

MUTAZIONI

Polimorfismi vs. mutazioni geniche

VARIABILITÀ GENETICA



Il **polimorfismo** è una variazione nel DNA che può avere un effetto **fenotipico minimo o nullo**; la sua frequenza nella popolazione è **MAGGIORE dell' 1%**



FENOTIPO NORMALE

Una **mutazione** è un cambio del genotipo che produce variabilità **modificando il fenotipo**; la sua frequenza nella popolazione è **INFERIORE all'1%.**

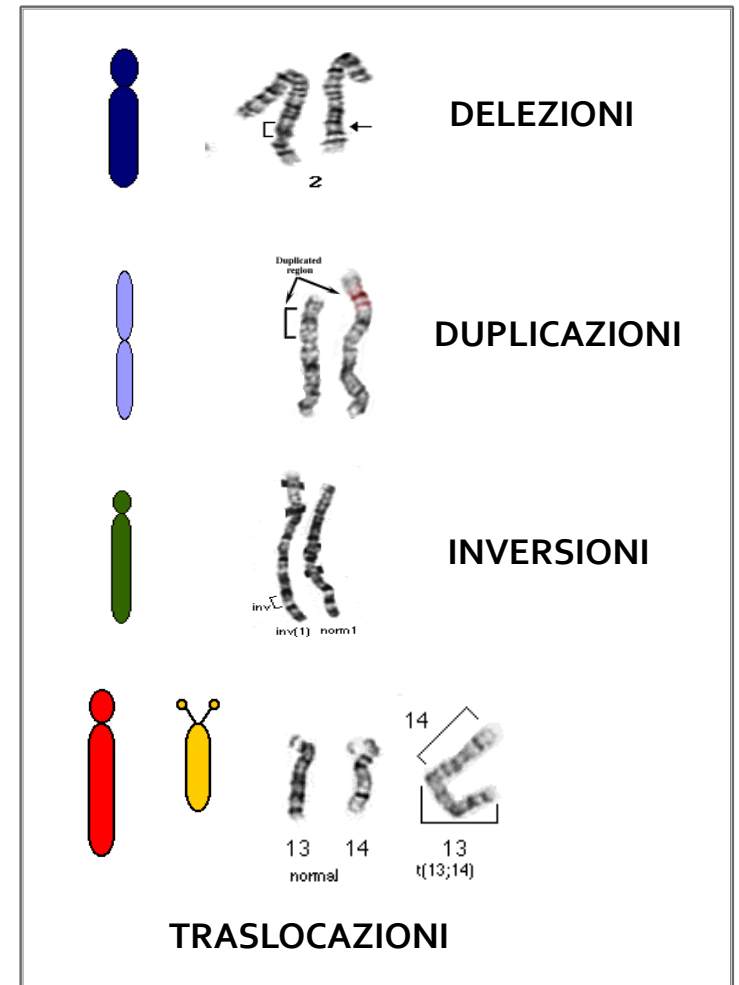
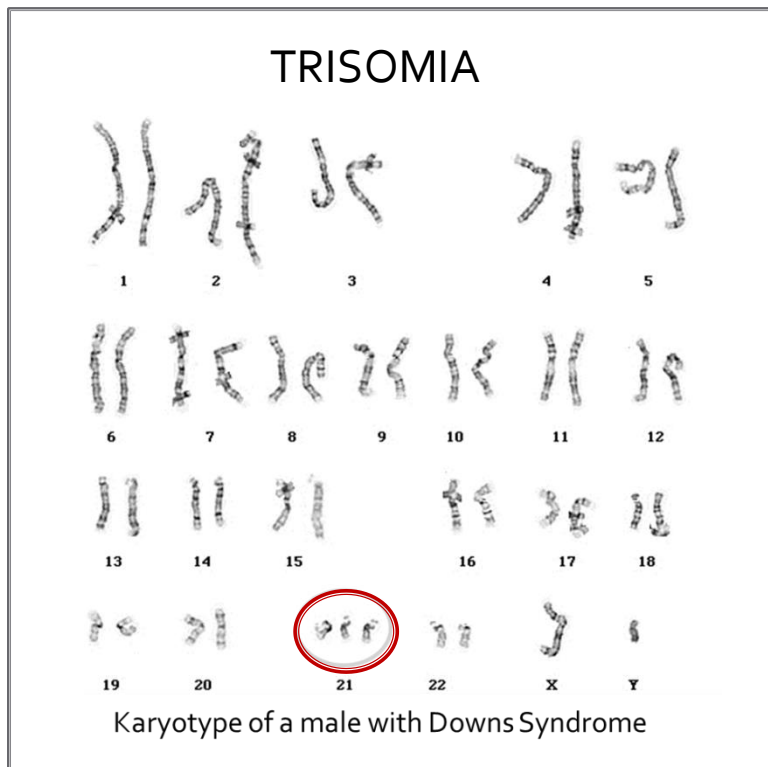


FENOTIPO MALATTIA

Si tratta di una discriminazione utilizzata da un punto di vista «didattico», ma esistono notevoli eccezioni a questa regola con **polimorfismi neutri <1%** e **alleli mutanti >1%**

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

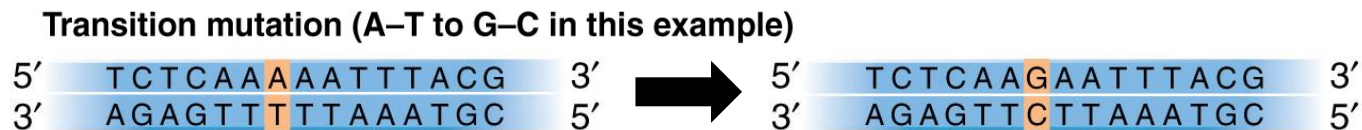
Aberrazioni cromosomiche possono riguardare sia il numero che la struttura dei cromosomi



MUTAZIONI:

Transizioni e Transversioni

- Mutazioni riguardano anche cambiamenti di singoli nucleotidi
- Si definisce transizione se una purina (A, G) è stata sostituita dall'altra purina (G, A) o se una pirimidina (C, T) è sostituita dall'altra pirimidina (T, C)



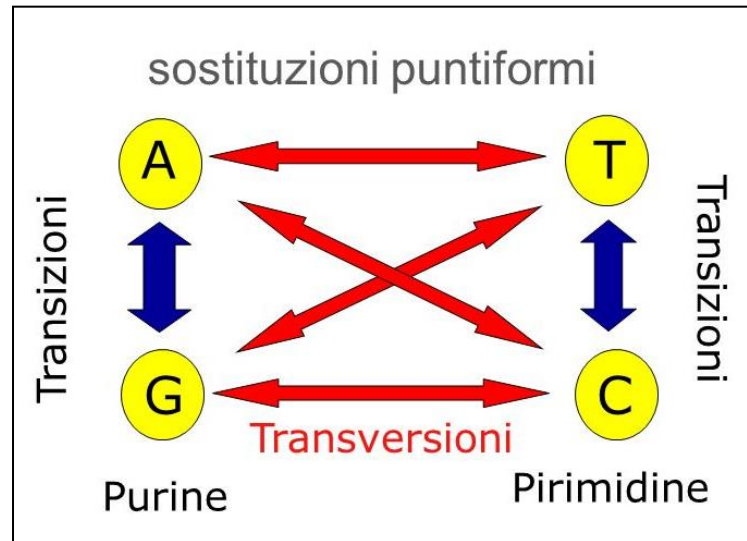
- Si definisce transversione se una purina o pirimidina è stata sostituita, rispettivamente, da una pirimidina o una purina.



MUTAZIONI: Transizioni e Transversioni

Transversioni: una purina o pirimidina è sostituita, rispettivamente, da una pirimidina o una purina.

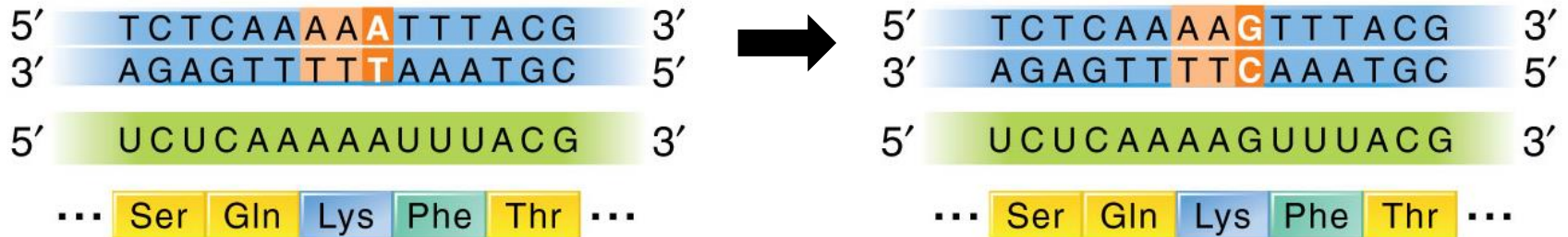
Transizioni se una purina (A, G) è sostituita dall'altra purina (G, A) o se una pirimidina (C, T) è sostituita dall'altra pirimidina (T, C)



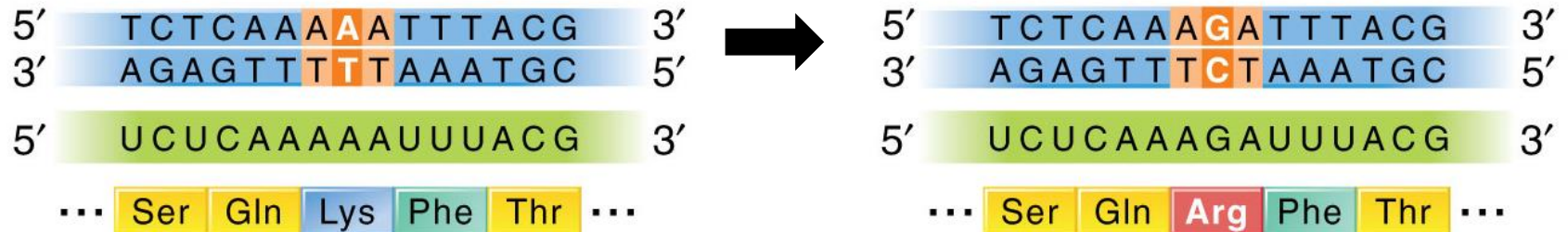
MUTAZIONI:

