



Università politecnica delle Marche

Dipartimento scienze della vita e dell'ambiente

Corso di laurea in

Scienze Biologiche

Tesi di laurea

Mutazione del gene FMR1 sul cromosoma X : sindrome dell'X fragile
FMR1 gene mutation on the X chromosome : the fragile X syndrome

Tesi di laurea di:
Maria Continisio

Docente Referente Chiar.mo Prof.
Maria Assunta Biscotti

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2020/2021

CHE COS'È LA SINDROME DELL'X FRAGILE?

CARATTERISTICHE:

- Descritta per la prima volta da Martin e Bell nel 1943.
- La sindrome dell'X fragile è una delle cause di ritardo mentale ereditario più frequente.
- Si manifesta maggiormente nei maschi.
- Costituisce la causa più diffusa di ritardo mentale dopo la sindrome di Down.

QUADRO CLINICO:

- Viso stretto e allungato
- Padiglioni auricolari molto grandi
- Mandibola prominente
- Ingrossamento dei testicoli
- Piede piatto

SINTOMI

- Ritardo mentale
- Problemi comportamentali (Iperattività e aggressività)
- Depressione
- Disturbi dell'ansia
- Problemi nel sonno
- Autismo

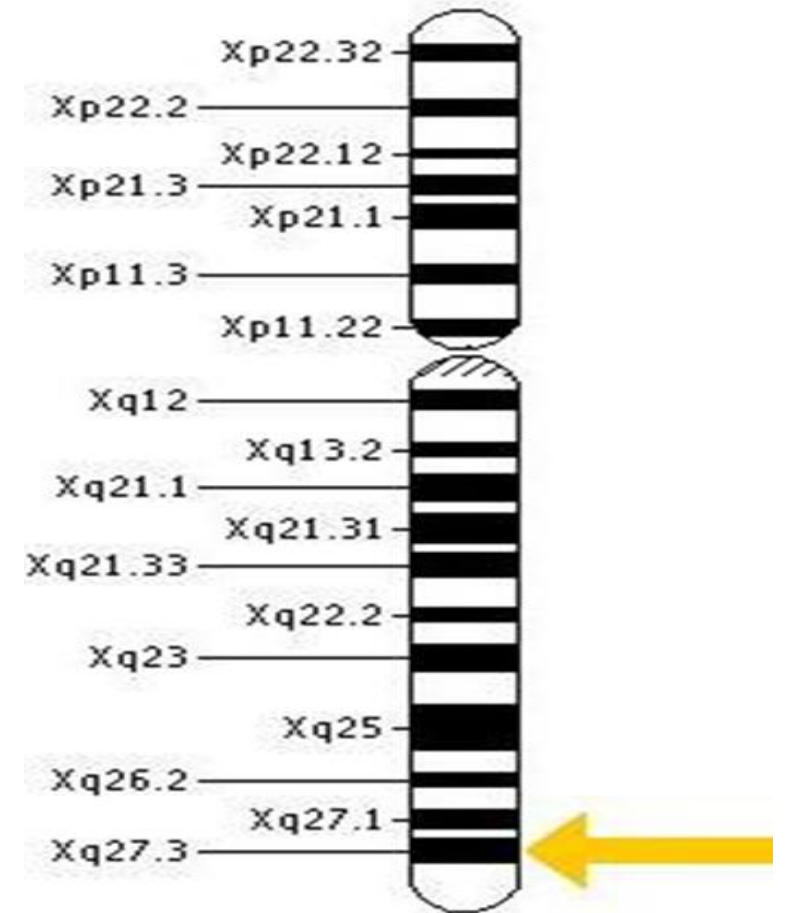


DA COSA VIENE PROVOCATA LA SINDROME DELL'X FRAGILE?

Questa malattia è causata dalla presenza di una mutazione del **GENE FMR1** situato nella regione terminale del cromosoma X.

