

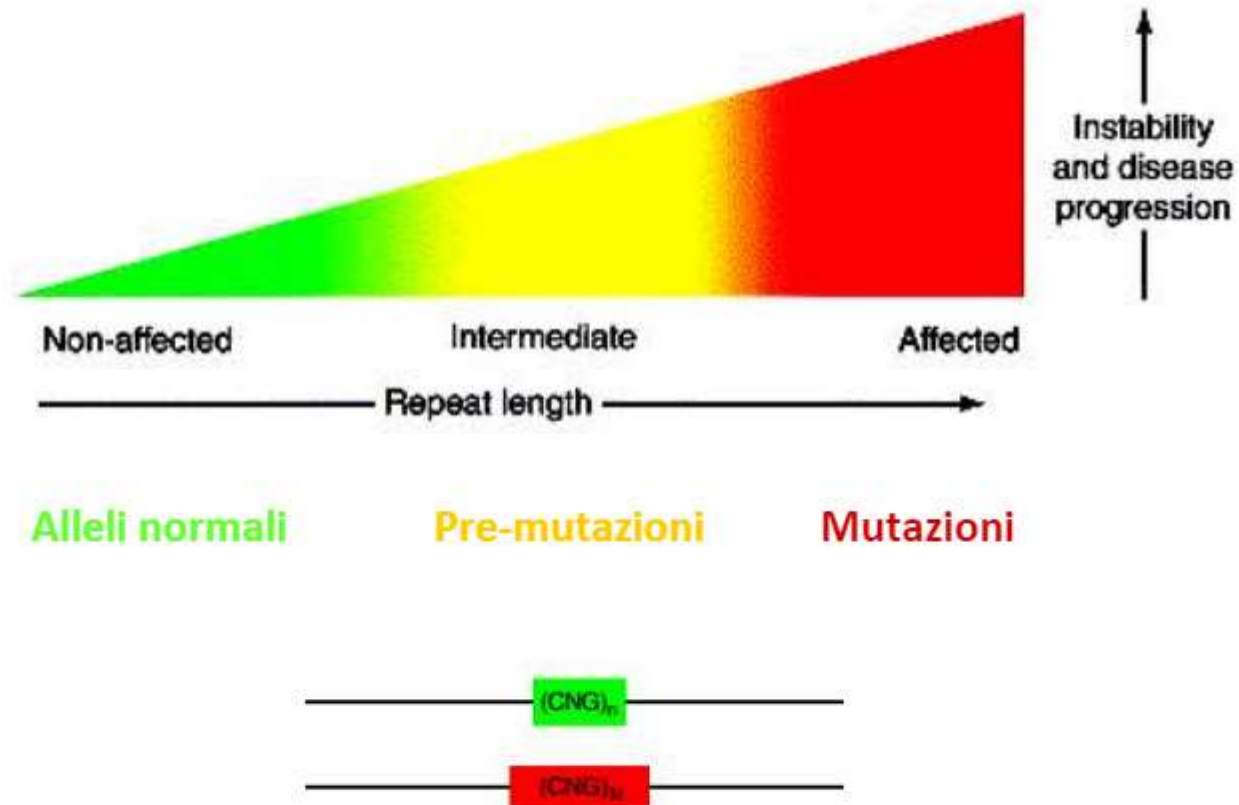
**Mutazioni dinamiche**

**e**

**Malattie da espansione di triplette  
o da ripetizioni instabili**

# Mutazioni dinamiche

mutazioni progressive, nei tessuti e nelle generazioni, di ripetizioni instabili



Le alterazioni fenotipiche (patologia) si manifestano al di là di un **valore soglia**

## Paradosso della genetica classica

secondo la quale una mutazione è un evento che modifica un gene introducendo un nuovo allele, per cui il gene in questione, se verrà trasmesso, sarà invariato, a meno di nuove mutazioni alleliche

- Con una media di uno ogni 2000 coppie di basi sono presenti i **microsatelliti (o STR, short tandem repeat)**, serie di nucleotidi ripetuti di lunghezza diversa nei diversi individui).
- Molti STRs (così come molti SNPs) non hanno effetto sulla funzionalità del genoma mentre altri incidono sull'espressione genica (regioni regolative) o sul prodotto proteico (regioni codificanti)

Sequenze ripetute di trinucleotidi sono presenti in tutto il genoma e sono generalmente stabili nelle generazioni.

Possono trovarsi in regioni regolative o codificanti di un gene e sono polimorfiche nella popolazione

Se numero di ripetizioni supera determinati valori la sequenza diventa altamente instabile determinando un aumento del numero delle ripetizioni nelle generazioni successive

L'espansione oltre una determinata soglia può influire sull'espressione genica, sulla stabilità del messaggero o sulla funzione della proteina, determinando sintomi clinici



## **Modelli di slippage (scivolamento) replicativo**

per spiegare l'origine delle  
amplificazioni o espansione  
delle sequenze ripetute

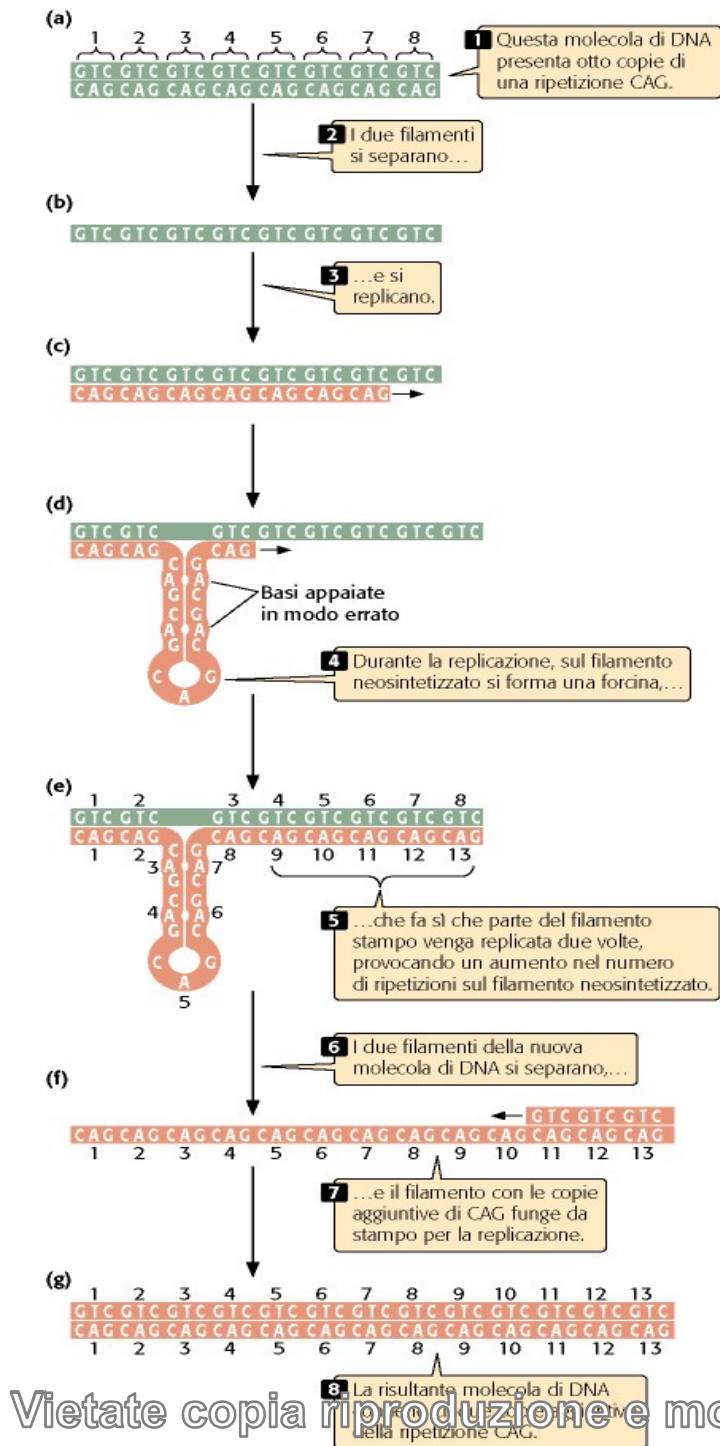
Allele normale:

