

VARIABILITÀ DEL GENOTIPO (sequenza del DNA genomico) → diversità fenotipica negli individui



MUTAZIONI e RICOMBINAZIONI

Replicazione semiconservativa → assicura una trasmissione fedele dell'informazione genetica

Nel corso della **replicazione del DNA** possono essere commessi degli errori. Gli errori, di solito vengono riconosciuti e corretti dall'**attività di proofreading** delle DNA polimerasi (correzione di bozze).

Errori che sfuggono ai sistemi di riparazione possono dare origine a **mutazioni (cambiamenti improvvisi ereditabili nel DNA)**.

Fenotipo mutante

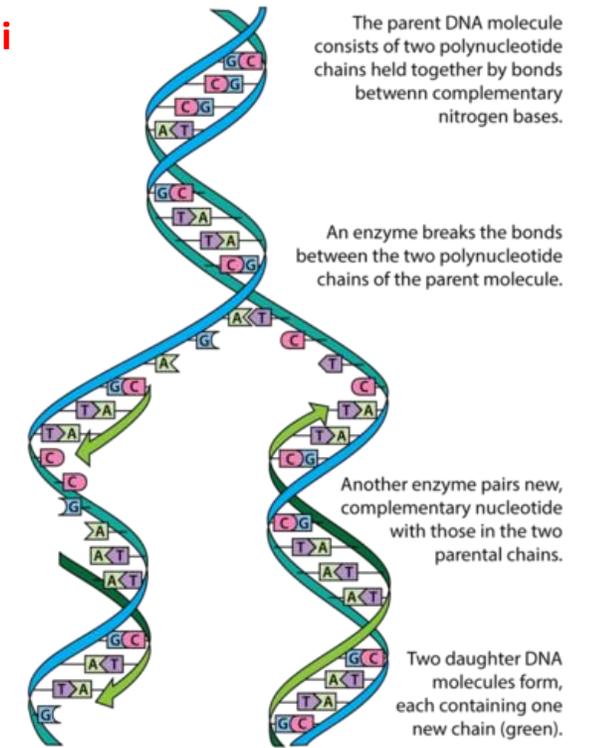
Mutazione

Cambiamento genotipico, o anche fenotipico, derivante da una alterazione del DNA genomico (formazione di nuovi alleli).

Ricombinazione

Nuova combinazione di varianti geniche già esistenti (alleli). Gli alleli derivanti dalle mutazioni rappresentano il materiale grezzo per generare nuove combinazioni (ulteriore variabilità) mediante processi di ricombinazione.

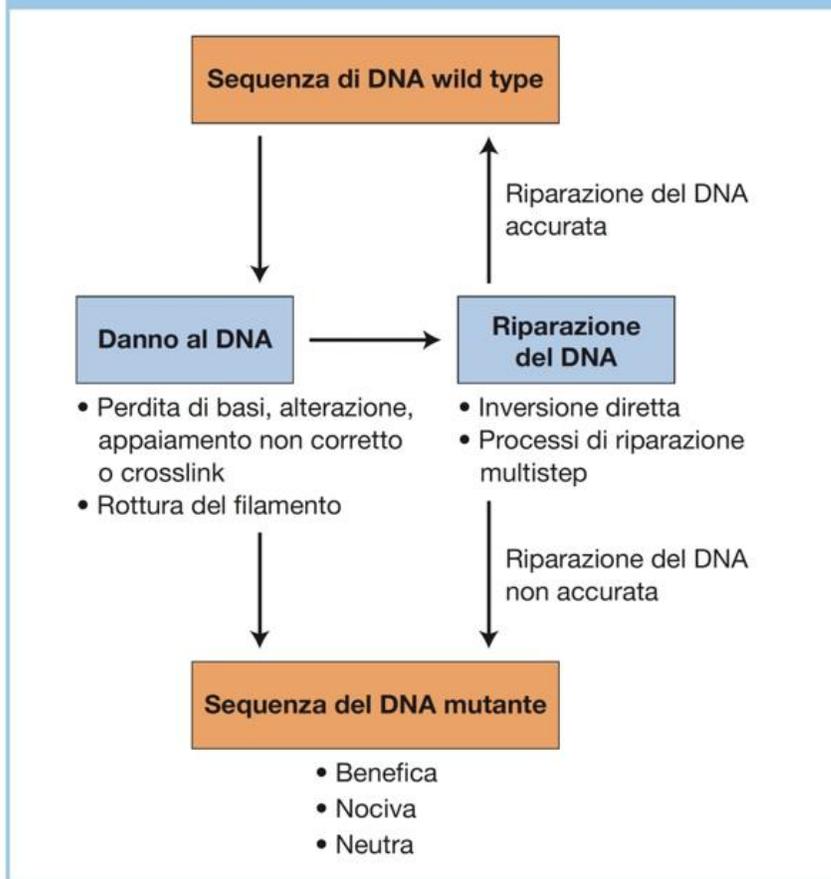
Variabilità genetica → cambiamenti evolutivi



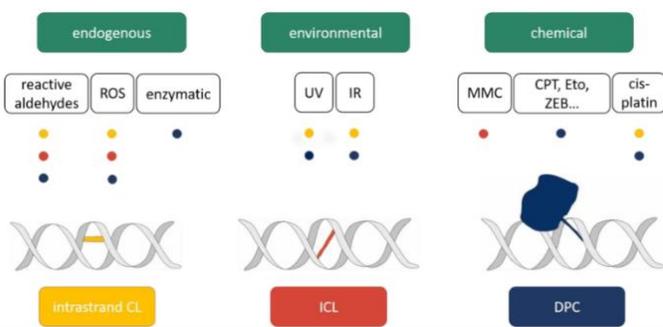
Tipi di mutazioni

- Alterazione numero cromosomi (mutazioni genomiche)
- Alterazione struttura cromosomi (mutazioni cromosomiche)
- **Alterazione struttura geni (mutazioni geniche)**

Visione d'insieme della mutazione, della riparazione e del danno al DNA



↑ Griffiths et al. – Genetica – VIII ed., Zanichelli



← different types of crosslinks (<https://doi.org/10.3390/ijms20174304>)

Mutazione → Danno (lesione) al DNA derivanti da

- Siti abasici (perdita di una base azotata dal nucleotide: sito apurinico o apirimidinico)
- Appaiamenti non corretti (mismatch)
- Basi modificate
- Legami crociati (crosslink) inter- o intra-filamento
- Rotture del filamento

Organismi unicellulari (batteri, lieviti, ...)

Durante la replicazione le mutazioni vengono trasmesse dalla cellula parentale alle cellule figlie.

Eucarioti pluricellulari

due tipi di eredità mutazionale

Cellule linea somatica (mutazioni somatiche)

Le mutazioni che insorgono nella cellula somatica sono trasmesse alle cellule figlie (non vengono ereditate!).

Cellule linea germinale (mutazioni germinali)

Le mutazioni che intervengono nel corso della **formazione dei gameti** vengono ereditate da tutte le cellule (somatiche e germinali) della prole.

Senza mutazioni non sarebbero esistiti alleli



Esisterebbero solo geni in forma unica

Tasso di mutazione

Controllo genetico

Condizioni ambientali

Mutazioni puntiformi

Cambiamenti in siti specifici di un gene o in una regione non codificante del DNA.



- Sostituzione di una base (transizione, transversione)
- Delezione di coppie nucleotidiche (da una a poche)
- Inserzione di coppie nucleotidiche (da una a poche)

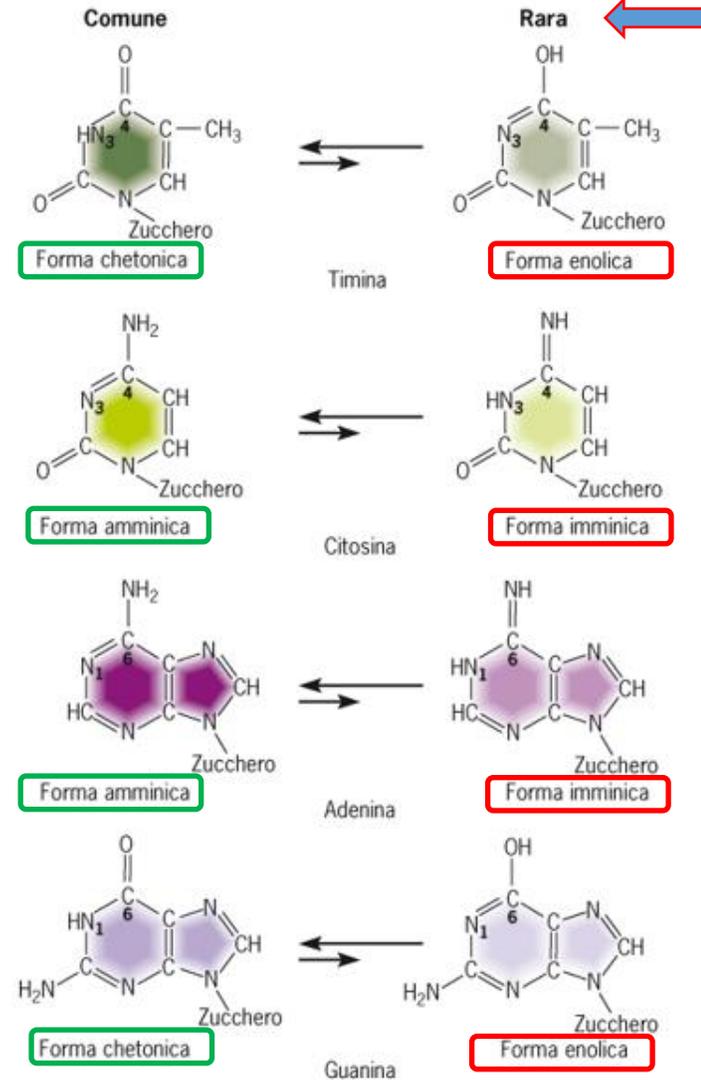
ALTERAZIONE APPAIAMENTO BASI AZOTATE



Le strutture delle basi azotate sono dinamiche

Transizioni tautomeriche nelle basi azotate

forma chetonica ↔ forma enolica (forma meno stabile)
forma amminica ↔ forma imminica (forma meno stabile)