Effetto sull'amino acido codificato

Silent mutation



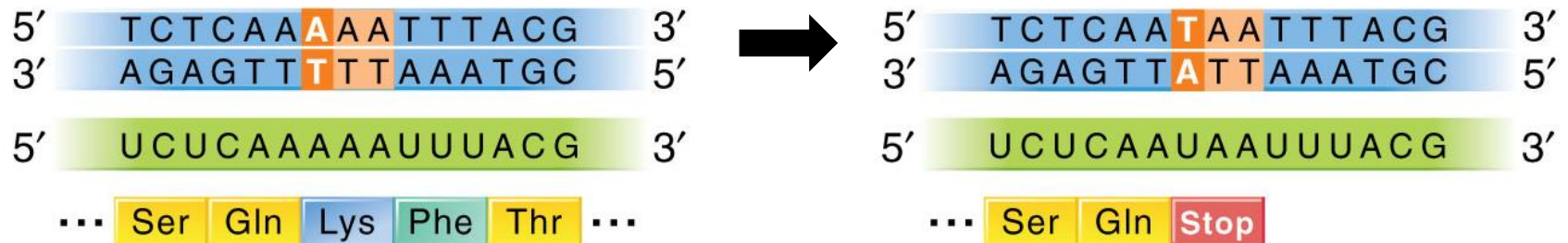
Missense mutation



MUTAZIONI:

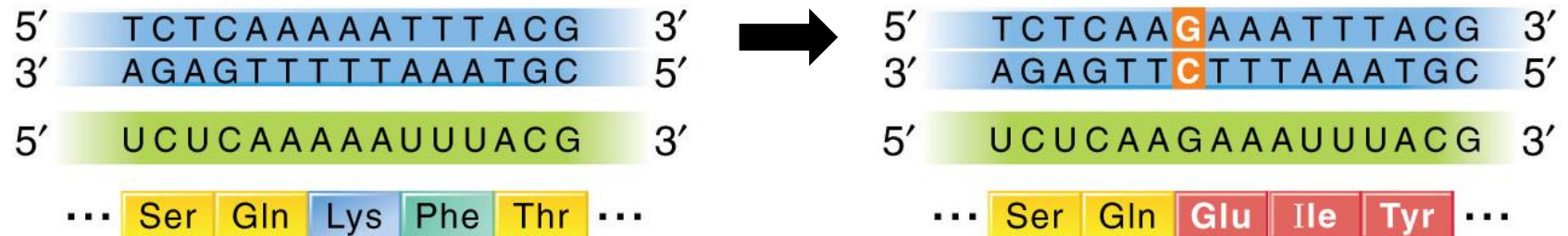
Effetto sull'amino acido codificato

Nonsense mutation



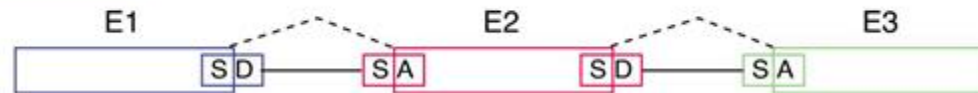
Frameshift mutation

Insertion of a nucleotide

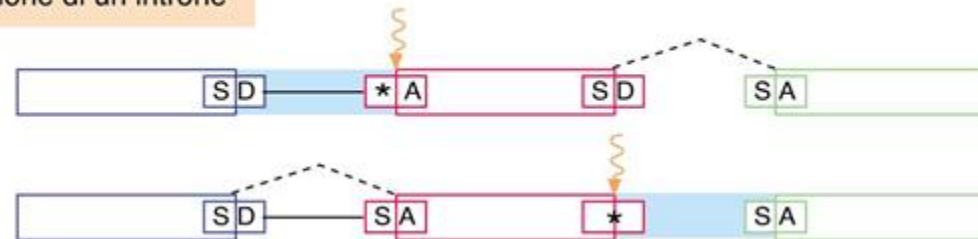


MUTAZIONI: Effetto sullo *splicing*

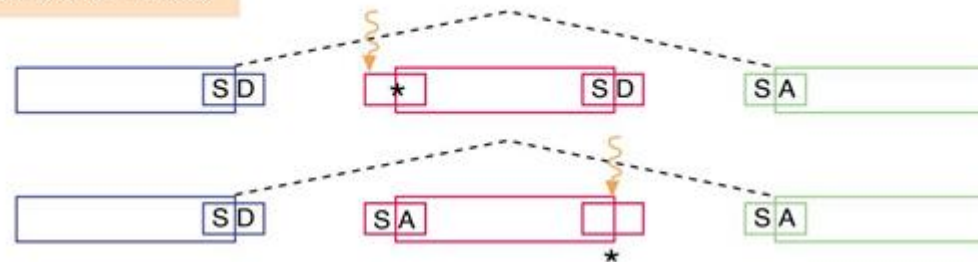
A Splicing normale



B Ritenzione di un introne

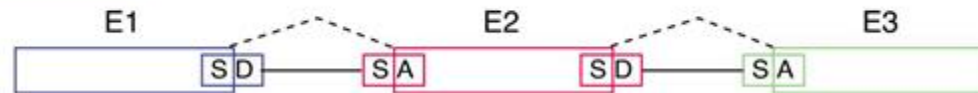


C Omissione di un esone

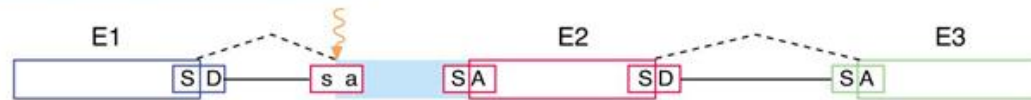


MUTAZIONI: Effetto sullo *splicing*

A Splicing normale



Attivazione del sito criptico di splicing



A Attivazione del sito di splicing accettore nascosto nell'introne 1



B Attivazione del sito di splicing donatore nascosto nell'esone 2

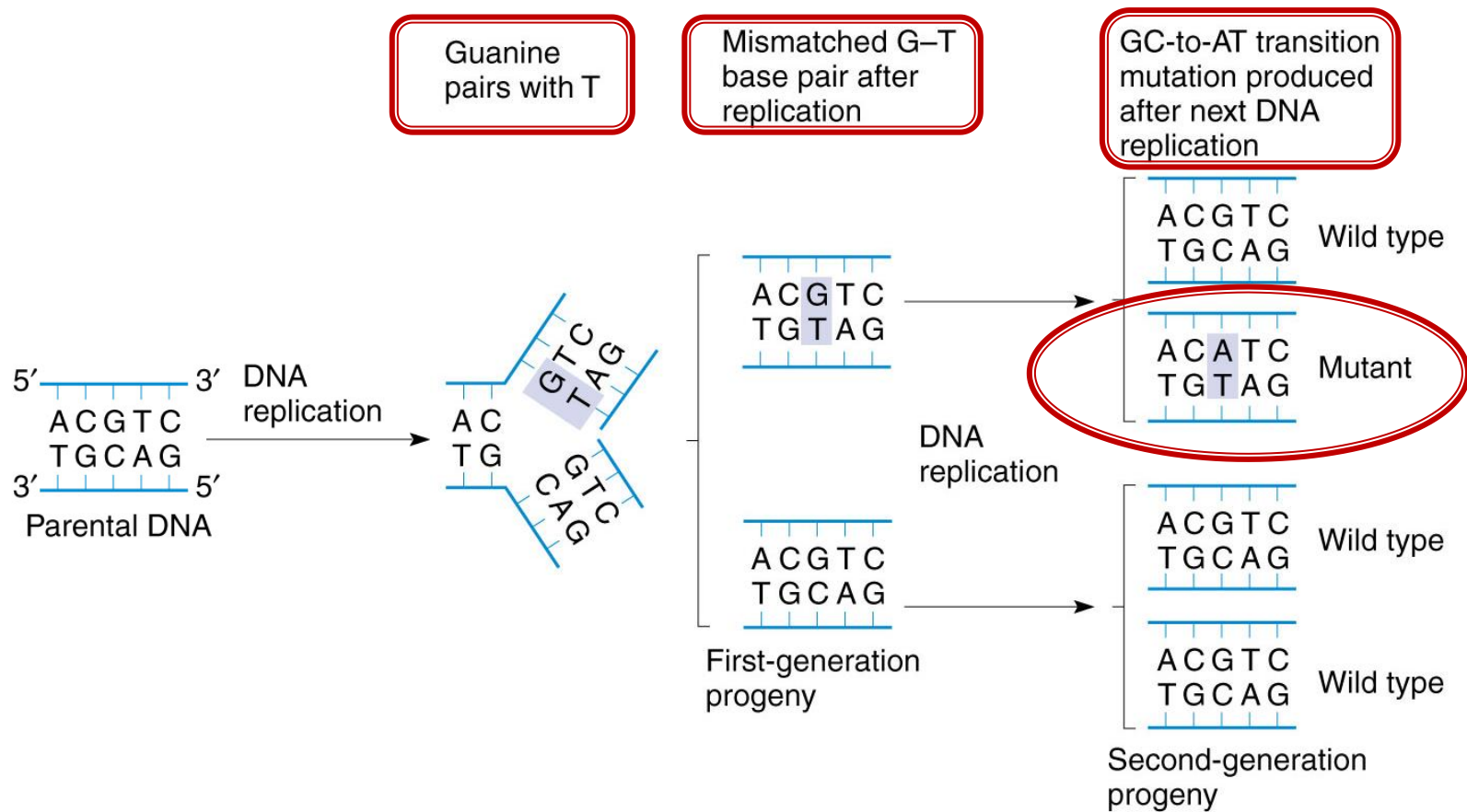


MUTAGENESI

MUTAGENESI Spontanea

misappaiamento alla replicazione

Errori di misappaiamento nella replicazione del DNA

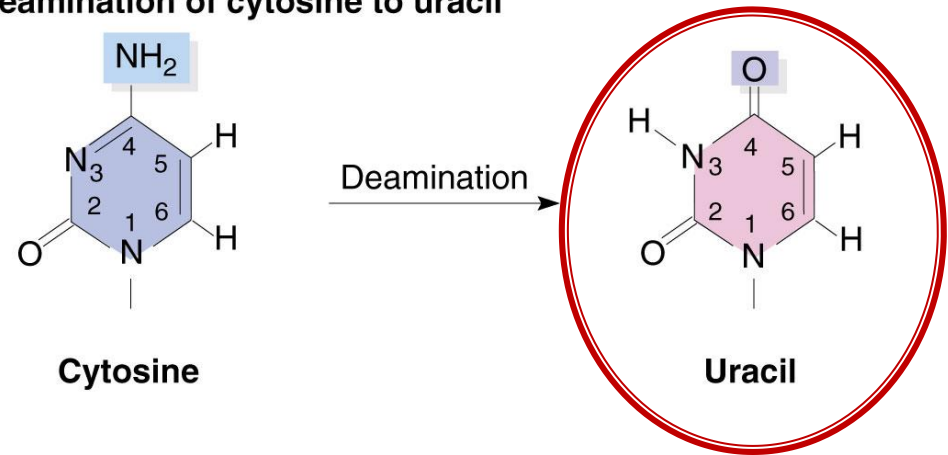


MUTAGENESI Spontanea

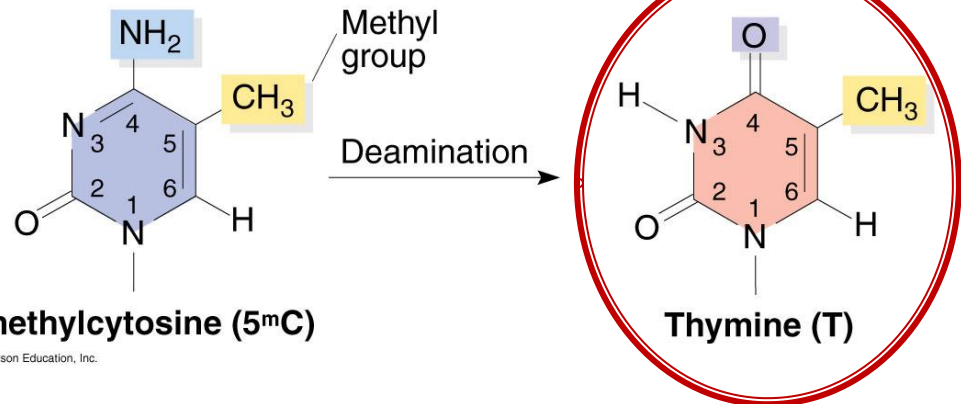
Deaminazione

La deaminazione spontanea della Citosina o della 5-metil-citosina produce una transizione a causa della formazione della base azotata Uracile o Timina che si appaiano con Adenina

