



Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Corso di Laurea triennale in Scienze Biologiche

# I siti fragili e la loro rilevanza nelle malattie umane

Fragile sites and their relevance in human diseases

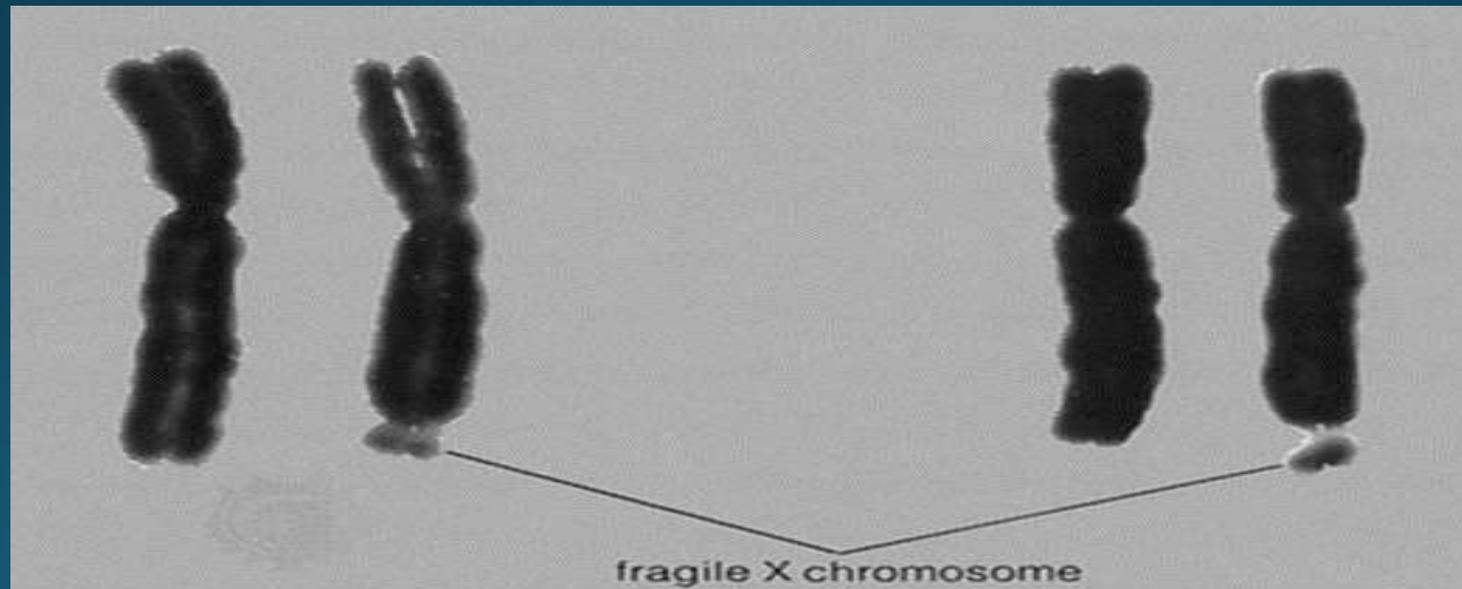
Tesi di Laurea di: Abbrugiati Martina  
Docente Referente: Gioacchini Giorgia  
Sessione di Laurea autunnale (Dicembre 2023)  
Anno Accademico: 2022/2023

# Che cosa sono i siti fragili?

I siti fragili sono siti presenti nella nostra cromatina inclini a formare lacune o rotture.

Si parla di instabilità cromosomica, ossia una particolare condizione dei cromosomi che induce negli stessi un numero di rotture, riarrangiamenti e scambi tra i cromatidi superiori alla media, in seguito a perturbazioni del processo replicativo.

L'instabilità cromosomica è ereditabile e porta ad una forte predisposizione allo sviluppo di patologie tumorali e a disordini di varia gravità nel sistema nervoso.



# Classificazione dei siti fragili

I siti fragili vengono classificati in tre categorie in base al loro livello di espressione.