Spostamento di un atomo di idrogeno

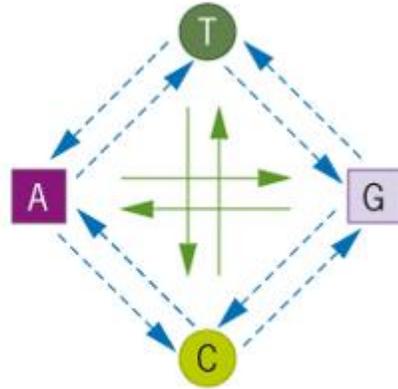
Le forme rare, a causa di appaiamenti inconsueti (A:C, G:T), possono dare origine a mutazioni.



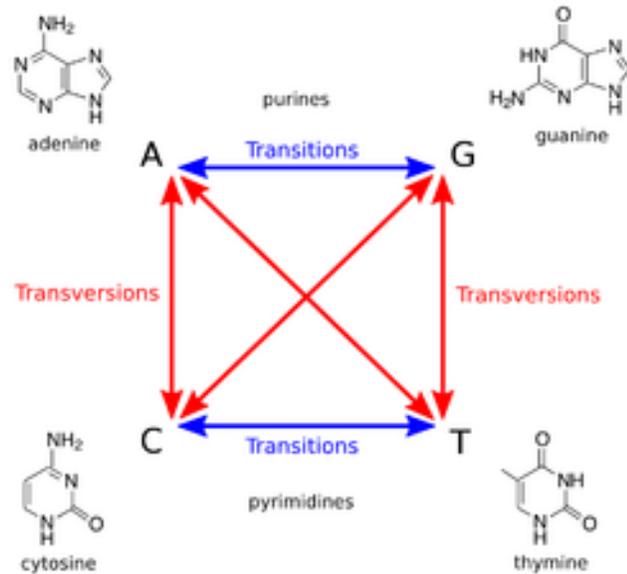
Sostituzione di basi

SOSTITUZIONI DI BASI ← Transizioni tautomeriche

Nel DNA si possono verificare dodici differenti sostituzioni di basi.



(a)



<u>Purine</u>	<u>Pirimidine</u>
adenina	citocina
guanina	timina
	uracile

4 transizioni

(purine → purina; pirimidina → pirimidina)

A → G

G → A

C → T

T → C

8 transversioni

(pirimidina → purina; purina → pirimidina)

C → A

C → G

T → A

T → G

A → C

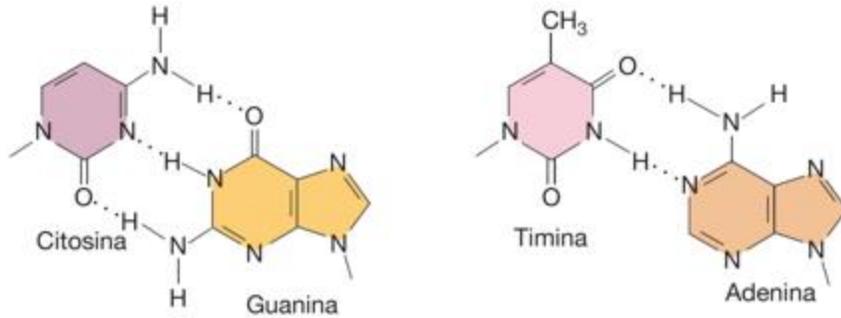
A → T

G → C

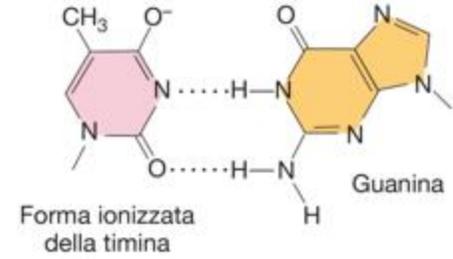
G → T

La tautomerizzazione e la ionizzazione delle basi portano all'appaiamento di basi non corretto

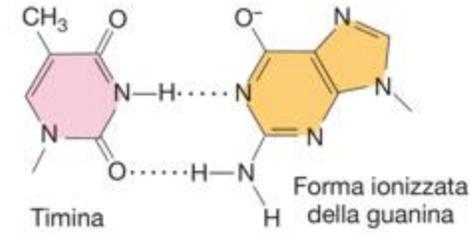
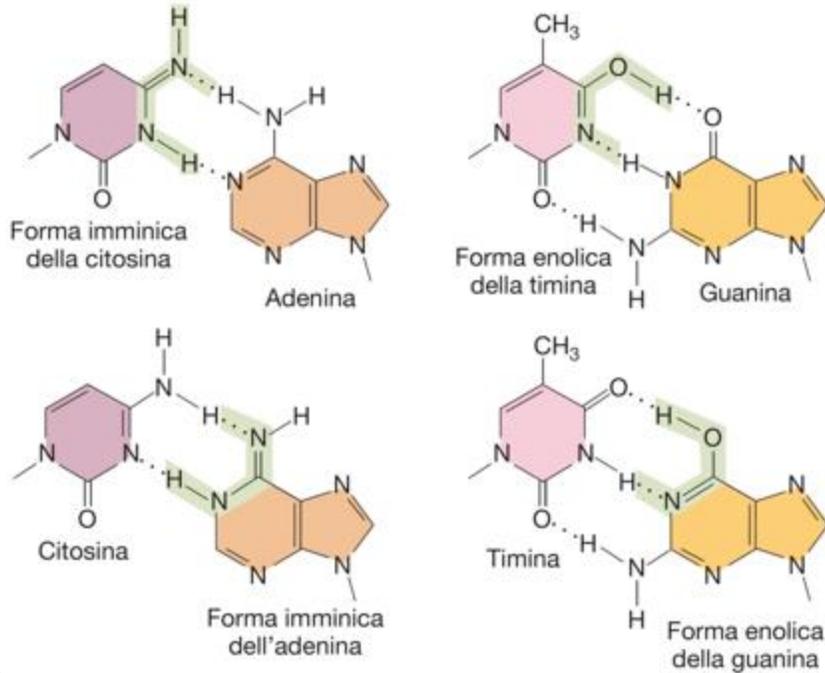
(a) Appaiamento normale



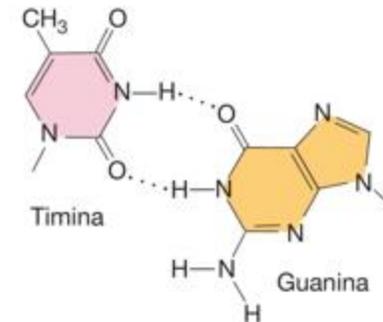
(c) Appaiamento in seguito a ionizzazione



(b) Appaiamento in seguito a tautomerizzazione

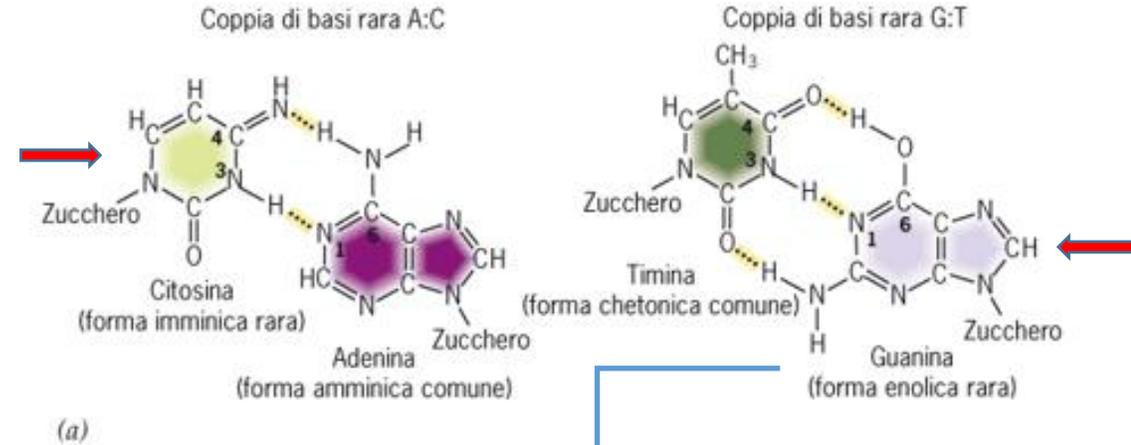


(d) Appaiamento consentito dal vacillamento



Se, nel momento della replicazione del DNA, sono presenti **forme rare** (enoliche o imminiche) delle basi possono avvenire **appaiamenti anomali** che possono dare origine a **mutazioni**.

