



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

---

Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders

Meccanismi molecolari alla base delle malattie da  
espansione di triplette nucleotidiche

Tesi di Laurea di:  
di:

Giorgia Mangialardo

Docente Referente  
Chiar.mo Prof.

Anna La Teana

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2020/2021

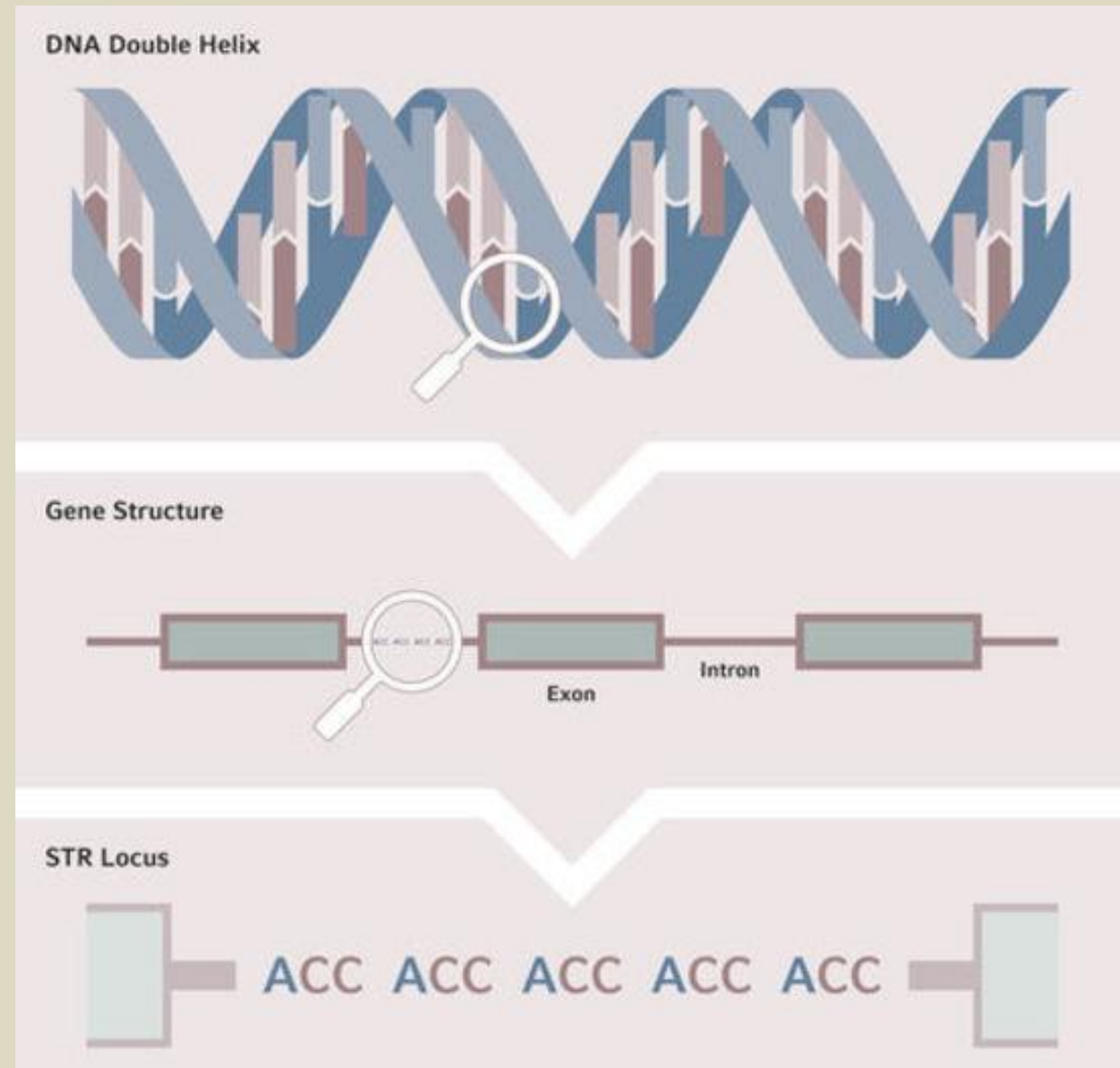
UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

# Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders

CANDIDATO: GIORGIA MANGIALARDO

TUTOR: ANNA LA TEANA

A.A. 2020/2021



- Porzioni di DNA ripetute e di lunghezza pari a circa 2-12 bp,
- Presenti nelle regioni codificanti e non del genoma,
- Intrinsecamente instabili,
- Potenzialmente patogene.

