

MUTAZIONE

Una mutazione può essere definita come il processo che determina una variazione strutturale del materiale ereditario (DNA)

- *E' un elemento fondamentale dell'evoluzione*
- *E' spesso la causa di una malattia ereditaria*
- *E' alla base della variazione individuale degli organismi viventi*

Mutazioni geniche

- Sostituzioni di basi (missenso, non senso, frameshift, splicing, dinamiche, neutre)
- Delezioni
- Inserzioni

DELEZIONE O DUPLICAZIONE DI UN GENE INTERO

o di UNO O PIU' ESONI di UN GENE

- Le delezioni sono più comuni delle duplicazioni e anche più patogene
- La maggior parte sono patogene, ma non tutte (geni del pigmento verde della visione a colori ripetuti in tandem sul crom X; geni della defensina in 8p23; geni HLA, spesso ripetuti in 6p21)

INTERRUZIONE DI UN GENE (riarrangiamento cromosomico)

- Di solito impediscono l'espressione di un gene o la stabilità del suo trascritto
- Occasionalmente si può creare un gene chimerico (cancro)

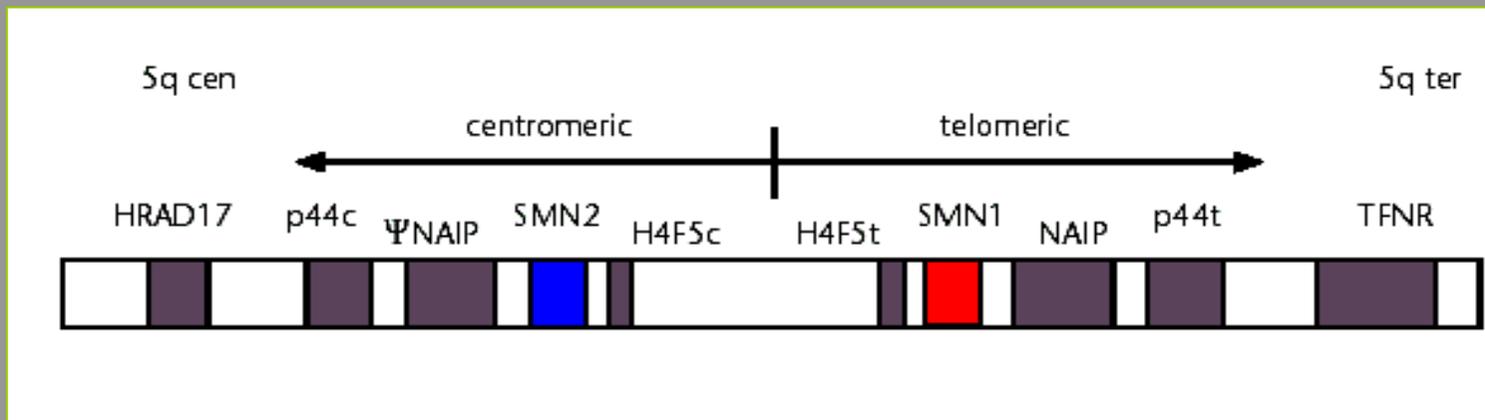
MUTAZIONI NEL PROMOTORE O IN ALTRE REGIONI REGOLATORIE *IN CIS*

- *Cambiamenti del promotore* (rimuovono o alterano siti di legame per fattori di trascrizione) che hanno l'effetto di ridurre o aumentare la trascrizione di un gene
- *Cambiamenti in altre sequenze regolatrici* situate più lontano dalla sequenza codificante

MUTAZIONI CHE ALTERANO SITO DI SPLICING

- Alterazioni della sequenza consenso
GT....AG che provoca l' eliminazione totale
o parziale dell'esone
- SMA

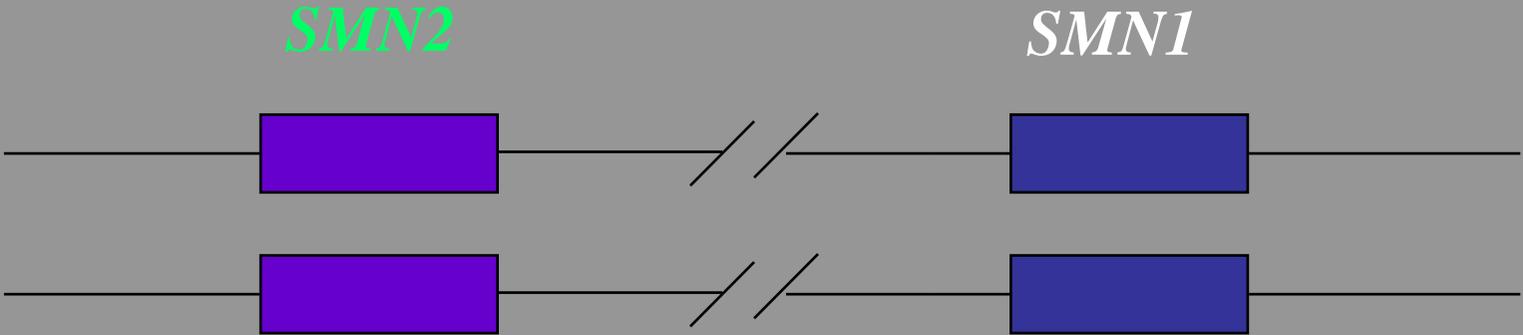
The Gene



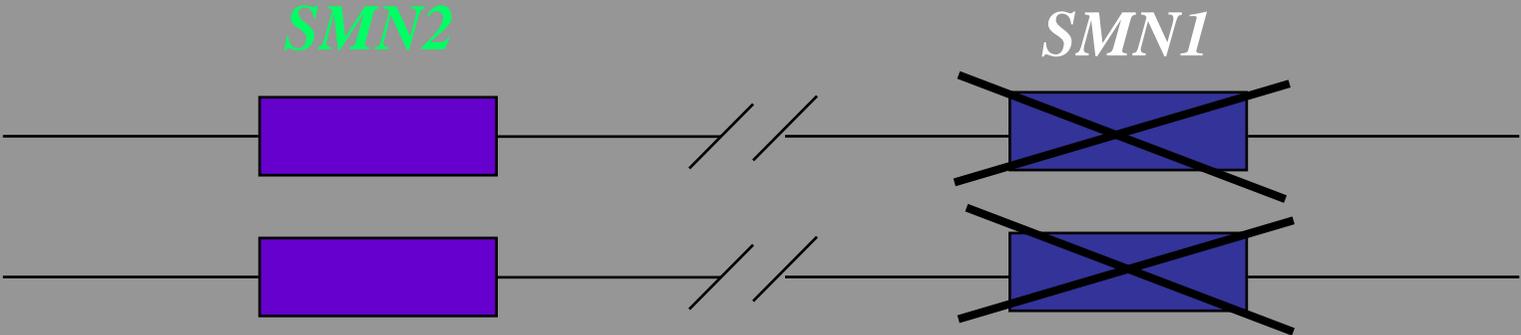
- SMA-determining gene \Rightarrow Survival of Motor Neurons (SMN, 3.5 KB)
- Part of 500 Kb inverted duplication \Rightarrow 5q13
- SMA patients \Rightarrow homozygous deletion SMN1 gene
- Deletion of SMN2 is not associated with SMA

