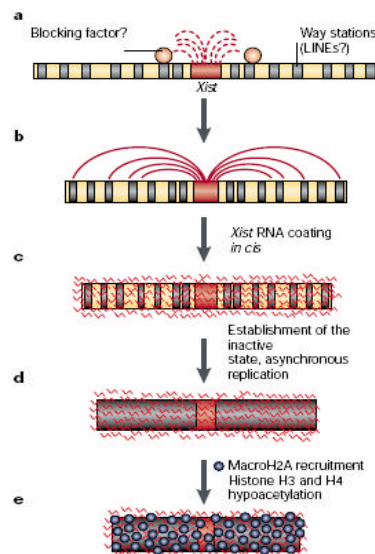


Fig.5

Modello di inattivazione del cromosoma X



*Obiettivo
dello
studio*

Il programma di ricerca ha previsto lo studio molecolare di pazienti italiani con sindrome di Lowe. Le famiglie provengono da Sicilia, Sardegna, Puglia, Lazio, Abruzzo, Emilia Romagna, Toscana, Lombardia, Veneto e Liguria. Tutti i pazienti presentano le caratteristiche cliniche della sindrome, incluso il ritardo mentale, cataratta congenita bilaterale, ipotonia congenita e tubulopatia. Riportiamo, inoltre, lo studio di una famiglia con una inattivazione totalmente sbilanciata del cromosoma X, che ha determinato in una femmina la manifestazione dei sintomi clinici della malattia.

Pazienti
e
Metodi

PAZIENTI

L'indagine del nostro studio è stata condotta su 20 pazienti affetti da sindrome di Lowe, provenienti da diverse regioni italiane: Sicilia, Sardegna, Puglia, Lazio, Emilia Romagna, Toscana e Lombardia. La diagnosi è stata fatta sulla base del riconoscimento dei sintomi clinici caratteristici di questa sindrome, come: ritardo mentale, cataratta congenita bilaterale, ipotonia congenita e tubulopatia. I nostri pazienti hanno un'età compresa tra i 4 e i 22 anni, e la diagnosi è stata effettuata, per la maggior parte di essi, all'età di cinque mesi.

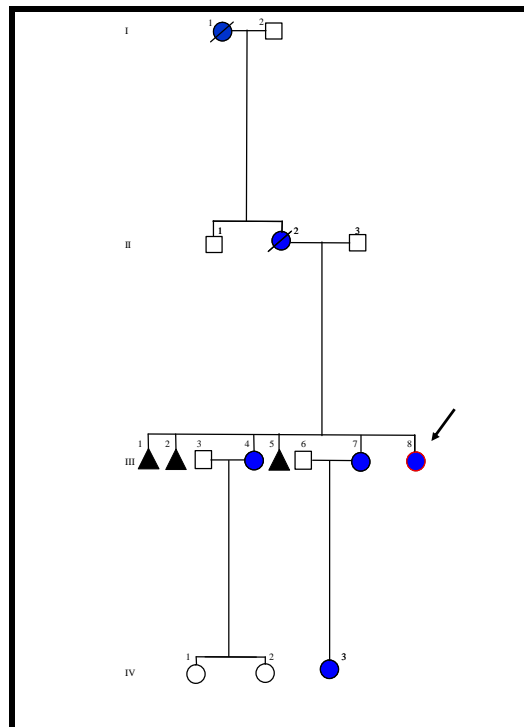
FAMIGLIA

Abbiamo esaminato 12 soggetti appartenenti ad una larga famiglia di quattro generazioni, nella quale una femmina manifestava i sintomi clinici della sindrome di Lowe (fig.6). Il DNA è stato estratto dal sangue periferico di tutti i membri della famiglia, ad eccezione dei soggetti I-1 e II-2, il cui DNA è stato estratto dalle linee linfoblastoidi, poiché deceduti in epoca precedente all'avvio dell'indagine. Il probando (III-8) è una

ragazza di 22 anni, terza figlia di una coppia di non consanguinei, senza storia familiare di Sindrome di Lowe o di altre anomalie oculari. Alla nascita era stata notata una cataratta congenita ed un'ipotonìa grave. Ad un anno di vita è stata posta la diagnosi di sindrome di Lowe sulla base dello sviluppo della sindrome renale di Fanconi, di un grave ritardo psicomotorio e di tipiche caratteristiche somatiche. All'esame citogenetico è risultato un cariotipo femminile normale.

Fig.6

ALBERO GENEALOGICO: il soggetto indicato dalla freccia è la paziente affetta da Sindrome di Lowe.