Le coppie di basi A:C e G:T appaiate con legami idrogeno che si formano quando la citosina e la guanina sono nelle loro rare forme tautomeriche imminica ed enolica.

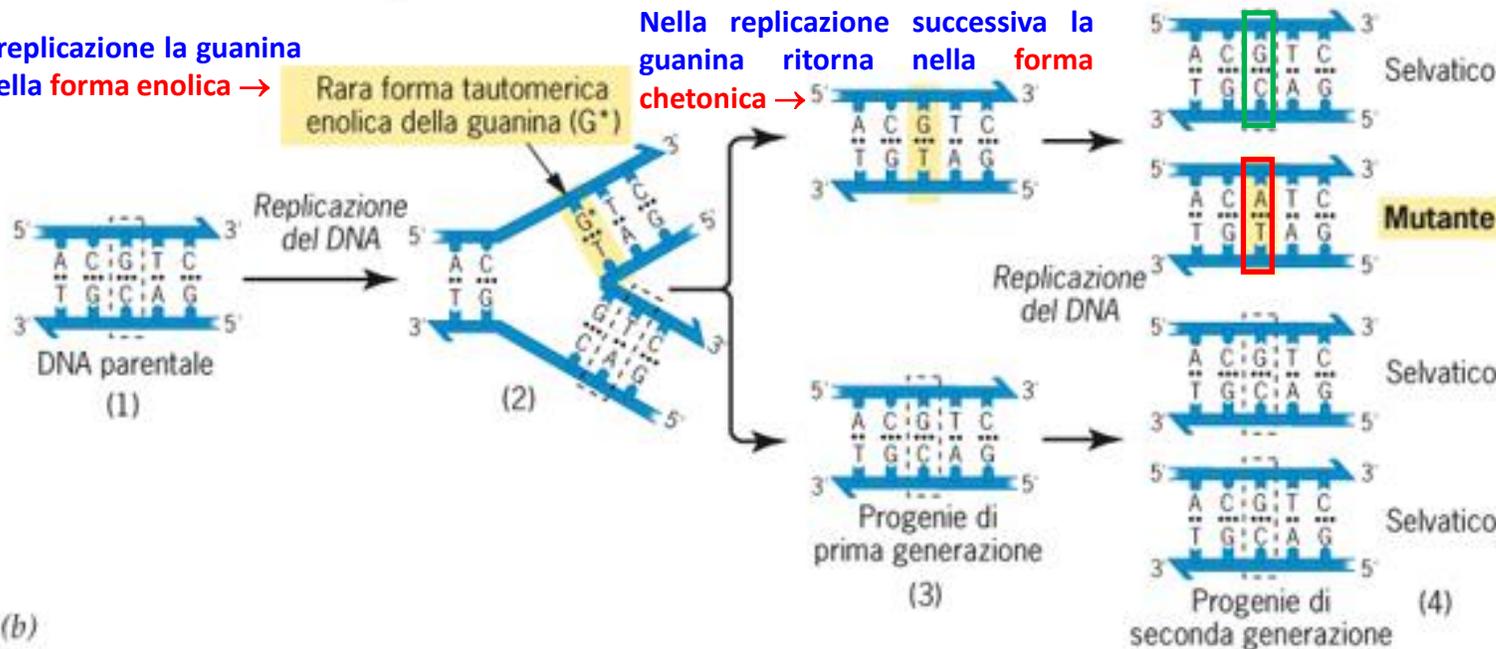


Meccanismo mediante il quale le transizioni tautomeriche nelle basi del DNA causano mutazioni.

Durante la replicazione la guanina è passata nella **forma enolica** →

Rara forma tautomerica enolica della guanina (G*)

Nella replicazione successiva la guanina ritorna nella **forma chetonica** →



Purine **Pirimidine**
adenina **citosina**
guanina **timina**
 uracile

→ Evento di **transizione**

G → A

C → T

(sostituzione di una coppia di basi **G:C → A:T**)

INSERZIONE O DELEZIONE DI COPPIE NUCLEOTIDICHE

MUTAZIONI FRAMESHIFT

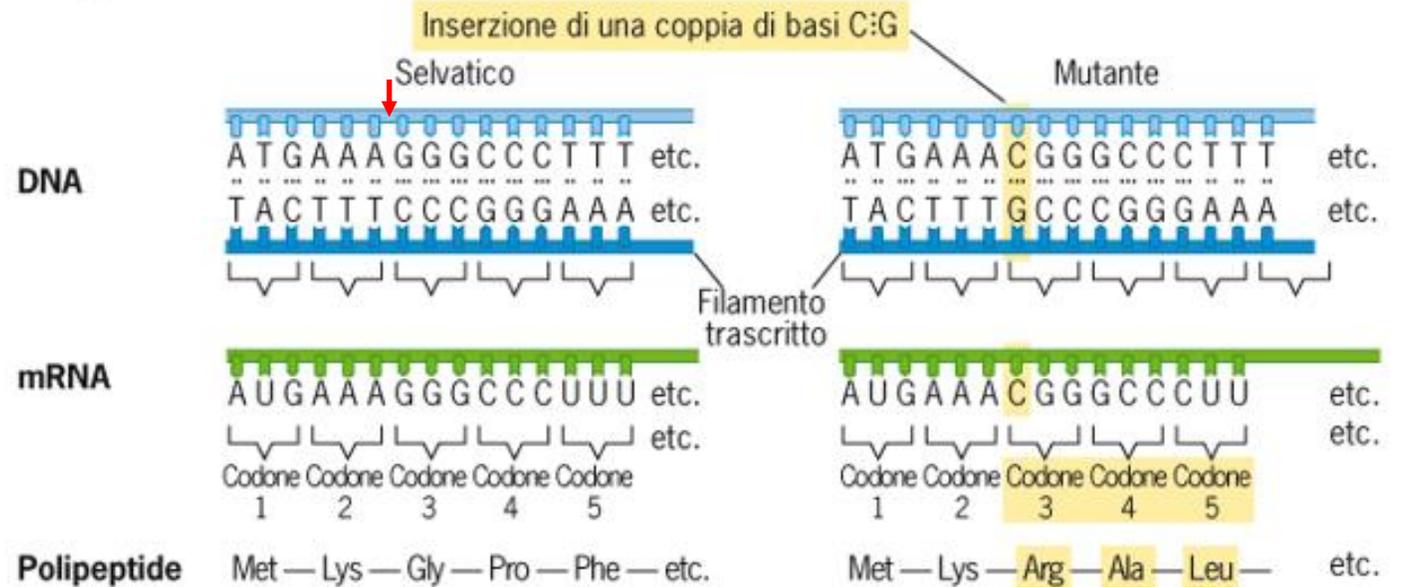
(scivolamento modulo di lettura)

- Inserzione di una coppia di basi
- Delezione di una coppia di basi



Possono avere conseguenze molto gravi!
(sintesi prodotto non funzionale)

Inserzioni o delezioni di una o due coppie di basi modificano lo schema di lettura del gene a valle del sito della mutazione.



(b)

Conseguenze delle mutazioni puntiformi nella cornice di lettura aperta

In seguito a **sostituzione di basi**, le mutazioni possono essere

- **Silenti** o sinonime
- **Missenso** o non sinonime (conservative, non conservative)
- **Non senso**

Anemia falciforme

Codone **CTC** → **CAC**
Glu → **Val** (catena β)

In seguito ad **inserzioni o delezioni di basi**, le mutazioni sono di tipo **frameshift**.

(a)

	Nessuna mutazione	Sostituzione di una singola base			
		Mutazione silente (sinonima)	Mutazione missenso (non sinonima)		Mutazione nonsense
			Conservativa	Non conservativa	
DNA	CAT AAG CAG AGT ACT GTA TTC GTC TCA TGA	CAT AA A CAG AGT ACT GTA TT T GTC TCA TGA	CAT AG G CAG AGT ACT GTA TCC GTC TCA TGA	CAT AC G CAG AGT ACT GTA TGC GTC TCA TGA	CAT TAG CAG AGT ACT GTA ATC GTC TCA TGA
mRNA	CAU AAG CAG AGU ACU	CAU AAA CAG AGU ACU	CAU AGG CAG AGU ACU	CAU ACG CAG AGU ACU	CAU UAG CAG AGU ACU
Proteina	His Lys Gln Ser Thr	His Lys Gln Ser Thr	His Arg Gln Ser Thr	His Thr Gln Ser Thr	His Stop

