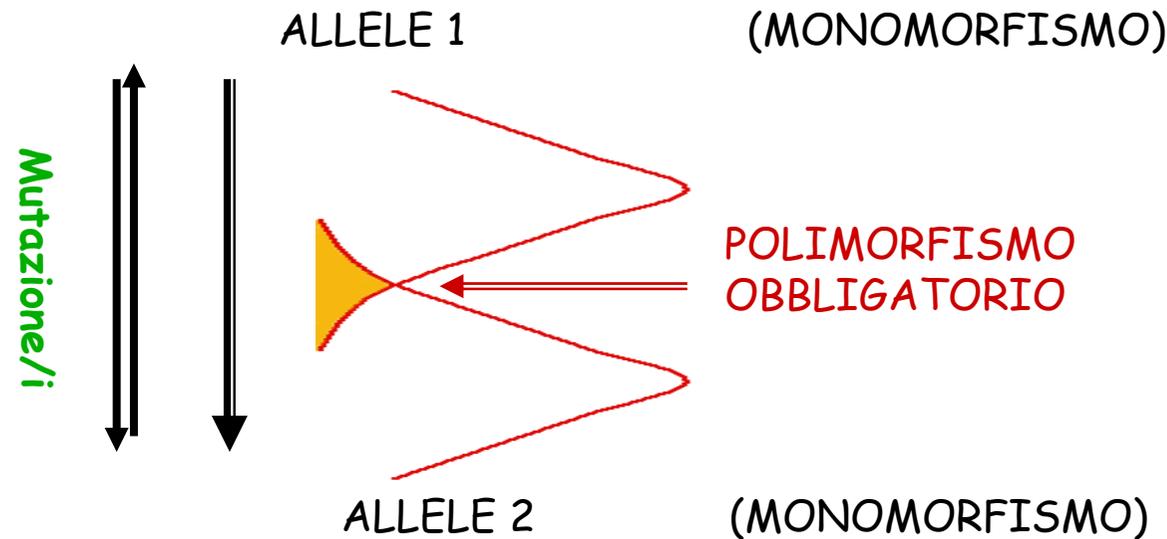


Mutazioni

Basi molecolari della variabilità

www.fisiokinesiterapia.biz

Il DNA non è un'entità statica ma è soggetto a cambiamenti ereditari (**mutazioni**) che insorgono casualmente e che sono alla base del **PROCESSO EVOLUTIVO**



Un determinato locus è definito **POLIMORFICO** qualora almeno l'1%* degli individui siano eterozigoti per quel carattere

Un locus è **POLIMORFICO** se 2 o più alleli sono mantenuti in una popolazione

* frequenza sufficientemente elevata da rendere improbabile l'origine casuale

Quali sono le conseguenze delle mutazioni?

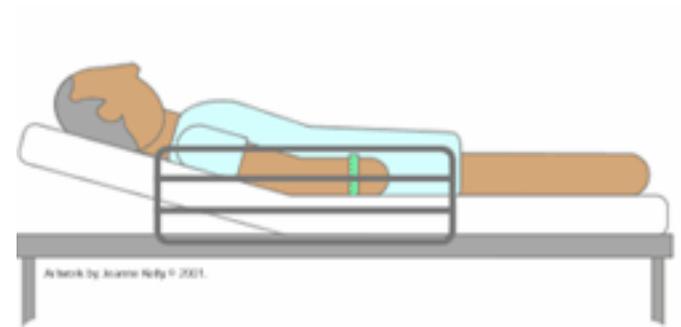
- le mutazioni causano polimorfismo nei nostri genomi
- il numero di polimorfismi è ~1 bp/500-1000 bp
- quindi, ~6 X10⁶ coppie di basi sono differenti in genomi di individui diversi

MUTAZIONI

polimorfismo



Alterazioni fenotipiche



Alterazioni funzionali

1-COSA CAUSA LE MUTAZIONI?

Mutazioni spontanee:

Duplicazione.

3 miliardi di coppie di basi devono essere replicate ad ogni divisione cellulare, in un periodo di 2-3 ore.

Con una velocità di circa 100.000 bp/sec.

Avvengono casualmente degli errori

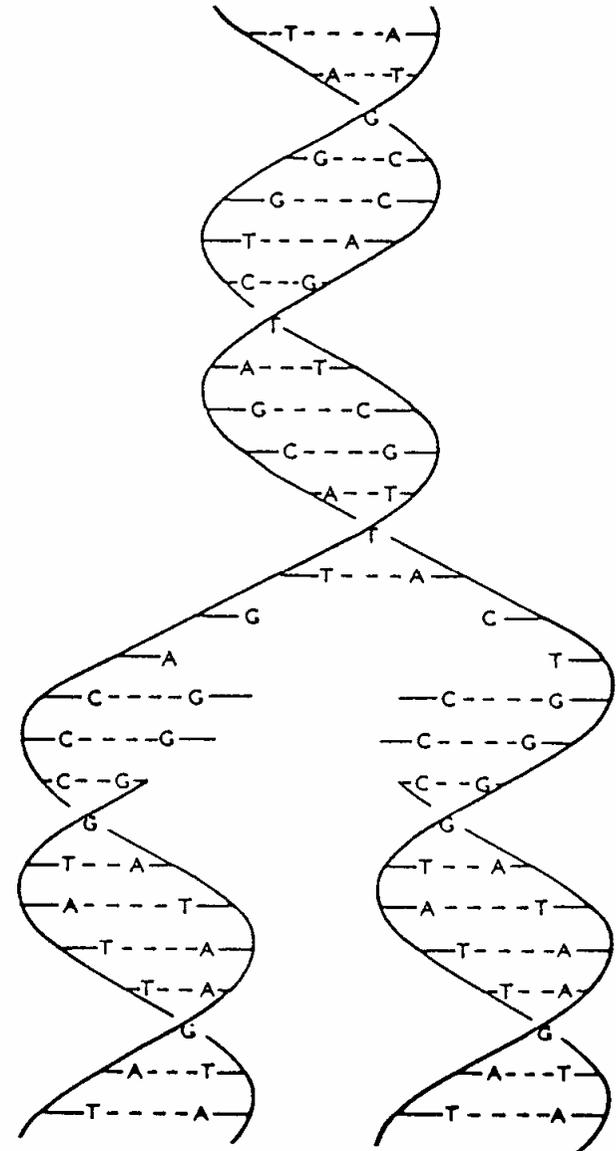
Ricombinazione.

Processo fondamentale per generare "diversità biologica", a causa della struttura di particolari regioni genomiche, è un'altra fonte di possibili errori.

Segregazione.

Processo finale della mitosi e della meiosi.

Avvengono casualmente degli errori che portano ad una errata ripartizione dei cromosomi nelle cellule figlie.



2-COSA CAUSA LE MUTAZIONI?

Mutazioni indotte:

fattori esogeni (mutageni chimici, ionizzanti e irradiazione UV, calore)

Radiazioni UV

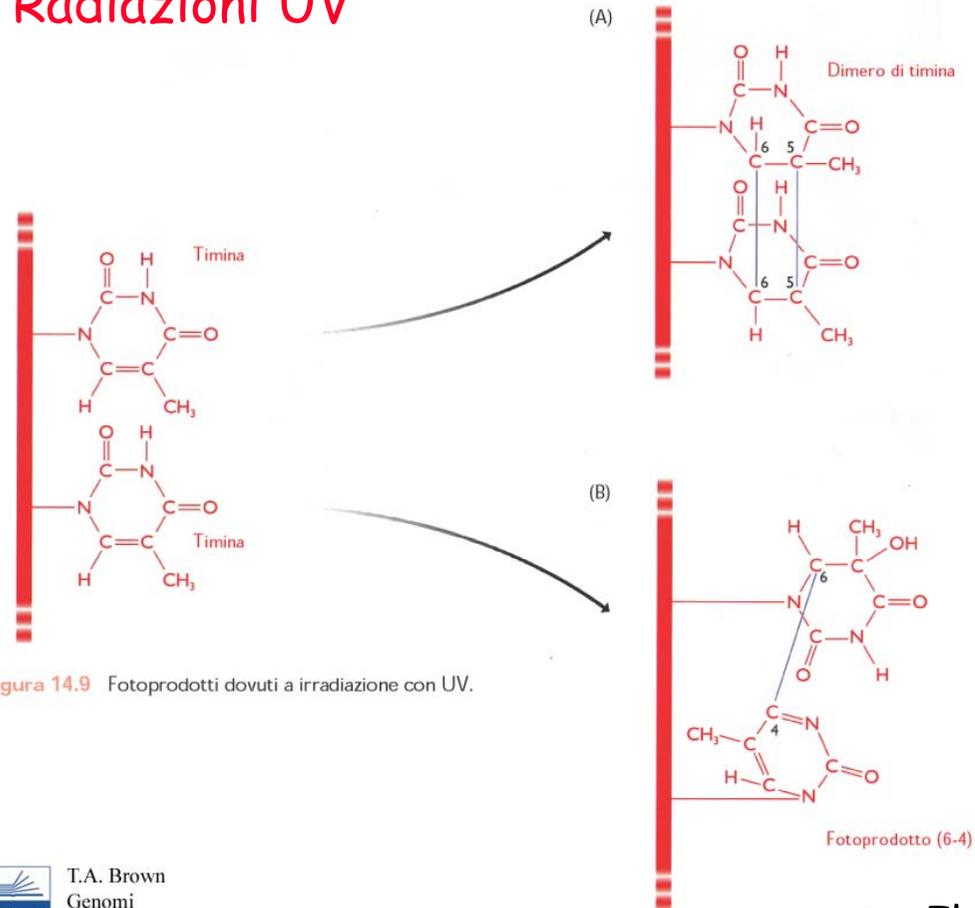
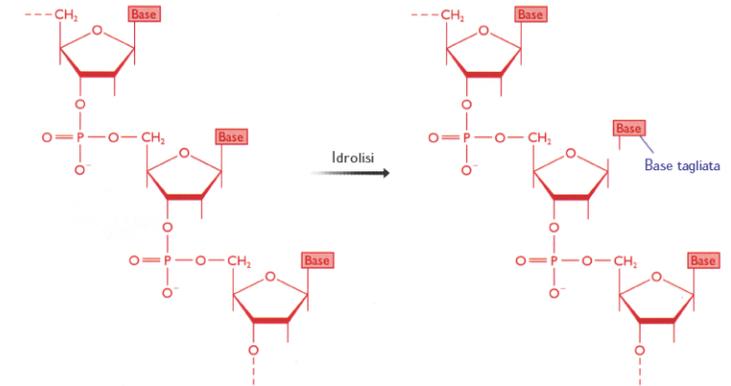


Figura 14.9 Fotoprodotti dovuti a irradiazione con UV.

Il risultato è generalmente una delezione.

Calore

(A) Idrolisi indotta da calore di un legame β -N-glicosidico



(B) Effetto dell'idrolisi su un DNA a doppio filamento

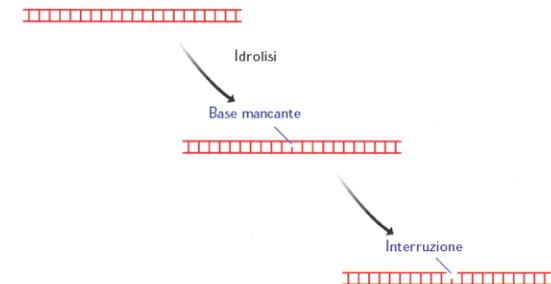


Figura 14.10 Effetto mutageno del calore.

Il calore provoca idrolisi dei legami β -N-glicosidici, creando un sito senza base. Lo zucchero-fosfato rimanenti vengono facilmente persi lasciando così un "buco".

TIPI DI MUTAZIONI E STIMA DELLE FREQUENZE

TIPO	MECCANISMO	FREQUENZA	ESEMPIO
Genomiche N° cromosomi	Errori di segregazione	10^{-2} /div. cell.	Aneuploidia
Cromosomiche Struttura cromosomi	Errori di ricombinazione	6×10^{-4} /div. cell.	Duplicazioni/Delezioni
Geniche Poche basi	Errori della duplicazione	10^{-10} /bp/div. cell. 10^{-5-6} / locus/gen.	Mut. puntiformi

DISTRIBUZIONE GENOMICA DELLE MUTAZIONI

Le mutazioni non sono distribuite casualmente ed uniformemente nel genoma.

L'incidenza delle mutazioni nei diversi loci dipende da diversi fattori:

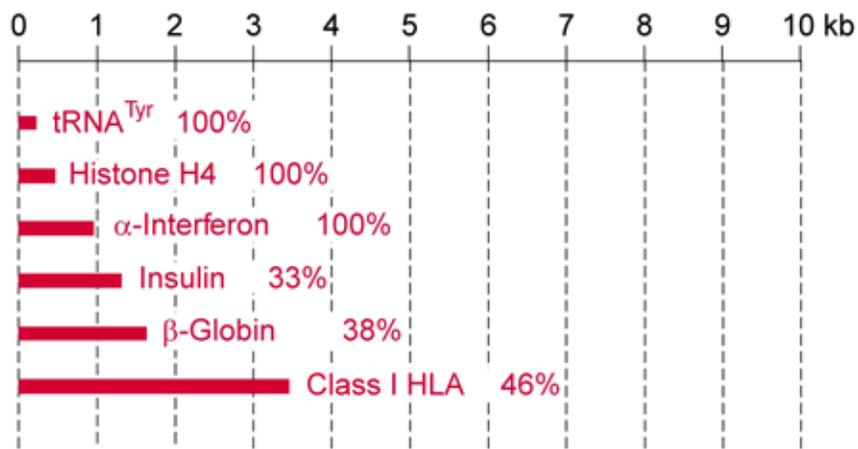
- dimensione del locus considerato
- capacità codificante o meno
- caratteristiche di sequenza.



