**MUTAZIONI GENICHE O PUNTIFORMI**

Le mutazioni genetiche possono essere classificate in base alla loro natura e alle conseguenze che hanno sul codice genetico, le due principali categorie di mutazioni riguardano le **transizioni e le transversioni**.Immagine che contiene testo, schermata, linea, Carattere

Descrizione generata automaticamenteImmagine che contiene testo, schermata, linea, Carattere

Descrizione generata automaticamente

Le mutazioni per transizione si verificano quando avviene un cambiamento di una coppia di basi purina (adenina o guanina) con un'altra coppia di basi purina, o di basi pirimidina (citosina o timina) con un'altra coppia di basi pirimidina. Ad esempio, una transizione può avvenire quando la sequenza AT diventa GC o viceversa, o quando TA diventa CG o viceversa.

Le mutazioni per transversione si verificano quando avviene un cambiamento di una coppia di basi purina con una coppia di basi pirimidina, o viceversa. Ad esempio, una transversione può avvenire quando AT diventa TA o GC, o quando GC diventa CG o TA.

Queste mutazioni possono influenzare la sequenza di amminoacidi codificati. Una mutazione silente si verifica quando il cambiamento nucleotidico non ha alcun effetto sulla proteina, in quanto l'amminoacido codificato rimane lo stesso. Immagine che contiene testo, Carattere, schermata

Descrizione generata automaticamente

D'altra parte, una mutazione missenso compor

ta un cambiamento nel nucleotide, che a sua volta modifica l'amminoacido codificato.

Ad esempio, AAA può diventare AGA, causando una transizione da lisina a arginina.

È importante notare che alcune mutazioni missenso possono essere considerate neutrali, il che significa che non hanno un impatto significativo sulla funzione della proteina. Questo può accadere quando il nuovo amminoacido è biochimicamente simile o affine a quello di partenza, e quindi non si verificano alterazioni rilevanti a livello molecolare o biologico. Queste mutazioni sono spesso considerate benigni o privi di significato clinico.

Quindi ricapitolando, le mutazioni genetiche possono essere classificate in base al tipo di cambiamento nucleotidico (transizione o transversione) e alle conseguenze che hanno sulla sequenza di amminoacidi codificati (silente, missenso o neutro). Queste mutazioni contribuiscono alla diversità genetica e possono avere un impatto sulla struttura e sulla funzione delle proteine

* **MUTAZIONI SILENTI**

Le mutazioni silenti, anche conosciute come mutazioni sinonime, si verificano nelle regioni non tradotte del DNA e possono coinvolgere sia i siti di montaggio (splicing) che quelli di regolazione dell'espressione genica (come il TATA BOX o il POLI A). Sebbene queste mutazioni non alterino direttamente la sequenza degli amminoacidi nelle proteine, possono avere effetti sull'attività di trascrizione e sulla quantità di trascritti di RNA.

Di solito, si ritiene che le mutazioni silenti non abbiano alcun effetto sulla funzione delle proteine, ma in realtà possono influenzare il legame del fattore di trascrizione al DNA e quindi influenzare l'espressione genica e la produzione di proteine. Pertanto, sebbene non alterino la sequenza degli amminoacidi, possono avere un impatto sul livello di RNA e sulla quantità di proteine prodotte.

Esistono anche le mutazioni sinonime chiamate "variazioni nonsense" (differenti dalle mutazioni non senso). Queste mutazioni sembrano silenti, ma in realtà sono deleterie in quanto influenzano l'espressione genica e la produzione di proteine senza introdurre un codone di stop nella sequenza codificante dell'mRNA.

Le mutazioni silenti o sinonime possono influenzare l'espressione genica a livello di trascrizione e produzione di proteine, anche se non modificano direttamente la sequenza degli amminoacidi. Le variazioni nonsense, d'altra parte, sono mutazioni sinonime che possono avere effetti deleteri sull'espressione genica e sulla produzione di proteine senza generare un codone di stop.

* **MUTAZIONE MISSENSO**

Le mutazioni missenso sono mutazioni puntiformi che causano la sostituzione di un singolo nucleotide nella sequenza del DNA, portando alla formazione di una tripletta diversa che codifica per un amminoacido differente. Questo tipo di mutazione può avere un impatto significativo sulla sequenza degli amminoacidi nella proteina risultante.