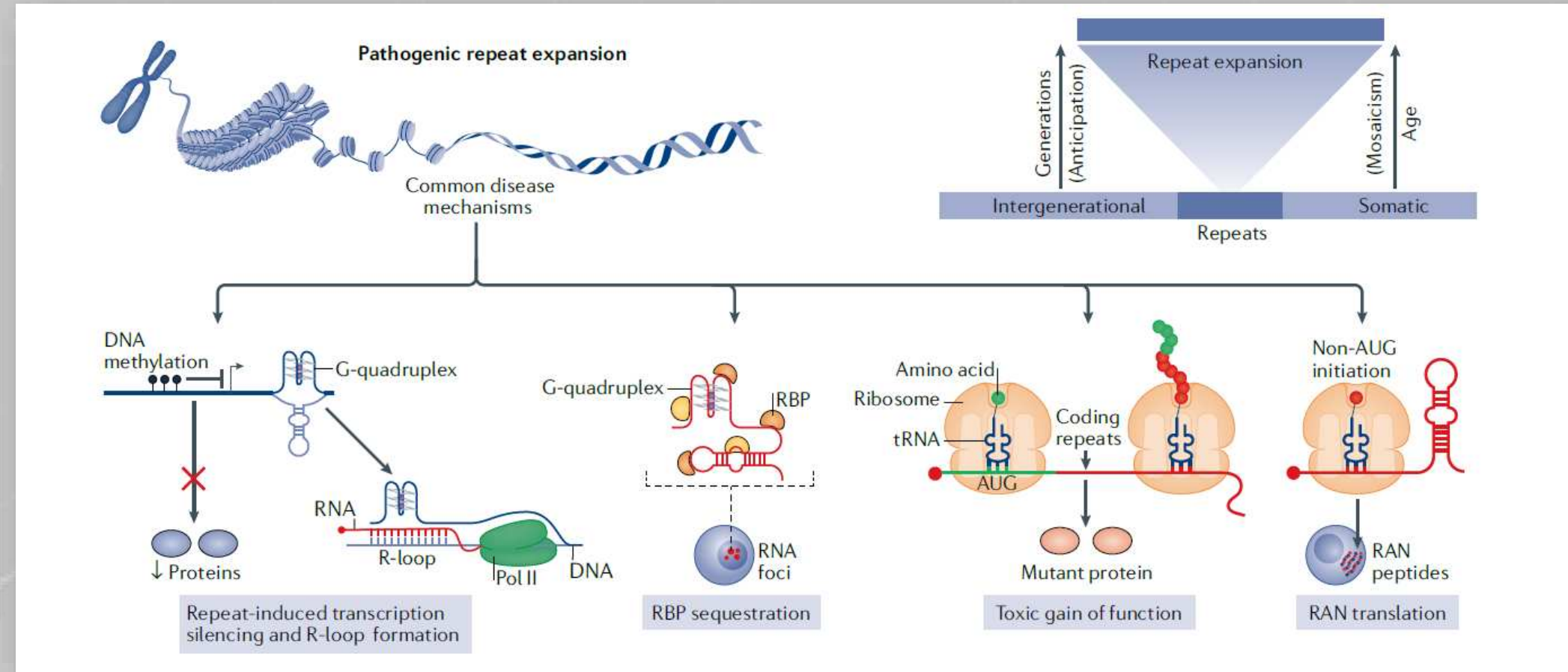
# STRs

«*Short Tandem Repeats*»

- Inducono un cambiamento strutturale del DNA,
- Causano la perdita (LOF) o il guadagno (GOF) di funzionalità nella proteina derivante,
- La patogenicità è influenzata dall'instabilità della ripetizione.

- Malik, I., Kelley, C.P., Wang, E.T., Todd, P.K. Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 22:9. 589-607. (2021).
- <https://handling-solutions.eppendorf.com/>

# La classificazione dei meccanismi patogenetici



## BASATI SUL DNA

Il silenziamento genico a livello trascrizionale e la formazione delle R-loop, con successiva attivazione della risposta al danno del DNA.

## BASATI SUL RNA

L'«RNA gelation» e il sequestro delle «RNA-Binding Proteins» (RBP).

## GOF

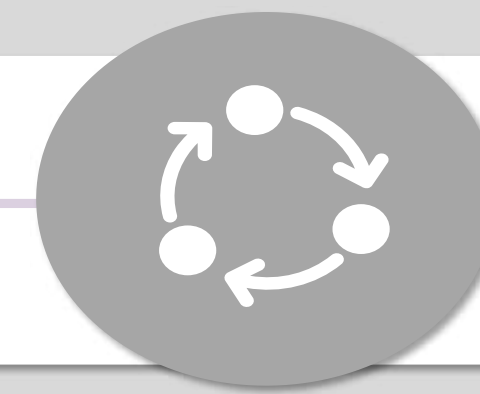
Il Guadagno di funzione (GOF) di proteine che ospitano le espansioni ripetute.

## RAN

L'«RAN translation» di peptidi tossici.



# Meccanismi patogenetici



-Morriss, G.R., Cooper, T.A. Protein sequestration as a normal function of long noncoding RNAs and a pathogenic mechanism of RNAs containing nucleotide repeat expansions. *Hum Genet.* 136:9. 1247-1263. (2017).

-Cleary, J.D., Ranum, L.P. Repeat-associated non-ATG

- (RAN) translation in neurological disease. *Hum. Mol. Genet.* 22:R1. R45-R51. (2013).