ANALISI DI MUTAZIONE

Il DNA è stato estratto utilizzando i metodi standard. I 23 esoni codificanti, del gene OCRL1, e le sequenze introniche fiancheggianti sono stati amplificati da DNA genomico, usando i primers forward e reverse designati in accordo alla sequenza nucleotidica del gene OCRL1. La miscela di reazione è stata preparata in un volume finale di 25ul, contenente 100ng di DNA, 200uM di ciascun dNTP, 1uM di ciascun primer (forward e reverse), 0.5U di Amplitaq Gold Polimerase (Applied Biosystem) e 2.5ul di buffer 10X. Sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione: uno step di denaturazione a 95°C per 10', seguito da 30 cicli di amplificazione con i seguenti parametri: 94°C per 30'', 52-60°C per 30'', 72°C per 1'; ed uno step finale a 72°C per 7'. I frammenti della PCR sono stati purificati ed analizzati mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

***DETERMINAZIONE DEL PATTERN DI INATTIVAZIONE
DEL CROMOSOMA X***

Il pattern d'inattivazione del cromosoma X (XCIP) è stato studiato in tutte le femmine della famiglia mediante l'analisi del recettore degli androgeni (AR). Questa analisi si basa sulla presenza nel locus AR (Xq12) di un microsatellite, CAG repeats, con una percentuale di eterozigotità molto elevata. Questo microsatellite si trova nel primo esone della regione codificante del locus AR, vicino ai siti metilati del cromosoma X inattivo e a quelli non metilati del cromosoma X attivo. L'XCIP è stato calcolato paragonando l'intensità degli alleli amplificati, dopo digestione del DNA con enzimi sensibili alla metilazione (HpaII e HinpI), normalizzati rispetto ai valori ottenuti dai DNA non digeriti e moltiplicati per 100. Gli XCIP sono stati classificati come casuali (rapporto da 50:50 a <80:20), sbilanciati (rapporto >80:20) o estremamente sbilanciati (>95:5).

SEQUENZIAMENTO DEL GENE XIST

Il promoter minimo, altamente conservato, del gene XIST localizzato in Xq13, è stato amplificato usando i primers precedentemente descritti (Plenge et al. 1997) ed analizzato attraverso il sequenziamento diretto.

ANALISI MOLECOLARE CITOGENETICA

Nella paziente III-8 è stato analizzato il cariotipo molecolare, mediante array-CGH, utilizzando il kit Agilent. Si tratta di una piattaforma di 60-mer oligonucleotidi, che ha permesso di evidenziare un profilo molecolare di aberrazioni comosomiche con una risoluzione di 75 Kb.

GENOTIPIZZAZIONE DEL CROMOSOMA X

L'analisi di linkage, estesa a tutto il cromosoma X, è stata eseguita mediante l'utilizzo di 37 marcatori microsatelliti localizzati ad una distanza media di 9,2 cM (ABI Prism Linkage Mapping Set, versione 2.5-MD10; HD5). Questi marcatori sono

stati amplificati seguendo il protocollo standard ed analizzati mediante sequenziatore automatico ABI PRISM 3100.

ANALISI STATISTICA

L'analisi di linkage a due punti è stata effettuata utilizzando MLINK routine di FASTLINK package v.4.1P, mentre per l'analisi di linkage a più punti è stato utilizzato LINKMAP routine di FASTLINK. L'analisi è stata eseguita assumendo che ci sia una trasmissione X-linked dominante del carattere in esame (inattivazione totalmente sbilanciata del cromosoma X), con una frequenza dell'allele malattia di 0.0001 ed una frequenza uguale per gli alleli dei singoli marcatori.

Risultati

ANALISI DI MUTAZIONE

I 23 esoni codificanti e le sequenze introniche fiancheggianti del gene OCRL1, sono stati analizzati singolarmente attraverso il sequenziamento diretto. Sono state identificate le mutazioni causali in tutti i 20 pazienti. Di queste 20 mutazioni, solo 4 erano già state descritte in precedenza. La distribuzione delle mutazioni, identificate nel nostro pannello di pazienti, include 4 mutazioni missense e 16 mutazioni che determinano una proteina anomala o tronca: 4 mutazioni nonsense, 4 mutazioni del sito di splicing, 3 inserzioni, 4 delezioni, di cui una in frame, e 1 delezione dell'intero gene (Tab.1).

