

Le “malattie da triplette”

Trinucleotide repeat disorders are a set of **genetic disorders** caused by **trinucleotide repeat expansion**, a kind of mutation where trinucleotide repeats in certain genes exceeding the normal, stable, threshold, which differs per gene. The mutation is a subset of **unstable microsatellite repeats** that occur throughout all genomic sequences. If the repeat is present in a healthy gene, a dynamic mutation may increase the repeat count and result in a defective gene.

Le “malattie da triplette”

Polyglutamine (PolyQ) Diseases (CAG)

Non-Polyglutamine Diseases (CGG, GCC, GAA, CTG)

Trinucleotide Repeats in Human Genetic Disease

Disease	Possible Biological Effect of Expansion
Fragile XA (FRAXA)	Repeat tract 5' to coding region; promoter methylation, gene silencing?
Fragile XE (FRAXE)	Promoter methylation, gene silencing?
Fragile XF (FRAXF)	Promoter methylation, gene silencing?
FRA 16A	Promoter methylation, gene silencing?
Jacobsen Syndrome (FRA11B)	Promoter methylation, gene silencing?
Friedreich ataxia (FRDA)	Repeat tract in an intron; altered mRNA production?
Myotonic Dystrophy (DM)	Repeat tract 3' to coding region; altered mRNA processing?
Spinocerebellar ataxia 8 (SCA8)	Repeat tract 5' to coding region; abnormal antisense regulation?
Kennedy disease (SBMA)	Polyglutamine expansion; gain of function
Huntington disease (HD)	Polyglutamine expansion; gain of function
Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1)	Polyglutamine expansion; gain of function
Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)	Polyglutamine expansion; gain of function
Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)	Polyglutamine expansion; gain of function
Spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)	Polyglutamine expansion; gain of function? loss of function?
Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7)	Polyglutamine expansion; gain of function
How River syndrome (DRPLA)	Polyglutamine expansion; gain of function

Tutti i microsatelliti hanno frequenze di mutazione per cambiamento di lunghezza molto alti (mutazioni dinamiche; $\sim 10^{-4}$) se paragonati alla frequenza delle mutazioni classiche ($\sim 10^{-8}$).

Alcuni microsatelliti sono più prone a espansione. Per esempio i microsatelliti formati da triplette del tipo:

CGG	CCG
CTG	CAG
GAA	TTC

perchè tendono a formare strutture molecolari a hairpin (forcina) o tetraplex o triplex

Trinucleotide Repeats in Human Genetic Disease

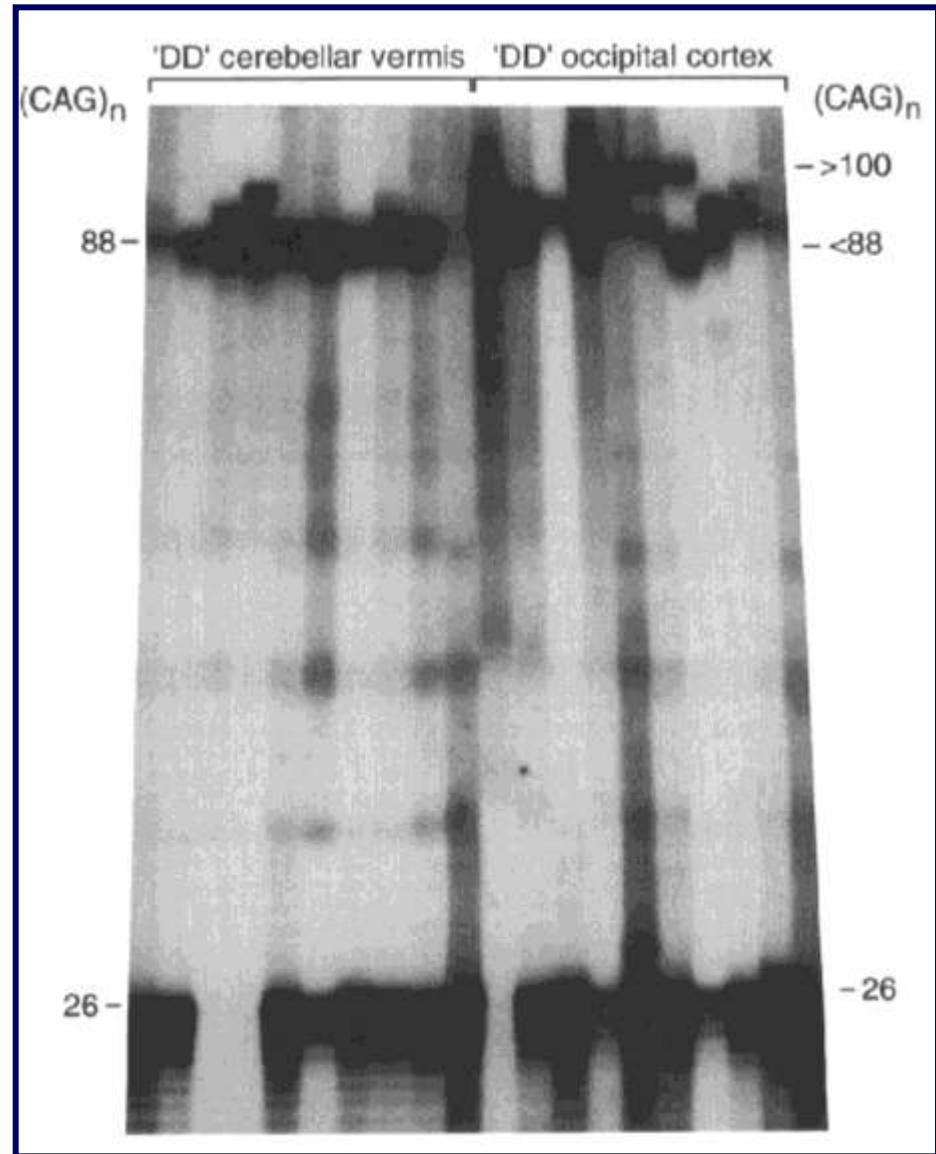
Disease	Repeat
Fragile XA (FRAXA)	(CGG) _n
Fragile XE (FRAXE)	(CCG) _n
Fragile XF (FRAXF)	(CGG) _n
FRA 16A	(CCG) _n
Jacobsen Syndrome (FRA11B)	(CGG) _n
Friedreich ataxia (FRDA)	(GAA) _n
Myotonic Dystrophy (DM)	(CTG) _n
Spinocerebellar ataxia 8 (SCA8)	(CTG) _n
Kennedy disease (SBMA)	(CAG) _n
Huntington disease (HD)	(CAG) _n
Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1)	(CAG) _n
Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)	(CAG) _n
Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)	(CAG) _n
Spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)	(CAG) _n
Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7)	(CAG) _n
How River syndrome (DRPLA)	(CAG) _n

Caratteristiche comuni delle malattie da mutazioni dinamiche

- Il tratto ripetuto presenta **instabilità** sia meiotica che mitotica
- Il tratto ripetuto è di solito polimorfico
- L'esordio e/o la gravità della malattia è correlata con la lunghezza dell'allele espanso
- Nelle malattie a esordio tardivo si osserva il fenomeno dell'anticipazione

