

## Malattia di Huntington

Malattie da **espansioni di triplette**: espansione, in regioni **codificanti** e **non codificanti**, di triplette instabili di nucleotidi

Malattie da poliglutammine (**CAG**  **Q**)

Sindrome X-fragile

Perdita di funzione

Atassia di Friedreich

Disease	MIM Number	Repeat unit	Gene product	Normal repeat	Expanded repeat	Main clinical features length
<i>Loss of function mechanism</i>						
FRAXA	309550	(CGC) <sub>n</sub>	FMRP	6-60	>200 (full mutation)	Mental retardation, macroorchidism, connective tissue defects, behavioral abnormalities
FRAXE	309548	(CCG) <sub>n</sub>	FMR2	4-39	200-900	Mental retardation
FRDA	229300	(GAA) <sub>n</sub>	Frxataxin	6-32	200-1700	Sensory ataxia, cardiomyopathy, diabetes
<i>RNA-mediated pathogenesis</i>						
DM1	160900	(CTG) <sub>n</sub>	DMPK	5-37	50-10,000	Myotonia, weakness, cardiac conduction defects, insulin resistance, cataracts, testicular atrophy, and mental retardation in congenital form
DM2	602668	(CCTG) <sub>n</sub>	ZNF9	10-26	75-11,000	Similar to DM1 but no congenital form
FXTAS	309550	(CGG) <sub>n</sub>	FMR1 RNA	6-60	60-200 (premutation)	Ataxia, tremor, Parkinsonism, and dementia

Distrofia miotonica

RNA "tossici"

Huntington

Acquisto di funzione “tossica”

Table 2 Polyglutamine disorders<sup>a</sup> caused by a gain-of-function mechanism

Disease	MIM number	Gene product	Normal repeat length	Expanded repeat length	Main clinical features
HD	143100	Huntingtin	6–34	36–121	Chorea, dystonia, cognitive deficits, psychiatric problems
SCA1	164400	Ataxin1	6–44 <sup>b</sup>	39–82	Ataxia, slurred speech, spasticity, cognitive impairments
SCA2	183090	Ataxin2	15–24	32–200	Ataxia, polyneuropathy, decreased reflexes, infantile variant with retinopathy
SCA3	109150	Ataxin3	13–36	61–84	Ataxia, parkinsonism, spasticity
SCA6	183086	CACNA1A	4–19	10–33	Ataxia, dysarthria, nystagmus, tremors
SCA7	164500	Ataxin7	4–35	37–306	Ataxia, blindness, cardiac failure in infantile form
SCA17	607136	TBP	25–42	47–63	Ataxia, cognitive decline, seizures, and psychiatric problems
SBMA	313200	Androgen receptor	9–36	38–62	Motor weakness, swallowing, gynecomastia, decreased fertility
DRPLA	125370	Atrophin	7–34	49–88	Ataxia, seizures, choreoathetosis, dementia

Atassie spinocerebellari

Malattia di Kennedy

## manifestazioni cliniche

- ✓ Huntingtina è espressa sempre
- ✓ L'Huntington si manifesta tra i 35 e i 50 anni
  - <20 anni : variante giovanile(fenotipo più severo)
  - >60 anni : variante senile (fenotipo più attenuato)
- ✓ Autosomica dominante; 5-10 casi ogni 100000 individui

Sintomi:

motori

Movimenti goffi  
Lievi difficoltà nei movimenti oculari  
Lievi movimenti incontrollati

Perdita della coordinazione dei movimenti volontari

Movimenti involontari di tutta la muscolatura  
Perdita muscolare e di peso



Sintomi:

cognitivi

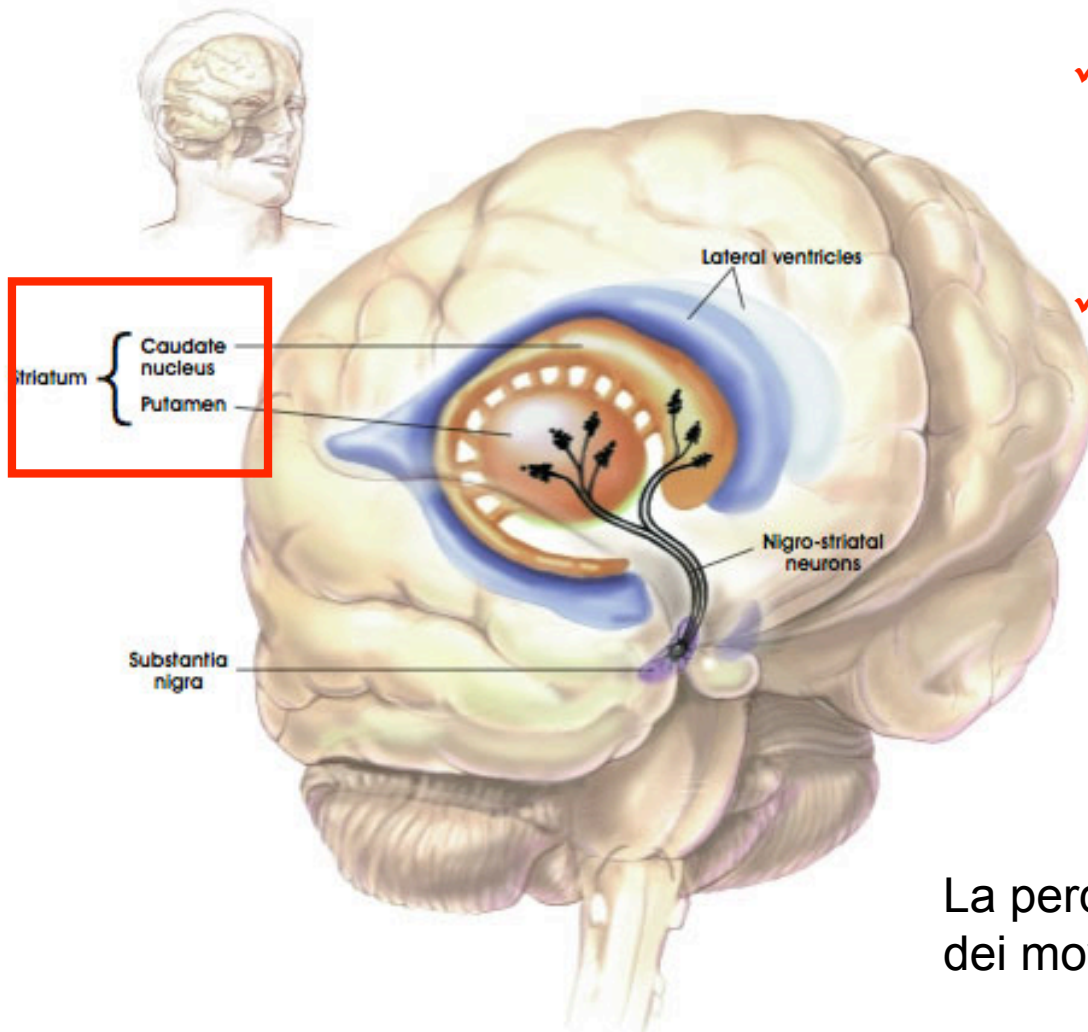
Rallentamento delle capacità  
Intellettive (anche molti anni prima  
Dei sintomi motori)

Difetti cognitivi.....Demenza

Sindromi psichiatriche  
(maniache depressive,  
Alterazioni della personalità)

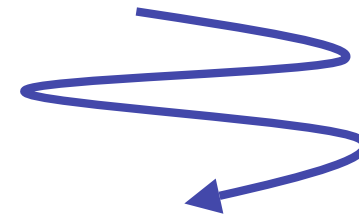
- ✓ Morte (15-20 anni) per complicazioni cardiache e polmonari
- ✓ No cura

# neuropatologia

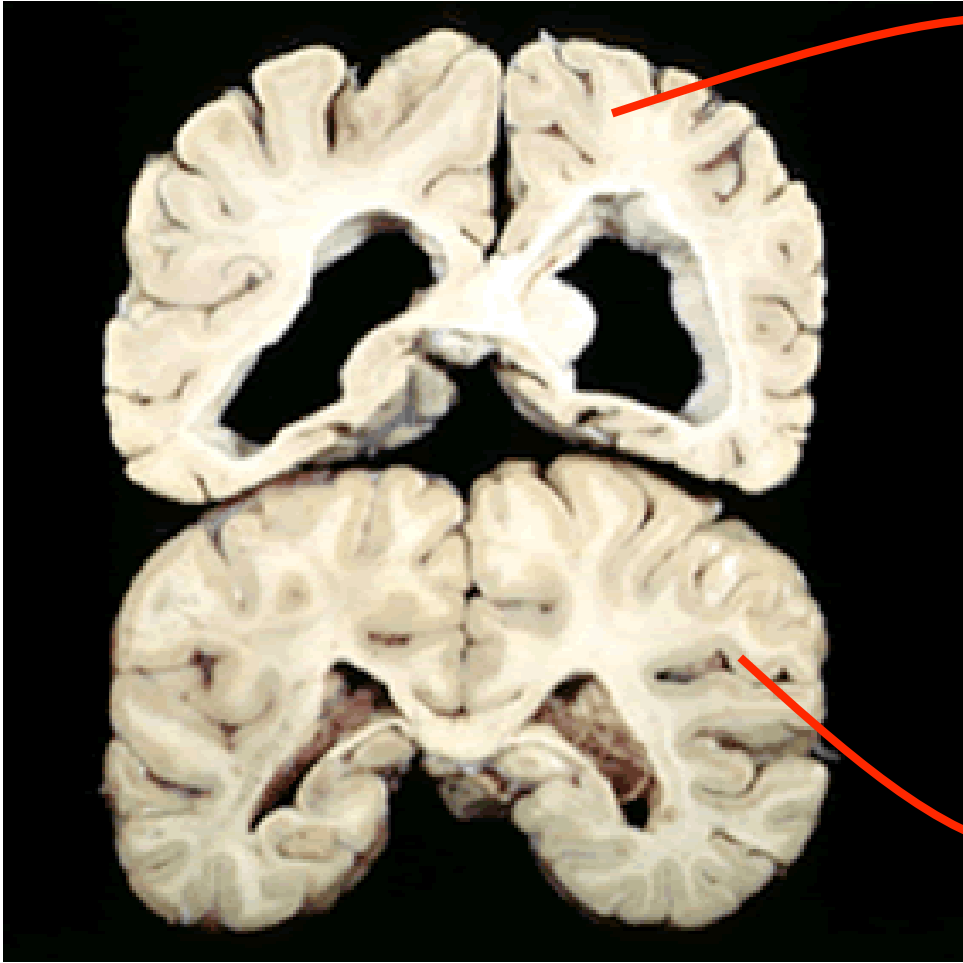


✓ graduale atrofia dello STRIATO  
nucleo caudato  
putamen

✓ Neuroni spinosi medi  
95% dei neuroni striatali  
neurotrasmettitore  
inibitorio GABA  
azione inibitoria