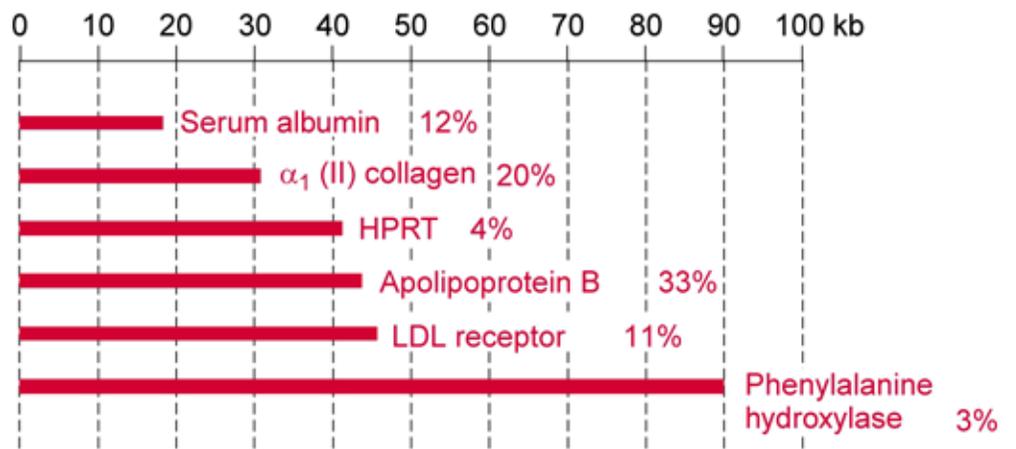
ZONE CALDE DI VARIABILITA'
(HOT SPOTS MUTAZIONALI)

Grandezza dei geni

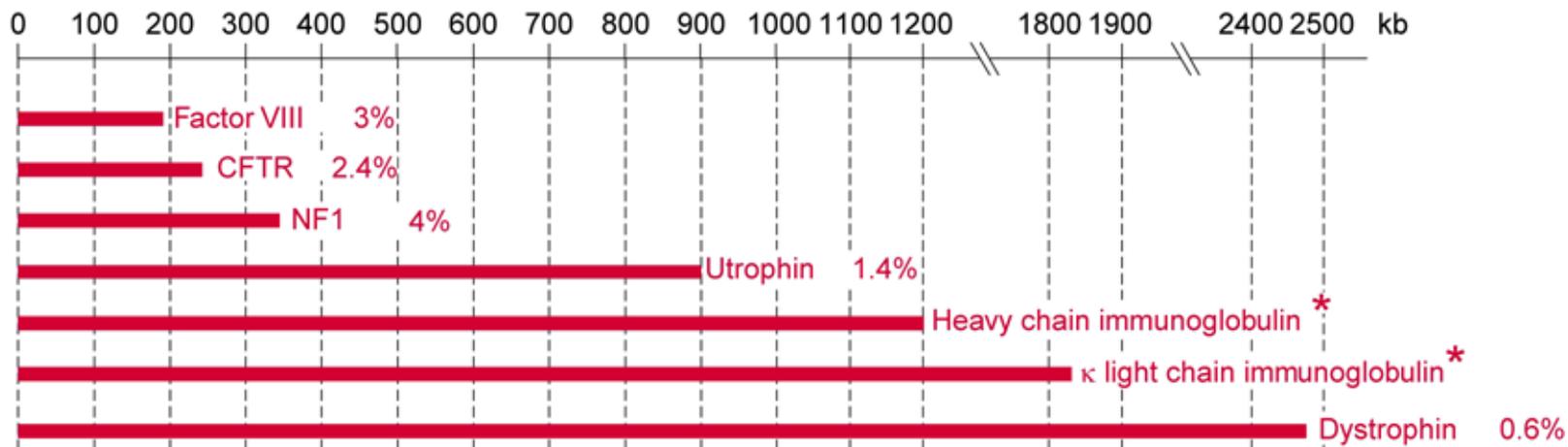
(A) Less than 10 kb



(B) Less than 100 kb



(C) More than 100 kb

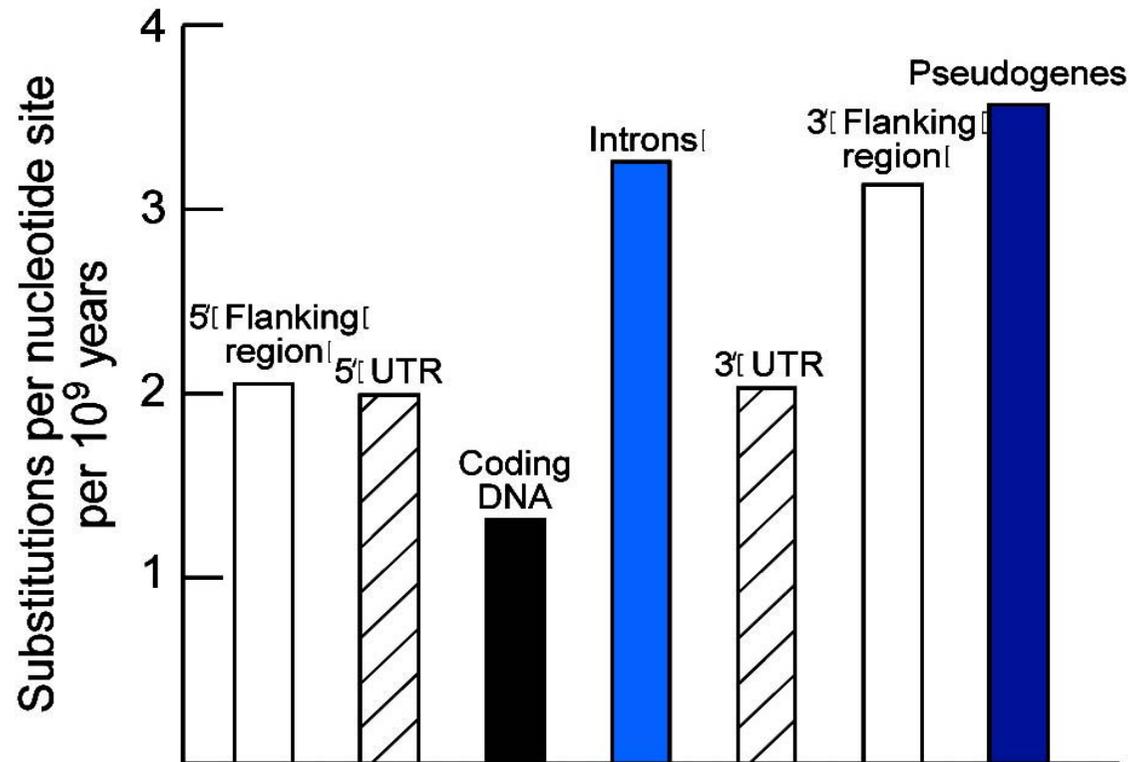


Frequenza di mutazione di alcuni geni

<u>Gene</u>	<u>Nuove mutazioni per 10⁶ gameti</u>
Emofilia B	2 - 3
Aniridia	2 - 5
Retinoblastoma	5 - 12
Acondroplasia	6 - 40
Emofilia A	32 - 57
Distrofia muscolare di Duchenne	43 - 105
Neurofibromatosi	44 - 100
Polycystic kidney disease	60 - 120

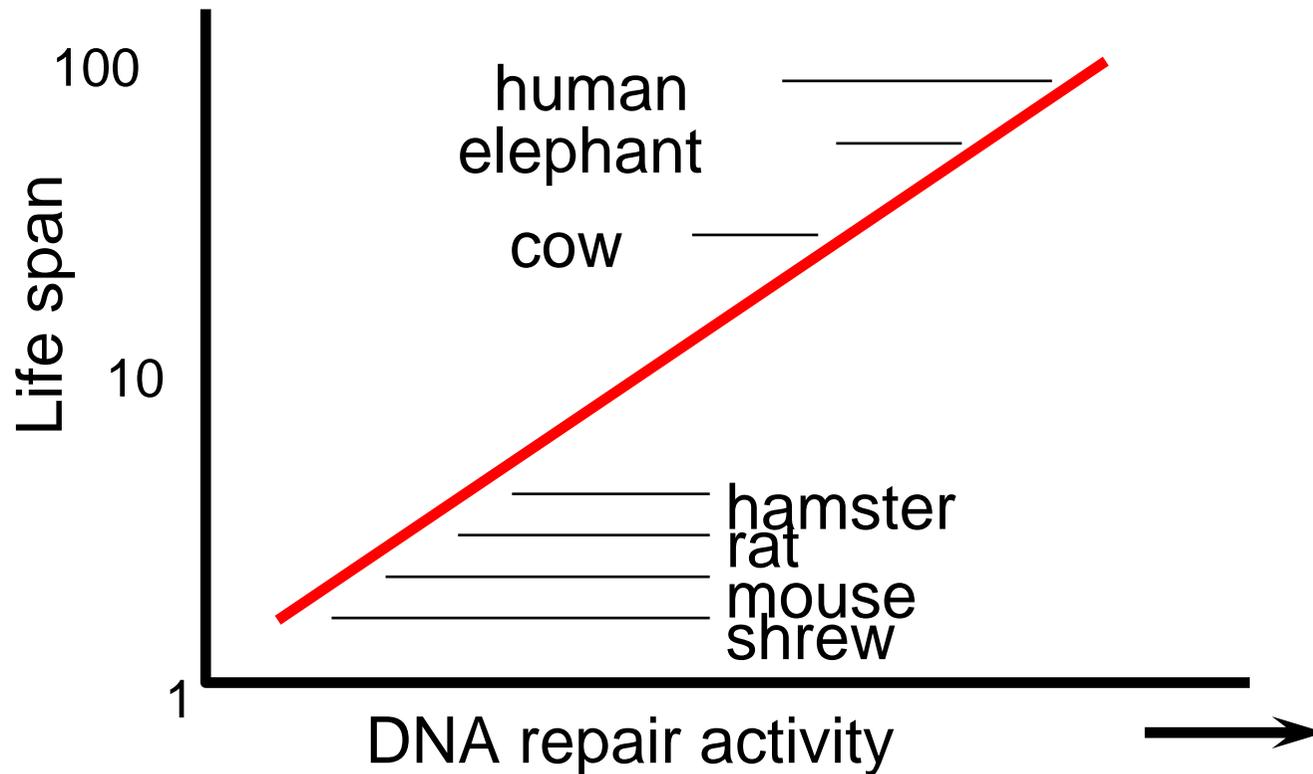
La frequenza di mutazione (mutazione / gene / divisione cellulare) può variare da 10^{-4} a 10^{-7} a seconda della grandezza del gene e del fatto che vi siano "hot spots" mutazionali (la frequenza in molti loci è compresa tra 10^{-5} e 10^{-6}).

Il tasso di mutazione varia in regioni geniche diverse



Il "tasso di mutazione" tiene conto sia dell'evento mutazionale che della pressione selettiva

Fortunatamente esistono meccanismi di “riparazione del DNA”



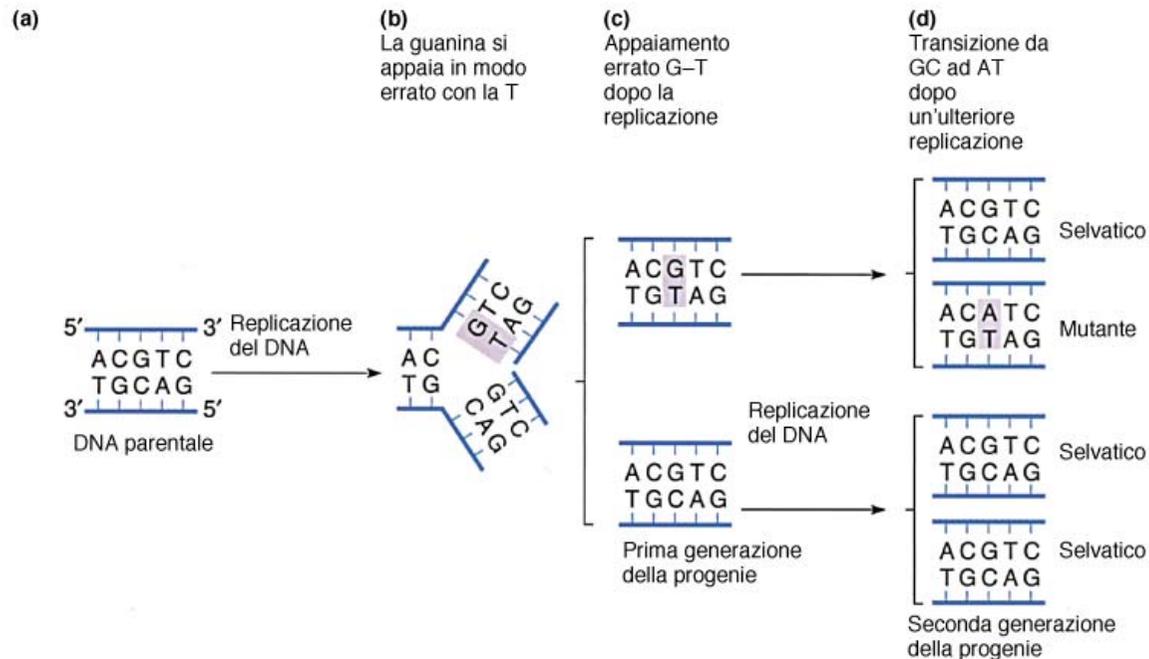
Correlazione tra attività di riparazione del DNA in cellule di varie specie di mammifero e la vita media dell'organismo considerato

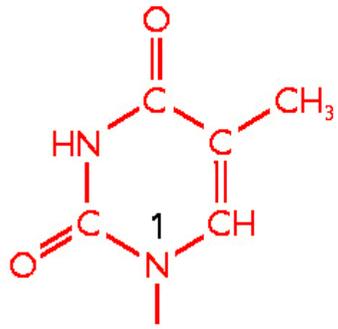
BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE: 1-Sostituzioni di basi

Sono dovute ad errori, che intervengono nei meccanismi di replicazione e di riparazione del DNA

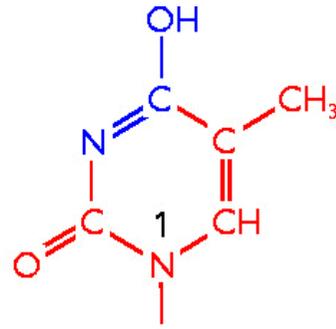
Figura 19.7

Produzione di una mutazione causata da appaiamento errato. I dettagli sono spiegati nel testo.