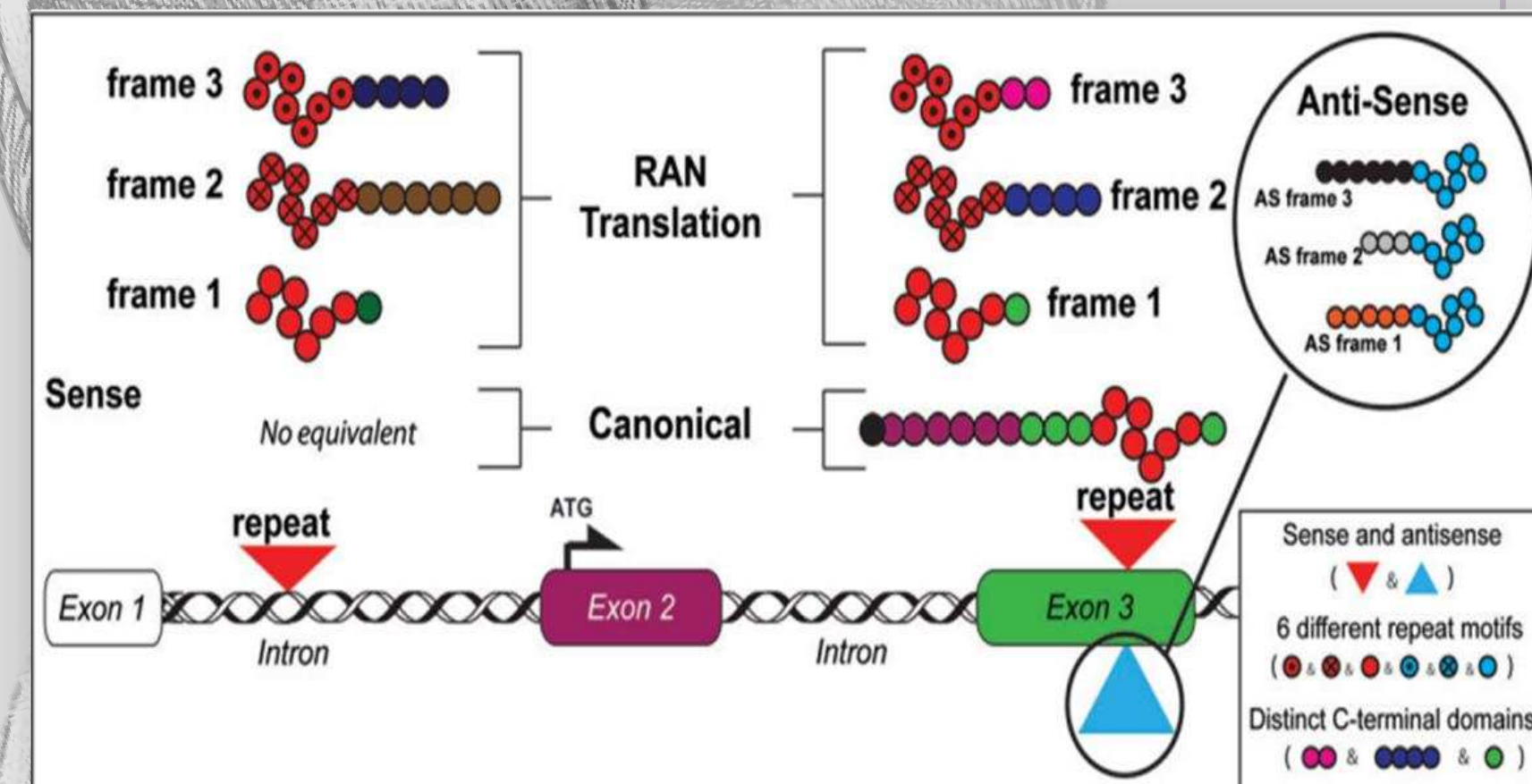
He, F., Todd, P.K. Epigenetics in nucleotide repeat expansion disorders. *Semin. Neurol.* 31(5), 470-483. (2011).

Le ripetizioni espanse possono verificarsi su tratti differenti del DNA:

- In regioni non codificanti del gene
- In regioni codificanti la proteina
- In regioni non codificanti ereditate in modo dominante

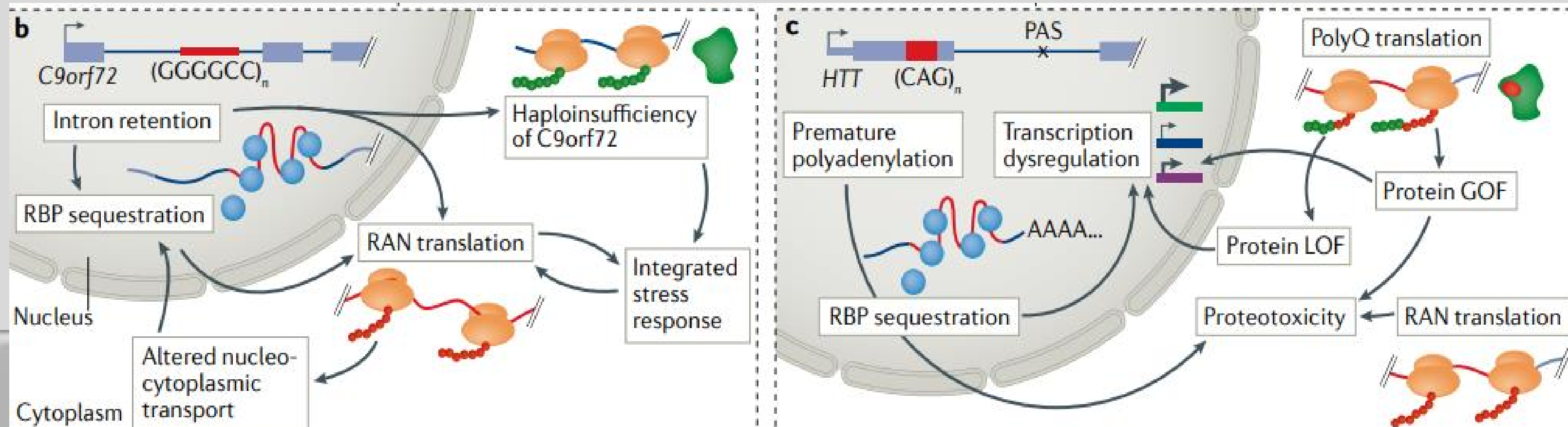
A livello del RNA le ripetizioni espanse:

- scatenano un effetto tossico di funzione per l'RNA trascritto e le proteine leganti l'RNA (le RNA-binding proteins) sono sequestrate;
- Inducono la RAN (Repeat Associated Non-AUG) translation

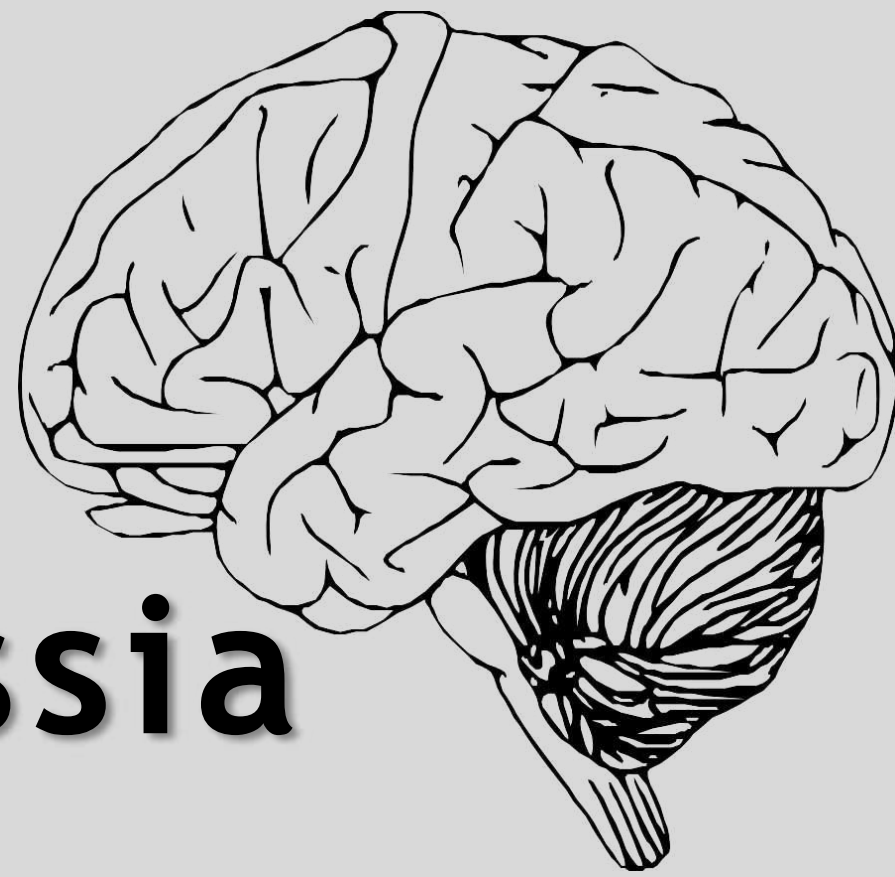


## LA SINERGIA TRA I MECCANISMI PUO' ESSERE ALLA BASE DELLE MALATTIE

- I 4 principali meccanismi molecolari possono coesistere e anche sinergizzare fino a generare una complessa patologia.
- In C9orf72 ASL/FTD, le ripetizioni GGGGCC espanse possono indurre la ritenzione di introni:
  1. aumentare il sequestro delle RBP
  2. aumentare la produzione delle ripetizioni dipeptidiche (DPR)
  3. aploinsufficienza
- Nella FXS e FXTAS la ripetizione CGG a livello della regione 5' UTR del gene FMR1 non solo può sequestrare le RBP, ma può anche aumentare la RAN translation.
- Nel morbo di Huntington, le ripetizioni CAG espanse, portano alla formazione di una huntingtina contenente una poliQ troncata.