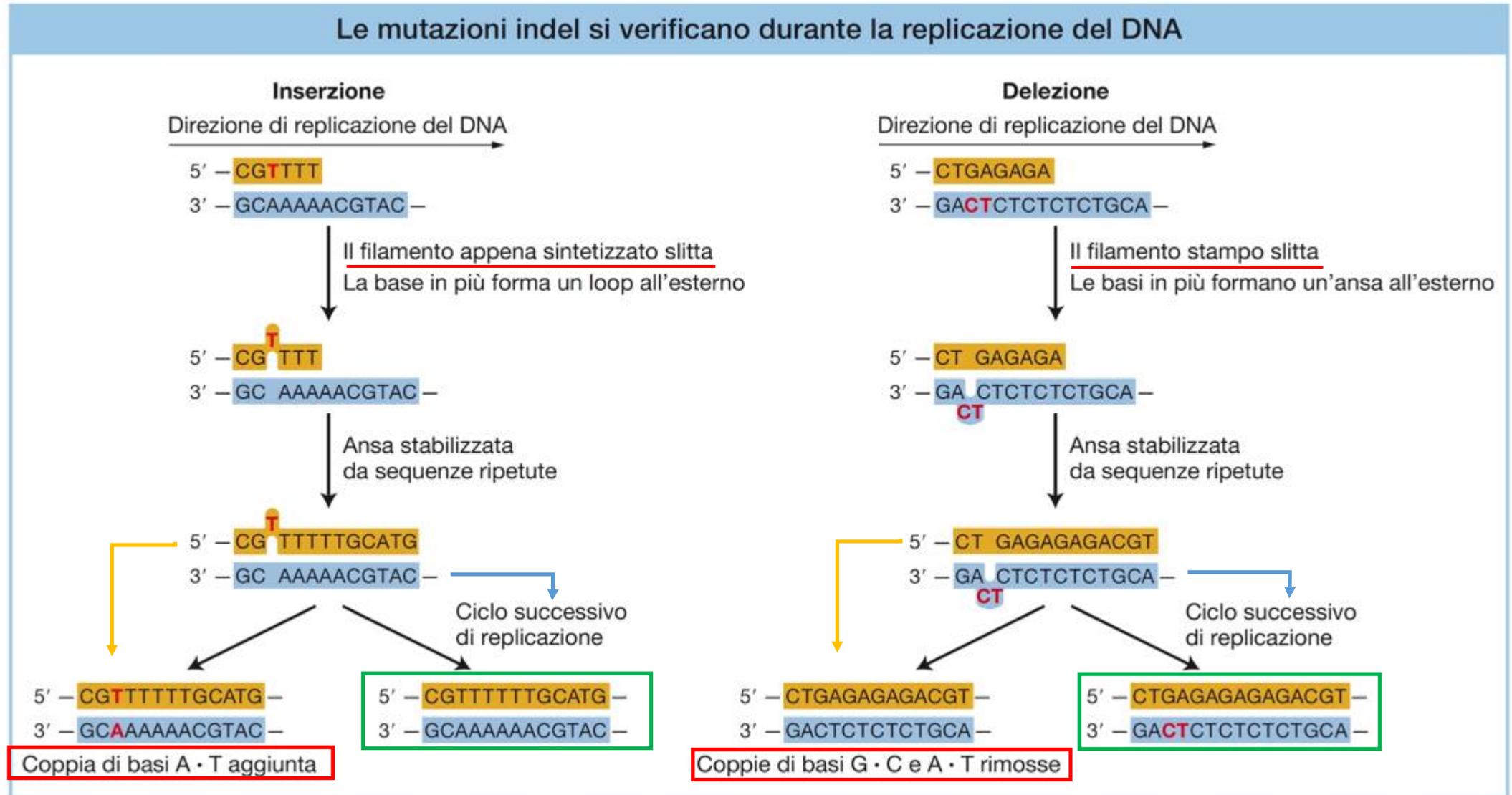
↑ Sostituzione con un aminoacido chimicamente simile

(b)

	Nessuna mutazione	Inserzione o delezione di una singola base (indel)	
		Inserzione (frameshift)	Delezione (frameshift)
DNA	CAT TGC GAC AAG GAT AGT ACT CCT GTA ACG CTG TTC CTA TCA TGA GGA	CAT GTG CGA CAA GGA TAG TAC TCC T GTA CAC GCT GTT CCT ATC ATG AGG A	CAT T GCG ACA AGG ATA GTA CTC CT GTA A CGC TGT TCC TAT CAT GAG GA
mRNA	CAU UGC GAC AAG GAU AGU ACU CCU	CAU GUG CGA CAA GGA UAG UAC UCC U	CAU GCG ACA AGG AUA GUA CUC CU
Proteina	His Cys Asp Lys Val Ser Thr Pro	His Val Arg Gln Gly Stop	His Ala Thr Arg Ile Val Leu

Genesi delle inserzione e delle delezioni

mutazioni indel



Mutazioni puntiformi in regioni non codificanti

- regioni che intervengono nella **regolazione** della
- replicazione del DNA
 - trascrizione del DNA
 - processamento degli RNA.

Mutazioni puntiformi a livello di elementi di controllo:
promotori → legano fattori della trascrizione (GTF)
enhancer → legano fattori di trascrizione generali (TF)

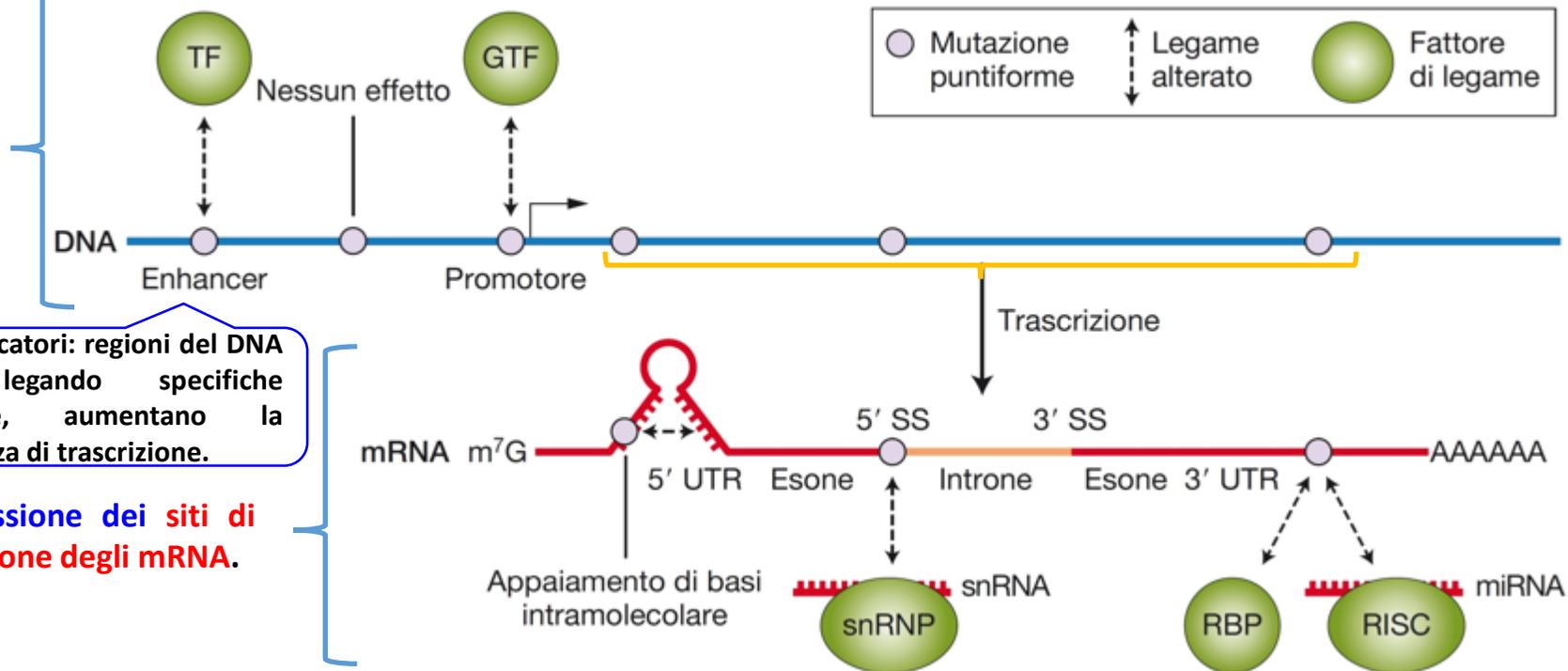
mutazioni a questi livelli influenzano la **trascrizione dei geni controllati**.

Alterazione dei siti di legame per i fattori che regolano i processi di trascrizione.

Intensificatori: regioni del DNA che, legando specifiche proteine, aumentano la frequenza di trascrizione.

Alterazione dell'espressione dei siti di legame per la maturazione degli mRNA.

Conseguenze delle mutazioni puntiformi nelle regioni non codificanti



RNA-binding protein

complesso silenziatore indotto da RNA

LA MUTAZIONE È UN EVENTO CASUALE

può avvenire in qualsiasi momento della vita dell'individuo ed in qualunque cellula.

