

MUTAZIONI: modifiche nella sequenza nucleotidica del DNA.

- **Mutazioni spontanee:** sono la conseguenza di processi naturali che avvengono nelle cellule, quali errori nella replicazione del DNA o l'azione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte durante il metabolismo;
- **Mutazioni indotte:** possono essere risultato di un attacco da parte di un agente esterno o mutageno che danneggia il DNA.

MUTAZIONI PUNTIFORMI: interessano singole basi

- **Transizioni:** sostituzione di una base pirimidinica o purinica con un'altra pirimidina o purina;
- **Trasversioni:** sostituzione di una pirimidina con una purina o viceversa.

Tipo di mutazione	Tipo di sostituzione nucleotidica
Transizione	A↔G
	C↔T
Trasversione	A↔C
	G↔C
	A↔T
	G↔T

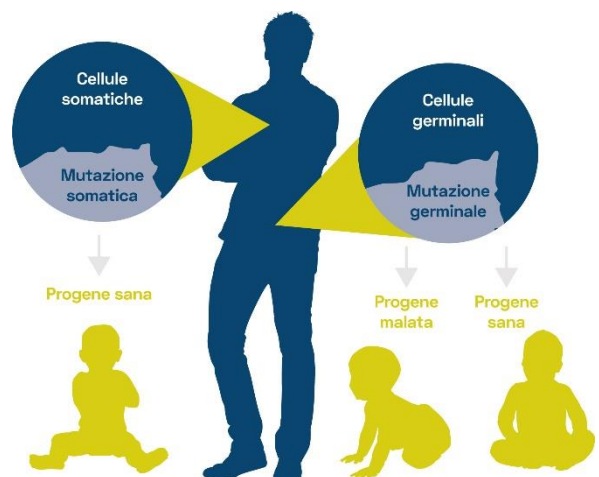
Il cambiamento di una singola base può cambiare completamente il senso della sequenza con potenziali effetti catastrofici.

- Il danno **può** essere riparato → esistono sistemi di riparazione che consentono di riparare il danno al DNA;
- Il danno **può NON** essere riparato → la replicazione del dna danneggiato “fissa” l'incorporazione di basi “scorrette” in corrispondenza delle basi danneggiate e determina **la trasmissione dell'errore alle cellule figlie**.

Ad esempio, durante il primo ciclo di replicazione, l'incorporazione di un nucleotide non corretto può introdurre una mutazione puntiforme e creare una coppia di basi male appaiate. Se l'errore non viene riparato, nel secondo ciclo di replicazione la sostituzione nucleotidica viene incorporata in modo permanente nella sequenza del DNA.

Negli organismi pluricellulari si possono avere:

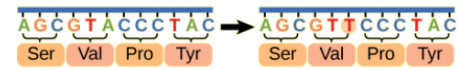
- **Mutazioni somatiche:** interessano le cellule di diploidi del corpo, hanno conseguenze solo per l'individuo nelle quali si verificano e non vengono trasmessi ai figli. Possono causare malattie acquisite come il cancro o patologie neurodegenerative;
- **Mutazioni nella linea germinale:** coinvolgono le cellule che producono i gameti e sono trasmesse ai figli. Possono portare malattie genetiche ereditarie.



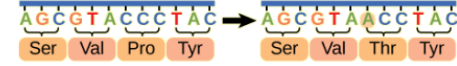
Mutazioni puntiformi all'interno di sequenze codificanti:

- **Mutazione silente:** non succede nulla se la nuova tripletta codifica per lo stesso aminoacido, per la ridondanza del codice genetico.
- **Mutazione missenso:** porta alla modifica della proteina se la tripletta codifica per un aminoacido diverso.
- **Mutazione nonsense:** si interrompe la sintesi della proteina se la tripletta corrisponde a un codone di stop.

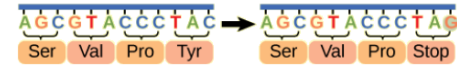
Mutazione silente:



Mutazione missenso:



Mutazione nonsense:



Effetto funzionale delle mutazioni sulla proteina:

- LOSS-OF-FUNCTION → mutazioni con perdita di funzione
- GAIN-OF-FUNCTION → mutazioni con acquisto di funzione

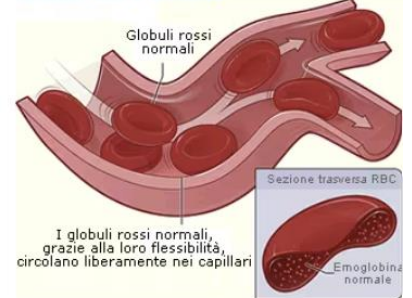
Se le mutazioni avvengono sui geni rilevati nel processo di proliferazione, come gli **oncogeni** o gli **oncosoppressori**, possono insorgere tumori. Il cattivo funzionamento dei meccanismi di riparazione causa una serie di patologie e in genere una maggiore predisposizione all'insorgenza dei tumori.