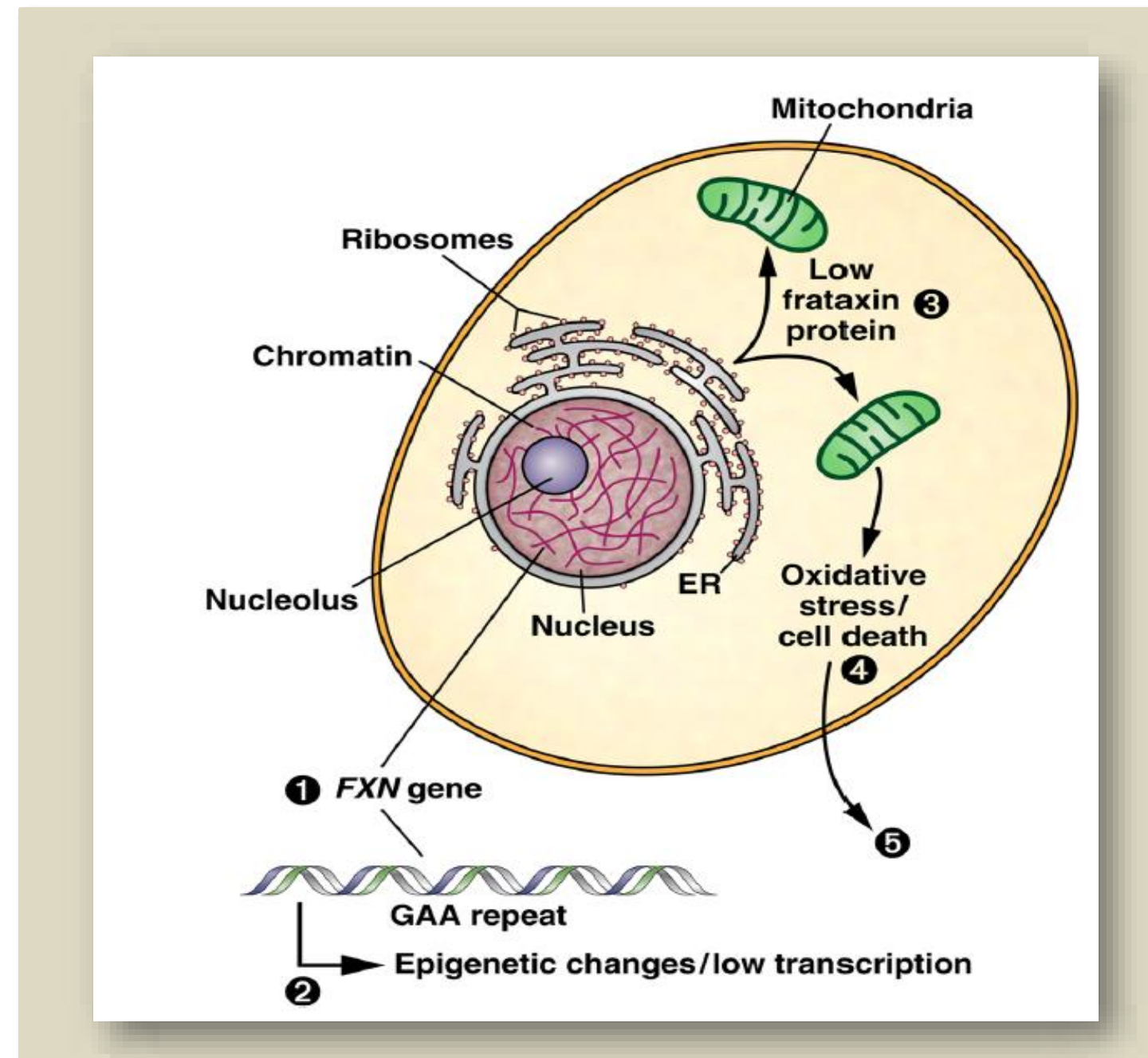
# L'Atassia di Friedreich

- *Campuzano, V. et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 271. 1423–1427. (1996).*
- *Gottesfeld, J. M. Molecular mechanisms and therapeutics for the GAA-TTC expansion disease Friedreich ataxia. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. 16. 1032–1049. (2019).*

**PATOLOGIA EREDITARIA A  
TRASMISSIONE AUTOSOMICA  
RECESSIVA E DEGENERATIVA  
DEL SISTEMA NERVOSO  
CENTRALE E PERIFERICO.**

- Sfocia nell'Atassia,
- Può essere accompagnata da malattie cardiache e diabete mellito,
- Esordio della patologia in età adolescenziale,
- Incapacità di deambulazione autonoma dopo circa 10 anni dall'esordio.