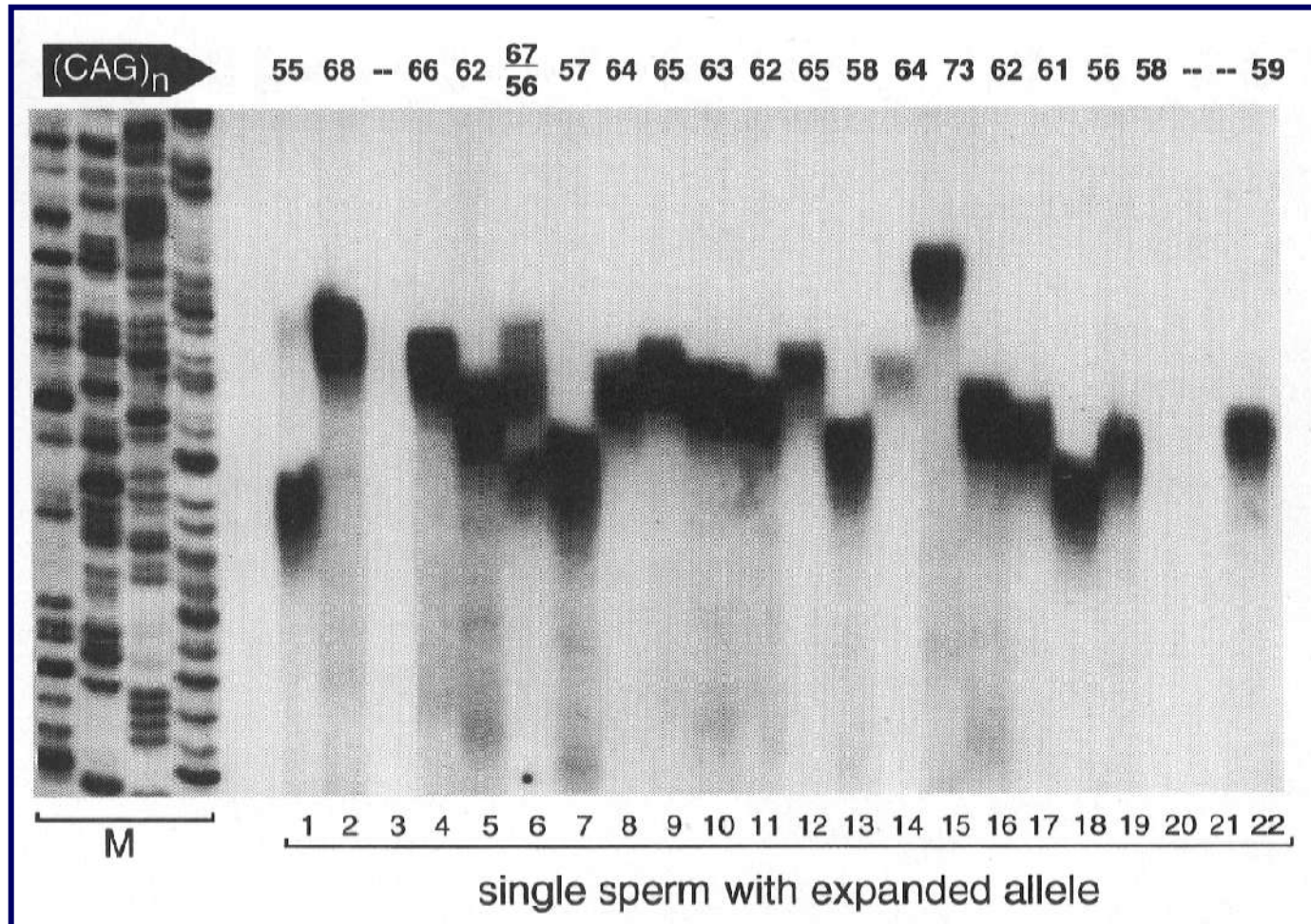
Instabilità mitotica

Single cell PCR



From Chong et al. (1995) Nature Genetics 10, 344-350.

Instabilità meiotica



From Chong et al. (1995) Nature Genetics 10, 344-350.

Caratteristiche comuni delle malattie da mutazioni dinamiche

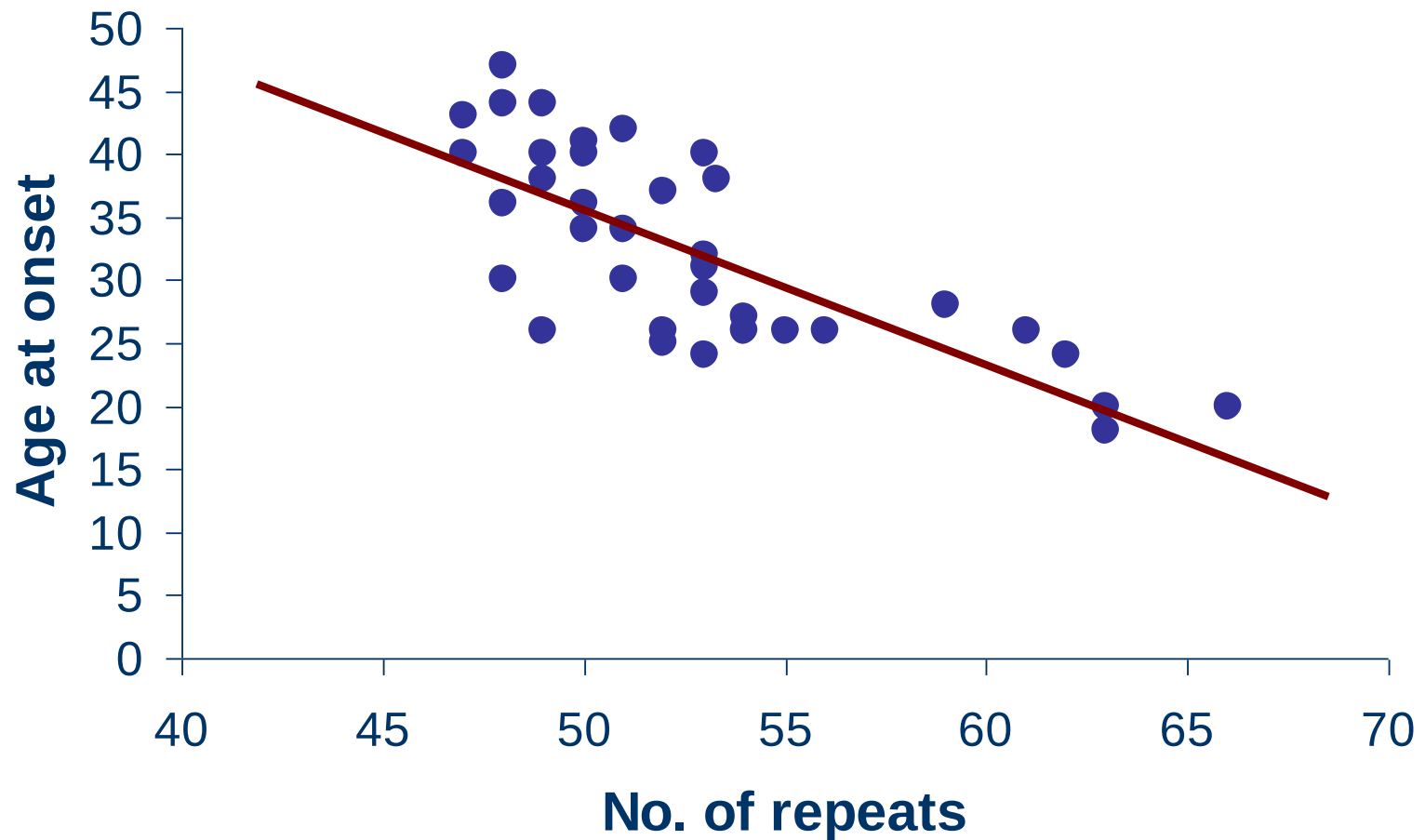
- Il tratto ripetuto presenta **instabilità** sia meiotica che mitotica
- Il tratto ripetuto è di solito **polimorfico**
- L'esordio e/o la gravità della malattia è correlata con la lunghezza dell'allele espanso
- Nelle malattie a esordio tardivo si osserva il fenomeno dell'anticipazione

Disease	Repeat	Normal length	Full disease length
Fragile XA (FRAXA)	(CGG) _n	6-52	230-2,000
Fragile XE (FRAXE)	(CCG) _n	4-39	200-900
Fragile XF (FRAXF)	(CGG) _n	7-40	306-1,008
FRA 16A	(CCG) _n	16-49	1,000-1900
Jacobsen Syndrome (FRA11B)	(CGG) _n	11	100-1,000
Friedreich ataxia (FRDA)	(GAA) _n	6-29	200-900
Myotonic Dystrophy (DM)	(CTG) _n	5-37	80-1,000
Spinocerebellar ataxia 8 (SCA8)	(CTG) _n	16-91	107-127
Kennedy disease (SBMA)	(CAG) _n	14-32	40-55
Huntington disease (HD)	(CAG) _n	10-34	40-121
Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1)	(CAG) _n	6-39	40-81
Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2)	(CAG) _n	14-31	34-59
Spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)	(CAG) _n	13-44	60-84
Spinocerebellar ataxia 6 (SCA6)	(CAG) _n	4-18	21-28
Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7)	(CAG) _n	7-17	38-130
How River syndrome (DRPLA)	(CAG) _n	7-25	49-75

Caratteristiche comuni delle malattie da mutazioni dinamiche

- Il tratto ripetuto presenta **instabilità** sia meiotica che mitotica
- Il tratto ripetuto è di solito **polimorfico**
- L'esordio e/o la gravità della malattia sono correlate con la **lunghezza** dell'allele espanso
- Nelle malattie a esordio tardivo si osserva il fenomeno dell'anticipazione

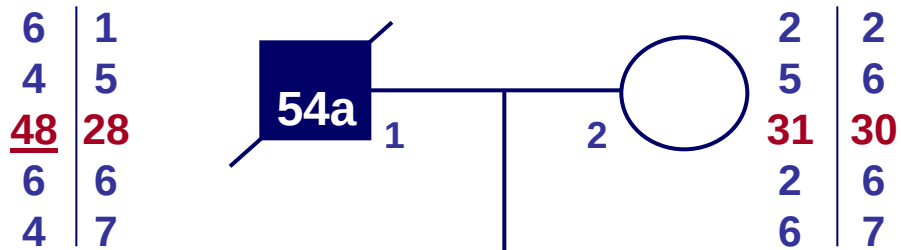
Age at onset of SCA1 vs repeat number of expanded chromosome



