
Le mutazioni del DNA e le patologie ereditarie

Il Folding delle proteine

Dopo la sintesi le proteine devono assumere una conformazione tridimensionale (struttura terziaria)

Enzimi e proteine chaperone aiutano le altre proteine a sviluppare il corretto folding

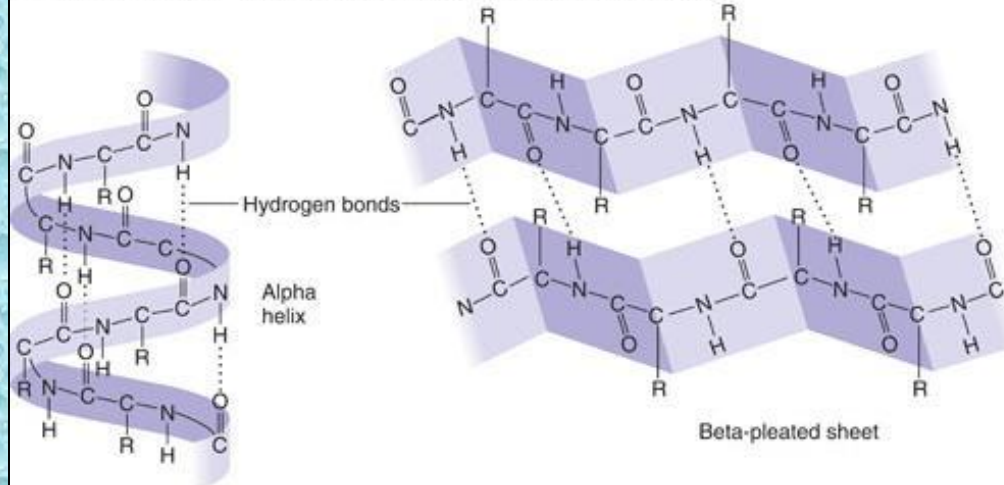
Proteine misfoldate sono marcate e smantellate

Le proteine non correttamente ripiegate sono causa di patologie

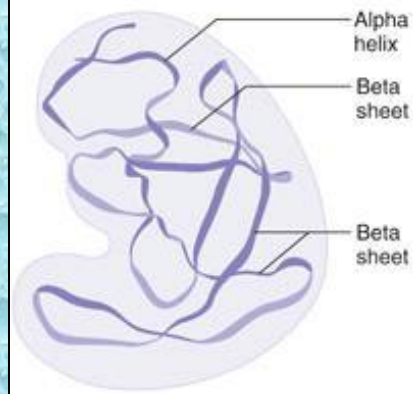
I Livelli di struttura delle proteine



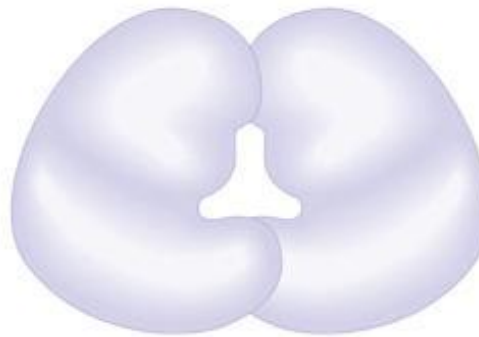
a. **Primary structure**—the sequence of amino acids in a polypeptide chain



b. **Secondary structure**—loops, coils, sheets, or other shapes formed by hydrogen bonds between neighboring carboxyl and amino groups

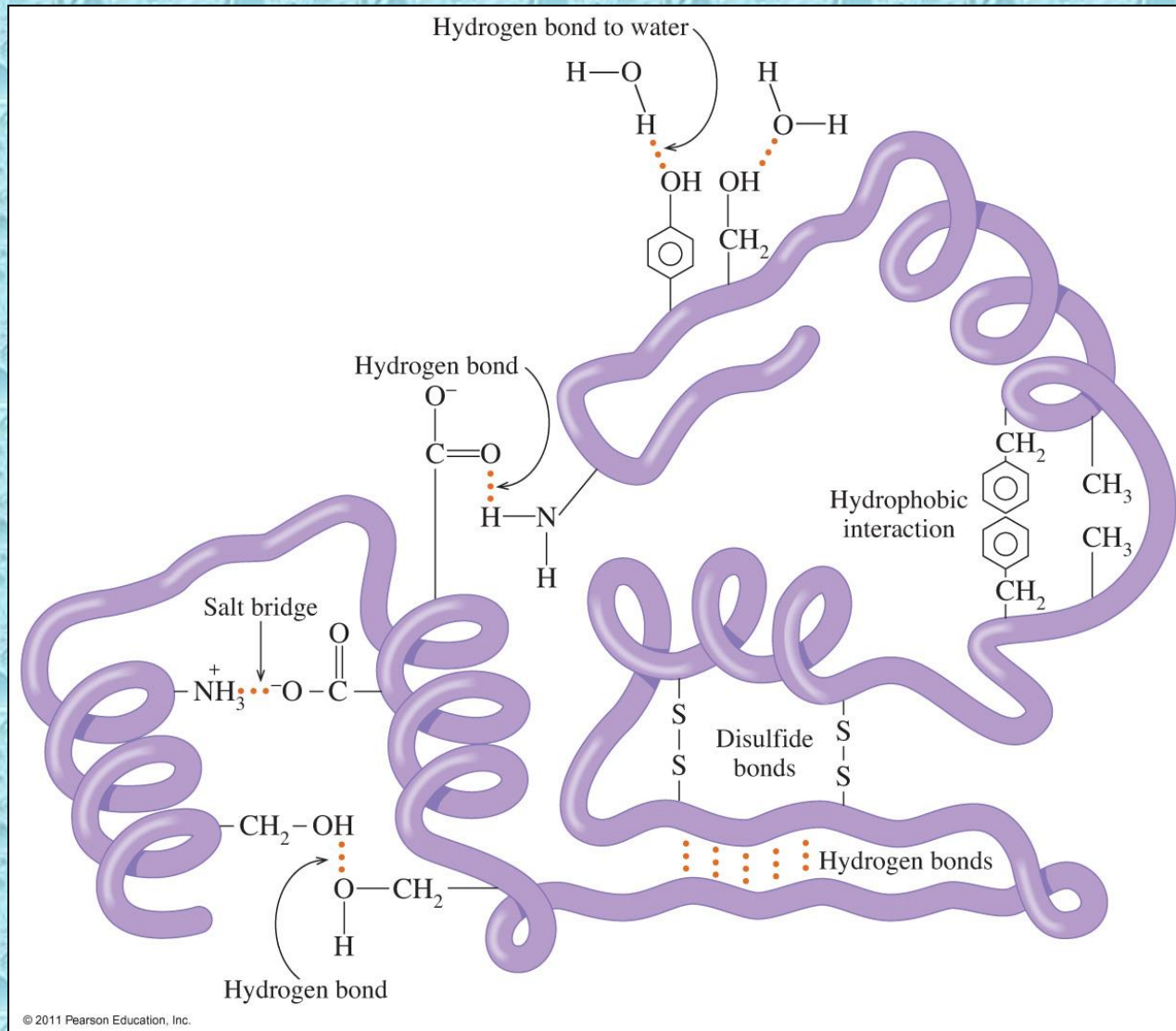


c. **Tertiary structure**—three-dimensional forms shaped by bonds between R groups, interactions between R groups and water