a) Deamination of cytosine to uracil



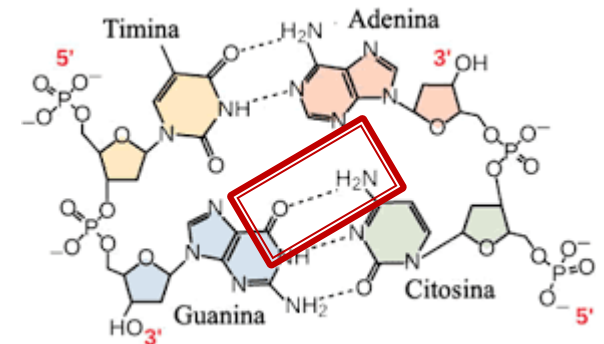
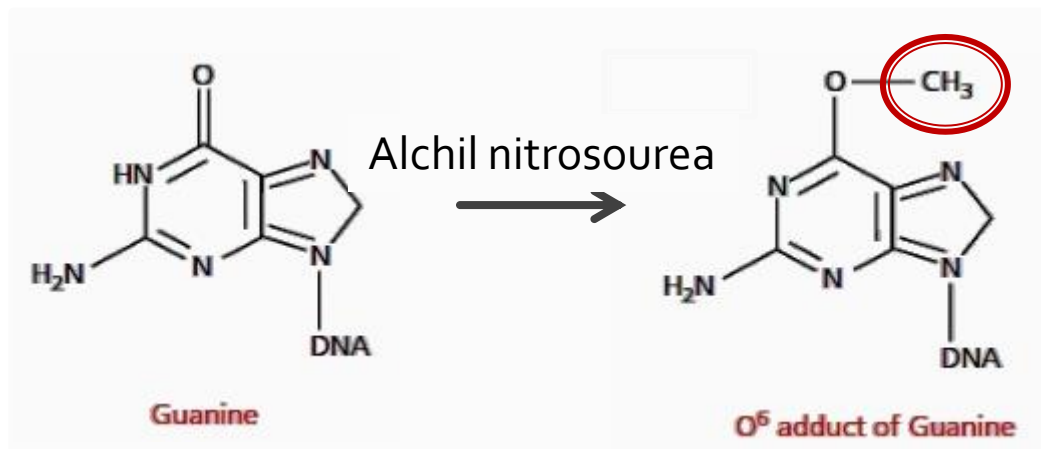
b) Deamination of 5-methylcytosine (5^mC) to thymine



MUTAGENESI Spontanea

Metilazione / Alchilazione

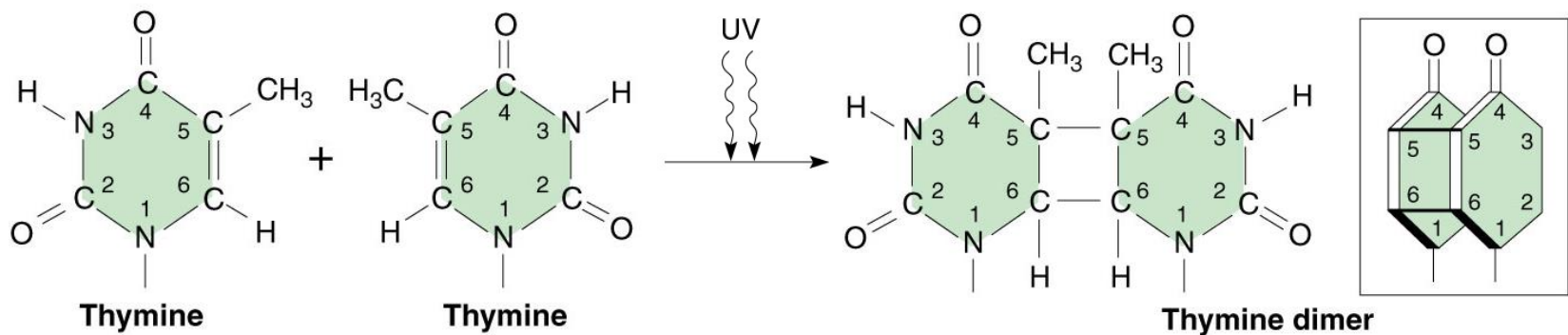
Le nitrosamine e le nitrosamidi sono prodotte dal tabacco. Il loro principale effetto sul DNA è la formazione di derivati della Guanina O6-alchilati



MUTAGENESI Spontanea

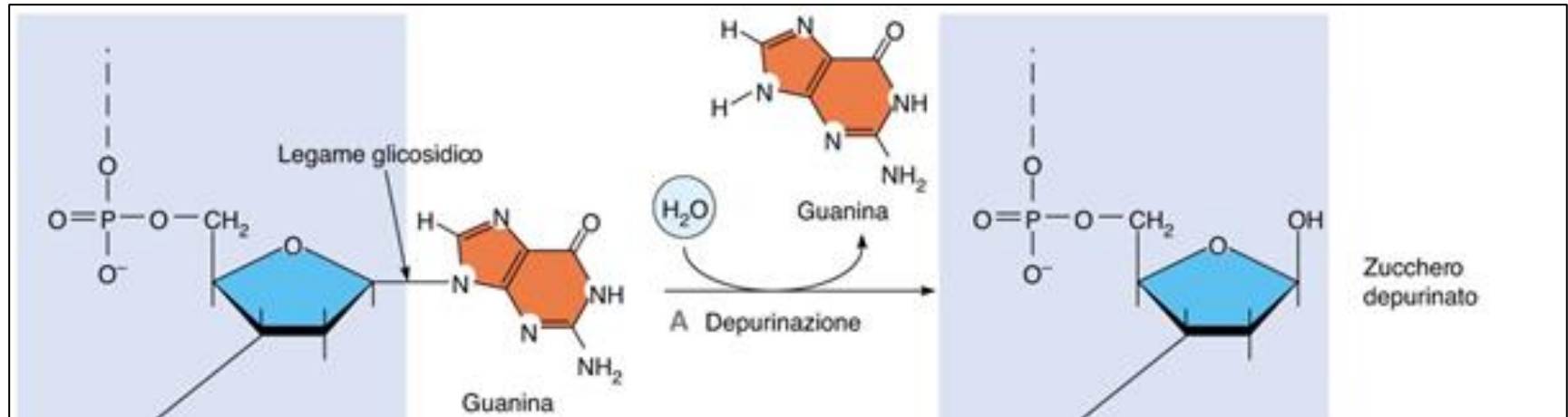
Dimeri di *timina*

L'esposizione ai raggi UV del sole induce la formazione di dimeri di *Timina*



MUTAGENESI Spontanea

Depurinazione



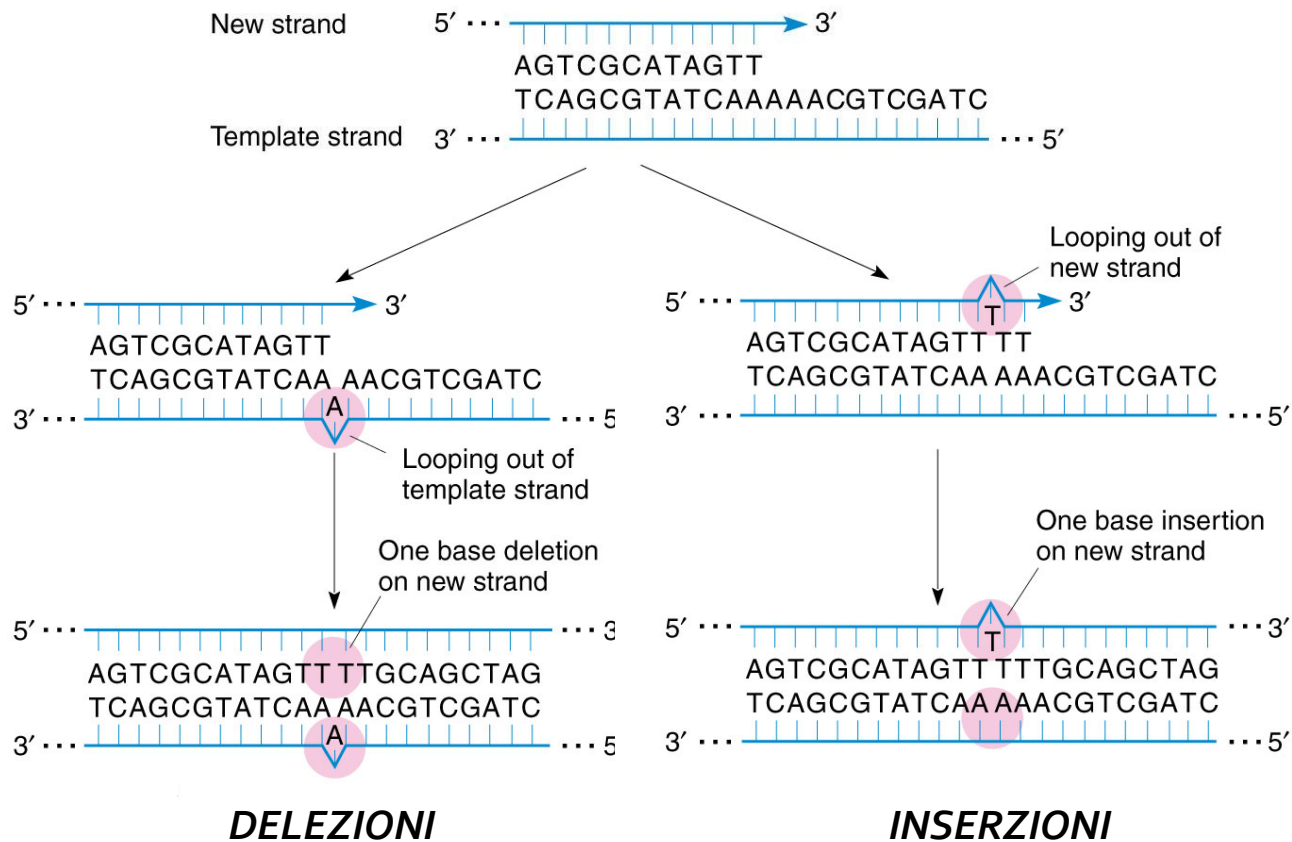
Alla replicazione del DNA, l'assenza della base azotata nella catena che funge da stampo porta all'inserimento di un nucleotide casuale nella posizione complementare della catena neosintetizzata