Ad esempio, se una tripletta CCU viene mutata in GCU, l'amminoacido prolina viene sostituito con alanina. La lunghezza della proteina rimane la stessa, ma la sequenza degli amminoacidi sarà alterata da questa sostituzione.

Un esempio pratico di una mutazione missenso è l'anemia falciforme, che è una malattia genetica autosomica recessiva. In questa condizione, il sesto amminoacido nella catena beta dell'emoglobina viene sostituito dalla valina anziché dall'acido glutammico. Questa mutazione causa una maggiore insolubilità dell'emoglobina, che tende a cristallizzare e conferisce agli eritrociti una forma a falce anziché una forma discoidale normale. Ciò porta a problemi di circolazione degli eritrociti nel corpo. È importante notare che l'anemia falciforme non causa una minore affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, ma piuttosto altera la forma degli eritrociti che possono causare problemi di circolazione. Questa condizione è diffusa in Africa, dove circa una persona su dodici è eterozigote per la mutazione, e gli eterozigoti sono resistenti al Plasmodium malariae, il parassita responsabile della malaria.

* **MUTAZIONI NON - SENSO**: sono più gravi in quando si viene a formare un CODONE DI STOP, e questo determina il troncamento della proteina; quindi, è presente una proteina più corta del normale. Sono deleterie in quanto provocano un’alterazione della funzione della proteina.Immagine che contiene testo, schermata, Carattere, linea

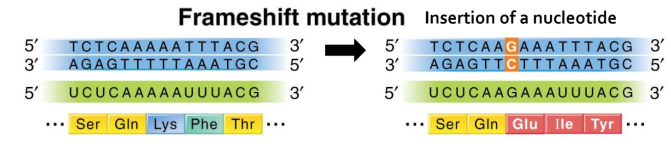
  Descrizione generata automaticamente

Esempio pratico: AAG che diventa UAG (si passa da lisina a codone di stop).

* **MUTAZIONE FRAME- SHIFT**:

Le mutazioni frameshift sono causate da delezioni o inserzioni di una o più basi nel DNA, che provocano uno spostamento del "frame" di lettura durante la traduzione dell'mRNA. La delezione comporta la rimozione di una base, mentre l'inserzione implica l'aggiunta di una base nel sequenza di DNA.

Le mutazioni frameshift sono chiamate così perché causano uno slittamento della finestra di lettura dei codoni durante la traduzione dell'mRNA. Questo significa che l'aggiunta o la rimozione di una base azotata (o di due nucleotidi, ma non di tre, poiché una tripletta corrisponde a un codone) determina un cambiamento nella sequenza degli amminoacidi nella proteina risultante. La proteina avrà quindi la stessa lunghezza, ma la sequenza degli amminoacidi sarà alterata a partire dal punto della mutazione. In alcuni casi, potrebbe anche essere creato un codone di stop prematuro.Immagine che contiene schermata, linea, testo, diagramma

Descrizione generata automaticamente

Queste mutazioni non solo influenzano la sequenza della proteina codificata, ma possono anche alterare lo splicing dell'mRNA. Possono causare l'attivazione di siti criptici di splicing, che normalmente non sono riconosciuti, ma che a seguito della mutazione vengono creati e attivati come siti di splicing. Ciò può portare al mantenimento di introni o alla rimozione di esoni nella trascrizione dell'mRNA.Immagine che contiene testo, diagramma, schermata, linea

Descrizione generata automaticamente

Quindi: le mutazioni frameshift sono causate da delezioni o inserzioni di basi nel DNA, che provocano uno slittamento del frame di lettura durante la traduzione dell'mRNA. Questo porta a cambiamenti nella sequenza degli amminoacidi della proteina e può influenzare anche il processo di splicing dell'mRNA.

* **MUTAZIONI DINAMICHE**

Le mutazioni frameshift sono coinvolte in varie malattie genetiche, tra cui la corea di Huntington. Queste mutazioni sono caratterizzate da espansioni ripetute di tratti di DNA, che possono verificarsi sia nelle regioni codificanti che nelle regioni non codificanti del genoma.

Nel caso delle malattie da triplette di tipo 1, le mutazioni frameshift si verificano nelle regioni codificanti e sono associate a malattie come l'atrofia muscolare bulbare e la corea di Huntington. Queste mutazioni coinvolgono l'espansione ripetuta di tratti di poliglutammina (CAG) nelle regioni codificanti dei geni. Ciò porta alla formazione di sequenze poliglutamminiche allungate, che sono correlate a malattie neurodegenerative, in particolare a livello del sistema nervoso.