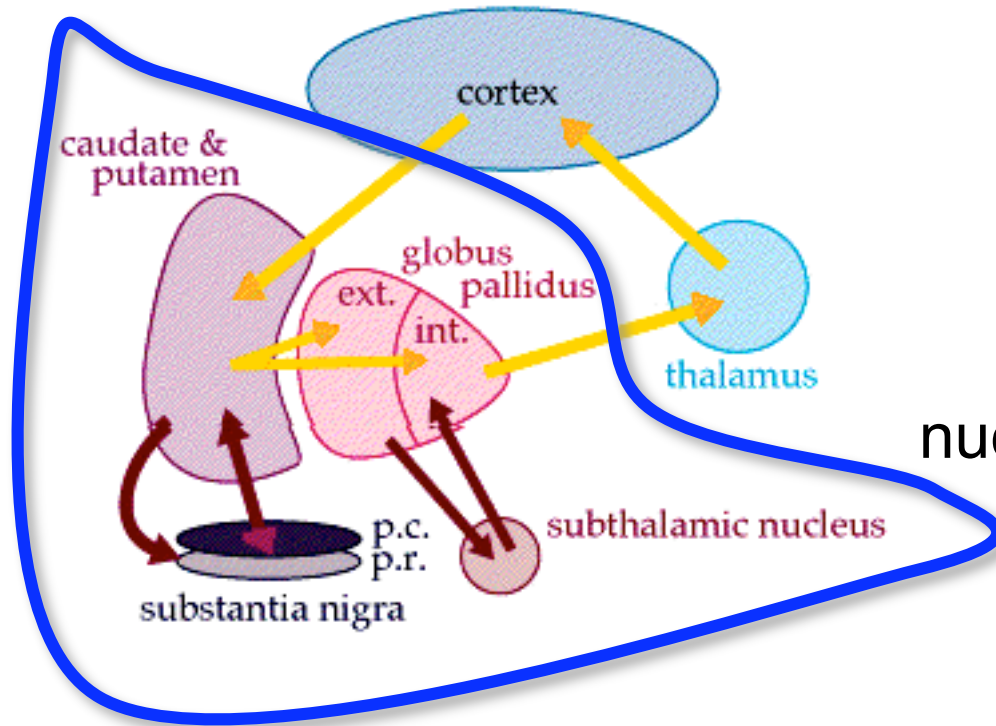


La perdita degli input inibitori è la causa  
dei movimenti incontrollati caratteristici



Huntington

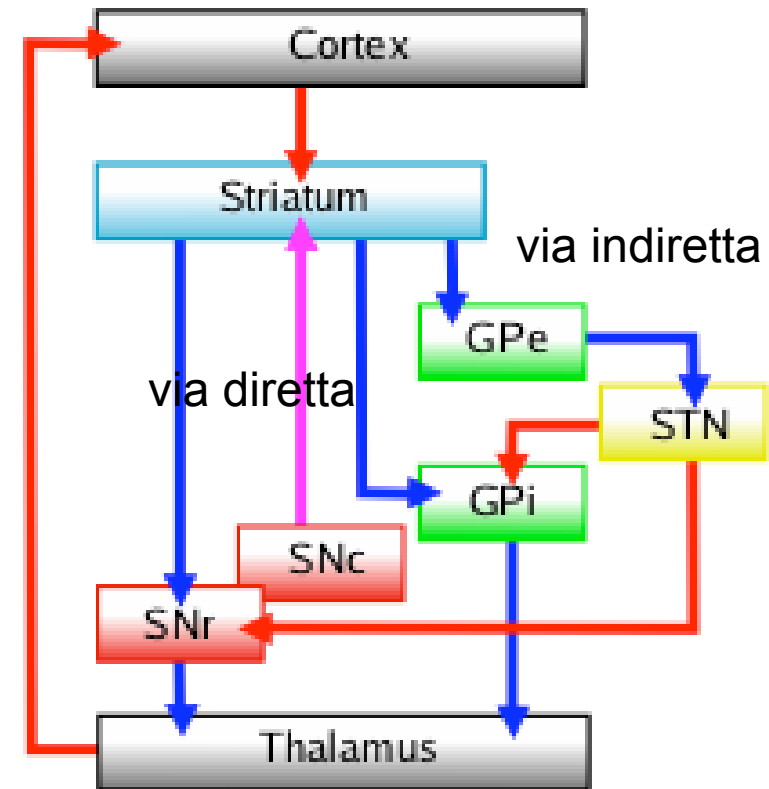
Normale

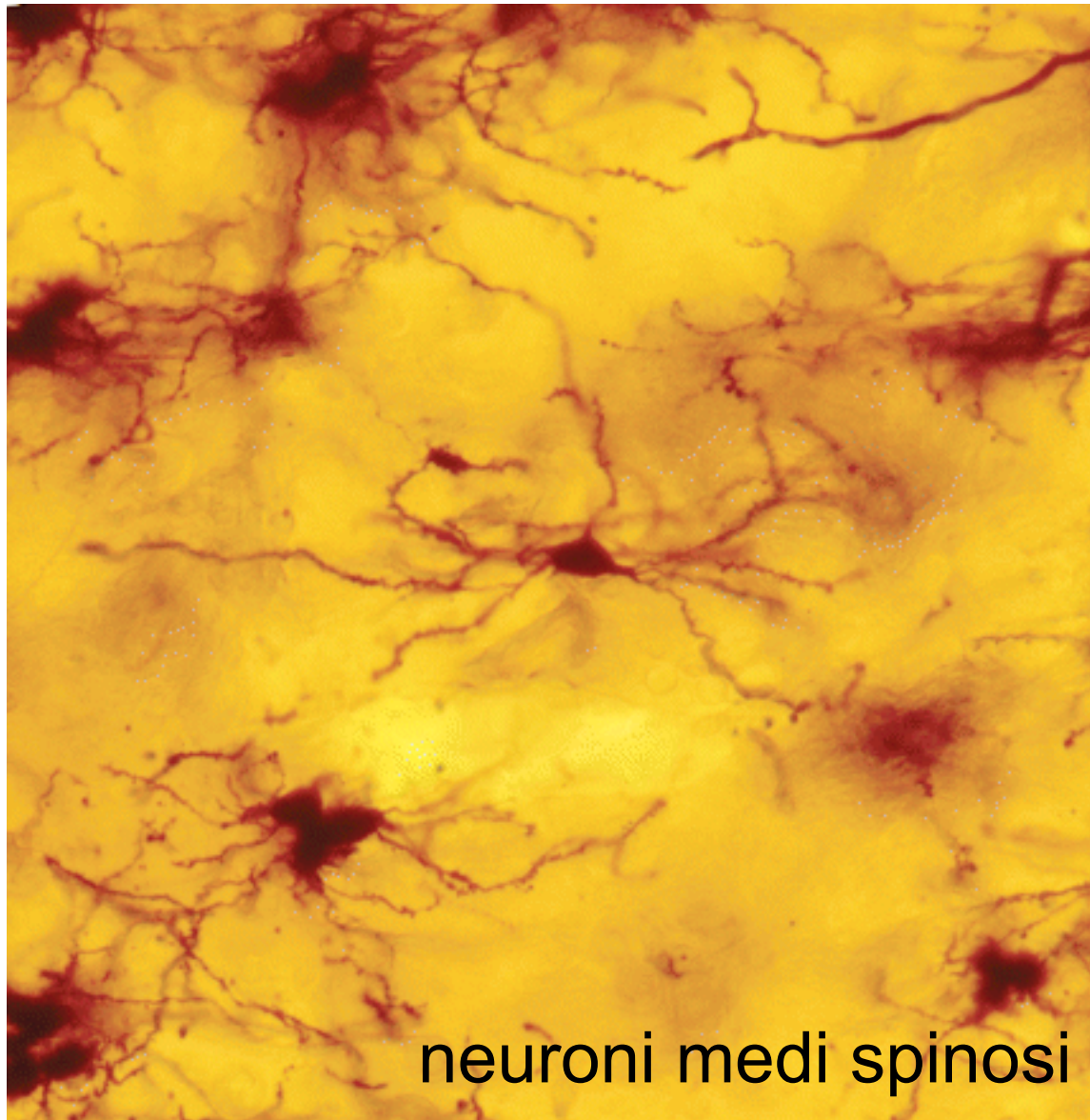


nuclei della base

Glutamatergiche  
Dopaminergiche  
GABAergiche

Controllo motorio  
Processi cognitivi  
Emozioni

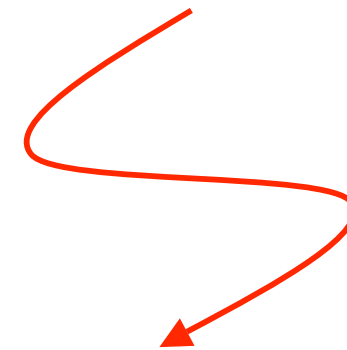




neuroni medi spinosi:

✓ 95% neuroni striatali

✓ azione inibitoria



perdita input inibitori



movimenti incontrollati

# A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes

## The Huntington's Disease Collaborative Research Group\*

\*The Huntington's Disease Collaborative Research Group comprises:

### Group 1:

**Marcy E. MacDonald,<sup>1</sup> Christine M. Ambrose,<sup>1</sup> Mabel P. Duyao,<sup>1</sup> Richard H. Myers,<sup>2</sup> Carol Lin,<sup>1</sup> Lakshmi Srinidhi,<sup>1</sup> Glenn Barnes,<sup>1</sup> Sherryl A. Taylor,<sup>1</sup> Marianne James,<sup>1</sup> Nicolet Groot,<sup>1</sup> Heather MacFarlane,<sup>1</sup> Barbara Jenkins,<sup>1</sup> Mary Anne Anderson,<sup>1</sup> Nancy S. Wexler,<sup>3</sup> and James F. Gusella<sup>1†</sup>**

<sup>1</sup>Molecular Neurogenetics Unit  
Massachusetts General Hospital  
and Department of Genetics  
Harvard Medical School  
Boston, Massachusetts 02114

<sup>2</sup>Department of Neurology  
Boston University Medical School  
Boston, Massachusetts 02118

<sup>3</sup>Hereditary Disease Foundation  
1427 7th Street, Suite 2  
Santa Monica, California 90401

### Group 2:

**Gillian P. Bates, Sarah Baxendale, Holger Hummerich, Susan Kirby, Mike North, Sandra Youngman, Richard Mott, Gunther Zehetner, Zdenek Sedlacek, Annemarie Poustka, Anna-Maria Frischauf, and Hans Lehrach**

Genome Analysis Laboratory  
Imperial Cancer Research Fund  
Lincoln's Inn Fields  
London, WC2A 3PX, England

### Group 3:

**Alan J. Buckler,<sup>1</sup> Deanna Church,<sup>1</sup> Lynn Doucette-Stamm,<sup>1</sup> Michael C. O'Donovan,<sup>1</sup>**

**Laura Riba-Ramirez,<sup>1</sup> Manish Shah,<sup>1</sup> Vincent P. Stanton,<sup>1</sup> Scott A. Strobel,<sup>2</sup> Karen M. Draths,<sup>2</sup> Jennifer L. Wales,<sup>2</sup> Peter Dervan,<sup>2</sup> and David E. Housman<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Center for Cancer Research  
Massachusetts Institute of Technology  
Cambridge, Massachusetts 02139

<sup>2</sup>Division of Chemistry and Chemical Engineering  
California Institute of Technology  
Pasadena, California 91125

### Group 4:

**Michael Altherr, Rita Shiang, Leslie Thompson, Thomas Fielder, and John J. Wasmuth**

Department of Biological Chemistry  
University of California  
Irvine, California 92717

### Group 5:

**Danilo Tagle, John Valdes, Lawrence Elmer, Marc Allard, Lucio Castilla, Manju Swaroop, Kris Blanchard, and Francis S. Collins**

Department of Internal Medicine and Human Genetics  
and The Howard Hughes Medical Institute  
University of Michigan  
Ann Arbor, Michigan 48109

### Group 6:

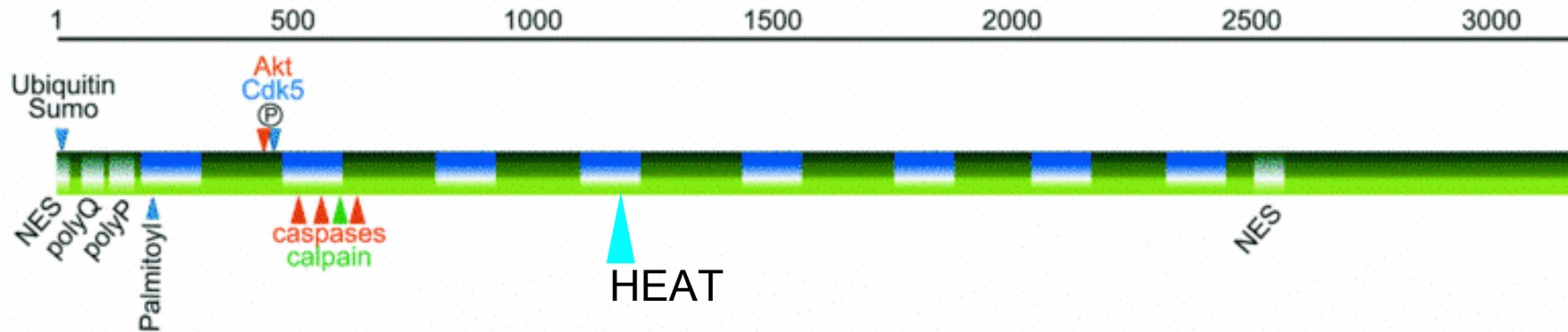
**Russell Snell, Tracey Holloway, Kathleen Gillespie, Nicole Datson, Duncan Shaw, and Peter S. Harper**

Institute of Medical Genetics  
University of Wales College of Medicine  
Cardiff, CF4 4XN, Wales

<sup>†</sup>Correspondence should be addressed to James F. Gusella.

