

Gli eventi che modificano i genomi

Danni al DNA

Un basso tasso di mutazione del DNA è richiesto sia per trasmettere la corretta informazione genetica alle generazioni successive che per la vitalità individuale. Ognuno delle migliaia di geni di un organismo può subire danni da mutazioni nelle sequenze codificanti o regolative, ma deve restare il più possibile funzionale.

Le **malattie genetiche** sono dovute a mutazioni, pre-esistenti o insorte durante la meiosi, nel patrimonio genetico di almeno uno dei due genitori.

Certe **malattie somatiche** sono invece dovute a mutazioni insorte durante la vita dell'individuo. Ad es. il cancro insorge in seguito all'accumulo di mutazioni nei geni che regolano il ciclo cellulare, con perdita di controllo sulla crescita e proliferazione.

D'altra parte se il patrimonio genetico fosse trasmesso con assoluta fedeltà non ci sarebbe la variabilità genetica necessaria all'evoluzione delle specie.

Vita e biodiversità dipendono quindi da un giusto equilibrio fra tasso di mutazioni e capacità di riparo.

Le principali cause di danno al genoma sono due:

- a) **inaccuratezza della replicazione** (soprattutto per la tautomerizzazione delle basi);
- b) **danno ambientale**, spontaneo o indotto (chimico: es. perdita di basi, reazioni con sostanze naturali o sintetiche; fisico: es. calore, radiazioni UV, X, ecc.).

L'inserzione di materiale genetico, dovuto ai trasposoni, è causa di mutazioni.

La cellula possiede sistemi che scandagliano l'intero genoma alla ricerca di errori replicativi o danni al DNA e mettono in atto diversi meccanismi di riparo.

A. **Mutazioni** per delezioni estese o per duplicazioni di segmenti

Mutazioni puntiformi

- i. **Mutazioni di sostituzione:** una coppia di basi viene invertita o sostituita dall'altra:
 - a. **Transizioni:** una purina (o una pirimidina) viene sostituita dall'altra
 - b. **Transversioni:** una purina viene sostituita da una pirimidina (e viceversa)
- ii. **Microdelezioni e microinserzioni:** una o pochissime coppie di basi vengono perse o acquisite.

B. **Ricombinazioni:**

- i. **Ricombinazioni omologhe:** avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze altamente omologhe (cioè identiche o quasi), quali che siano
- ii. **Ricombinazioni sito-specifiche:** avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze omologhe ben definite
- iii. **Trasposizioni:**
 - a. **Trasposizioni semplici:** un segmento genomico viene spostato da un sito ad un altro nel genoma
 - b. **Trasposizioni replicative:** un segmento genomico viene copiato e la copia trasposta in un nuovo sito del genoma
 - c. **Retrotrasposizioni:** un segmento di RNA viene retrotrascritto, cioè copiato in DNA a doppio filamento e questo viene inserito in un sito del genoma.

- Le **mutazioni** sono in natura eventi di per sé **puramente casuali**, cioè non sono condizionate dall'effetto che eventualmente produrranno.
- Le **ricombinazioni** sono in genere eventi complessi **biologicamente programmati**, cioè destinati a succedere di norma in date condizioni al fine di produrre un determinato effetto.
- Occasionalmente possono attuarsi in modo erraneo (**ricombinazioni illegittime**, causando a volte **duplicazioni geniche, delezioni, traslocazioni o fusioni cromosomiche**). Le **trasposizioni** sono eventi più o meno **sporadici** dagli effetti sostanzialmente non programmati. Infine accadono sporadicamente errori di segregazione durante la meiosi o la mitosi con conseguenti fenomeni di alterazione del corredo cromosomico (per raddoppio o perdita di singoli cromosomi – **aneuploidie** - o raddoppi dell'intero corredo - **poliploidizzazione**).