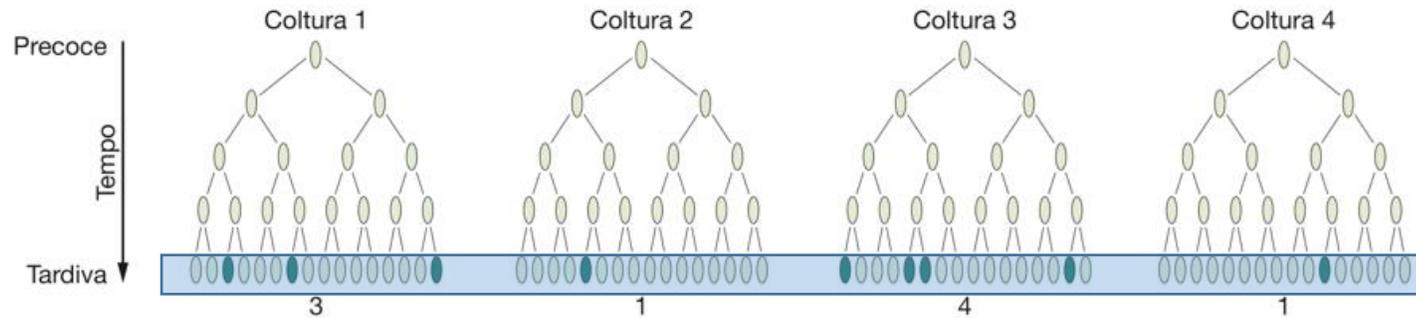
Test di fluttuazione di S. Luria e M. Delbrück

Mutazione → resistenza di *E. coli* all'infezione del fago T1

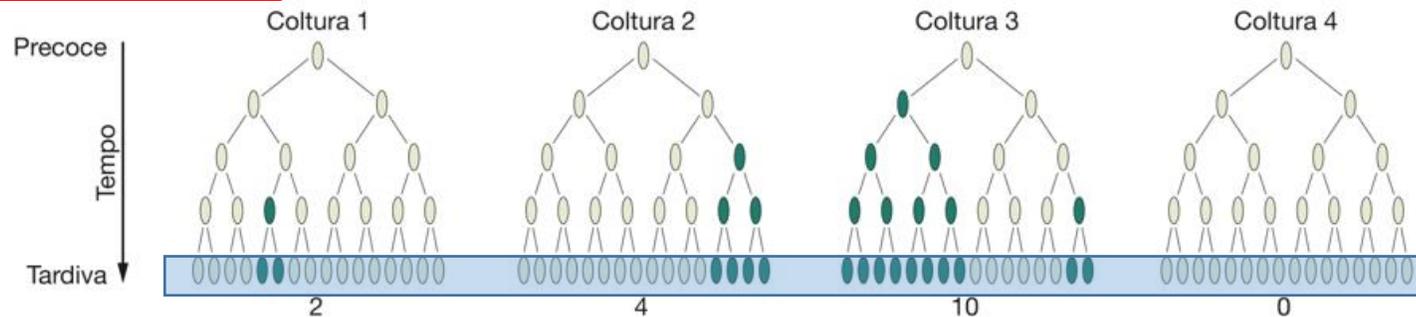
Risultati di mutazioni indotte e spontanee

(a) Mutazione indotta

Popolazioni diverse (colture batteriche gestite nelle stesse condizioni)



(b) Mutazione spontanea



Se la mutazione derivasse dall'esposizione all'agente selettivo (risposta adattativa), in popolazioni separate il numero dei mutanti sarebbe pressoché costante.

Esposizione delle colture al fattore selettivo (fago T1)

Se la mutazione derivasse dall'esposizione all'agente selettivo (risposta adattativa), in popolazioni separate il numero dei mutanti (resistenti al fago T1) sarebbe pressoché costante.

Esposizione delle colture al fattore selettivo

alta fluttuazione del numero di mutanti in popolazioni diverse

Conferma la casualità delle mutazioni!

Se la mutazione fosse un evento casuale potrebbe avvenire in qualsiasi momento della crescita; in seguito all'esposizione all'agente selettivo delle diverse popolazioni il numero dei mutanti sarà diverso.

- Difetti nel sistema di replicazione
- Inefficienza dei sistemi di riparazione
- Fattori ambientali

Influenzano il **tasso di mutazione**

MUTAZIONI INDOTTE

Le mutazioni possono essere indotte da fattori esterni.

Muller (1927) scoprì l'effetto mutageno dei **raggi x** in *Drosophila*.



Questo approccio consentì l'avvio di studi sugli effetti delle mutazioni indotte dai raggi x in geni specifici.

Per dimostrare la **mutagenicità dei raggi x** Muller sviluppò il «**Metodo CIB**»

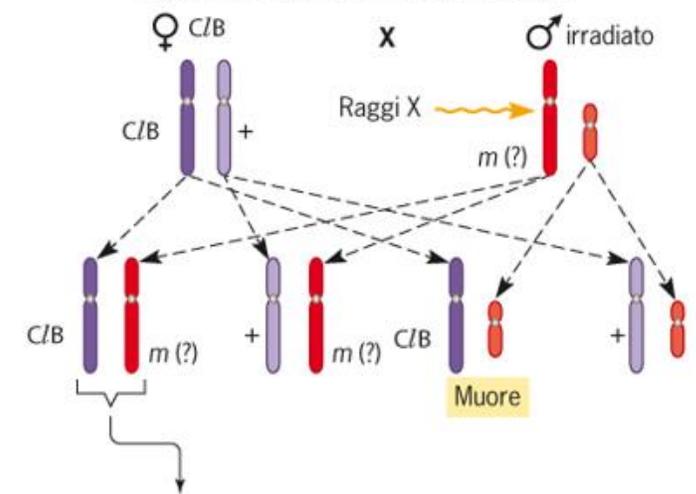
Cromosoma X CIB alterato:

C → *crossover suppressor* (inversione che causa la morte nella progenie che eredita un cromosoma x ricombinante)

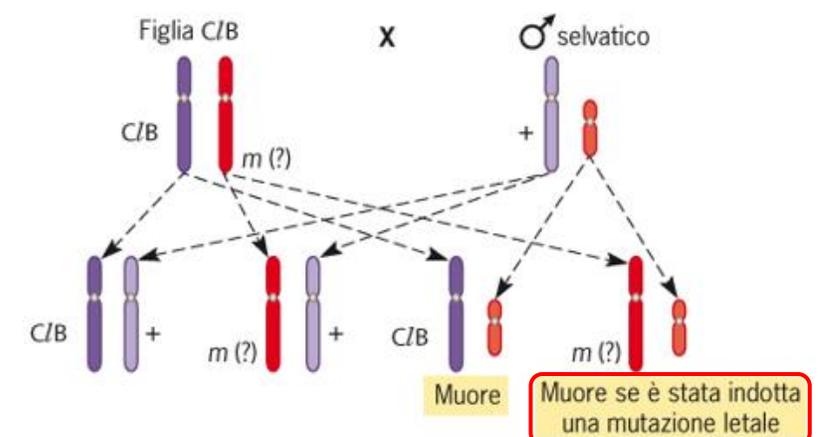
I → mutazione *letale* recessiva

B → mutazione dominante per il fenotipo **occhio Bar**

Incrocio I: femmine eterozigoti per il cromosoma *CIB* sono incrociate con maschi irradiati.



Incrocio II: le femmine *CIB* della progenie dell'incrocio I sono incrociate con maschi selvatici.



1/3 della progenie sarà rappresentato da maschi se non si è avuta una mutazione letale recessiva sul cromosoma X.

Questo approccio dimostrò che i raggi X aumentavano di circa 150 volte il tasso di mutazioni letali X-linked in maschi di *Drosophila*.

- **Radiazioni elettromagnetiche ad alta energia**
- **Molte sostanze chimiche**

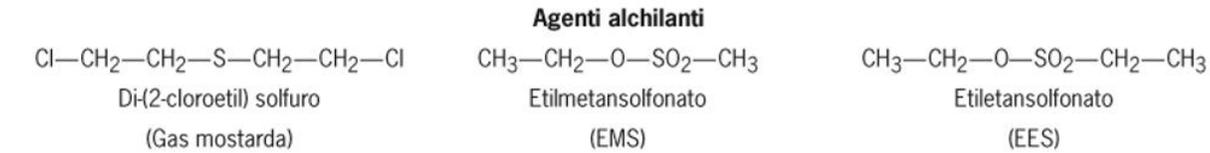
—————> **Potenti mutageni**

**Aggiunta gruppi alchilici (CH₃-, CH₃CH₂-, ...)
alle basi azotate del DNA**

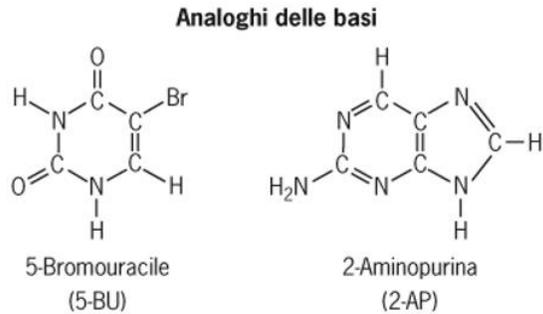
Mutageni chimici

DNA in replicazione
Analoghi delle basi

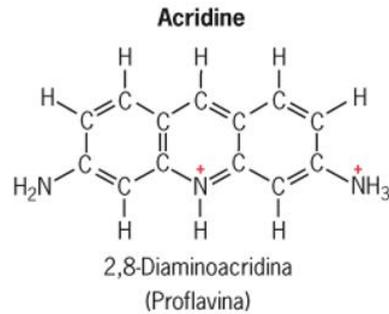
DNA in qualsiasi momento
Agenti alchilanti
Acido nitroso
Coloranti acridinici



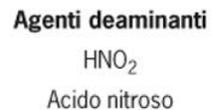
(a)



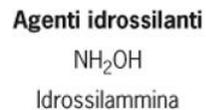
(b)



(c)



(d)



(e)

Gli **analoghi delle basi** vengono incorporati nel DNA nel corso della replicazione.

