

RAGIONI MOLECOLARI DELLA SMA

Le ragioni molecolari della malattia

L'atrofia muscolare spinale è causata da ridotti livelli di espressione di un gene ubiquitariamente espresso: il survival motor neuron (SMN). Sono state postulate due ipotesi per spiegare l'effetto del deficit di questo gene ovvero che esso possa influenzare lo splicing di altri geni o distruggere la loro funzione negli assoni distali (1).

Nel 1990 utilizzando analisi linkage fu scoperto che il locus della SMA era localizzato sul cromosoma 5q13, una zona molto complessa e tra l'altro molto instabile. Nel 1995 fu identificato il gene responsabile della patologia e fu appunto chiamato SMN (2) mentre l'anno successivo ne fu caratterizzata la struttura (3).

La funzione del gene SMN

Il gene SMN codifica per una proteina di 38 kD che si localizza nel citoplasma e nel nucleo di tutte le cellule dell'organismo, ovvero è ubiquitaria. Una particolare isoforma breve che comprende solo la regione ammino-terminale è stata individuata solamente negli assoni dei neuroni (4) ma si ritiene che essa non abbia un ruolo nella SMA dato che esistono dei pazienti SMA con una mutazione che non dovrebbe alterare la presenza di questa isoforma di SMN breve (3).

Il ruolo, per lo meno il più importante, della proteina SMN è quello di contribuire al corretto svolgimento dei fenomeni di splicing dell'RNA (5). Lo splicing è un fenomeno molto importante per l'espressione dei geni. Il DNA genomico dei cromosomi umani contiene numerosi geni che codificano per le proteine dell'organismo. Le proteine sono i mattoni (per lo meno alcuni mattoni) che vanno a costituire le cellule, i tessuti e gli organi. Il passaggio tra DNA genomico presente nei cromosomi e la proteina non è diretto ma avviene tramite una molecola intermedia, l'RNA. L'RNA viene prima copiato dallo stampo di DNA e poi successivamente tagliato e riaccoppiato per eliminare delle porzioni, gli introni, che normalmente non codificano per proteine. Questo fenomeno detto di splicing necessita di un complesso macchinario proteico e ribonucleico di cui la proteina SMN fa parte.

La proteina SMN è coinvolta nei fenomeni di splicing di un'innumerabile quantità di geni. La sua mancanza non è compatibile con la vita. Nell'uomo esistono due geni SMN, uno telomerico SMN1 ed uno centromerico SMN2 derivante da una duplicazione nelle recenti fasi evolutive. Essi differiscono per soli 5 nucleotidi di cui solo 1 nella regione codificante la proteina ma che comunque non cambia la sequenza amminoacidica (6). La delezione di SMN1 può, nell'uomo, essere parzialmente compensata dalla presenza più o meno ripetuta del gene SMN2. Una delle poche differenze di questi due geni è una transizione C-T nell'esone 7 che ne determina uno splicing alternativo che porta all'eliminazione dello stesso esone e alla formazione di una proteina tronca non funzionale ed instabile (7, 8). Solo il 10% del gene SMN2 subisce uno splicing corretto che porta alla formazione di una proteina funzionale; la quantità del prodotto proteico SMN, in pazienti in cui il gene SMN1 è perduto, può variare dal 10 al 50% e ciò rende conto della gravità della malattia (9, 10). La correlazione tra il numero di copie del gene SMN2 e la gravità della malattia è ancora controversa dato che esistono lavori a favore (11, 12) e contrari (10) a tale ipotesi, quindi molti autori non raccomandano di fare previsioni sulla gravità della patologia in base al numero di copie di SMN2 (13).

Proteina ubiquitaria ma con effetti prettamente neurali?

Allo stato attuale si possono proporre due ipotesi per spiegare i meccanismi della SMA. La prima suggerisce che l'alterazione dei livelli delle proteine che formano lo spliceosoma snRNPs, indotta dalla riduzione di SMN, vada ad alterare lo splicing di geni importanti per i circuiti motoneurali. La seconda ipotesi è che SMN abbia una peculiare funzione negli assoni che viene inficiata nei pazienti SMA (1).

Come abbiamo accennato inizialmente la proteina SMN è localizzata nel nucleo e nel citoplasma di tutte le cellule dell'organismo. C'è quindi da capire come mai gli effetti della riduzione dei suoi livelli siano prettamente a carico del sistema nervoso centrale e dei motoneuroni prossimali in particolare.

Dopo un'iniziale ipotesi che la patologia correlasse con la dimensione della delezione del gene SMN1 i vari ricercatori hanno incominciato a considerare, come avevamo precedentemente accennato, che gli effetti del gene SMN2 potessero essere molto importanti per la gravità della malattia. Rimane ancora da chiarire come un gene ubiquitario possa avere effetti prettamente a livello di un unico tessuto, quello nervoso.

Abbiamo già appurato come la SMA sia una patologia a carico del metabolismo dell'RNA, una molecola molto importante per la regolazione dell'espressione genica, e come SMN sia un componente importante sia dello spliceosoma maggiore che di quello minore, ma la sua assenza sembra influenzare di più lo spliceosoma minore (14).