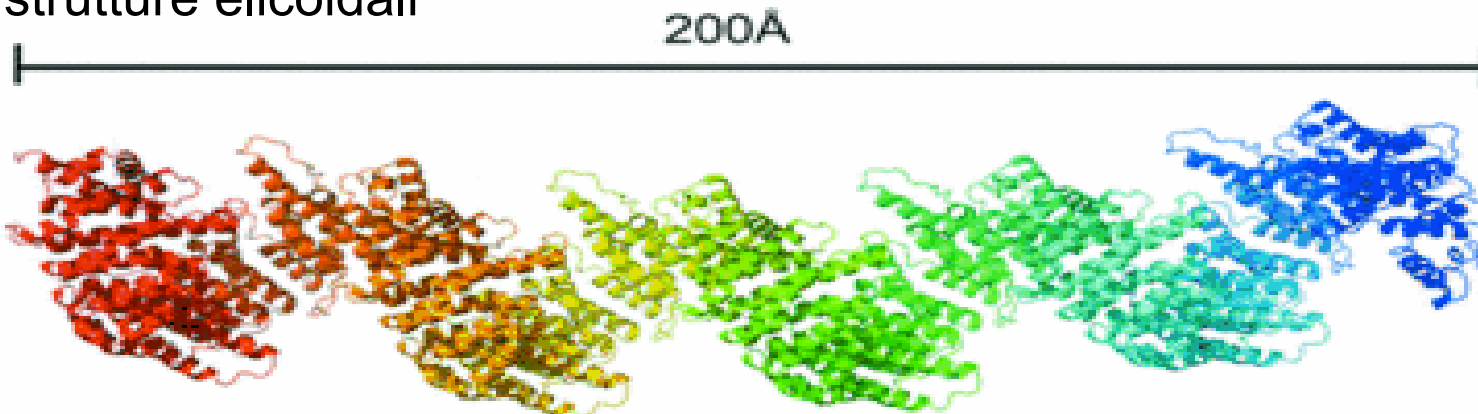


# Huntingtina (Htt)

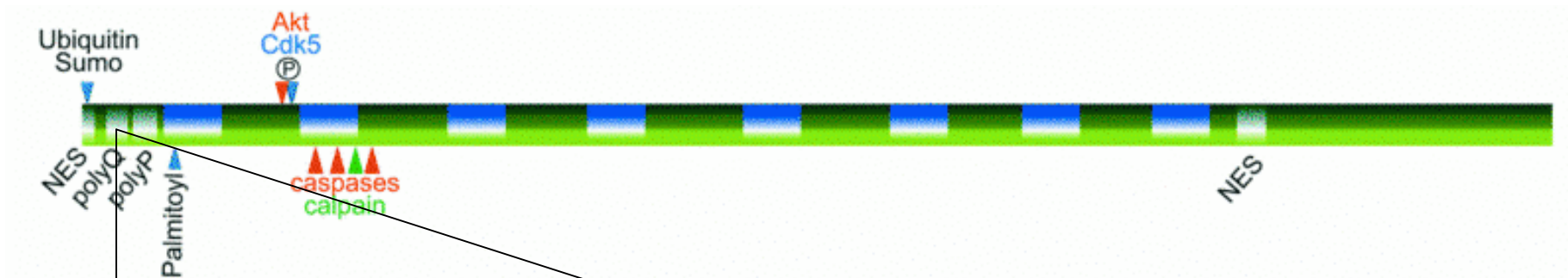


- ✓ 3100 aa, 350kDa
- ✓ 67 esoni, 200kb
- ✓ Poli CAG (6-35)
- ✓ Domini HEAT: 28-36

interazione proteina-proteina  
strutture elicoidali



# Huntingtina mutata (mtHtt)



CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG

✓ Espansione CAG all'estremità 5' in esone 1

35-39 insorgenza tardiva

40-50 insorgenza tipica

>50 forme giovanili

✓ Il numero di triplette CAG è il determinante primario della severità della malattia (30-60% della variabilità nella età di insorgenza)

✓ Anticipazione



## Anticipazione

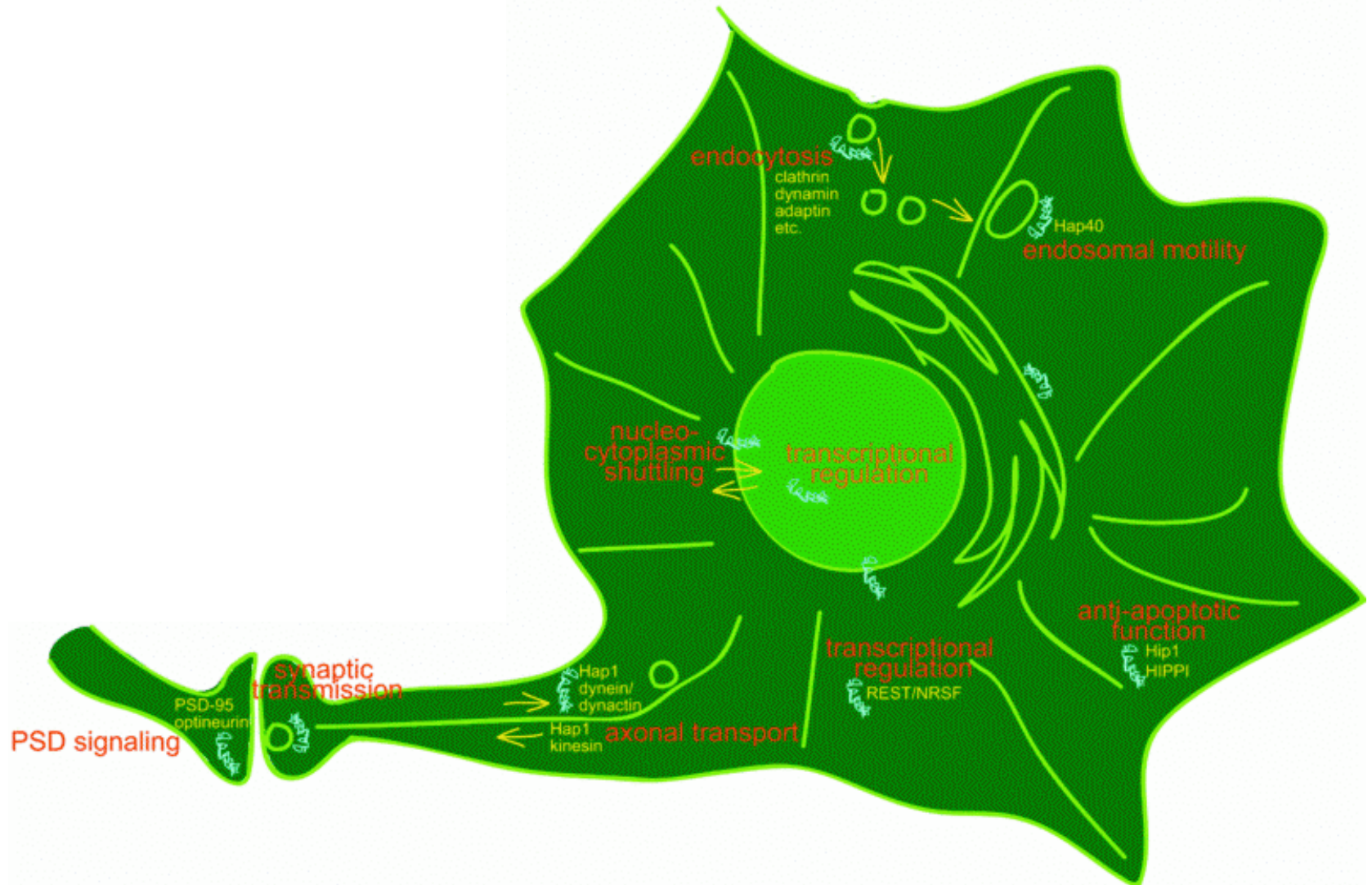
- Fenomeno connesso all'espansione del numero di triplette nelle generazioni.
- Determina la tendenza della malattia a divenire più grave nelle generazioni successive.
- Caratteristica comune a tutte le malattie da instabilità del DNA.

# Ruolo dell'Huntingtina

Essenziale nello sviluppo (KO letale embrionale)

Espressa in tutti i tessuti e in diversi compartimenti cellulari

234 proteine identificate che interagiscono con Htt



Region of HTT	Cellular pathway	Interacting protein
(a) NH <sub>2</sub> -terminal portion (with polyQ)	Transcription	Sp1
		RAP30
		CBP
		P53
		PQBP-1
	Subcellular location	SD-95
		tubulin
		HIP1
		HAP1
		FBP-11
	RNA processing	HYPC
		sympkin
		EGFR
		IP <sub>3</sub> R1
Receptors	E2-25 kd	
Degradation		
(b) COOH-terminal HEAT repeats	Transcription	NF-κB
		P50

Traffico delle proteine  
 Trasporto delle vescicole  
 Endocitosi

Regolazione della trascrizione  
 Funzioni anti-apoptotiche  
 Segnalazione post-sinaptica

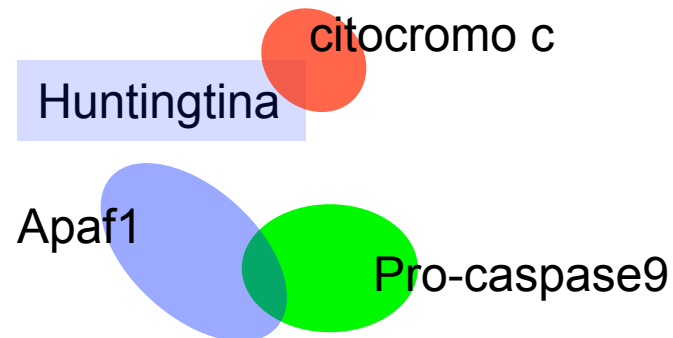
- ✓ Alcune di queste interazioni hanno una sicura rilevanza funzionale



Regola l'ancoraggio dei recettori NMDA e del kainato alla membrana post-sinaptica



Inibisce complesso di trascrizione per l'espressione del BDNF



Impedisce la formazione di un apoptosoma funzionale e la conseguente attivazione caspasi esecutrici

## Modelli transgenici di HD

✓ **1996**: creazione del primo topo transgenico, in cui fu inserito l'esone 1 del gene umano **mutato** (45 repeats) che codifica per l'huntingtina.