CARATTERISTICHE DEL GENE FMR1:

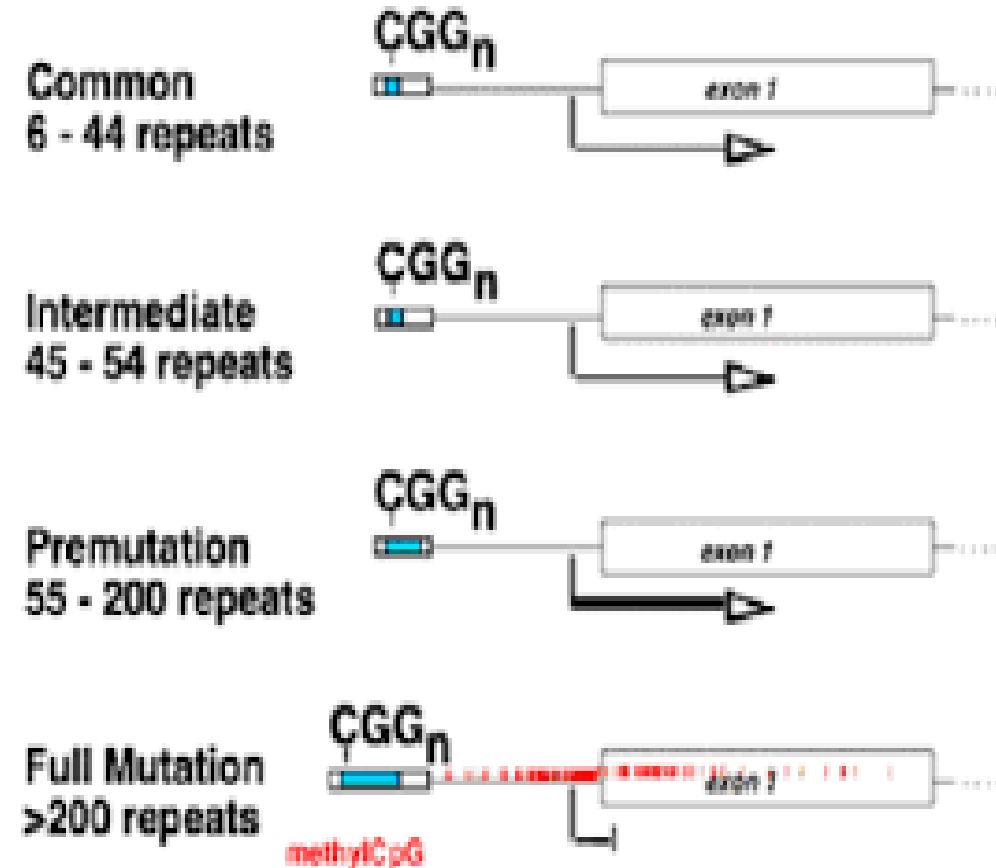
- Il gene FMR1 produce normalmente la proteina **FMRP**. Questa proteina si lega agli mRNA e ai ribosomi, ed è espressa nel cervello e nei testicoli che sono gli organi più colpiti dalla sindrome.
- L'assenza di questa proteina provoca la malattia generando il ritardo mentale.
- I livelli del QI dipendono dal livello di produzione della proteina FMRP.
- Il gene FMR1 si trova all'interno di un **SITO** chiamato **FRXA**, localizzato nel braccio lungo del cromosoma X: **Xq27.3** all'estremità del cromosoma X.
- Il sito FRXA si trova nella regione non codificante del gene precisamente nella regione 5' non tradotta.
- La mutazione del gene FMR1 è provocata dall'espansione della **TRIPLETTA CGG**.



- CAUSE GENETICHE:

- Espansione della tripletta CGG:

1. Negli individui normali il n° delle ripetizioni è basso e non supera 50, infatti il numero di triplette varia tra 6 e 50 e non c'è instabilità cromosomica perché la proteina FMRP viene prodotta normalmente.
2. Se il n° delle ripetizioni aumenta, da 50 fino a un max di 200, si ha la **PREMUTAZIONE**: l'espansione della tripletta non porta subito a uno stato patologico perché la proteina FMRP viene prodotta normalmente, quindi la malattia non si manifesta. Gli individui con la premutazione sono chiamati PORTATORI SANI.
3. Se il n° di ripetizioni supera i 200 si ha la **MUTAZIONE COMPLETA**, in questo modo la proteina FMRP non può essere prodotta perché il gene FMR1 viene silenziato e di conseguenza si svilupperà la sindrome dell'X FRAGILE.