→ causa sia di *transizioni* che di *transversioni*

MUTAGENESI Spontanea

Inserzione / Delezione

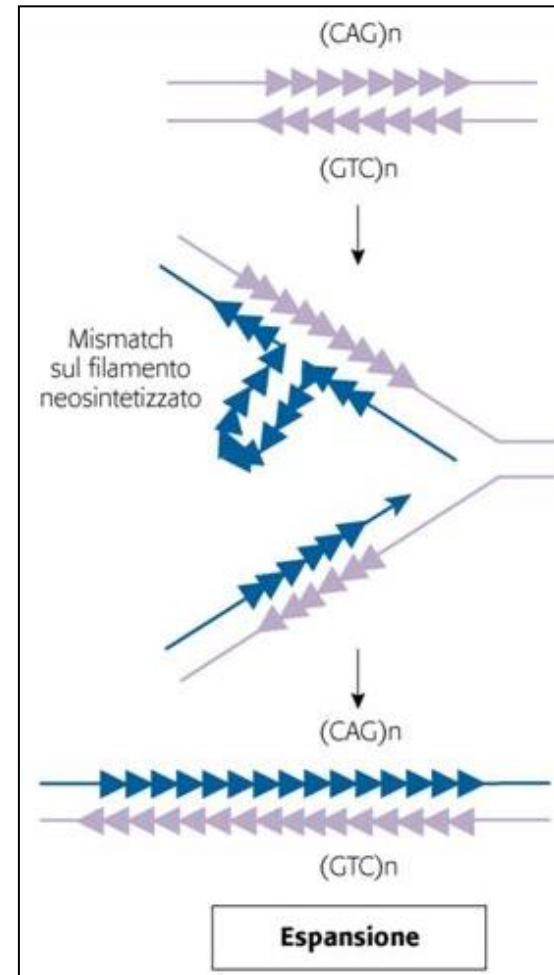
Origine di mutazioni per inserzione / delezione a seguito di posizionamento errato delle catene durante la sintesi del DNA



MUTAGENESI Spontanea

Mutazioni dinamiche

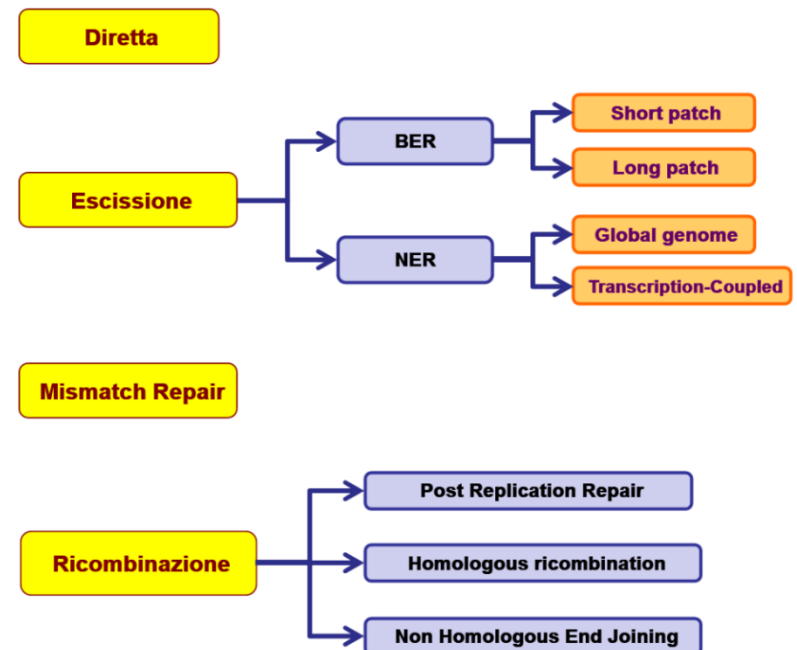
- Sono state riscontrate mutazioni geniche che portano alla espansione di segmenti di DNA costituiti da ripetizioni di triplette nucleotidiche
- A causa di errori della DNA polimerasi alla replicazione, queste mutazioni sono instabili e possono espandersi ad ogni generazione successiva: per questa ragione si dicono mutazioni dinamiche



RIPARO DEI DANNI AL DNA

RIPARO DANNI AL DNA

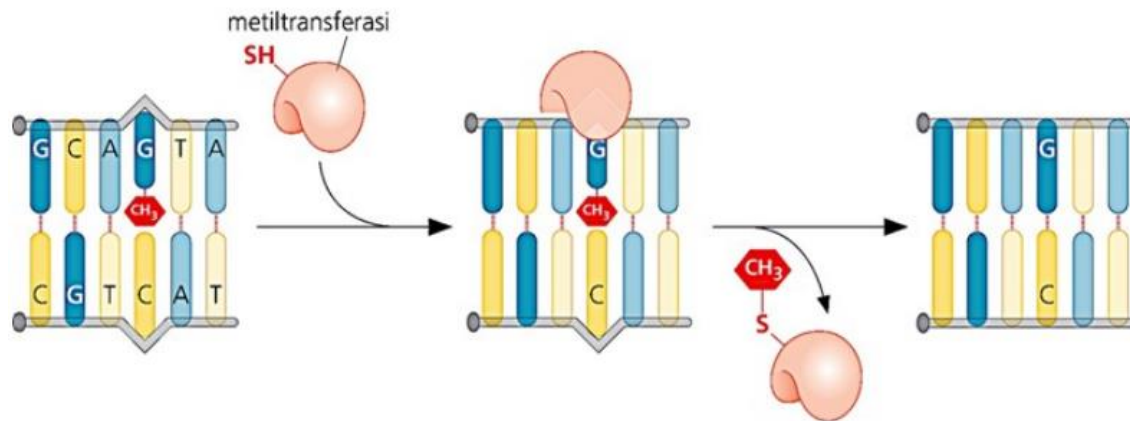
- Numerosi sistemi di riparazione dei danni al DNA si sono evoluti e specializzati nel riparare le diverse tipologie di alterazioni che possono colpire il DNA



RIPARO DELLE MUTAZIONI

O6-methylguanine methyltransferase

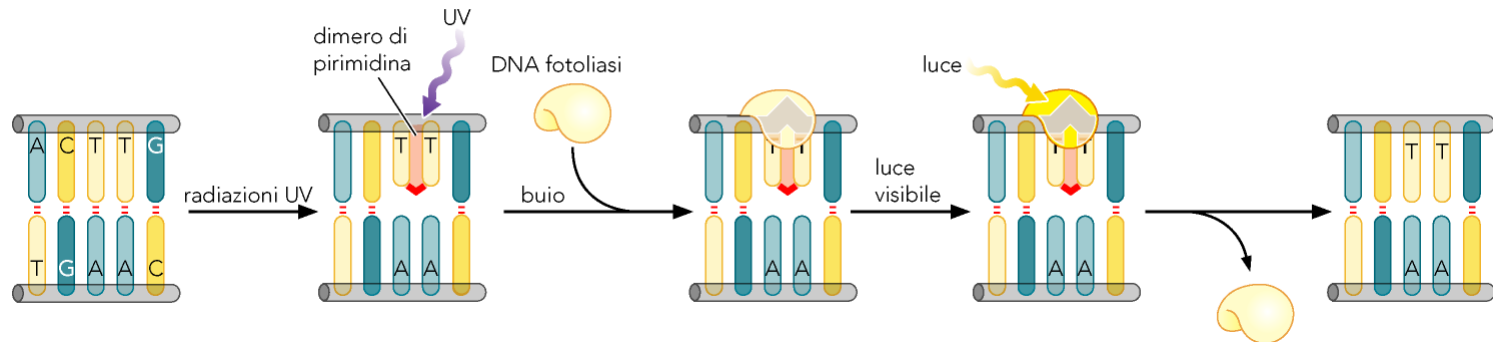
- Un meccanismo diretto di riparo di Guanine metilate è fornito da una metiltransferasi in grado di legare a se' il gruppo metilico (-CH₃), sottraendolo alla O6-metilguanina e ripristinando il nucleotide normale



RIPARO DELLE MUTAZIONI

DNA Fotoliasi

- La formazione di dimeri di Timina può essere corretta da un enzima, la DNA fotoliasi, un enzima attivato dalla luce, altamente conservato dai batteri alle piante ed agli animali (*Selby CP, et al. PNAS 103:17696–700. 2006*)



- Tuttavia il meccanismo della fotoliasi sembra non essere più funzionante negli esseri umani e in altri mammiferi, dove invece viene utilizzato meccanismo di riparazione dell'escissione nucleotidica (*Lucas-Lledó JJ, Lynch M. Mol Biol Evol. 26:1143–53. 2009*)