Normale sviluppo fino alle cinque settimane di vita

Successivamente:

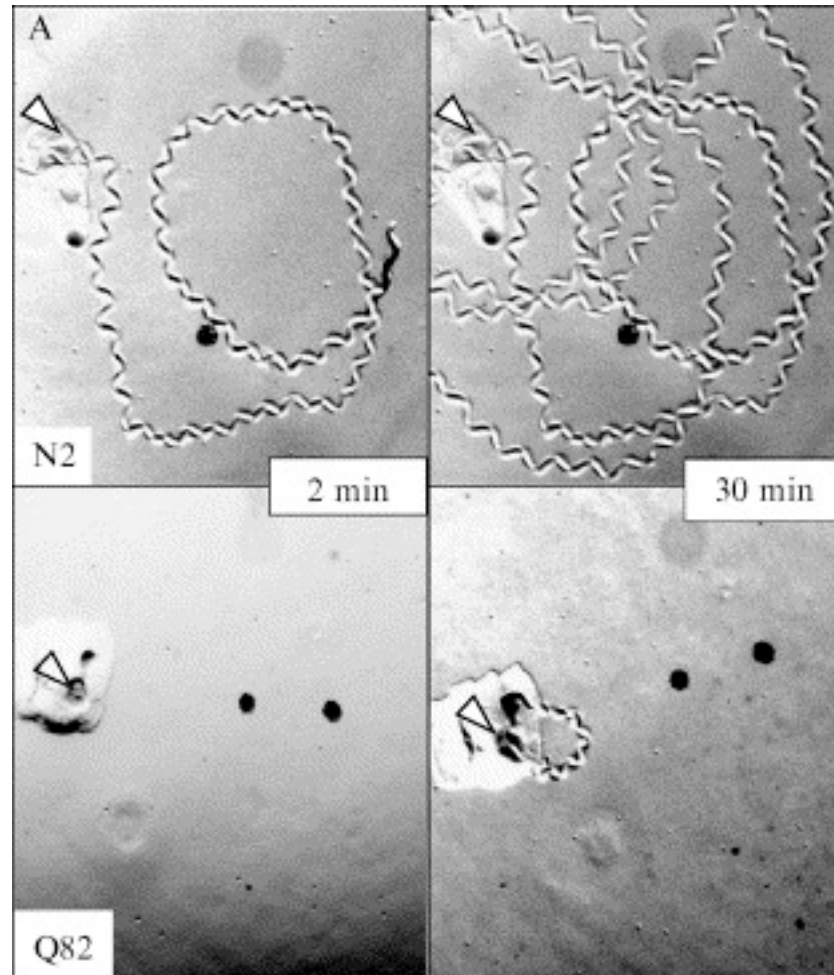
- ✓ perdita di peso
- ✓ diminuzione progressiva delle dimensioni del cervello
- ✓ diabete (dovuto all'accumulo degli aggregati di *polyQ* nel pancreas)
- ✓ tremori
- ✓ morte (~13 settimane)

Animal model	Species	Construct	Promoter	CAG repeat size
R6/2	Transgenic mouse	First 90 amino acids (a.a.) of human htt randomly inserted into mouse genome (Mangiarini et al. 1996)	Human huntingtin	144
R6/1	Transgenic mouse	First 90 a.a. of human htt randomly inserted into mouse genome (Mangiarini et al. 1996)	Human huntingtin	116
N171-82Q	Transgenic mouse	First 171 a.a. YAC of human htt randomly inserted into mouse genome (Schilling et al. 1999)	Prion	82
YAC	Transgenic mouse	Yeast artificial chromosome expressing entire human htt protein (Hodgson et al. 1999)	Human htt promoter	72, 128

sintomi motori  
e cognitivi  
tipici di HD



## Caenorhabditis elegans



Il tratto poliQ è *per se* tossico e induce neurodegenerazione

Caenorhabditis elegans

poliQ= 0

000:00:00.000



Caenorhabditis elegans

poliQ= 86

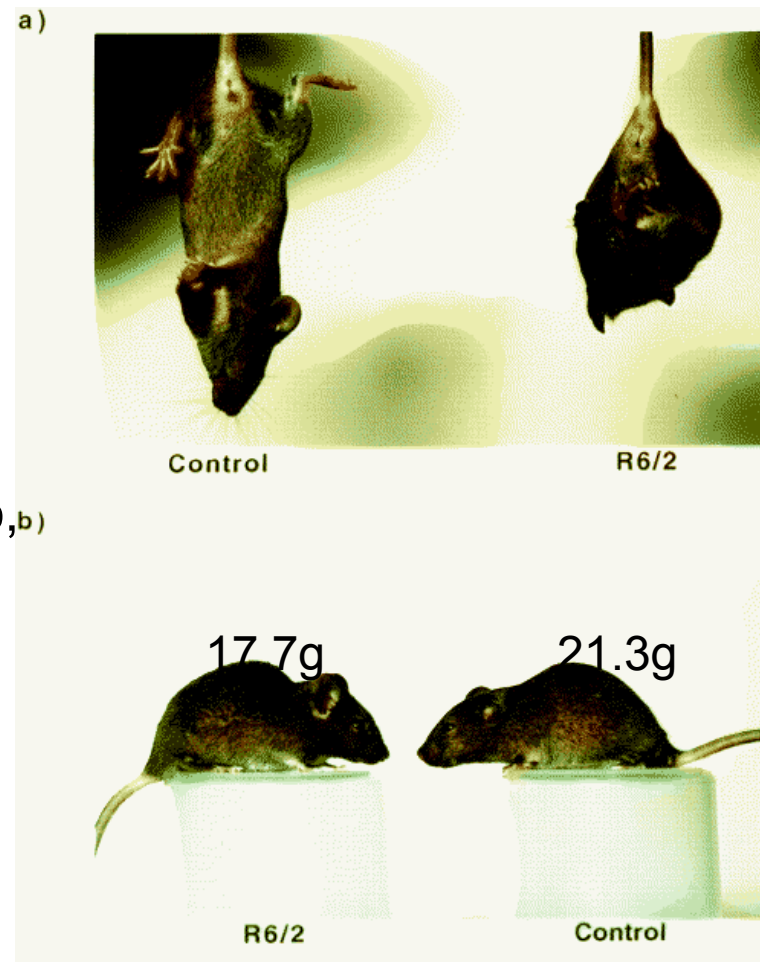
000:00:00.000

## Topi R6/2

Modello transgenico più studiato

### Caratteristiche

- Età di esordio circa 2 mesi
- riduzione del 20% del volume del cervello,<sup>b)</sup> che interessa tutte le strutture cerebrali
- presenza di inclusioni intraneuronali
- cellule apoptotiche
- patologia neuritica



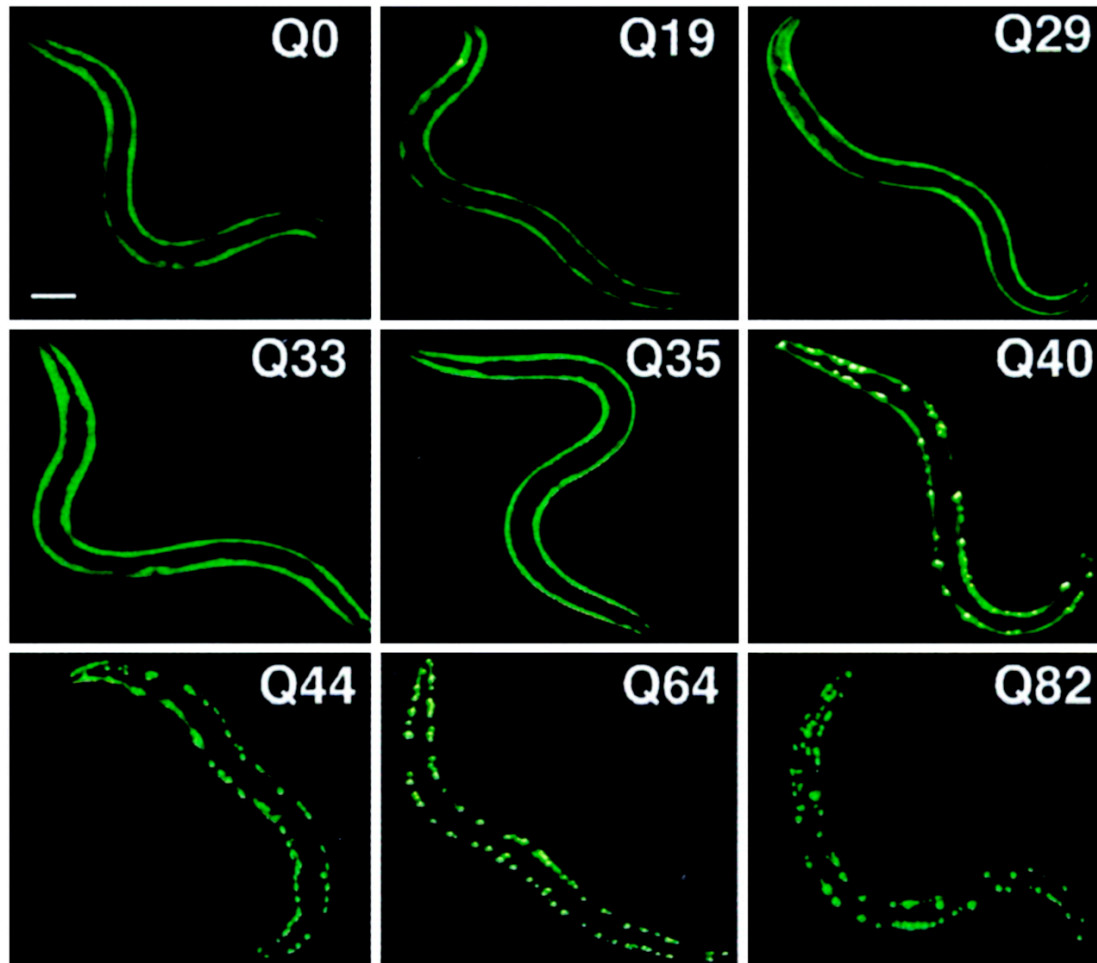
## Disfunzioni intracellulari

### Inclusioni intraneuronali contenenti mtHtt

#### Aggregazione della mtHtt:

- ✓ modello a cerniera: legami idrogeno tra foglietti beta insolubili che si formano nel tratto poliglutamminico
- ✓ modello transglutaminasi: crosslinking delle glutammine ad opera delle transglutaminasi

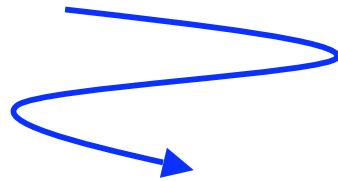
L'**aggregazione** della mtHtt è l'innesco che alla fine porta alla degenerazione neuronale?