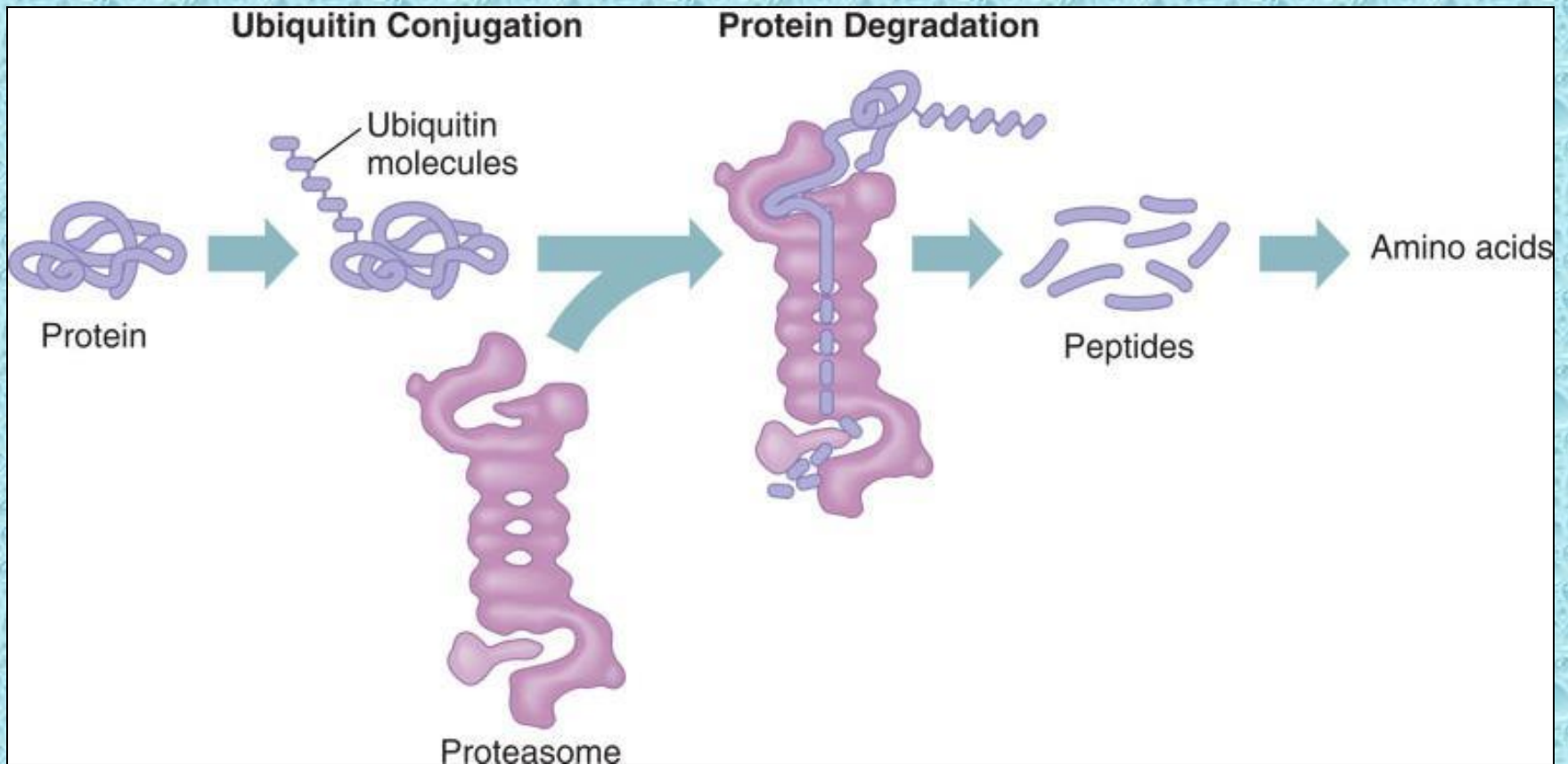


d. **Quaternary structure**—protein complexes formed by bonds between separate polypeptides

La struttura terziaria delle proteine



Le proteine senza il corretto folding sono distrutte



Il misfolding delle proteine ne causa la perdita di funzione e può causare patologie

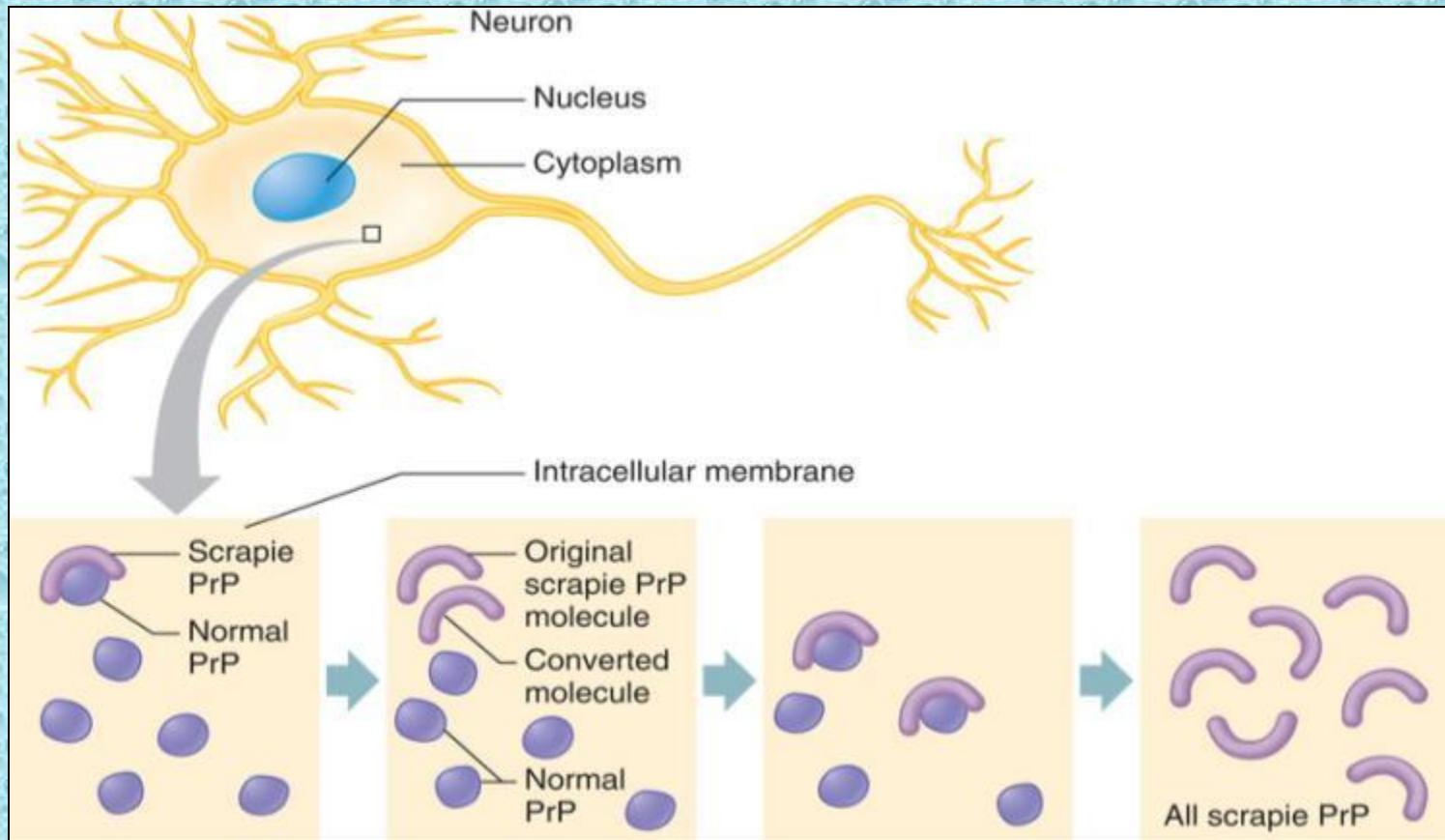
Disorders of Protein Folding and Aggregation

| Disease | Misfolded Protein | OMIM (protein) |
|--|--------------------------------|-----------------------|
| Alzheimer disease | amyloid beta precursor protein | 104760 |
| Familial amyotrophic lateral sclerosis | superoxide dismutase | 147450 |
| Huntington disease | huntingtin | 143100 |
| Parkinson disease | alpha synuclein | 163890 |
| Lewy body dementia | | |
| Prion disorders | prion protein | 176640 |

(All but Huntington disease are genetically heterogeneous; that is, abnormalities in different proteins cause similar syndromes.)

Il misfolding delle proteine: i prioni

Patologia da proteine mal ripiegate: I prioni non correttamente ripiegati causano la scrapie degli ovini, l'encefalopatia spongiforme nei bovini e una variante del morbo di Creutzfeldt-Jakob negli umani

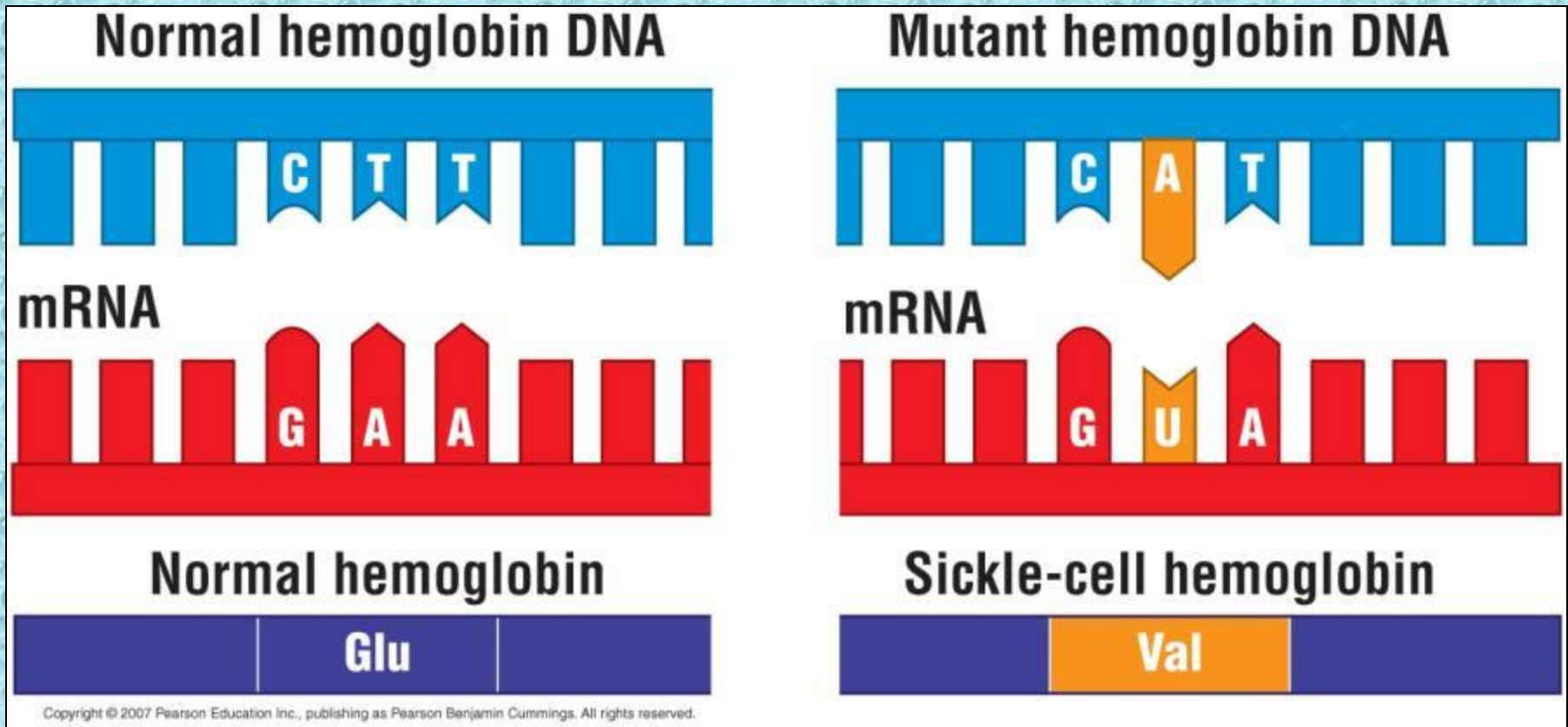


Le mutazioni del DNA possono causare il misfolding delle proteine

Le mutazioni sono dei cambiamenti del materiale genetico.