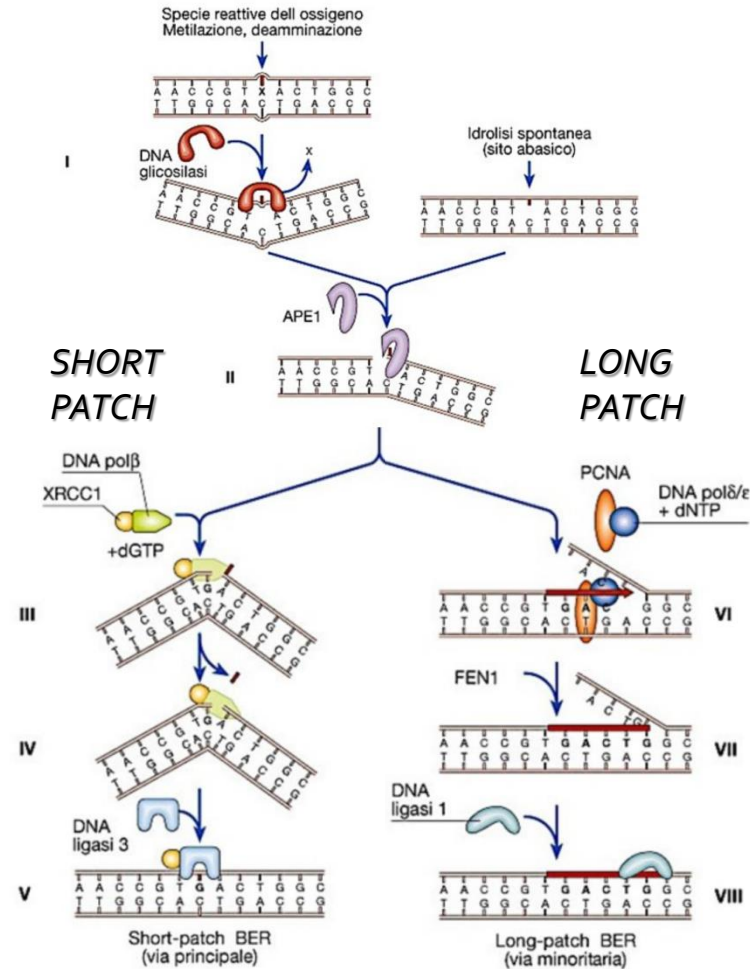
RIPARO DELLE MUTAZIONI

Base Excision Repair (BER)

Il *Base Excision Repair (BER)* è responsabile principalmente della rimozione e riparazione di piccole lesioni di basi che non distorcono l'elica di DNA, quali ad esempio:

- Basi ossidate
- Basi alchilate
- Basi deaminate

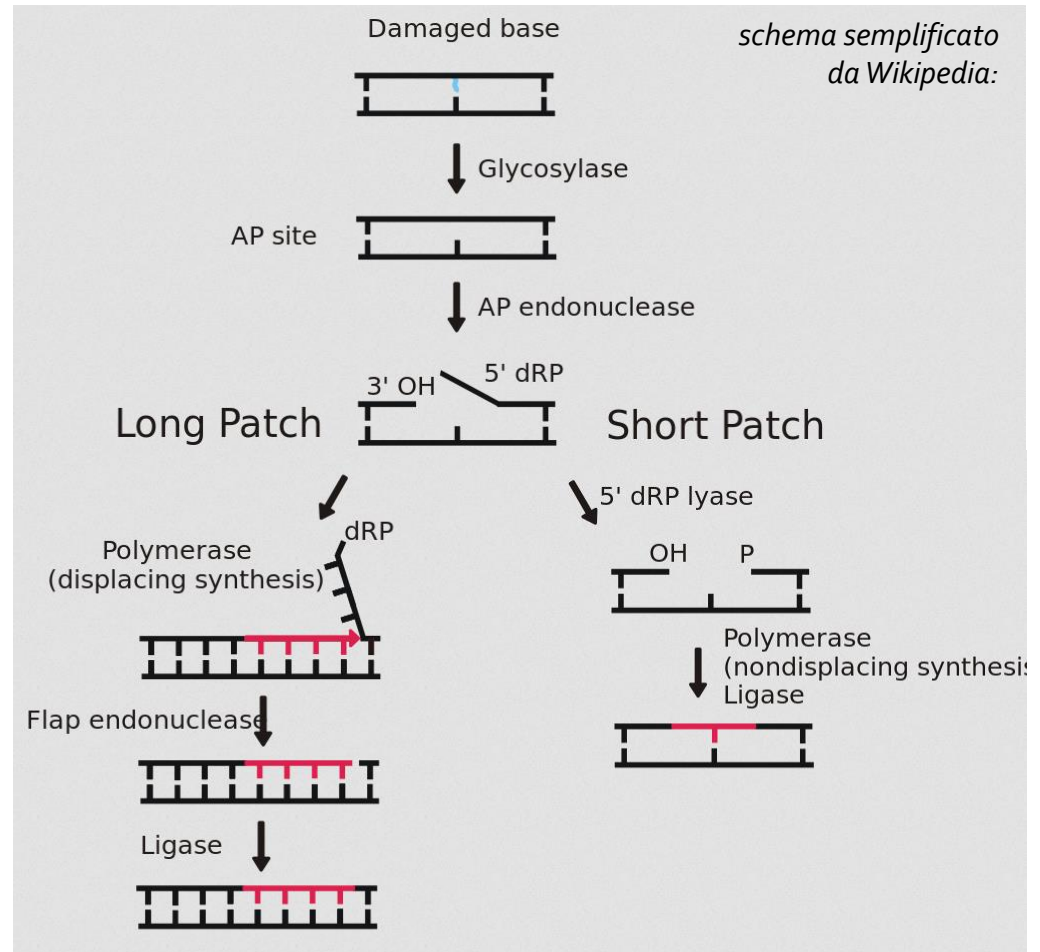
Lesioni più ampie che distorcono l'elica del DNA sono invece riparate dal sistema *nucleotide excision repair* (discusso successivamente)



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Base Excision Repair (BER)

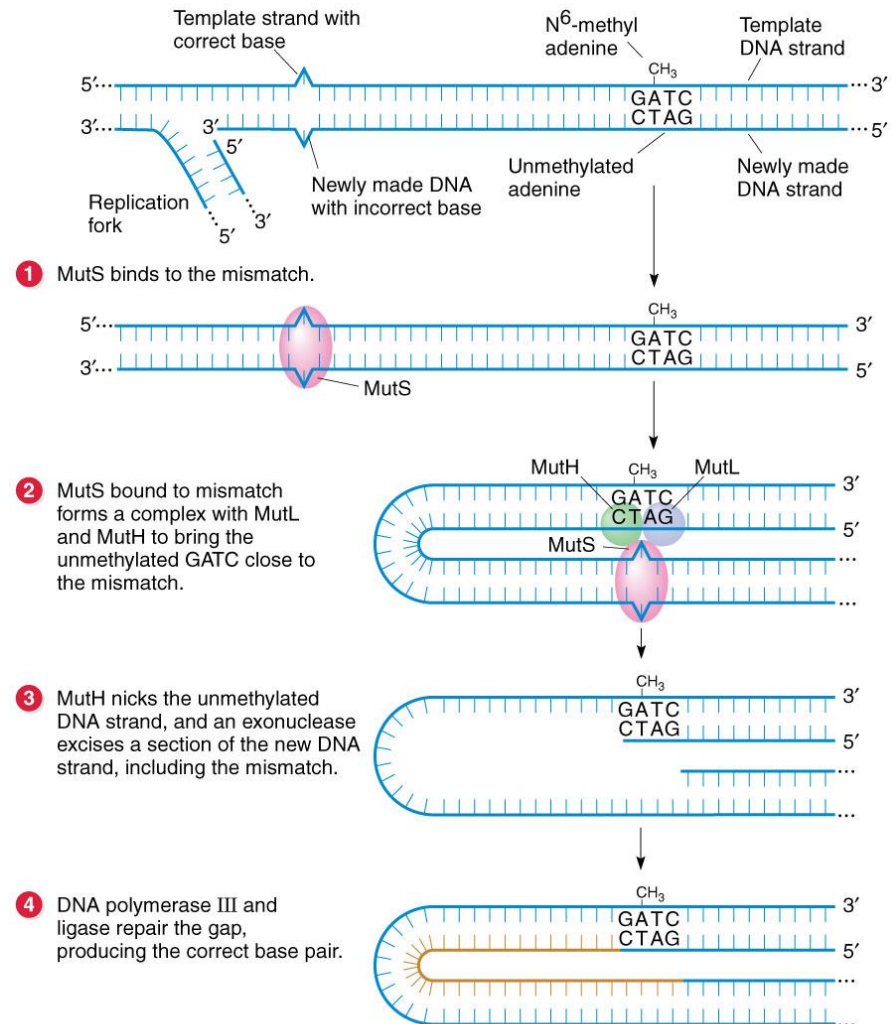
- La base danneggiata è riconosciuta e rimossa da una *DNA glicosilasi*
- Il sito apurinico / apirimidinico (*AP site*) è tagliato da una *endonuclease AP*
- La regione aperta è successivamente riparata tramite:
 - via breve (*short patch*): una regione anucleotidica è chiusa con il corretto nucleotide
 - via lunga (*long patch*): un piccolo segmento di DNA è ripristinato



RIPARO DELLE MUTAZIONI

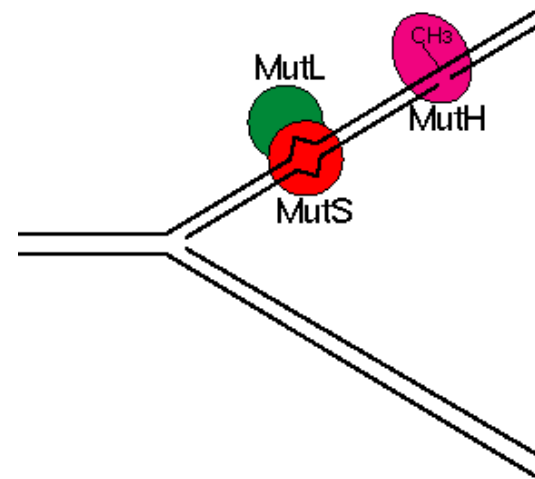
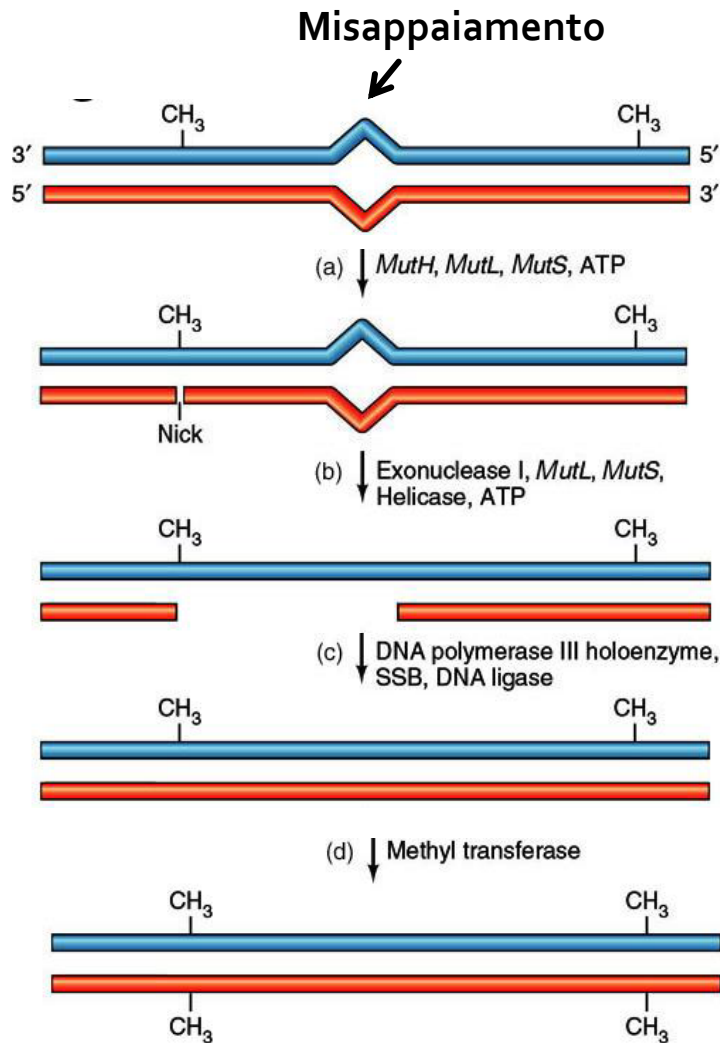
Mismatch Repair (Procarioti)

- Nel caso di misappaiamento tra nucleotidi, un meccanismo specializzato nella correzione è il DNA mismatch repair (MMR)
- È un sistema per riconoscere e riparare piccole inserzioni, delezioni o incorporazione errata di nucleotidi durante la replicazione e la ricombinazione del DNA.