Effetti degli eventi modificatori del genoma: mutazioni non risolte dai sistemi di riparo del DNA, nonché eventi ricombinativi:

A. Sugli organismi **unicellulari** e sulla linea **germinale** degli organismi **pluricellulari**:

- i. Conseguenze funzionali **incompatibili** con la vita (morte cellulare o mancato sviluppo dell'organismo pluricellulare)
- ii. Conseguenze funzionali **peggiorative** dell'**adattamento** all'ambiente (minor successo riproduttivo di conspecifici nell'ambiente)
- iii. Assenza di conseguenze funzionalmente rilevanti (**mutazioni neutre**)
- iv. Conseguenze funzionali **migliorative** dell'**adattamento** all'ambiente (maggior successo riproduttivo di conspecifici nell'ambiente)

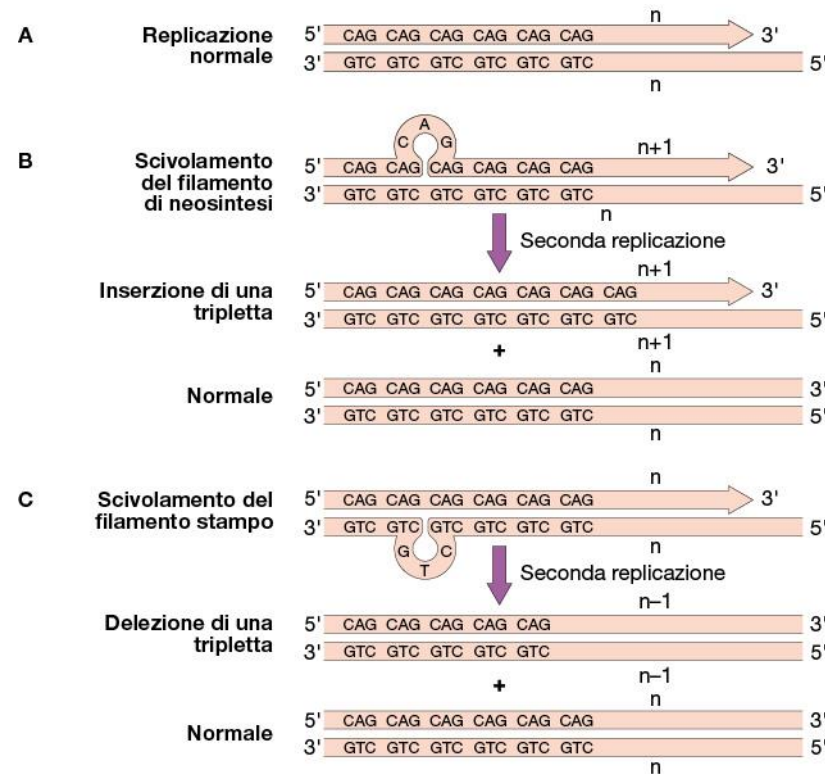
I punti **ii.** e **iv.** sono l'oggetto della **selezione naturale** darwiniana, il **iii.** è alla base del fenomeno della **deriva genica**. Entrambi contribuiscono all'**evoluzione** dei viventi.

B. Sulle linee cellulari **somatiche** degli organismi pluricellulari:

- i. **Morte cellulare** (per **apoptosi**)
- ii. **Accumulo** di mutazioni in geni rilevanti per il controllo del ciclo cellulare (sviluppo di **tumori**)
- iii. **Invecchiamento** dell'organismo.