CAG x 6-37 copie

Allele mutato:

CAG x 37-121 copie

Legami G-C intracatena, forti perché costituiti da tre ponti idrogeno



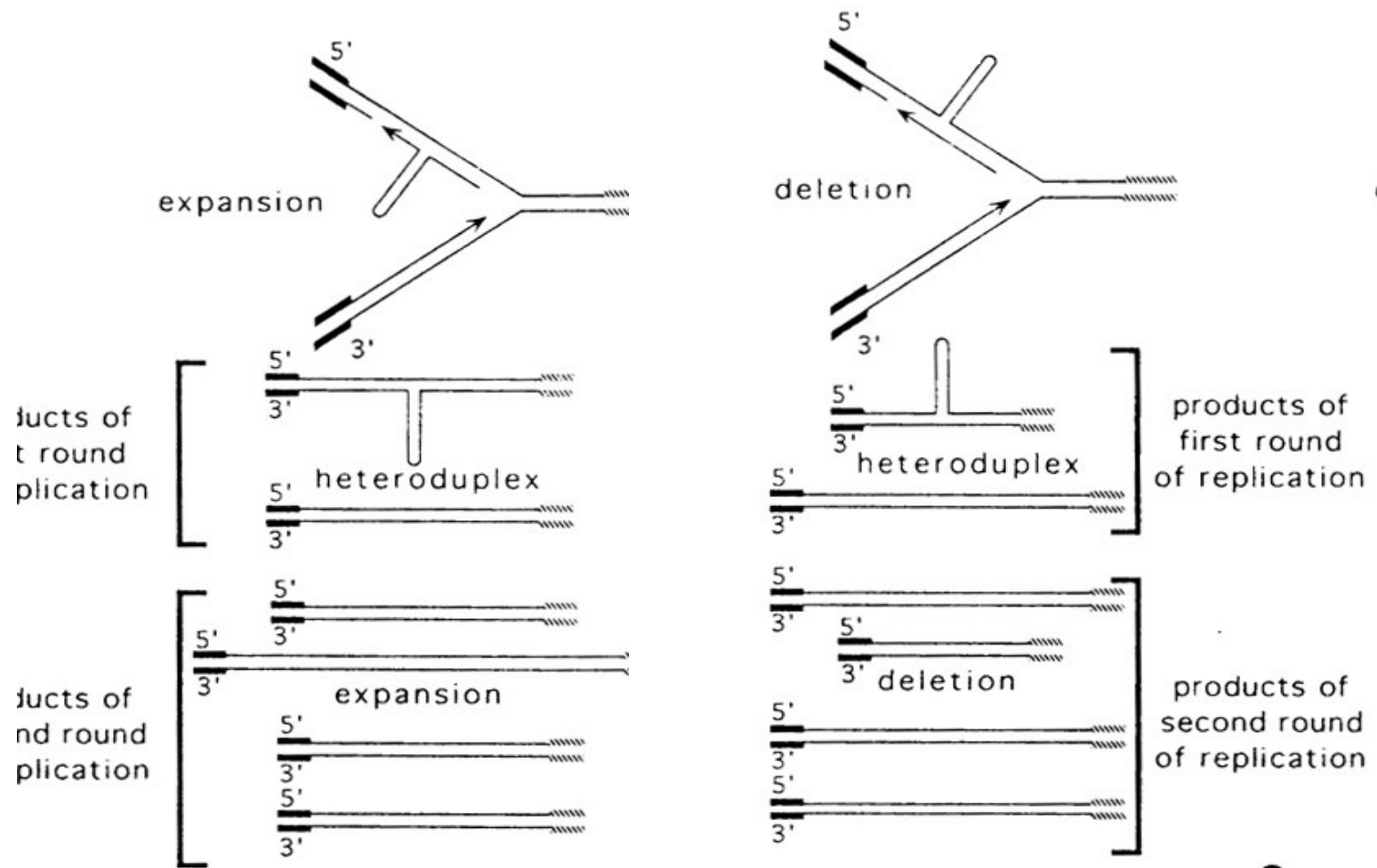
Vietata copia riproduzione e modifiche



Se il loop si forma **dopo** il passaggio della polimerasi si ha un **aumento di triplette**

**MA**

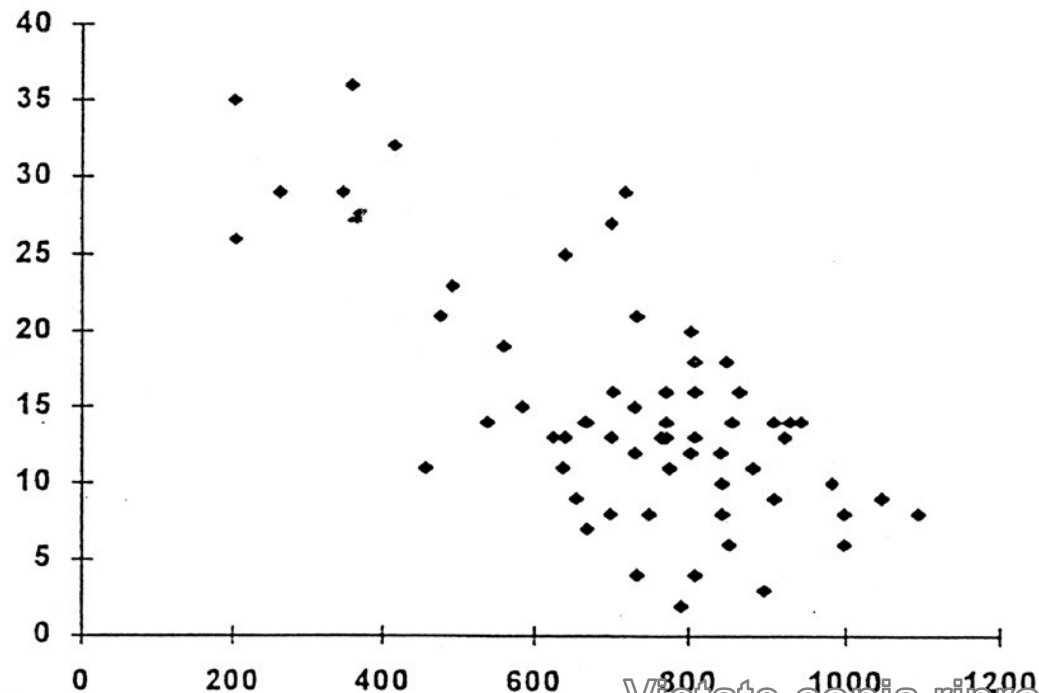
se il loop si forma **prima** del passaggio della polimerasi si ha una **delezione di triplette**



# ANTICIPAZIONE GENICA

## RELAZIONE TRA GRANDEZZA DELL'ESPANSIONE ED ESORDIO DELLA PATOLOGIA

Come conseguenza dell'instabilità introdotta dalla mutazione dinamica, che porterà all'espansione delle ripetizioni, la gravità e la precocità dei sintomi (direttamente proporzionali al numero di triplette) tendono ad aumentare nelle generazioni successive  
età



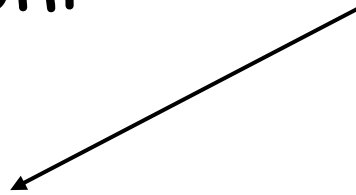
I loci coinvolti nella mutazione dinamica sono ad elevato polimorfismo ma il numero delle ripetizioni si mantiene entro un certo limite.