L'**aggregazione** della dell'Htt dipende dalla **lunghezza** del poliQ

Studi dimostrano che la presenza delle inclusioni intraneuronali non correla con la morte indotta da mtHtt

- ✓ Neuron striatale esprimenti mtHtt in cui viene inibita la formazione di inclusioni (sovraespressione di E3 Ub ligasi) muoiono di più
- ✓ La formazione di inclusioni riduce la mtHtt diffusa ed aumenta la sopravvivenza neuronale



**Aggregazione:**      \_effetto collaterale  
                                 \_ruolo protettivo

## ipotesi conformazionale

- ✓ L'espansione del tratto poliQ induce una modificazione conformazionale
- ✓ L'alterazione conformazionale modifica il pattern di interazione con altre proteine
- ✓ Queste diverse interazioni sono la causa della disfunzione neuronale

### Alterazioni nella funzione del nucleo

mtHtt deve entrare nel nucleo per essere tossica  
interazione con CreBindingProtein (CBP)  
interazione con Sp1

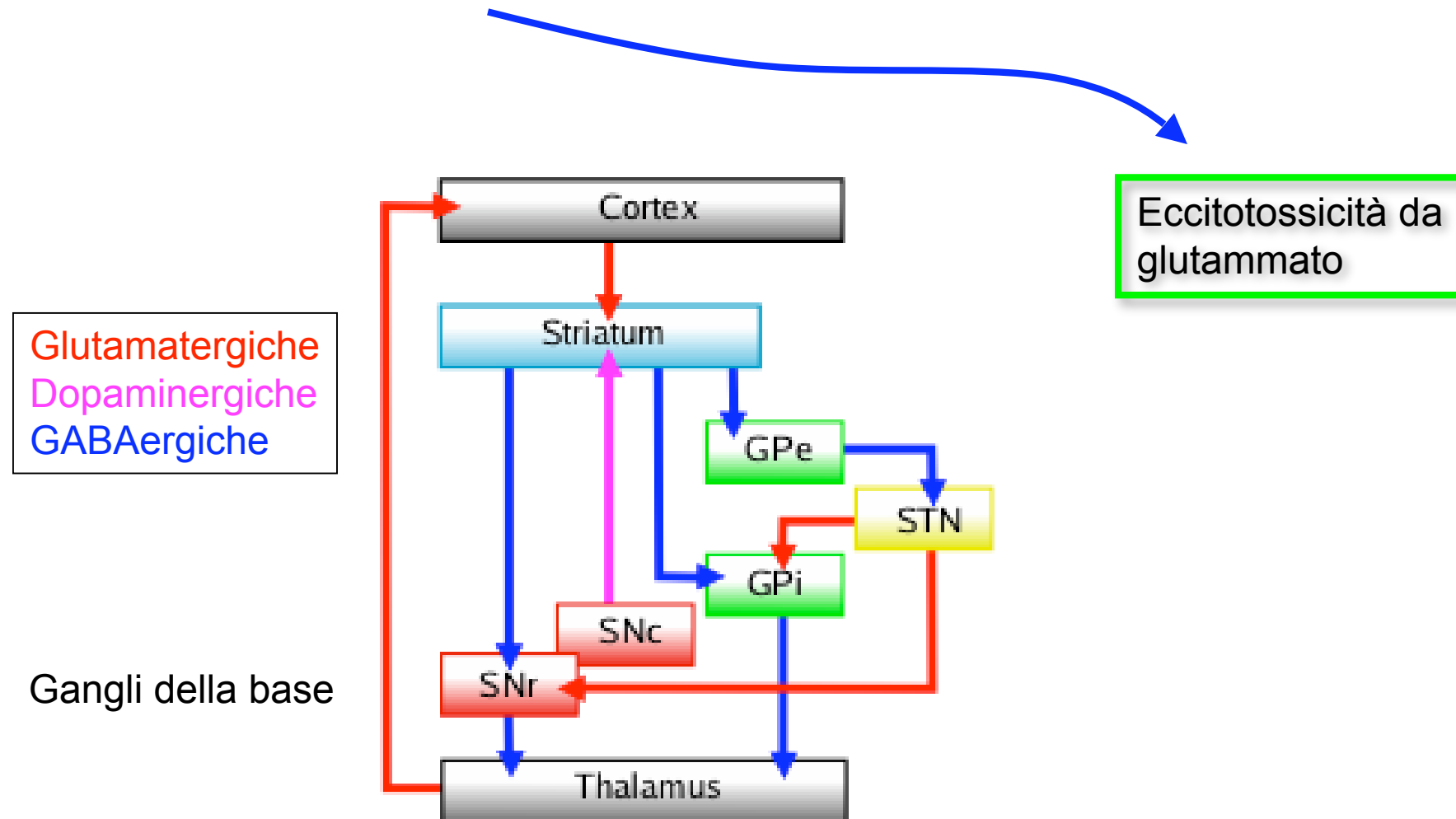
### Alterazioni nella funzione dei mitocondri

frammento di mtHtt localizza alla membrana  
mitocondriale  
difetti  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondriale  
declino nel metabolismo mitocondriale e produzione  
di ATP

## Selettività dei neuroni striatali

I neuroni striatali mtHtt sono suscettibili alla stimolazione glutamatergica  
Lo striato riceve input eccitatori glutamatergici dalla corteccia

Difetti nel trasportatore astrocitario del glutammato GLT1



# Malattia di Parkinson

- ✓ Età media di esordio 60 anni
- ✓ Incidenza annuale: 110-330 ogni 100.000

in Italia ci sono più di 200.000 malati di Parkinson,  
con circa 8.000 - 12.000 nuovi casi l'anno

Sintomi:

motori

- ✓ Tremori
- ✓ Rigidità muscolare
- ✓ Bradicinesia/ipocinesia/acinesia
- ✓ Postura piegata
- ✓ Instabilità posturale



Sintomi:

comportamentali

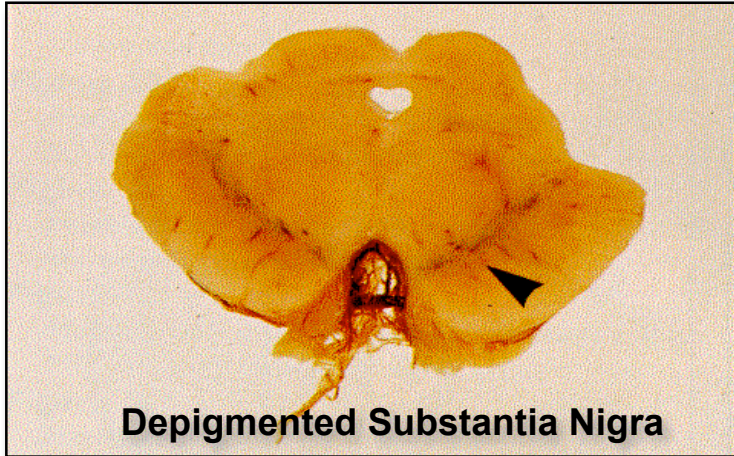


- ✓ Depressione
- ✓ Disturbi del sonno
- ✓ Demenza
- ✓ Disturbi del linguaggio
- ✓ Disturbi della personalità

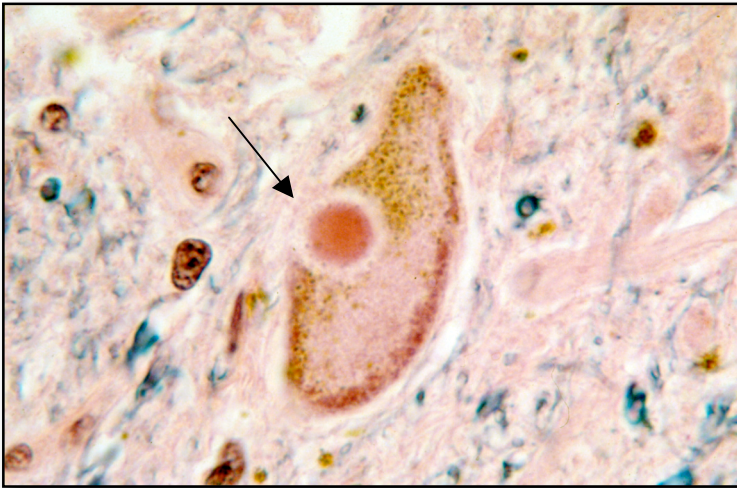


parzialmente legati alla  
terapia con L-dopa

# Neuropatologia

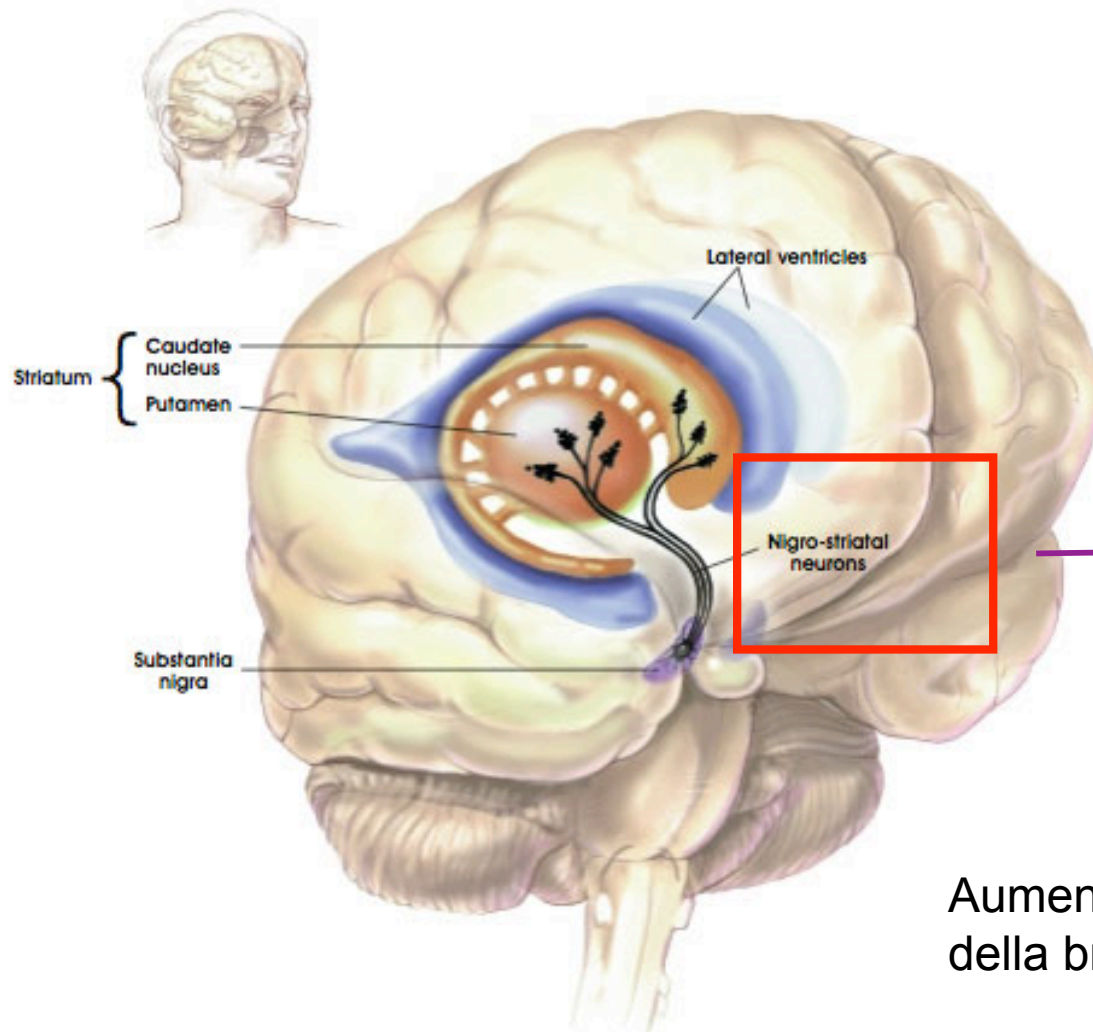


Degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra  
80-85% dei neuroni morti a malattia conclamata