(Melki *et al.*, 1994; Lefebvre *et al.*, 1995; Burglen *et al.*, 1996)

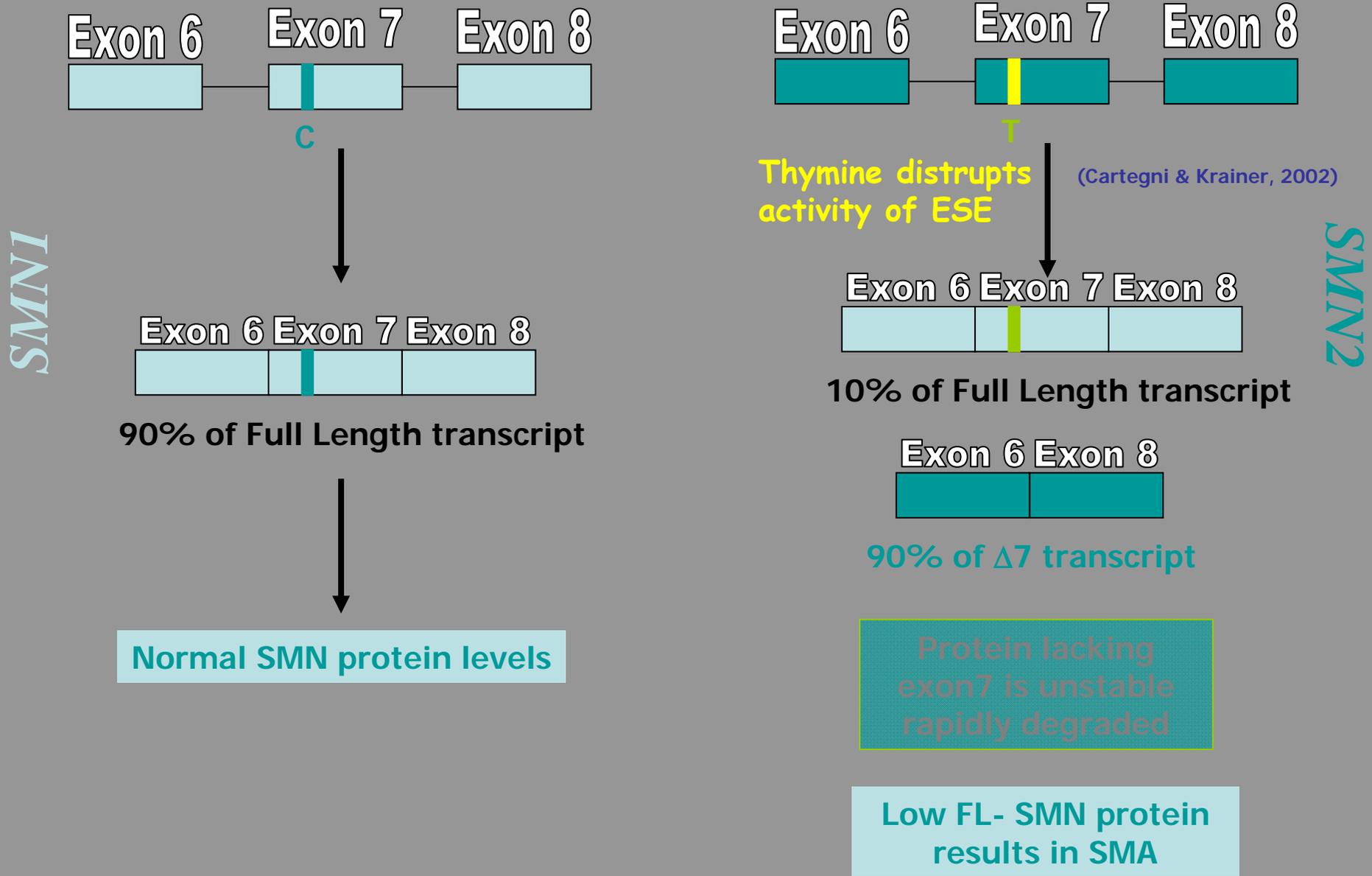
Normal Individual



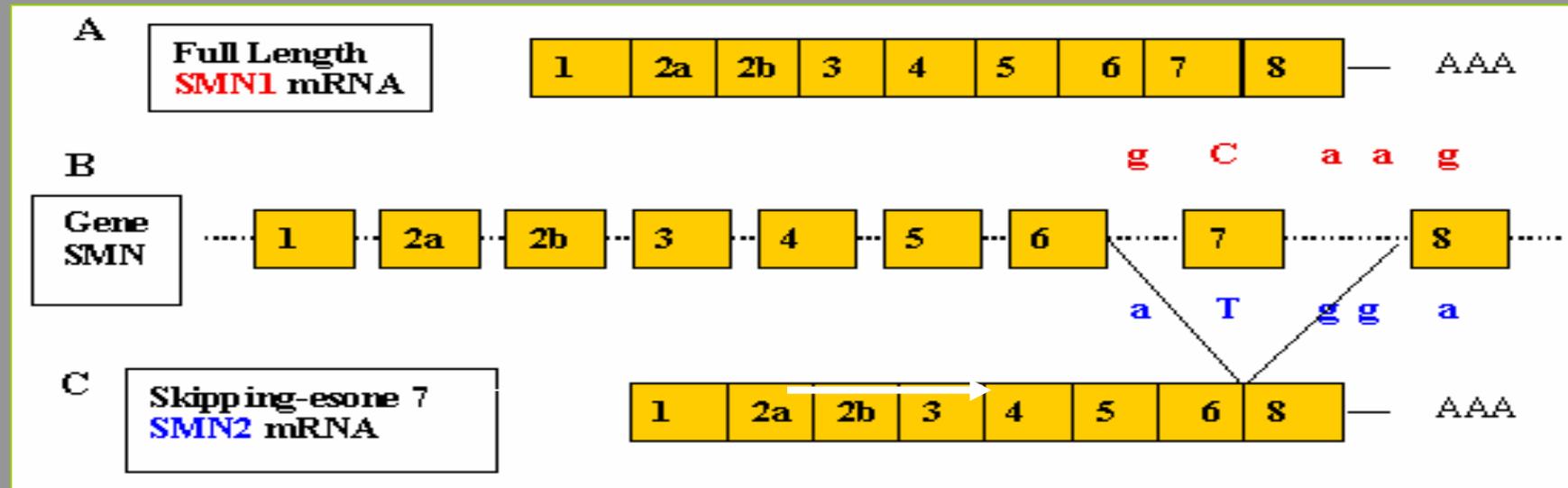
SMA Patients



Why SMN2 does not prevent from SMA?



SMN1 - SMN2



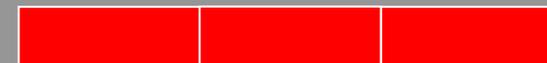
Exon 6 Exon 7 Exon 8



Exon 6 Exon 8



Exon 6 Exon 7 Exon 8



MUTAZIONI CHE ALTERANO FRAME DI LETTURA

- DMD /BMD

MUTAZIONI CHE CREANO CODONE DI STOP

- Le mutazioni di stop sono quelle che creano un codone non senso: UAG, UGA, UAA provocano la terminazione della sintesi di quella proteina. In realtà non crea una proteina tronca, perché la cellula degrada gli RNA messaggeri che contengono siti di stop prematuri

Gene AR: recettore degli androgeni

AR: Xq11-q12

Il recettore viene attivato dal DHT e stimola a sua volta la trascrizione di geni che favoriscono il differenziamento sessuale maschile

All'interno di questo gene sono state caratterizzate mutazioni di diversa natura:

1. Mutazioni con perdita di funzione: sindrome da insensibilità agli androgeni e sviluppo anatomico in senso femminile
2. Mutazioni con perdita parziale della funzione : varietà di stati sessuali ambigui

3. Espansione della tripletta CAG nell'esone 1 del gene : *atrofia muscolare spinobulbare X-linked* ad insorgenza tardiva.
4. Guadagno di funzione: la proteina è tossica per i neuroni e in più lievi segni di deficienza di androgeni perché l'espansione modifica dominio attivazione della proteina
5. Normale variazione delle ripetizioni della tripletta CAG media la variazione della risposta agli androgeni: le ripetizioni brevi mediano una risposta forte e viceversa
6. ruolo nella suscettibilità alla calvizie maschile

Perdita/acquisizione di funzione

- Il prodotto può avere una riduzione o perdita di funzione
- ❖ Il prodotto può funzionare in modo anomalo, e quindi acquisire una diversa funzione

Acquisto di funzione

- Alterazioni a carico dei circuiti di controllo o di segnalazione
- Caratteri dominanti perché la presenza di un allele normale non può impedire all'allele mutato di comportarsi in modo anomalo
- Il prodotto presenta
CARATTERISTICHE NUOVE

Perdita di funzione