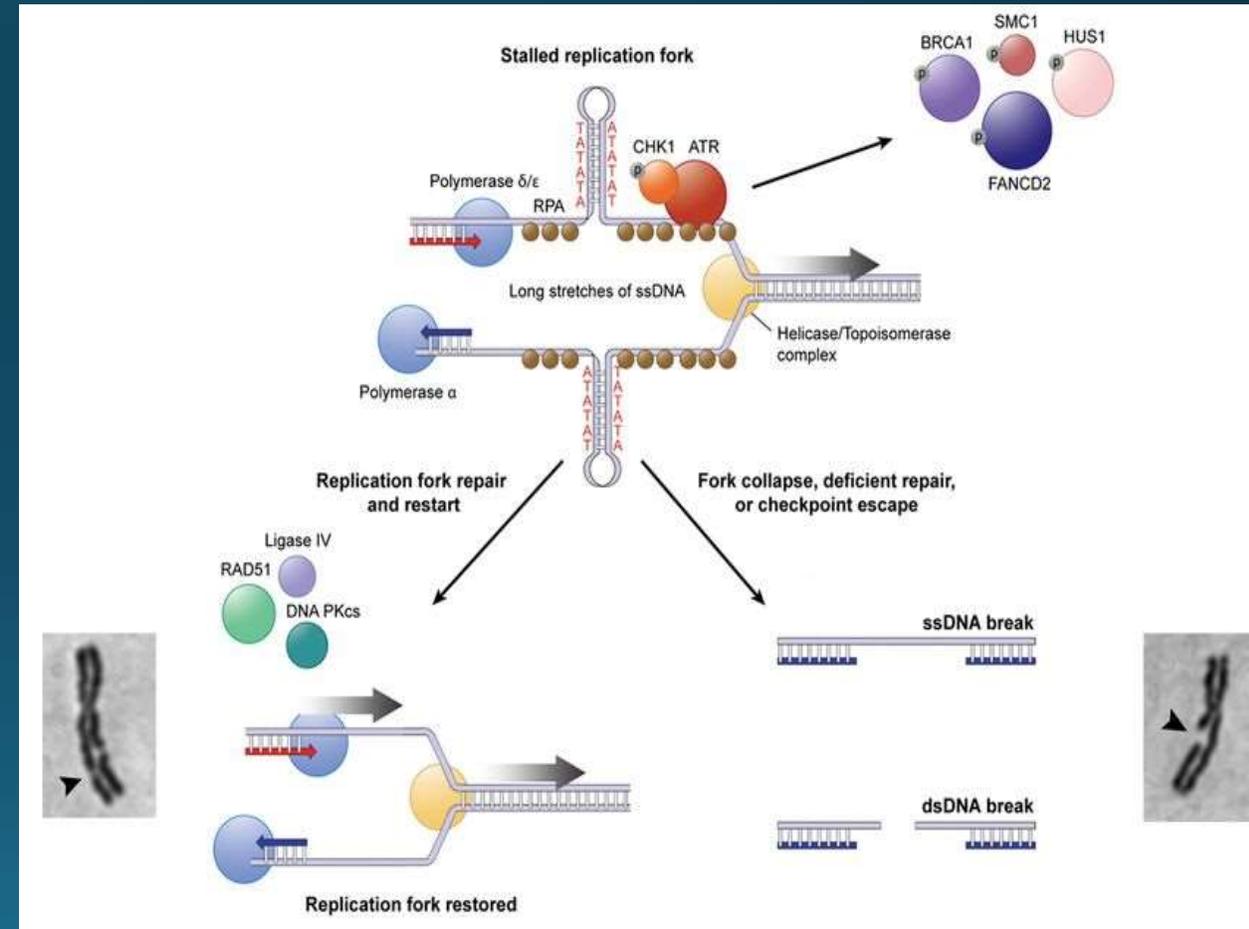
- Siti fragili rari (RFS): sono siti individuati in un numero limitato di individui e sono associati a ripetizioni della tripletta CGG. In questa tipologia di siti la frequenza di rottura dipende dall'espansione delle ripetizioni.
- Siti fragili comuni (CFS): sono siti che rappresentano una normale componente della struttura cromosomica, riscontrabile in tutti gli individui. Sono relativamente ricchi in AT. La loro instabilità è correlata all'esposizione all'afidicolina (APH).
- Siti fragili precoci (ERFS): sono siti localizzati in regioni cromosomiche a replicazione precoce, con un elevato contenuto in GC e contengono un'alta densità di origini di replicazione.