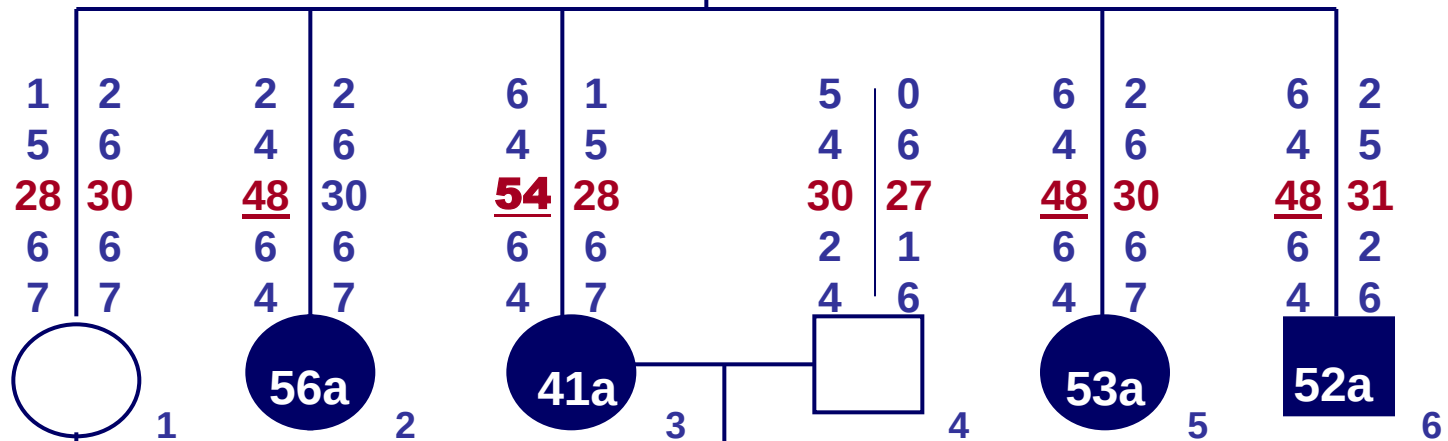
Caratteristiche comuni delle malattie da mutazioni dinamiche

- Il tratto ripetuto presenta **instabilità** sia meiotica che mitotica
- Il tratto ripetuto è di solito **polimorfico**
- L'esordio e/o la gravità della malattia è correlata con la **lunghezza** dell'allele espanso
- Nelle malattie a esordio tardivo si osserva il fenomeno dell'**anticipazione**