- Fenotipi recessivi per cui la metà del prodotto normale è sufficiente, ma a volte tale aploinsufficienza determina un fenotipo anomalo e si eredita come carattere dominante. Inoltre il prodotto dell'allele mutato può avere effetto dominante negativo perché impedisce il funzionamento del prodotto dell'allele normale

Effetto del tipo e della localizzazione delle mutazioni sulla funzionalità genica

Mutazione extragenica	Nessun effetto	raramente possono inattivare elementi di regolazione necessari per l'espressione di quel gene
Delezioni di uno o più geni	Abolizione	
Delezioni di un esone	Abolizione o modificazione	Slittamento modulo di lettura, proteina instabile
Delezioni di un gene	Alterata dose genica	
Mutazione intraesonica	abolizione	Perdita/cambiamento di aa importanti Slittamento codice di lettura Introduzione di codoni di stop
Mutazioni del sito di splicing	Abolizione o modulazione dell'espressione	GT/AG
Mutazioni nel promotore	Abolizione o modulazione dell'espressione	La delezione completa ne abolisce la funzione
Mutazione nel codone di terminazione	modificazione	Vengono aggiunti aa finchè non viene raggiunto un altro sito di stop
Mutazione nel segnale di poliA	Abolizione o modulazione dell'espressione	La delezione completa ne abolisce la funzione

Non tutte le varianti di sequenza sono necessariamente patogene.

E' necessario un test funzionale *in vitro* o *in vivo* per dimostrare che il cambiamento in un gene ne abbia cambiato la funzionalità



Mar 5 1999
Volume 283
Number 5407
"Mitochondria"

FOSFORILAZIONE OSSIDATIVA
BIOSINTESI ACIDI GRASSI

EREDITA' EXTRANUCLEARE

Structure

Double-stranded, circular molecule: Except for D-loop which is triple stranded
16,569 nucleotide pairs

Copies

2 to 10 in each mitochondrion
> 1,000 in each cell

Strands: **Heavy (H)** strand: Rich in guanines; 28 genes

Light (L) strand: Rich in cytosines; 9 genes

mtDNA encodes for 37 gene and for 13 of mitochondrial peptide subunits,
involved in mitochondrial respiratory-chain complex

Remaining > 67 OXPHOS subunits are nuclear encoded

rRNAs: 2

tRNAs: 22

DNA MITOCONDRIALE

- Due filamenti (H e L) diversi nella composizione nucleotidica, entrambe trascritti e tradotti
- La replicazione è bidirezionale e asincrona: due diverse origini di replicazione OL e OR
- NON esistono introni
- Codice genetico diverso da quello nucleare