# Alterazioni della sintesi del DNA nei siti fragili

I CFS sono sequenze ampiamente ripetute e per tale motivo, durante il processo replicativo, si appaiano formando dei loop o strutture a forcina che impediscono o ritardano la progressione della DNA polimerasi. Dunque quando le forcelle di replicazione sono in stallo, i siti fragili rimangono sotto replicati fino alla mitosi.

La successiva ed eventuale entrata della cellula in fase G2 con DNA che non è stato completamente replicato, induce alla formazione di gap e rotture nelle cellule in metafase.

Oltre alla replicazione tardiva, i siti fragili tendono ad essere privi di origini di replicazione, le quali per altro hanno anche una minore efficienza di attivazione, aumentando in questo modo ancora di più il rischio di fallimento della replicazione.



# Interazione tra replicazione e trascrizione

## Teoria "collisione trascrizione-replicazione"

I geni di grandi dimensioni associati ai siti fragili richiedono più di un ciclo cellulare per completare la loro trascrizione. Pertanto è facile che alcune sottoregioni di questi geni possano subire trascrizione e replicazione contemporaneamente. Ciò può causare una conseguente collisione tra l'RNA polimerasi II e il macchinario di replicazione, portando allo stallo della replicazione e alla formazione di loop R.

## Teoria "modulazione dell'origine di replicazione"

Le grandi unità di trascrizione impediscono all'origine dormiente di attivarsi in caso di stress replicativo, spostando il complesso di pre-replicazione all'interno dei siti fragili durante la fase G1.

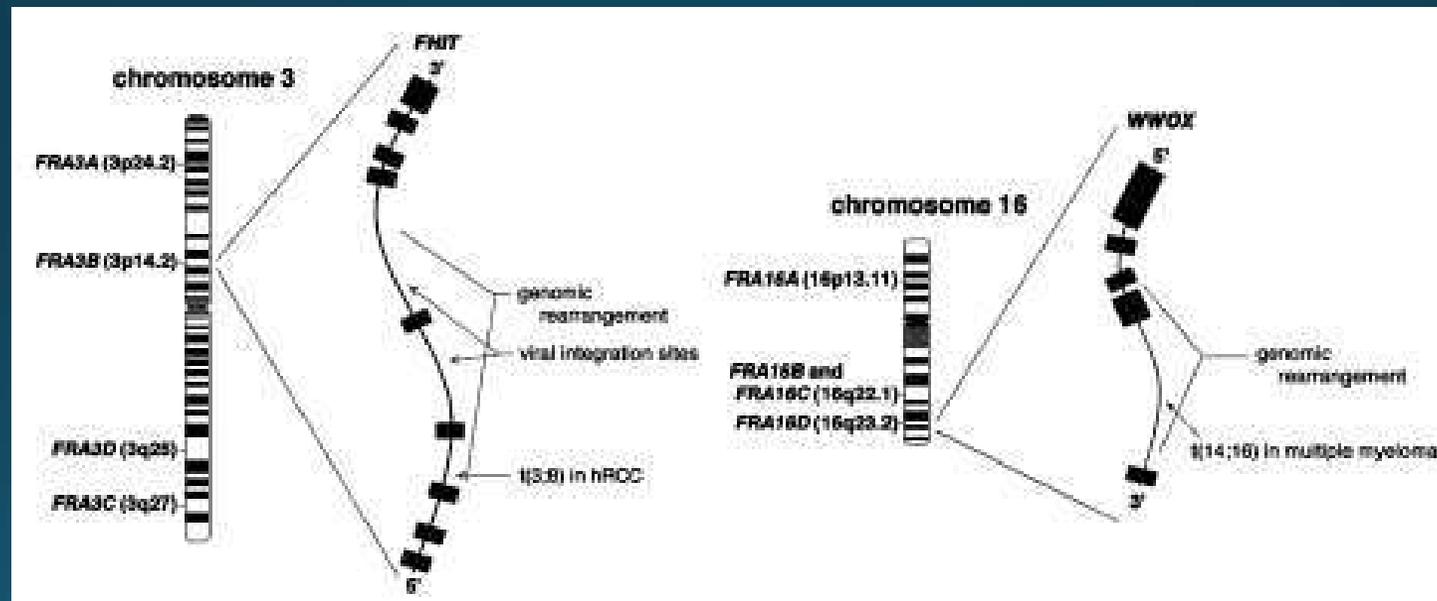
## Teoria "configurazione tridimensionale del genoma (TAD)"

La fragilità dei siti fragili è da ricercare nel contesto della configurazione tridimensionale del genoma (TAD). Infatti, alcuni studi dimostrano che i confini delle TAD coincidono con la maggior parte dei siti fragili replicati tardivamente che ospitano geni trascritti di grandi dimensioni.