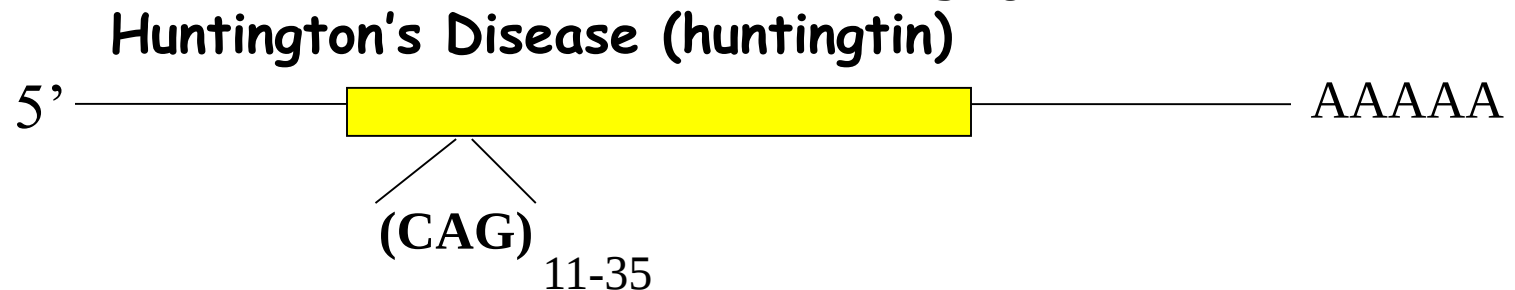
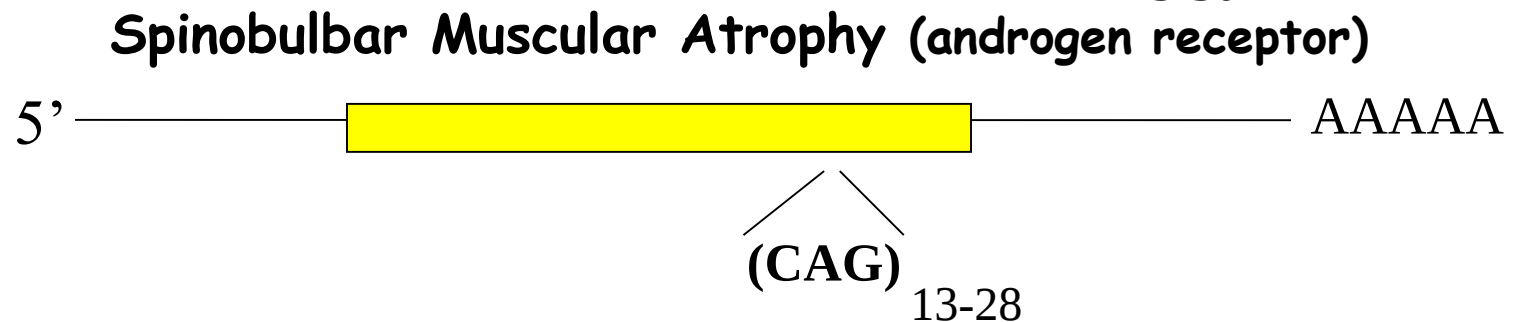
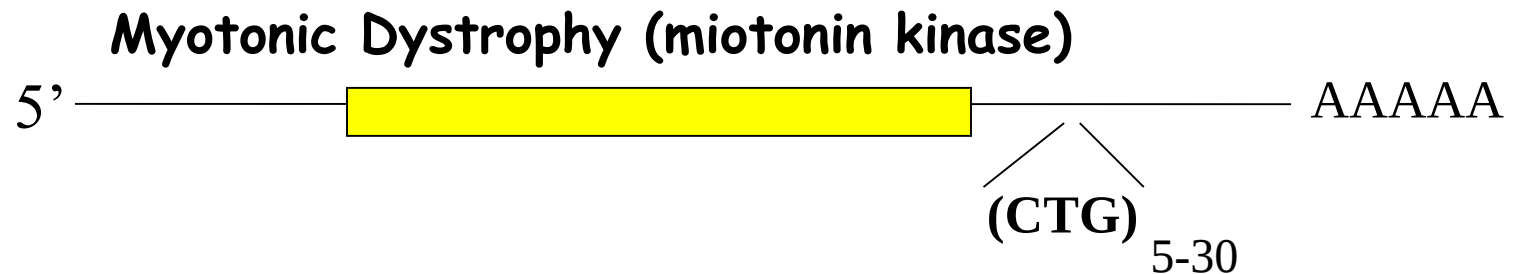
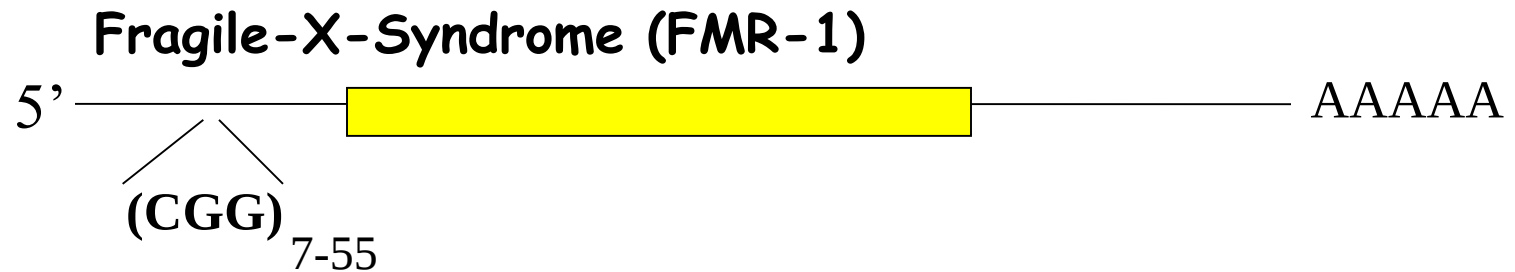
Cause più significative degli eventi mutazionali