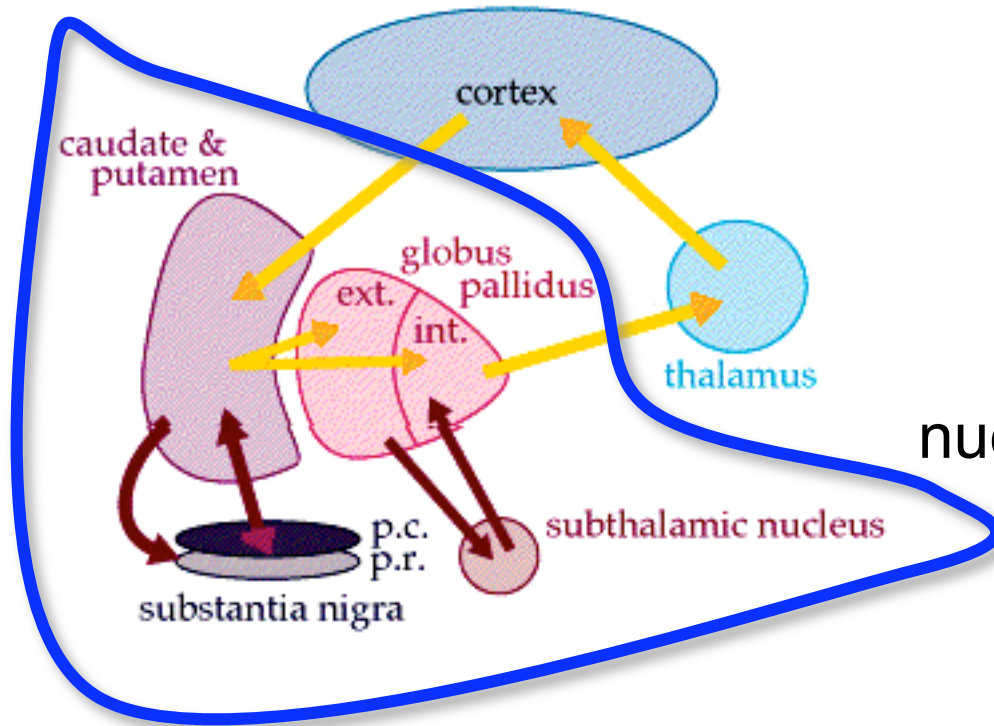


Corpi di Lewy (ubquitinated  $\alpha$ -synuclein)

# Neuropatologia



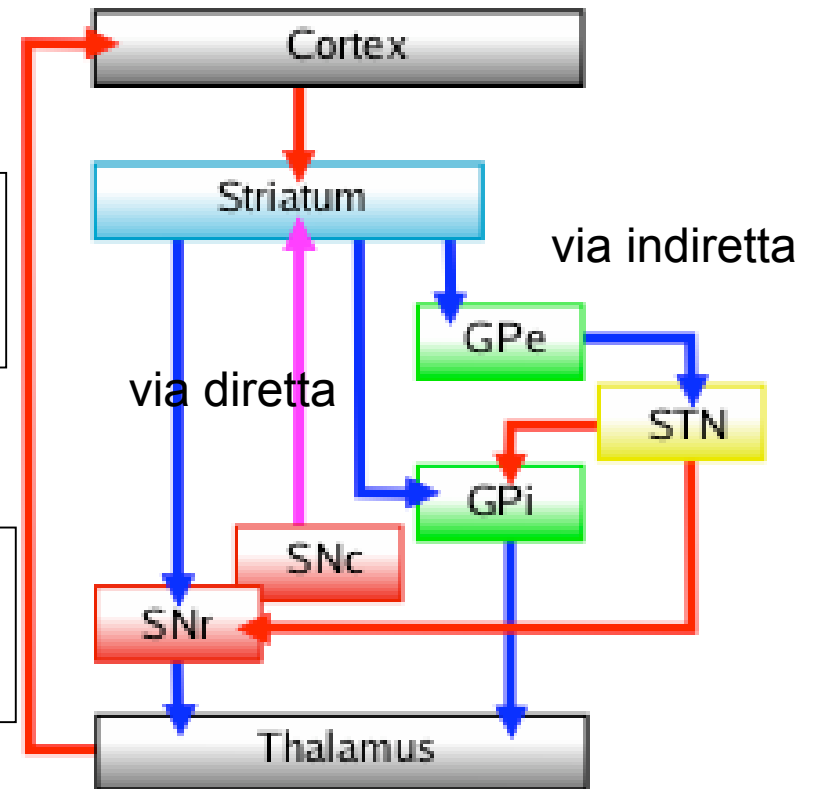
Aumento degli input inibitori è la causa della bradicinesia/acinesia



nuclei della base

Glutamatergiche  
Dopaminergiche  
GABAergiche

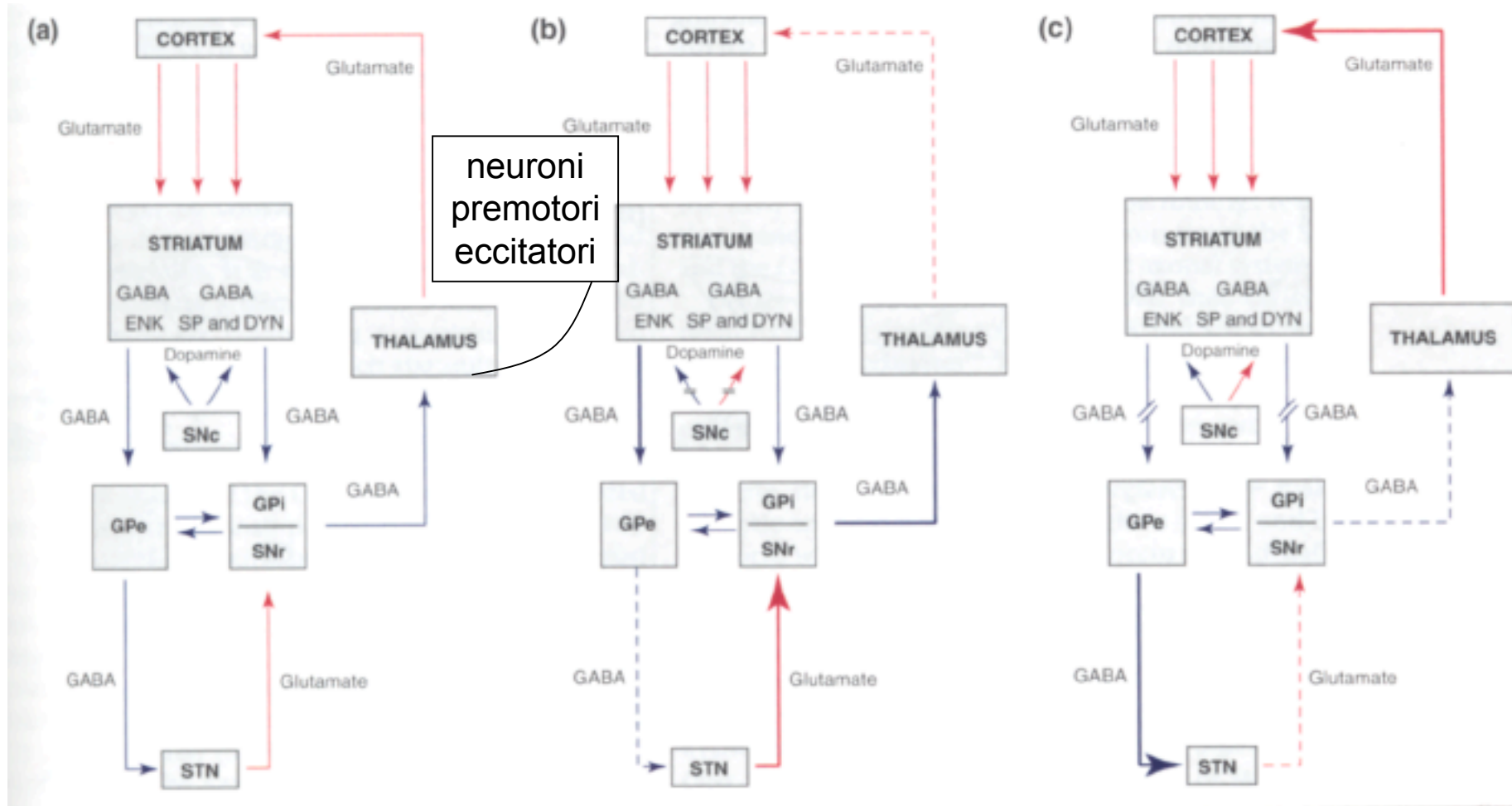
Controllo motorio  
Processi cognitivi  
Emozioni