- UGA/G: triptofano
- AGA/G: STOP

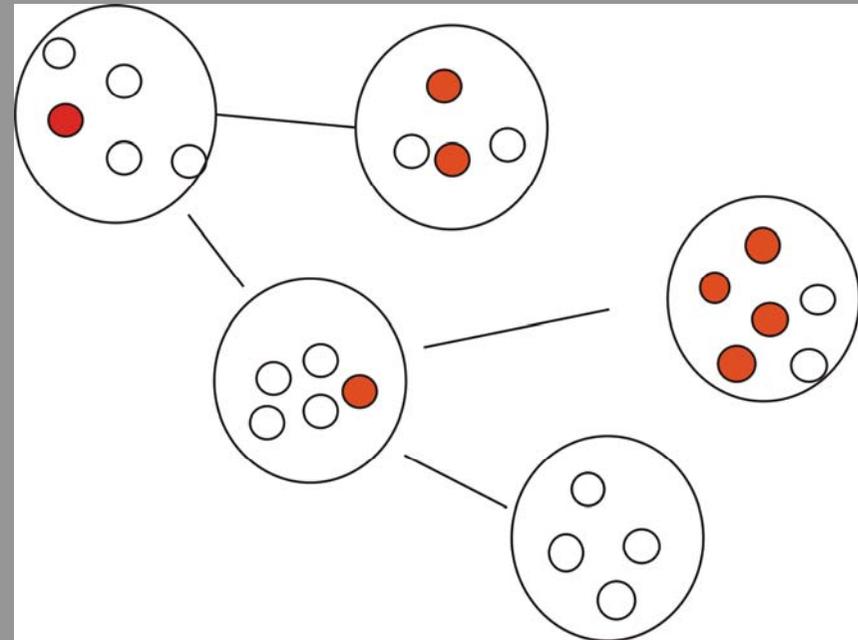
- NON esiste sistema di riparo delle mutazioni (tasso di mutazione è 10-20 volte superiore a quello nucleare)

Differenze tra i codici genetici

codone	Codice nucleare	Mitocondrio
AGG,AGA	arginina	Terminazione
AUA	Isoleucina	Metionina
UGA	Terminazione	triptofano

ETEROPLASMIA/OMOPLASMIA

- Il DNA mit va incontro a **SEGREGAZIONE REPLICATIVA** sia durante la mitosi che la meiosi : la percentuale di mit normali e mutati **VARIA** dopo ogni evento replicativo
- Questo determina diversi genotipi e fenotipi anche nei gemelli identici
- (ogni mit contiene 8-10 molecole di DNA, ogni cellula migliaia di DNA mit)
- **ETEROPLASMIA/OMOPLASMIA**
- **EFFETTO SOGLIA:** il fenotipo malattia si manifesta dopo che il numero di mit mutati ha superato una determinata percentuale



EREDITA' MITOCONDRIALE

- L'eredità dei geni extranucleari segue regole diverse rispetto a quelle dei geni nucleari:
- Non è coinvolta la segregazione meiotica
- Eredità uniparentale (materna), non esistono rapporti mendeliani di segregazione

Eredità Mitochondriale

- I mitocondri PATERNI sono selettivamente distrutti nello zigote e diluiti con i mitocondri dell'ovocita
- Raramente mitocondri paterni sono stati osservati
- Le femmine con una mutazione trasmetteranno la stessa a tutti i figli
- Non tutti i figli manifesteranno il fenotipo-malattia
- I maschi affetti e i portatori non trasmetteranno la mutazione a nessuno dei loro figli
- Nelle famiglie con chiara trasmissione mitocondriale, il rischio di trasmissione di una femmina portatrice ai loro figli è del 50%. Dove invece tale chiara trasmissione non è osservata, il rischio di ricorrenza è variabile tra il 3 - 6%.

EREDITA' MITOCONDRIALE

- L'eredità dei geni extranucleari NON è mendeliana
- Eredità UNIPARENTALE (materna)
- Sono affetti sia maschi che femmine che hanno la madre affetta, ma la trasmissione del carattere avviene solo attraverso le donne affette (i maschi affetti non trasmettono la malattia)

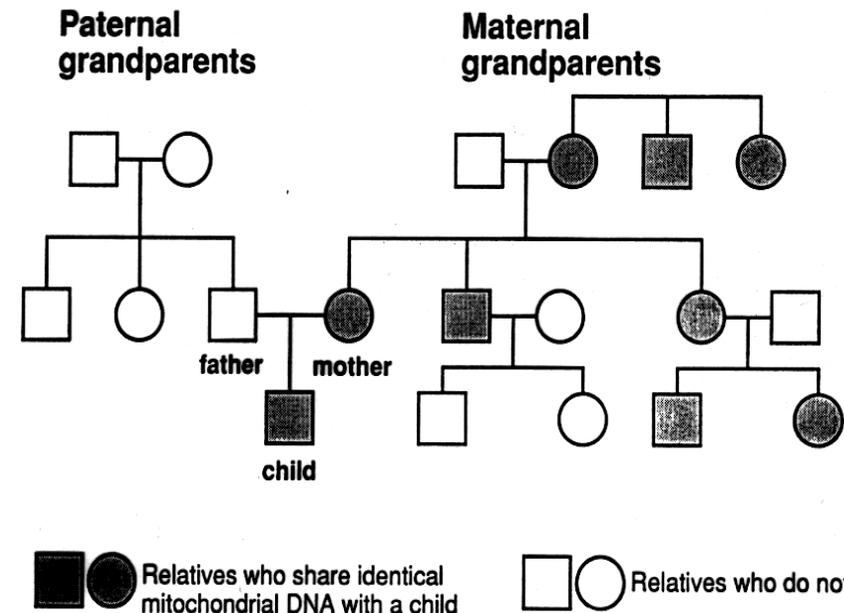


Figure 1 Family tree displaying maternal inheritance of the mitochondrial chromosome through three generations.

IPOSTESI DELL'ENDOSIMBIOSI

- Le cellule precursori delle c. eucariotiche erano anaerobe e con il progressivo accumulo di ossigeno nell'atmosfera è cresciuta la loro necessità di acquisire la capacità di **funzioni ossidative**. Quindi il processo di selezione ha fatto in modo che sopravvivessero solo quelle che per endocitosi avessero incluso al loro interno questi elementi procariotici aerobi

OMOPLASMIA ED ETEROPLASMIA

- Si ereditano 23 molecole di DNA nucleare (cromosomi) da ciascun genitore e circa 100.000 molecole di mtDNA dall'ovocita materno.
- Negli individui normali il 99.9% delle molecole di mtDNA sono identiche (OMOPLASMIA). Se insorge una nuova mutazione questa si diffonde nella popolazione di mtDNA si avranno 2 genotipi ciascuno con una sua frequenza (ETEROPLASMIA). La velocità di fissazione di una nuova mutazione nel genoma mit risulta un processo circa 10 volte più rapido di quella riscontrata per le mutazioni nucleari. Questo perché dopo la fecondazione l'ovocita da 100.000 molecole di mtDNA arriva ad averne 100-500 copie (COLLO DI BOTTIGLIA).