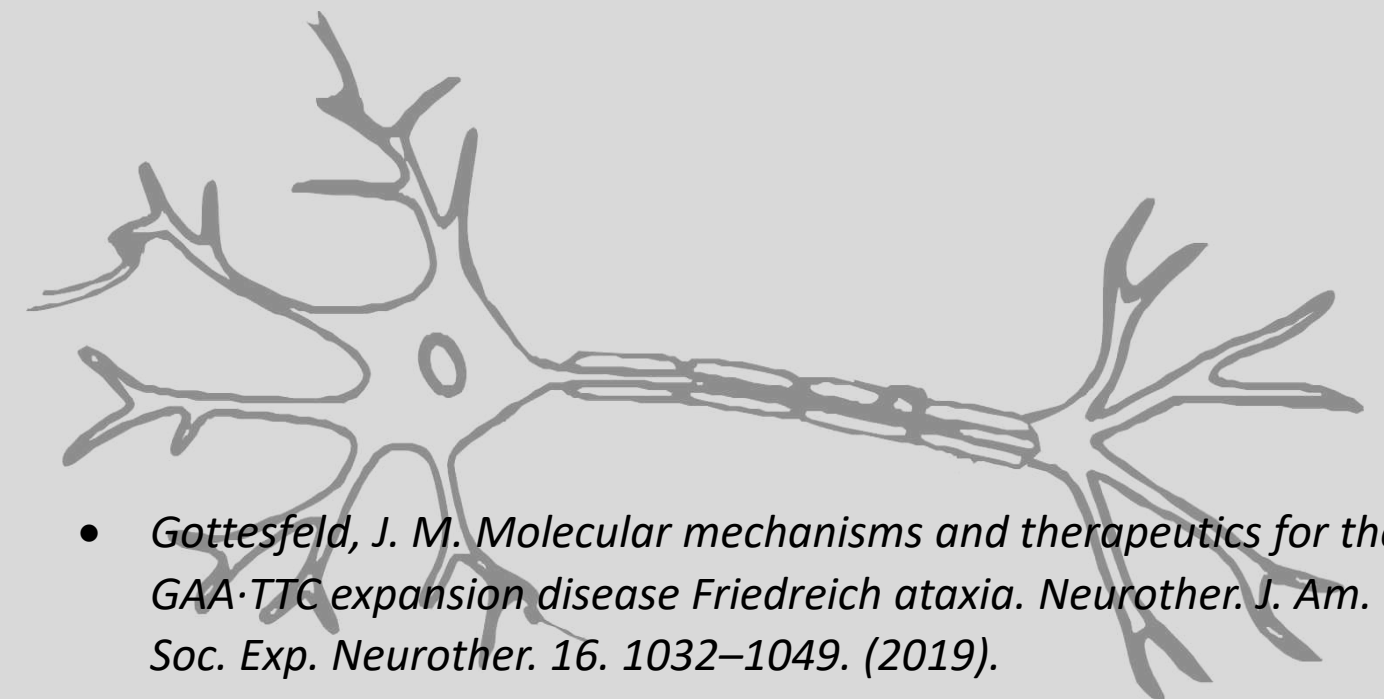
# Meccanismo patogenetico dell'Atassia di Friedreich



Mutazione del gene *FXN* localizzato sul cromosoma 9q13-q21.1 e codificante la proteina mitocondriale *fratassina*.

Le ripetizioni della tripletta GAA causano la mutazione nel primo introne del gene *FXN*.

Ripetizioni espanse oltre la soglia di 60, provocano l'inibizione della trascrizione genica e livelli minori di mRNA e di proteina *fratassina*.



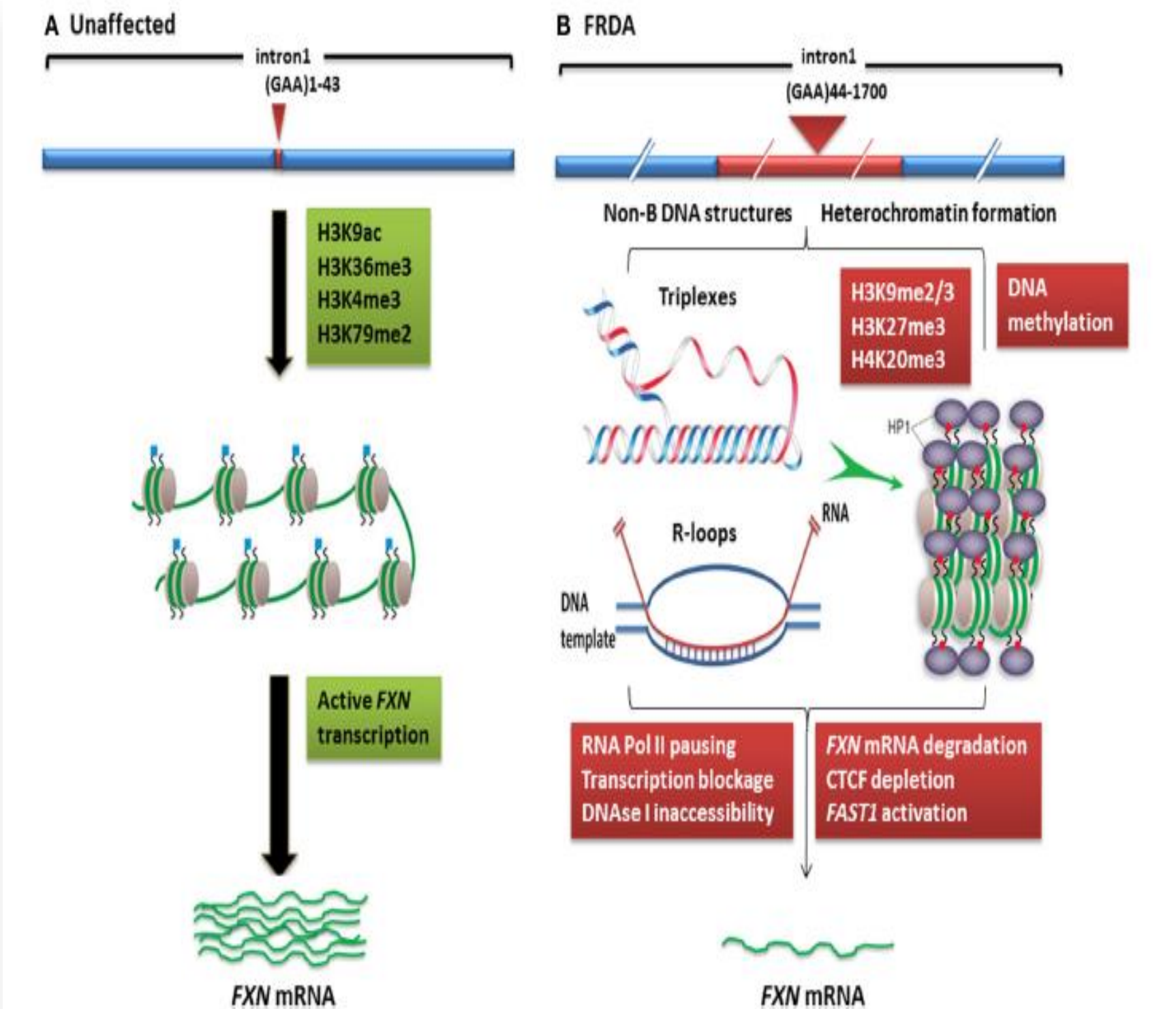
- Gottesfeld, J. M. Molecular mechanisms and therapeutics for the GAA·TTC expansion disease Friedreich ataxia. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 16. 1032–1049. (2019).