Per un **evento mutazionale iniziale** la sequenza si può espandere introducendo nella popolazione un nuovo allele non ancora patologico (perché l'alterazione non provoca ancora sintomi).

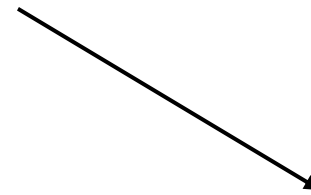
Questo è un **allele pre-mutato**.

La progenie dell'individuo con l'allele premutato avrà in quel sito un'instabilità genomica.

- In un individuo che ha ereditato l'amplificazione delle ripetizioni, tutte le cellule possiederanno un gene che tende ad espandere e che, di fatto, modificherà le sue dimensioni

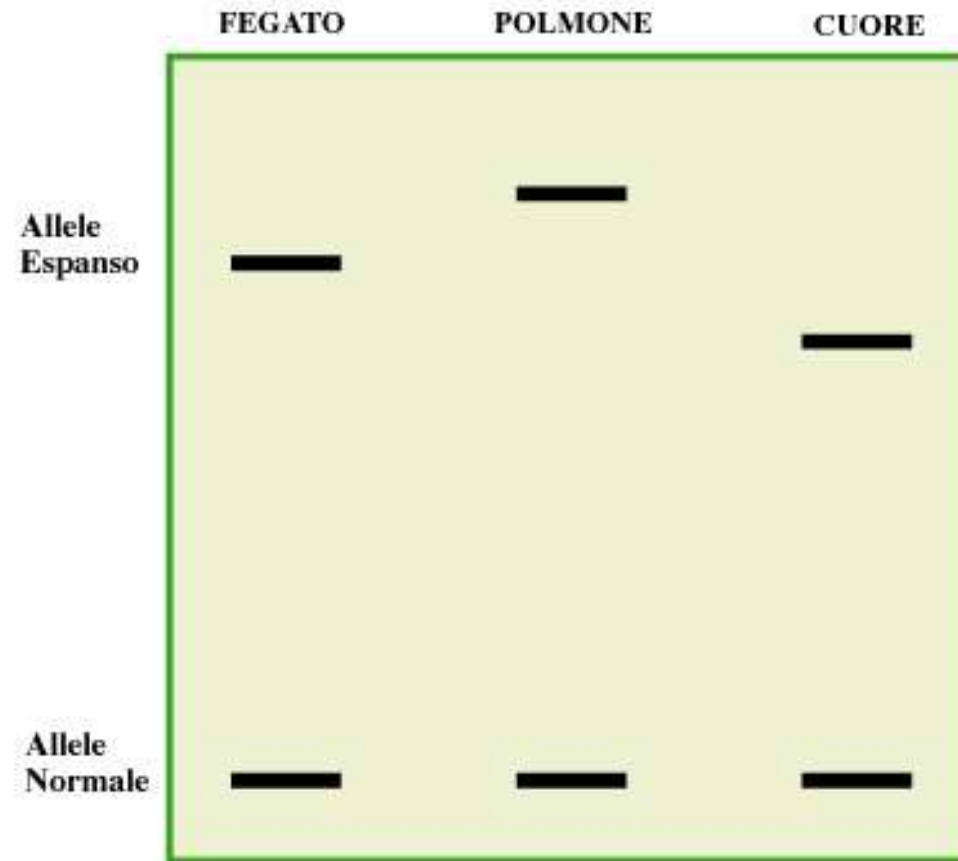


**Mutazione nelle cellule somatiche**  
**Instabilità post-zigotica (Mosaicismo tissutale)**

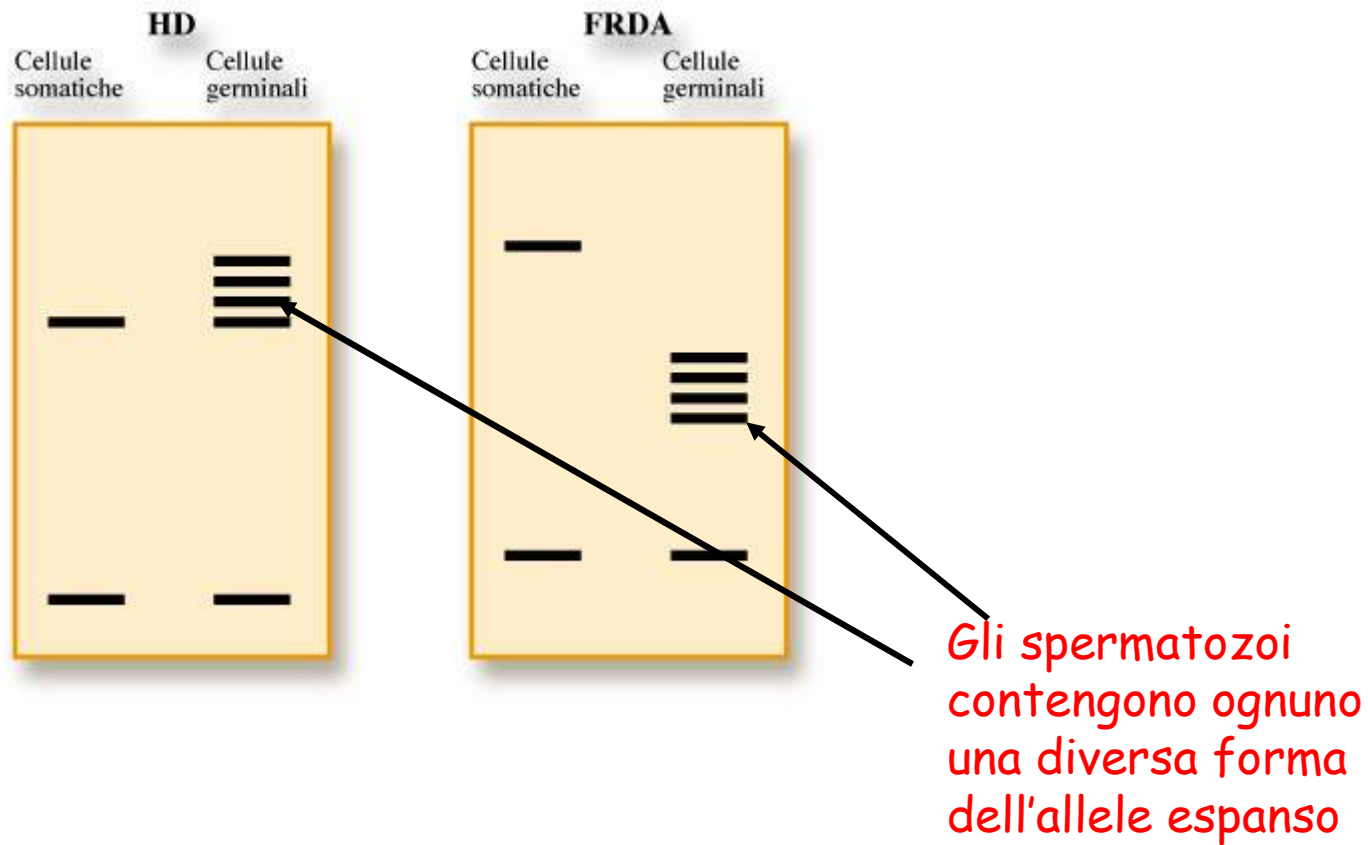


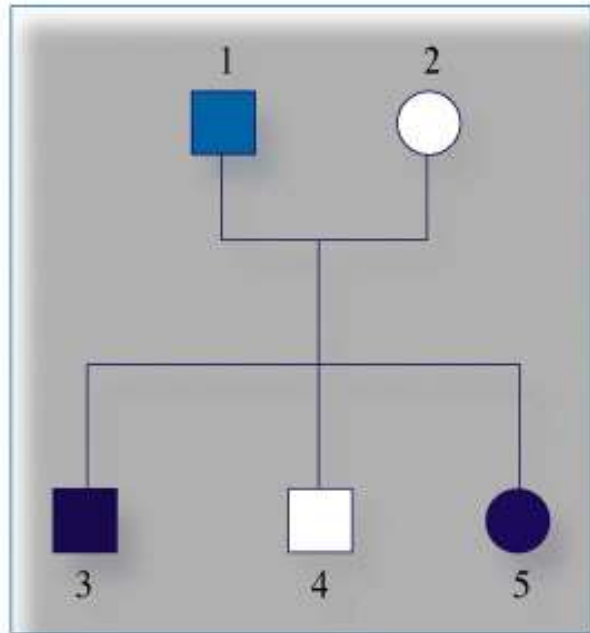
**Mutazione nelle cellule germinali**  
**Instabilità meiotica (Anticipazione)**