ANEMIA FALCIFORME: mutazione missenso nel gene globina; l'acido glutammico in posizione 6 (carico negativamente) viene sostituito da valina (idrofobico).

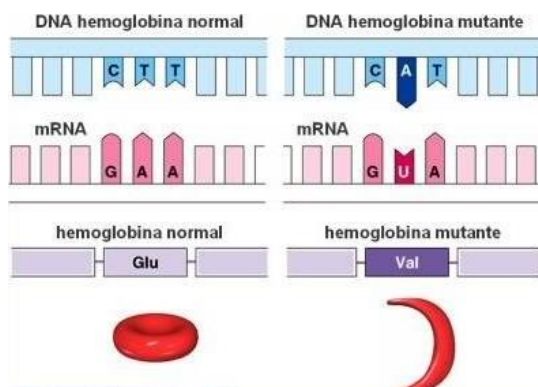
L'anemia falciforme è una malattia genetica del sangue, così definita per la caratteristica forma a falce assunta, in particolari circostanze, dai globuli rossi del malato. Questa peculiarità è in contrasto con la tipica sagoma - a disco biconcavo, elastica e facilmente deformabile - degli eritrociti maturi, che permette loro di transitare indisturbati nel ristretto lume dei capillari sanguigni.

Nell'anemia falciforme compaiono in circolo globuli rossi anomali, spigolosi e facilmente aggregabili (vedi figura). Queste caratteristiche rappresentano un grosso ostacolo al normale transito degli eritrociti all'interno dei vasi capillari e favoriscono la formazione di ingorghi alla circolazione, con danno tissutale ischemico. Le cellule falciformi, inoltre, sono più fragili di quelle normali e vanno facilmente incontro ad **emolisi**, determinando una grave forma **anemica** (detta appunto anemia falciforme o drepanocitica, dal momento che *drepanos*, in greco, significa falce).

GLOBULI ROSSI NORMALI



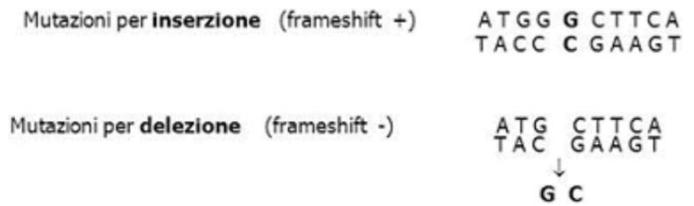
GLOBULI ROSSI FALCIFORMI



FRAMESHIFT: gli inserzione o delezione di una qualche coppia di basi.

L'**inserimento** di una base provoca lo slittamento nella lettura delle basi dal punto della mutazione in poi (mutazioni per scorrimento o slittamento di lettura) e quindi la formazione di una catena di aminoacidi completamente diversa.

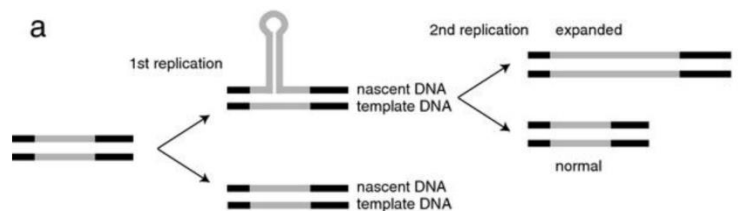
La **delezione** produce lo stesso effetto dell'inserzione.



ESPANSIONE DELLE RIPETIZIONI TRINUCLEOTIDICHE: dovute alla presenza di ripetizioni do trinucleotidi, quali CGG, CAG o GAA.

- Le espansioni delle ripetizioni trinucleotidiche possono adottare conformazioni e tripla elica e assumere strutture secondarie insolite che potrebbero interferire con i processi di replicazione e trascrizione.
- Questo tipo di mutazione è responsabile di diverse malattie genetiche tra cui la sindrome dell'X fragile, la malattia di Huntington, l'atassia di Friedreich e la distrofia miotonica.