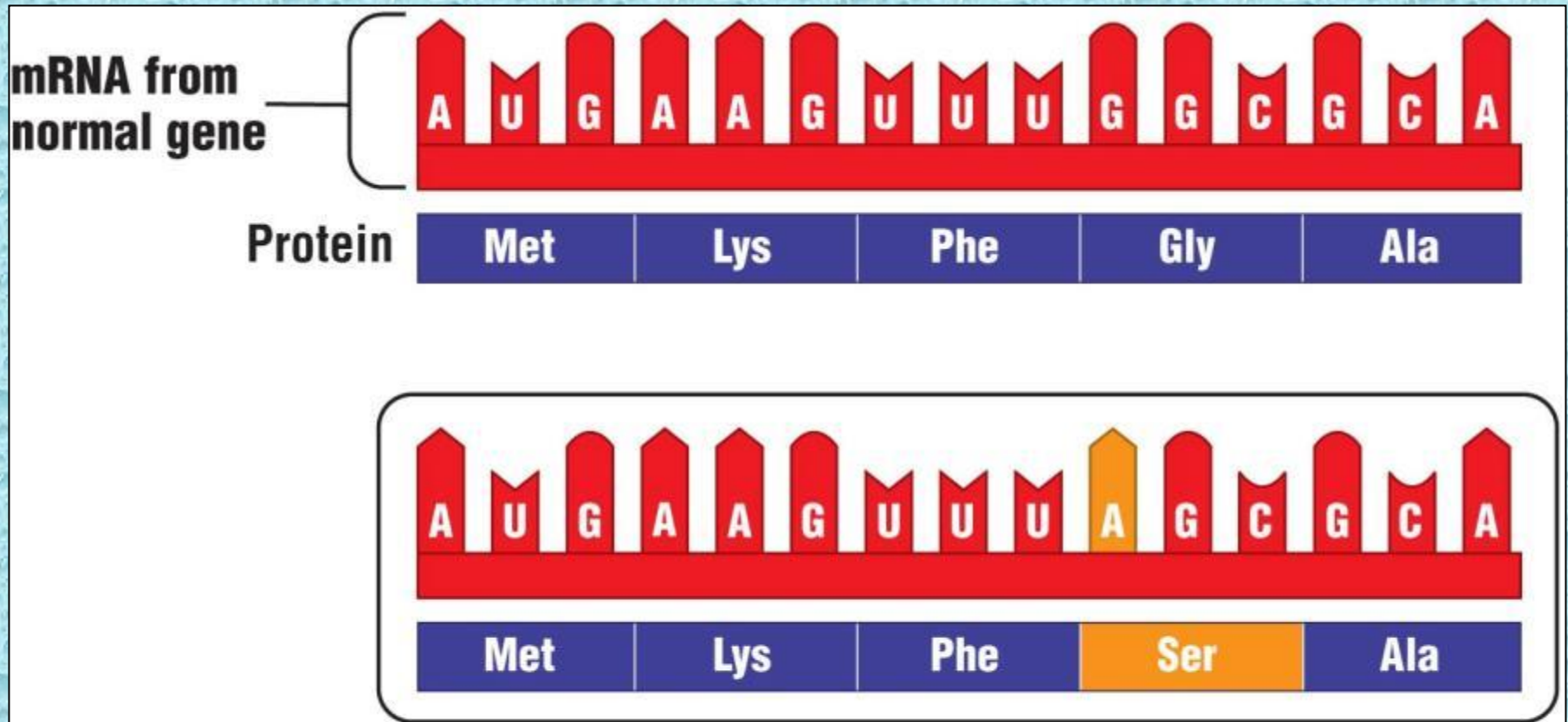
Mutazioni del DNA

- Una mutazione
 - È un qualsiasi cambiamento della sequenza del DNA.



Tipo di Mutazione

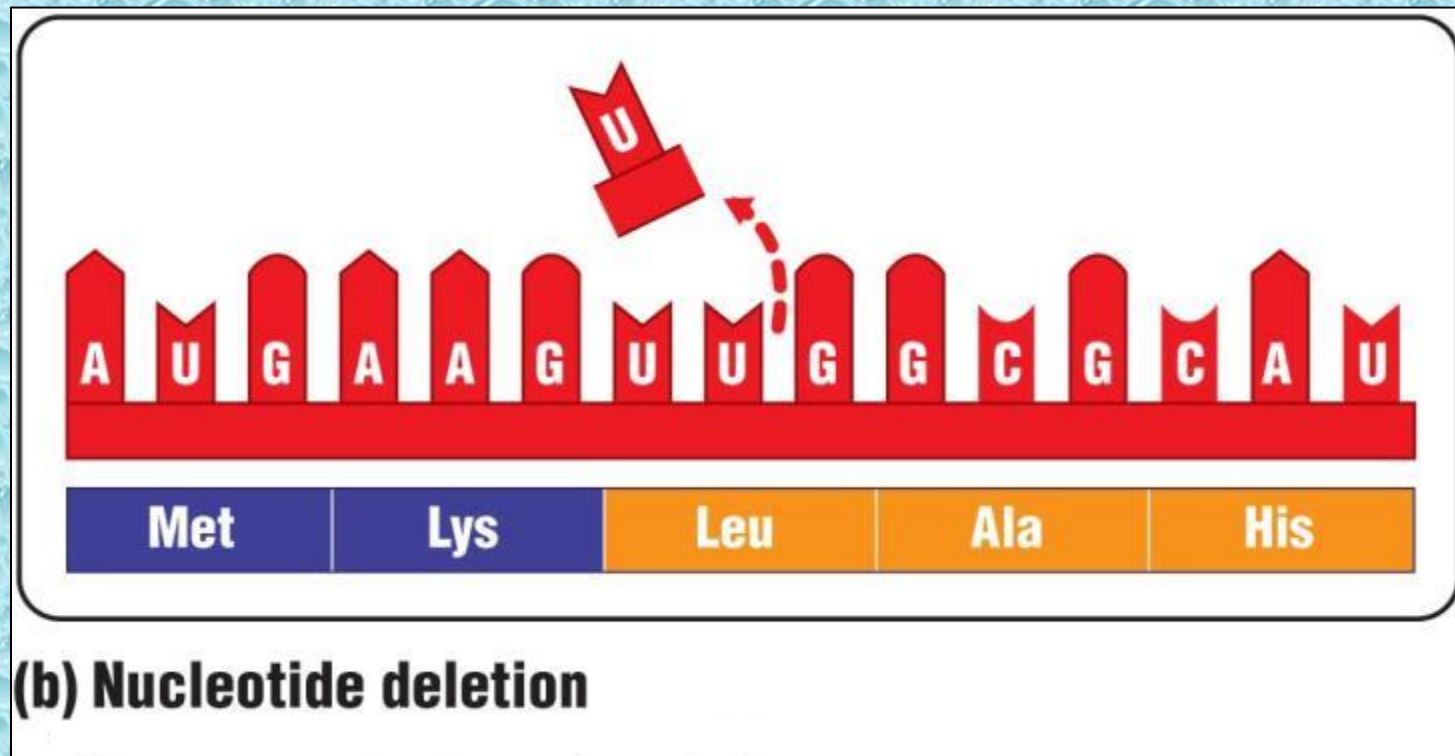
- Le mutazioni di un gene
 - Possono essere divise in due categorie generali:
Le sostituzioni di una base e inserzioni o delezioni



(a) Base substitution

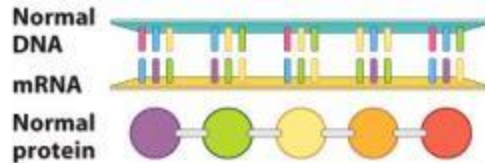
Tipo di Mutazione

- Insertioni e delezioni
 - Possono avere effetti disastrosi.
 - Può cambiare la fase di lettura del gene.



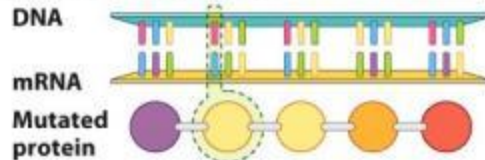
Tipo di Mutazione

TYPES OF MUTATIONS

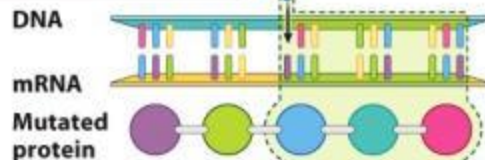


POINT MUTATIONS

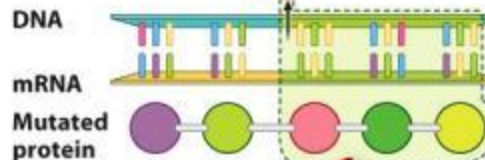
BASE-PAIR SUBSTITUTION



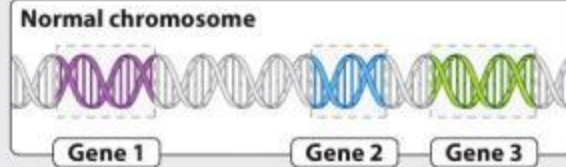
BASE-PAIR INSERTION



BASE-PAIR DELETION

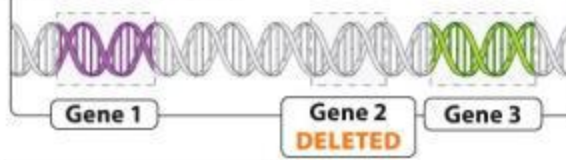


Insertions and deletions can be much more harmful than substitutions because they can alter the reading frame for the rest of the gene.