FAMIGLIA

L'analisi del gene OCRL1, mediante sequenziamento diretto, ha mostrato nella paziente III-8, appartenente alla famiglia in esame, una sostituzione T>G, in eterozigosi, al dinucleotide invariato del sito donatore di splicing dell'introne 14 (IVS14+2T>G). Questa mutazione, che determina uno splicing anomalo, non è stata riscontrata negli altri membri della

famiglia esaminati (II-2, II-3, III-4, III-7). Al fine di determinare l'origine parentale della mutazione abbiamo studiato i microsatelliti DXS6854 e DXS6855 localizzati in prossimità del gene OCRL1. L'analisi degli aplotipi ha messo in evidenza che la mutazione del gene OCRL1 è presente nel cromosoma X di origine paterna. Il pattern di inattivazione del cromosoma X (XCIP) è stato studiato in tutte le femmine della famiglia mediante l'analisi del recettore degli androgeni (AR). Il probando, come cinque delle sette femmine non affette, ha mostrato un XCIP completamente sbilanciato, con un rapporto di 100:0 (Fig.7). Tutte le femmine della famiglia ereditano il cromosoma X attivo dal padre e nel probando tale cromosoma contiene la mutazione del gene OCRL1. Questo spiega la manifestazione della Sindrome di Lowe in questa paziente.

Al fine di identificare sul cromosoma X un locus responsabile dell'XCIP completamente sbilanciato, abbiamo eseguito l'analisi delle sequenze del promoter minimo del gene XIST che non ha mostrato la presenza di alcuna mutazione.

Anche l'analisi citogenetica, mediante Array-CGH, ha mostrato un profilo normale per tutti i cromosomi, incluso il cromosoma X (Fig.8).

Abbiamo proseguito lo studio con la genotipizzazione di tutti i membri della famiglia, mediante l'utilizzo di 37 marcatori microsatelliti, distribuiti ad una distanza media di 9.2cM, lungo tutto il cromosoma X (Fig.9).

Successivamente è stata eseguita l'analisi di linkage che ha dato i seguenti risultati:

- ✓ L'analisi di linkage a due punti ha dato un valore massimo di LOD SCORE di 1.81 per i marcatori DXS8067 e DXS8057 ad una frazione di ricombinazione di $\theta= 0.0$.
- ✓ L'analisi di linkage a più punti ha evidenziato un valore di LOD SCORE di 2.11, per questa stessa regione che si estende per circa 3.4 cM, localizzata in Xq25 (Fig.10).

Poiché un LOD SCORE >2 rappresenta la soglia di significatività per il linkage sul cromosoma X, questi dati sembrano indicare la presenza, in questa regione, di un locus che controlla il pattern di inattivazione del cromosoma X.

L'analisi di linkage a più punti, inoltre, ha evidenziato un LOD SCORE < -2 per il marcatore DXS1106, escludendo così il linkage con il locus di XIST, il principale locus genetico proposto per il controllo del processo di inattivazione, localizzato nella regione Xq13.2.

Tab.1
Mutazioni del gene OCRL1 identificate nei pazienti in studio

| PAZIENTE | ESONE | MUTAZIONE | EFFETTO PREDETTO | STATO DELLA MADRE |
|-----------------|--------------|----------------------------|---|--------------------------|
| SL-01 | 8 | 559 del A | Frameshift/stop | Portatrice |
| SL-02 | 9 | 690 G>T | W230C (mutant protein) | Portatrice |
| SL-03 | 11 | 889-11G>A | Splicing abnormality, amino acid insertion and premature stop | Portatrice |
| SL-04 | 11 | 889-11G>A | Splicing abnormality, amino acid insertion and premature stop | Portatrice |
| SL-05 | 12 | 1110-1111 ins T | Frameshift /premature stop | Portatrice |
| SL-06 | 12 | 1193+1 G>C | Splice site mutation | Non portatrice |
| SL-07 | 14 | 1380 T>G | Y460X (Premature stop) | Non portatrice |
| SL-08 | 14 | 1382 ins ATAA | Frameshift /premature stop | Non esaminata |
| SL-09 | 14 | 1415+2 T>G | Splicing abnormality | Non portatrice |
| SL-10 | 15 | 1529 T>A | V510D (mutant protein) | Portatrice |
| SL-11 | 15 | 1522-1533 del AAGCCTGTTAGC | Mutant protein | Portatrice |
| SL-12 | 16 | 1643-44insCCTT | frameshift, premature stop | Non portatrice |
| SL-13 | 17 | 1679 T>A | V560E (Substitution, splice site) | Portatrice |
| SL-14 | 18 | 1829-5_1829-21 del | alternative splice acceptor, frameshift, premature stop | Portatrice |
| SL-15 | 18 | 2032C>T | R678X (premature stop) | Non portatrice |
| SL-16 | 19 | 2193C->G | Y731X (premature stop) | Portatrice |
| SL-17 | 20 | 2246delA | frameshift, premature stop | Portatrice |
| SL-18 | 21 | 2364C>G | Y788X (premature stop) | Non portatrice |
| SL-19 | 22 | 2530G->A | A844T (Substitution, splice site) | Portatrice |
| SL-20 | | Delezione intero gene | | Portatrice |

Fig.7

La figura mostra l'XCIP ottenuto mediante l'analisi del recettore degli androgeni (HUMARA) nelle femmine della famiglia.