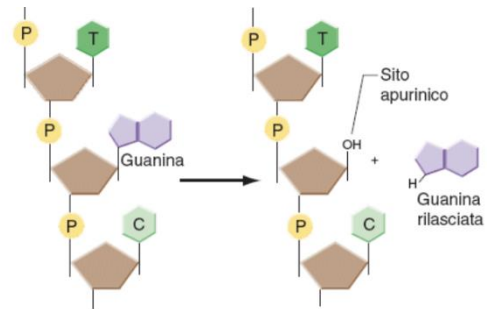
Alcune regioni sul DNA contengono numerose copie di triplette uguali disposte in serie. Il DNA di nuova sintesi contenente ripetizione trinucleotidiche si apre e poi si riappaia in modo scorretto con il filamento originale nella lezione nella regione ripetuta, causando un'ulteriore replicazione delle ripetizioni trinucleotidiche aggiuntive e la formazione di uno scivolamento intermedio. Dopo il secondo ciclo di replicazione, il DNA di nuova sintesi contiene ripetizioni aggiuntive su entrambi i filamenti.



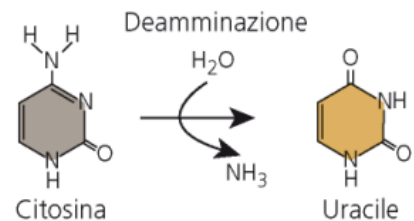
MUTAZIONI SPONTANEE

1. Errori di incorporazione di una base errata. L'aggiunta di un nucleotide errato può portare alla formazione di coppie di nucleotidi non correttamente appaiate (mismatch). Dovuti soprattutto ad **errori nel processo di replicazione**.
2. Le specie **reattive dell'ossigeno (ROS)**, possono danneggiare chimicamente le basi azotate. Si parla di danno ossidativo. Le basi danneggiate si appaiono in modo scorretto provocando delle **mutazioni puntiformi**. I radicali dell'ossigeno possono anche causare la **rottura dei filamenti del DNA**.

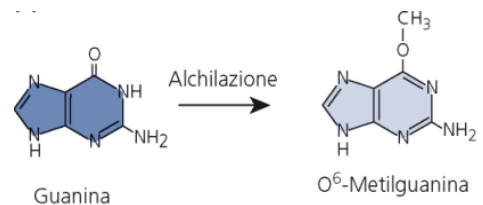
- **DEPURINAZIONE:** perdita spontanea di una Guanina o Adenina. Nella depurinazione, si spezza il legame tra la base azotata purinica e il deossiribosio e l'adenina o la guanina si stacca dal nucleotide. In corrispondenza di questo sito in cui manca la base purinica (sito apurinico) può essere inserita una base a caso.



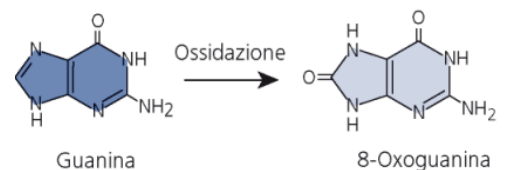
- **DEAMMINAZIONE:** consiste nella perdita spontanea di un gruppo amminico. La deamminazione della citosina trasforma la base in uracile e questo fa sì che durante la replicazione al posto della coppia di basi pirimidiniche venga inserita una coppia di basi puriniche.



- **ALCHILAZIONE:** per effetto di agenti alchilanti come le nitrosammine. O⁶-metilguanina si accoppia in modo sbagliato con T.



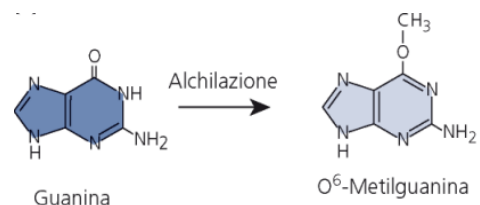
- **OSSIDAZIONE:** agenti ossidanti (radiazioni ionizzanti od agenti chimici che generano radicali liberi) \Rightarrow G diventa OxoG che si può accoppiare con A. 8-oxoguanina è altamente mutageno, porta ad una trasversione da G-C e T-A, una delle mutazioni più frequenti nei tumori umani.



DANNI INDOTTI DA AGENTI MUTAGENI

1. L'agente mutageno altera una base

Questa si appaia in modo sbagliato. Per esempio, gli **agenti alchilanti** (ad esempio le nitrosammine) aggiungono un gruppo chimico (gruppo alchilico) alle basi determinando appaiamenti errati durante la replicazione.



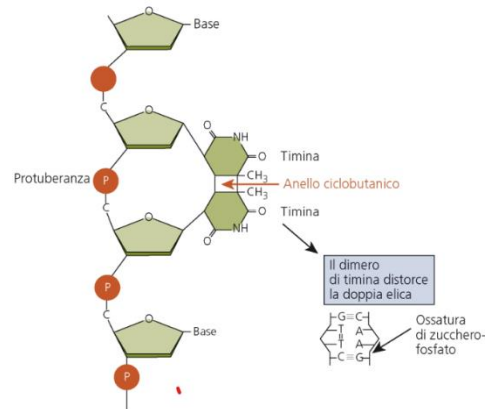
2. L'agente mutageno danneggia una base

Questa non è più in grado di appaiarsi con nessuna base. L'impossibilità di appaiare una base interrompe la replicazione.