Normale

Parkinson

Huntington



Glutammatergiche, attivatorie



GABAergiche, inibitorie

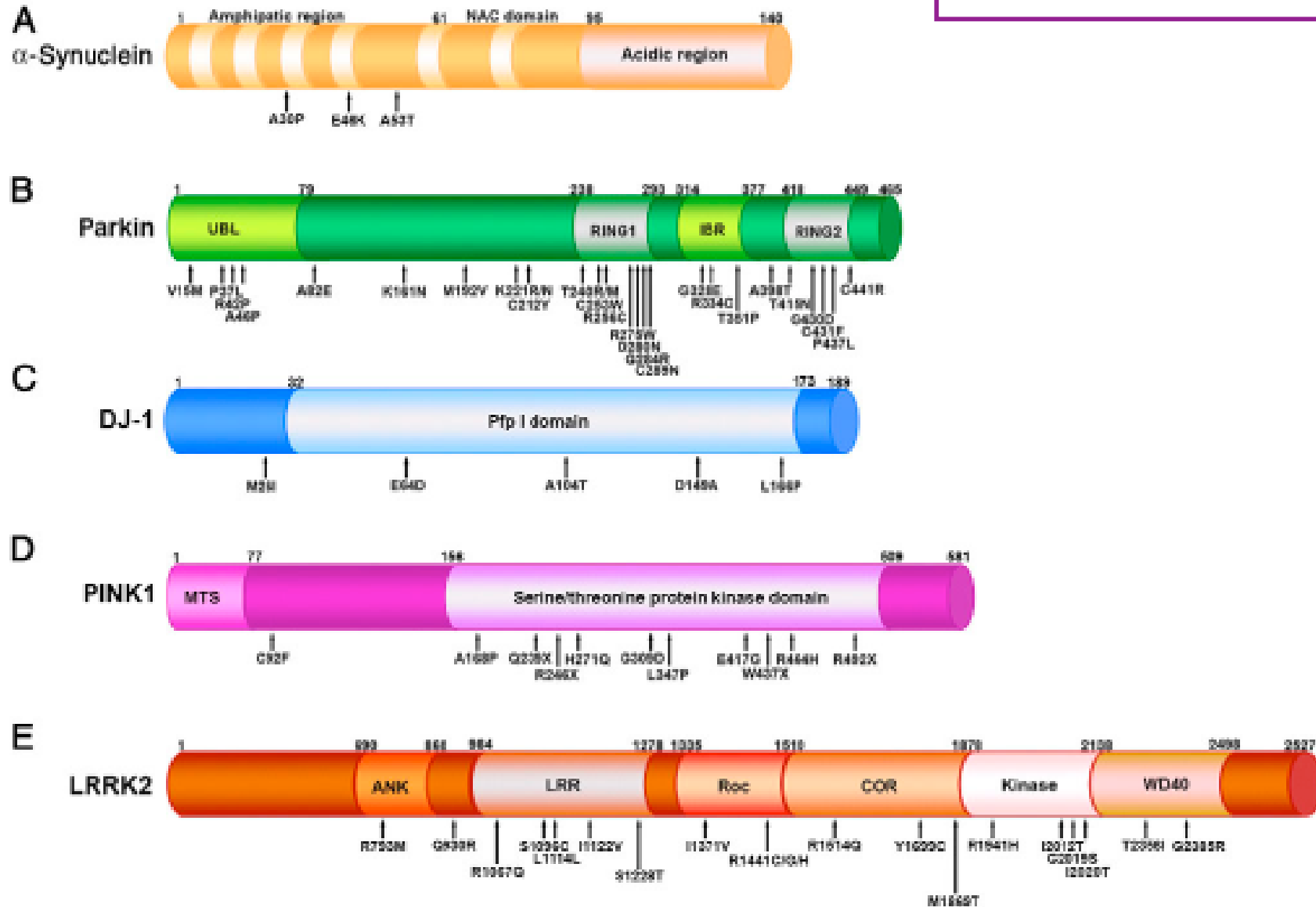
# genetica

- ✓ 95% sporadico (idiopatico)
- ✓ 5% familiare

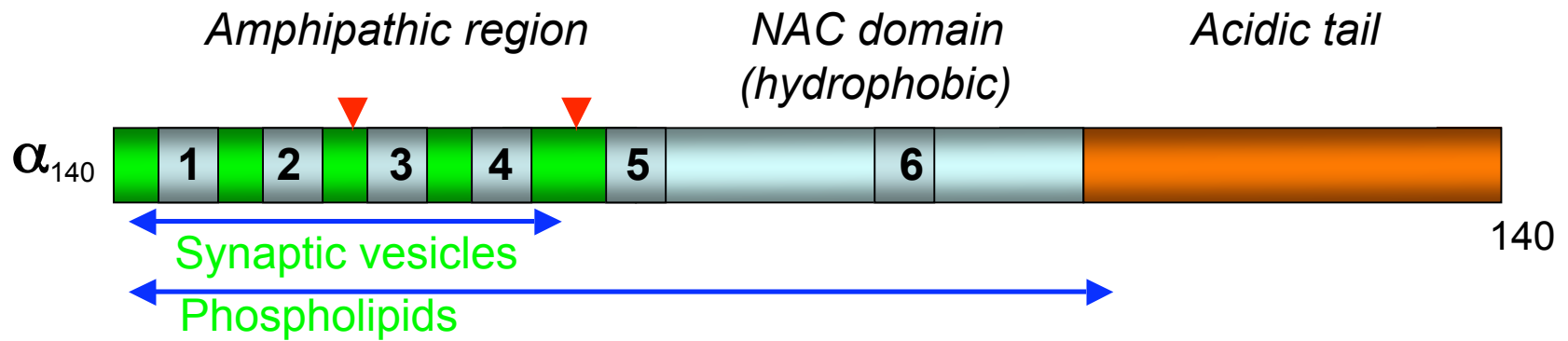
Table 1 | Parkinson's disease-associated genes

Locus	Gene	Inheritance	Function	Phenotype
*PARK1/4	$\alpha$ -Synuclein	Autosomal dominant	Involved in synaptic vesicle formation	Age of onset: 30–60 years Lewy bodies: ++
PARK2	Parkin	Autosomal recessive	An E3 ligase	Age of onset: ~30 years *Lewy bodies: –
PARK6	Phosphatase and tensin homologue (PTEN)-induced kinase 1 (PINK1)	Autosomal recessive	A mitochondrial kinase	Age of onset: 30–50 years Lewy bodies: ?
PARK7	Parkinson's disease (autosomal recessive, early onset) 7 (DJ1)	Autosomal recessive	Involved in oxidative stress response	Age of onset: 20–40 years Lewy bodies: ?
PARK8	Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)	Autosomal dominant	A protein kinase	Age of onset: 40–60 years Lewy bodies: + variable pathology
Unmapped	HtrA serine peptidase 2 (HTRA2, also known as OMI)	Autosomal dominant? Predisposition	A serine protease and/or involved in stress response	Age of onset: 44–70 years Lewy bodies: ?

# Modelli delle proteine associate alla malattia di Parkinson



# $\alpha$ -synucleina (SNCA)



A30P  
E46K  
A53T  
Moltiplicazioni  
geniche

PD familiare  
(forma rara)

**Localizzazione:** citosol  
terminali sinaptici

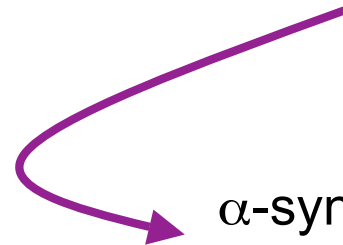
**Funzione:** regolazione della funzione  
sinaptica

Topi ko mostrano perdita di vescicole sinaptiche  
 $\alpha$ -synucleina recupera la neurodegenerazione nei topi  
Ko per lo chaperone sinaptico CSP $\alpha$



## Aggregazione

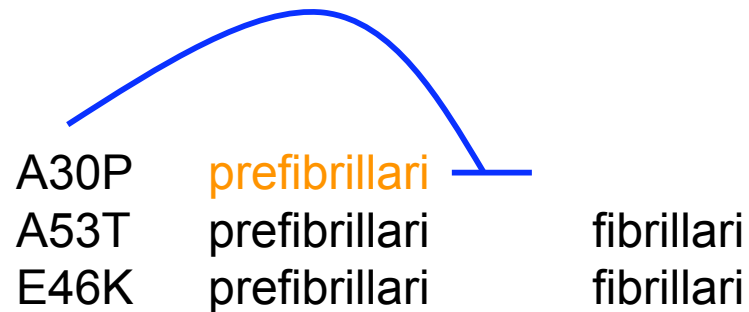
- ✓  $\alpha$ -synucleina è il principale componente dei corpi di Lewy nelle forme sporadiche e familiari  
fibrille a foglietti beta (amorfe e amiloidi)
- ✓ topi transgenici  $\alpha$ -synucleina e A53T ricapitolano molte caratteristiche del PD, compresa la formazione di corpi di Lewy



$\alpha$ -synucleina coinvolta anche nelle  
Forme idiopatiche (polimorfismi nel  
Promotore, fosforilazione)

# Aggregazione

- ✓  $\alpha$ -synucleina forma strutture prefibrillari (oligomeri)  
fibrillari (aggregati)



La forma tossica è prefibrillare (?)

- ✓ Hsp70 riduce il fenotipo PD in Drosophila con a-syn mutata senza effetti sulla presenza di aggregati fibrillari
- ✓ Parkina (E3 Ub-ligasi) riduce il fenotipo PD ma aumenta gli aggregati fibrillari

## Meccanismi tossici

### Alterazioni nella funzione/traffico delle vescicole

$\alpha$ -syn mutata altera il trasporto di DA nelle vescicole da parte del trasportatore VMAT2 con conseguente aumento di DA nel citosol=stress ossidativo

### Alterazioni nella funzione dei mitocondri/stress ossidativo

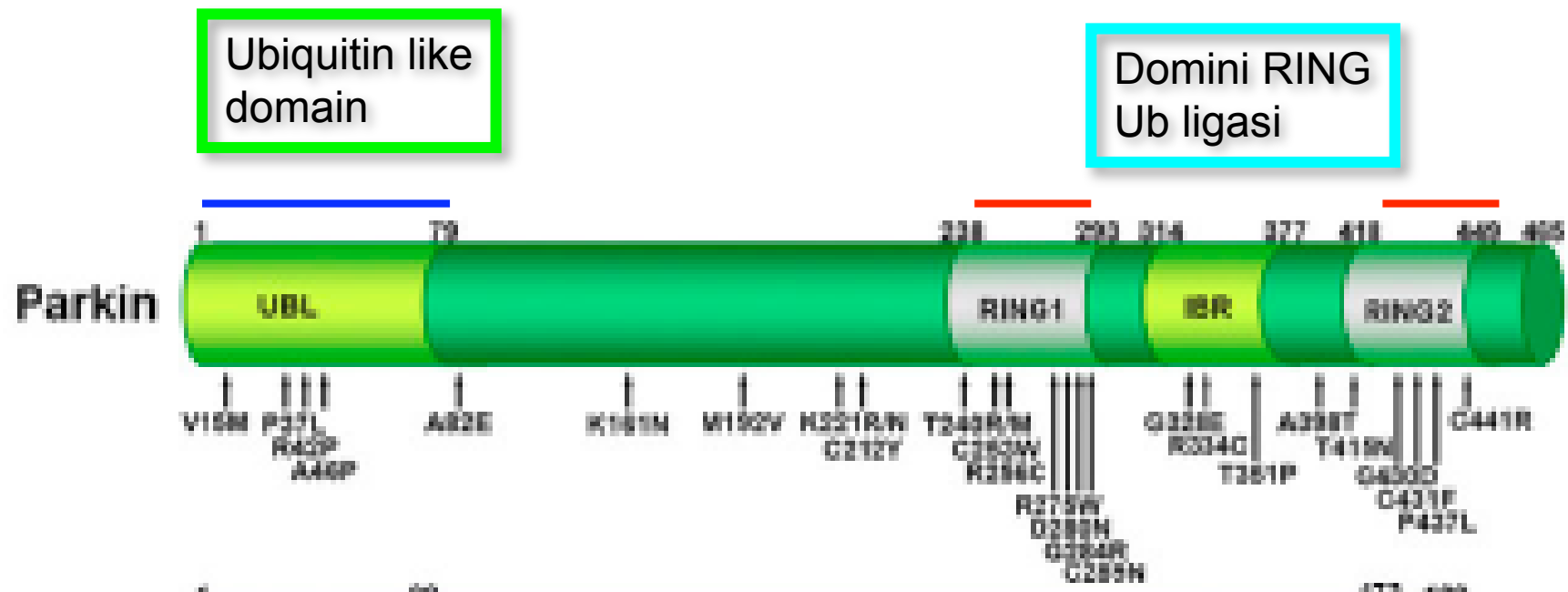
Sovraespressione di  $\alpha$ -syn mutata rende le cellule più sensibili allo stress ossidativo e a MPTP  
Oligomeri di  $\alpha$ -syn formano pori che alterano la membrana dei mitocondri

# Parkin

PD autosomico recessivo  
(frequente)  
Esordio 30 anni

**Localizzazione:** citosol  
mitocondri (membrana esterna)

**Funzione:** E3 ubiquitina ligasi



## Meccanismi tossici

✓ Difetti nell'attività Ub/ligasi della Parkin causano l'accumulo dei suoi substrati con danni conseguenti

✓ Tra questi substrati **non c'è l' $\alpha$ -syn**. Nelle forme autosomiche recessive associate a mtParkin mancano i corpi di Lewy

✓ Sindrome clinica diversa dal PD?

Parkin è importante nel mantenimento delle funzioni del mitocondrio (importanti nelle altre forme di PD)

Parkin ko in Drosophila      mostra riduzione durata della vita  
apoptosi  
stress ossidativo  
alterazione catena trasporto e-  
Interazione con PINK1 e LRRK2

# DJ1

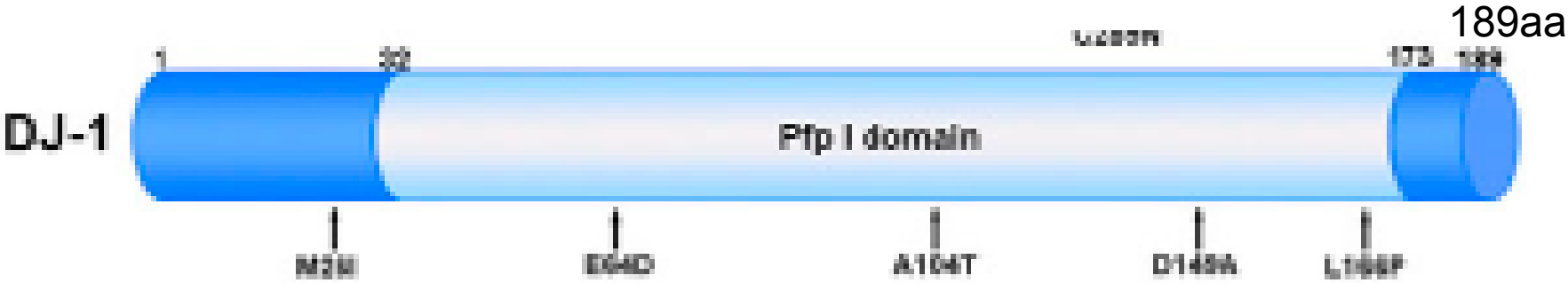
Mutazioni di senso  
Delezioni di esoni  
Dominanti e recessive