TECNICHE PER INDIVIDUARE LA SINDROME DELL' X FRAGILE

MATERIALI E METODI UTILIZZATI:

-ANALISI DIRETTA DEL DNA:

- Il DNA estratto da un prelievo di sangue viene digerito con 2 enzimi di restrizione: ECORI e EagI i quali producono dei frammenti di DNA.

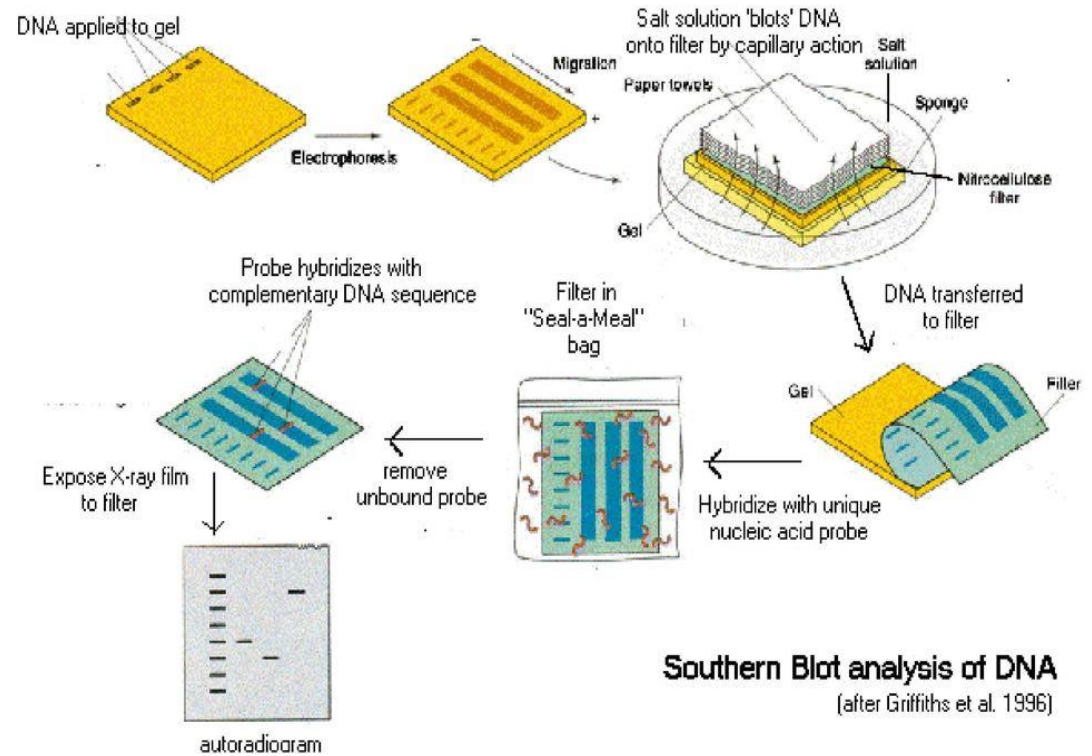
-METODICA UTILIZZATA:

- Tecnica del SOUTHERN BLOTTING che ci permette di capire se c'è una premutazione o una mutazione completa e lo stato di metilazione.
- Tecnica della PCR che ci permette di conoscere con precisione il numero delle triplette.

PROCEDURA:

- I frammenti di restrizione vengono separati in base alle dimensioni tramite l'ELETTROFORESI SU GEL.
- Tramite il SOUTHERN BLOTTING i frammenti di DNA vengono trasferiti su una membrana di NITROCELLULOSA o NYLON.
- Dopo il trasferimento si esegue un'ibridazione con una sonda marcata che ci permette di individuare i frammenti di DNA.

Southern blot



RISULTATI:

- **CROMOSOMA X NORMALE NON METILATO:**

Una prima digestione con l'enzima di restrizione ECORI in persone normali produce un frammento di 5,2 kb. La doppia digestione con l'enzima di restrizione Eagl e ECORI in condizioni normali porta alla produzione di frammenti di 2,8 kb.

- **CROMOSOMA X CON PREMUTAZIONE NON METILATO:**

La doppia digestione con gli enzimi di restrizione ECORI e Eagl ci permette di individuare la presenza di premutazioni: nel maschio si ha la produzione di frammenti da 2,9 a 3,3 kb, mentre nella femmina si ha la produzione di frammenti da 5,3 a 5,7 kb.