Le radiazioni ionizzanti (raggi X) possono rompere il legame chimico tra la base azotata e il desossiribosio portando alla formazione di siti abasici (apurinici o apirimidinici), inoltre provocano la formazione di radicali liberi che danneggiano le basi (reazioni di ossidazione).

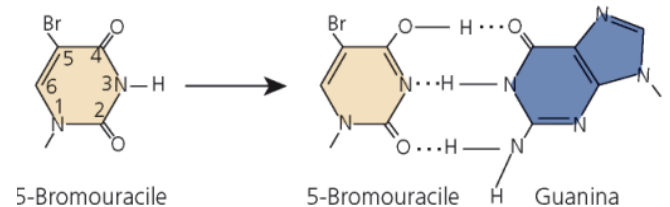
Il raggi ultravioletti (UV), una delle fonti più importanti danno al DNA, possono fare sì che due primidine poste una accanto all'altra sullo stesso filamento leghino tra loro (crosslink).

Le radiazioni UV inducono la formazione di un anello ciclobutanico tra timine adiacenti, creando così un dimero di timine che distorce la doppia elica di DNA e blocca la trascrizione o la replicazione dopo il sito danneggiato.



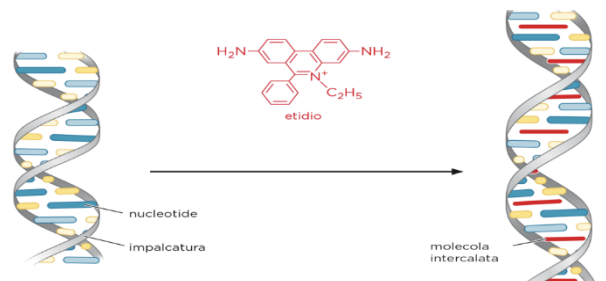
3. L'agente mutageno si sostituisce a una base

È ciò che avviene con composti chimici molto simili per struttura alle basi, gli analoghi delle basi. Gli analoghi incorporati nel DNA al posto delle basi normali si appaiono con nucleotidi sbagliati causando mutazioni.



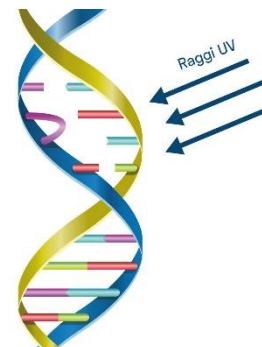
4. L'agente mutageno si intercala nel DNA

Gli agenti intercalanti hanno una struttura chimica che permette loro di inserirsi tra le coppie di base nella doppia elica del DNA. Ciò porta all'inserzione o alla delezione di una coppia di basi.



5. L'agente mutageno provoca la rottura del DNA

A seguito di questa rottura si possono verificare il riarrangiamenti cromosomici: delezione, inversione, traslocazione... Le radiazioni ionizzanti (raggi X) possiedono sufficiente energia per rompere il doppio filamento di DNA.



SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

Il primo livello di controllo dell'integrità del patrimonio genetico è esercitato dalla DNA polimerasi, l'enzima che duplica il DNA che è in grado di riconoscere, eliminare e sostituire nucleotidi inseriti in maniera errata. L'accuratezza della replicazione è critica per la riproduzione delle cellule e la frequenza di errori durante la replicazione corrisponde a 1 sola base sbagliata ogni 10^9 - 10^{10} nt.

ATTIVITA' DELLA DNA Pol:

1. Attività polimerasica 5'-3'
2. Attività esonucleasica 5'-3': opera nella direzione della sintesi del DNA e aiuta a **rimuovere i primer** di RNA dai frammenti di Okazaki
3. Attività esonucleasica 3'-5': opera nella direzione opposta alla sintesi del DNA e partecipa alla **correzione del DNA appena sintetizzato**.

In risposta ai danni al DNA vengono attivati dei meccanismi di sorveglianza geneticamente controllati, chiamati "checkpoint" che regolano diversi aspetti del metabolismo cellulare. Per esempio, la progressione del ciclo cellulare e la replicazione del DNA vengono inibite, mentre si ha una stimolazione dei meccanismi di riparazione e di ricombinazione del DNA ed, eventualmente, l'induzione del meccanismo di morte cellulare programmata o apoptosi.