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Mismatch Repair



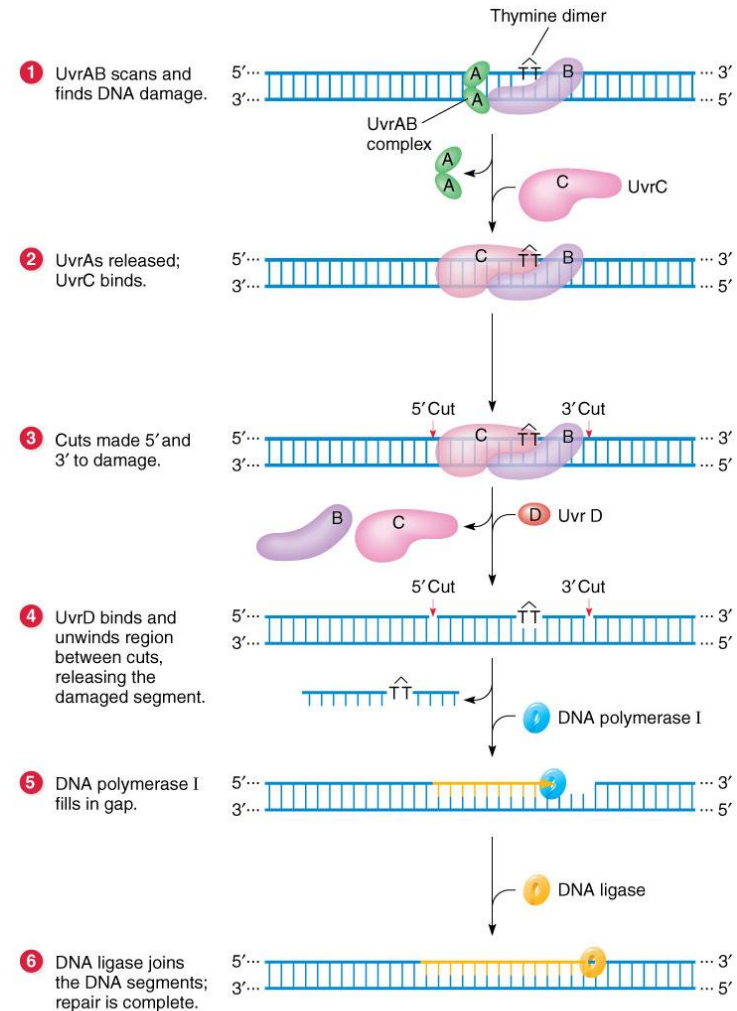
Negli eucarioti:

- Omologo di MutS è MSH2
- Omologo di MutL è MLH1
- MutH non ha un omologo eucariotico. La sua funzione di endo- ed exonucleasi è assunta dagli omologi MLH1.

RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

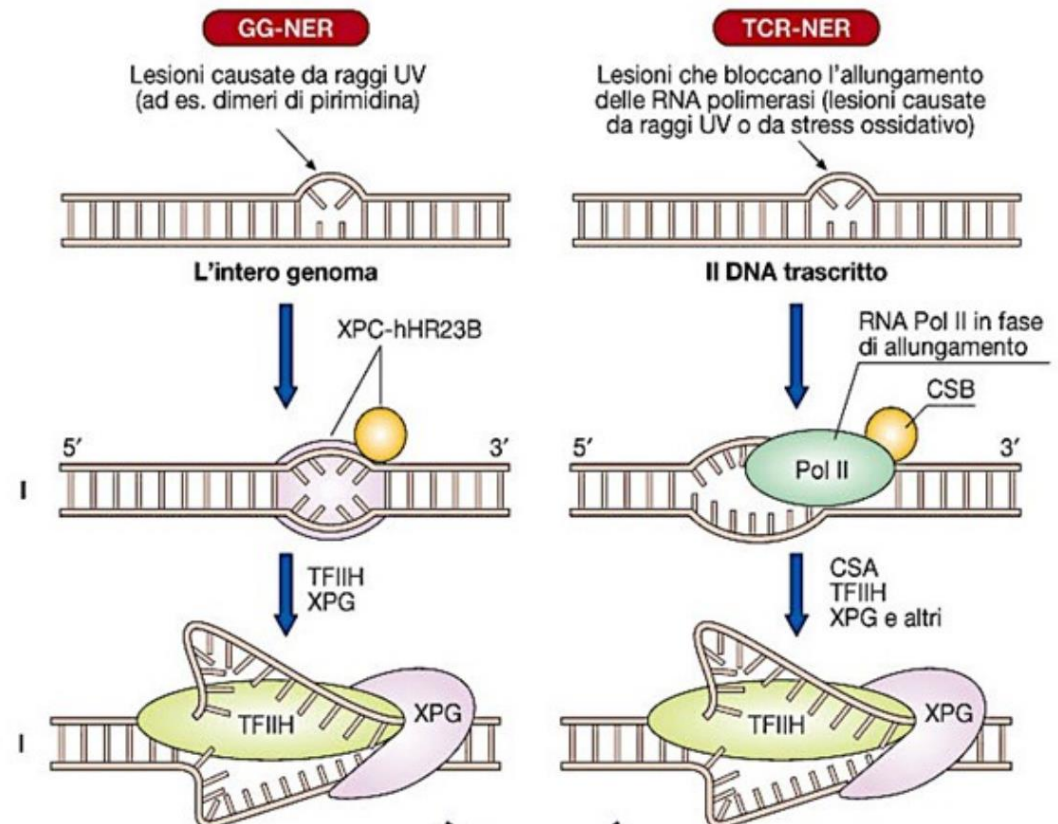
- Nel caso di eventi che causano la deformazione della doppia catena di DNA, ad esempio in seguito a formazione di dimeri di Timina, interviene un processo di riparo che ripristina la doppia catena originaria, chiamato Nucleotide Excision Repair (NER)



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

- Danni causati dalla formazione di dimeri di pirimidine sono corretti essenzialmente tramite il sistema nucleotide excision repair (NER)



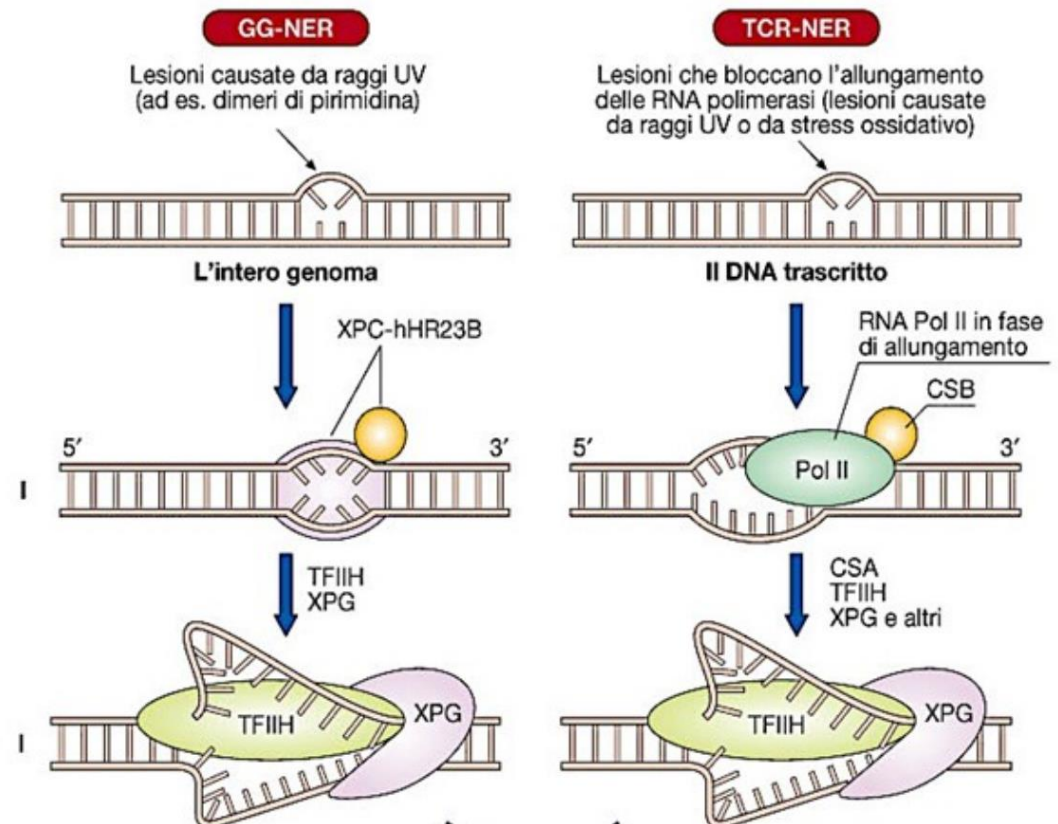
RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

La riparazione dell'escissione nucleotidica negli eucarioti può essere suddivisa in due sottovie:

- NER genomico globale (GG-NER)
- NER accoppiato alla trascrizione (TC-NER).