# Instabilità allelica post-zigotica: l'individuo è un mosaico

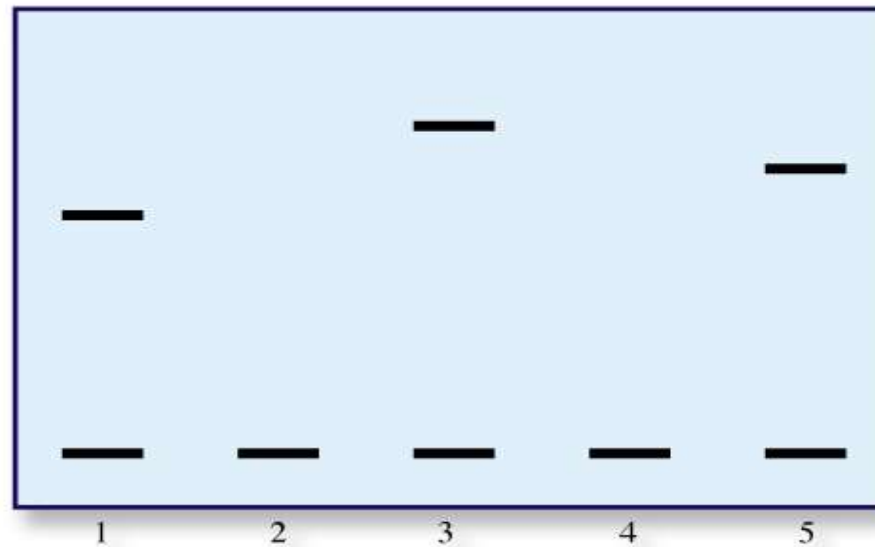


# Instabilità meiotica





**Instabilità allelica meiotica:**  
 i figli ereditano alleli di dimensioni diverse fra loro e diverse da quelle dei genitori  
 (perché ogni gamete ha espanso in maniera diversa o non ha espanso una sequenza ripetuta)





Principali patologie umane da espansione di triplette:

Corea di Huntington

Sindrome dell'X fragile

Distrofia miotonica

Atassia spinocerebellare

TRASMISSIONE PREVALENTEMENTE PER...	
FRAX A	Meiosi femminile
FRAX E	Meiosi maschile
FRAX F	
FRA 11B	
FRA 16A	
DM	Meiosi femminile
HD	Meiosi maschile
MID	Meiosi maschile
SBMA	X linked recessiva
DRPLA	Meiosi maschile
FRDA	Materna (sia espansione -mutazioni più difficili- che contrazione) - Paterna (contrazione)
SCA 2	Meiosi maschile e femminile
SCA 7	Meiosi maschile
SCA 8	Meiosi femminile

Vietate copia riproduzione e modifiche

## Malattie a decorso progressivo

- causano degenerazione a livello del sistema nervoso
- ereditate come carattere autosomico dominante

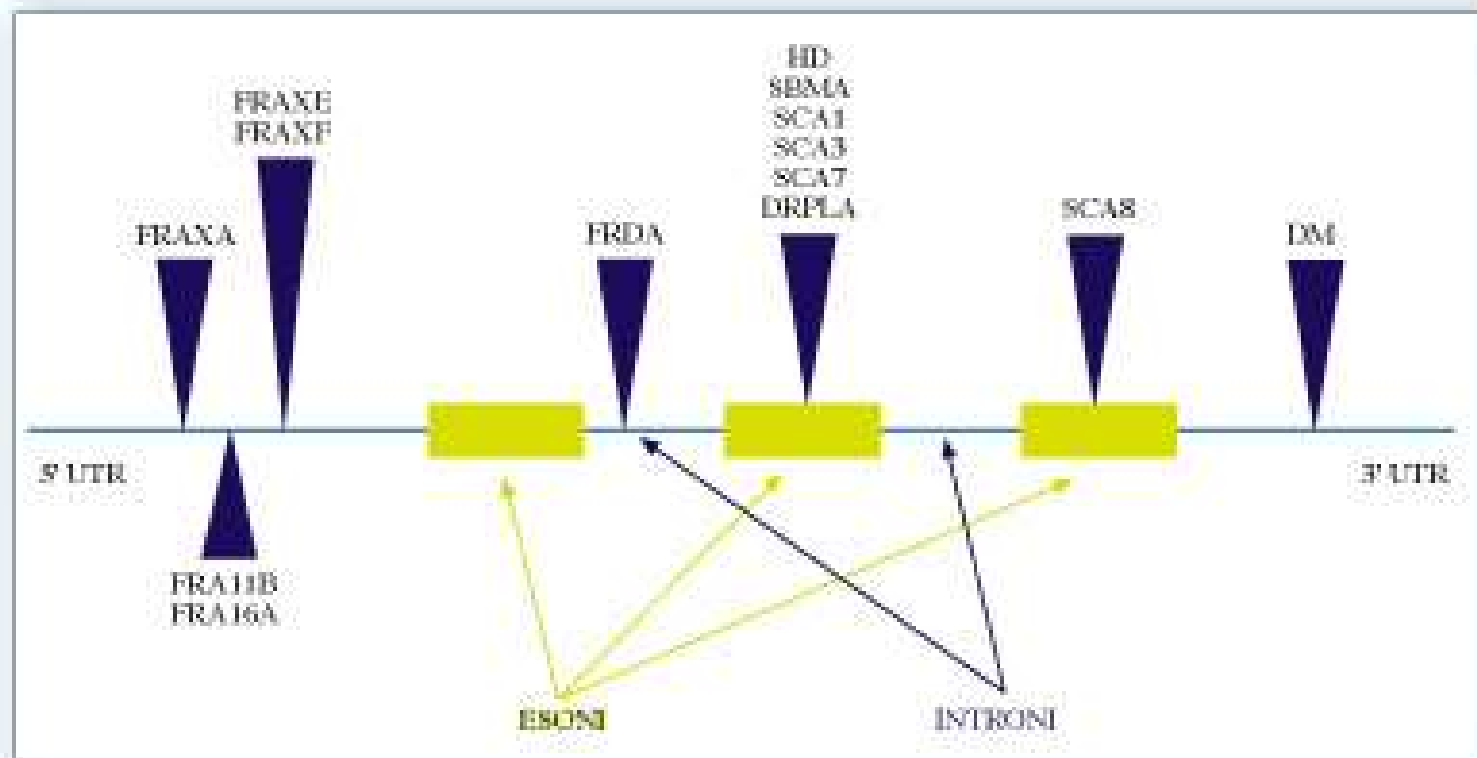
Patogenesi varia e ancora in gran parte sconosciuta