- **CROMOSOMA X CON MUTAZIONE COMPLETA METILATO:**

La presenza di mutazioni complete porta alla produzione di frammenti superiori a 5,7 kb. Questo perché l'enzima Eagl non taglia se il DNA è metilato, quindi in caso di mutazioni complete solo l'enzima ECORI taglia il DNA producendo frammenti superiori a 5,7 kb.

PCR:

- Si basa sull'amplificazione della tripletta CGG attraverso l'utilizzo di primer.
- Rispetto al Southern Blotting, la PCR è una tecnica più veloce e meno costosa anche se presenta delle limitazioni :
 - Consente di amplificare premutazioni fino a 130 ripetizioni portando all'amplificazione di frammenti fino a 300 bp.
 - Non è possibile con questa tecnica individuare le mutazioni complete perché la PCR non è in grado di amplificare lunghi frammenti nella mutazione completa.

Queste limitazioni nella PCR hanno condotto al miglioramento di questa tecnica con lo sviluppo della **TP-PCR** (Triplet Repeat Primed) che attraverso l'utilizzo di 3 primer permette di amplificare in modo completo la regione espansa e riconoscere esattamente quanto è lunga l'espansione.

CONCLUSIONI

Tutt'oggi la sindrome dell'X fragile non è curabile e le persone affette da questa malattia presentano un ritardo mentale provocato dall'espansione della tripletta CGG.

L'analisi diretta del DNA mediante il SOUTHERN BLOTTING ci permette di capire se un individuo è affetto o è un portatore sano della sindrome dell'X fragile: è una metodica molto affidabile anche se non ci permette di conoscere con precisione il numero delle triplette. Il Southern Blotting ci consente di rilevare la presenza di mutazioni e anche lo stato di metilazione del gene FRMR1 grazie all'utilizzo degli enzimi di restrizione ECORI e EAGL: l'enzima EAGL taglia il DNA quando non è metilato. La PCR ci consente di conoscere con precisione il numero della tripletta attraverso l'utilizzo di primer.

RICAPITOLANDO.....

La sindrome dell' X fragile è una delle cause di ritardo mentale ereditario più frequente provocata dalla mutazione del gene FMR1. La mutazione del gene FMR1 è causata dall'espansione della tripletta CGG nella regione 5' non tradotta del gene FMR1. L'espansione della tripletta CGG provoca la repressione del gene FMR1 portando allo sviluppo della malattia. La repressione del gene FMR1 impedisce la produzione della proteina FMRP, e l'assenza di questa proteina porta allo sviluppo della malattia e del ritardo mentale.

La PCR e il SOUTHERN BLOTTING sono le tecniche utilizzate per individuare la sindrome dell'X fragile. La PCR ci permette di conoscere con precisione il numero della tripletta attraverso l'utilizzo di primer, mentre il SOUTHER BLOTTING ci permette di individuare premutazioni e mutazioni complete attraverso l'uso di enzimi di restrizione.

BIBLIOGRAFIA

- ❖ “Fragile X syndrome clinical presentation, pathology and treatment” María Jimena Salcedo-Arellano, Randi J. Hagerman, Verónica Martínez-Cerdeño.
- ❖ «Fragile x syndrome» Chakrabarti, Lisa; Davies, Kay E.
- ❖ «Direct Diagnosis by DNA Analysis of the Fragile X Syndrome of Mental Retardation” François Rousseau, M.D., Dominique Heitz, Valérie Biancalana, M.Sc., Sandra Blumenfeld, Christine Kretz, Joëlle Boué, M.D., Niels Tommerup, M.D., Carl Van Der Hagen, M.D., Célia DeLozier-Blanchet, Ph.D., Marie-Françoise Croquette, M.D., Simone Gilgenkrantz, M.D., Pierre Jalbert, M.D.
- ❖ “Analysis of DNA by Southern Blotting” Michael R. Green and Joseph Sambrook.
- ❖ “Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses” Claudia Ciaccio¹, Laura Fontana², Donatella Milani¹, Silvia Tabano², Monica Miozzo² and Susanna Esposito³

GRAZIE PER L'ATTENZIONE