Nel caso delle malattie da triplette di tipo 2, le mutazioni frameshift si verificano nelle regioni non codificanti del genoma. Esempi di queste malattie includono la sindrome dell'X fragile e la distrofia miotonica. In queste condizioni, le espansioni ripetute di sequenze non codificanti, come le sequenze GCN (polialanina), sono associate a disfunzioni genetiche.

Nelle parti non codificanti del genoma, le mutazioni frameshift possono avere un impatto ancora più significativo, poiché le espansioni ripetute possono essere molto più grandi. Queste mutazioni possono interessare la parte 5' non tradotta del gene, il promotore o la parte 3' non tradotta. Possono essere coinvolte in diverse patologie, come alcune forme di atassia.

*(NB. Le malattie da triplette di tipo 1 e 2 sono malattie genetiche causate dall'espansione di sequenze di triplette ripetute all'interno dei geni. Le malattie da triplette di tipo 1 si verificano quando le espansioni ripetute si trovano nelle regioni codificanti del gene, come nel caso della corea di Huntington. Le malattie da triplette di tipo 2 si verificano quando le espansioni ripetute si trovano nelle regioni non codificanti del gene, come nel caso della distrofia miotonica. Queste espansioni di triplette causano disfunzioni cellulari e portano a sintomi clinici caratteristici associati a ciascuna malattia)*

* **MUTAZIONI EPIGENETICHE**

Oltre alla sequenza del DNA, anche l'ambiente in cui viviamo gioca un ruolo importante nell'influenzare le variazioni del DNA attraverso meccanismi epigenetici. Le modificazioni epigenetiche si riferiscono a cambiamenti chimici che avvengono sul DNA stesso o sulle proteine chiamate istoni che avvolgono il DNA. Questi cambiamenti includono la metilazione del DNA e la modificazione delle code istoniche tramite metilazione o acetilazione.

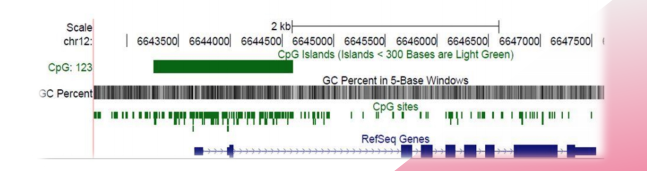
Esistono molecole chiamate "players" che agiscono come scrittori, cancellatori e lettori epigenetici. Gli scrittori, come le metilasi, aggiungono gruppi metilici al DNA, i cancellatori, come le demetilasi, rimuovono i gruppi metilici, mentre i lettori riconoscono e leggono le modifiche epigenetiche. Questi players permettono di regolare l'espressione genica influenzando l'accessibilità del DNA alla macchinaria di trascrizione.

La metilazione del DNA, ad esempio, crea un ingombro che impedisce al complesso di trascrizione di legarsi e attivare il processo di trascrizione. Di conseguenza, la metilazione del DNA è generalmente associata alla repressione dell'espressione genica. Tuttavia, va notato che la metilazione del DNA insieme ad altre modifiche epigenetiche, come l'acetilazione degli istoni e i cambiamenti nella struttura della cromatina, può anche avvenire sulle code istoniche. La metilazione delle code istoniche non è sempre associata alla repressione trascrizionale, ma esiste un "codice istonico" in cui diverse modifiche possono interagire in modi complessi per regolare l'espressione genica.

In generale, i meccanismi epigenetici, compresi la metilazione del DNA e le modifiche istoniche, sono fondamentali per il controllo dell'espressione genica e giocano un ruolo cruciale nel determinare il destino delle cellule e nel modulare la risposta ai fattori ambientali.

La metilazione del DNA è il fenomeno più studiato. Avviene in siti specifici che definiscono le CpG ISLANDS.

**CpG ISLANDS**

L'acronimo CpG si riferisce al legame fosfodiesterico tra una citosina (C) e una guanina (G) che sono posizionate una accanto all'altra nella sequenza del DNA. La metilazione del DNA si verifica principalmente in questi siti CpG.