- In condizioni di eteroplasmia il DNA mit va incontro a segregazione replicativa: la % di DNA mutato e normale varia dopo ogni evento replicativo e questo determina diversità a livello genotipico e fenotipico anche in gemelli identici
- Il fenotipo si manifesta con effetto soglia:
 - - natura della mutazione
 - -% DNA mit mutati
 - -importanza che l'organo colpito dalla mutazione riveste nel processo di produzione di energia

PATOLOGIE MITOCONDRIALI

- Mutazioni a carico del DNA mit riducono la produzione di ATP e questo danneggia i diversi organi nell'uomo a secondo del loro fabbisogno di energia
- Mutazioni MISSENSO, INSERZIONI, DELEZIONI, e che riducono il numero di copie dei mit
- Sistema nervoso centrale, muscolo, cuore, rene, fegato, pancreas
- La frequenza è di circa 6- 17/100.000

- Le mutazioni sono
- missenso, a carico della sintesi proteica
- delezioni di diversa entità (vantaggio replicativo)
- alterazioni dei rapporti DNA mit-DNA nucleare

- Il calo di produzione di ATP danneggia i vari organi a secondo della loro necessità di energia per svolgere le varie funzioni
- Gli organi più colpiti sono: SNC, muscolo, cuore, rene, pancreas, fegato
- Le manifestazioni cliniche comprendono: ATROFIA OTTICA, SORDITA', ATASSIA, DIABETE, ISCHEMIA, DEGENERAZIONE DEI GANGLI BASALI, PROBLEMI NEL MOVIMENTO

Diagnosi di patologie mitocondriali

- DIAGNOSI CLINICA
- ANALISI ACCURATA DEL PEDIGREE
- TEST METABOLICI
- ANALISI ENZIMATICHE DELLA FUNZIONE OSSIDATIVA NEL MUSCOLO SCHELETRICO
- ANALISI MOLECOLARE DELLA MUTAZIONE NEL TESSUTO APPROPRIATO

Classificazione genetica delle malattie mitocondriali

Difetti nel DNA mitocondriale

Difetti nel DNA nucleare

- difetti nei geni che codificano per la sintesi di proteine mitocondriali
- difetti nei geni che codificano per proteine coinvolte nell'importazione delle proteine mitocondriali
- difetti nella comunicazione intergenomica

Malattie mitocondriali

- Encefalomiopatie
- Encefalocardiomiopatie

Caratteristiche comuni delle encefalomiopatie

- I sintomi generalmente peggiorano in certe condizioni quali esercizio fisico, temperature estreme, ipoglicemia, infezioni
- decorso più severo e bassa statura qualora la patologia insorga in età pediatrica
- nel paziente adulto: miopatia, atassia, perdita dell'udito, retinopatia, neuropatia, debolezza muscolare
- nel paziente pediatrico: ritardo psicomotorio, ipotonia, acidosi lattica, problemi cardio respiratori
- Ragged Red Fibers (RRFs), caratteristica comune ma non sempre presente in tutte le malattie mitocondriali

RED RAGGED FIBRES (RRFs)

- trasformazione di fibre muscolari
“scattered” in fibre muscolari “ragged”
- RRFs caratterizzate da un accumulo di mitocondri nel sarcolemma (SDH staining)

RED RAGGED FIBRES (Zeviani & Di Donato, 2004)