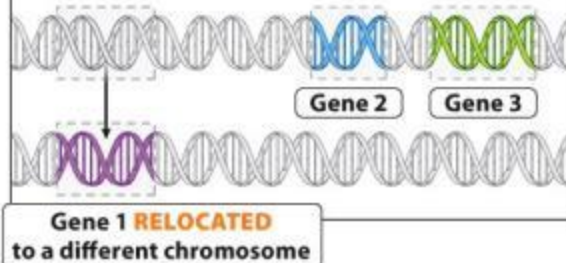


CHROMOSOMAL ABERRATIONS

GENE DELETION



GENE RELOCATION



GENE DUPLICATION



In point mutations, one base pair is changed, whereas in chromosomal aberrations, entire sections of a chromosome are altered.

Tipo di Mutazione

Le mutazioni che producono cambiamenti in un singolo gene sono dette **mutazioni geniche**.

Le mutazioni che producono cambiamenti in un intero cromosoma sono dette **mutazioni cromosomiche** e sono le più devastanti.

Tipo di Mutazione

Mutazioni geniche

Le mutazioni geniche che coinvolgono uno o pochi nucleotidi sono chiamate **mutazioni puntiformi** perchè avvengono in un singolo punto della sequenza del DNA

Le mutazioni puntiformi includono le **sostituzioni, le inserzioni, e le delezioni.**

Tipo di Mutazione

Le Sostituzioni
generalmente non
modificano più di
un singolo
amminoacido.

DNA: TAC GCA TGG AAT

mRNA: AUG CGU ACC UUA

Amino
acids: Met — Arg — Thr — Leu

↓ Substitution

DNA: TAC GTA TGG AAT

mRNA: AUG CAU ACC UUA

Amino
acids: Met — His — Thr — Leu

Tipo di Mutazione

Gli effetti delle **inserzioni** o delle **delezioni** sono più gravi.

L'aggiunta o la perdita di un nucleotide causa uno slittamento della fase di lettura dei codoni.

Cambiamenti di questo tipo sono detti mutazioni **frameshift**.

Tipo di Mutazione

In una **inserzione**, viene inserita una base in più nella sequenza del gene.

DNA: TAC GCA TGG AAT

mRNA: AUG CGU ACC UUA

Amino
acids:

Met – Arg – Thr – Leu

↓ Insertion

DNA: TAT CGC ATG GAA T

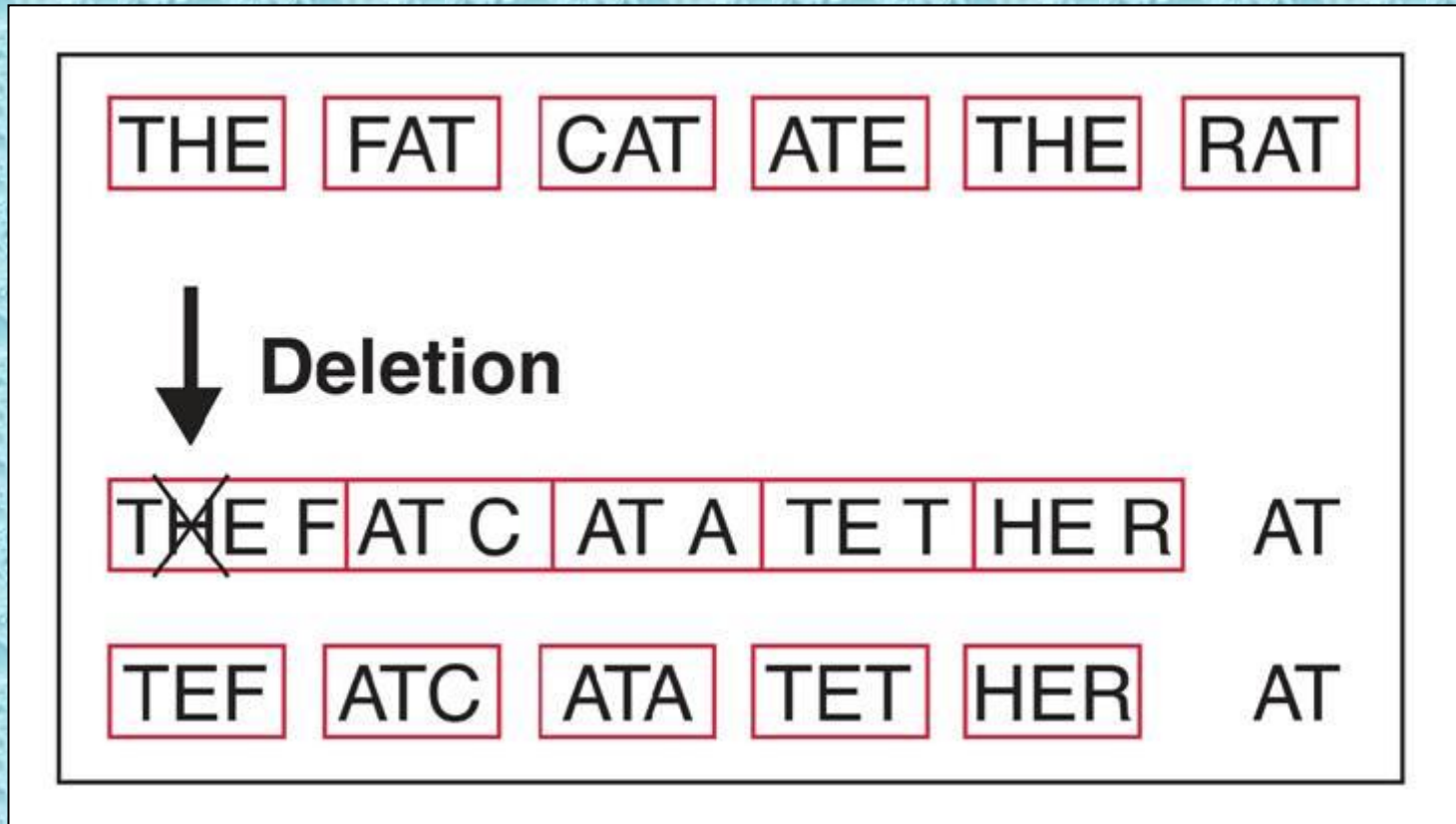
mRNA: AUA GCG UAC CUU A

Amino
acids:

Ile – Ala – Tyr – Leu

Tipo di Mutazione

La delezione di una singola base porta anch'essa allo slittamento della fase di lettura.



L'informazione genica viene perduta

Tipo di Mutazione

Le mutazioni Cromosomiche

Coinvolgono cambiamenti nel numero o nella struttura dei cromosomi.

Le mutazioni cromosomiche includono le **delezioni**, **le duplicazioni**, **le inversioni** e **le traslocazioni**.

Tipo di Mutazione

Le delezioni portano alla perdita di una parte o di tutto il cromosoma.



Original chromosome



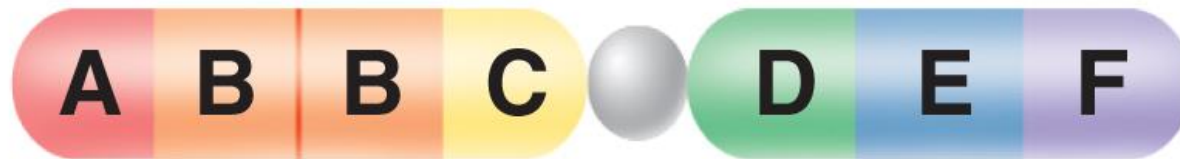
Deletion

Tipo di Mutazione

Le duplicazioni producono extra copie di parti di un cromosoma.



Original chromosome



Duplication

Tipo di Mutazione

Le inversioni invertono la direzione di parti di un cromosoma.



Original chromosome



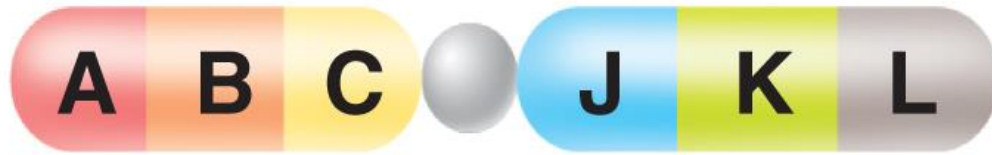
Inversion

Tipo di Mutazione

Le traslocazioni avvengono quando parte di un cromosoma si rompe e si attacca ad un altro.



Original chromosome



Translocation

Tipo di Mutazione

Significato delle mutazioni

Molte mutazioni non hanno nessun effetto o piccoli effetti sull'espressione genica (es. mutazioni silenti o che causano la sostituzione di un amminoacido con uno simile).

Altre mutazioni sono la causa di malattie genetiche.

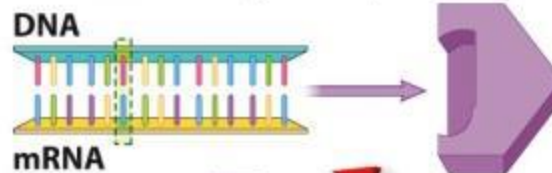
Causa delle mutazioni

- Le mutazioni del DNA si possono originare da:
 - Errori nella duplicazione del DNA.
 - Esposizione ad agenti fisici o chimici detti mutageni.
- Sebbene le mutazioni sono spesso dannose,
 - Esse sono fonte di diversità genica negli esseri viventi.
 - Esse contribuiscono all'evoluzione mediante selezione naturale.