- Intrinseci alla natura delle basi e della replicazione:
 - Eventi di **tautomerizzazione** delle basi
 - Eventi di **slittamento** durante la replicazione
- Dovuti ad **agenti fisici**:
 - Da **raggi UV**
 - Da radiazioni e.m. ad alta energia: **raggi X** e **raggi γ**
 - Da particelle ad alta energia: **raggi α** e **raggi β**
- Dovuti ad **agenti chimici**:
 - Da agenti **alchilanti**
 - Da agenti **deaminanti**
 - Da agenti **intercalanti**
 - Da agenti **ossidanti** (anche intrinseci al metabolismo)
 - Da agenti **mimetici delle basi**



Espansione o contrazioni di triplette durante la replicazione. Alcune regioni sul DNA contengono numerose copie di triplette uguali disposte in serie. La replicazione di tali regioni normalmente non provoca variazioni nel numero di triplette (**A**). Tuttavia, può accadere che durante la replicazione si formino degli appaiamenti intramolecolari (che si suppone siano dovuti a degli scivolamenti dell'apparato replicativo in tali regioni) sul filamento di neosintesi (**B**) o sul filamento stampo (**C**). Come conseguenza, alla seconda generazione, si genera nel caso (**B**) l'inserzione di una o più triplette e nel caso (**C**) la delezione di una o più triplette.

Mutazioni dinamiche



ESPANSIONE DELLE RIPETIZIONI TRINUCLEOTIDICHE

Disease	Gene Location	Repeat Sequence	Normal Repeat Number	Mutated Repeat Number
Huntington disease	4p16.3	CAG	9 - 35	37 - 100
Kennedy disease	Xq21	CAG	17 - 24	40 - 55
SCA1	6p23	CAG	19 - 36	43 - 81
DRPLA	12p	CAG	7 - 23	> 49
Fragile X site A	Xq27.3	CGG	6 - 54	> 200
Fragile X site E	Xq28	CCG	6 - 25	> 200
Fragile X site F	Xq28	GCC	6 - 29	> 500
Myotonic dystrophy	19q13	CTG	5 - 35	50 - 4000

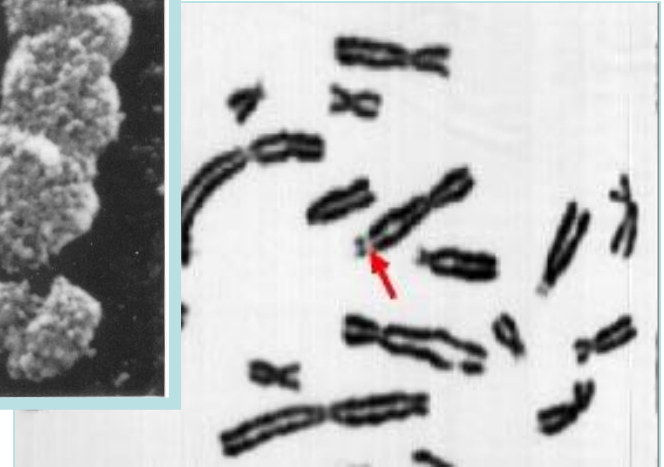
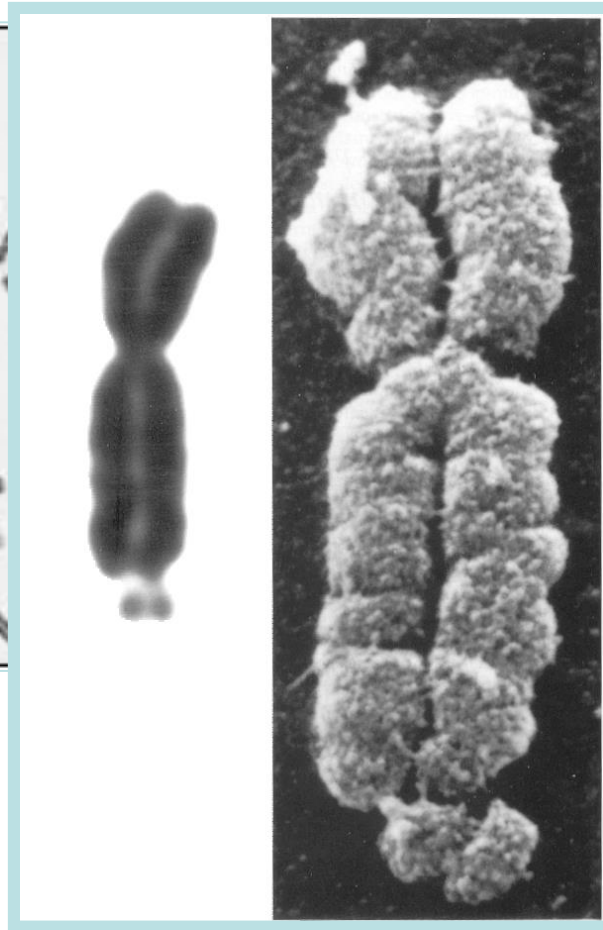
Fragile X syndrome