### Malattie neurodegenerative

ripetizioni CAG, in regioni tradotte, codificano per poliglutammina

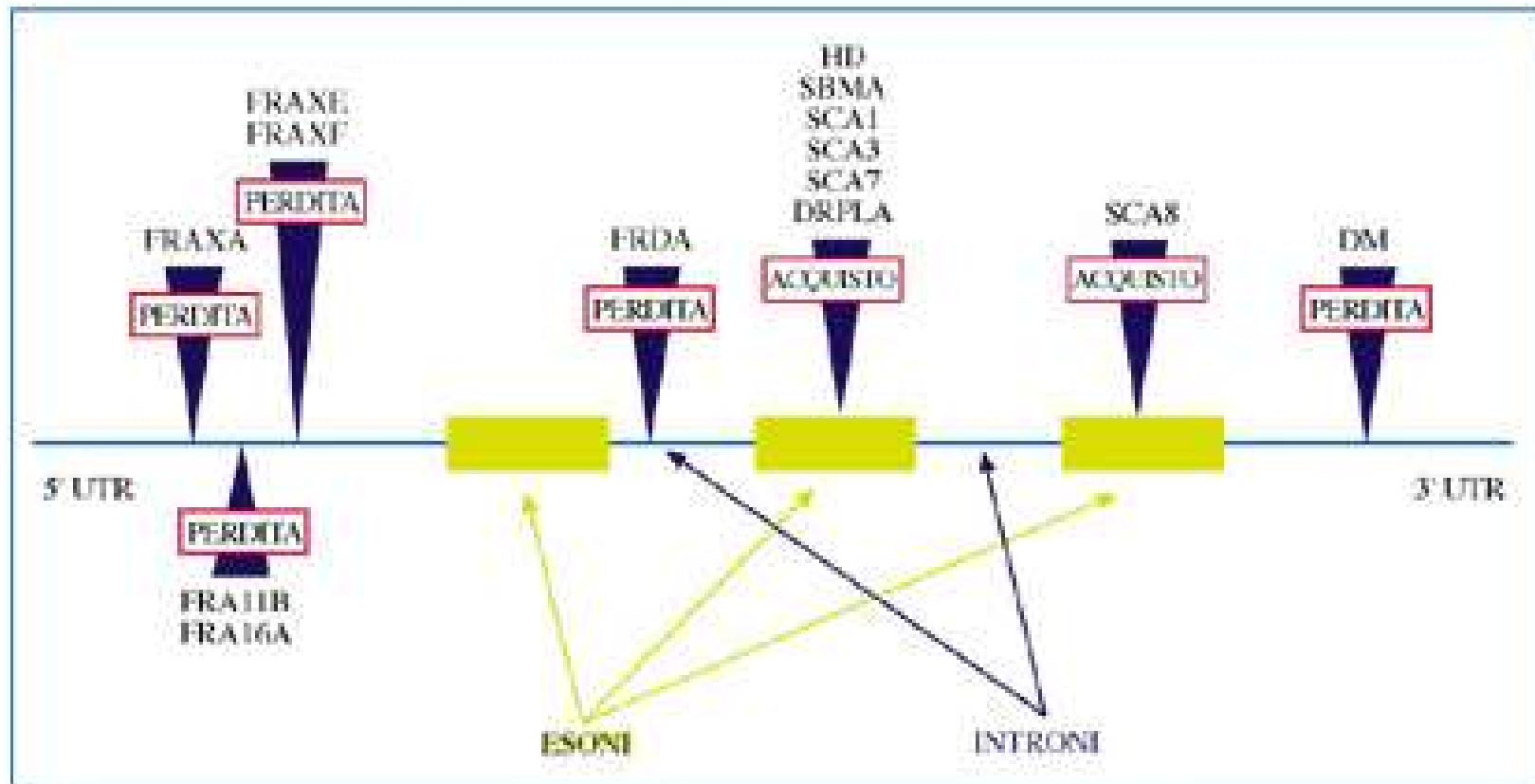
### Malattie non-degenerative

ripetizioni CGG, CCG, CTG, in regioni trascritte ma non tradotte



Vietate copia riproduzione e modifiche

Le mutazioni ad espansione di triplette possono determinare sia perdita sia acquisto di funzione



# La corea di Huntington

## Soggetto normale

52

M L K Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q ATG TTG  
AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
Q Q Q Q Q Q F K Y G V L N  
CAG CAG CAG CAG CAG CAG TTC AAG TAT GGT GTG CTG AAC

## Paziente

M L K Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q ATG TTG  
AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q CAG  
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q CAG  
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG  
Q Q Q Q Q Q F K Y G V L N  
CAG CAG CAG CAG CAG CAG TTC AAG TAT GGT GTG CTG AAC

### Caratteristiche:

- Malattia neurodegenerativa che porta alla demenza, caratterizzata da disturbi del movimento (còrea, dal greco *danza*) e rigidità. Esordio tardivo e decorso progressivo. Porta a morte in circa 15 anni.

Frequenza: circa 1/20.000

### Genetica:

- Espansione preferenziale nelle **trasmissioni paterne** (favorita da età paterna avanzata)

Gene responsabile: gene IT15, (Interesting Transcript 15) sul braccio corto del cromosoma 4, che codifica per la proteina huntingtina. La mutazione è data dall'espansione della tripletta CAG nell'esone 1 → proteina con sequenza di glutamine in eccesso