Dalla mutazione alla patologia

FROM MUTATION TO ILLNESS

- 1** A mutated gene codes for a non-functioning protein, commonly an enzyme.

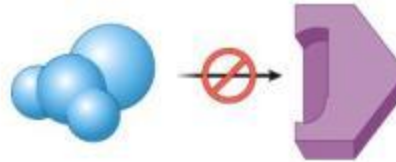


Functioning enzyme should look like this:



Non-functioning enzyme

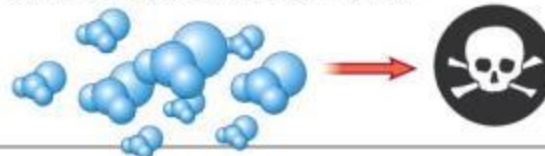
- 2** The non-functioning enzyme can't catalyze the reaction as it normally would.



- 3** The molecule it would have reacted with accumulates.

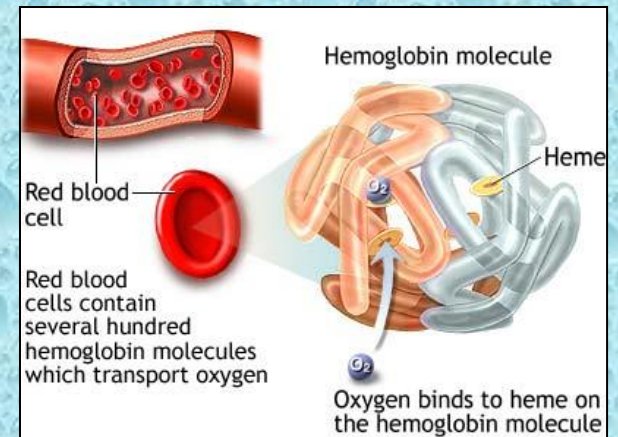
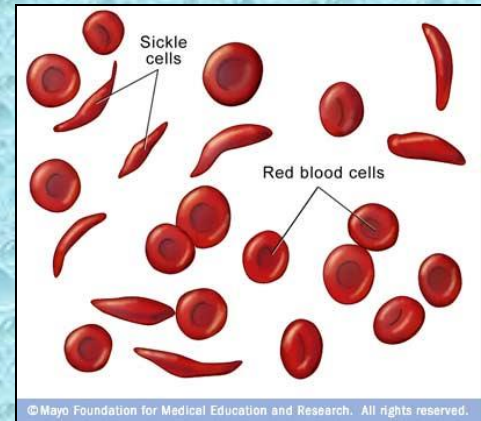


- 4** The accumulating chemical causes sickness (fast-flushing, for example) or death (Tay-Sachs disease, for example).



Es. 1: Anemia a cellule falciformi

- E' una patologia nella quale i globuli rossi diventano a forma di falce.
- I normali globuli rossi sono elastici e rotondi. Essi si muovono facilmente nei capillari sanguigni per ossigenare tutti i tessuti.
- Le cellule falciformi intasano i capillari.
- I capillari intasati possono causare dolore, infezioni e danneggiare gli organi.



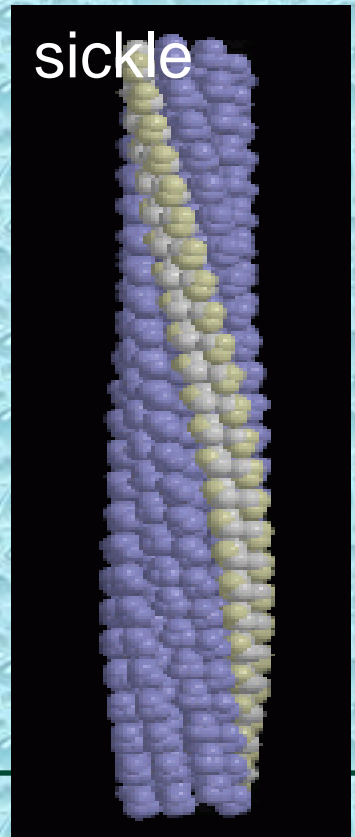
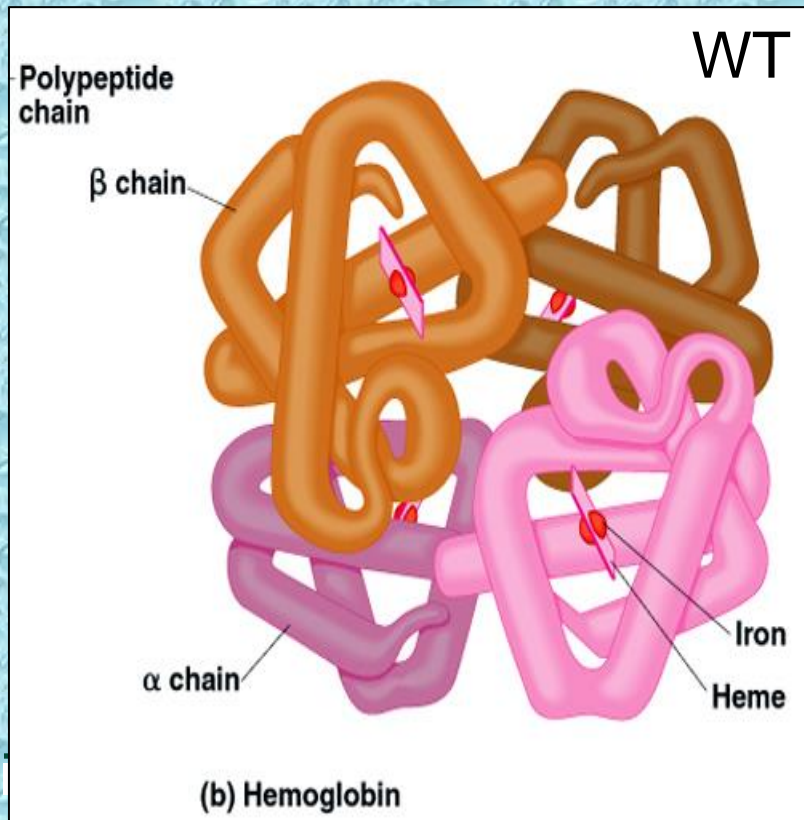
Basi molecolari dell'anemia falciforme

Glutamato → Valina in posizione 6 della β globina

Questa sostituzione forma polimeri di emoglobina nella forma deossigenata

I polimeri di Hb deformano i globuli rossi formando cellule falciformi

Le cellule falciformi sono soggette ad emolisi.



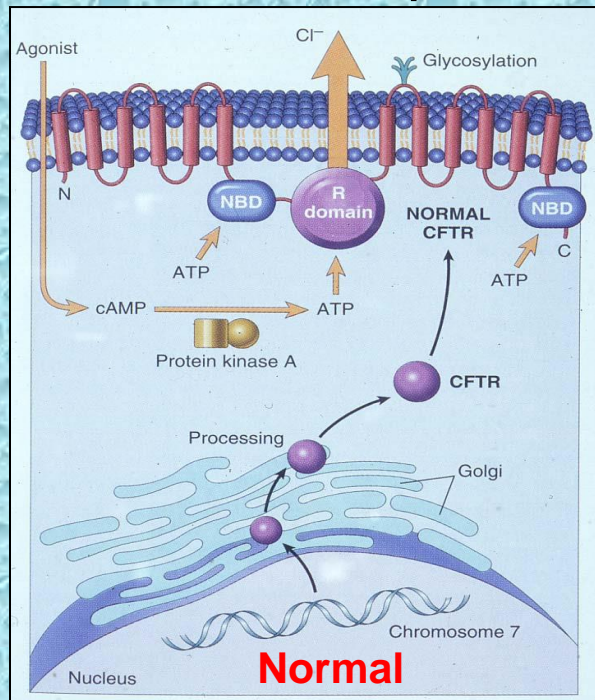
Es. 2: Fibrosi cistica

La fibrosi cistica è una malattia genetica recessiva dovuta al malfunzionamento della proteina CFTR codificata dal gene omonimo cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

La fibrosi cistica è caratterizzata da infezioni batteriche croniche delle vie aeree, indigestione dei grassi dovuta a insufficienza esocrina del pancreas, infertilità maschile ed elevate concentrazioni di cloro nel sudore.