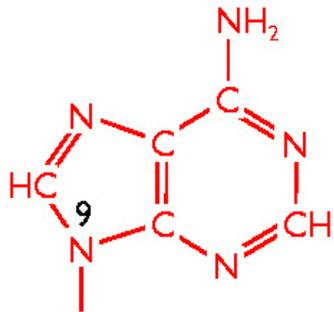
keto-thymine



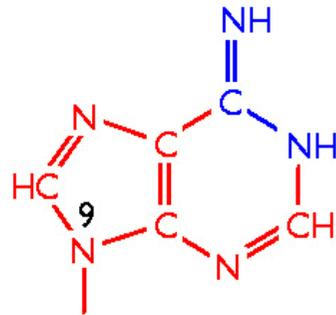
enol-thymine

• **Tautomeria delle basi azotate:**
Presenza di isomeri strutturali in equilibrio dinamico

Si appaia con **G** e non con **A**

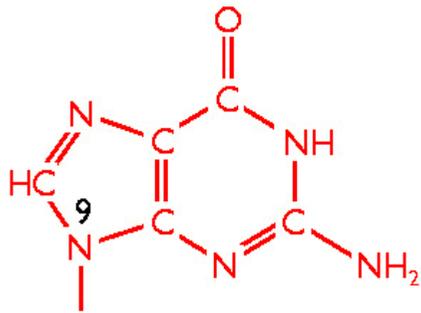


amino-adenine

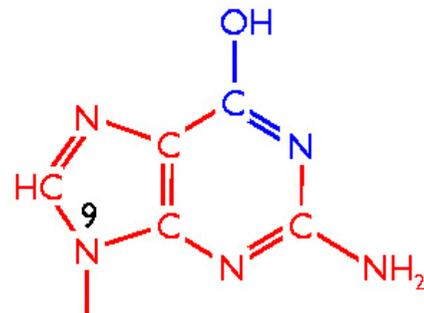


imino-adenine

Si appaia con **C** e non con **T**



keto-guanine



enol-guanine

Si appaia con **T** e non con **C**

• **Deaminazioni e depurinazioni:** Alcuni danni al DNA si originano in soluzione acquosa a causa di reazioni spontanee di idrolisi:

base deaminata

Citosina

Adenina

Guanina

base formata

Uracile

Ipoxantina

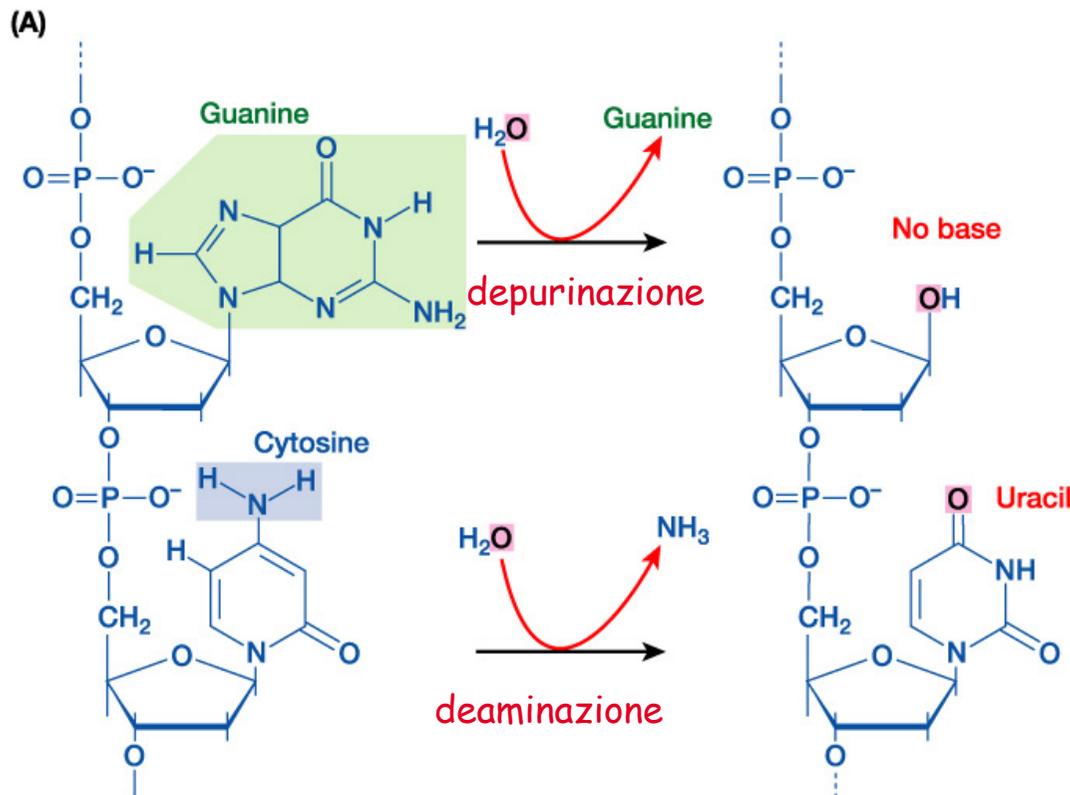
Xantina

sostituzione di coppia di basi

C-G --> (U-A) **T-A**

A-T --> (I-C) **G-C**

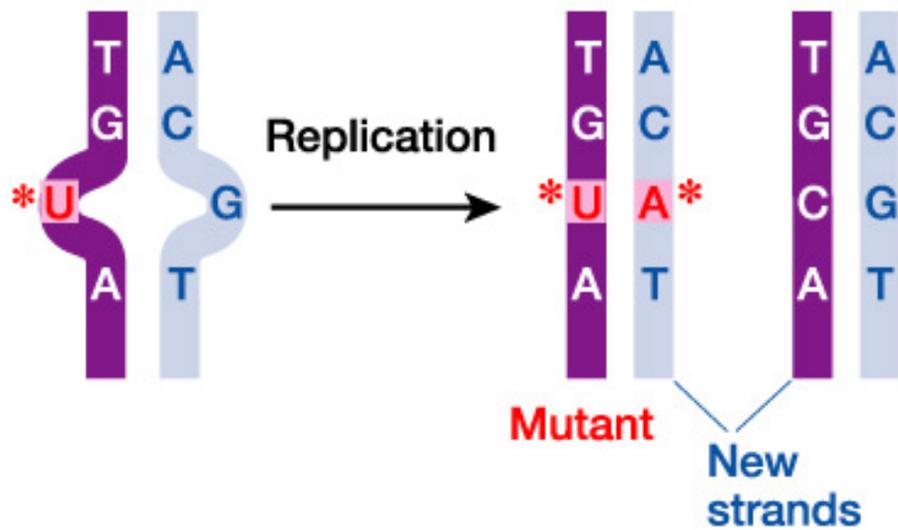
G-C --> (X-C) **G-C**



Ogni giorno circa 5000 adenine o guanine sono perse da ciascuna cellula nucleata umana per rottura spontanea del legame base-zucchero

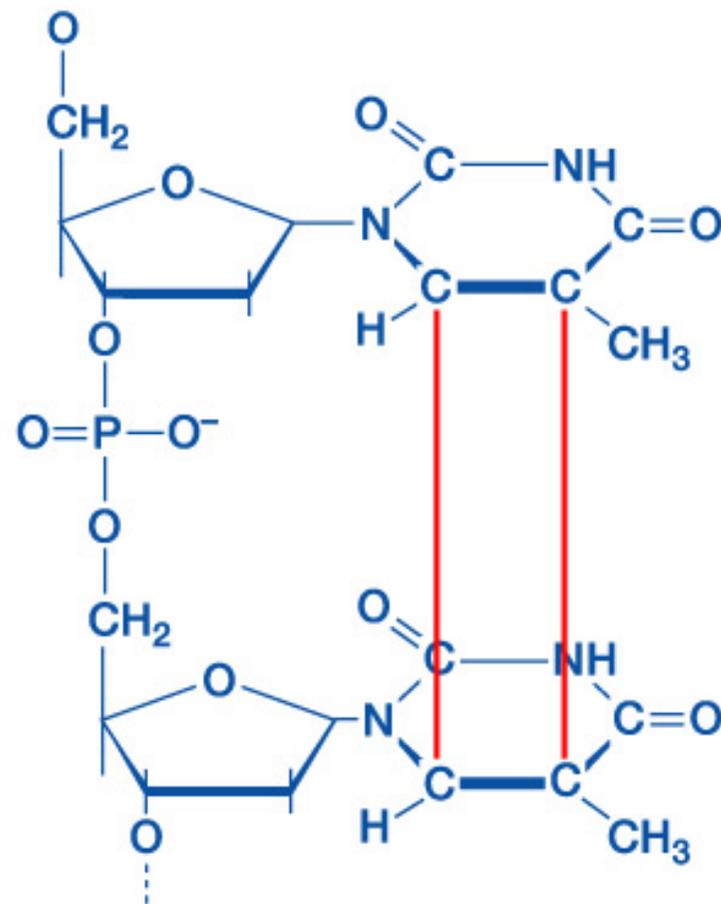
Ogni giorno circa 100 citosine sono deaminate spontaneamente, in ciascuna cellula nucleata umana, producendo uracile

(B)



La successiva replicazione del DNA
fissa la mutazione

(C)



Effetti delle mutazioni puntiformi nella regione codificante di un gene.

Le sostituzioni di basi possono essere raggruppate in 3 classi in base alla capacità codificante:

- **MUTAZIONI SINONIME** (silenti) non modificano la sequenza del prodotto genico. Sono le mutazioni più frequenti
- **MUTAZIONI MISSENSO** modificano la sequenza del prodotto genico; possono avere un effetto negativo, un effetto positivo oppure non avere alcun effetto:

conservative -> cambiamento di un aa con uno chimicamente simile

non conservative -> cambiamento di un aa con uno chimicamente diverso

- **MUTAZIONI NON SENSO** sostituzione di un codone che specifica per un aa con un codone di terminazione. Mutazioni rare

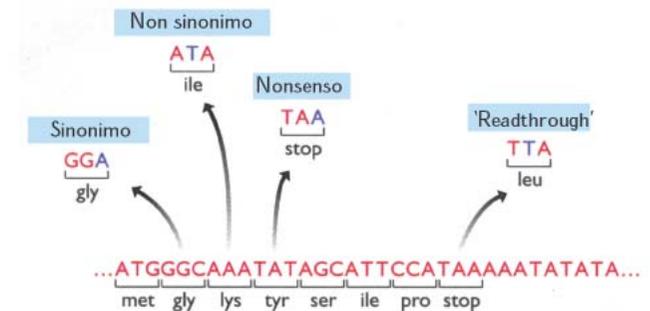


Figura 14.11 Effetti delle mutazioni puntiformi nella regione codificante di un gene.