# Correlazione tra l'attivazione dei siti fragili e lo sviluppo tumorale

L'attivazione dei siti fragili può rappresentare uno dei possibili eventi iniziali nella generazione di danni cromosomici legati alla progressione del tumore e alla resistenza ai farmaci terapeutici.

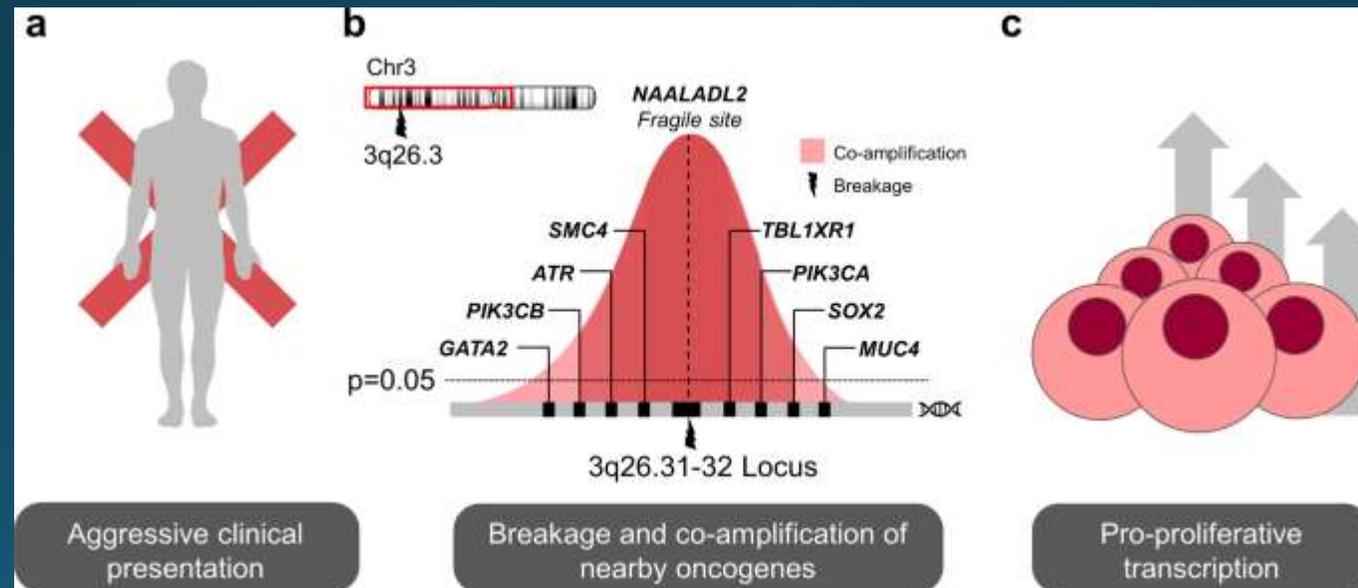
La traslocazione allelica e la perdita di omozigosi dei geni FHIT e WWOX può determinare una varietà di trasformazioni neoplastiche, tra cui il cancro del polmone, del rene, della mammella, della prostata, del fegato e del tratto gastrointestinale.



Loci FHIT e WWOX. Il gene FHIT comprende FRA3B, in 3p14.2 sul cromosoma 3, e il gene WWOX si estende su 16q23.2 sul cromosoma 16. Anche FRA3A, FRA3C, FRA3D e FRA16C sono siti fragili comuni, mentre FRA16A e FRA16B sono rari.

Anche un aumento del numero di copie (CNV), a cui vanno incontro i siti fragili rari in seguito allo stallo delle forcelle durante il processo di replicazione, può essere associato allo sviluppo e alla progressione tumorale.

Ciò accade in corrispondenza dell'*N*-acetilato alfa-linked acidic dipeptidase like-2 (NAALADL2). Gli studi di associazione genomica hanno identificato alcuni polimorfismi all'interno del locus NAALADL2 che sono correlati al rischio di sviluppo del cancro alla prostata e alla gravità della malattia. Infatti, la sovraespressione di NAALADL2 e successivamente la sua rottura, nelle linee cellulari del cancro alla prostata, può portare ad un'alterata matrice extracellulare, ad un aumento della crescita tumorale e ad un aumento della capacità invasiva.