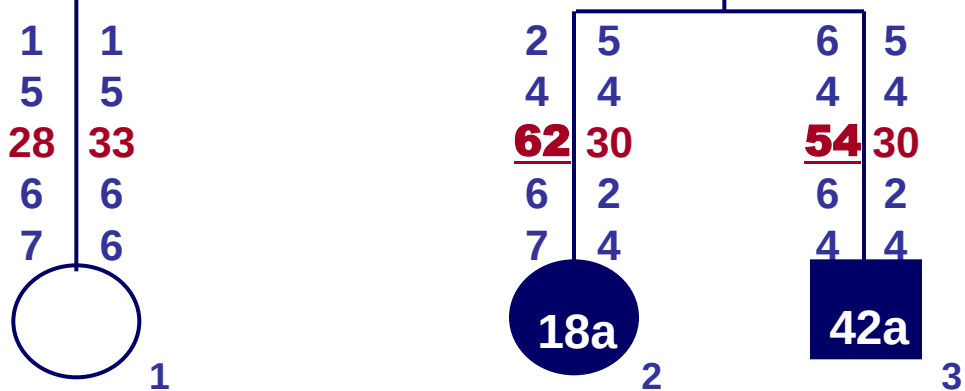
I



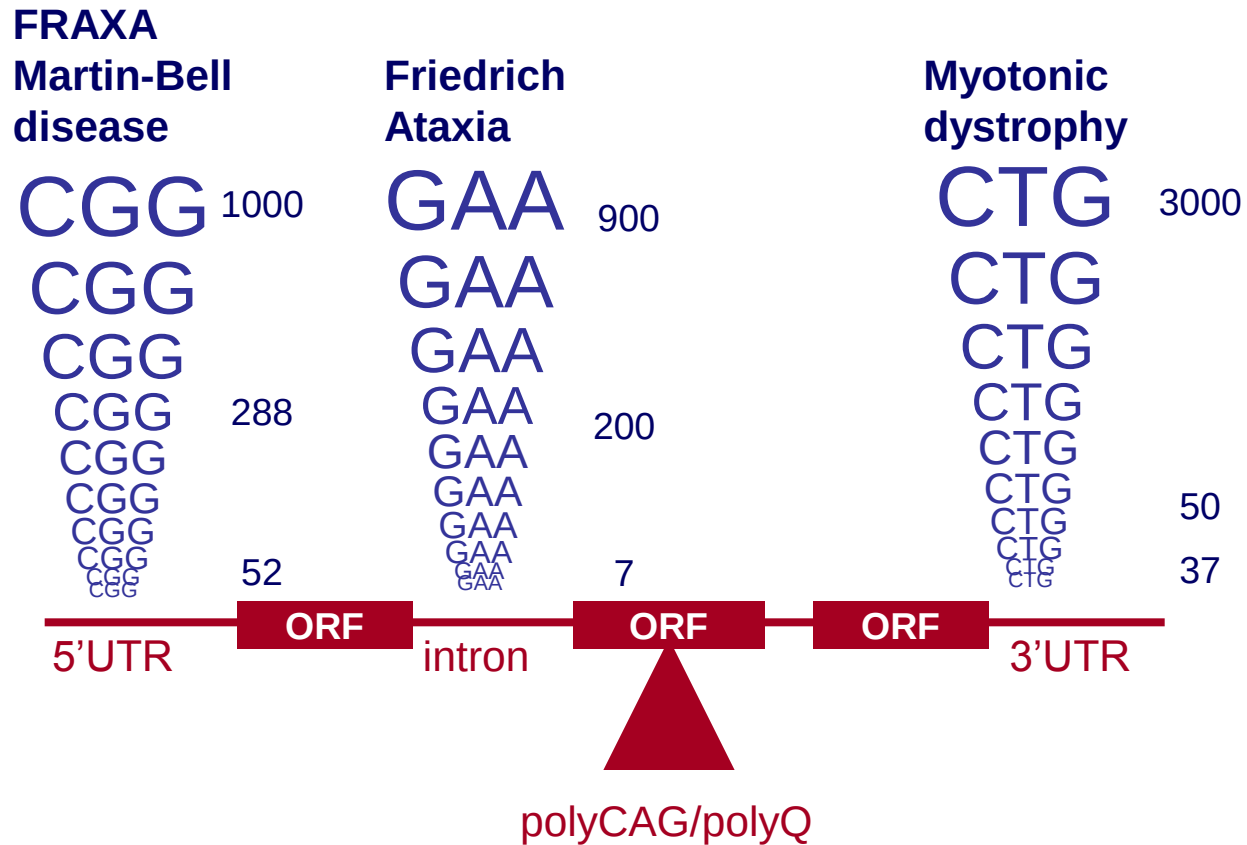
II



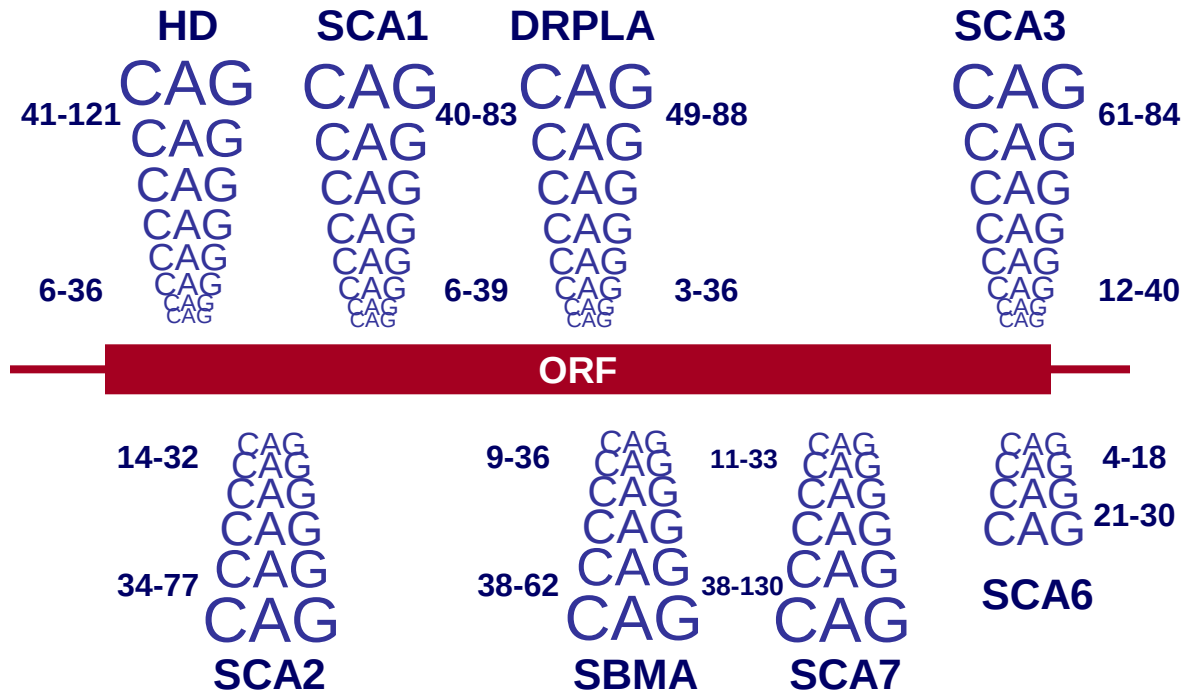
III



Trinucleotide Repeats Genomic Localization



Non-PolyQ diseases : introns

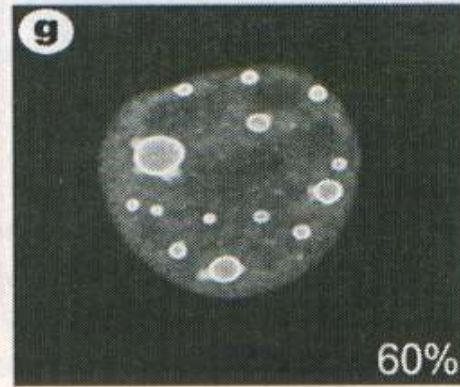
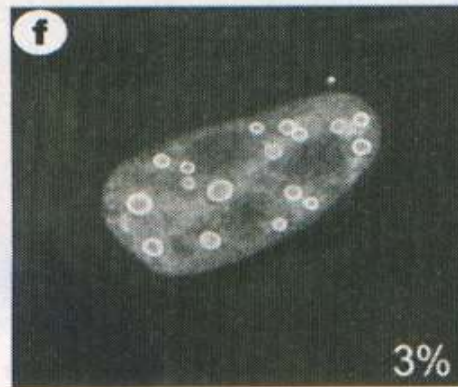
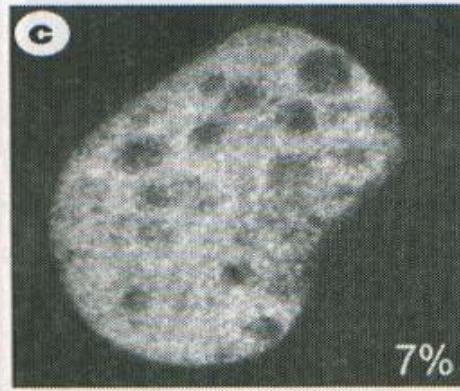
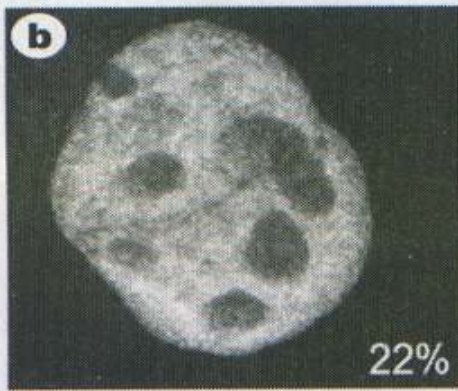


PolyQ diseases : exons

In tutte le malattie PolyQ, ad eccezione della SCA6, sono stati trovati **aggregati nucleari e/o citoplasmatici** formati dalla proteina (intera o parziale) contenente il tratto polyQ, ubiquitine e altre proteine coinvolte con il proteosoma.

ataxin-1[30]

ataxin-1[82]



Diversa frequenza :
mut >> wt

Immunofluorescence of ataxin-1 in transfected COS-1 cells **b**, **d**, **f**, the subcellular localization of wild type ataxin-1[30]; **c**, **e**, **g**, the localization of mutant ataxin-1[82]. The percent of transfected cells with each depicted pattern is indicated. Images were generated by projecting a series of confocal Z scans that spanned the nucleus.

Ma gli aggregati, o inclusioni nucleari (NI) sono responsabili della malattia?

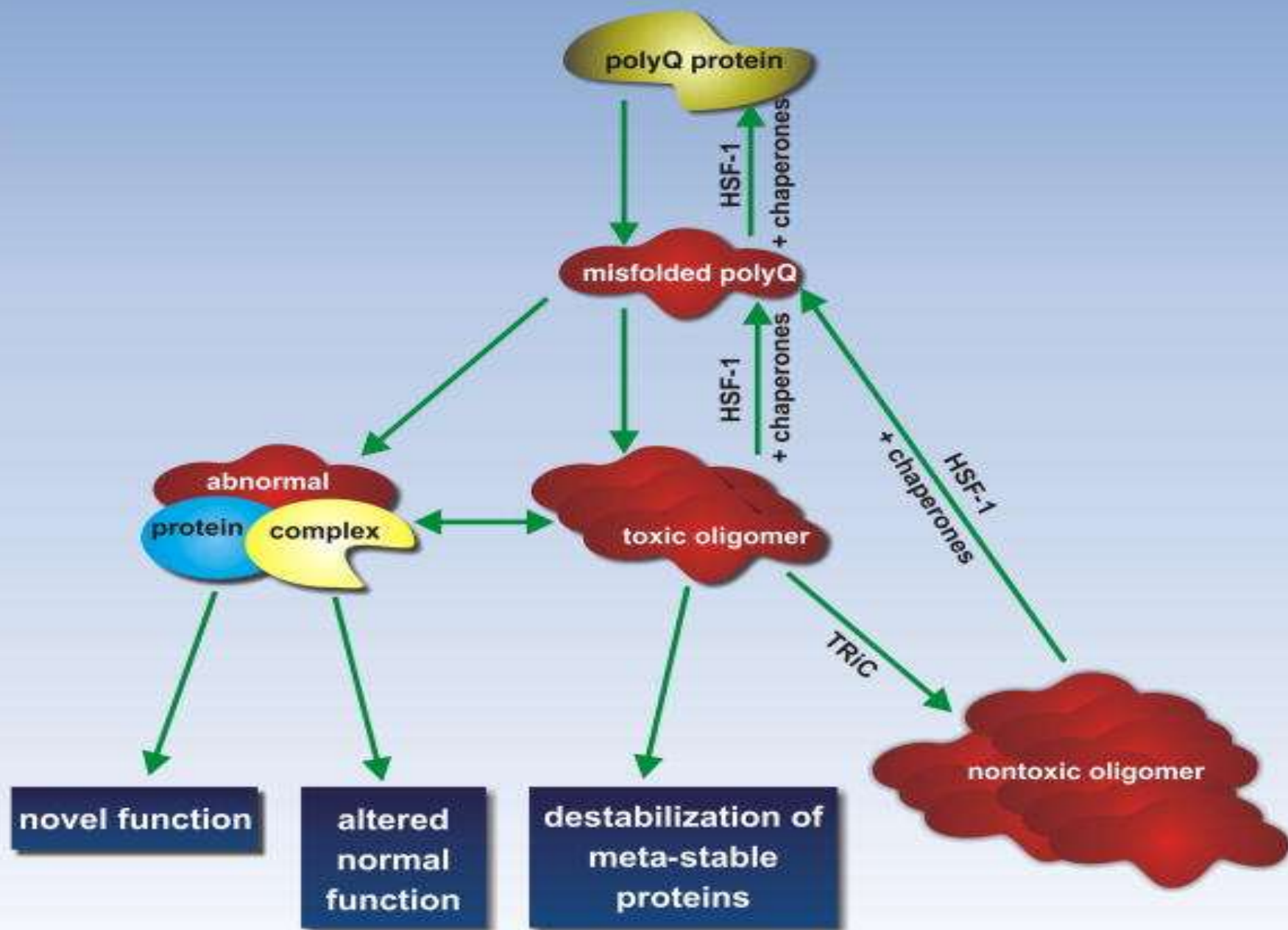
Esperimenti sui topi transgenici

- Topi transgenizzati con un gene SCA1 espanso e con il Nuclear Localization Signal mutato **non** mostrano inclusioni nucleari e **non** si ammalano

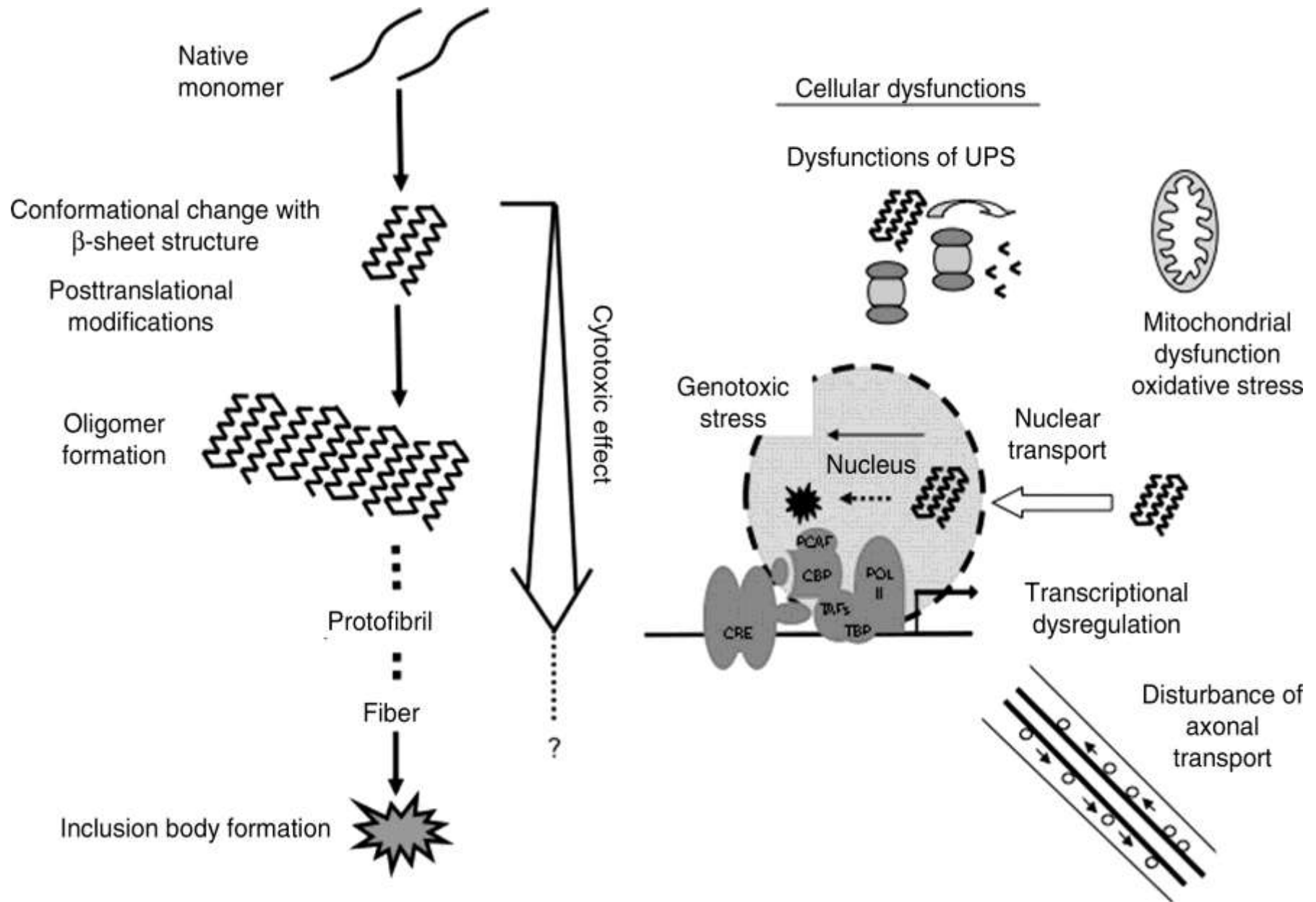
Il peptide atassina1-polyQexp è tossico nel nucleo