Le isole CpG sono regioni del DNA che presentano una densità elevata di siti CpG. Nella definizione canonica, un'isola CpG è considerata una regione di almeno 200 paia di basi con una percentuale di contenuto GC superiore al 50% e con un rapporto di CpG osservate e attese superiore al 60%. Queste isole CpG sono spesso associate alla regolazione dell'espressione genica.

Nell'immagine fornita, si può osservare come i geni sono rappresentati nel genome browser. Gli esoni, che sono le regioni codificanti dei geni, sono mostrati in blu. La direzione dell'orientamento del gene è indicata dalla freccia, poiché alcuni trascritti possono essere trascritti anche in direzione inversa rispetto alla sequenza del DNA.

**Distribuzione della metilazione del DNA nel nostro genoma**

* II 70-80% delle citosine dei dinucleotidi sono metilati nella maggior parte dei tessuti.Immagine che contiene testo, Carattere, schermata, algebra

  Descrizione generata automaticamente
* In genere i geni tessuto specifici non espressi sono metilati mentre gli stessi geni sono demetilati nei tessuti in cui vengono espressi.
* Molti geni sono preceduti da CpG islands che in genere rimangono demetilate.

I geni sono tutti uguali, ma poi la tessuto – specificità è regolata a livello epigenetico.

La metilazione del DNA si ritrova principalmente nelle regioni intergeniche e nelle sequenze ripetute, nei trasposoni e negli elementi LINE e SINE; nelle regioni promotrici invece le CPG non sono metilate e quindi vengono trascritte. Questo è importantissimo perché le zone che potrebbero essere deleterie vengono metilate. Se cambia lo stato di metilazione si ha una patologia.

**La metilazione come protezione dell’integrità del genoma**

La metilazione del DNA svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità e della regolazione dell'espressione genica. La mancanza di metilazione può consentire agli elementi trasponibili, come i retrovirus endogeni, di causare danni al DNA. Inoltre, la metilazione del DNA è coinvolta nella formazione dello zigote durante la fecondazione.

Durante la gametogenesi, sia lo spermatozoo che l'ovocita portano una specifica firma di metilazione derivata dai genitori, che viene successivamente cancellata quando si forma lo zigote. Dopo la formazione dello zigote, avviene un processo di riduzione della metilazione, che successivamente viene riattivata durante lo sviluppo embrionale.

La metilazione del DNA non è un processo statico, ma dinamico e regolato durante lo sviluppo e l'adattamento dell'organismo.

Perturbazioni nell'assetto di metilazione possono portare a diverse patologie, agendo in tre modalità principali:

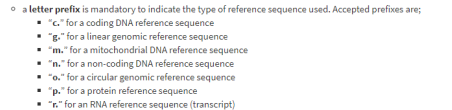
1. Danni al DNA che possono indurre tumori e malattie ereditarie.
2. Errato silenziamento dell'espressione genica, causando sindromi genetiche diverse dal cancro, come la sindrome di Rett e la sindrome di immunodeficienza, centromero instabile e facies caratteristiche (ICF).
3. Silenziamento scorretto di geni specifici che può contribuire allo sviluppo del cancro.

L'equilibrio e l'integrità del profilo di metilazione del nostro genoma sono fondamentali per il corretto funzionamento dell'organismo. Pertanto, le alterazioni della metilazione del DNA possono causare una serie di problematiche e patologie.

**RUOLI DELLA METILAZIONE**

* Controlla l’inattivazione del cromosoma X;
* Controlla l’espressione di geni soggetti ad imprinting;
* Reprime la trascrizione di elementi ripetitivi e l’attivazione di elementi trasponibili;
* Reprime l’espressione di molti promotori.

**NOMENCLATURA DI UNA MUTAZIONE**

La nomenclatura utilizzata dalla Human Genome Variation Society (HGVS) fornisce un protocollo standard per descrivere le mutazioni che si trovano nel genoma, nel cDNA e in altri contesti. Ad esempio, se una mutazione si verifica nel genoma, viene indicata con "g" seguito dalla descrizione della variazione.

Nella nomenclatura a sinistra, l'indicazione "A>G" significa che in quella specifica posizione si è verificato un cambiamento della base da adenina (A) a guanina (G). Questa indicazione si riferisce alla variazione del DNA e non fa riferimento all'RNA o alla proteina.