Sito fragile NAALADL2 circondato da regioni ricche di oncogeni. La rottura del sito fragile induce all'amplificazione degli oncogeni vicini, con conseguente aumento della proliferazione cellulare.

# Correlazione tra le regioni degli FS con i siti di integrazione virale e con lo sviluppo neurologico

I siti fragili possono aiutare la tumorigenesi fornendo punti deboli per l'integrazione virale.

Utilizzando la FISH, è stato possibile mappare il sito di integrazione spontanea del virus del papilloma umano 16 (HPV16) in un carcinoma cervicale primario (PCC) nel sito fragile FRA3B.

Inoltre, i geni associati ai CFS sembrano essere coinvolti anche nello sviluppo neurologico.

**PARKIN:** primo gene fragile classico ad avere funzioni neuroprotettive, la cui mancanza causa il parkinsonismo autosomico recessivo nei giovani.

**AUTS2, IMMP2L e NRXN1:** delezioni costituzionali all'interno di questi geni sono correlati con disturbi dello spettro autistico, disabilità intellettiva e disturbi psichiatrici.

**WWOX:** gene fragile coinvolto anche nella differenziazione e nello sviluppo neurale, poiché la carenza genetica di WWOX risulta causa di epilessia, disabilità intellettiva e neuropatie degenerative. WWOX è anche incluso tra i fattori di rischio per la malattia di Alzheimer.

# Sindrome dell'X fragile

Il sito fragile coinvolto è il FRAXA.

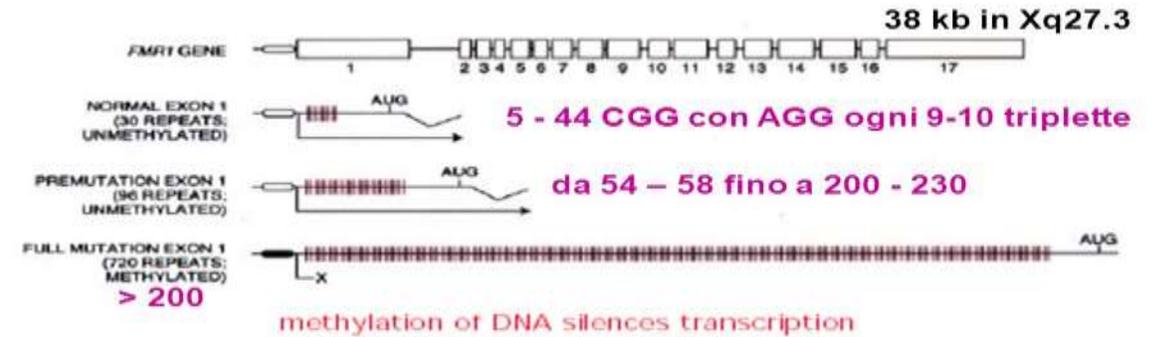
La sindrome dell'X fragile è causata da una eccessiva ripetizione della tripletta CGG, che cade nel 5'UTR del gene FMR1.

- attorno a 30 ripetizioni -> ripetizioni fisiologiche della tripletta CGG
- tra 50 e 200 ripetizioni -> malattia nella fase di premutation.
- ripetizioni superiori a 200 -> malattia nella fase di full mutation.

Il gene FMR1 codifica per la proteina FMRP. Quando il gene FMR1 viene silenziato, non viene più prodotta la proteina FMRP, determinando a livello nervoso una produzione incontrollata di neurotrasmettitori.