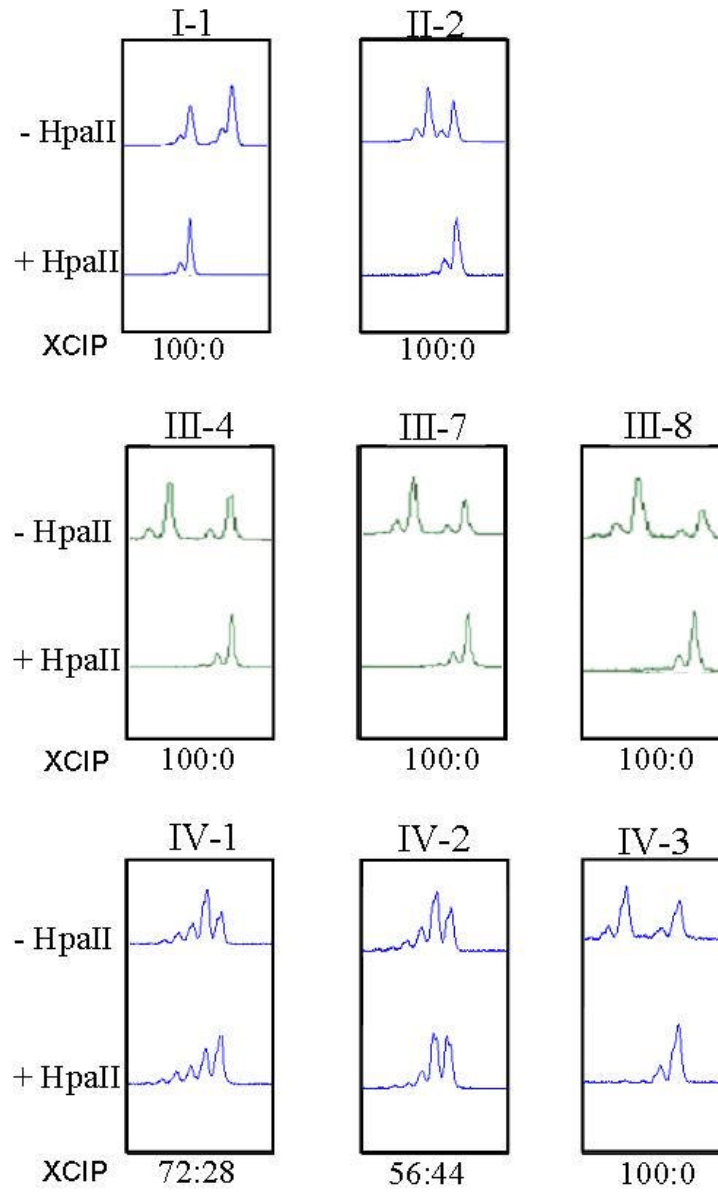


Fig.8
L'analisi citogenetica mediante Array-CGH mostra un profilo normale per il cromosoma X