PD ad insorgenza  
Precoce (20-40 anni)  
Rara

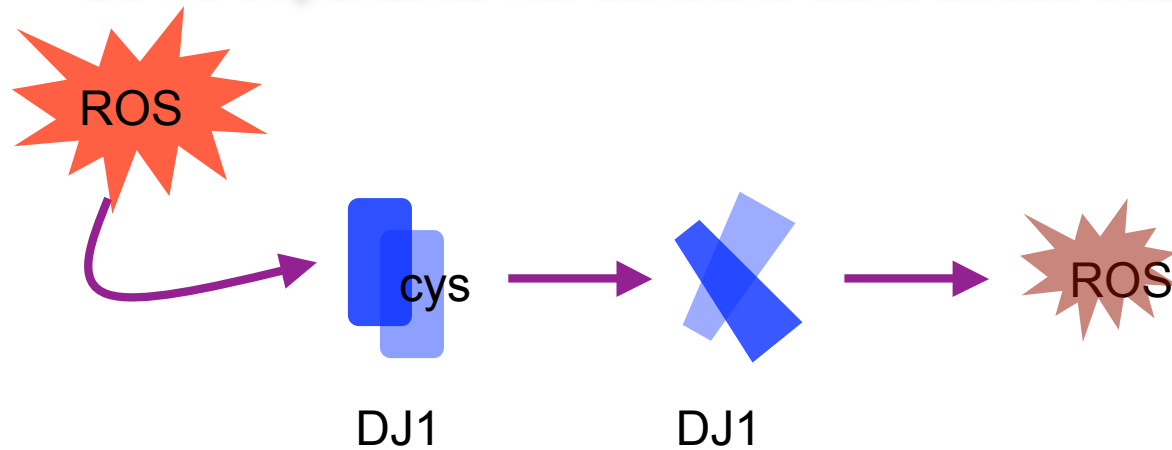
**Localizzazione:** citosol (primaria)  
mitocondri (i mutanti tendono ad accumularsi)  
espressa in tutti i tessuti (incluso il SNC)

**Funzione:** ??  
wild-type è omodimero  
le mutazioni inibiscono la dimerizzazione  
destabilizzazione → degradazione → perdita di funzione  
ruolo nella risposta allo stress ossidativo



## Meccanismi tossici

DJ1 è importante nel controllo dello stress ossidativo



Ko di DJ1 in cellule topi e *Drosophyla* rende suscettibili ai ROS  
Il difetto è recuperato da DJ1 wild-type  
**ma non** da quello mutante

Come sensore dello stress ossidativo, DJ1 è importante nella risposta apoptotica

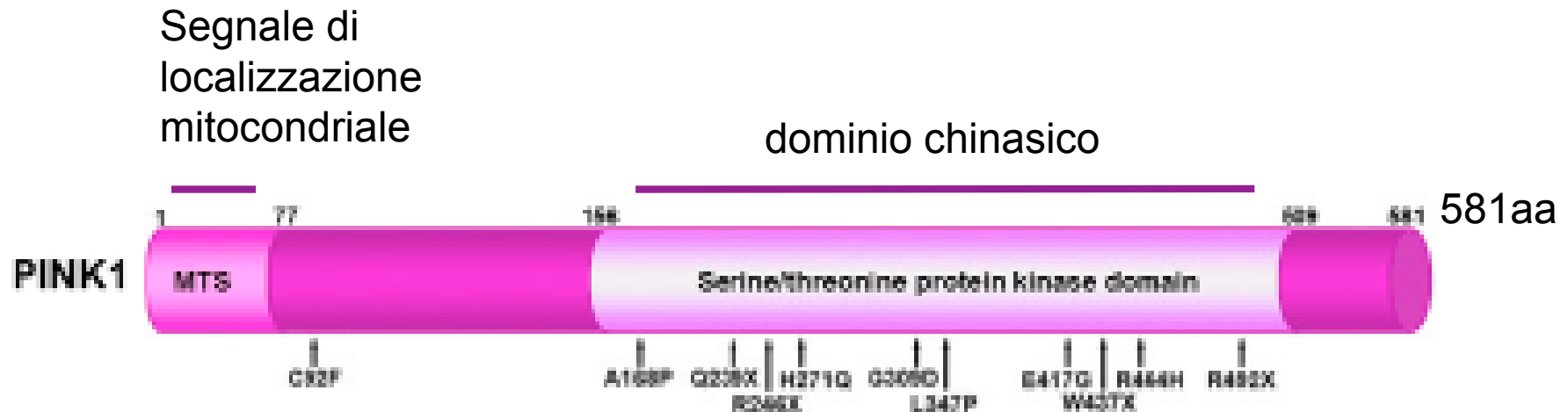
# PINK1

PD autosomico recessivo  
e dominante  
Esordio variabile

**Localizzazione:** mitocondri  
espressa in tutti i tessuti

**Funzione:** serina/treonina chinasi  
mutazioni si localizzano nel dominio chinasico

Perdita di funzione  
**ma** i mutanti sono  $\pm$  attivi





# Meccanismi tossici

✓ Alterazione delle funzioni mitocondriali

mutPINK1

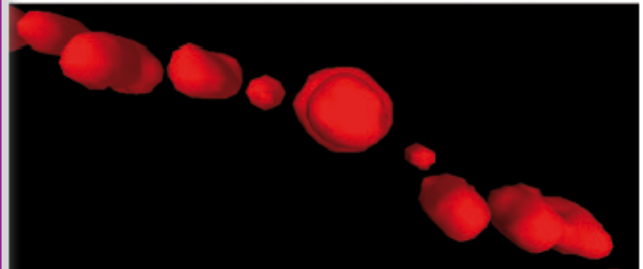
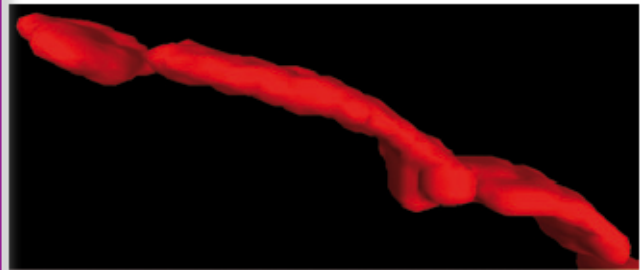


✓ Perossidazione lipidica  
✓ MnSOD, GR e GST

Controllo stress ossidativo

Regolazione della dinamica dei mitocondri

**d**



# LRRK2

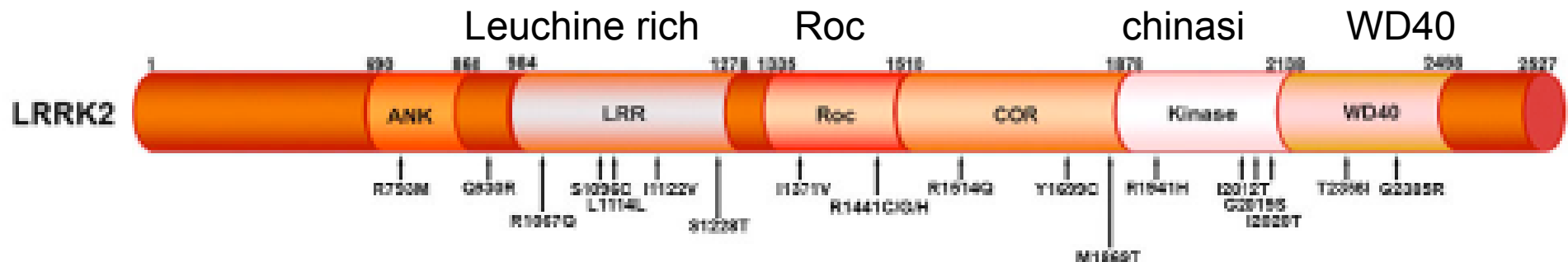
PD autosomico dominante  
PD idiopatico (scarsa penetranza?)  
Esordio 40-60 anni

**Localizzazione:** citosol  
mitocondri

**Funzione:** Leucine rich repeat kinase 2  
autofosforilazione (attivatoria)  
mutazioni si localizzano in tutti i domini

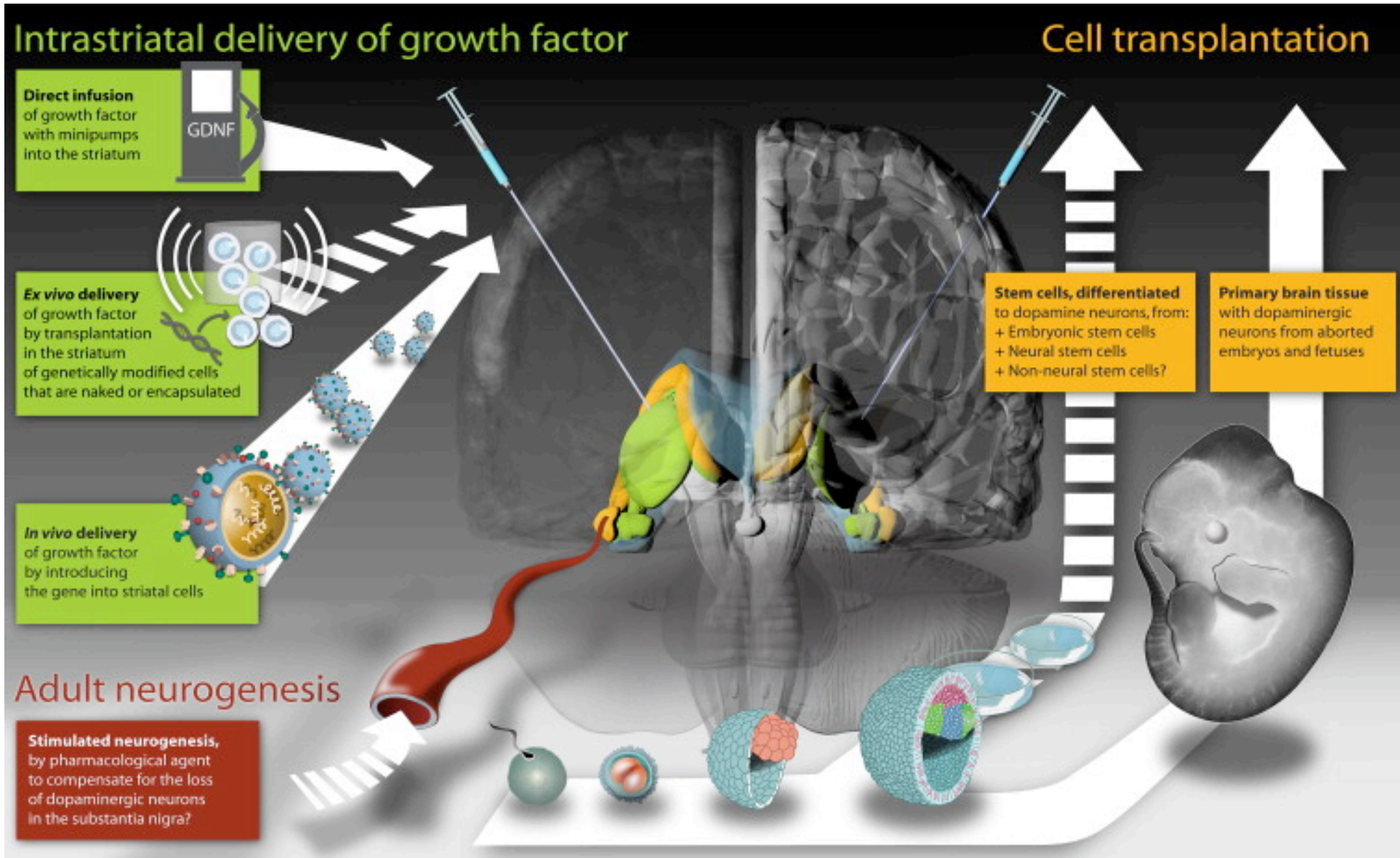
Mutazioni aumentano l'autofosforilazione

Acquisto di funzione  
(pro-apoptotica?)





# Terapia del Parkinson



## Sviluppo dei neuroni dopaminergici