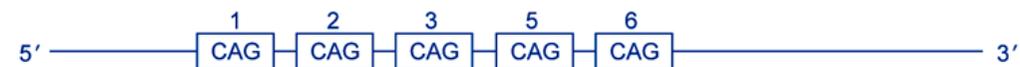
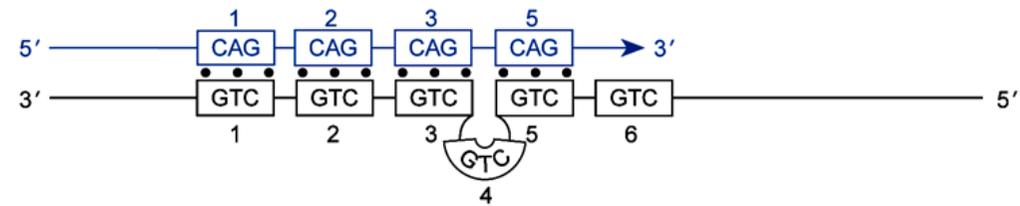
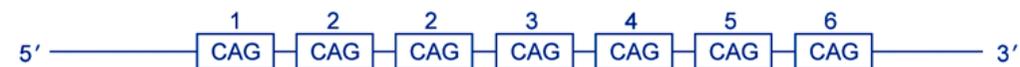
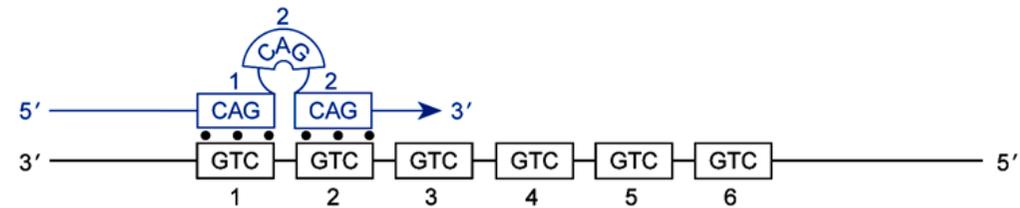
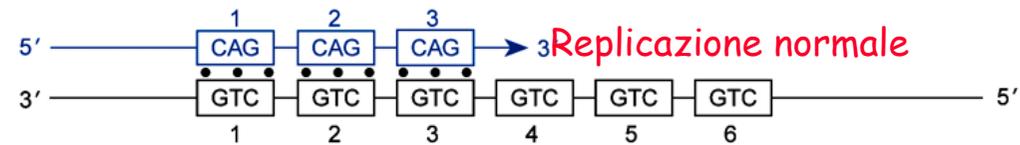
T.A. Brown
Genomi
EdiSES

BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE: 2-Inserzione/delezione di poche basi

Il fenomeno dello slittamento della forza replicativa è spesso la causa di brevi inserzioni/delezioni

Corte sequenze ripetute in tandem

In questo caso si possono verificare inserzioni/delezioni per appaiamento errato causato da scivolamento di un filamento



CONSEGUENZE DELL'INSERZIONE/DELEZIONE DI POCHE BASI NELLE REGIONI CODIFICANTI

Perdita di un solo a.a

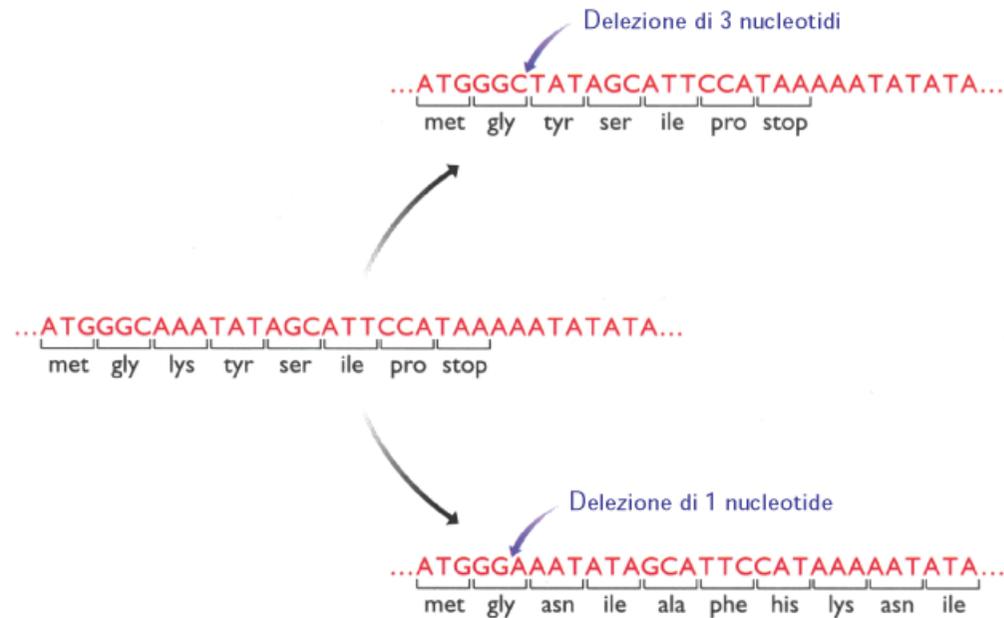


Figura 14.12 Mutazioni per delezione.

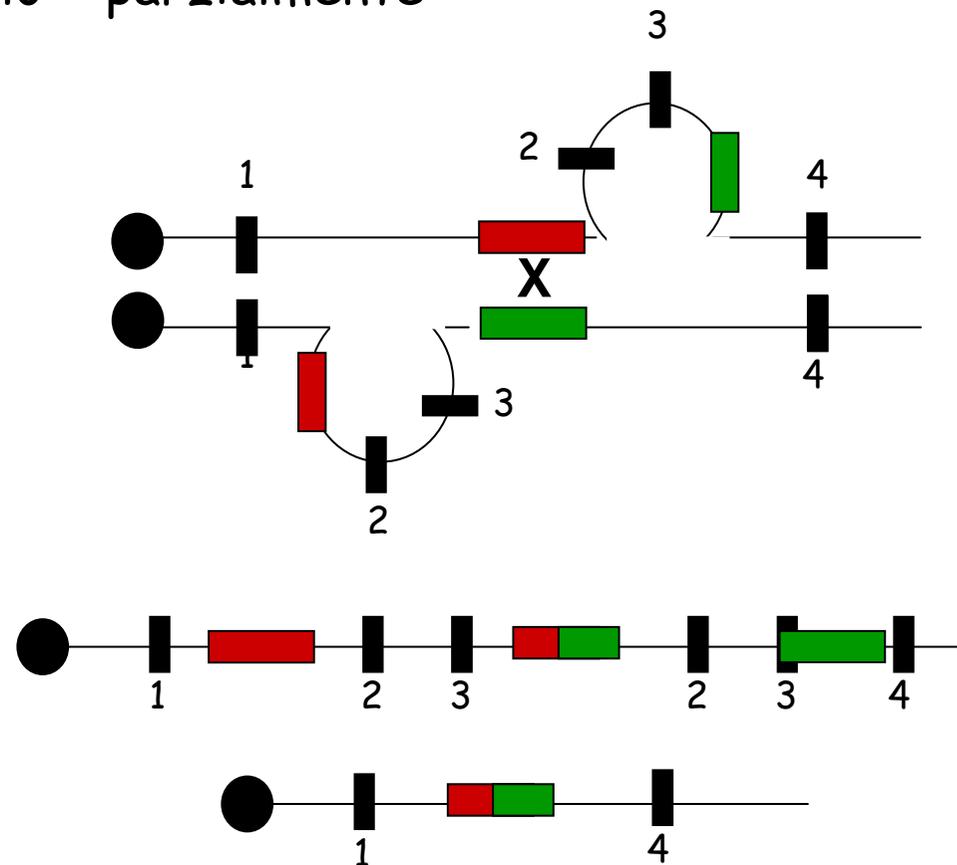


T.A. Brown
Genomi
EdiSES

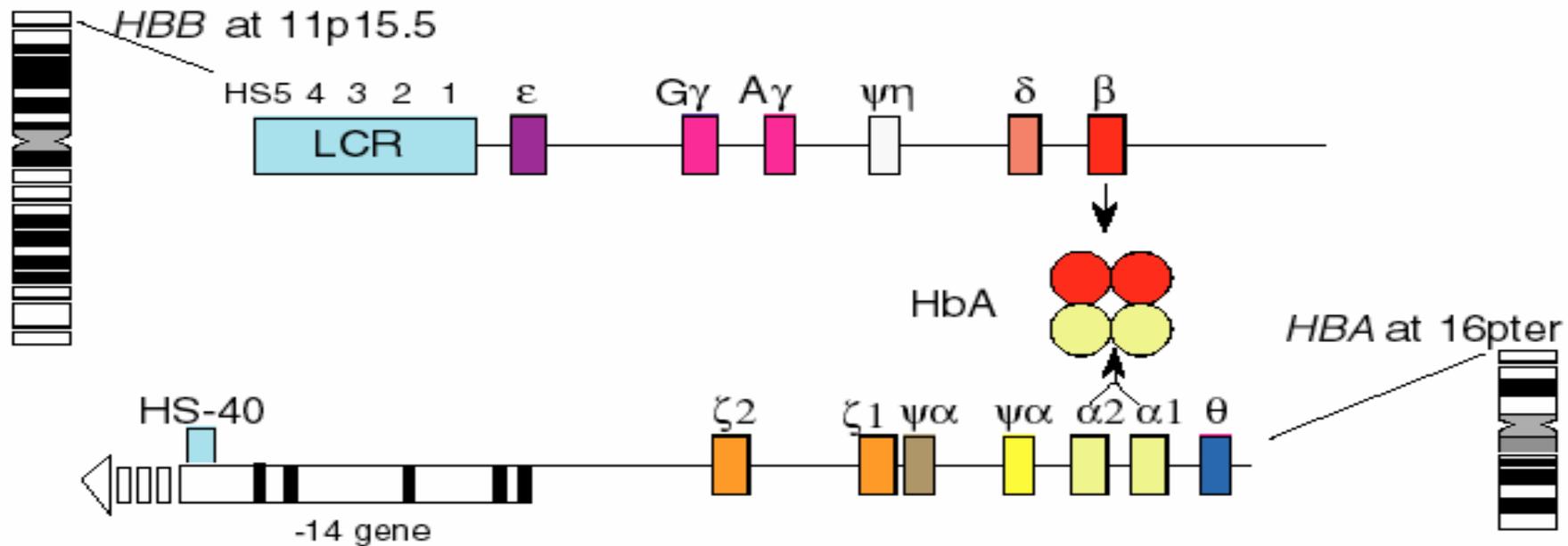
Slittamento completo del frame di lettura

BASI MOLECOLARI DELLE MUTAZIONI SPONTANEE: 3-Inserzione/delezione di grandi regioni

Inserzioni/delezioni estese sono causate da **ricombinazione omologa ineguale** (sequenze omologhe non alleliche) o **ricombinazione non omologa** (sequenze non omologhe o solo parzialmente omologhe, intersperse nel genoma).

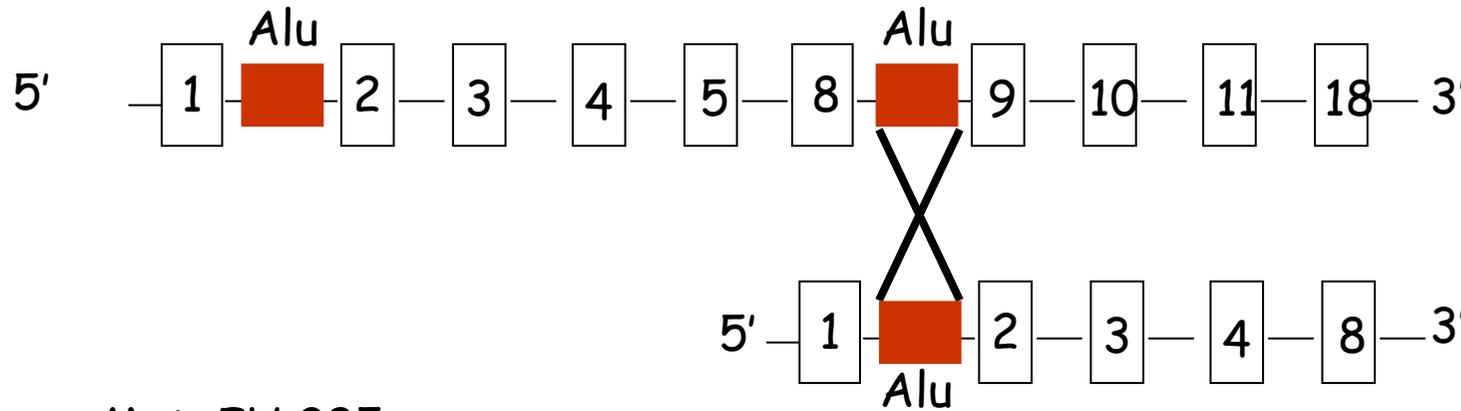


Le regioni genomiche dove sono presenti sequenze omologhe o parzialmente omologhe, non alleliche (famiglie geniche, sequenze ripetute), sono da ritenersi hot-spots mutazionali.

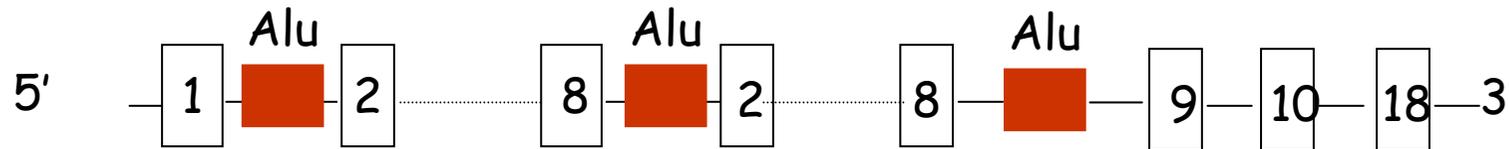


Sequenze ripetute intersperse, quali le sequenze Alu e le sequenze LINE, presenti anche nelle regioni introniche dei geni sono da ritenersi hot-spots mutazionali.

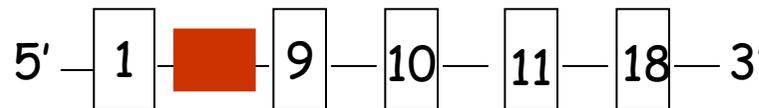
Gene LDLR



Mut. FH 295



+ Mut. FH?



Determinanti dell'espressione fenotipica

- Natura della mutazione

mutazioni differenti, a carico dello stesso gene possono portare a fenotipi più o meno severi a seconda degli effetti delle diverse mutazioni sull'espressione del gene o sulla funzione del prodotto proteico.