- Topi transgenizzati con un gene SCA1 espanso in cui è stato deletato il sito di aggregazione della proteina **non** mostrano inclusioni nucleari e si ammalano.

La molecola tossica è presumibilmente l'oligomero



Molecular mechanisms of polyQ diseases.



LA MALATTIA DI HUNTINGTON

(Còrea di Huntington)



George Huntington

13 aprile 1872, *Medical and Surgical Reporter of Philadelphia*. Huntington descrisse le caratteristiche di una malattia degenerativa del sistema nervoso che chiamò "còrea ereditaria", delineandone tre aspetti peculiari:

1. La **natura ereditaria**, che a differenza di altri disturbi genetici si manifesta (se trasmessa) in ogni generazione e non prevede portatori sani del disturbo tra una generazione e l'altra.
2. La tendenza alla **follia** e all'infermità mentale, che conduce spesso in casi estremi al desiderio suicida.
3. La manifestazione dei sintomi in **età adulta**, solitamente dopo i quarant'anni d'età.

CLINICA

Esordio 40 - 50 anni, sintomi poco specifici (alterazioni della personalità, irrequietezza, stati depressivi)

Talvolta insorgenza precoce (20 anni - Malattia di Huntington giovanile)

Progressiva compromissione dei sistemi motori, con movimenti involontari rapidi della muscolatura facciale e degli arti

Andatura barcollante, torsioni del tronco

Fonazione modificata, voce monotona o a parola esplosiva

Compromissione precoce della motilità oculare

Apatia, irritabilità, turbe della memoria, idee deliranti a carattere persecutorio sino a stati demenziali conclamati

Durata media 15 - 25 anni

Decesso per cause intercorrenti (soprattutto complicanze polmonari, cardiache, cadute).

Molte delle malattie neurodegenerative presentano entrambe le classi di sintomi in qualche momento nel corso della progressione della malattia

Due tipi principali di sintomi clinici

✓ **DEMENZE:**

disordini cognitivi, associativi, caratteriali e di memoria

✓ **DISORDINI DEL MOVIMENTO:**

Ipercinesia, acinesia, paralisi

Le manifestazioni cliniche dipendono dai sistemi neuronali coinvolti nel corso della malattia

TERAPIA

Non esistono terapie in grado di arrestare il decorso della malattia

Terapie sintomatiche per discinesie (antagonisti della dopamina), rigidità (farmaci antiparkinsoniani).

EPIDEMIOLOGIA

Prevalenza di circa

3 - 7 casi per 100.000 (Europa occidentale)

1 per 1.000.000 (Asia)

Trasmissione ereditaria, autosomica dominante a penetranza completa

FATTORI DI RISCHIO EPIDEMIOLOGICI

- **Familiarità** – numero di ripetizioni della sequenza trinucleotidica CAG
- **Origine etnica**
- **Età**

Fenomeno della **anticipazione** : SI

CNS

Brain

Spinal cord

Prosencephalon

Brain stem

Telencephalon

Diencephalon

Mesencephalon

Rhinencephalon,
Amygdala,
Hippocampus,
Neocortex, **Basal**
ganglia, Lateral
ventricles

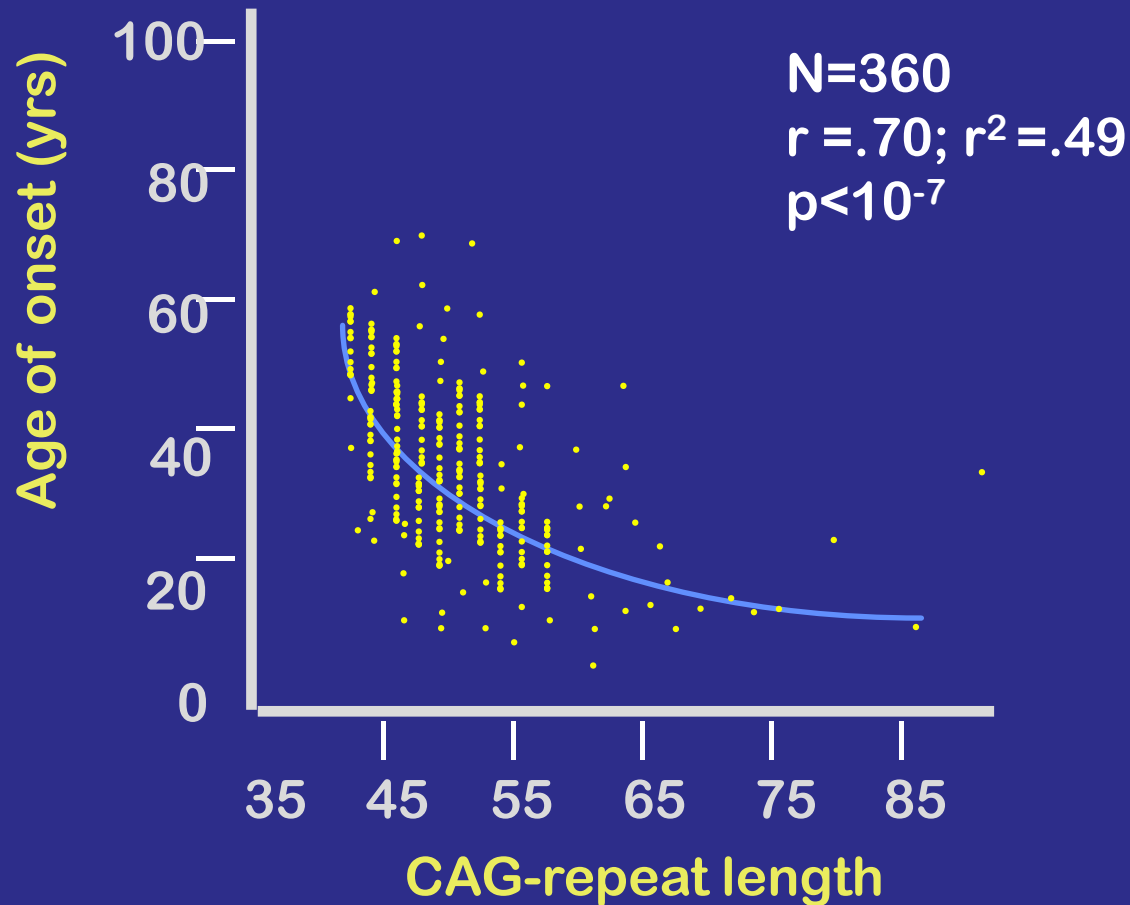
Epithalamus,
Thalamus,
Hypothalamus,
Subthalamus,
Pituitary gland,
Pineal gland,
Third ventricle