2156 M. Zeviani and S. Di Donato

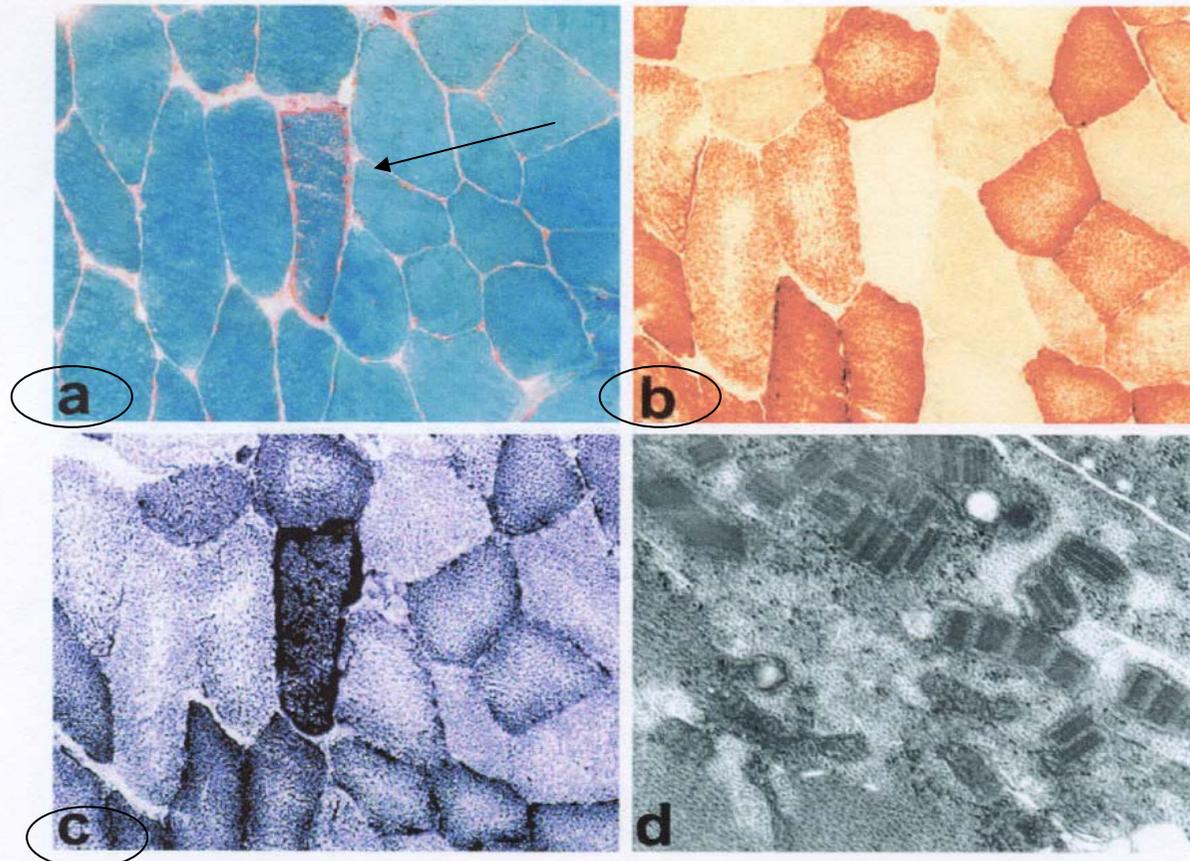


Fig. 2 (A–C) Serial transverse sections of a biopsy from the vastus lateralis muscle of a 18-year-old patient with MERRF: modified Gomori trichrome stain (A); COX stain (B); SDH stain (C). Note absent COX activity, and increased SDH activity in the RRF at the centre of the figure. (D) Transverse section through the periphery of the RRF in (A) shows numerous enlarged mitochondria, many of which contain paracrystalline inclusions. (Courtesy of Dr Marina Mora, Laboratory of Muscle Biology).

Classificazione clinica delle encefalomiopatie basata sull'età dell'insorgenza della malattia

- Malattie che si presentano alla nascita
- Malattie che si presentano durante l'infanzia o nell'adolescenza

Classificazione delle malattie mitocondriali basata sulla genetica

- malattie dovute a riarrangiamenti del DNA mitocondriale su larga scala (delezioni e duplicazioni), eredità sporadica
- malattie dovute a mutazioni puntiformi eteroplasmiche/omoplasmiche, eredità materna
- malattie dovute a difetti di geni nucleari (eredità mendeliana)

Malattie dovute a riarrangiamenti del DNA mitocondriale su larga scala

- **Sindrome di Kearns-Sayre (KSS)**

fenotipo: atassia, neuropatia, PEO, degenerazione del pigmento della retina, cardiomiopatia, bassa statura, RRFs

- **Sindrome di Pearson**

fenotipo: anemia sideroblastica

- **Progressive External Ophthalmoplegia (PEO)**

fenotipo: oftalmoplegia esterna e progressiva, miopatia e intolleranza all'esercizio fisico

Malattie dovute a mutazioni puntiformi eteroplasmiche del mtDNA

- **Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS)**

fenotipo: episodi d'infarto dovuti a lesioni focali del cervello, acidosi lattica e RRFs

genetica: mutazione A3243G nel gene per il tRNA Leu molto frequente; altre mutazioni puntiformi sia nel gene per il tRNA Leu sia nel gene per il tRNA Val

- **Myoclonic Epilepsy with ragged red fibres (MERRF)**

fenotipo: mioclono, epilessia, debolezza muscolare, atassia, demenza e sordità

genetica: mutazione più comune transizione da A a G in posizione 8344 di un gene codificante per un tRNA

Malattie dovute a mutazioni puntiformi eteroplasmiche del mtDNA

- **Neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP)**

fenotipo: atassia, retinopatia pigmentaria, neuropatia

genetica: mutazioni nel gene che codifica per l'ATPasi 6 (T8993G e T8993C)

- **Hearing loss-ataxia-myoclonus**

fenotipo: perdita dell'udito, atassia, miopatia, mioclono

genetica: inserzione di una C in posizione 7472 per il gene che codifica per il tRNA serina.

Malattie dovute a mutazioni puntiformi omoplasmiche del mtDNA

- Leber Hereditary Optic Neuroretinopathy (LHON)

fenotipo: perdita della vista, atassia, neuropatia

genetica: mutazioni puntiformi nei geni ND4(G11778A) e ND6 (G144559A e T14484C) sono state prevalentemente descritte

Malattie dovute a mutazioni dei geni nucleari

- disordini dovuti a difetti nei geni che alterano la stabilità del mtDNA
- disordini dovuti a difetti di geni strutturali coinvolti nella fosforilazione ossidativa
- disordini dovuti a difetti nelle componenti non proteiche della catena respiratoria
- disordini dovuti a difetti di geni codificanti per proteine indirettamente coinvolte nella fosforilazione ossidativa

L'ATASSIA DI FRIEDREICH:
UN ESEMPIO DI MALATTIA
MITOCONDRIALE

L'atassia di Friedreich (OMIM 229300)

- Autosomica recessiva
- Incidenza: 1/30000-1/50000 nati vivi (Italia: 1/22000-1/25000). Frequenza minore nelle popolazioni asiatiche e africane
- Insorgenza solitamente prima dei 20 anni → atassia e scoliosi (varianti rare: insorgenza fino a 50 anni o entro la prima decade di vita)
- Durata della vita ridotta

Manifestazioni cliniche

- Atassia, disartria, spasticità, debolezza delle estremità inferiori, alterazioni sensoriali, riduzione o perdita dei riflessi tendinei, riduzione o assenza dei potenziali somatosensoriali
- Anomalie scheletriche: scoliosi e piede cavo
- Anomalie cardiache: cardiomiopatia ipertrofica, stenosi muscolare subaortica, dilatazione del ventricolo sinistro, alterazioni della contrattilità cardiaca
- Anomalie endocrine: diabete mellito
- Alterazioni sfinteriche

Alterazioni biochimiche e cellulari

- Alterazioni mitocondriali:
 - ↓ attività aconitasi ed enzimi dei complessi I-III della catena respiratoria (N.B. enzimi che contengono un gruppo Fe-S)
 - accumulo di ferro intramitocondriale
 - perdita di DNA mitocondriale
- ↓ fosfolipidi nella corteccia cerebellare e occipitale
- Perdita neuronale nel midollo spinale, nella corteccia e nel cervelletto

Genetica dell'atassia di Friedreich

- Mutazioni del gene FRDA (locus 9q13; 7 esoni, di cui il 6 non codificante; due splicing alternativi), che codifica la proteina FRATASSINA
- Eterogeneità genetica:
 - in una piccola percentuale di casi è coinvolto un locus in posizione 9p23-p11: FRDA2
 - <1% dei pazienti non ha alterazioni né di FRDA, né di FRDA2