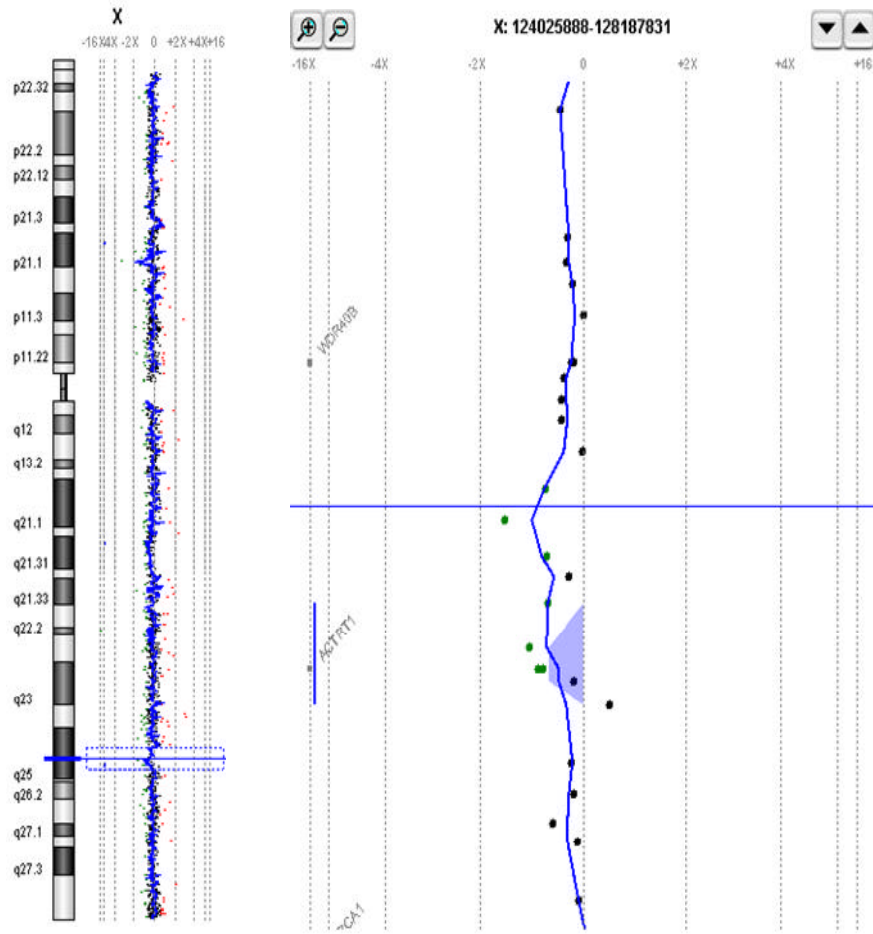


Fig.9
Albero genealogico della famiglia con gli aplotipi ottenuti esaminando 37 marcatori microsatelliti. La regione indicata dal rettangolo rappresenta la regione condivisa dalla femmine con l'XCIP completamente sbilanciato. La freccia indica la paziente affetta da sindrome di Lowe.

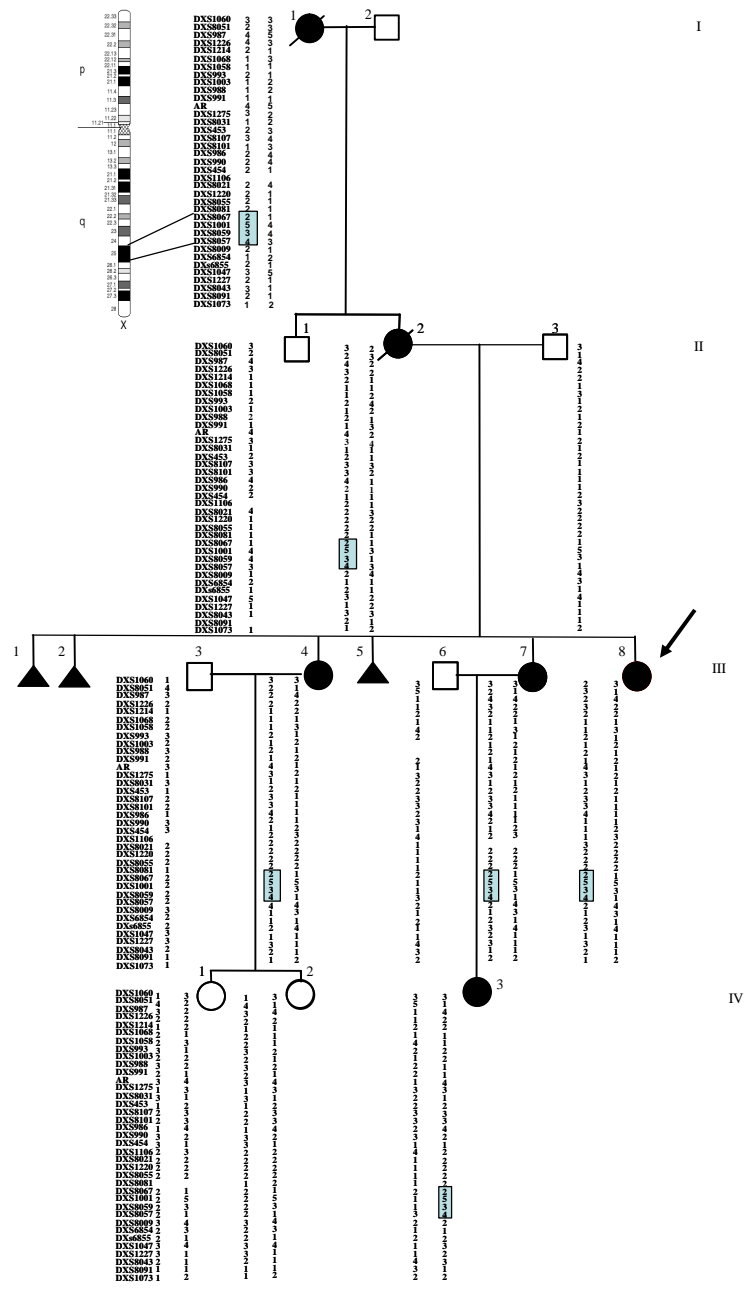
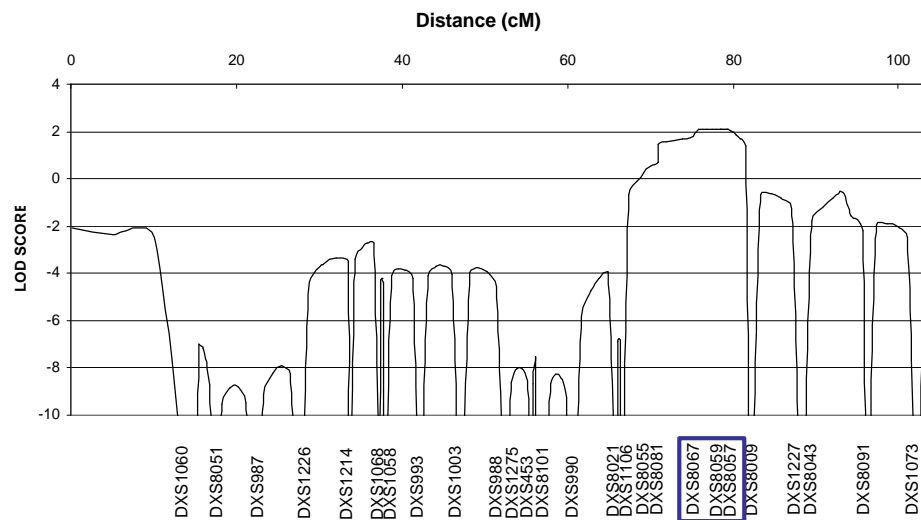