Le basi molecolari della Fibrosi cistica

La patologia è causata per il 70% dei casi dalla delezione della fenilalanina in posizione 508 ($\Delta F508$)



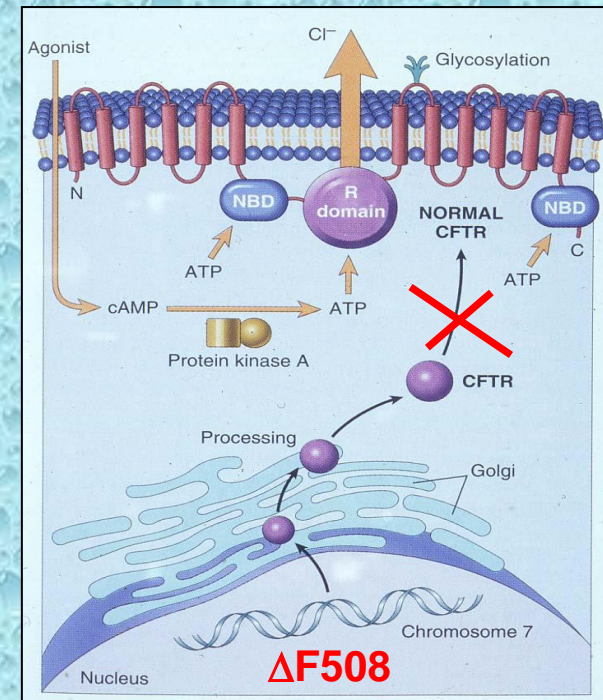
CFTR Sequence:

| | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nucleotide | ATC | ATC | CTT | GGT | GTT |
| Amino Acid | Ile | Ile | Phe | Gly | Val |
| | 506 | | 508 | | 510 |

Deleted in $\Delta F508$

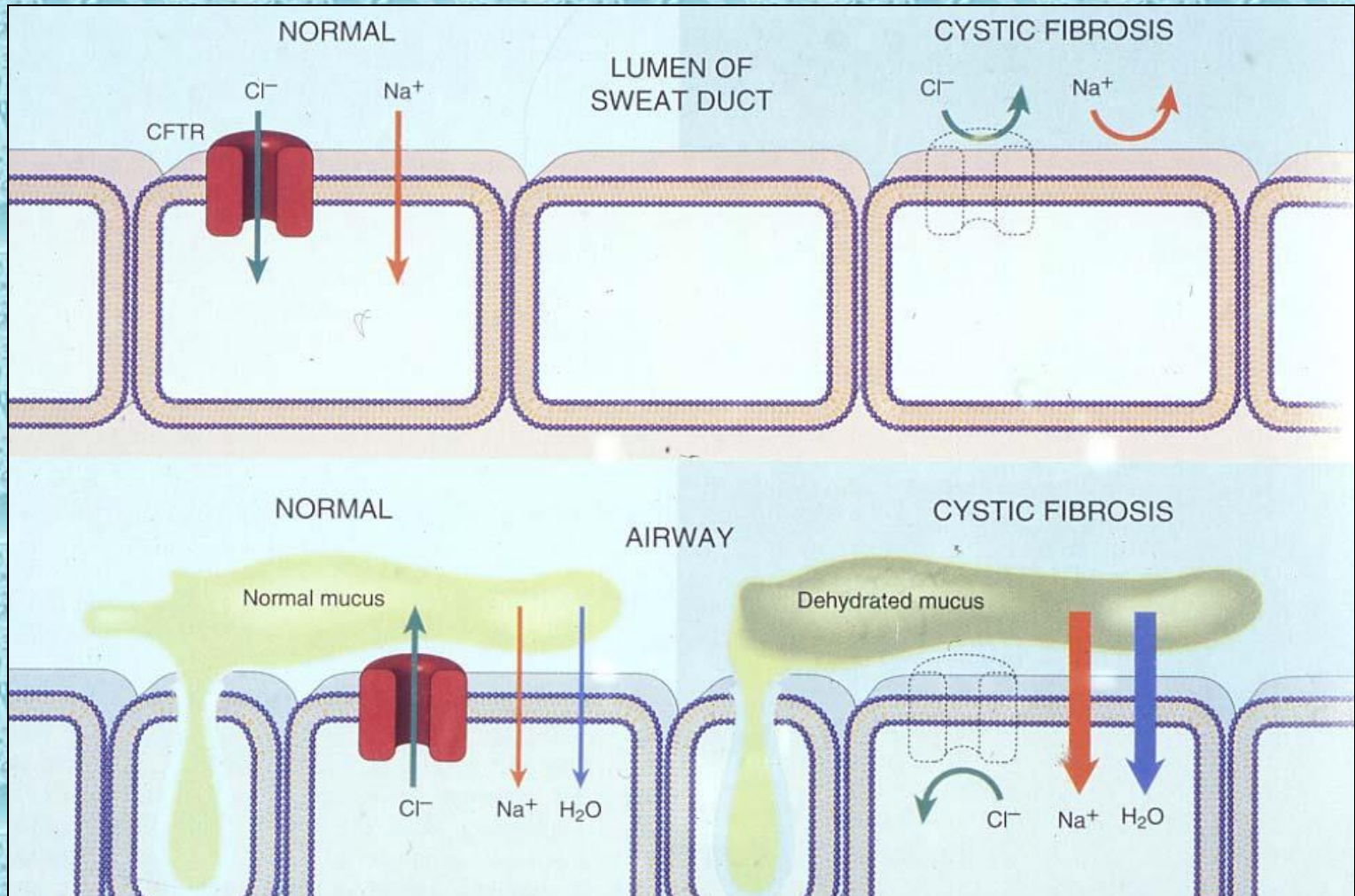
$\Delta F508$ CFTR Sequence:

| | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|
| Nucleotide | ATC | ATT | GGT | GTT |
| Amino Acid | Ile | Ile | Gly | Val |
| | 506 | | | |



Quando la proteina CFTR con mutazione delta F508 raggiunge il reticolo endoplasmatico il meccanismo di controllo qualità di questo organello riconosce il misfolding della proteina e la indirizza sul proteosoma per la degradazione. Quindi la delta F508 non raggiunge la membrana cellulare.

Le basi molecolari della Fibrosi cistica



Patologie muscolari

Definizione:

Malattie che colpiscono il muscolo (**miogeniche**)

Differiscono dalle neuropatie

Hanno eziologia eterogenea

Evoluzione devastante

Non è presente un trattamento farmacologico
specifico

Caratteristiche comuni:

✱ Manifestazioni cliniche

- **Affaticamento muscolare:** principale caratteristica
 - **Contratture +/- severe:** in stadio avanzato della malattia
 - **Dolore:** dovuto allo stato infiammatorio
 - **Atrofia del muscolo**
 - **Deformità:** in stato avanzato della malattia
 - **DTR:** (Deep Tonic Reflex) contrazione del muscolo in risposta ad applicazione di pesi: normale, diminuita o assente
-

Caratteristiche comuni:

✧ Patologia

+/- importante riduzione delle fibre muscolari

Le fibre muscolari sono rimpiazzate da grasso o da fibrosi

Fibrosi:

Aumento dell'infiltrazione infiammatoria

Mediante microscopia elettronica sono stati osservati anormali mitocondri

Eziologia e classificazione

Miopatie ereditarie

- **Distrofie muscolari**
- Miopatie congenite
- Channellopatie ereditarie
- Paralisi transitorie
- malattie metaboliche ereditarie

Patologie associate alla glicolisi

Malattie associate al metabolismo ossidativo

Miopatie lipidiche

Miopatie mitocondriali

✿ Miopatie ereditarie (Distrofie muscolari)

Legate al cromosoma X:→

-**Duchenne** (presenta anche manifestazioni cardiache)

-**Becker**

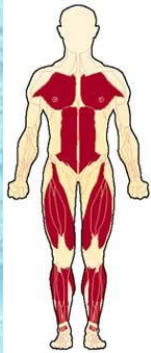
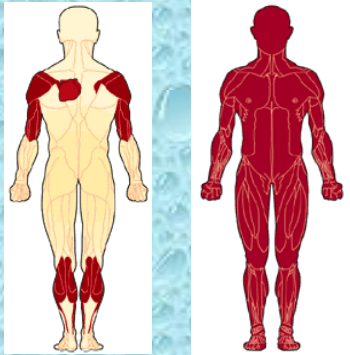
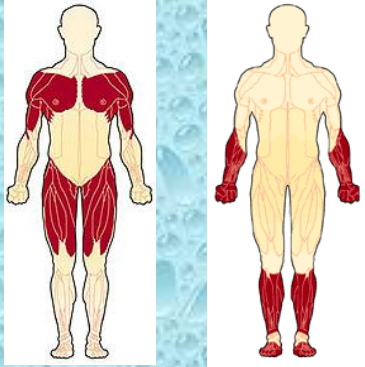
→**Emery-Dreifuss** (cardiomiopatia severa)

Non legate all'X:

Limb Girdle

Oculare-faringea

Miopatie ereditarie (Distrofie muscolari)

| | Duchenne/ Becker | Emery-Dreifuss, congenita | Limb-Girdle, Miopatia distale |
|---------------------------------|---|--|---|
| Insorgenza | 2-6 anni | infanzia | Tarda infanzia – media età |
| Gruppi muscolari colpiti |  |  |  |
| Aspettativa di vita | Raramente oltre I vent'anni | varia | Età media |
| ereditarietà | Associata all'X | Associata all'X, autosomica, dominante o recessiva | autosomica, dominante o recessiva |
| Geni responsabili | Distrofina | Emerina, lamina, merosina | Calpaina-3, Disferlina , Caveolina-3 |

Distrofinopatie legate all'X:

Gruppo di miopatie ereditarie

Fisiopatologia: Distrofina malfunzionante o inattiva

Distrofina:

- Ha un importante ruolo nella stabilità del sarcolemma
 - Presenta due teste globulari con una struttura a bastoncino flessibile
 - Associata con sarcoglicani & destroglicani (proteine di membrana e glicoproteine)
 - Gene codificante: sul braccio corto del cromosoma X: Xp21 locus
 - Perdita di funzione: → cascata di eventi (che includono la perdita di altri componenti associati al complesso della distrofina, rottura del sarcolemma con attivazione della fosfolipase e stress ossidativo) che comporta la **mionecrosi**
-

Distrofinopatie legate all'X:

Associata al cromosoma X,

I maschi sono affetti

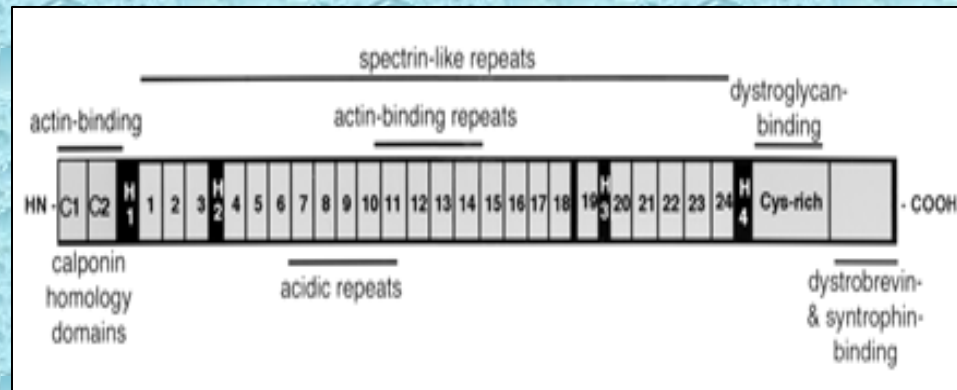
Le femmine sono portatrici

Insorgenza: 2-5 anni nella forma Duchenne, e nella prima decade di vita nella forma Becker)

Patologia con gravi sintomi tra i quali manifestazioni a livello cardiaco

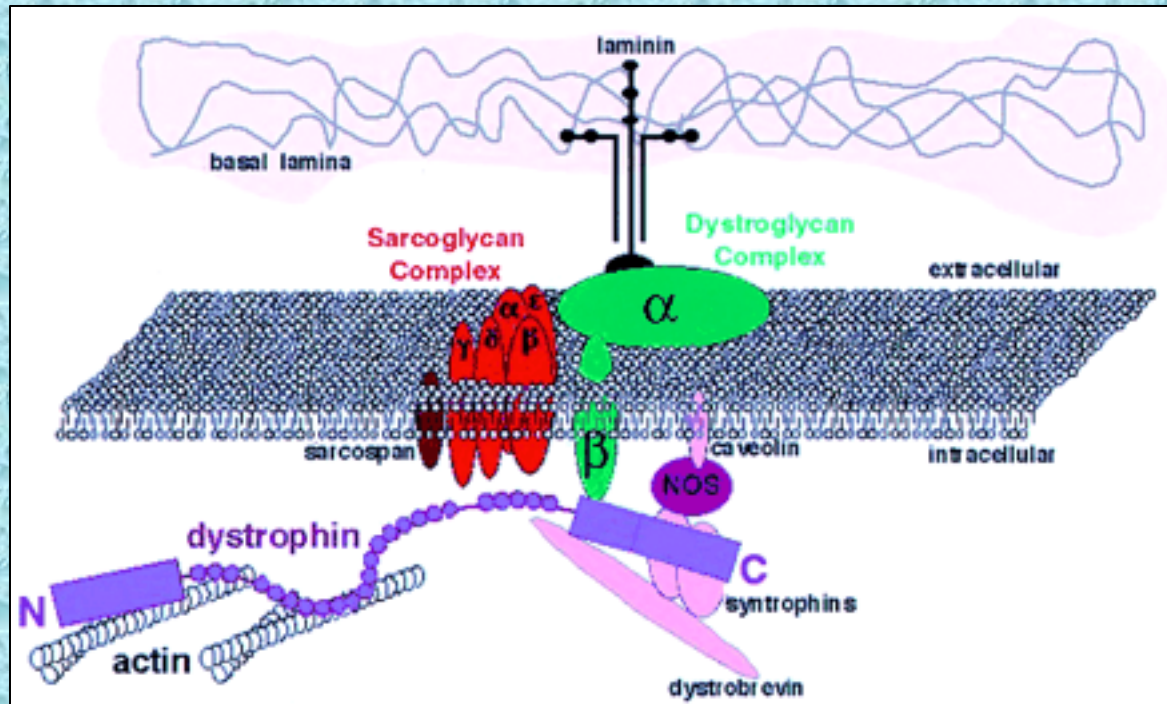
Morte nella seconda decade di vita

Struttura della Distrofina



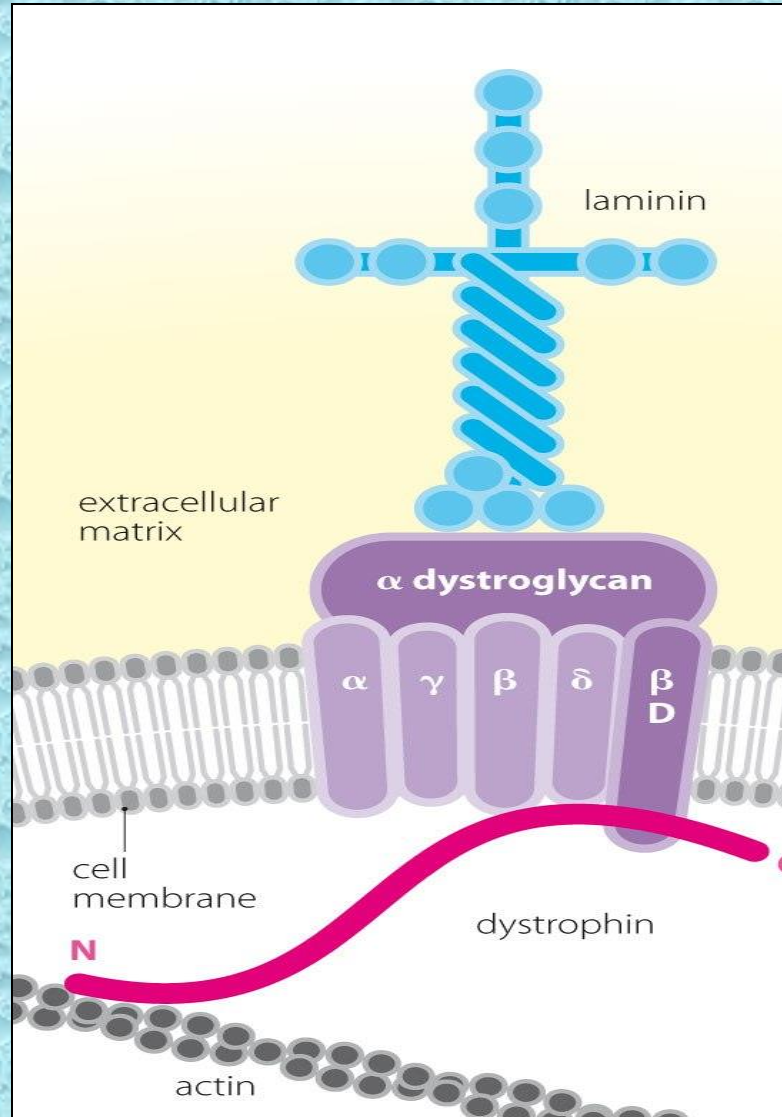
Domini della distrofina. La porzione N terminale contiene il sito di legame all'actina, mentre il C terminale I domini di legame con il β -dystroglicano, la dystrobrevina e syntrofina. I domini N e C terminali sono uniti da 24 ripetizioni spettina-simili. le 4 regioni "cerniera" sono denominate H1-H4.

Il Complesso della distrofina

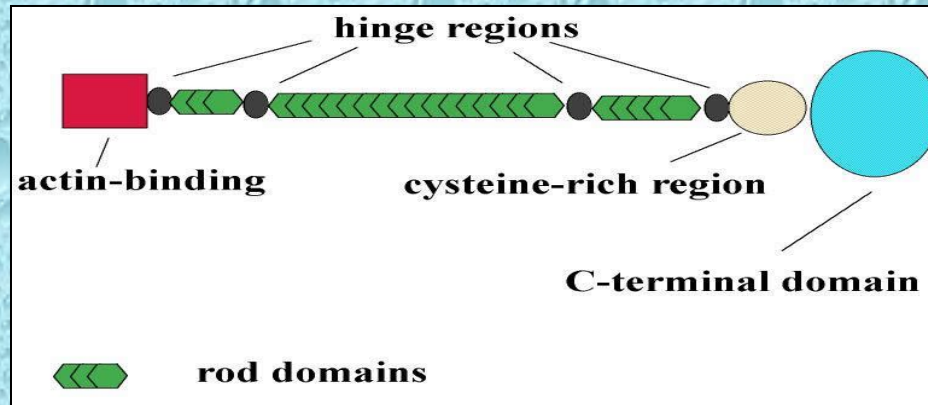


Rappresentazione schematica del complesso della distrofina. La distrofina (viola) presenta un N terminale legato all'actina, mentre il C terminale interagisce con il β -distroglicano, con l' α e β -sintrofina e con la distrobrevina. nNOS interagisce con le sintrofine così come con la calveolina.

Distrofina



Distrofina



Il gene è composto da 79 esoni i quali rappresentano lo 0.6% del gene intero.

Ci sono 8 regioni promotrici.

Gli introni corrispondono al 99.4% del gene.

La regione genomica di questo gene è grande 2.2 milioni di basi.

La proteina presenta un N-terminale che lega l'actina.

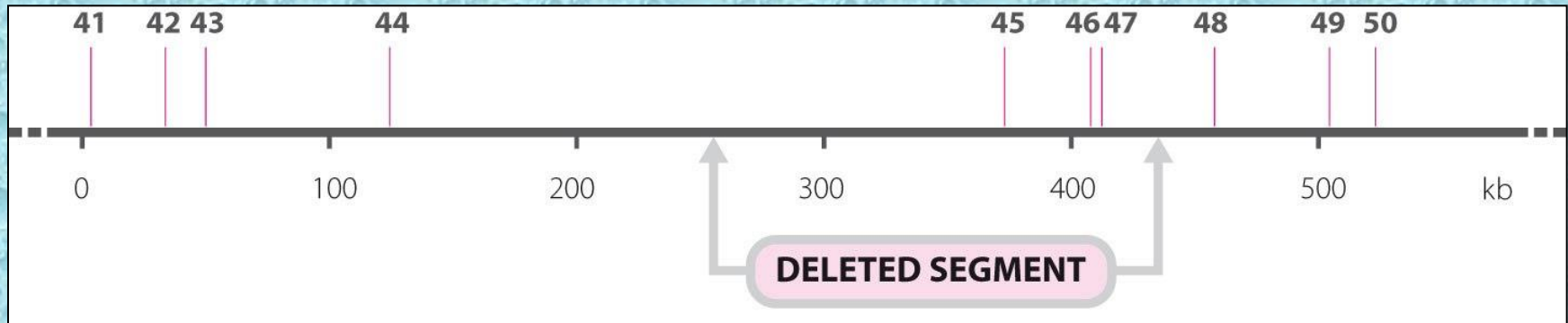
Il dominio a bastoncino che contiene 24 motivi ripetuti.