1. Aggirano il danno
2. Invertono il danno
3. Sistemi di escissione
4. Ricombinazione

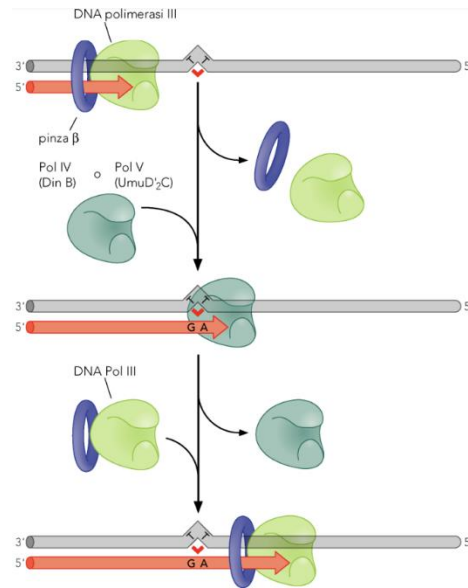
1. Aggiramento del danno:

- Lesioni quali i dimeri di timina, le sequenze ripetute o il DNA non B (forcine, strutture cruciformi e scivolote del DNA a tripla elica e G-quadruplex) rappresentano un problema per l'avanzamento della forcella di replicazione.
- Le cellule eucariotiche utilizzano DNA Pol ad alta fedeltà, che copiano lo stampo del DNA in modo accurato ma sono incapaci di aggirare le lesioni del DNA che creano distorsioni strutturali della doppia elica.
- In un processo noto come **Sintesi Translesione**, DNA Pol specializzate a bassa fedeltà sostituiscono transitoriamente le Pol replicative e continuano la copiatura del DNA oltre il punto danneggiato.

La sintesi translesione permette a una cellula di sopravvivere a quello che sarebbe un blocco della replicazione. E' un sistema di sicurezza, che entra in azione quando certe lesioni, che bloccherebbero la replicazione (come dimeri di T, siti apurinici, ecc...) non sono state corrette dagli altri sistemi di riparo. Ma allo stesso tempo si rischia di aumentare il danno e la frequenza delle mutazioni.

La forcella replicativa si blocca a livello della lesione (dimeri di T), la DNA Pol replicativa è sostituita da una delle Pol specializzate.

Una volta che la sintesi translesione ha aggirato il danno, le Pol si scambiano di nuovo e la replicazione ad alta fedeltà riprende.

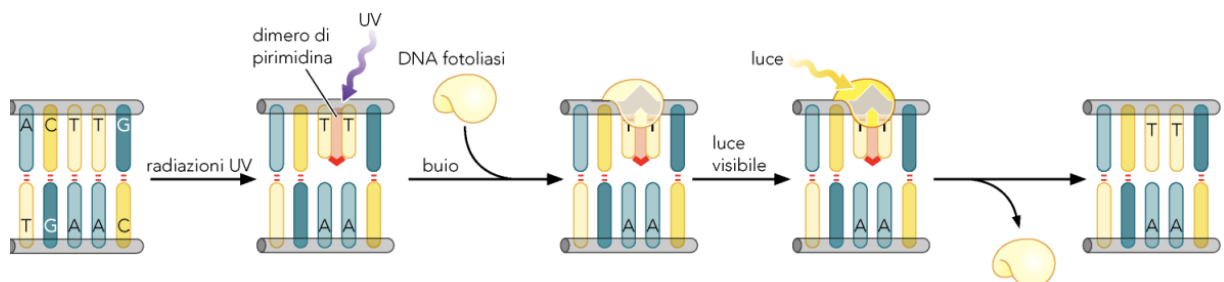


Sintesi translesione del DNA
E' un sistema di sicurezza, che entra in azione quando certe lesioni, che bloccherebbero la replicazione (come dimeri di T, siti apurinici, ecc.), non sono state corrette dagli altri sistemi di riparo. Sebbene poco accurato, permette alla cellula di portare a termine la replicazione del cromosoma. E' dovuto all'attività di particolari DNA Pol, appartenenti alla famiglia Y, in grado di sintetizzare DNA oltre il punto di lesione. In E.coli queste DNA Pol (Pol IV o Pol V) subentrano alla DNA Pol III nella sintesi, ma introducono basi a caso di fronte allo stampo. Alcune introducono basi corrette, ad es. 2 A di fronte ad un dimeri di T. Il sistema di sintesi translesione è l'ultima possibilità per la cellula di sopravvivere, anche se a caro prezzo (elevata probabilità di introduzione di mutazioni). I geni di queste DNA Pol appartengono alla così detta **riposta SOS**, che insorge quando la cellula risulta fortemente danneggiata.