Pur presentando strutture simili alle basi normali, si comportano in modo diverso, generando appaiamenti errati.

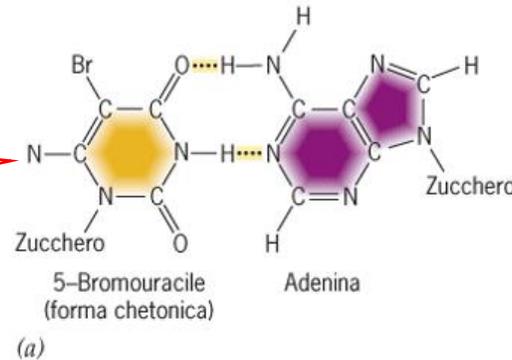
5-bromouracile (analogo timina)
2-aminopurina (analogo adenina)

5-bromouracile

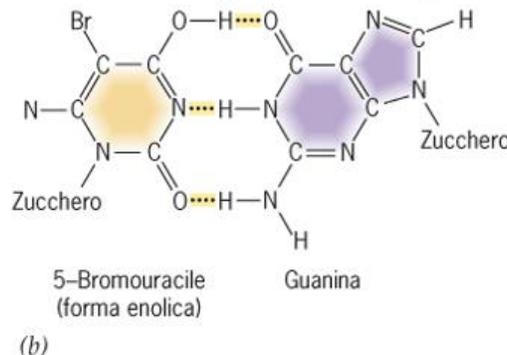
Analogo della timina
 in **forma chetonica** (più stabile)

Nella **forma enolica** (meno stabile) si appaia con la **guanina**; passando, poi, nella forma chetonica si appaia con l'adenina, inducendo una **transizione G:C → A:T**

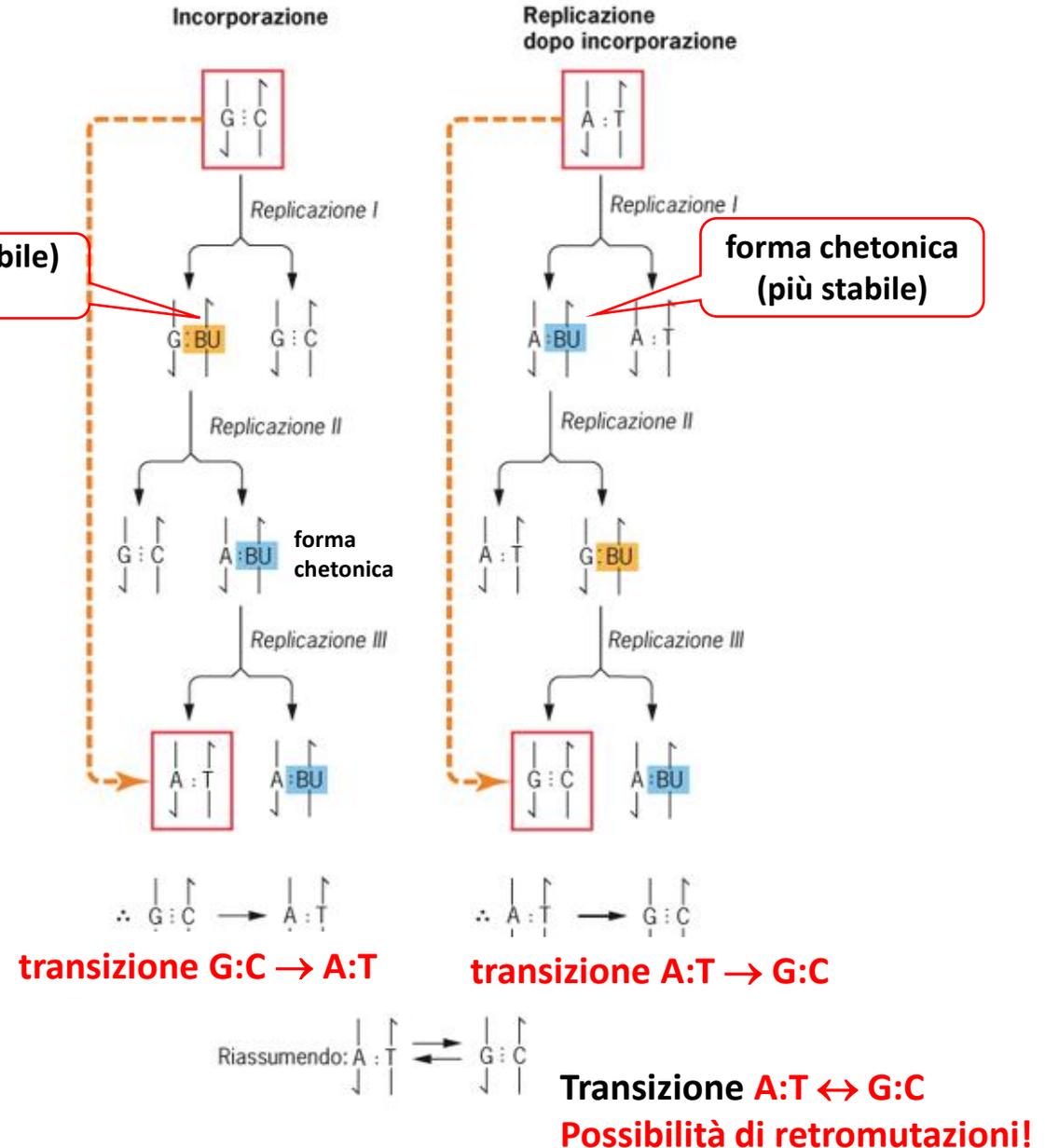
5-Bromouracile: appaiamento con l'adenina.



5-Bromouracile: appaiamento con la guanina.



Effetto della forma enolica del 5-bromouracile durante:

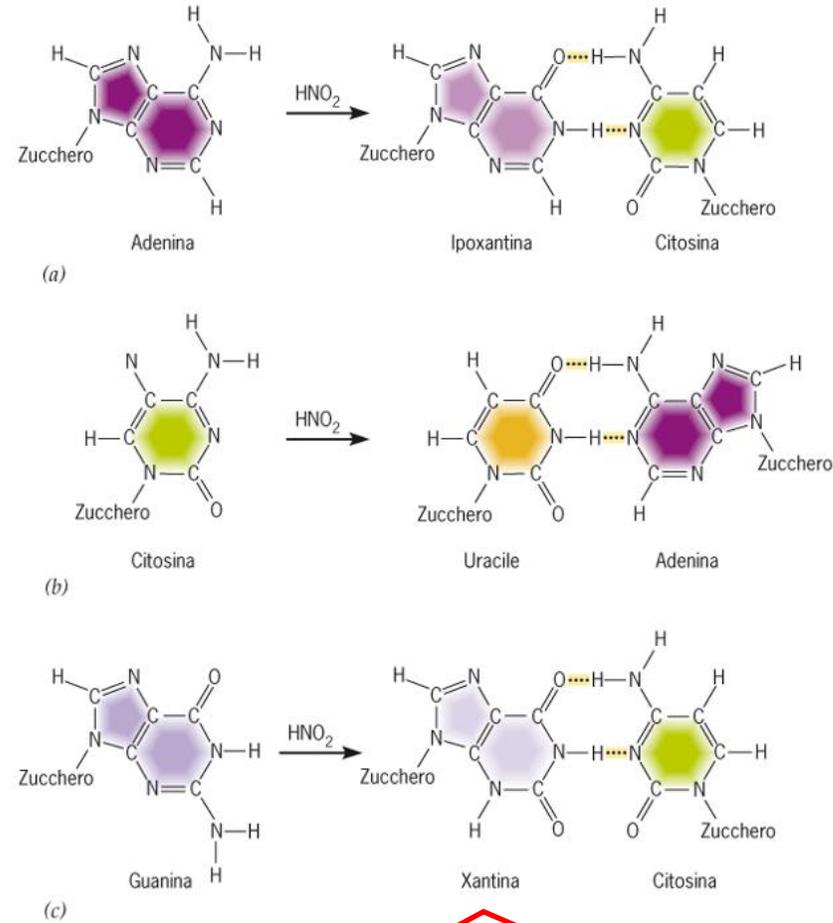


Acido nitroso (HNO_2)

Induce **deaminazione ossidativa** dei gruppi amminici di adenina, guanina e citosina

gruppi amminici \rightarrow gruppi chetonici

Può indurre mutazioni in qualsiasi momento del ciclo cellulare



transizione A:T \rightarrow G:C

transizione G:C \rightarrow A:T

Transizione A:T \leftrightarrow G:C

Possibilità di retromutazioni!