*Fragile X
is the world's leading cause
of inherited mental impairment*



The National Fragile X Foundation

La sindrome dell'X fragile è causata da un gene in Xq27.3



Fatti chiave sulla sindrome dell'X fragile

La più comune delle forme monogeniche di ritardo mentale (1/4000 maschi e, in forma meno grave, 1/7000 femmine)

La malattia è causata da espansione instabile di un repeat CGG alla regione 5'UTR (untranslated region) del gene FMR1 (fragile X-mental retardation protein). FMRP regola alcuni mRNA neuronali (de-regolazione nella segnalazione nei dendriti).

I pazienti con X fragile hanno un'espansione di >200 CGG che è metilata in modo anomalo. La **metilazione** si estende all'adiacente regione del promotore. Ciò dà una **conformazione inattiva alla cromatina** e impedisce la trascrizione del gene FMR1.

Le espansioni non metilate di ~60-200 repeats ("premutazioni") sono presenti in femmine e maschi senza manifestazioni cliniche ovvie ma che sono a rischio di avere rispettivamente figli e nipoti affetti.

La malattia di Huntington

Huntington's Disease.



- **An autosomal dominant neurodegenerative disorder first clinically described by Huntington in 1872.**
- **It is rare, with death rates of 1.6 per million, and is commonest among white Europeans.**
- **Initial symptoms occur in those aged 30 – 50.**
- **Sometimes it can strike in the 20's, when suicide is often the result.**
- **Death comes on average 12 years after the onset.**

Huntington's disease

- autosomal dominant disease
- juvenile to late adult onset
- associated with involuntary movements (chorea), behavioral disturbances, and cognitive impairment
- caused by mutations in the IT15 gene (whose function is unknown)
- normal gene has a CAG repeat that is polymorphic in the population and that ranges from 11-35 repeats
- patients have expanded numbers of repeats (>35 repeats)
- CAG repeat is translated into a polyglutamine tract in the protein
- disease shows anticipation, but the severity of the illness does not always correlate strictly with the degree of expansion
 - affected children of affected fathers have an age of onset 8-10 years earlier than their fathers
 - affected children of affected mothers have an age of onset similar to their mothers'

Mutazioni diverse dello stesso gene possono associarsi a sindromi diverse

***Es: distrofia
muscolare
di Duchenne e
di Becker (Xp21)***



Le delezioni che causano slittamento del modulo di lettura (e quindi totale perdita di funzione della proteina) causano la **distrofia muscolare di Duchenne** mentre le delezioni che non alterano il modulo e preservano parzialmente la funzione della proteina causano la forma più lieve di **distrofia di Becker**

un filamento del gene
 β -globinico normale

GTGCACCTGACTCCTG**A**GGAG---

GTGCACCTGACTCCTG**T**GGAG---

un filamento del gene
 β -globinico mutato

unico nucleotide
cambiato (mutazione)

(A)



(B)

5 μ m



(C)

5 μ m

Molte neoplasie sono ad eziologia **multifattoriale**, causate quindi dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali

Il cancro e' una malattia genetica della **cellula somatica** perche' riguarda alterazioni del genoma riscontrabili soltanto nelle cellule cancerose di un individuo e derivate, probabilmente, dall'interazione tra geni e ambiente

La maggior parte dei tumori non viene ereditata dalle successive generazioni poiche' queste mutazioni non sono trasmesse per via ereditaria

Geni coinvolti nei tumori

GENI del riparo del DNA (caretakers): responsabili del mantenimento dell'integrità del genoma durante la replicazione cellulare. La perdita di funzione di entrambi gli alleli espone la cellula a commettere errori (mutazioni recessive);

ONCOGENI: derivano da mutazione di **proto-oncogeni** cioè geni la cui azione promuove positivamente la proliferazione cellulare. Un singolo allele mutante può influenzare il fenotipo dell'intera cellula (mutazioni dominanti)

ONCOSOPPRESSORI: i prodotti di tali geni inibiscono la proliferazione cellulare. Per cambiare il comportamento di una cellula devono essere inattivati entrambi gli alleli (mutazioni recessive).