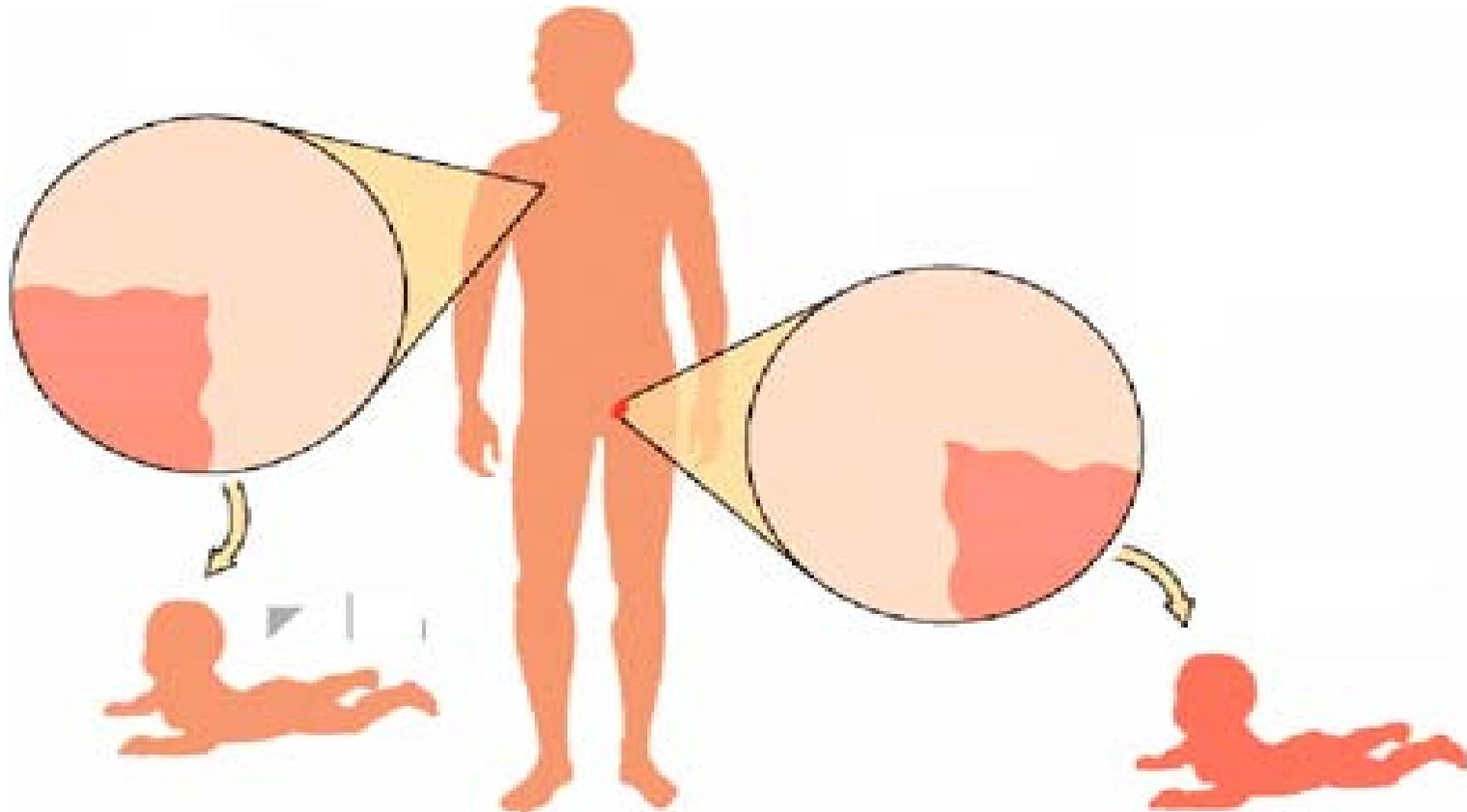
- Background genetico

- due individui di una stessa famiglia (che non siano gemelli identici) pur avendo uno stesso gene mutato, potranno esprimere fenotipi malattia diversi, a causa del diverso "background" genetico

- Influenza ambientale

- fattori quali lo stile di vita, la dieta, e l'esposizione a sostanze tossiche può influenzare il fenotipo della malattia.

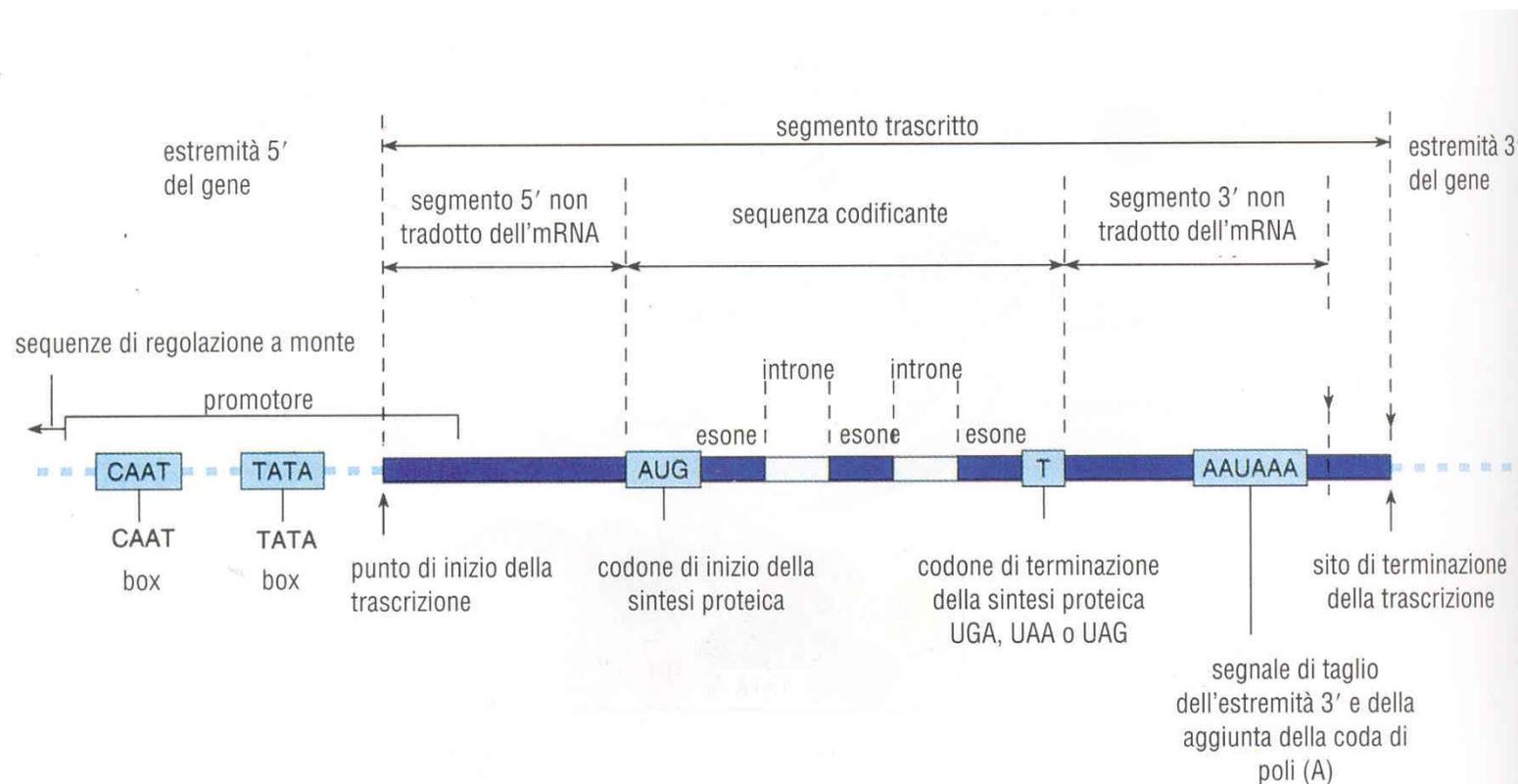
LA PATOGENICITA' DI UNA MUTAZIONE E' INFLUENZATA DAL TIPO E NUMERO DELLE CELLULE IN CUI L'ALLELE MUTANTE E' ESPRESSO



Una mutazione non letale nella linea germinale viene trasmessa alla progenie,
Una mutazione nelle cellule somatiche avrà una conseguenza solo per la cellula che subisce la mutazione o se avviene nelle prime fasi dello sviluppo potrà coinvolgere più cellule.

All'interno di uno stesso gene le mutazioni patologiche possono verificarsi in posizioni diverse, determinando anche fenotipi diversi.

- Nella sequenza codificante (sostituzioni di basi, frame-shift)
- Nelle sequenze non codificanti intrageniche
- Nelle sequenze di regolazione esterne ai geni



**·GRADO CON CUI IL FENOTIPO ABERRANTE
VIENE ESPRESSO DALL'ETEROZIGOTE**

Non tutte le mutazioni hanno effetto immediato sull'organismo: alcune sono ad "effetto ritardato", conferendo il fenotipo alterato tardivamente nella vita di un individuo.

Alcune mutazioni mostrano penetranza diversa o variabilità di espressione in individui diversi.

CLASSE DELLA MUTAZIONE E MODALITA' IN CUI VIENE ALTERATA L'ESPRESSIONE DEL GENE MUTANTE

Le mutazioni, se cambiano il fenotipo, vengono classificate in due categorie:
•mutazioni con perdita di funzione "loss of function"; sono per lo più recessive.

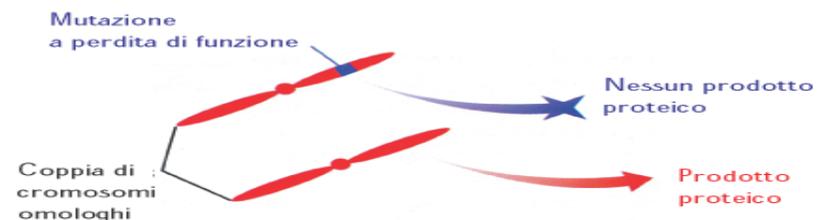


Figura 14.14 Una mutazione a perdita di funzione ('loss of function') è di solito recessiva, perché è presente una versione funzionale del gene nell'altra copia del cromosoma.



T.A. Brown
Genomi
EdiSES

•mutazioni con acquisizione di funzione, "gain of function"; sono molto meno comuni. La mutazione deve essere tale da conferire un'attività anormale alla proteina. Molte sono in sequenze regolatrici.

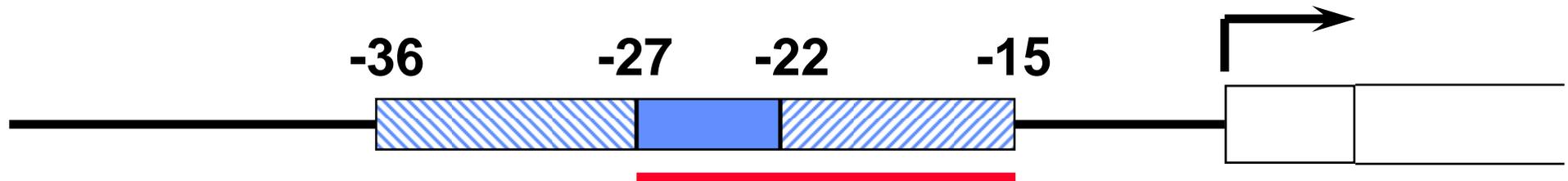
Natura della mutazione: Mutazioni regolative

Il gene del fattore IX

- localizzato sul cromosoma X
- la regione trascritta è >32,700 bp, con 8 esoni

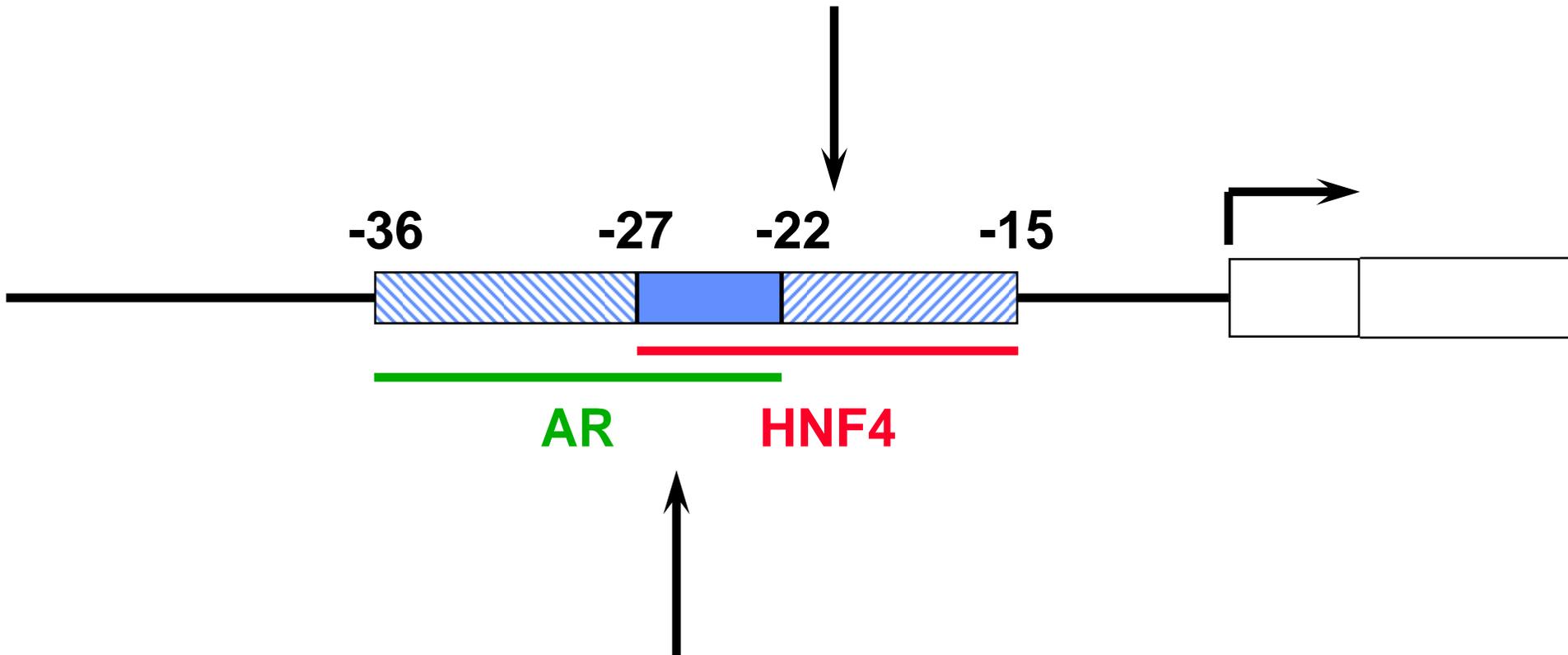
Il promotore del gene del fattore IX

- ci sono due siti di legame sovrapposti: per AR e per HNF4



- AR = androgen receptor
 - **AR** fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per "zinc finger"
 - lega l'androgeno
 - i livelli di androgeno aumentano alla pubertà
- HNF4 = hepatocyte nuclear factor 4
 - **HNF4** fattore di trascrizione appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari per "zinc finger"
 - ligando non noto - probabilmente un recettore "orfano"
 - HNF4 è espresso precocemente nello sviluppo e nel fegato adulto

- la mutazione del nt -20 porta a sviluppare la forma di Emofilia B detta di Leyden. In questo caso l'emofilia migliora con la pubertà quando i livelli di androgeno aumentano.