Non mutagena

La xantina si appaia, comunque, con la citosina

Coloranti acridinici

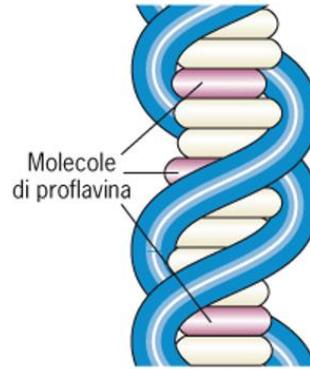
(proflavina, arancio di acridina, ...)

Intercalandosi tra le coppie di basi del DNA, inducono alterazioni nella **conformazione del DNA** e **rigidità della catena**

↓
Inserzioni

Delezioni

↓
mutazioni frameshift



Agenti alchilanti

(mostarde azotate, mostarde solforiche, metil-metansolfonato, etil-metansolfonato)

↓
trasferiscono gruppi alchilici (metilici, etilici) alle basi azotate, alterandone le caratteristiche e gli appaiamenti.

↓
Possono indurre tutti i tipi di mutazioni

Transizioni

Transversioni

Frameshift

Alterazioni cromosomiche

Agenti idrossilanti

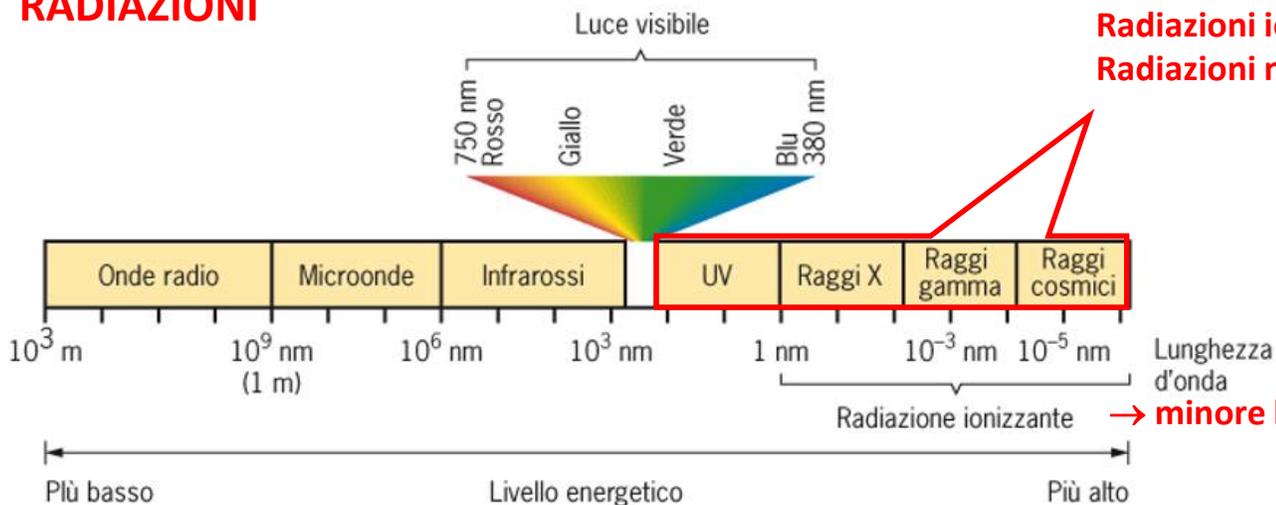
Idrossilammina (NH_2OH) → effetto mutageno specifico

↓
Idrossilazione del gruppo amminico della **citocina**

Appaiamento **idrossilammina:adenina**

Transizione G:C → A:T

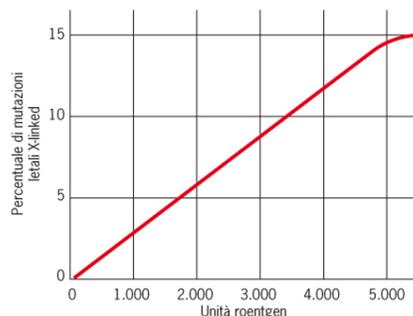
RADIAZIONI



Spettro elettromagnetico della luce

Molecole con atomi in forma ionica o in stati eccitati sono chimicamente molto reattive ed in grado di indurre mutazioni nelle cellule.

Le **radiazioni ionizzanti** possono indurre alterazioni nella struttura dei cromosomi: delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni.

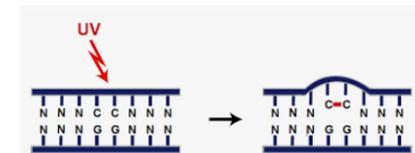


Riguardo all'esposizione alle radiazioni ionizzanti, non esiste un livello di sicurezza: **maggiore è la dose di irradiazione maggiore è il tasso di mutazione.**

Le **raggi ultravioletti** possono rendere molto reattive purine e pirimidine in seguito alla formazione di **idrati** e **dimeri**.

Dimeri delle pirimidine

alterano la struttura a doppia elica del DNA con ripercussione sul processo di replicazione; sono causa di errori nei processi di riparazione.



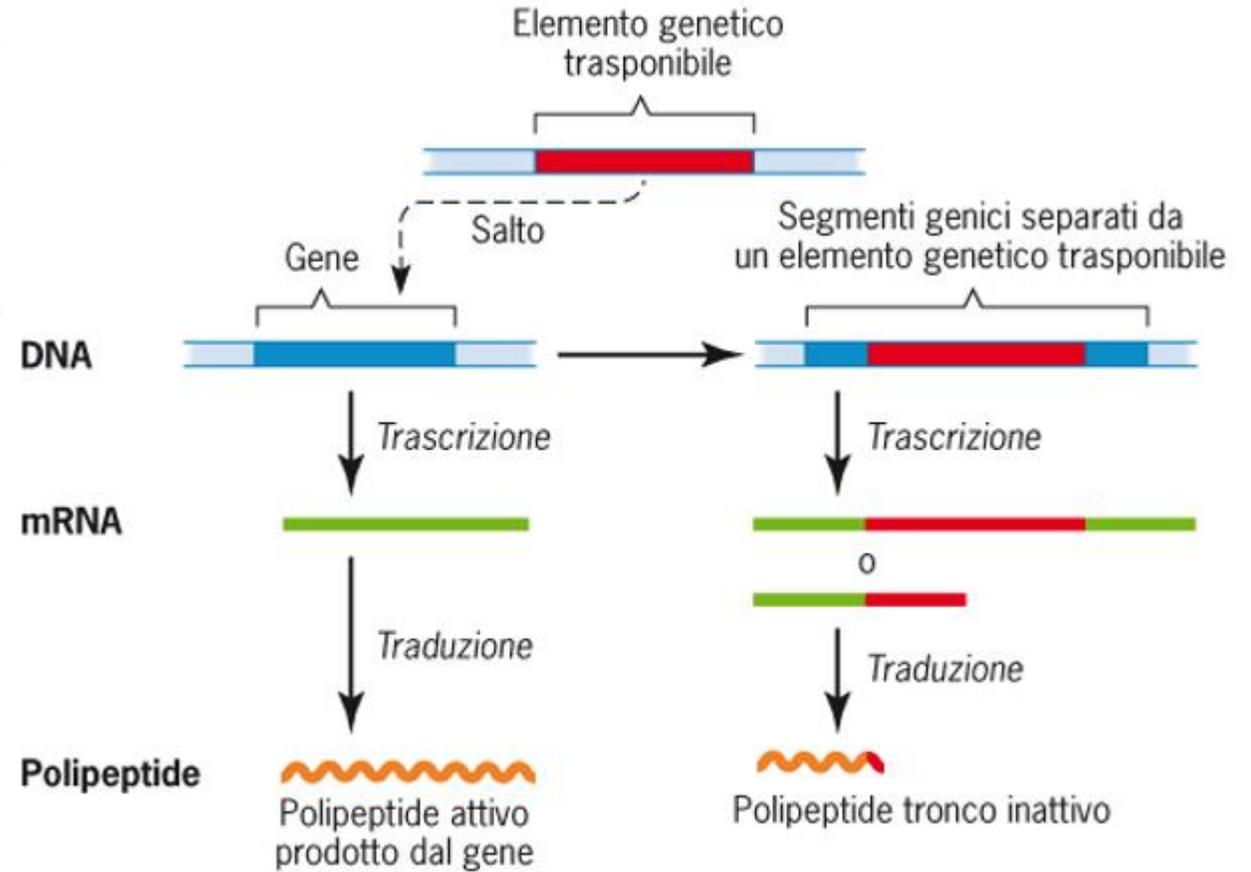
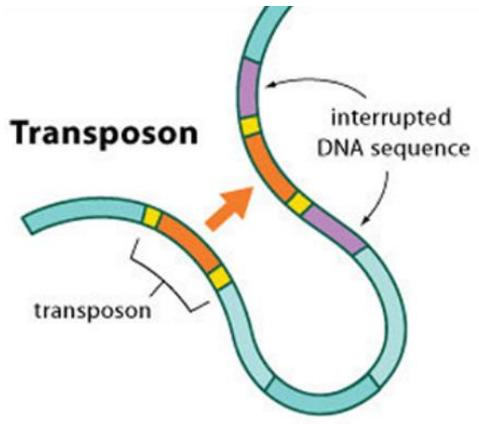
ELEMENTI GENETICI TRASPONIBILI

Tutti gli organismi viventi possiedono **elementi genetici trasponibili (trasposoni)**, detti anche geni che saltano. Si tratta di segmenti di DNA in grado di spostarsi da un posto all'altro del genoma di una cellula.