Le mutazioni genomiche:

Cambiamenti nel numero dei cromosomi

- Aneuploidia : perdita o aggiunta di uno o pochi cromosomi
- Poliploidia : il numero cromosomico diventa multiplo di quello normale

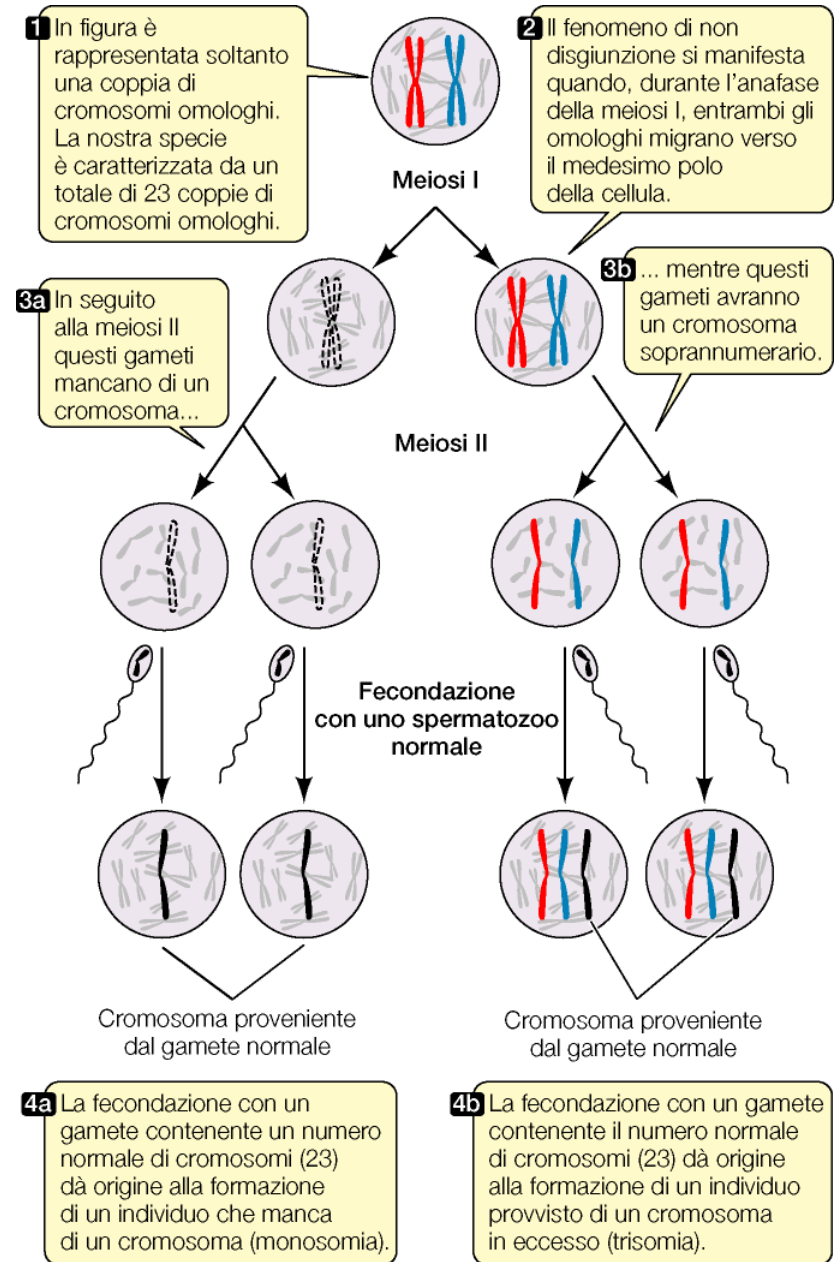
Mutazioni nel numero dei cromosomi (Aneuploidia)

Monosomie e trisomie. Accade talvolta che alla meiosi i due omologhi anziché separarsi, migrino entrambi nella stessa cellula figlia (**non disgiunzione**). In questo modo si creano due cellule figlie, una con un **cromosoma in meno** e una con un **cromosoma in più**

Dopo la fecondazione un tipo di zigote avrà **1 cromosoma omologo**, l'altro **3 cromosomi omologhi**

La trisomia del 21 determina la **sindrome di Down**

Per quel che riguarda gli autosomi, nella specie umana nessuna **monosomia** permette lo sviluppo dell'embrione