# Modelli molecolari coinvolti

Il primo : le ripetizioni della tripletta GAA portano alla formazione di una struttura del DNA insolita che impedisce l'avanzamento del RNA polimerasi e incide sulla trascrizione del gene.

Il secondo: Assemblaggio della eterocromatina *in vivo* a causa delle ripetizioni GAA e silenziamento trascrizionale del gene *FXN*, accompagnato da ipoacetilazione e metilazione di istoni (sull'*H3-H4* e *H3-Lys9*, rispettivamente).



- Elgin, S.C., Reuter, G. Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:8. a017780. (2013).
- Punga, T., Bühler, M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* 2. 120–129. (2010).
- Rodden, L. N. et al. Methylated and unmethylated epialleles support variegated epigenetic silencing in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 29. 3818–3829. (2021).

- Punga, T., Bühler, M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* 2. 120–129. (2010),
- Sandi, C., Sandi, M., Anjomani Virmouni, S., Al-Mahdawi, S., Pook, M.A. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Front. Genet.* 3:5. 165. (2014).

# Approcci terapeutici

## Therapeutic opportunities for Friedreich ataxia

- ① Genetic correction of the repeats -- CRISPR/Cas9 or other genome editing methods
- ② Increase transcription -- artificial transcription factors/ epigenetic drugs/transcription inducers
- ③ Protein replacement -- TAT-FXN/cell therapy/gene therapy/ FXN stabilization/translation inducers
- ④ Reverse mitochondrial dysfunction -- Antioxidants/dPUFAs/drugs to reverse oxidative stress
- ⑤ Symptomatic relief  
Various therapies being tested