Tectum, Cerebral
peduncle, Pretectum,
Mesencephalic duct

Rhombencephalon

Metencephalon
Pons,
Cerebellum

Myelencephalon
Medulla
oblongata



Brain Volume loss in normal vs HD patients

0.24% year
Control

0.86% year
Pre HD

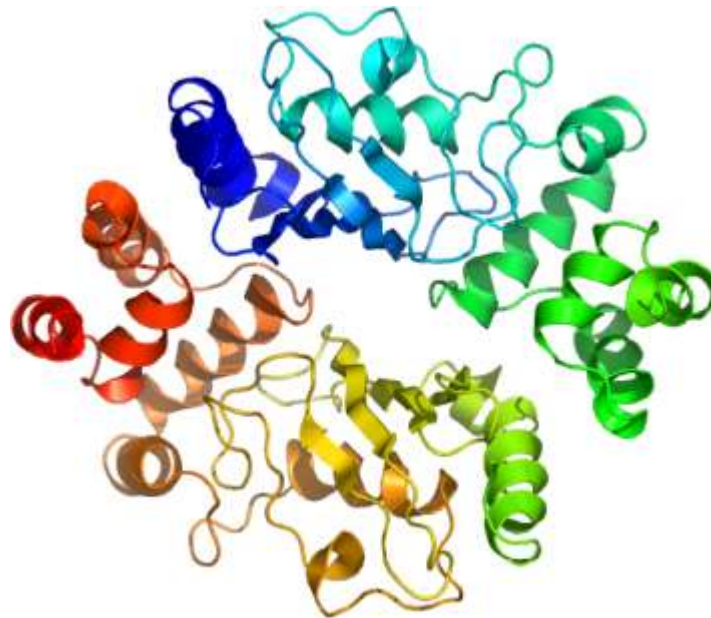
2.61 % year
Early HD

ISTOPATOLOGIA

1. Neurodegenerazione di regioni cerebrali specifiche

- **Sistema extrapiramidale, gangli della base** → depauperamento dei neuroni inibitori GABA-ergici → sintomi ipercinetici (*chorea* = danza)

2. Inclusioni intranucleari ed aggregazione proteica huntingtina



Hypothetical mechanism of aggregation

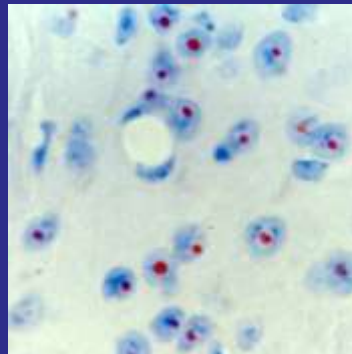
Polyglutamine expansion

enzyme-independent
mechanism

enzyme-dependent
mechanism

Polar-zippers formation

Transglutaminases:
Cross-linking activity



La proteina huntingtina (Htt)

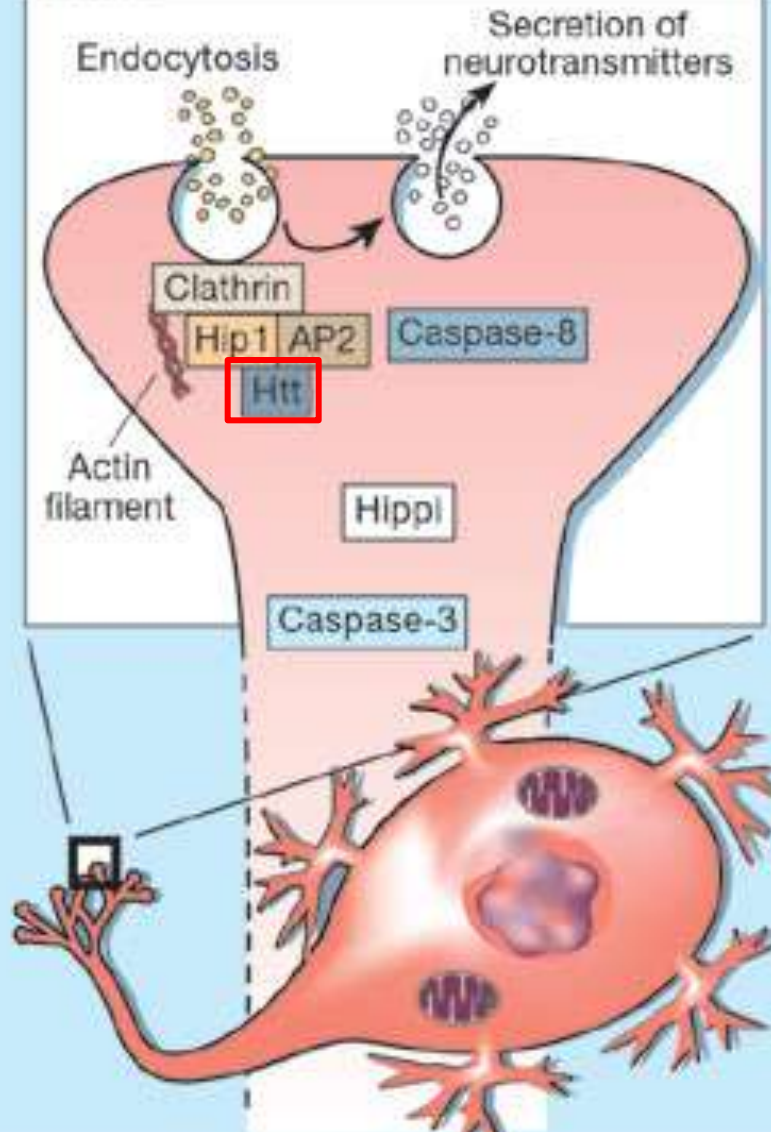
La proteina mutante tende ad accumularsi nel nucleo

Target proposti :

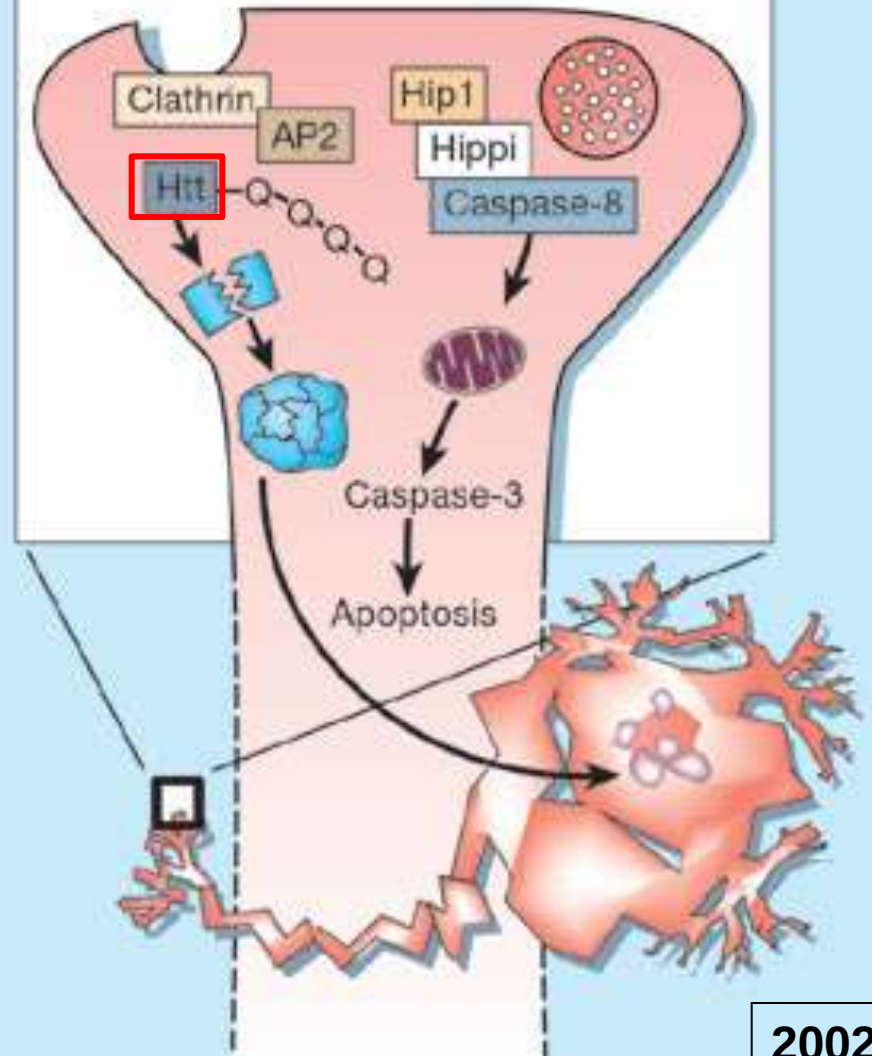
- Meccanismo di trasporto vescicolare assonico.
- Acceleratore del complesso della Dineina
- Influenza la distribuzione di BDNF (Brain Derived Neuronic Factor) : corteccia cerebrale → striatum tramite il trasporto assonico → accumulo di materiale proteico con conseguente morte cellulare.