Fig.10

Analisi statistica a più punti. La regione indicata dal rettangolo mostra un LOD SCORE di 2.11, indicando la presenza di linkage con l'XCIP completamente sbilanciato presente nella famiglia.



Discussione

La sindrome oculocerebrorenale di Lowe (OCRL) è una malattia molto rara caratterizzata da anomalie agli occhi, al sistema nervoso centrale e ai reni. Il gene responsabile della OCRL si trova in Xq25-26 e codifica per una fosfatasi localizzata nell'apparato del Golgi e nel compartimento endosomiale. La maggior parte dei pazienti con sindrome di Lowe non ha livelli elevati di trascritto o di attività fosfataseica. In accordo con questo la gran parte delle mutazioni descritte producono proteine tronche e le mutazioni missense sono localizzate nei domini catalitici altamente conservati. La sindrome di Lowe, come malattia X-linked recessiva letale, è caratterizzata da un gran numero di nuove mutazioni. In questa tesi viene descritto lo studio molecolare di pazienti italiani con sindrome di Lowe e lo studio di una famiglia in cui una paziente femmina manifesta i sintomi clinici della malattia. Abbiamo esaminato 20 pazienti e in tutti è stata trovata la mutazione causale. Tra le mutazioni identificate 6 risultano nuove mutazioni, e nonostante l'esiguo numero viene rispettata la percentuale attesa di un terzo.

La distribuzione delle mutazioni identificate nel nostro pannello di pazienti include 4 mutazioni missense e 16 mutazioni che determinano una proteina anomala o tronca: 4 mutazioni nonsense, 4 mutazioni del sito di splicing, 3 inserzioni, 4 delezioni, di cui una in frame, e 1 delezione dell'intero gene. La loro distribuzione nel gene è simile a quella descritta in altre casistiche, con la particolarità della mutazione missense identificata nel paziente SL-13. Questa mutazione è localizzata in una regione del gene non appartenente ad uno dei domini catalitici altamente conservati, come accade per la maggior parte delle mutazioni missense. Sebbene si sappia da diversi anni che le mutazioni nel gene OCRL1 causano la sindrome di Lowe, poco è ancora conosciuto sull'effettiva azione della proteina all'interno della cellula. Noi pensiamo che si possano fare grandi progressi nella comprensione dell'attività di questa fosfatasi, anche grazie alla mappatura delle mutazioni che potrà dare informazioni interessanti sulla correlazione genotipo-fenotipo.

Pur essendo la sindrome di Lowe una malattia recessiva legata all'X, sono state descritte alcune femmine che mostrano tutte le manifestazioni cliniche caratteristiche della sindrome.

In questa tesi viene descritto lo studio di una famiglia in cui una paziente femmina manifesta i sintomi clinici della malattia. L'analisi mutazionale del gene OCRL1, ha messo in evidenza la presenza di una nuova mutazione (IVS14+2T>G), originatasi probabilmente nella linea germinale del padre. La presenza di un pattern di inattivazione completamente sbilanciato, riscontrato nelle cellule del sangue di questa paziente, spiega la manifestazione clinica della malattia, dopo aver escluso le anomalie citogenetiche e la disomia uniparentale.

Una inattivazione sbilanciata del cromosoma X è frequente in femmine portatrici di mutazioni che colpiscono geni coinvolti nella sopravvivenza, maturazione e proliferazione cellulare. Il pattern di inattivazione in questi casi è legato ad uno svantaggio di crescita post-inattivazione per quelle cellule con il cromosoma X attivo portatore della mutazione.