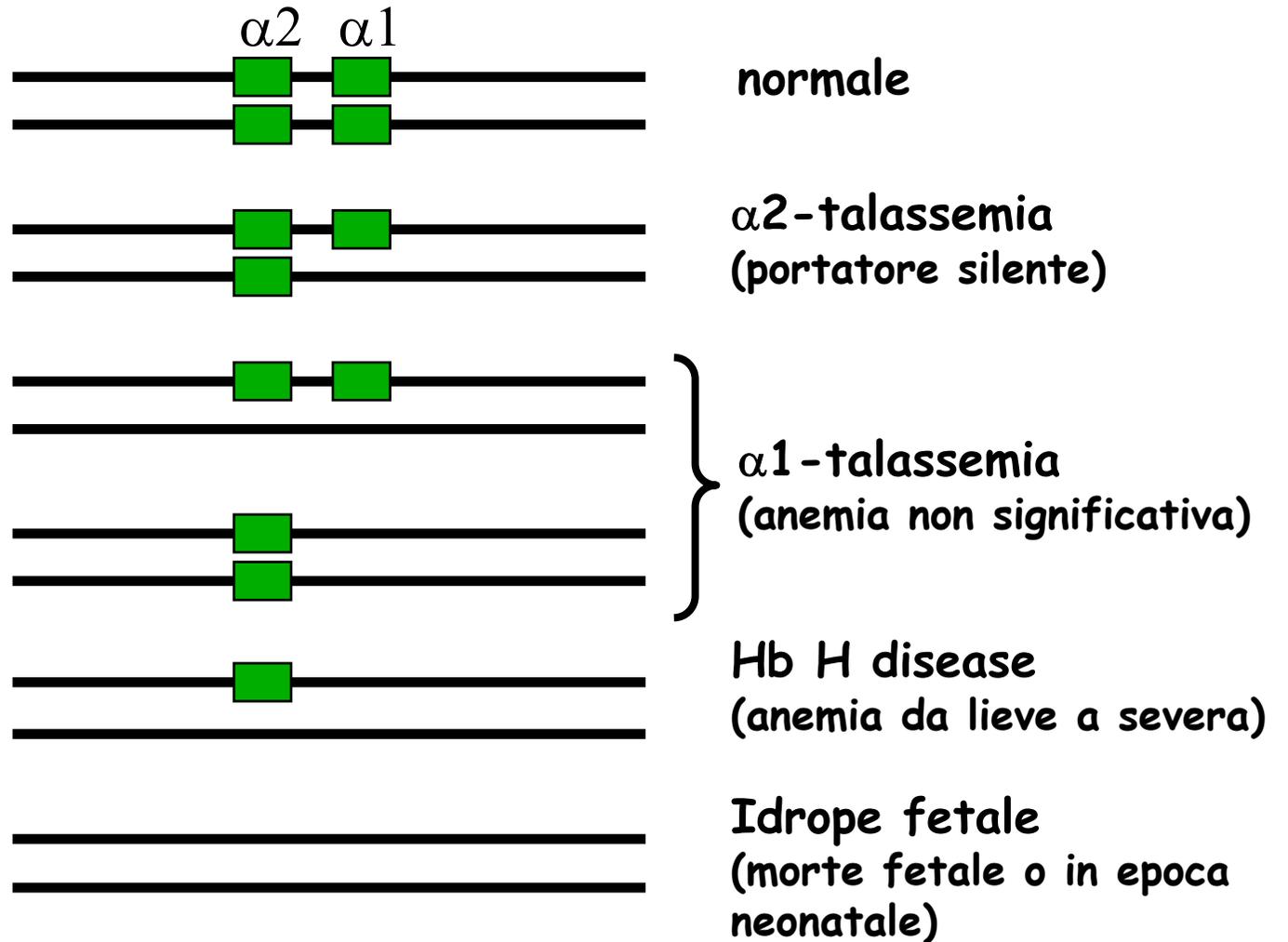


- la mutazione del nt -26 porta a sviluppare la forma di Emofilia B detta di Brandenburg. In questo caso i livelli di fattore IX rimangono bassi anche dopo la pubertà.

Talassemie

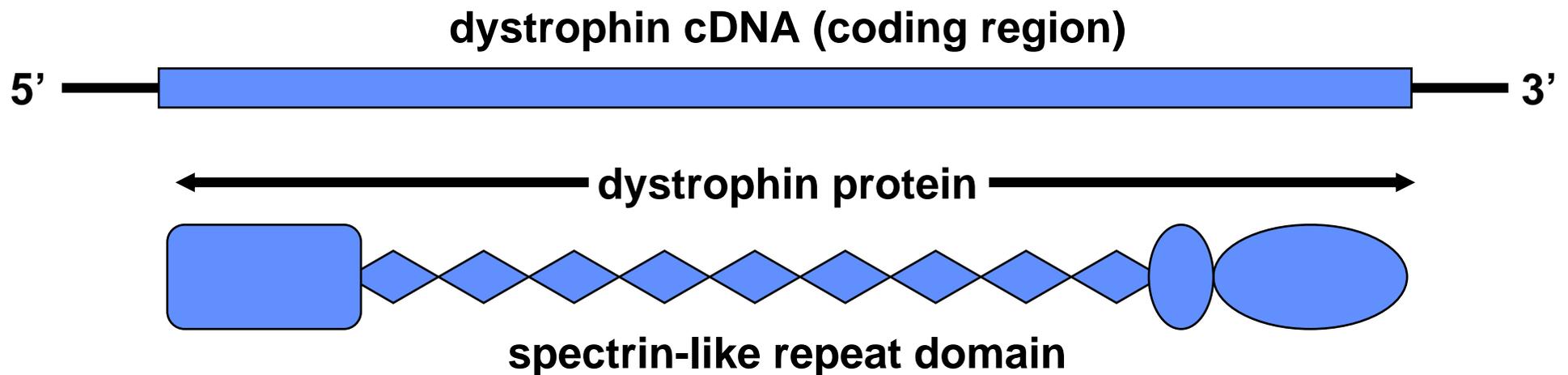
(diminuzione della sintesi delle catene α o β)

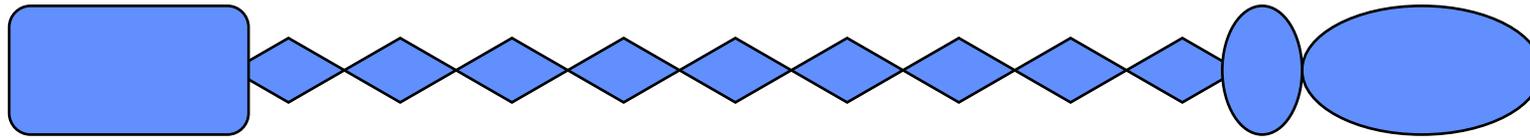
• la perdita di geni α -globinici porta a forme di α -talassemia di differente severità



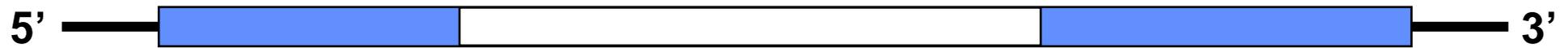
Mutazioni nel gene della distrofina

- Distrofia Muscolare di Becker e Duchenne
 - BMD is a less-severe disease (patients are still walking after 16 yrs)
 - DMD is a more-severe disease (patients are not walking at 12 yrs)
- both can be caused by massive deletions in the dystrophin gene (as well as other types of mutations)
- **the severity is not necessarily correlated with the size of the deletion**

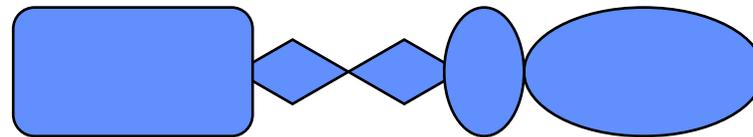




mutations causing BMD can be very large in-frame deletions



truncated but functional protein with intact N- and C-termini

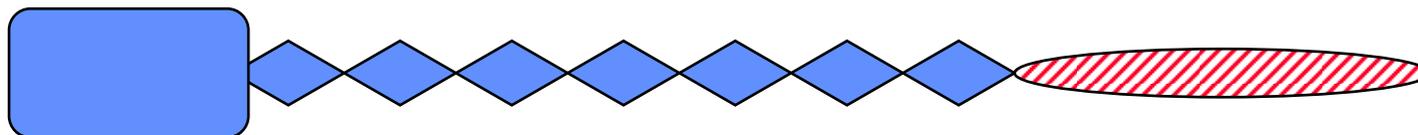


partially functional dystrophin protein

mutations causing DMD can be small out-of-frame deletions



C-terminal truncated protein (with out-of-frame translation product)



non-functional dystrophin protein

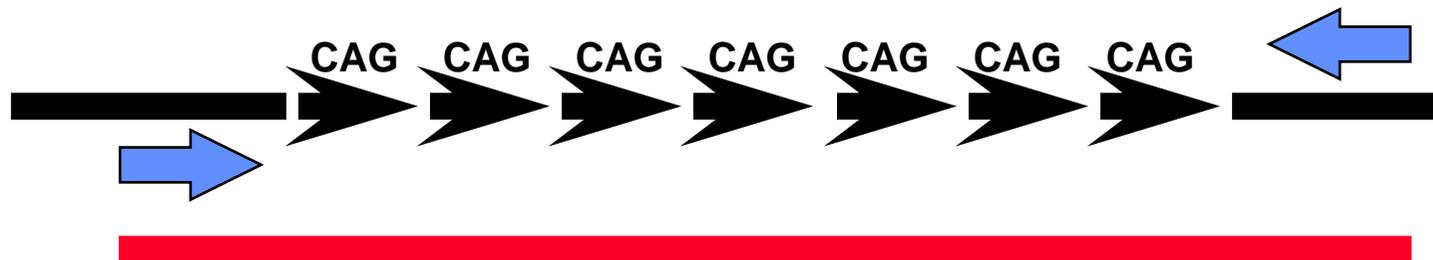
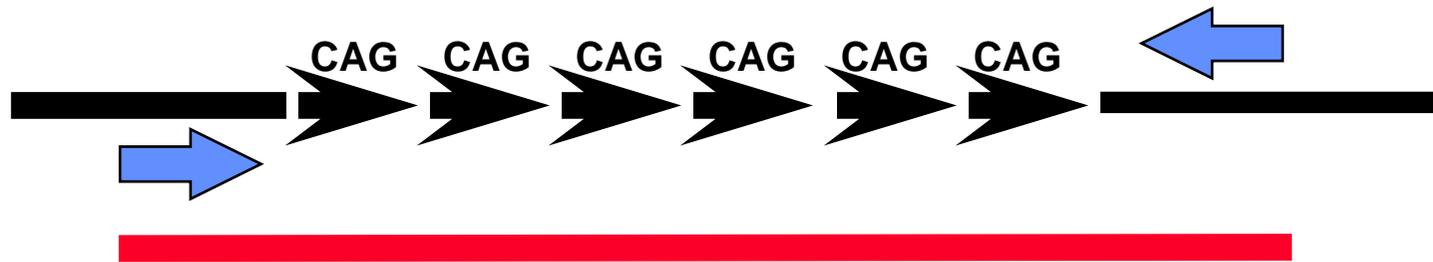
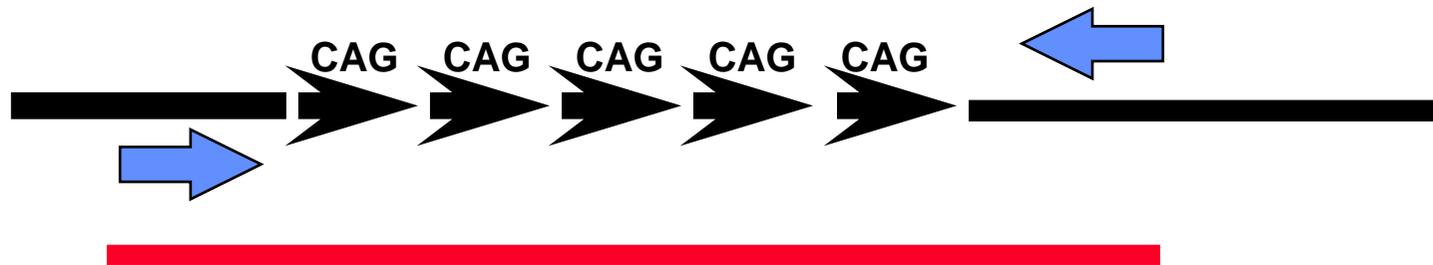
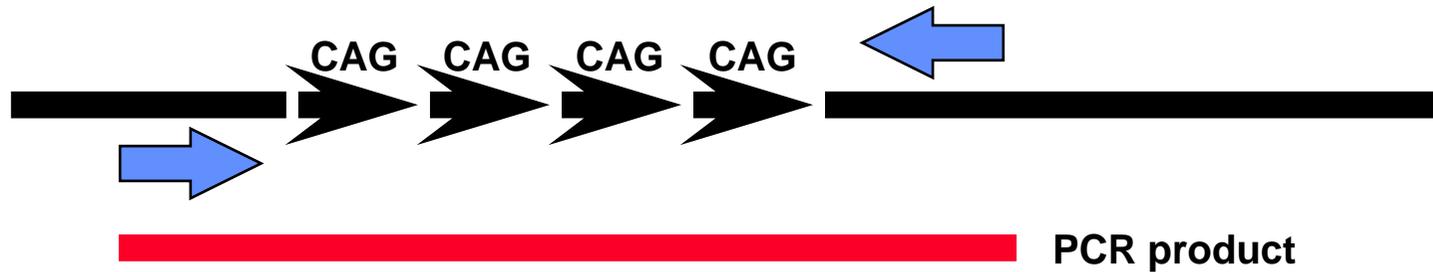
Patologie neuropsichiatriche causate dall'espansione di sequenze trinucleotidiche ripetute

- Myotonic dystrophy
- Fragile X syndrome
- Spinal and bulbar muscular atrophy (Kennedy's)
- Huntington's disease

Microsatelliti

- corte regioni genomiche contenenti brevi (1-4 nt) sequenze ripetute in tandem.