Nella nomenclatura a destra, invece, viene specificato che quella regione del DNA codifica per una specifica proteina, e nella posizione indicata si è verificato un cambiamento da adenina (A) a guanina (G). Questa notazione tiene conto dell'effetto del cambiamento sulla sequenza proteica.

La nomenclatura HGVS fornisce un modo standardizzato e preciso per descrivere le mutazioni genetiche, consentendo una comunicazione chiara e uniforme tra i ricercatori e gli esperti nel campo della genetica

Immagine che contiene testo, Carattere, schermata, linea

Descrizione generata automaticamente

ES. c.859 +12T>C significa che dopo 12 nucleotidi dall’ultimo nucleotide dell’esone ho un cambio di una T con una C. Poiché questo è un nucleotide a valle dell’ultimo esone, la mutazione sarà in un introne (5’). In questo caso ho una relazione con l’RNA e la proteina.

**NUMERAZIONE DEI NUCLEOTIDI**

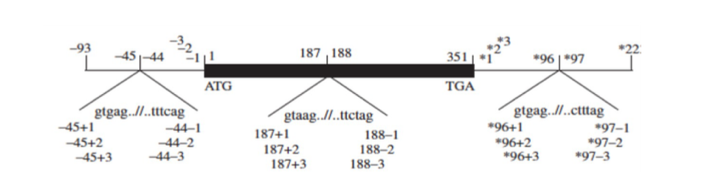
* Il nucleotide + 1 è la A dell’ATG codone di inizio della traduzione.
* Il nucleotide che precede al 5’ l’ATG – codone di inizio della traduzione è denominato – 1; non esiste una base 0.
* Il nucleotide che segue al 3’ il codone di terminazione è denominato \*1. Questo indica il primo codone a valle dello stop.

Immagine che contiene diagramma, testo, linea, Disegno tecnico

Descrizione generata automaticamente

Quando parliamo di sequenza genomica parliamo sia di esoni che di introni.

Se io prendo una parte codificante faccio riferimento ai soli esoni.

Se prendo in considerazione una parte non codificante faccio riferimento agli introni.

Per quanto riguarda la nomenclatura si affronterà meglio nella parte di tirocinio.

L**\*** indica un codone di stop; il segno > indica la sostituzione di un nucleotide.

**TIPI DI VARIAZIONI GENETICHE: NOMENCLATURA**

* **semplici**
* Sostituzione: c.123A>G
* Delezione c.123delA
* Duplicazione c.123dupA
* Inserzione c.123\_124insC
* **complesse**
* indel c.123delinsGTAT
* **Combinazione di varianti**
* due alleli: c.[123A>G];[456C>T]
* per allele c.[123A>G;456C>T]

**Esempio: sostituzioni**

• le sostituzioni sono indicate dal carattere "›". Ad esempio, 76A>C indica che in posizione 76 un'adenina è sostituita da una citosina;

• 88+1G>T (oppure IVS2+1G>T) indica che una guanina è sostituita da una timina in posizione +1 dell'introne 2, posizionato tra i nucleotidi 88 e 89 del cDNA;

• 89-2A>C (oppure IVS2-2A>C) indica che un'adenina è sostituita da una citosina in posizione -2 dell'introne 2, posizionato tra i nucleotidi 88 e 89 del cDNA;

Bisogna sempre indicare il genoma a cui si fa riferimento in quanto quest’ultimo può essere aggiornato.

**EFFETTO DELLE MUTAZIONI GENICHE**

Le mutazioni genetiche possono essere associate a due tipi principali di alterazioni funzionali: guadagno di funzione (Gain of Function - GOF) e perdita di funzione (Loss of Function - LOF). In alcuni casi, può verificarsi anche un'espressione ectopica, in cui un gene viene attivato in un momento o in un luogo non appropriato, come ad esempio nei tumori.

Le malattie a perdita di funzione (LOF) sono generalmente di tipo recessivo, il che significa che è necessaria la presenza di due copie mutate del gene per manifestare la malattia. In queste condizioni, si ha una mancanza o una diminuzione della funzione del prodotto genico.

Le malattie a guadagno di funzione (GOF), invece, sono di tipo dominante, il che significa che la presenza di una sola copia mutata del gene è sufficiente per causare la malattia. In queste condizioni, la mutazione può aumentare la normale funzione della proteina o conferire una nuova caratteristica.