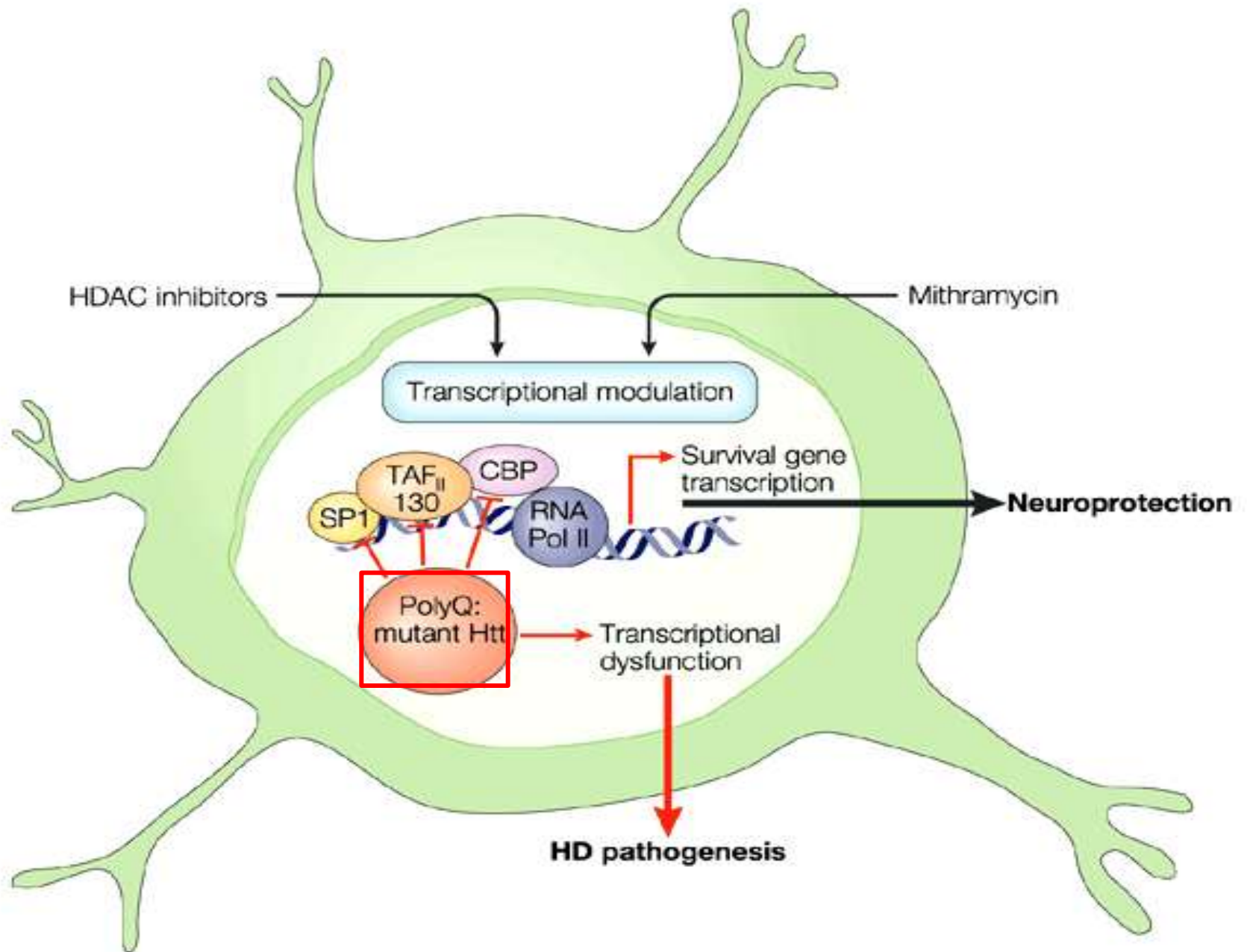
a

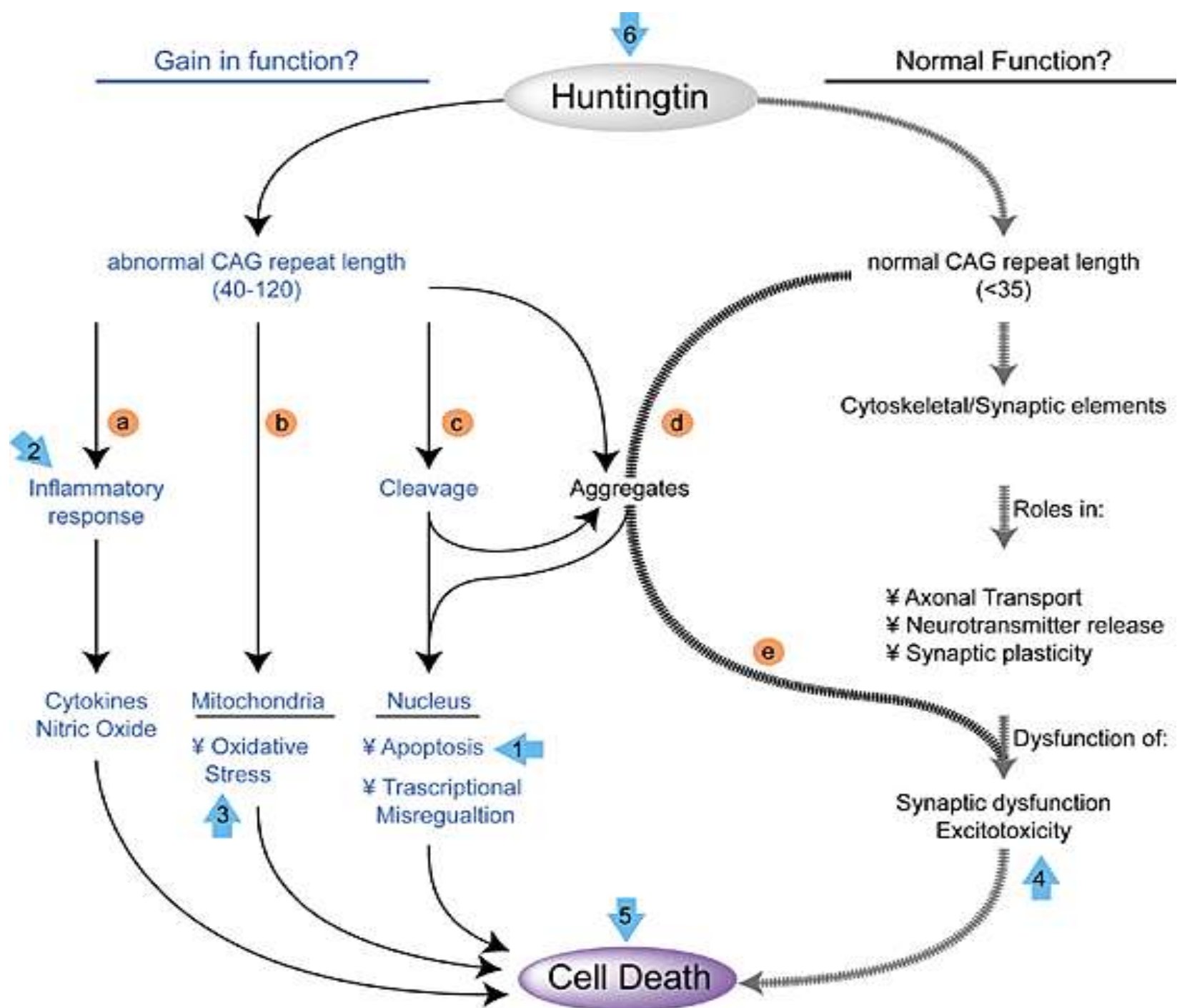
Normal

**b**

Huntington's disease







Sindrome dell'X fragile (1943)

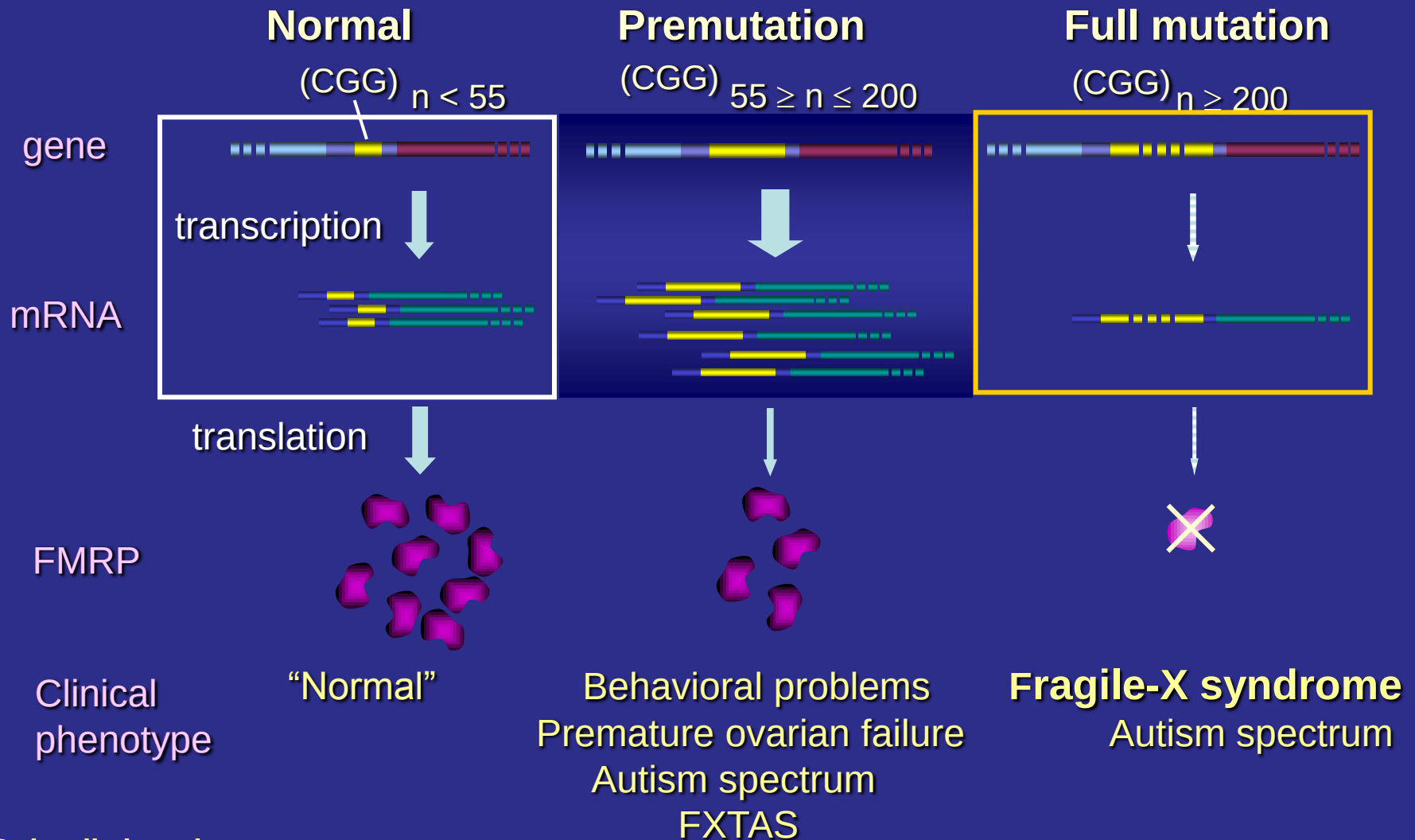
(non-PolyQ disease)