Polimorfismi in loci VNTR



Mutazioni dinamiche e patologia

Malattia	localizzazione della sequenza	ripetizione
<i>espansioni modeste in regioni codificanti: seq. normali ca 4-40 ripetizioni, geni mutati ca 20-100 ripetizioni</i>		
•Huntington's disease	codificante	(CAG) _n
•Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)	codificante	(CAG) _n
•Machado-Joseph's disease	codificante	(CAG) _n
•Kennedy's disease (SBMA)	codificante	(CAG) _n
•Dentatorubral-pallidoluysian	codificante	(CAG) _n
<i>espansioni molto estese in regioni non codificanti: seq. normali 2-55 ripetizioni, geni mutati ca 50-4000 ripetizioni</i>		
•Fragile XA syndrome	5' UTR	(CGG) _n
•Myotonic dystrophy	3' UTR	(CTG) _n

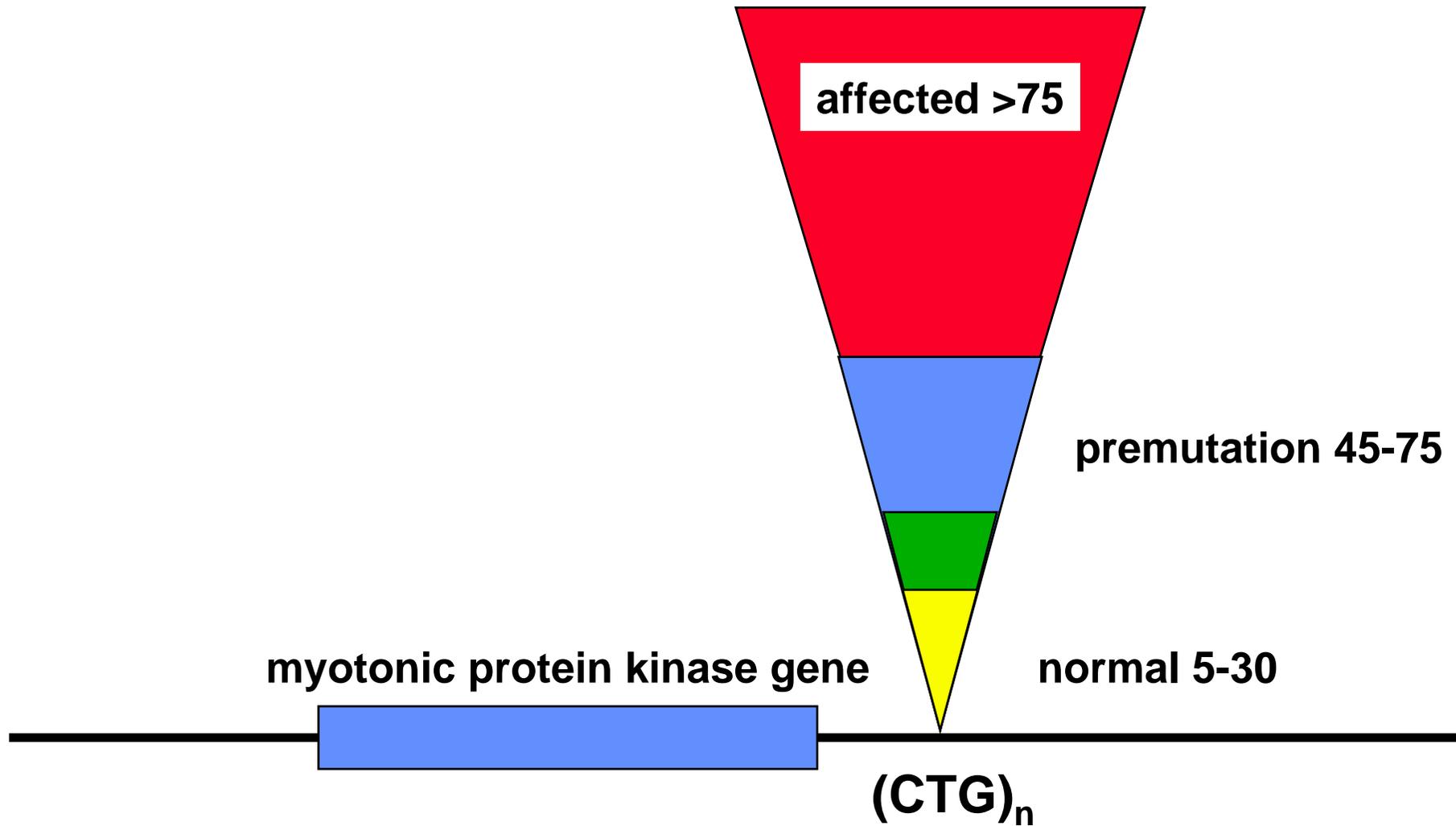
Distrofia Miotonica

- patologia autosomica dominante
- caratterizzata da miotonia e progressiva degenerazione muscolare
- la forma più comune di distrofia muscolare con esordio nell'adulto
- manifestazioni scheletriche, cardiovascolari, e oculari (cataratta)
- associazione con cambiamenti cognitivi, incluso il ritardo mentale
- la patologia mostra il fenomeno dell'"anticipazione"
 - esordio tardivo con sintomi lievi nella prima generazione
 - quindi esordio neo-natale, associato a ritardo mentale, alla 3°-4° generazione
- causata da mutazioni nel gene DM-1 (miotonina protein kinasi), espresso nel cervello, cuore, e muscolo
- il gene normale ha al 3'-UTR una ripetizione CTG polimorfica nella popolazione (5-30 ripetizioni)
- i pazienti hanno un numero espanso di ripetizioni, fino a molte centinaia, che causano una diminuzione dei livelli di mRNA

Anticipazione

- la severità della patologia aumenta di generazione in generazione
- i sintomi passano da lievi nella prima generazione a severi nelle generazioni più avanzate
- è dovuta all'espansione, a step successivi, delle ripetizioni trinucleotidiche
- nella popolazione normale, la lunghezza della ripetizione è polimorfica, ma stabile
- il primo step è la formazione di una "premutazione" con normale fenotipo ma instabile
- la premutazione quindi si espande nella successiva generazione a una lunghezza molto maggiore e una ulteriore instabilità
- l'anticipazione è tipica dell'espansione delle ripetizioni trinucleotidiche

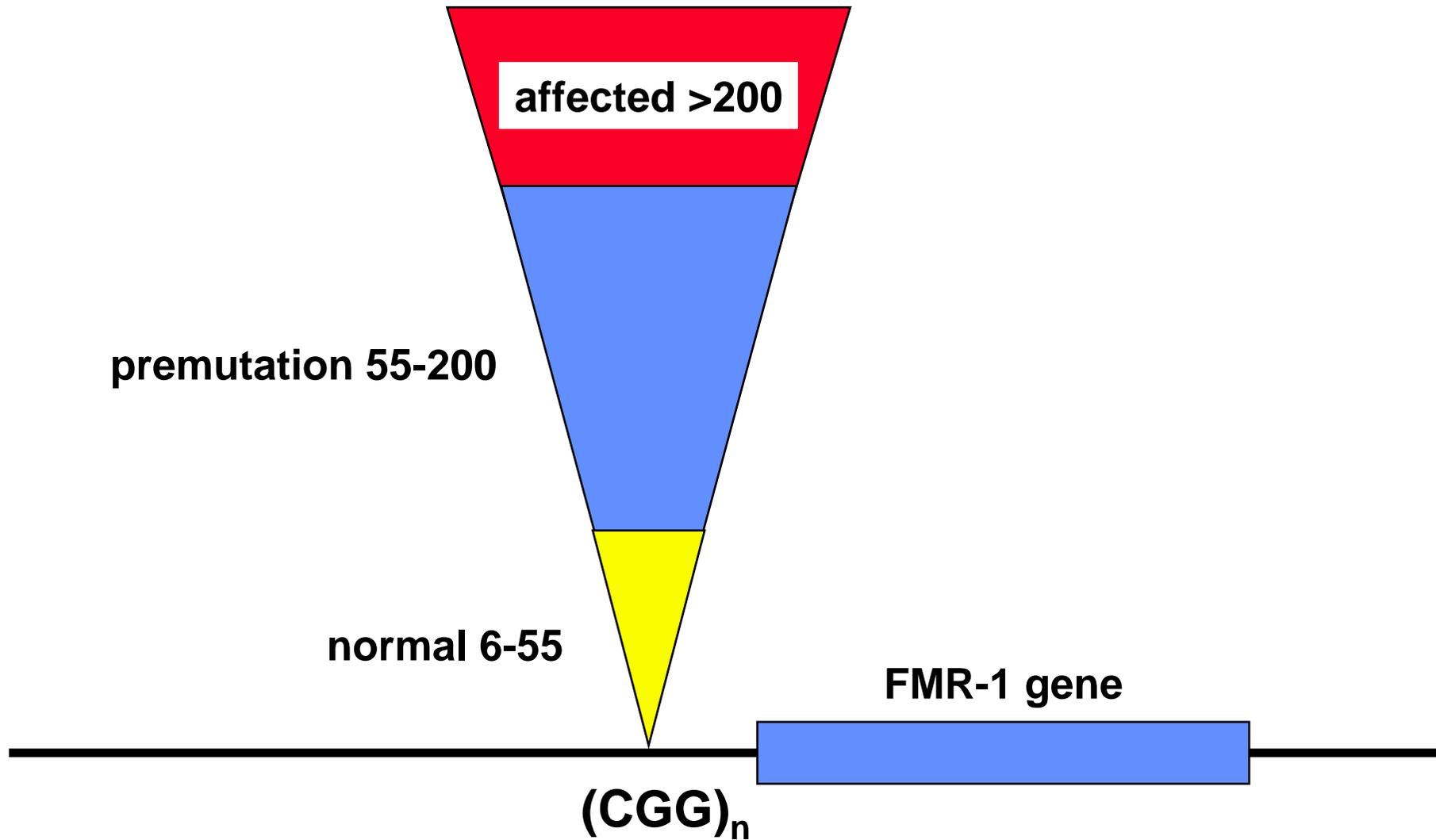
Structure and inheritance of CTG repeats in myotonic dystrophy



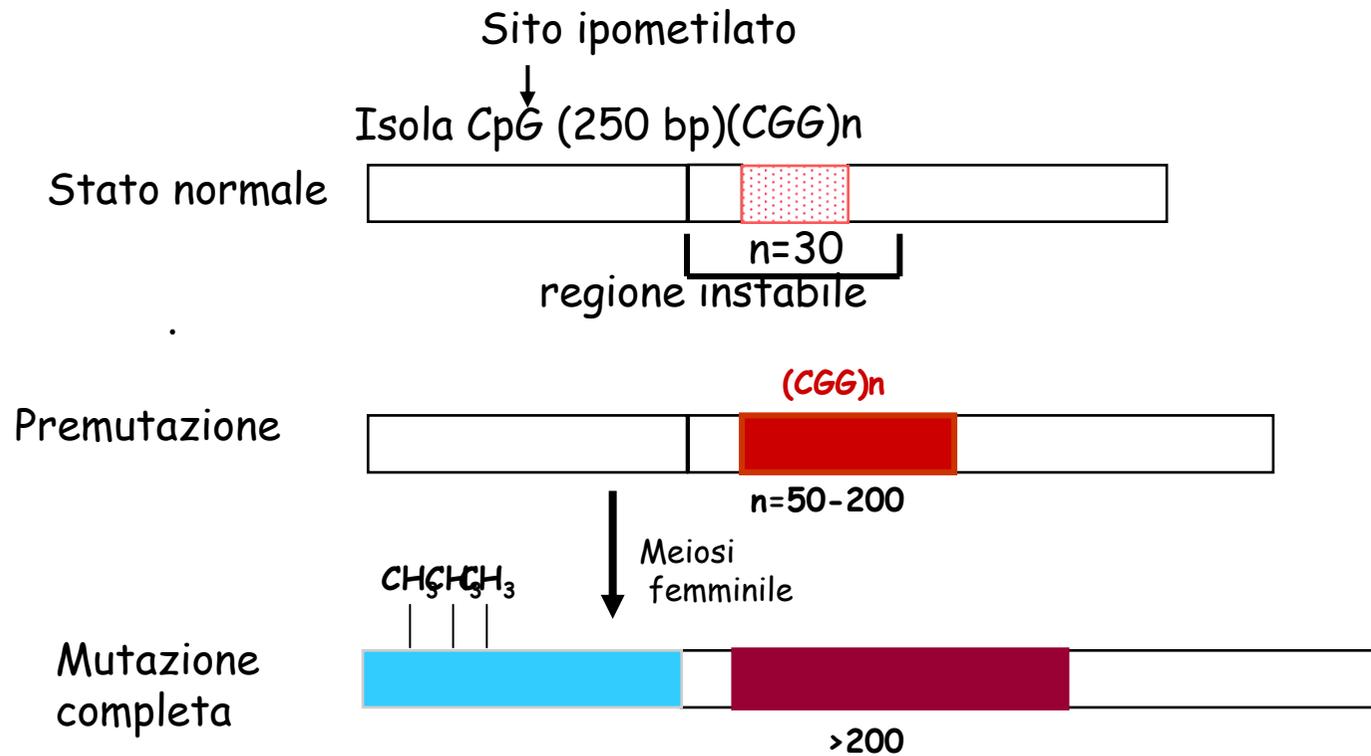
Fragile X syndrome (FRAXA)