In modelli animali di SMA (zebrafish) è stato dimostrato che la somministrazione di complessi snRPs (di cui fa parte la proteina SMN) potevano indurre il recupero del fenotipo normale nel pesce, e questo risultato fortemente sostiene l'ipotesi che SMN sia coinvolta nella formazione dei vari complessi che sottendono allo splicing (15). Sorprendentemente però è stato osservato che la quantità totale di complessi snRNPs non cambia nelle cellule con la delezione di *Smn1* e ciò indica che la capacità delle cellule di mantenere la normale quantità di snRNPs eccede di parecchio la quantità limitante della molecola SMN (14, 16). Quando però i livelli di SMN sono particolarmente bassi si può determinare un effetto sulle quantità di snRNPs che però non sono egualmente alterati in differenti tessuti (16). Questo può determinare una diversa (patologica) regolazione dello splicing in tessuti differenti rispetto agli organismi sani (5).

La seconda ipotesi, sostenuta anch'essa da alcuni lavori, asserisce invece che le anomalie riscontrate in zebrafish con ridotti livelli di *Smn*, ovvero coni di crescita brevi e di piccole dimensioni, sia spiegabile anche in cellule di mammifero con una forte riduzione dei livelli di trasporto del messaggero per la β -actina e conseguentemente della relativa proteina (17).

I topi SMA infatti sviluppano delle anomalie proprio a livello della giunzione neuromuscolare (NMJ) (18) che sembrano correlare con un'alterata distribuzione del canale al calcio Cav2.2 che potrebbe influenzare i fenomeni di integrazione sinaptica ed il rilascio del neurotrasmettitore a livello della NMJ (19). Comunque numerosi aspetti devono essere ancora chiariti poiché le alterazioni dei canali Ca^{2+} nell'assone distale non possono completamente spiegare ciò che accade nei topi SMA.

Diagnosi di Atrofia Muscolare Spinale

La conduzione nervosa e l'elettromiografia sono degli strumenti indispensabili per confermare il sospetto di deficit neurogenico in pazienti con possibile SMA. La conduzione dei motoneuroni può risultare ridotta e l'elettromiografia può mostrare un incremento delle dimensioni delle unità consistente con una denervazione. La biopsia muscolare non è più necessaria nei pazienti SMA (20). Da un punto di vista di screening genetico va detto che il 95% dei pazienti SMA mancano dell'esone 7. L'approccio standard consiste nel separare i due geni utilizzando tecniche di PCR (reazione della catena polimerasica), tramite la quale si rileva la delezione del gene SMN1. La specificità è del 99% e la sensibilità diagnostica è del 95%. Il 5% dei pazienti non presenta delezioni ma inserzioni, mutazioni puntiformi e piccole delezioni di 2 basi che in generale determinano una non corretta struttura tridimensionale della proteina (21).

I genitori di pazienti SMA sono quasi sempre portatori sani, ed in quanto tali, il loro rischio di avere altri figli affetti è del 25% per ogni nuova gravidanza. Le nuove mutazioni sul gene SMN1 sono rare e rappresentano meno del 2% del totale. Se l'analisi genetica conferma la diagnosi clinica di SMA, il monitoraggio con alta affidabilità delle successive gravidanze è possibile mediante analisi dei villi coriali durante le fasi iniziali della gravidanza (undicesima settimana di gestazione) e su di esso si può effettuare una diagnosi, ricercando la delezione di SMN1 nel DNA estratto dal villo.

A cura di:
Daniele Bottai
Università degli studi di Milano
Professore aggregato
Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria
Ospedale San Paolo via A. di Rudini 20142
Milano, Italia
Tel 0039-02-503 23286
Fax 0039-02-503 23033
E-mail: daniele.bottai@unimi.it

Referenze

1. Burghes AH, Beattie CE. (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 10: 597-609.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19584893
2. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7813012
3. Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, et al. (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32: 479-482.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8838816
4. Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G. (2007) Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1959-1964.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17261814
5. Chari A, Paknia E, Fischer U. (2009) The role of RNP biogenesis in spinal muscular atrophy. *Curr Opin Cell Biol* 21: 387-393.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19286363
6. Murray LM, Talbot K, Gillingwater TH. (2010) Review: neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36: 133-156.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20202121
7. Lorson CL, Androphy EJ. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9: 259-265.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607836
8. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6307-6311.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10339583
9. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 16: 265-269.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207792
10. Gavrillov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH. (1998) Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet* 20: 230-231.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9806538

11. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70: 358-368.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11791208
12. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, et al. (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9: 333-339.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655541
13. Lunn MR, Wang CH. (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371: 2120-2133.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18572081
14. Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L. (2007) Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2: e921.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17895963
15. Winkler C, Eggert C, Gradl D, et al. (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* 19: 2320-2330.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204184
16. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, et al. (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133: 585-600.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18485868
17. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, et al. (2003) *Smn*, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163: 801-812.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14623865
18. Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, et al. (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17: 2552-2569.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18492800
19. Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M. (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179: 139-149.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17923533
20. Wee CD, Kong L, Sumner CJ. (2010) The genetics of spinal muscular atrophies. *Curr Opin Neurol* 23: 450-458.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20733483
21. Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, et al. (2007) Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions. *J Child Neurol* 22: 926-945.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17761647