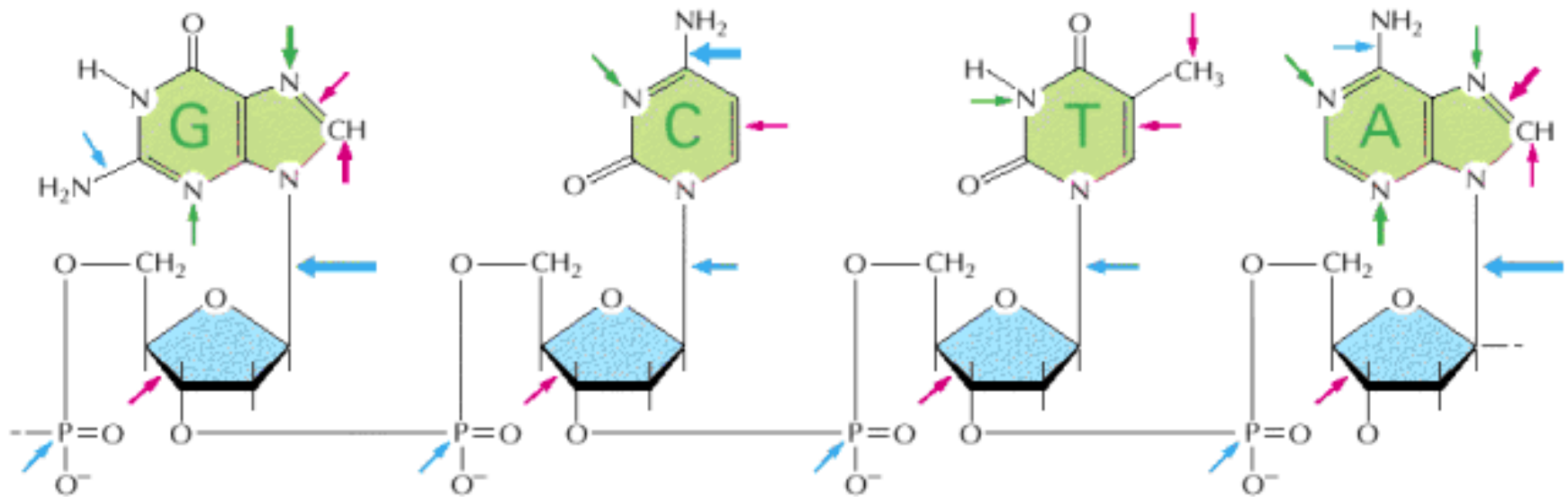


Monosomia

Trisomia

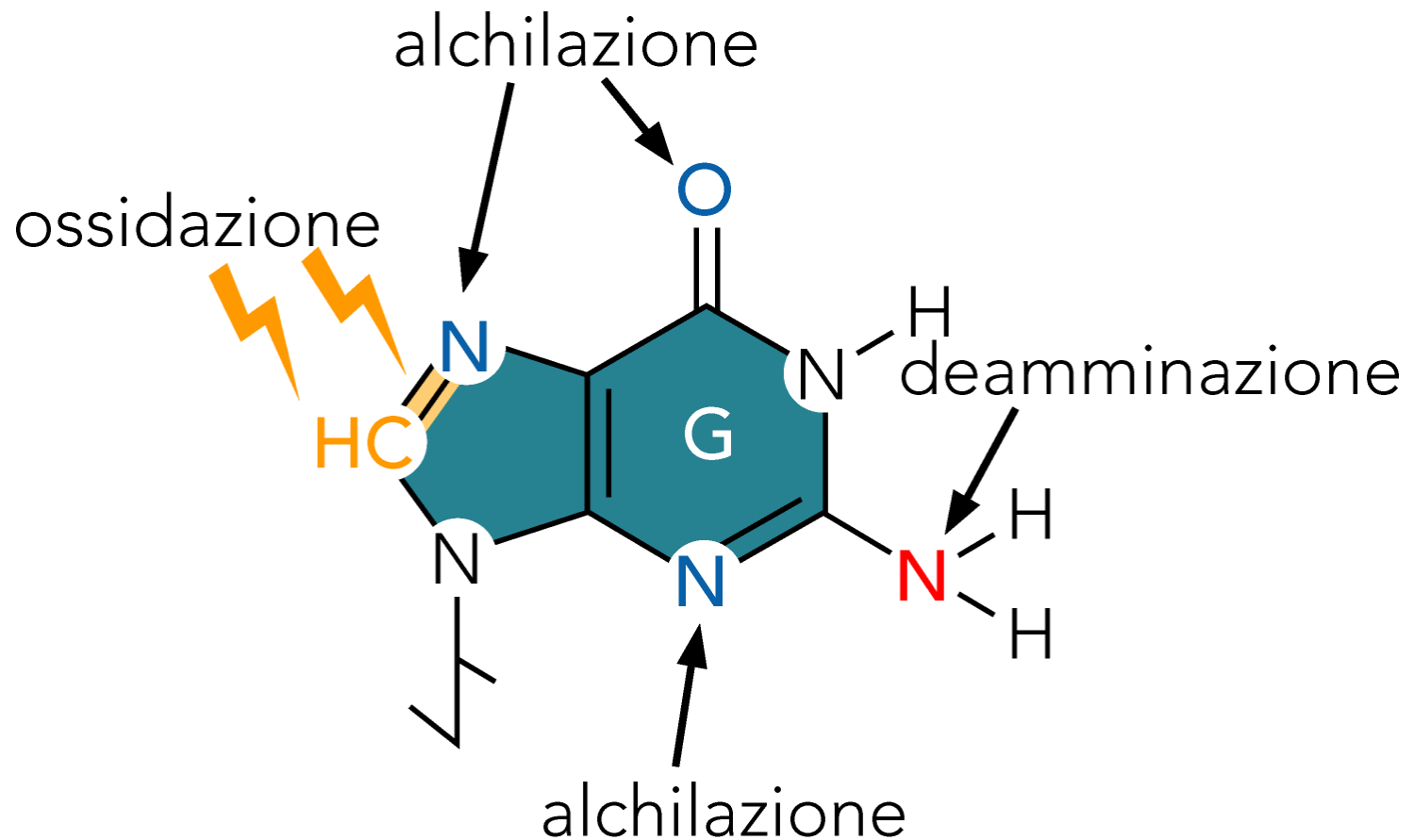
CLASSI GENERALI DEL DANNO AL DNA

- ❑ Tre classi principali di danno al DNA:
 - ✓ Cambiamenti di singole basi;
 - ✓ Distorsione strutturale;
 - ✓ Danno all'ossatura del DNA.



A summary of spontaneous alterations likely to require DNA repair.