**Fenotipo normale: 9 → 36 repeats**

Alleli normali: <26 CAG

Alleli intermedi: 27-35 CAG

**Fenotipo malato: 37 → 121 repeats**

Alleli mutati a penetranza incompleta: 36-39 CAG

Alleli mutati a penetranza completa: 40-121 CAG

Forma giovanile per espansioni > 60 CAG



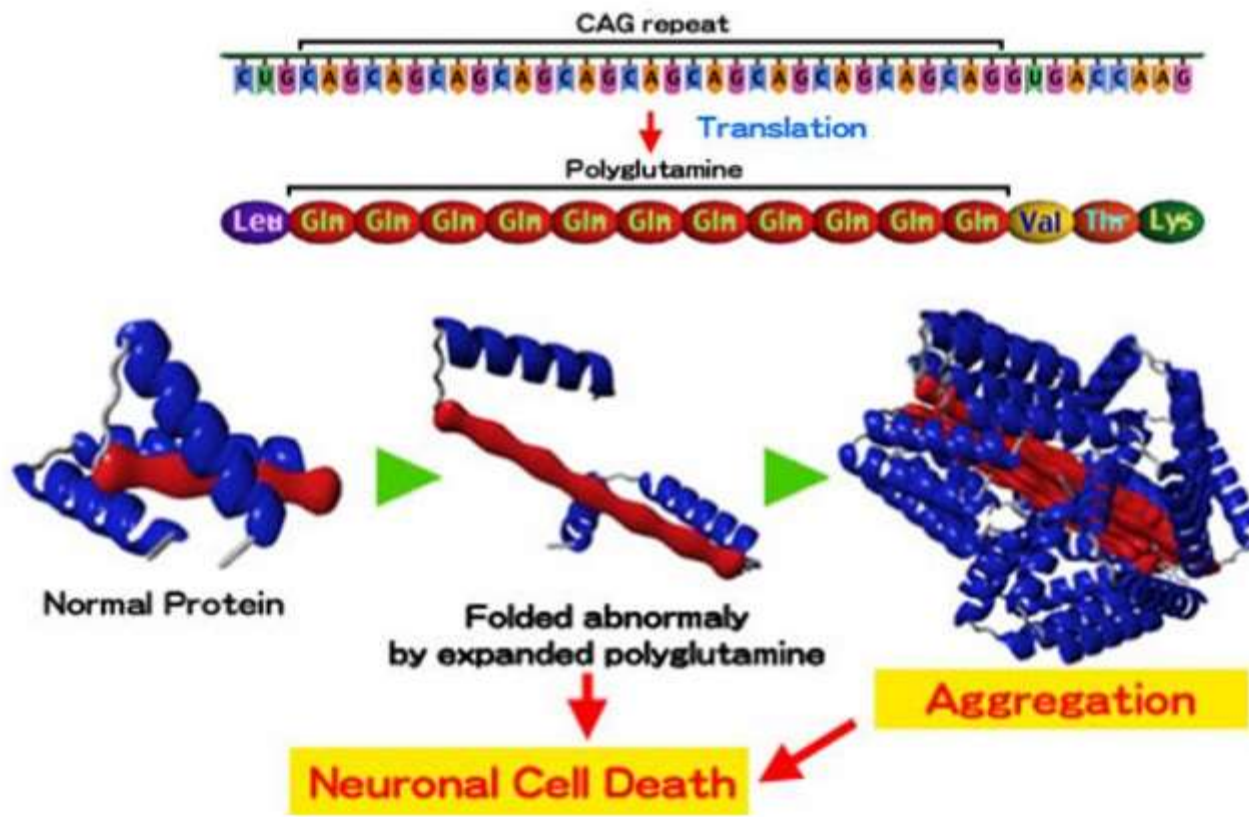
# Meccanismo della malattia

- La cornice di lettura non è alterata.
- I livelli di proteina si mantengono costanti
- L'espansione del tratto di triplette CAG all'interno della sequenza codificante determina la produzione di proteine caratterizzate da tratti di poliglutamina molto lunghi.
- Il meccanismo patogenetico si basa **sia su una perdita di funzione che su un acquisto di funzione**

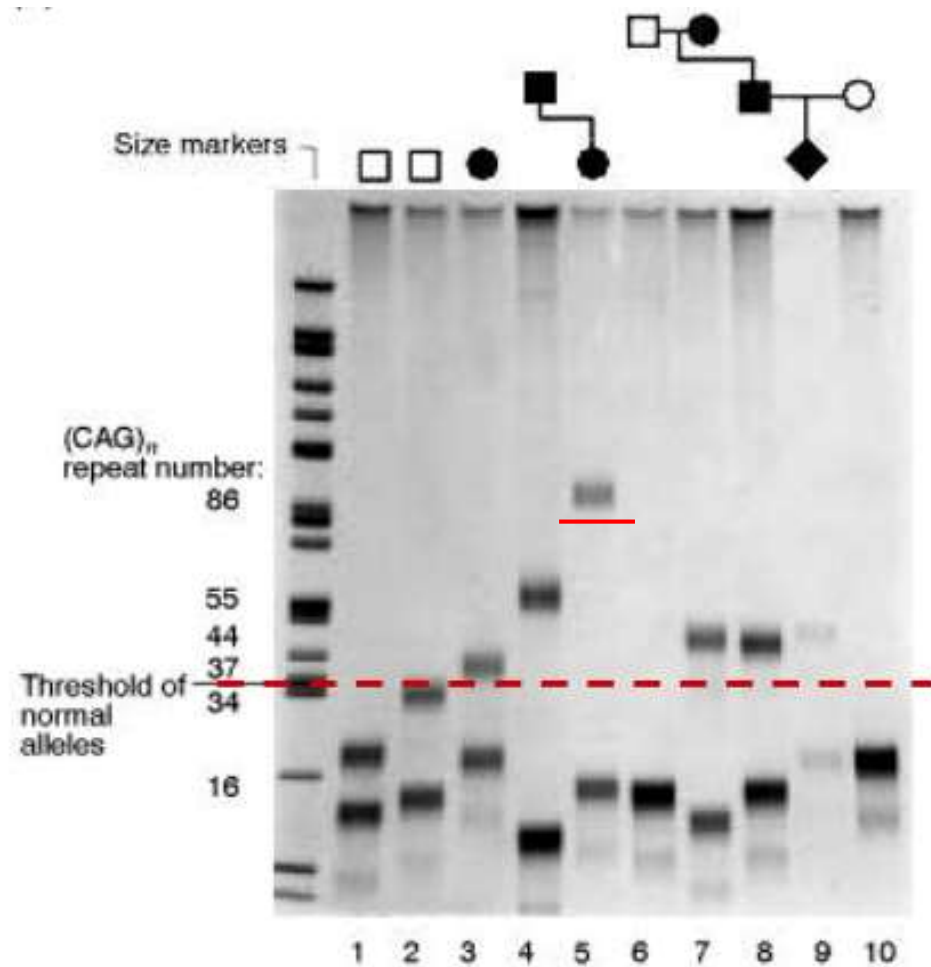
La funzione normale della huntingtina è quella di controllare la produzione di Brain-Derived **Neurotrophic Factor (BDNF)**, una neurotrofina fondamentale per la sopravvivenza dei neuroni striatali.

Questa funzione è persa in presenza della mutazione e l'apporto nutritivo allo striato viene a mancare.

**Oltre alle cellule dello striato, muoiono le cellule produttrici della proteina anomala per tossicità da accumulo.**



- I tratti di poliglutamina sono tossici per i neuroni, perché formano aggregati nucleari che portano alla morte delle cellule.



### Malattia di Huntington.

Amplificazione di un frammento di gene contenente ripetuti (CAG) *n* con la PCR e corsa su gel di polyacrylamide. Le bande sono rivelate con colorazione argentea. La scala indica il numero di ripetizioni.

5) caso di insorgenza giovanile.

9) feto affetto (diagnosi prenatale).

# Altre Malattie da espansione di CAG nella sequenza codificante

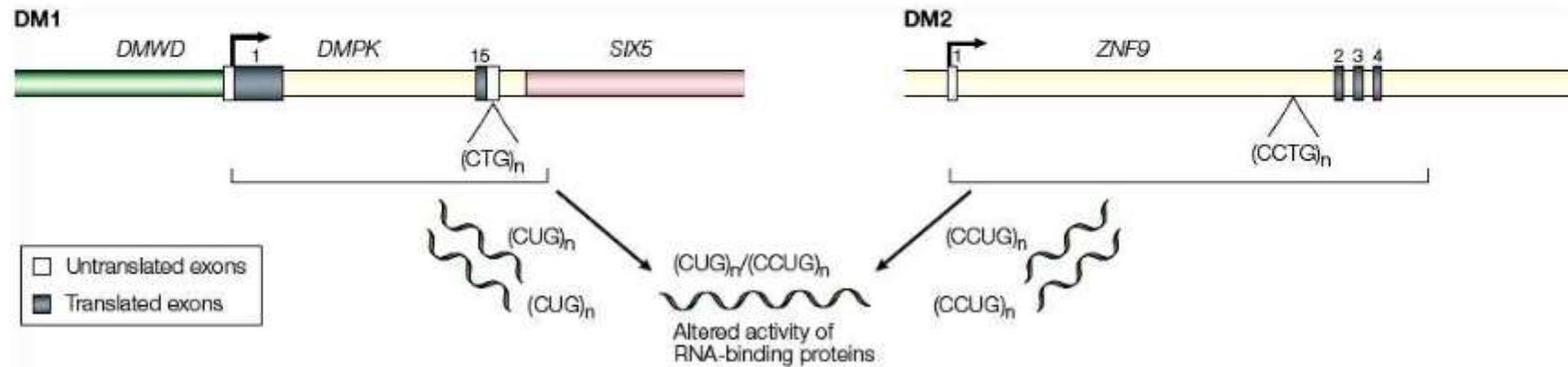
## Malattia di Kennedy

- Atassia spino-cerebellare 1
- Atassia spino-cerebellare 2
- Atassia spino-cerebellare 3
- Atassia spino-cerebellare 6
- Atassia spino-cerebellare 7
- Atrofia dentatorubro-pallidoluisiana

# Distrofia Miotonica 1

È causata dalle espansioni di ripetizioni di CTG nella regione 3' non tradotta del gene DMPK sul cromosoma 19q13.3 che codifica per una **miosin chinasi espressa nei muscoli scheletrici**. La tripletta risulta espansa 50-4000 volte, quando nella popolazione normale il range varia da 5 a 37 volte.