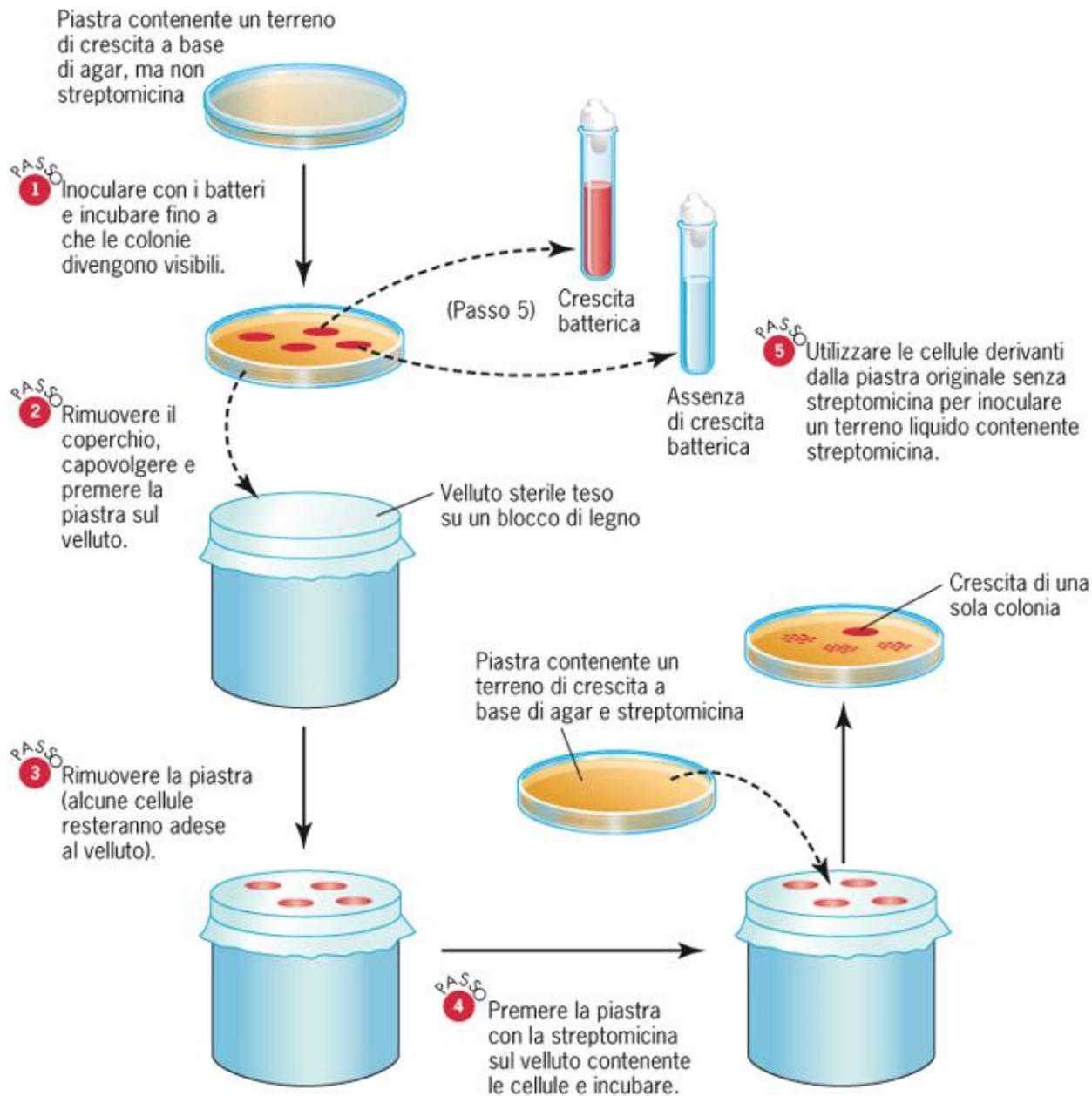


Eventi di ricombinazione consentono lo spostamento degli elementi trasponibili (**trasposizione**).

Nel caso della trasposizione l'**elemento trasponibile** ed il **sito bersaglio** non sono regioni omologhe.



I trasposoni sono in grado di bloccare il processo di trascrizione e possono rappresentare una fonte di mutazioni cromosomiche.



**Tecnica del replica plating
consente l'isolamento di batteri mutanti**

Una **mutazione**, inducendo la formazione di un **nuovo allele**, può portare all'espressione di un **fenotipo anormale**.



Una mutazione in un gene selvatico che porta alla formazione di un nuovo fenotipo viene definita **mutazione forward**.

In alcuni casi è difficile stabilire quale sia il fenotipo selvatico (occhi castani, occhi celesti).

Le mutazioni possono essere **reversibili**, ristabilendo il fenotipo selvatico.

Dopo mutazione, un fenotipo selvatico può essere ristabilito per **retromutazione** o per **mutazione a suppressore**.

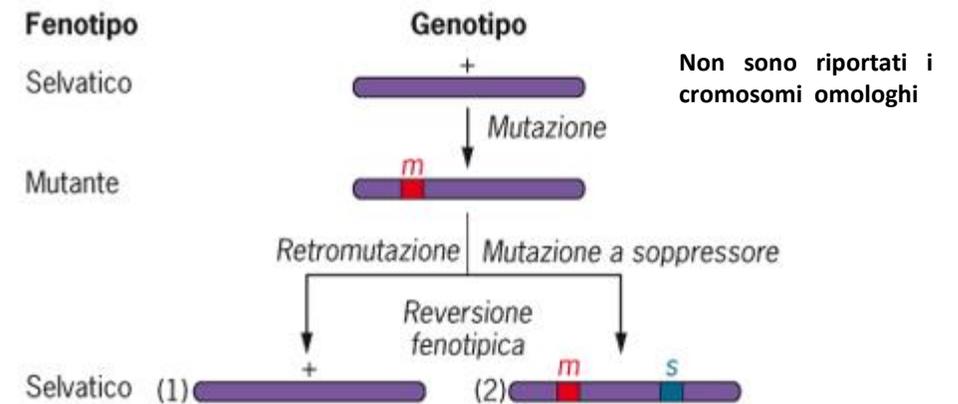
Retromutazione

Una seconda mutazione, nello stesso sito del gene dove era avvenuta una precedente mutazione, ristabilisce il **genotipo selvatico** (sequenza nucleotidica originale).

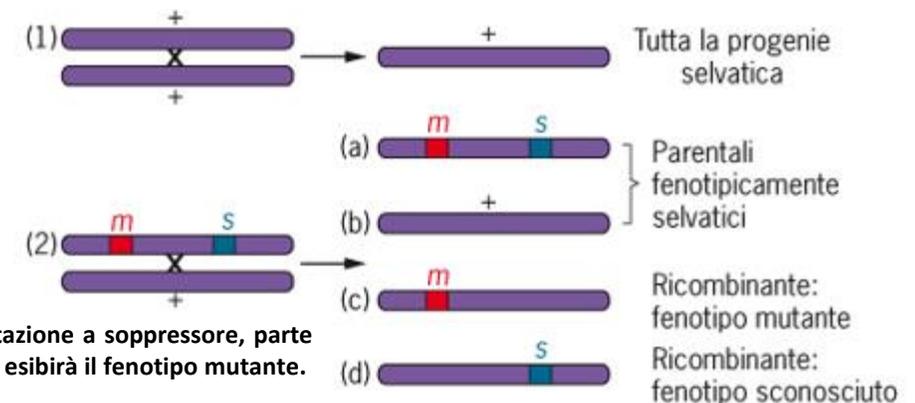
Mutazione a suppressore

Una seconda mutazione (*suppresso mutation*), in un sito del genom diverso da dove era avvenuta un precedente mutazione, ristabilisce **fenotipo selvatico**.

Per poter **distinguere tra retromutazione e mutazione a suppressore** si ricorre al reincrocio del **revertante fenotipico** con l'**organismo selvatico originale**.



Reincrocio con il selvatico



In caso di mutazione a suppressore, parte della progenie esibirà il fenotipo mutante.

Una **mutazione** porta alla formazione di un **nuovo allele**.

Isoallele → effetti rilevabili solo con specifiche tecniche diagnostiche
Allele nullo → totale assenza prodotto genico

effetti?

- Alterazioni rilevabili solo con sofisticate tecniche diagnostiche
- Alterazioni morfologiche
- ...
- Letalità

Organismi monoploidi

Gli effetti delle mutazioni, sia dominanti che recessive, si manifestano subito sul fenotipo dei mutanti.

Organismi diploidi

Gli effetti delle mutazioni recessive non si manifestano subito, ma solo quando l'allele mutato sarà presente in omozigosi.

Ad esclusione delle mutazioni recessive a carico di geni X-linked:

La mutazione, quando presente in emizigosi, si esprime!

In caso di prodotto genico essenziale per la sopravvivenza, se la mutazione è in omozigosi, induce la morte dell'organismo (**mutazione letali recessive**).