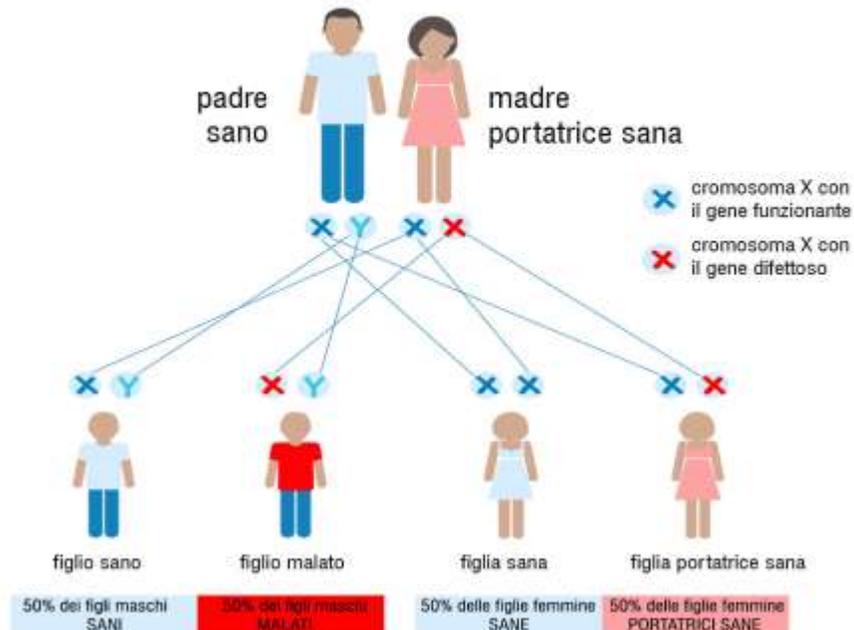
Nella Sindrome dell'X fragile, la probabilità di aggiungere triplette è molto più alta se avviene in ovogenesi piuttosto che in spermatogenesi.

## Sindrome dell' X fragile ripetizioni CGG nel 5'UTR



from Galeter et al Medical Genetics, 2nd edition, p. 189, 1998

### Ereditarietà eterosomica recessiva la madre è portatrice sana



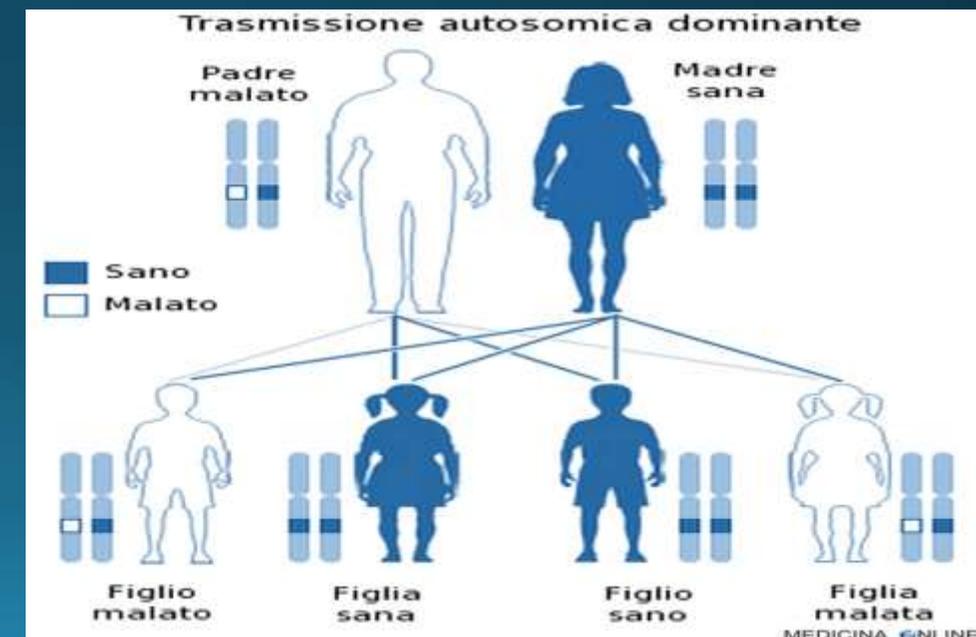
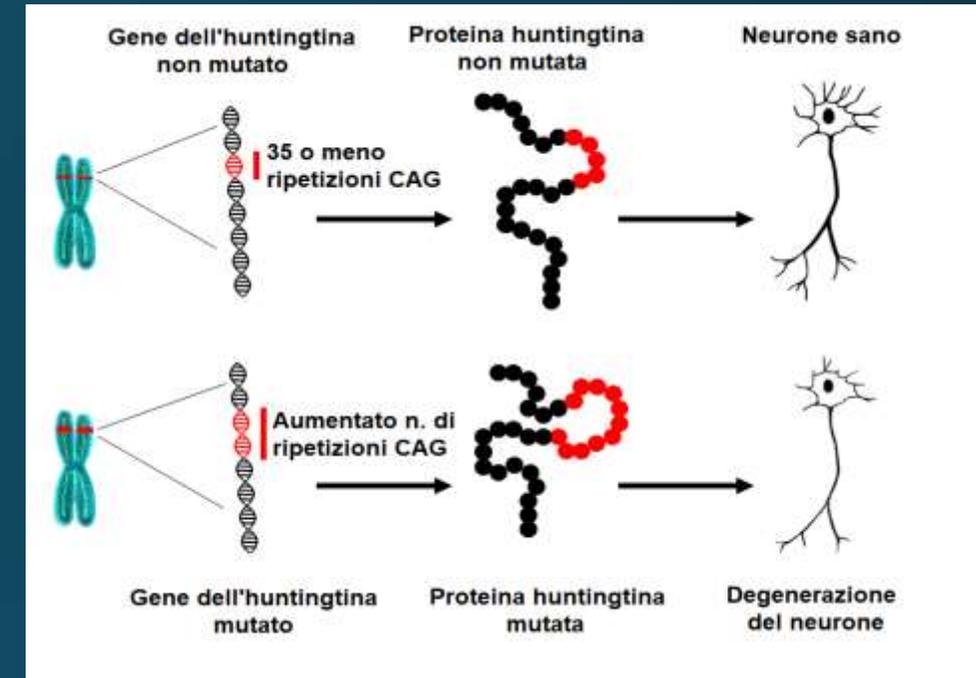
# Malattia di Huntington