2. Inversione o reversione diretta

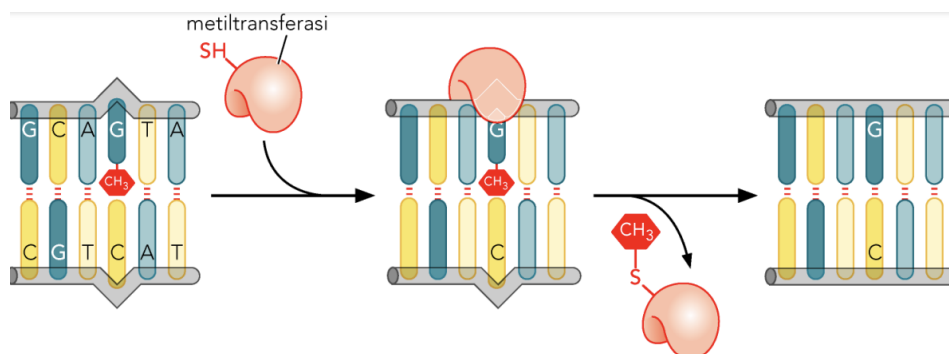
Il danno al DNA dovuto a radiazioni UV (che portano alla formazione di dimeri di pirimidina) può essere riparato direttamente mediante **fotoriattivazione** o "riparazione con la luce".

La **DNA fotoliasi** è attivata dalla luce e rompe i legami covalenti che uniscono le pirimidine.



Un esempio di riparo diretto: La fotoliasi batterica, attivata dalla luce UV-A separa direttamente i dimeri di pirimidine utilizzando il metilene-tetraidrofolato (MTHF) e il flavin-adenin-dinucleotide (FADH2) come cofattori.

La riparazione della base metilata O^6 -metilguanina è mediata dalla **DNA metiltransferasi**.



3. Riparazione per escissione

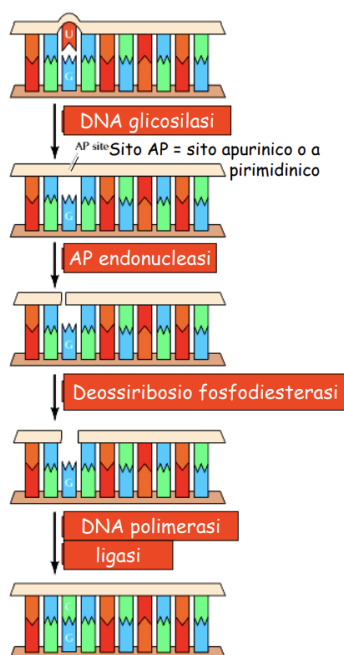
Il DNA danneggiato viene riconosciuto e rimosso, o per singole basi o per nucleotidi.

La regione a singolo filamento (gap) che viene a formarsi, è poi riempita mediante la sintesi di un nuovo filamento di DNA utilizzando il filamento complementare integro come stampo.

Abbiamo tre tipi di riparazione per escissione:

- a) Escissione di base (BER)
- b) Escissione di Nucleotidi (NER)
- c) Riparo di Accoppiamenti Scorretti (MMR)

a) Riparazione per escissione di una base (BER)



La base danneggiata viene riconosciuta e rimossa. L'escissione della base dal DNA è catalizzata dall'enzima **DNA glicosilasi**, un enzima che taglia il legame che unisce la base al deossiribosio dello scheletro di DNA. Questa reazione produce uracile libero e **un sito apirimidinico o un sito apurinico (AP)**.

Questi siti sono riparati da una **AP endonucleasi** che taglia su di un lato del sito AP.

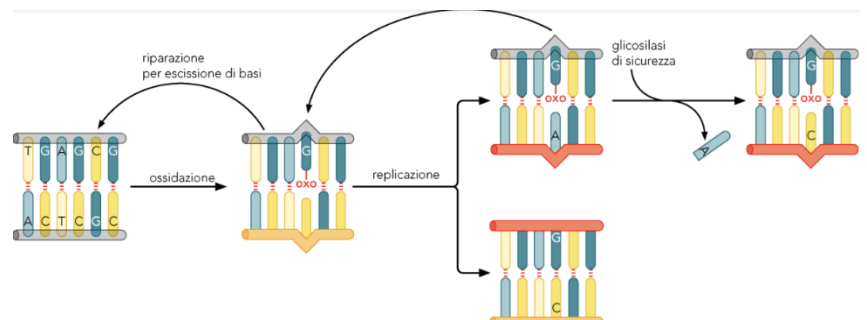
Il deossiribosio rimanente viene quindi rimosso.

L'interruzione di una base che ne deriva viene riempita dalla **DNA polimerasi** e dalla **ligasi**.

Le **DNA glicosilasi** sono enzimi che riconoscono lesioni specifiche, ad es. una riconosce l'U formato dalla deaminazione di C, un'altra la oxoG formata per ossidazione di G, ecc. Nei nuclei delle cellule di mammifero ne sono state identificate 8. Agiscono scorrendo lungo il genoma.