- X-linked
- Frequenza: 1 maschio ogni ~1.250 è la seconda causa di ritardo mentale
- La patologia mostra il fenomeno dell'anticipazione
- Aumenta la "penetranza" nelle generazioni successive
- Causata da mutazioni nel gene FMR-1, espresso ad alti livelli nel cervello e nei testicoli, e ampiamente nell'embrione
- Il gene normale ha al 5'-UTR la sequenza CGG ripetuta e polimorfica
Nella popolazione (6-55 ripetizioni)
- I pazienti hanno un numero di ripetizioni che raggiunge le migliaia
- Ne risulta il silenziamento trascrizionale

Structure and inheritance of CGG repeats in fragile X syndrome



Il 5' del gene FMR1

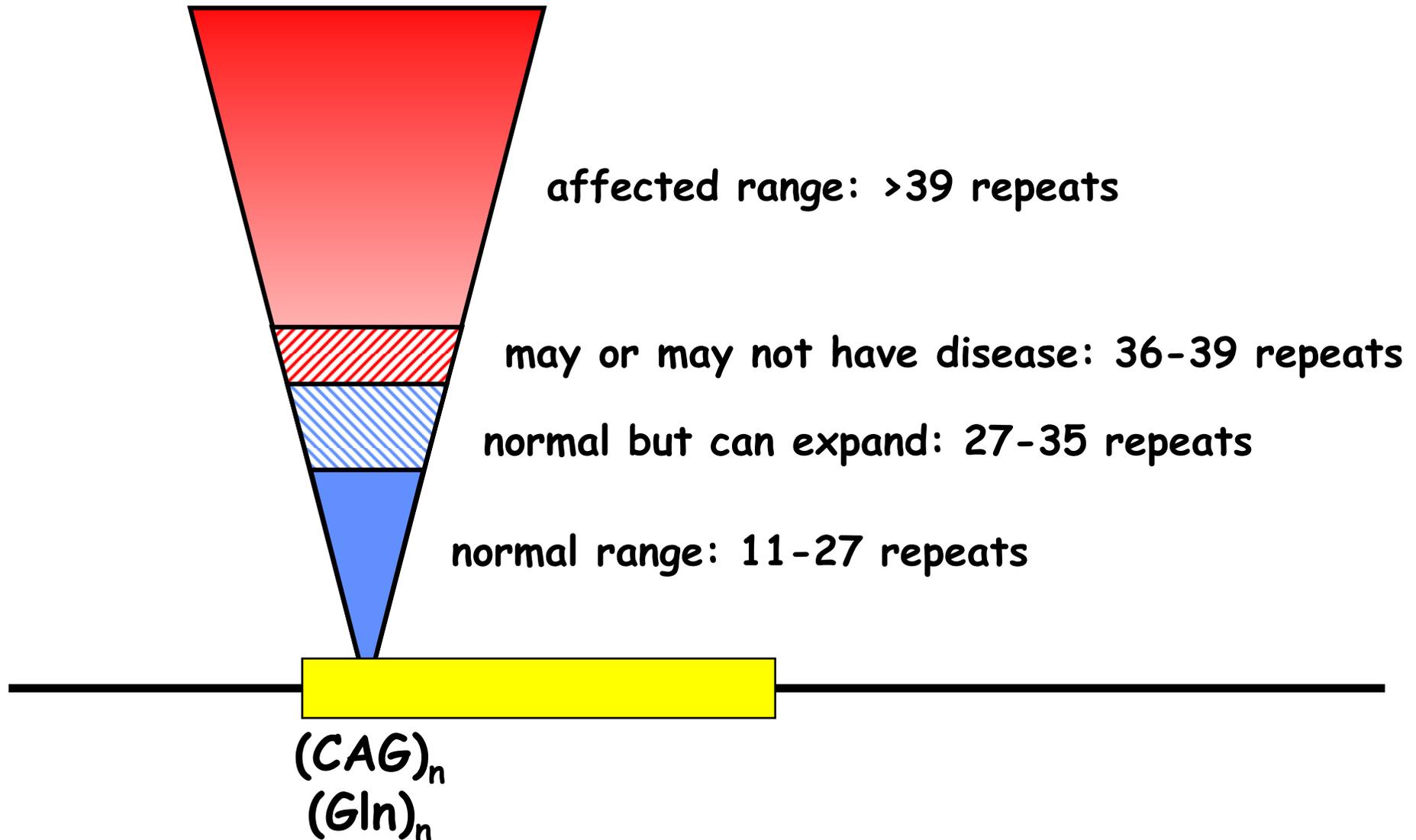


Huntington's disease

- patologia **autosomica dominante**
- esordio sia giovanile che adulto
- associato a movimenti involontari (chorea)
- causata da **mutazioni nel gene IT15** (la cui funzione non è nota)
- il gene normale ha una ripetizione **CAG polimorfica nella popolazione** (11-35 ripetizioni)
- i pazienti hanno un numero espanso di ripetizioni (>35)
- la ripetizione **CAG** è tradotta in **tratti di poliglutamina** nella proteina
- la patologia mostra il fenomeno dell'**anticipazione**, ma la severità non sempre correla strettamente con il grado di espansione
 - figli affetti di padri affetti mostrano un esordio di 8-10 anni più tardivo rispetto ai loro padri
 - figli affetti di madri affette mostrano un esordio simile alle loro madri



CAG repeats in Huntington's disease



Perché la malattia di Huntington è così comune (1/12.500)?

- **espressione nell'adulto** - il gene mutato è trasmesso prima che i sintomi siano visibili;
- **malattia dominante** - possibilità del 50% di passare la malattia ad ogni figlio;

I POLIMORFISMI OGGI

Sono oggetto di studi approfonditi per:

- Accertamenti Medico-legali
- Comprendere la diversa suscettibilità degli individui alle patologie complesse
- Comprendere la diversa risposta degli individui ai medicinali

I POLIMORFISMI DEL DNA

(Polimorfismo Genotipico)

polimorfismi di sequenza	SNP
polimorfismi di lunghezza	VNTR-STR

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

1,46 X10⁶ TOTALI -> 1 SNP/1 Kb

•93% dei geni contiene almeno 1 SNP

•98% dei geni è entro 5 Kb da 1 SNP

TIPOLOGIA degli SNPs

	N x10 ³
1)codificanti, non sinonimi, non conservativi	60-100
2)codificanti, non sinonimi, conservativi	100-180
3)codificanti sinonimi	200-240
4)non codificanti, 5'UTR	140
5)non codificanti, 3' UTR	300
6)Altri non codificanti	>1000

Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

Applicazioni

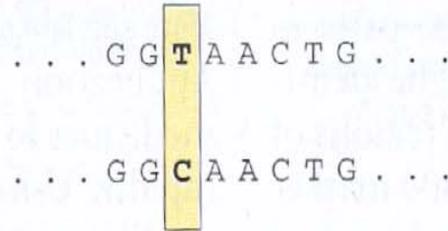
- **Studi di genetica di popolazione** -> definizione della variazione della sequenza del DNA nella specie umana
- **Studi di associazione SNPs-malattia** -> marcatori molecolari
- **Studi degli aplotipi** -> frequenza e distribuzione nelle popolazioni
 - > assoc. aplotipo/rischio malattia
 - > assoc. aplotipo/risposta al farmaco

(per poter condurre in modo informativo studi di associazione basati sugli aplotipi è stato calcolato essere necessari da 30.000 a 1.000.000 di marcatori genetici)

SNPs e FARMACOGENETICA

What is an SNP?

Different people can have a different nucleotide or base at a given location on a chromosome



What is an SNP map?

Location of SNPs on human DNA



Human DNA

How can an SNP map be used to predict medicine response?

Patients **with** efficacy in clinical trials



Patients **without** efficacy in clinical trials



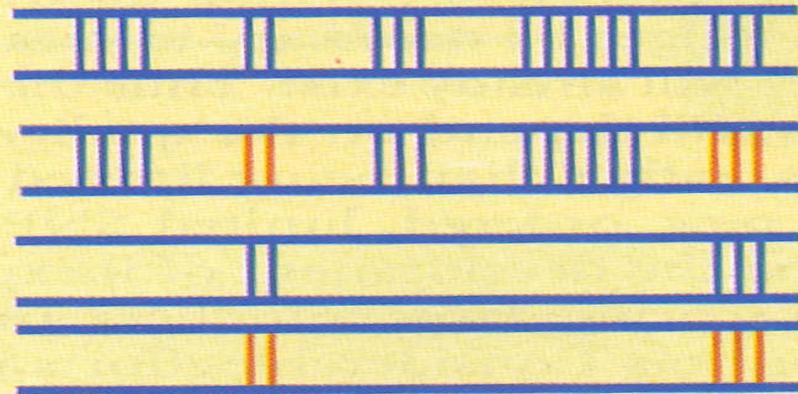
Predictive of **efficacy**



Predictive of **no** efficacy



Section of SNP genotype profile



Il futuro della diagnosi: GENE CHIP

Serie ordinate di sonde gene specifiche (20-25 nt) -> **Chip da ibridazione** -> oligonucleotidi in grado di ibridare a DNA wild-type e a DNA mutato per differenze di una sola base. DNA da analizzare amplificato con PCR marcato con fluorocromo ed ibridato ai supporti contenenti gli oligonucleotidi. Nella reazione viene incluso anche un DNA wild-type marcato con un altro fluorocromo.

Chip da ibridazione mettono in evidenza mutazioni in omozigosi

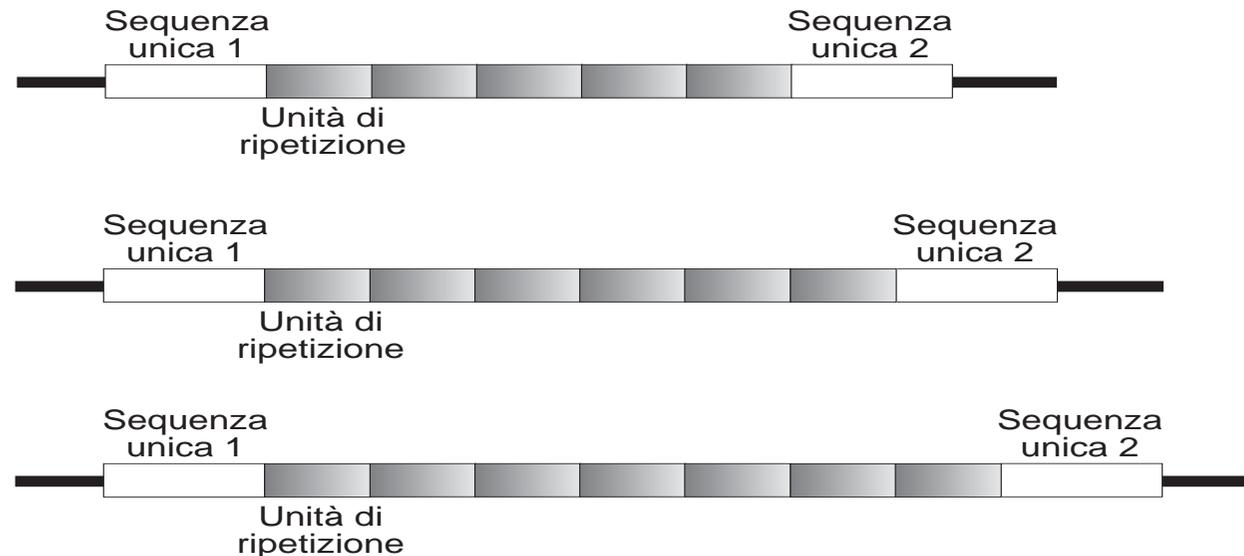
La tecnologia dei micro-chip può essere utilizzata per lo screening di mutazioni in geni noti (es: p53, CYP 450)

POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA

Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)

Minisatelliti ipervariabili (più di 1000 loci caratterizzati da corte unità ripetute in tandem con sequenza variabile ma con un motivo centrale conservato (GGGCAGGAXG))

La variazione allelica a ciascun locus è dovuta a differenze nel numero delle ripetizioni contenenti la sequenza minisatelite comune



Per vedere questa immagine
occorre QuickTime™ e un
decompressore Photo - JPEG.

Impronta digitale del DNA (DNA fingerprint)

Il DNA umano contiene 60 loci
minisatelliti ipervariabili
riconosciuti dalla sonda
PML33.15

(AGAGGTGGGCAGGTGG)

Digestione con *Hin* fI
e ibridazione con la sonda
danno un quadro di ibridazione
tipo "codice a barre"
($p=3 \times 10^{-11}$)

Due Gemelli Identici
hanno bande identiche,
Padre e Figlio hanno 50%
delle bande in comune