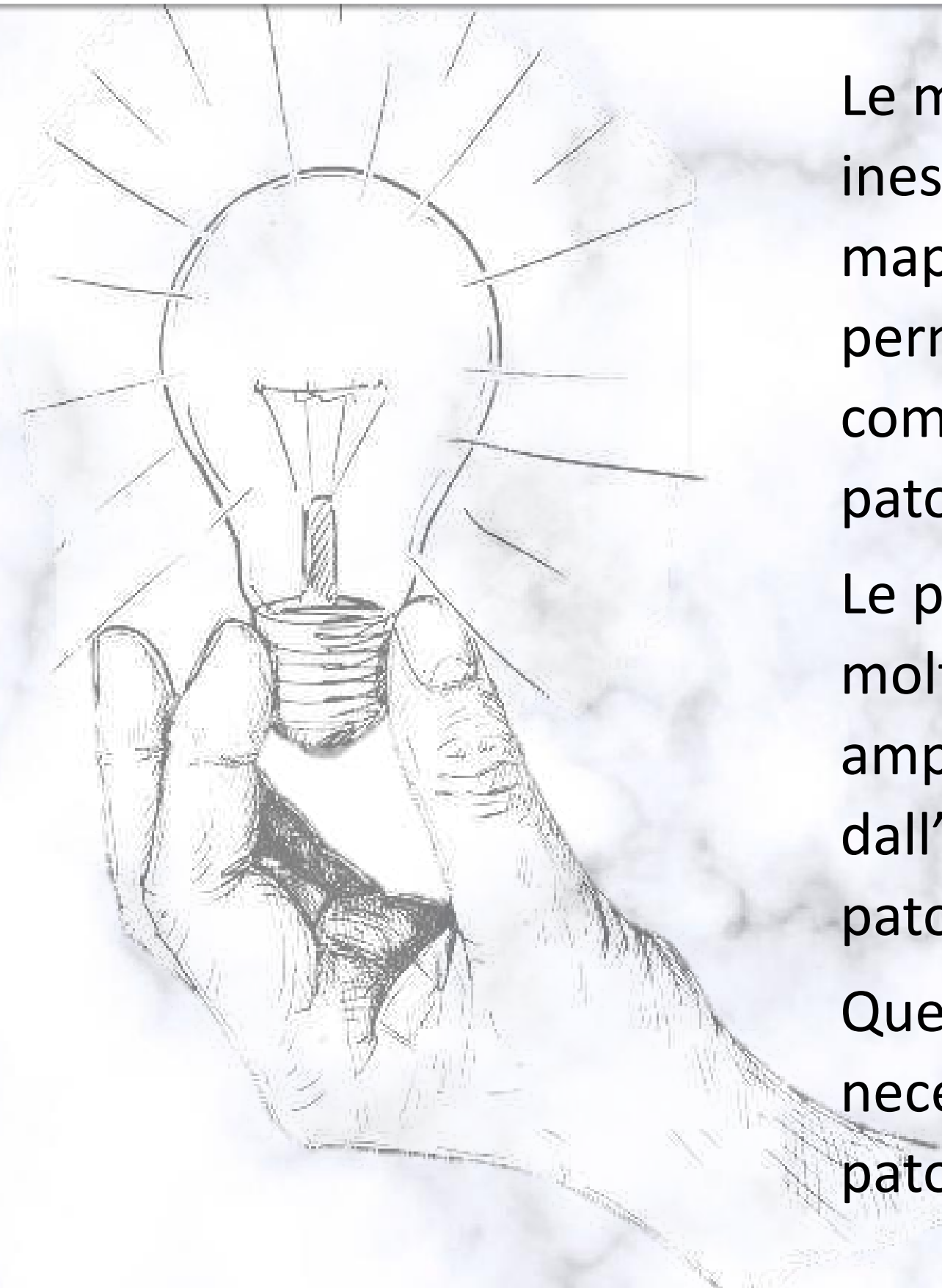
- Gottesfeld, J. M. Molecular mechanisms and therapeutics for the GAA·TTC expansion disease Friedreich ataxia. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 16. 1032–1049 (2019).
- Lynch, D.R., Schadt, K., Kichula, E., McCormack, S., Lin, K.Y. Friedreich Ataxia: Multidisciplinary Clinical Care. *J Multidiscip Healthc.* 14. 1645-1658. (2021).

# Conclusioni

Le mutazioni da espansione di nucleotidi sono state a lungo un luogo inesplorato della genetica. Solamente negli ultimi 4 anni sono state mappate il 28% delle espansioni ripetute associate alle malattie, permettendo la costruzione di una mappa che ci guida nella comprensione dei principali meccanismi che portano alla loro patogenicità.

Le patologie innescate dalle ripetizioni trinucleotidiche sono molteplici e possono coinvolgere differenti geni sfociando in un ampio range di disturbi, la cui diversificazione e gravità dipendono dall'entità dell'espansione e dalla sinergia di due o più dei meccanismi patogenici descritti precedentemente.

Questo ci suggerisce che, a volte, degli approcci combinati sono necessari per agire contemporaneamente su più meccanismi patogenici.





# RIASSUNTO ESTESO

Le “*Short Tandem Repeats*” (STRs), anche detti microsatelli, sono porzioni di DNA ripetute e di lunghezza pari a circa 2-12 bp, presenti nelle regioni codificanti e non del genoma. Intrinsecamente risultano essere instabili a causa dell’alto grado di polimorfismo di lunghezza, e questa instabilità è anche la causa della loro potenzialità patogena.

I meccanismi patogeni da ripetizioni trinucleotidiche possono essere suddivisi in quattro categorie:

- I meccanismi basati sul DNA come il *silenzamento genico a livello trascrizionale* e *la formazione delle R-loop* con successiva attivazione della risposta al danno del DNA;
- “*L’RNA gelation*” e il sequestro delle proteine che legano l’RNA (*RNA-binding proteins, RBP*);
- Il *Guadagno di funzione (GOF)* di proteine che ospitano le espansioni ripetute;
- *L’RAN translation* di peptidi tossici.

Successivamente sarà focalizzata l’attenzione sui meccanismi che coinvolgono il silenzamento genico a livello trascrizionale in assenza di metilazione di DNA, con la perdita di funzione proteica e che causano l’insorgenza dell’Atassia di Friedreich.

L’Atassia di Fredreich è una patologia neurodegenerativa ed ereditaria derivante dalla ripetizione della tripletta GAA. Le ripetizioni silenziano la trascrizione del gene *FXN*, comportando la carenza della proteina *fratassina* che provoca l’insorgenza dell’atassia, con differenti complicanze annesse (come il diabete mellito e patologie cardiache). Nonostante la patologia sia rara, diversi approcci terapeutici sono stati messi a punto, basati sui meccanismi molecolari coinvolti nella FRDA. Tuttavia, rimane insoluto il motivo per cui alcune cellule e tessuti siano più vulnerabili alla carenza della *fratassina*. Le prospettive future mirano quindi alla conoscenza per cui alcuni tessuti sono più colpiti, con il tentativo di trovare nuove strategie terapeutiche indirizzate a questo.