Riparo di oxoG: A

Una base danneggiata, che non viene rimossa prima della replicazione, non porta necessariamente a mutazione. Nel caso della oxoG esiste una glicosilasi di sicurezza, che riconosce il mismatch oxoG:A, elimina A, anche se questa è una base normale del DNA, e la sostituisce con C senza rimuovere il danno. Un'altra glicosilasi di sicurezza è quella che rimuove T dai mismatch G:T, derivanti dalla deaminazione di 5Me-C, assumendo "per default" che T sia la base sbagliata.

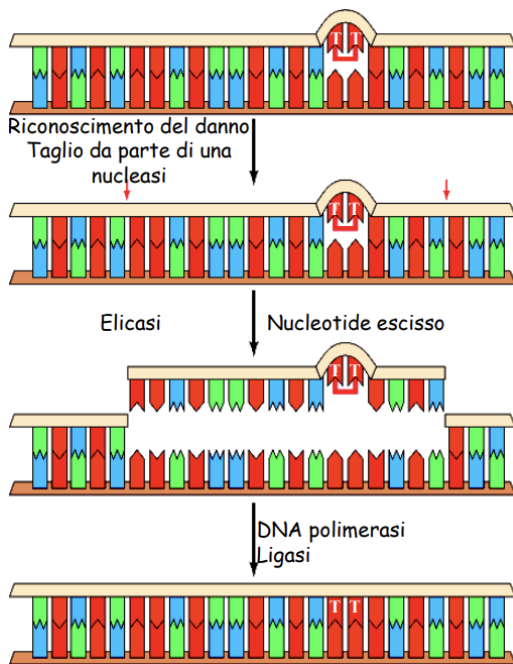


DNA Base Flipping:

Meccanismo secondo cui tipi di enzimi agiscono girando la base fuori dalla doppia elica dove può essere eliminata o modificata e riportata nella alfa elica.

- L'uracile e le basi alchilate sono riconosciute dalle glicosilasi e tolte direttamente dal DNA
- I dimeri delle pirimidine sono tolti rompendo i legami covalenti tra di loro
- Le metilasi aggiungono un gruppo metile alle citosine

b) Riparazione per Escissione di nucleotidi (NER)



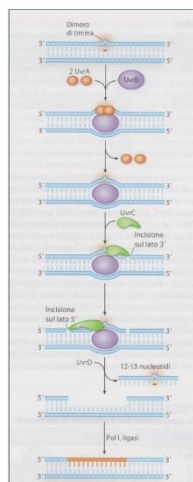
Le basi danneggiate vengono rimosse come parte di un oligonucleotide che contiene una lesione.

In E.coli questa riparazione è catalizzata dai prodotti di 3 geni: **uvrA, B e C**:

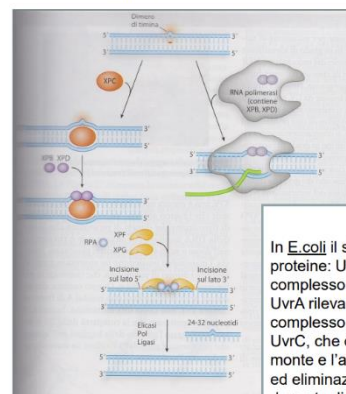
- **uvrA** riconosce DNA danneggiato
- recluta **uvrB** e **uvrC** sul sito della lesione
- **UvrB** e **uvrC** tagliano rispettivamente sui lati 3' e 5' del sito danneggiato, rimuovendo così un oligonucleotide che consiste di 12- 13 basi
- Una elicasi rimuove l'oligonucleotide che contiene il danno.
- L'interruzione del filamento viene riempita dalla DNA polimerasi e sigillata dalla ligasi.
- Il complesso UvrABC viene spesso chiamato escinucleasi.

Gli enzimi di questo sistema di riparo non riconoscono le lesioni come tali, ma le conseguenti distorsioni della doppia elica, con rimozione di un corto segmento di DNA a cavallo della lesione.

Procarioti



Eucarioti



In **E.coli** il sistema è composto da 4 proteine: UvrA, UvrB, UvrC, UvrD. Il complesso AB scorre lungo il DNA, finché UvrA rileva un danno, poi lascia il complesso, UvrB apre il DNA e recluta UvrC, che crea 2 incisioni, una 8 basi a monte e l'altra 4-5 basi a valle della lesione, ed eliminazione del frammento di 12-13 basi da parte di UvrD (elicasi). Infine DNA Pol + ligasi riempiono il buco. Negli eucarioti il macchinario è molto più complesso (oltre 25 proteine) ma il meccanismo è simile.