Nella nostra famiglia, sei femmine, tra cui cinque non affette, mostrano un XCIP completamente sbilanciato, e tutte hanno ereditato il cromosoma X attivo dal padre, differente in ogni generazione, quindi la possibilità che la spiegazione del fenomeno osservato, sia imputabile ad una selezione cellulare sembra inconsistente.

La presenza di una concordanza nell'XCIP, nelle femmine della famiglia, potrebbe essere il frutto di un evento stocastico, anche se la probabilità di trovare per caso, sei femmine, appartenenti ad una famiglia di quattro generazioni, con lo stesso pattern di inattivazione completamente sbilanciato e con lo stesso cromosoma X inattivo è un evento estremamente raro. Queste osservazioni suggeriscono che in questa famiglia, l'inattivazione non random, può essere dovuta alla presenza di un tratto genetico X-linked, coinvolto nella scelta del cromosoma X da inattivare, trasmesso in modo dominante.

Gli eventi più precoci del processo di inattivazione sono sotto il controllo di XIC (X Inactivation Centre), il principale locus genetico proposto per il controllo di questo processo. Questa

regione, localizzata in Xq13.2, contiene diverse sequenze regolatorie e il gene XIST, che rappresenta un elemento chiave nel pathway di inattivazione in cis. Sinora XIST è l'unico gene, descritto negli umani, a determinare la scelta iniziale di quale cromosoma X deve rimanere attivo e quale inattivo.

Sono state descritte due famiglie nelle quali una mutazione nel promoter del gene XIST ha determinato una inattivazione preferenziale del cromosoma X che portava la mutazione. In altre famiglie, in cui diverse femmine mostravano lo stesso XCIP sbilanciato, l'analisi degli aplotipi ha mostrato la cosegregazione del tratto con le seguenti regioni del cromosoma X, una in Xq28, in Xq25-26 e una in Xq13 (Naumova et al 1997; Bicocchi et al. 2005)

L'analisi degli aplotipi, nella nostra famiglia, non ha mostrato alcun linkage con la regione Xq13.2, dove risiede il locus di XIST, e il sequenziamento del suo promoter minimo non ha mostrato alcuna variazione nucleotidica.

I nostri dati mostrano, invece, una cosegregazione del pattern di inattivazione con una regione di circa 3.4 cM, localizzata in

Xq25. Questa regione si sovrappone in parte con quella già descritta da Naumova et al., e più precisamente questa sovrapposizione si osserva nella zona compresa tra i due marcatori DXS425 e DXS8057.

La ricerca nelle banche dati, disponibili in rete, ha rivelato che più di 38 geni mappano all'interno di questo intervallo. Sulla base delle informazioni riguardanti i processi biologici e le funzioni molecolari, diversi di essi potrebbero essere candidati come geni responsabili dell'inattivazione completamente sbilanciata del cromosoma X, in questa famiglia.

In questo studio riportiamo il primo caso di una famiglia, in cui sei femmine su otto, presentano una inattivazione del cromosoma X completamente sbilanciata (100:0), ereditata come tratto X-linked dominante, che ha permesso di identificare una regione d'interesse per la localizzazione di un locus che controllerebbe la preferenziale inattivazione del cromosoma X.

Bibliografia

1. Lowe C, Terrey M, MacLachan E. Organic aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation: a clinical entity. *Am J Dis Child* 1952; 83:164:184
2. Attree O, Olivos I, Okabe I, Bailey C, Nelson D, Lewis R, McInnes R, Nussbaum RL. The Lowe oculocerebrorenal syndrome gene encodes a novel protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* 1992; 358: 239-242
3. Nussbaum R, Orrison M, Janne P, Charnas L, Chinault A. Physical mapping and genomic structure of the Lowe syndrome gene OCRL1. *Hum Genet* 1997 ; 99: 145-150
4. Suchy SF, Olivos-Glander IM and Nussbaum RL. Lowe syndrome, a deficiency of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 5 phosphatase in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2245-2250
5. Dressman MA, Olivos-Glander LM, Nussbaum RL, Suchy SF. Ocr11, a PtdIns(4,5)P(2) 5-phosphatase is localizaed to the

- trans-Golgi network of fibroblasts and epithelial cells. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 178-190
6. Ungewickell AJ, Majerus PW. Increased levels of plasma lysosomal enzymes in patients with Lowe syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13342-13344
7. Faucherre A, Desbois P, Satre V, Lunardi J, Dorseuil O, Gacon G. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet* 2003; 12:2449-2456
8. Leahey AM, Charnas L, Nussbaum R. Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Hum Mol Genet* 1993; 4:461-463
9. Lin T, Orrison BM, Leahey AM, Suchy S, Bernard D, Lewis R, Nussbaum R. Spectrum of mutations in the OCRL1 gene in the Lowe oculocerebral syndrome. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1384-1388
10. Kawano T, Indo Y, Nakazato H, Shimadzu M, Matsuda I. Oculocerebrorenal syndrome of Lowe: three mutations in the