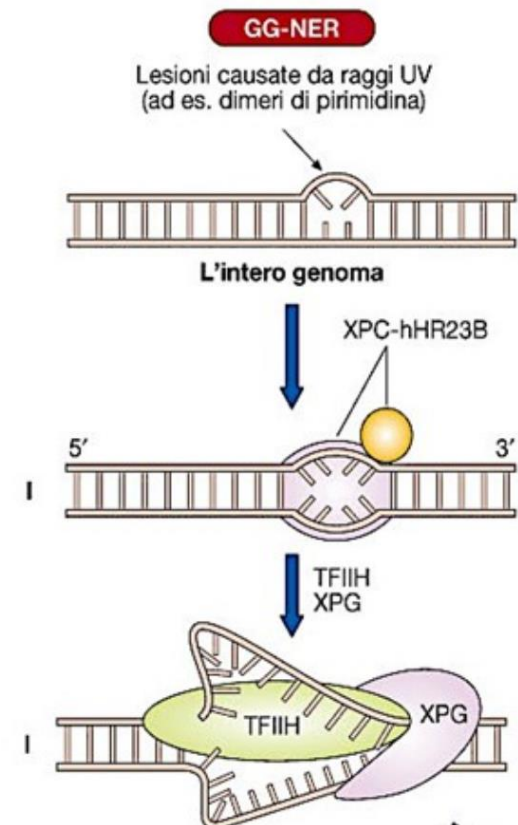
Le due vie differiscono nel modo in cui riconoscono il danno al DNA ma condividono lo stesso processo per la riparazione della lesione.



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

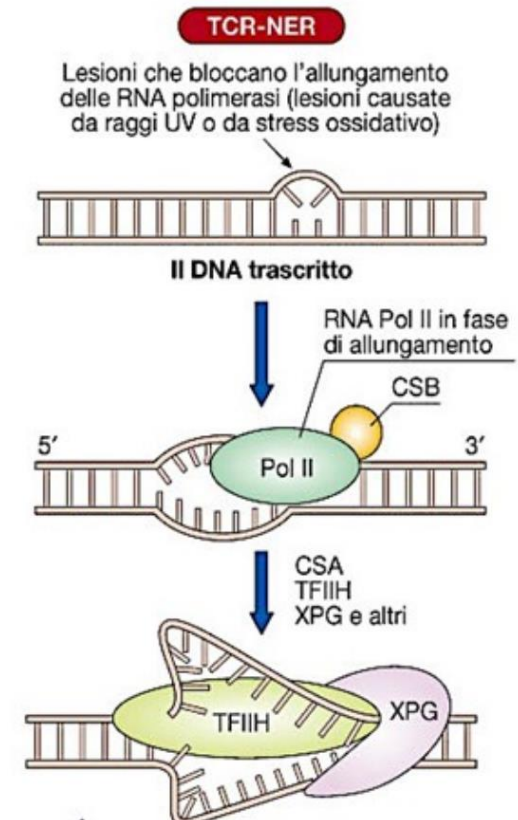
- Global genomic NER (GG-NER) repairs damage in both transcribed and untranscribed DNA strands in active and inactive genes throughout the genome.
- This process is not dependent on transcription.
- This pathway employs several "damage sensing" proteins including the DNA-damage binding (DDB) and XPC-Rad23B complexes that constantly scan the genome and recognize helix distortions:
- the XPC-Rad23B complex is responsible for distortion recognition



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

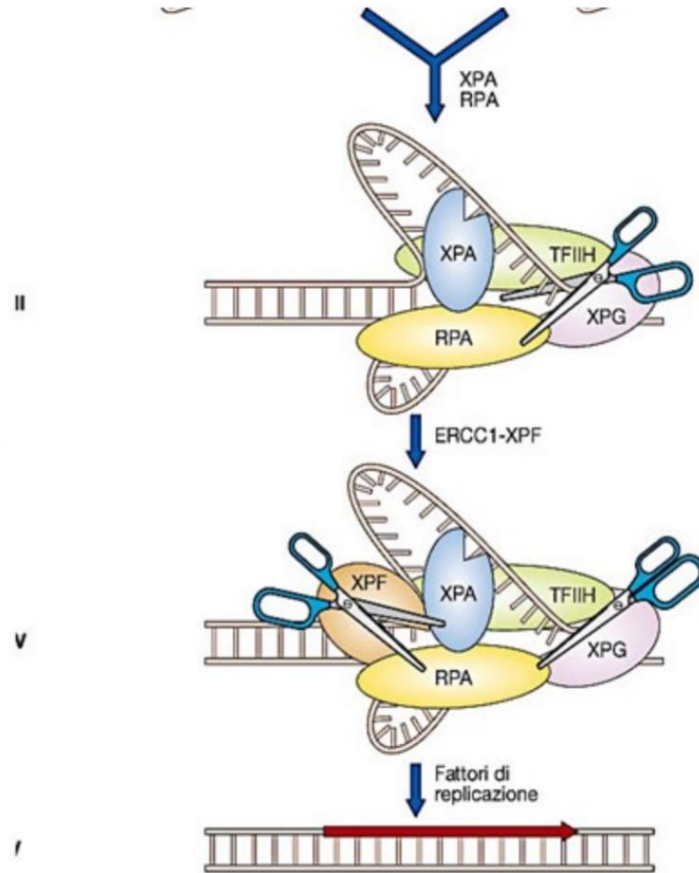
- Transcription coupled NER (TC-NER) initiates when RNA polymerase stalls at a lesion in DNA: the blocked RNA polymerase serves as a damage recognition signal, which replaces the need for the distortion recognition properties of the XPC-RAD23B and DDB complexes.
- CS proteins (CSA and CSB) bind to DNA damage sites instead of XPC-Rad23B.
- NER repairs the transcribed strands of transcriptionally active genes faster than it repairs nontranscribed strands and transcriptionally silent DNA.



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Escissione di nucleotidi

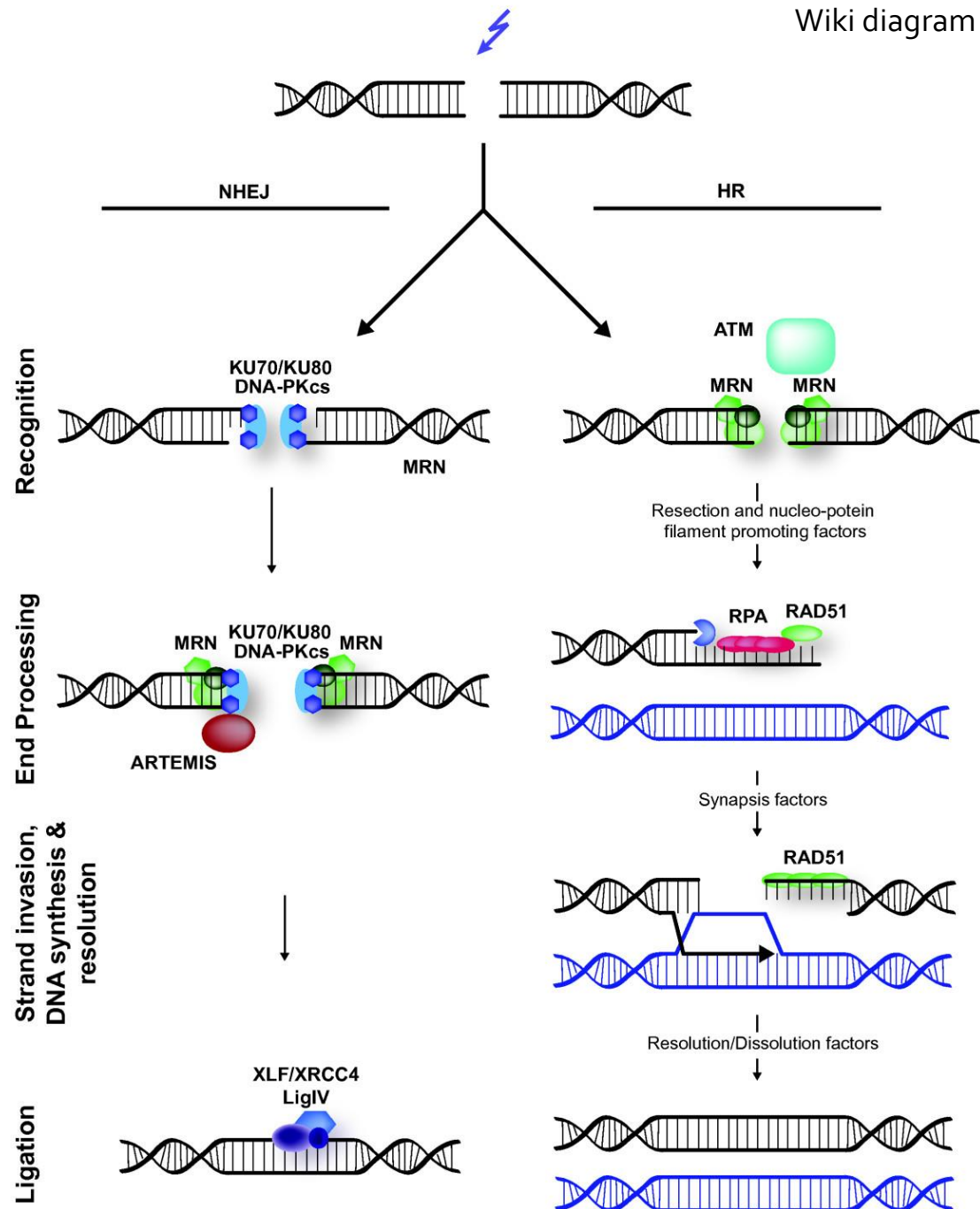
- Upon identification of a damaged site, repair proteins are recruited on site to:
 - verify presence of DNA damage;
 - excise the DNA surrounding the lesion;
 - fill in the repair patch.