XERODERMA PIGMENTOSO: mutazione di uno dei geni XP implicati nel sistema NER

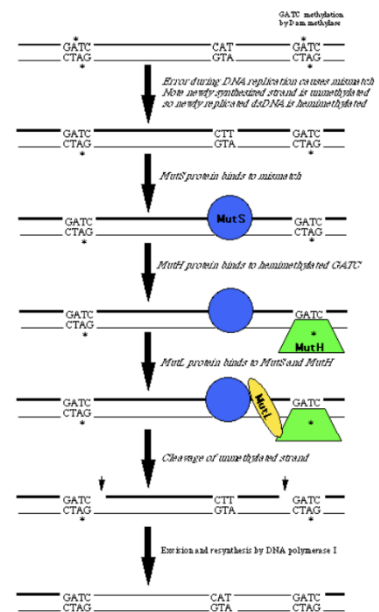
- Rara malattia a trasmissione autosomica recessiva (1 persona ogni 250.000);
- Caratterizzata da una sensibilità estrema alla luce UV (e alcune luci artificiali) e da un aumentato rischio di sviluppare tumori della pelle (>1000 volte);
- La diagnosi precoce e la prevenzione sono alla base del trattamento;
- Applicazione topica **dell'endonucleasi V** incapsulata in liposomi.

c) Riparazione di Appaiamenti Scorretti: MisMtcH Repair (MMR)

Fondamentale per riconoscere gli errori nella replicazione sfuggiti alla DNA Pol, (errori commessi dalle Pol e non riparati con il proof-reading), o che sono indotti da ricombinazione, deaminazione o altre forme di danno che generano appaiamenti non corretti (può riparare anche alcuni slittamenti). Grazie a questo processo la frequenza di errori per appaiamento scorretto delle basi si riduce di 100 volte.

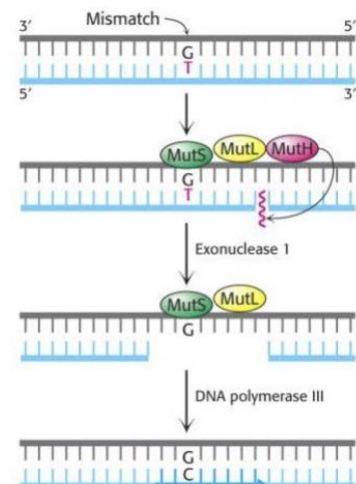
MisMtcH Repair in E.Coli

- Il DNA viene analizzato da MutS (un dimero);
- MutS recluta MutL, che si lega alla base male appaiata, e recluta MutH, che taglia il filamento non modificato;
- MutS e MutL insieme con un'elicasi ed un'endonucleasi rimuovono quindi la porzione del filamento non modificato che contiene la base male appaiata.
- L'interruzione viene poi riempita dalla DNA Polimerasi e saldata dalla Ligasi.



MisMtcH Repair negli eucarioti

- Gli eucarioti hanno omologhi di MutS, con più specificità;
- Non hanno la Dam Metilasi, riconoscono il filamento stampo dalle incisioni dei frammenti di Okazaki;
- Mutazioni ereditarie dei geni predispongono ai tumori



CANCRO COLORETTALE EREDITARIO: difetto della riparazione delle basi appaiate male. Dovuto a mutazioni in uno dei diversi geni dell'MMR

- L'80% dei cancri del colon è sporadico, mentre un 20% ha una suscettibilità ereditaria alla malattia;
- Il cancro colon-rettale non associato a poliposi (HPNCC) è la forma ereditaria più comune del cancro colo rettale;
- Il 3-5% di tutte le neoplasie maligne colorettali (colpisce 1 persona su 200);
- Caratterizzato dalla presenza di pochi polipi, insorgenza precoce (prima di 45 anni);
- L'anamnesi familiare e i test genici consentono di individuare le persone a rischio, che vengono così monitorate attraverso colonscopie e sottoposte a chirurgia profilattica.

La sindrome di Lynch si manifesta nelle famiglie con un modello di ereditarietà autosomica dominante. Questo significa che, se un genitore è portatore di una mutazione genetica per la sindrome di Lynch, c'è una probabilità del 50% che la mutazione venga trasmessa al figlio.

La mutazione di un gene riparativo causa l'accumulo di mutazioni in altri geni fino a determinare (come accade in molte cellule tumorali) l'insorgenza di aberrazioni cromosomiche.

Con opportune sonde è possibile colorare in modo differenziale le diverse coppie di cromosomi di una cellula diploide umana normale di sesso maschile, ottenendone il cariotipo. I cromosomi di cellule tumorali hanno un numero alterato di cromosomi e numerosi riarrangiamenti evidenziati dai diversi colori sullo stesso cromosoma.

Possiamo dire quindi che **mutazioni di un gene coinvolto delle riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.**