La malattia di Huntington è causata da una eccessiva ripetizione della tripletta CAG, che cade all'interno della regione esonica.

- ripetizioni inferiori a 26 -> ripetizioni fisiologiche della tripletta CAG
- da 27 a 35 ripetizioni -> l'individuo non manifesta la malattia ma può trasmetterla alla progenie con una probabilità inferiore al 50%.
- tra le 36 e le 39 ripetizioni -> prima leggera neurodegenerazione.
- ripetizioni superiori a 40 -> importante neurodegenerazione.
- ripetizioni superiori a 36 -> probabilità di trasmissione della malattia superiore al 50%.

La malattia di Huntington viene ereditata in modo autosomico e dominante.

Nella malattia di Huntington, la situazione è molto più grave se il portatore sano è il padre poiché l'espansione della tripletta è a carico della spermatogenesi.



# Bibliografia

- New Era of Mapping and Understanding Common Fragile Sites: An Updated Review on Origin of Chromosome Fragility, Thomas Liehr, Friedrich Schiller University Jena, *Frontiers in Genetics*, 20 May 2022, Volume 13, Article 906957.
- The oncological relevance of fragile sites in cancer, Benjamin S. Simpson, Hayley Pye, Hayley C. Whitaker, *Communications Biology*, 12 May 2021.
- Fragilome: Determining the role of fragile sites in human disease, Manfred Schwab, *Cancer Letters* 232 (2006) 1–3, [www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet), 30 July 2005.
- Tesi triennale "Approcci di citogenetica molecolare nello studio dell'instabilità dei siti fragili", Sartori Cristina, 2010/2011.

# Riassunto

L'instabilità genetica dei siti fragili è un segno distintivo della grande maggioranza delle cellule tumorali.

Mentre la cellula normale ha evoluto meccanismi molecolari specifici per la riparazione di eventuali errori durante la replicazione del DNA e i checkpoint per mantenere la stabilità cromosomica durante la moltiplicazione cellulare, la cellula cancerosa tumorale spesso perde la capacità di mantenere l'integrità genomica. La conseguenza di ciò è un'instabilità genomica diffusa, che può essere dimostrata con riarrangiamenti cromosomici, con delezioni, traslocazioni e amplificazioni.

Una delle vie molecolari per i riarrangiamenti cromosomici parte proprio dai siti fragili, ossia regioni genomiche particolarmente predisposte a formare lacune o rotture.

L'attivazione dei siti fragili pertanto può risultare uno dei possibili eventi iniziali nella generazione di danni cromosomici legati alla progressione del tumore e alla resistenza ai farmaci terapeutici.

Inoltre, si stanno accumulando prove del fatto che i siti fragili possano essere correlati anche a tipi di malattie umane non cancerose, soprattutto a carico del sistema nervoso.