Causa : mutazione del gene FMR1 sul cromosoma X (1991)
Incidenza: 1 maschio su 4000 e 1 femmina su 6000

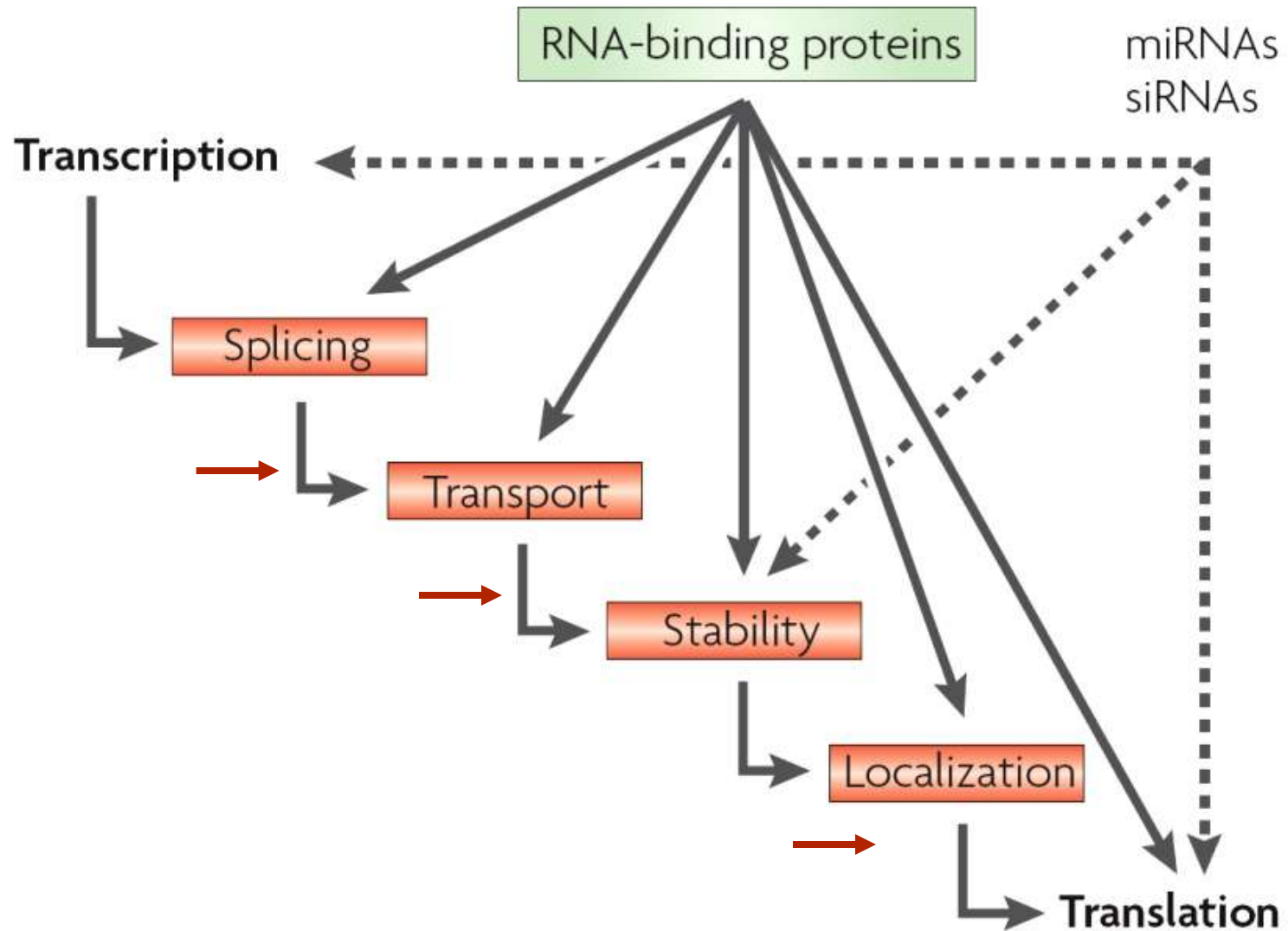
Ritardo nello sviluppo mentale (IQ medio 42)
Sindrome da deficit di attenzione e iperattività (80%)
Autismo (20-30%)
Ansia (70-100%)



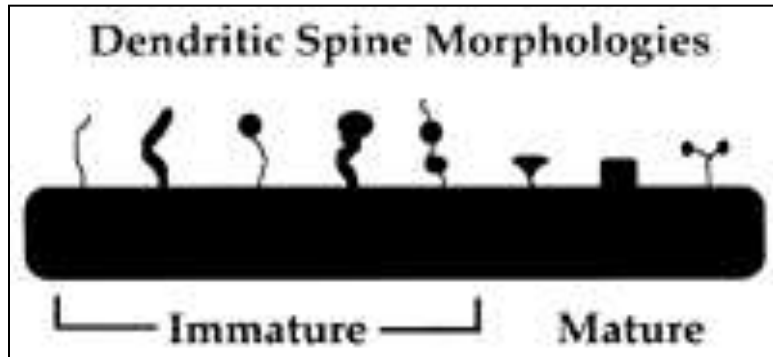
The Fragile-X Syndrome



FMRP E' UNA TIPICA *RNA BINDING PROTEIN*



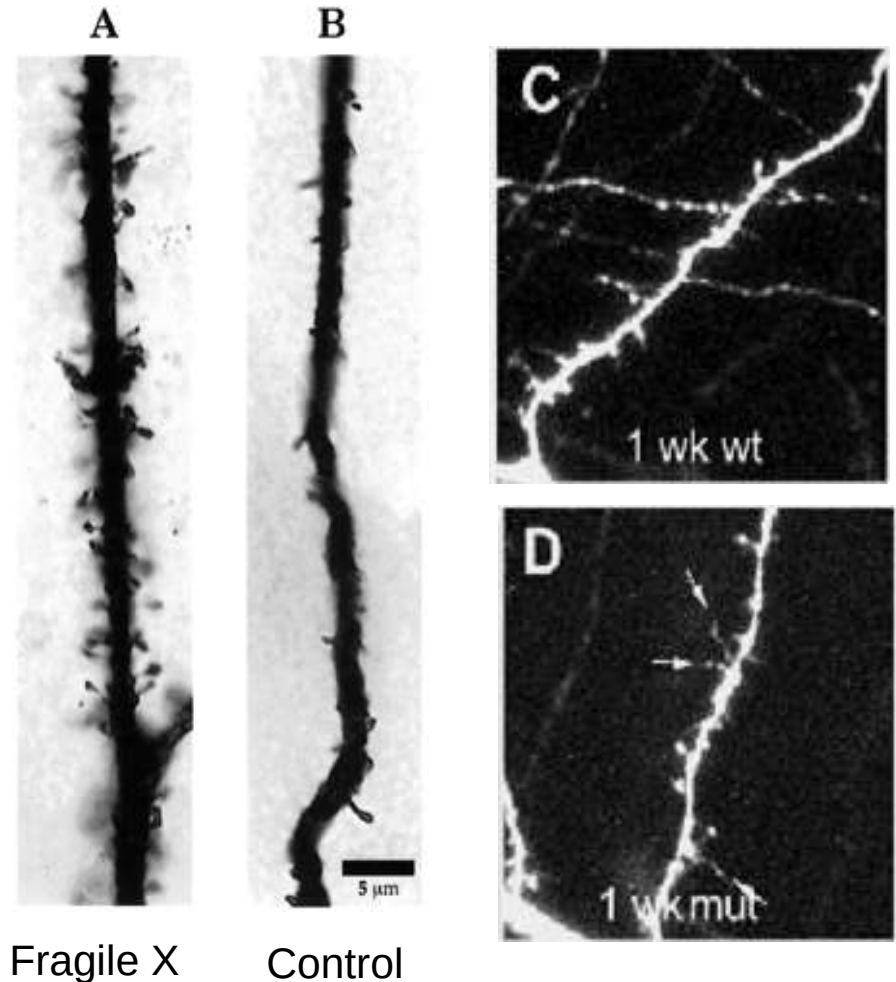
Dendritic Spine Dysgenesis and Mental Retardation



FMRP is believed to

1. regulate a substantial population of mRNA
2. play important roles in learning and memory, development of axons, formation of synapses, and the wiring and development of neural circuits

Mouse model for FXS



In conclusione....