OCRL1 gene derived from three patients with different phenotypes. *Am J Med Genet* 1998; 77:348-355

11. Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, Fukushima Y. Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in Japanese families with Lowe syndrome. *Clin Genet* 1998; 54:199-202

12. Lin T, Orrison BM, Suchy S, Lewis RA, Nussbaum R. Mutations are not uniformly distributed throughout the OCRL1 gene in Lowe syndrome patients. *Mol Genet Metabol* 1998; 64:58-61

13. Satre V, Monnier N, Berthoin F, Ayuso C, JjoannardA, Jouk PS, Lopez-Pajares I, megarbane A, Philippe HJ, Plauchu H, Torrej ML, Lunardi J. Characterization of a germline mosaicism in families with Lowe syndrome and identificatio of seven novel mutations in OCRL1 gene. *Am J Hum Genet* 1999; 65:68-76

14. Addis M, Loi M, Lepiani C, Cau M, Melis MA. OCRL mutation analysis in Italian patients with Lowe syndrome. *Hum Mutat* 2004: Mutation in brief # 710

15. Scholten HG. Een meisje met het syndroom van Lowe. *Maandschr Kindergeneeskd* 1960; 28:251-255
16. Svore J, Masopust J, Komarkova A, Macek M, Hyanek J. Oculocerebral syndrome in a female child. *Am J Dis Child* 1967; 114:186-190
17. Harris LS, Gitter KA, Galin A, Plechaty GP. Oculo-cerebro-renal syndrome: report of a case in a baby girl. *Br J Ophthalmol* 1979; 54:278-280
18. Sagel I, Ores RO, Yuceoglu AM. Renal function and morphology in a girl with oculocerebrorenal syndrome. *J Pediatr* 1970; 77:124-127
19. Cyvin KB, Weudemann H, Bathen J. Lowe's syndrome. *Acta Pediatr Scand* 1973; 62:309-312
20. Yamashina I, Yoshida H, Fukui S, Funakoshi I. Biochemical studies on Lowe's syndrome. *Mol Cell Biochem* 1981; 52:107-124
21. Hodsson SV, Heckmatt JZ, Hughes E, Crolla JA, Dubowitz V, Bobrow M. A balanced de novo X/autosomal translocation in

a girl with manifestation of Lowe syndrome. *Am J Med Genet* 1986: 23:837-847

22. Mueller OT, Hartsfield JK Jr, Gallardo LA, Essig YP, Miller KL, Papenhausen PR, Tedesco TA. Lowe oculocerebrorenal syndrome in a female with balanced X;20 translocation: mapping of the X chromosome breakpoint. *Am J Hum Genet* 1991: 49:804-810

23. Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena F, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard F. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nature Genet* 1997: 17:353-356

24. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992: 52:1229-1239

25. Willard H.F. The sex chromosome and X chromosome inactivation.. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds) *The Metabolic and Molecular*

Bases of inherited Disease. 2001: 9th ed. McGraw-Hill, New York pp 1191-1221

26. Pegoraro E, Schimke RN, Arahata K, Hayashi Y, Stern H, Marks H, Glasberg MR et al. Detection of new paternal dystrophin gene mutations in isolated cases of dystrophinopathy in females. *Am J Hum Genet.* 1994: 54:989-1003.

27. Reddy BK, Anandavalli TE, Reddi OS. X-Linked Duchenne muscular dystrophy in an unusual family with manifesting carriers. *Hum Genet* 1984: 67: 460-462.

28. Puck JM, Stewart CC, Nussbaum RL. Maximum-likelihood analysis of T-cell X chromosome inactivation patterns: normal women versus carriers of X-linked severe combined immunodeficiency: *Am J Hum Hum Genet* 1992: 50:742-748

29. Fey MF, Peter HJ, Hinds HL, Zimmermann A, Liechi-Gallati S, Gerber H, Suder H, Tobbler A. Clonal analysis of human tumors with M27b, a highly informative polymorphic X-chromosomal probe. *J Clin Invest.* 1992: 89:1438-1444.

30. Naumova AK, Plenge RM, Bird LM, Leppert M, Morgan K, Willard HF, Sapienza C. Heritability of X chromosome

inactivation phenotype in a large family. *Am J Hum Genet* 1996: 58:1111-1119

31. Rastan S, Brown SD. The search for the mouse X-chromosome inactivation center. *Genet Res* 1990: 56:99-106

32. Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X-inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet* 1997: 61:60-70

33. Naumova AK, Olien L, Bird LM, Smith M, Verner AE, Leppert M, Morgan K, Sapienza C. Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur J Hum Genet* 1998: 6:552-562