La distinzione tra LOF e GOF non è sempre semplice, ma di solito la LOF indica una mancanza o una diminuzione del prodotto genico, mentre la GOF implica un aumento o una modifica della funzione della proteina.

Le malattie causate da guadagno di funzione sono spesso caratterizzate da una certa omogeneità molecolare, nel senso che tutti i pazienti presentano la stessa mutazione. Un esempio di guadagno di funzione è rappresentato dall'acondroplasia, una forma di nanismo in cui la mutazione causa un aumento della capacità della proteina di svolgere la sua funzione normale.

Le mutazioni genetiche possono influenzare la quantità di espressione di un gene (mutazione quantitativa), la capacità della proteina di svolgere la sua funzione normale (mutazione qualitativa) o addirittura conferire una nuova funzione o proprietà alla proteina (mutazione qualitativa).

**La distinzione tra LOF e GOF non sempre è ben distinta**

In generale, LOF vuol dire che la mutazione dà una minore quantità del prodotto proteico o che

la funzione del prodotto proteico è compromessa

In genere sono recessive e la copia dell’allele normale è sufficiente, ma ci sono 2 eccezioni:

* La copia dell’allele normale non è sufficiente (Aploinsufficienza quando l’allele normale non compensa più la parte malata),
* L’allele mutato interferisce negativamente sulla funzione dell’allele normale

(Effetto dominante negativo)

QUANDO AVVIENE UNA MUTAZIONE PATOGENA

* il prodotto non c'è o è inattivo e per la sua funzione il 50% è sufficiente: fenotipo recessivo
* il prodotto non c'è o è inattivo e per la sua funzione il 50% non è sufficiente: aploinsufficienza, fenotipo dominante
* ll prodotto è strutturalmente alterato e interagisce con il prodotto non mutato: effetto dominante negativo

**FIBROSI CISTICA**

Esempio di patologia dove c’è LOF e dove la severità della malattia dipende dalla funzione proteica persa.

**IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE**

Esempio di patologia in cui il meccanismo d’azione è l’aploinsufficienza tant’è che anche l’eterozigote è affetta in maniera mai meno severa dell’omozigote.

**SINDROME DI MARFAN**

Esempio di sindrome dominante negativa, è causata dalla mutazione del gene FBN 1. Viene danneggiata la struttura della fibrillina che si assembla in modo scorretto.

**MUTAZIONI DINAMICHE**

* PROTEIN LOSS-OF-FUNCTION: non c’è prodotto genico o è insufficiente
* PROTEIN GAIN-OF-FUNCTION: prodotto proteico alterato, acquisto di nuove funzioni ed interazioni proteiche; formazione di aggregati che producono danno cellulare (es. Malattia di Hungtington)
* RNA GAIN-OF-FUNCTION: l’espansione in tratto non codificante produce mRNA non tradotto che risulta dannoso per la cellula;

Diverse sono le patologie correlate a queste mutazioni.

**SINDROME DEL CROMOSOMA X FRAGILE**

Si ha un ritardo mentale associato al cromosoma X; colpisce più i maschi rispetto alle femmine.

La mutazione è collocata in Xq27.3; questa patologia è dovuta ad una grossa espansione nell’estremità 5’ non tradotta del gene che viene metilata, ossia viene impedita la trascrizione. Si ha una LOF.

**COREA DI HUNGTINGTON (GOF)**

È una malattia causata da un’acquisizione di funzione di una proteina. Si ha una mutazione nel gene Hungtintina (IT15: Chr 4). Ancora non si conosce la patogenesi.

**DISTROFIA MIOTONICA DI TIPO 1 (RNA GAIN OF FUNCTION)**

È una patologia dovuta a GOF. Si ha la formazione di un RNA messaggero espanso, tossico che forma delle strutture a forcina che sequestrano RNA – binding proteins che regolano lo splicing di altri trascritti.

Sono stati proposti tre meccanismi patologici non mutualmente esclusivi:

* aploinsufficienza con conseguente riduzione dei livelli della proteina C9orf72 che contribuiscono alla patogenesi;
* Formazione di focolai di RNA che sequestrano specifiche proteine che legano l'RNA e ne compromettono la normale funzione;
* la traduzione associata alla ripetizione non avviata da AUG (RAN) di ripetizioni di RNA in proteine ripetute dipeptidi tossiche (DPR);