Mutazioni del gene FRDA: espansione della tripletta GAA

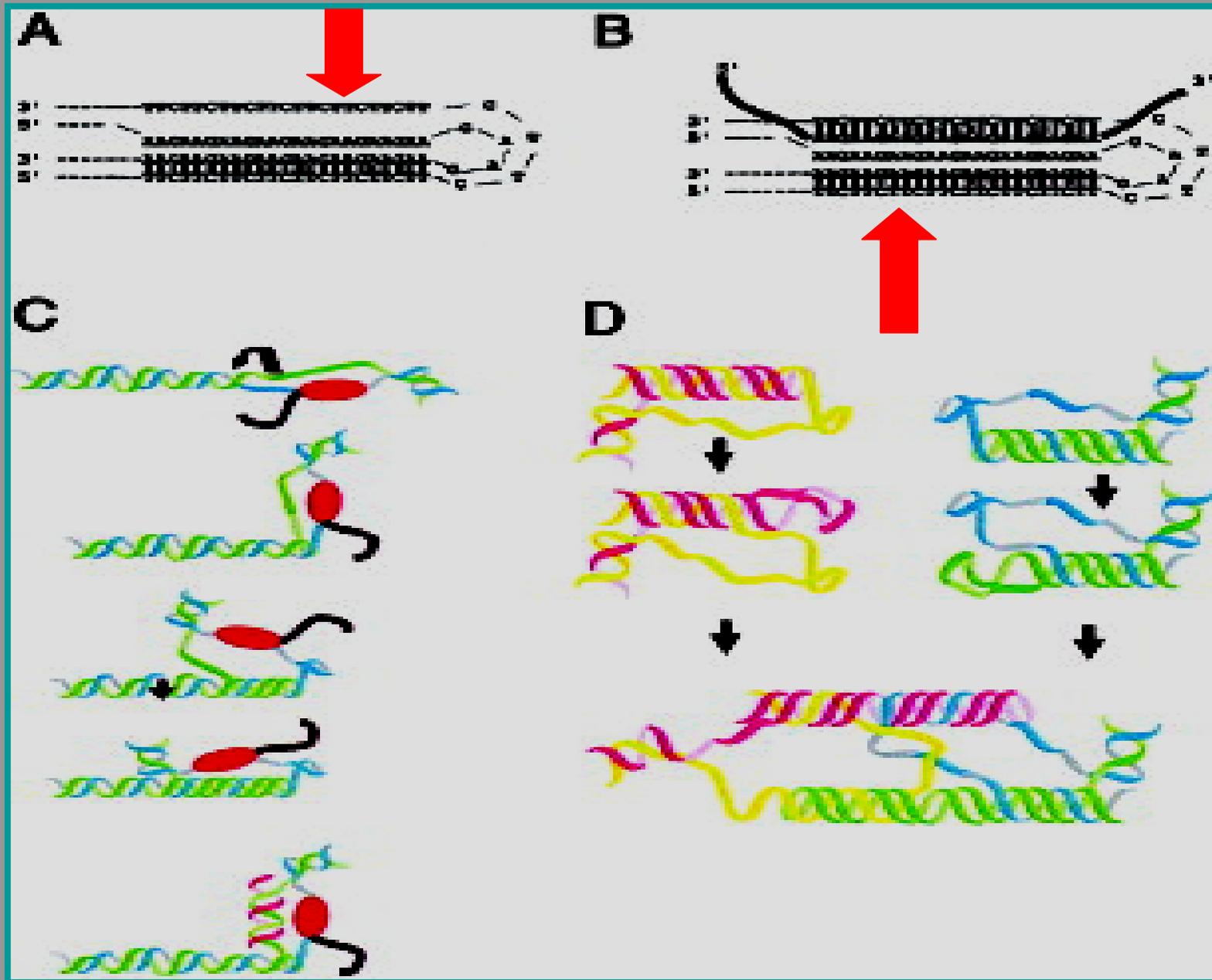
- Espansione del numero di triplette GAA presenti nel primo introne del gene FRDA; instabilità dell'espansione durante la mitosi e la meiosi
- Numero di copie normale: tra 6 e 34
- Numero di copie tra 67 e 1700: atassia di Friedreich
- Numero di copie tra 34 e 60: livelli di fratassina e fenotipo normali, ma notevole propensione all'espansione durante la trasmissione parentale

Mutazioni del gene FRDA: mutazioni puntiformi

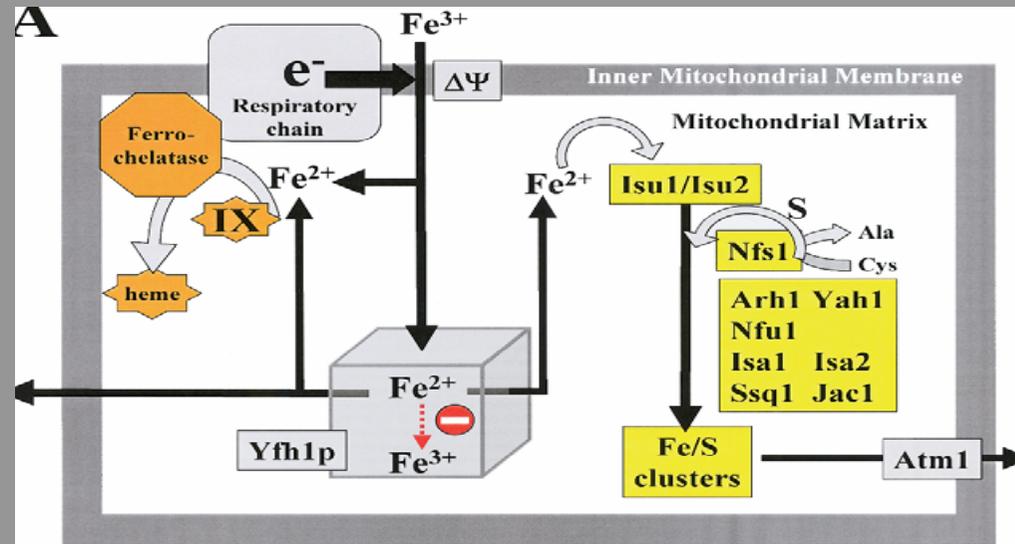
- Mutazioni puntiformi di FRDA che alterano o troncano la regione codificante
- Il 96% dei malati è omozigote per l'espansione della tripletta, i pazienti rimanenti sono eterozigoti composti (espansione + mutaz. puntiforme)
- Nessun caso di malati con mutazioni puntiformi di FRDA su entrambi gli alleli: incompatibilità con la vita?