- Si pensa che questo dominio dia flessibilità alla proteina.
- Questo dominio è interrotto da 4 domini a cerniera.

Il dominio ricco di cisteine è importante nel mantenimento della struttura cellulare.

La regione C terminale contiene i siti di legame con le sintrofine.

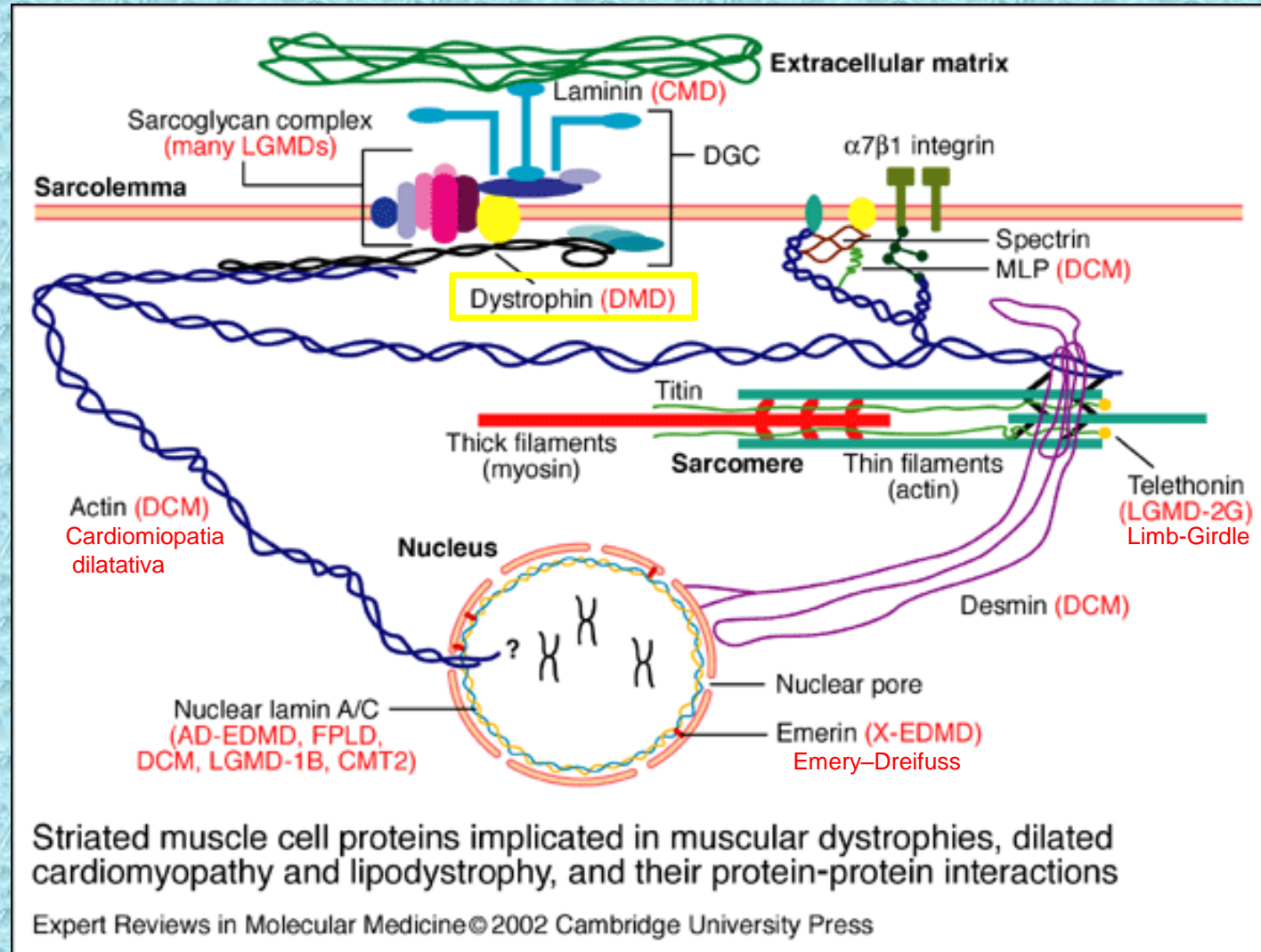
Distrofina



Delezione di parte del gene della distrofina

La regione rappresentata contiene gli esoni 41-50. Questi esoni sono lunghi 100 pb ed essendo piccoli le delezioni cadono principalmente in regioni introniche. L'effetto di queste mutazioni è rimuovere uno o più esoni causando la perdita di parti (domini) della proteina.

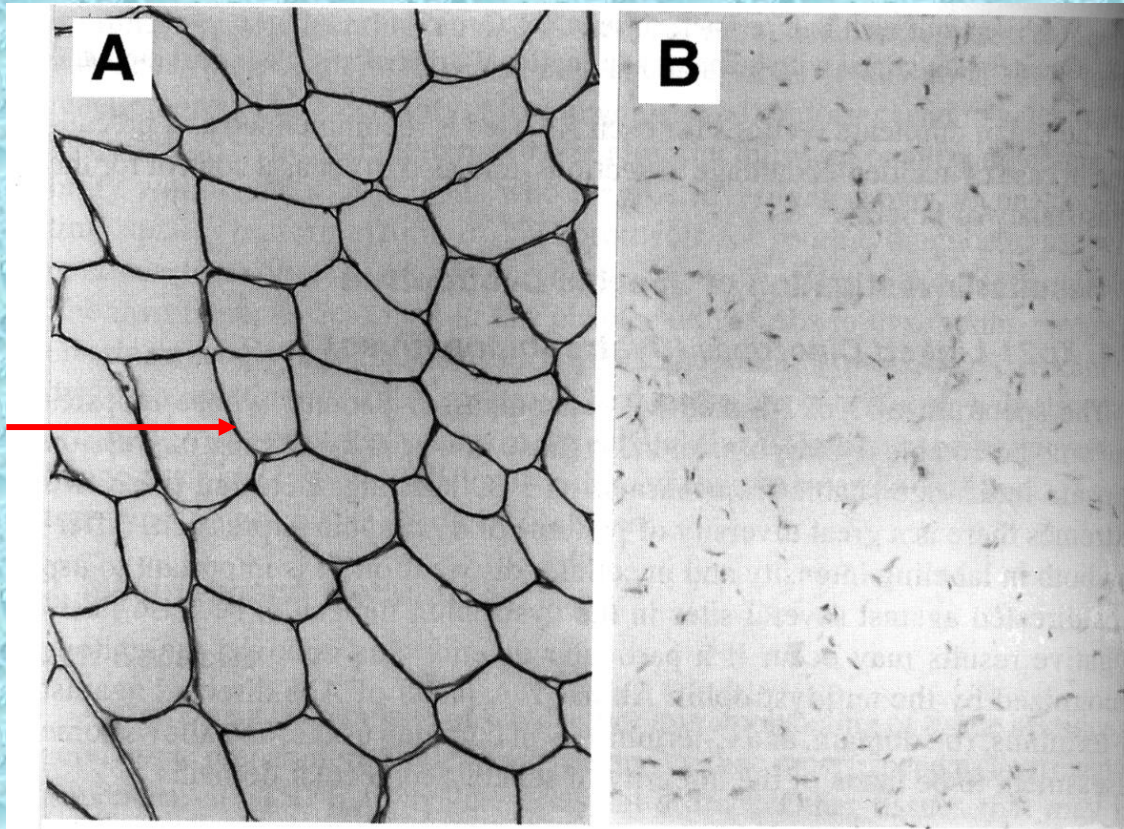
Proteine muscolari e relative patologie



Distrofina

Marcatura della distrofina con anticorpi specifici in biopsie muscolari

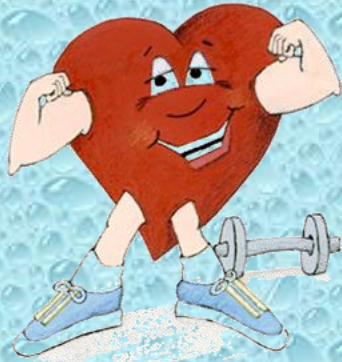
Distrofina in cellule muscolari



Normale

DMD – No distrofina

Marcatori della patologia (Creatina chinasi)



Danno cellulare → Il contenuto esce → rilevato nel sangue

Nel danno muscolare la quantità di creatina chinasi (Ck_{total}) è elevata

Treatments della DMD

Miglioramento respiratorio:

- O₂ terapia
- Ventilazione
- Trattamento chirurgico della scogliosi
- Tracheotomia

Miglioramento della mobilità:

- Fisioterapia
 - Prednisone (simile al cortisone)
 - Sedia a rotelle
-

Terapia genica

Sviluppo di "*minigeni*," che codificano per una proteina più piccola, i quali potrebbero essere veicolati nelle cellule muscolari attraverso sistemi virali

Problemi con la terapia genica

Il tessuto muscolare è esteso e difficile da trasfettare

L'uso di virus potrebbe attivare il sistema immunitario e causare la distruzione delle fibre muscolari