## DMM1 e DMM2: patologie a RNA



I trascritti contenenti l'espansione formano degli aggregati resistenti alla distruzione che rimangono intrappolati nel nucleo.

Questi aggregati interferiscono con altre proteine nucleari → **guadagno di funzione**

In particolare, gli aggregati ("foci") di RNA sequestrano una classe di proteine necessarie per un corretto assemblaggio dello spliceosoma

L'effetto finale è l'alterazione dello splicing di altri geni, con conseguente alterazione funzionale di diversi *pathways* (effetto in *trans*).

# Sindrome dell'X Fragile

Gene FMR-1 responsabile della sindrome dell'X fragile (FRAXA, ~1/4000 maschi, ritardo mentale)

Sito fragile sensibile al folato:

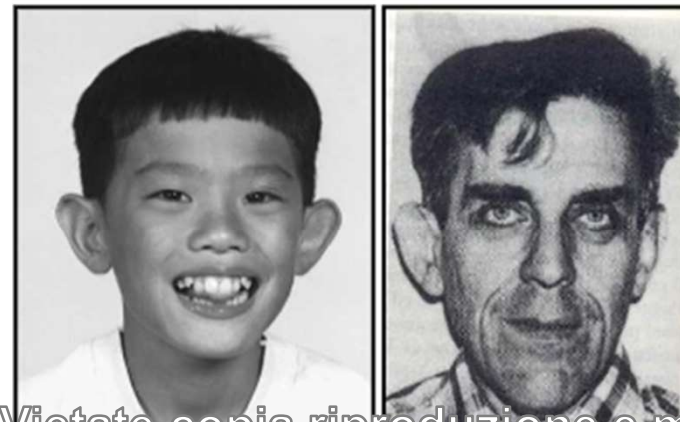
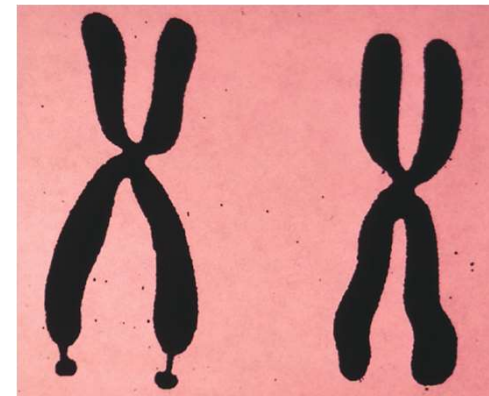
Visibile in coltura priva di ac.folico e timina, regione che non si compatta normalmente durante la mitosi

## Fenotipo:

- ritardo mentale grave
- faccia allungata con mandibola larga
- grandi orecchie a sventola
- testicoli ingrossati (macro-orchidismo)

Espansione allelica: al 5' UTR

Allele normale CGG x 6-52 copie  
allele premutato CGG x 60-200 copie  
allele mutato CGG > 200 copie



Vietata copia riproduzione e modifiche



## Meccanismo della malattia

FMRP è una RNA binding protein espressa soprattutto nel cervello e nei testicoli.

Nel cervello lega mRNA codificanti importanti proteine neuronali regolandone il trasporto verso i dendridi e qui la loro traduzione.

FMRP è necessaria per il normale procedere della maturazione sinaptica glutamatergica durante lo sviluppo.

La sua assenza causa una alterazione della funzionalità sinaptica

**Meccanismo patogenetico: Perdita di funzione.**

Negli individui con l'allele mutato la ripetizione espansa (che cade quasi sempre in sequenze non codificanti al 5' o introniche) risulta **metilata** in maniera anomala e ciò determina il **silenziamento di *FRM1***.

Inibitori delle DNA metil transferasi permettono la riattivazione trascrizionale dell'allele mutato.

MALATTIA	TRASMISSIONE	GENE	LOCUS	TRIPLETTA	RANGE DI ESPANSIONE	PROTEINA
Ritardo mentale con sito fragile Xq27.3	X-linked	FMR1	Xq27.3	CGG	N: 6-50 pm: 52-200 M: >250	FMRP
Ritardo mentale con sito fragile Xq27.3-28	X-linked	Ox19?	Xq27.3-28	GCC	N: 6-25 pm: 30-150 M: >200	?
Atrofia muscolare spino-bulbare	X-linked	AR	Xq11-12	CAG	N: 12-33 M: 40-62	AR
Distrofia miotonica	AD	DMK	19q13	CTG	N: 5-30 pm: 42-180 M: >200	Mt-PK
Malattia di Huntington	AD	HD	4p16	CAG	N: 9-30 M: 40-121	Huntingtina
Atassia spinocerebellare di tipo 1	AD	SCA1	6p22	CAG	N: 9-39 M: 41-81	Ataxina 1
Atassia spinocerebellare di tipo 7	AD	SCA7	3p21.1-p12	CAG	N: 7-17 pm: 17-38 M: 38-130	Ataxina 7
Atassia spinocerebellare di tipo 8	AD	DMPK	13q21	CTG	N: 16-37 M: >150	Ataxina 8
Malattia di Machado-Joseph	AD	MJD	14q23	CAG	N: 14-34 M: 61-84	Ataxina 3
Atrofia dentato-rubro-pallido-lusiana	AD	DRPLA	12p12	CAG	N: 7-23 M: 49-88	DRPLA
Sindrome di Haw River	AD	DRPLA	12p12	CAG	N: 7-23 M: 49-88	DRPLA
Atassia di Friedreich	AR	X25	9q12-13	GAA	N: 7-20 M: 200-1200	Frataxina

Vietate copia riproduzione e modifiche

MALATTIA	TRASMISSIONE	GENE	LOCUS	TRIPLETTA	RANGE DI ESPANSIONE	PROTEINA
Ritardo mentale con sito fragile Xq27.3	X-linked	FMR1	Xq27.3	CGG	N: 6-50 pm: 52-200 M: >250	FMRP
Ritardo mentale con sito fragile Xq27.3-28	X-linked	Ox19?	Xq27.3-28	GCC	N: 6-25 pm: 30-150 M: >200	?
Atrofia muscolare spino-bulbare	X-linked	AR	Xq11-12	CAG	N: 12-33 M: 40-62	AR
Distrofia miotonica	AD	DMK	19q13	CTG	N: 5-30 pm: 42-180 M: >200	Mt-PK
Malattia di Huntington	AD	HD	4p16	CAG	N: 9-30 M: 40-121	Huntingtina
Atassia spinocerebellare di tipo 1	AD	SCA1	6p22	CAG	N: 9-39 M: 41-81	Ataxina 1
Atassia spinocerebellare di tipo 7	AD	SCA7	3p21.1-p12	CAG	N: 7-17 pm: 17-38 M: 38-130	Ataxina 7
Atassia spinocerebellare di tipo 8	AD	DMPK	13q21	CTG	N: 16-37 M: >150	Ataxina 8
Malattia di Machado-Joseph	AD	MJD	14q23	CAG	N: 14-34 M: 61-84	Ataxina 3
Atrofia dentato-rubro-pallido-luysiana	AD	DRPLA	12p12	CAG	N: 7-23 M: 49-88	DRPLA
Sindrome di Haw River	AD	DRPLA	12p12	CAG	N: 7-23 M: 49-88	DRPLA
Atassia di Friedreich	AR	X25	9q12-13	GAA	N: 7-20 M: 200-1200	Frataxina