Effetti dell'espansione GAA

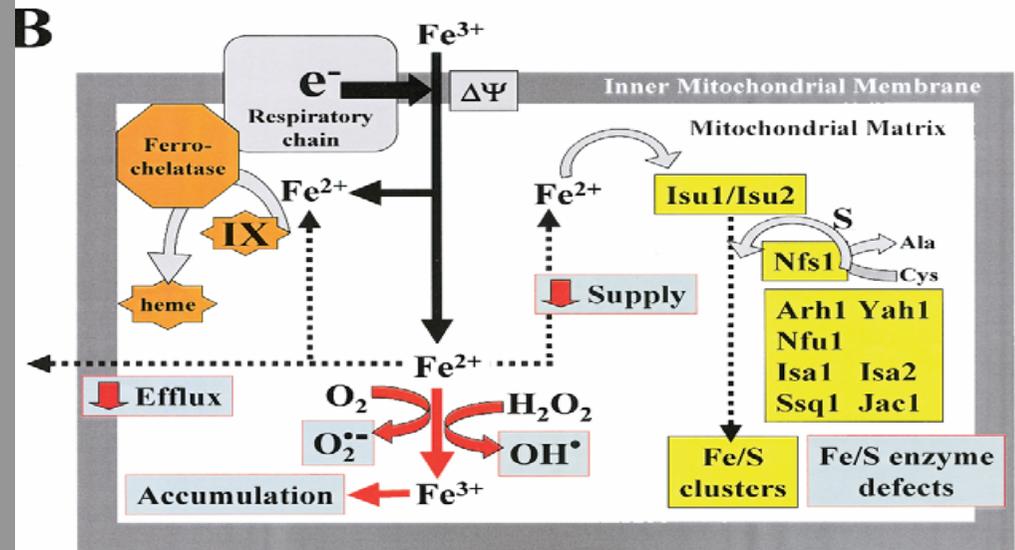
- L'espansione della tripletta GAA interferisce con la trascrizione del gene FRDA \Rightarrow alterazione del processo di elongazione del trascritto
- La riduzione della trascrizione del gene FRDA è proporzionale alla lunghezza dell'espansione della tripletta
- Nei malati \Rightarrow notevole riduzione dei livelli di fratassina



normal



Frataxin deficiency



Ferrochelatase catalyzes the final step of the heme biosynthetic pathway, which involves the insertion of Fe²⁺ into protoporphyrin IX. This enzyme is localized to the matrix side of the inner mitochondrial membrane and is believed to be able to bind Fe²⁺ immediately after its reduction by the respiratory chain

Le mutazioni puntiformi di FRDA

- Finora note 17 mutazioni puntiformi che colpiscono residui conservati
- Mutazioni troncanti di solito nell'esone 1, mutazioni missenso di solito negli ultimi 3 esoni
- Effetti: alterazione dei processi di splicing, della maturazione e/o della stabilità della proteina fratassina

Correlazione genotipo-fenotipo

- Riduzione dei livelli di fratassina e fenotipo proporzionali alla lunghezza dell'espansione GAA:
 - con ripetizioni < 500 pb insorgenza più tardiva e fenotipo più lieve
 - con lunghezze > 500 pb insorgenza più precoce, decorso più rapido, maggiore incidenza di diabete, cardiomiopatia e scoliosi, maggiore alterazione dei riflessi

La fratassina

- Localizzata sulla membrana mitocondriale interna; 210 aminoacidi
- Prodotta come precursore; processamento in due passaggi da parte dell'enzima MPP (mitochondrial-processing peptidase)
- Elevato livello di conservazione nell'evoluzione
- Sedi di espressione: cuore, muscolo scheletrico, fegato, grasso bruno, pancreas e rene. Sistema nervoso centrale: midollo spinale, cervelletto, corteccia cerebrale

Patogenesi dell'atassia di Friedreich

- Le manifestazioni patologiche derivano dalla perdita della fratassina e/o della sua funzione
- Il meccanismo patogenetico non è ancora noto
⇒ numerose ipotesi sul ruolo della fratassina:
 1. Trasportatore mitocondriale del ferro
 2. Proteina coinvolta nella formazione dei gruppi Fe-S
 3. Proteina legante gli ioni ferro
 4. Proteina coinvolta nella risposta agli stress ossidativi

1. La fratassina e l'omeostasi mitocondriale del ferro

- Nei malati: accumulo di ferro nei mitocondri (cuore e sistema nervoso) e maggiore quantità sierica del recettore della transferrina
- Ipotesi: la fratassina è coinvolta nel trasporto mitocondriale del ferro
- \Rightarrow nei malati l'eccesso di ferro reagisce con H_2O_2 (prodotto della respirazione ossidativa) e catalizza la formazione di radicali idrossilici \Rightarrow perdita del mtDNA e degli enzimi con il gruppo Fe-S a causa dello stress ossidativo

2. La fratassina e la biogenesi dei gruppi Fe-S

- Nei malati c'è un deficit degli enzimi che contengono gruppi Fe-S nei siti catalitici
- Due ipotesi:
 - Poiché i gruppi Fe-S sono molto sensibili ai radicali liberi, i deficit enzimatici sono causati dallo stress ossidativo conseguente all'accumulo di Fe
 - La fratassina svolge un ruolo nella sintesi dei gruppi Fe-S

3. La fratassina come proteina legante il ferro

- Sembra verosimile che i mitocondri possiedano un meccanismo per legare il ferro libero e per rilasciarlo quando è necessario
- Nei malati l'accumulo di ferro nei mitocondri potrebbe essere dovuto al deficit di questo meccanismo
- Ipotesi: la fratassina ha la funzione di legare il ferro mantenendolo solubile e biodisponibile

Conclusioni: possibile patogenesi dell'ataxia di Friedreich

- ☆ La frataxina sembra svolgere un ruolo sia nella formazione dei gruppi Fe-S, sia nell'attivazione dei meccanismi di difesa dagli stress ossidativi
- ☆ Il deficit di frataxina determina gravi alterazioni negli enzimi mitocondriali e nelle loro funzioni, sia a causa dei problemi nella loro sintesi, sia a causa dei danni ossidativi. Le alterazioni enzimatiche causano anche l'accumulo di ferro mitocondriale, che contribuisce ad ulteriori danni ossidativi.