HR e NHEJ

Nel caso di rotture del doppio filamento, due sono i meccanismi deputati al riparo della lesione:

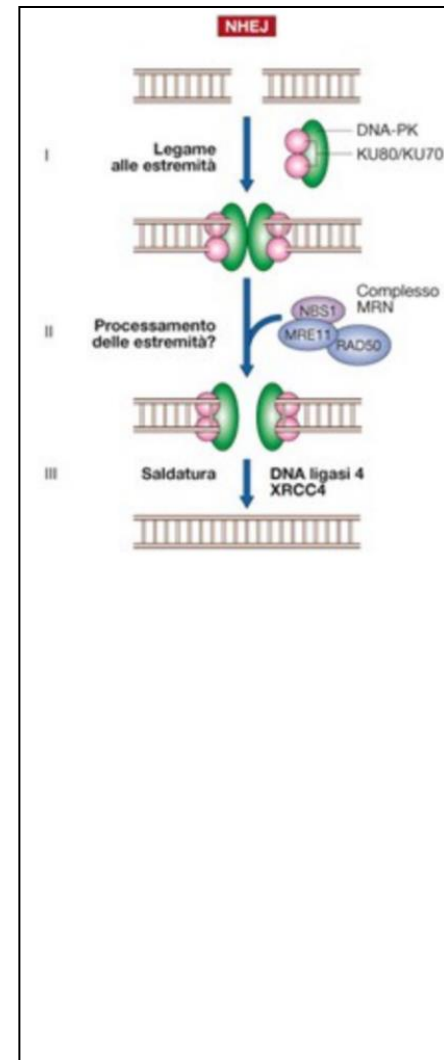
- Homologous recombination (HR)
- Non-homologous end-joining (NHEJ)



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Non-Homologous End Joining

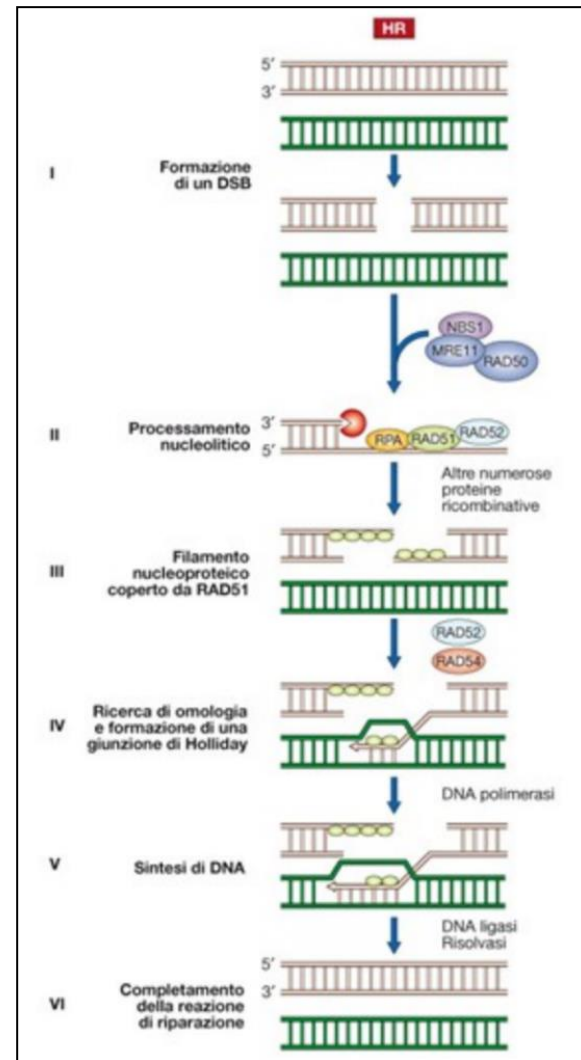
- Questo meccanismo è portato a produrre errori: ad esempio traslocazioni o inversioni cromosomiche.
- Inoltre al punto di giunzione dei due segmenti di DNA, la sequenza nucleotidica risulta spesso alterata per la presenza di piccole delezioni o inserzioni
- Rappresenta un meccanismo estremo di salvataggio



RIPARO DELLE MUTAZIONI

Homologous Recombination

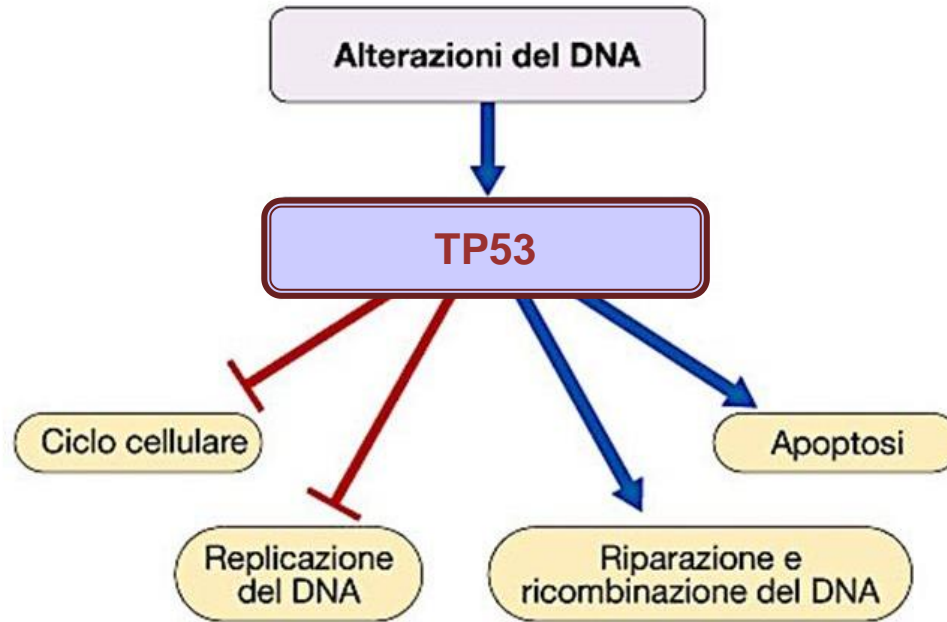
- Il meccanismo che è in grado di correggere in maniera appropriata le rotture della doppia elica è la ricombinazione omologa
- Questo complesso meccanismo è in grado di ripristinare la struttura cromosomica e la sequenza del DNA impiegando la sequenza omologa come stampo per produrre fedelmente la nuova catena



TP53

Funziona da snodo centrale per coordinare gli eventi cellulari messi in atto in risposta a segnalazioni di danni al DNA

In risposta a segnalazioni di danni al DNA, p53 attiva l'espressione di geni implicati nella inibizione della replicazione del DNA e del ciclo cellulare

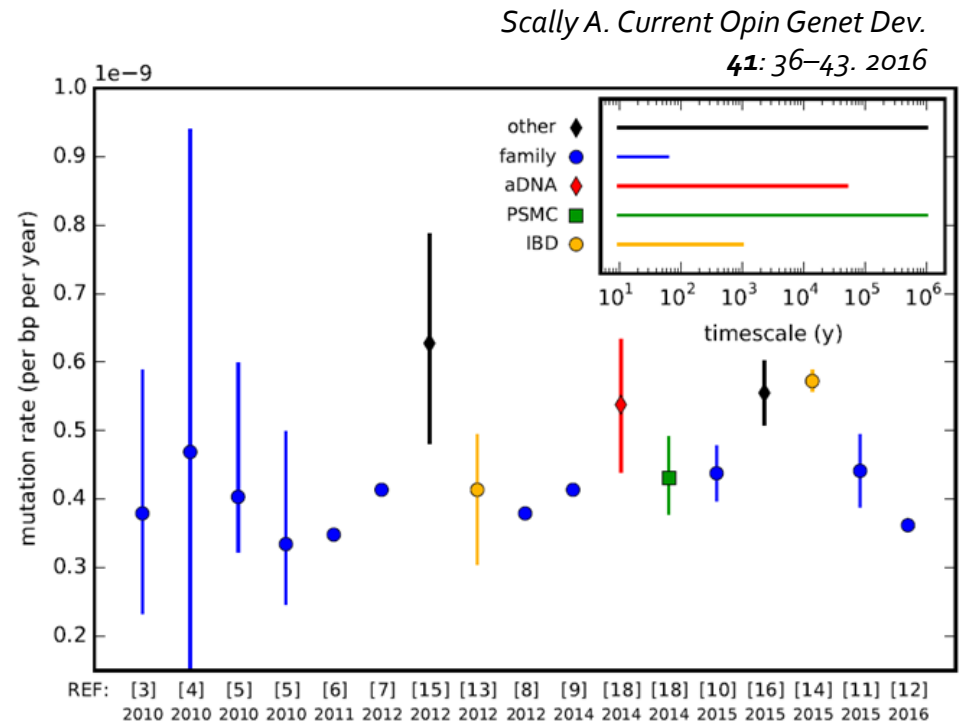


Se non riparati, promuove il processo di apoptosi o morte cellulare

Lascia il tempo alla cellule per riparare i danni

MUTAZIONI: Frequenza

- Errori spontanei avvengono durante la replicazione o la riparazione del DNA
- Tali errori avvengono con una frequenza di circa 0.5×10^{-9} per nucleotide/ anno
- Mediamente, ogni gene può pertanto subire più di 10^5 mutazioni nel corso della vita di un uomo



In caso di difetti in geni del riparo del DNA, la frequenza di mutazioni è più alta rispetto alla norma

MALATTIE ASSOCIATE A DIFETTI NEL RIPARO DI MUTAZIONI

Alterazioni in geni del riparo del DNA sono associati ad un'alta frequenza di aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche; la maggior parte è anche associata a una maggiore predisposizione al cancro.

Malattie associate a GG-NER

- Mutazioni in proteine coinvolte in GG-NER sono responsabili di molteplici patologie genetiche, tra cui:
- Xeroderma pigmentoso (XP): fotosensibilità grave, alti tassi di cancro in aree del corpo esposte al sole

Malattie associate a TC-NER

- Mutazioni in proteine coinvolte in TC-NER sono responsabili di molteplici patologie genetiche, tra cui:
- Cockayne syndrome (CS): fotosensibilità, ritardo mentale, caratteristiche simili alla progeria, microcefalia

MALATTIE ASSOCIATE A DIFETTI NEL RIPARO DI MUTAZIONI

Alterazioni in geni del riparo del DNA sono associati ad un'alta frequenza di aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche; la maggior parte è anche associata a una maggiore predisposizione al cancro.

Malattie associate a difetti nel MMR

- Mutazioni in proteine coinvolte in Mismatch Repair sono responsabili di:
- *Sindrome di Lynch* o Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC): causata da mutazioni in geni MSH2, MLH1, MSH6, PMS2

MALATTIE ASSOCIATE A DIFETTI NEL RIPARO DI MUTAZIONI

Alterazioni in geni del riparo del DNA sono associati ad un'alta frequenza di aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche; la maggior parte è anche associata a una maggiore predisposizione al cancro.

Malattie associate a difetti di HR

- Mutazioni in proteine coinvolte in ricombinazione omologa sono responsabili di :
- Breast Ovarian Cancer syndrome: causata da mutazioni in BRCA1 / BRCA2 ed altri geni
- Fanconi anemia: causata da geni (almeno 22 noti) coinvolti nel riparo del DNA tramite ricombinazione omologa; leucemie acute sono la principali neoplasie in questi pazienti

MALATTIE ASSOCIATE A DIFETTI NEL RIPARO DI MUTAZIONI

Alterazioni in geni del riparo del DNA sono associati ad un'alta frequenza di aberrazioni cromosomiche e mutazioni geniche; la maggior parte è anche associata a una maggiore predisposizione al cancro.

Malattie associate a difetti nella percezione del danno al DNA

- *Ataxia telangiectasia*: causata da mutazioni nel gene ATM, in grado di percepire e segnalare danni al DNA. È causa di leucemie

Malattie associate a difetti nel coordinamento della risposta cellulare al danno del DNA

- *Sindrome di Li Fraumeni*: causata da mutazioni nel gene TP53, implicata nel sovrintendere e coordinare (*checkpoint*) gli eventi di riparo e replicazione del DNA. Mutazioni in TP53 aumentano il rischio di ogni tipo di tumore, in particolare tumori mammari, leucemie e sarcomi;

FINE