vietate copia riproduzione e modifiche

MALATTIA	FENOTIPO	POSSIBILE MECCANISMO PATOGENETICO	CARATTERISTICHE
Sindrome dell'X fragile FRAX-A	Ritardo mentale (di entità variabile), disturbi del comportamento (iperattività, perdita di attenzione, disturbi del linguaggio). Dismorfie facciali, macrorchidismo, lassità legamentosa, iperestensibilità delle articolazioni.	Nell'ambito del gene FMR1 la sequenza CGG codifica per un poliglicina; il probabile ruolo della proteina nella struttura e nella funzione dei ribosomi suggerisce un difetto nella traduzione degli mRNA.	Proteina ubiquitaria a localizzazione citoplasmatica e nucleare, con due domini conservati che legano l'RNA; cosedimenta con i ribosomi (subunità 60S) in seguito a centrifugazione in gradiente di saccarosio; interagisce nella struttura del ribosoma con FXR1 e FXR2.
FRAX-E	Lieve ritardo mentale (raro)	Repressione del gene FMR2, coinvolto probabilmente nella regolazione dell'espressione genica.	Proteina nucleare appartenente a una famiglia di fattori di trascrizione DNA-binding (insieme ad AF-4, coinvolta in alcuni tumori, e ha LAF-4, che interviene nella differenziazione dei linfociti); espressa in varie regioni del cervello (soprattutto amigdala e ippocampo), nella placenta e nel polmone.
FRAX-F	Lieve ritardo mentale (molto raro)	La regione coinvolta è molto vicina a quella di FRAXE, quindi la patogenesi potrebbe essere la stessa.	Proteina nucleare appartenente a una famiglia di fattori di trascrizione DNA-binding (insieme ad AF-4, coinvolta in alcuni tumori, e ha LAF-4, che interviene nella differenziazione dei linfociti); espressa in varie regioni del cervello (soprattutto amigdala e ippocampo), nella placenta e nel polmone.
FRA11B (sindrome di Jacobsen)	Crescita lenta prima e dopo la nascita, diminuite capacità motorie, lieve ritardo mentale; dismorfismo, malformazioni cardiache, iperglicemia, pancitopenia.	Perdita di un porzione del cromosoma 11 (FRA11B/CBL2), favorita dalla presenza del sito fragile a livello della tripletta ripetuta all'estremità 5' del gene CBL2.	Nella patologia non è coinvolto un solo gene specifico.
FRA16A	Infertilità, aborti, malformazioni, aneuploidie; bassa attività delle cellule NK e dei linfociti con recettori per la porzione Fc delle IgG (cellule T gamma).	La presenza di un sito fragile può portare ad aberrazioni cromosomiche; l'ipermetilazione della sequenza ripetuta interferisce con la regolazione trascrizionale.	Nella patologia non è coinvolto un solo gene specifico.
Distrofia Miotonica (DM)	Miotonia, debolezza muscolare, facies mippatica, con difficoltà alla masticazione e alla respirazione e andatura barcollante; disturbi cardiaci (soprattutto aritmie) ed endocrini (ridotta fertilità maschile, calvizie frontale), ipersonnia, cataratta, alterazioni scheletriche e articolari.	La sequenza espansa si trova al di fuori della regione tradotta del gene; due meccanismi sono stati proposti: 1) Inibizione dell'espressione di alcuni geni (DMPK, DMAHP); 2) Sequestro delle proteine da parte dell'mRNA espanso.	Proteina chinasi cAMP-dipendente espressa, in varie isoforme, nel muscolo scheletrico e cardiaco e nel cervello, probabilmente coinvolta nei meccanismi di rilascio muscolare.

Corea di Huntington (HD)	Disturbi cognitivi, dell'attenzione e della concentrazione; incoordinazione dei muscoli della lingua, respiratori, faringei e facciali che porta disturbi alla parola, alla deglutizione e alla respirazione; degenerazione nervosa con stati depressivi o maniacali, disturbi del comportamento, fino a demenza.	Traduzione di sequenze di poliglutammina che provocano formazione di aggregati di proteine che precipitano nel citoplasma del neurone con conseguente degenerazione della cellula.	Proteina citosolica diffusa in tutto il sistema nervoso, primariamente nelle regioni somatodendritiche, associata ai microtubuli e alle vescicole sinaptiche, contiene domini HEAT, ripetizioni di 40 aa (comuni anche alla fosfolipasi 2A) importanti nel trasporto di vescicole.
Atassia spinocerebellare (SCA1)	Atassia, atrofia dei muscoli oculari, debolezza muscolare che esita in disabilità entro 10-20 anni dall'insorgenza (nella giovinezza).	Poliglutammina.	Proteina coinvolta nello sviluppo embrionale del cervelletto e anche della colonna vertebrale; ha localizzazione nucleare in varie regioni del cervello, citoplasmatica nel cervelletto.
Atassia spinocerebellare (SCA7)	Atassia, retinopatia con degenerazione della macula fino alla cecità; instabilità gonadica.	Poliglutammina.	Proteina con segnale per localizzazione nucleare.
Atassia spinocerebellare (SCA8)	Diminuite capacità motorie; atassia; atrofia cerebrale.	I meccanismi molecolari sono simili a quelli della DM in quanto le due patologie sono simili.	
Atrofia muscolare spino-bulbare o malattia di Kennedy (SBMA)	Degenerazione dei corni anteriori midollari e dei gangli spinali (con coinvolgimento del bulbo), che porta affaticabilità, diminuita risposta motoria, con progressione verso l'atrofia muscolare; ginecomastia, atrofia testicolare e oligospermia, fascicolazioni, instabilità meiotica (specie maschile), disfagia; risposta sensoriale diminuita.	Aumento delle sequenze di poliglutammina nella molecola del recettore degli androgeni, proteina importante per lo sviluppo corretto delle cellule nervose; si formano coaggregati citoplasmatici del recettore non in grado di interagire con l'ormone, di qui anche i sintomi a carico delle gonadi. I frammenti dei recettori per gli androgeni potrebbero promuovere la formazione di corpi inclusi intraneuronali che potrebbero essere causa di morte cellulare.	Proteina nucleare, recettore per gli androgeni, fondamentali per la differenziazione, crescita e rigenerazione dei neuroni.
Atrofia dentato-rubro-pallido-luisiana (DRPLA)	Degenerazione del cervelletto e dei circuiti extrapiramidali: atassia, epilessia mioclonica, coreatetosi e demenza, esordio nella seconda decade di vita e morte entro la quarta decade.	Poliglutammina.	Proteina espressa prevalentemente in cervello, ovaie, testicoli e prostata, e a livelli più bassi in fegato, timo e linfociti.
Malattia di Machado-Joseph (MJD-SCA3)	Degenerazione dei tratti spinocerebellari, dei nuclei dentati, dei nuclei pontini e vestibolari, di strutture extrapiramidali, di nervi cranici motori e radici anteriori spinali, e dei gangli spinali; oftalmoplegia, gonfiore facciale e linguale.	Poliglutammina; la funzione del gene alterato (MJD1) è sconosciuta.	Proteina di funzione ignota espressa nelle cellule linfoblastoidi e nel cervello.
Atassia di Friedrich (FRDA)	Degenerazione dei gangli spinali, delle colonne del Clarke, delle colonne posteriori, dei tratti piramidale e cerebellare dorsale con atassia, mancanza di riflessi, atrofia dei muscoli oculari; cardiopatia ipertrofica, aumento di incidenza del diabete mellito, disartria.	Patogenesi sconosciuta; la degenerazione delle cellule nervose potrebbe essere causata da un deficit della respirazione cellulare e da una quantità eccessiva di Fe <sup>++</sup> .	Proteina mitocondriale (presenta un segnale di destinazione in posizione N-terminale) appartenente al complesso della citocromo c-ossidasi; espressa in tessuti con elevata attività metabolica (quali cuore, midollo; no nella corteccia), è indispensabile per la funzione respiratoria anche se il suo ruolo non è chiaro (forse metabolismo del Fe <sup>++</sup> ).
Sindrome Haw River	Atassia, corea; disturbi psichiatrici simili alla schizofrenia; atrofia cerebellare.	Poliglutammina; l'alterazione è la stessa dell'atrofia dentato-rubro-pallido-luisiana.	