The sites on each nucleotide that are known to be modified by spontaneous oxidative damage (*red arrows*), hydrolytic attack (*blue arrows*), and uncontrolled methylation by the methyl group donor S-adenosylmethionine (*green arrows*) are shown, with the width of each arrow indicating the relative frequency of each event.



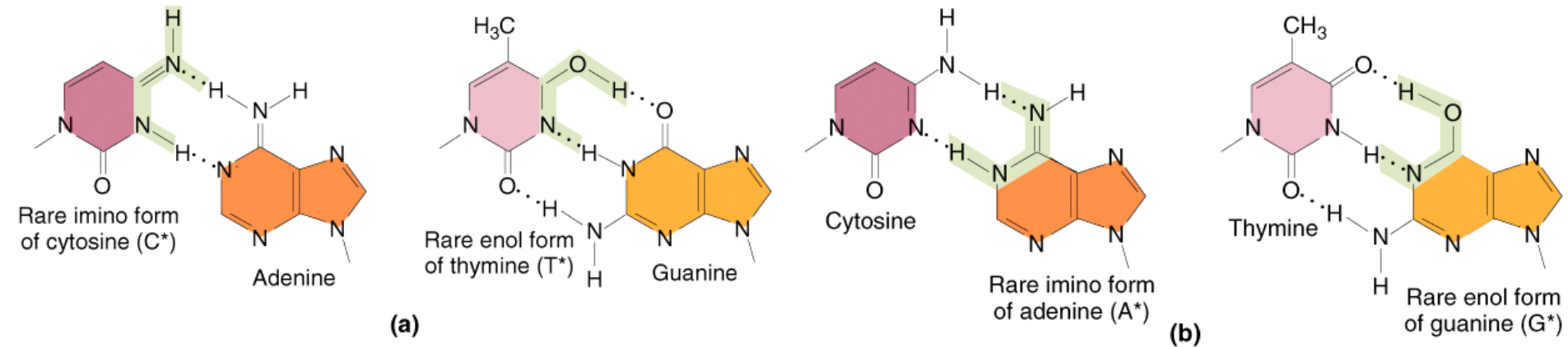
Alchilazioni, ossidazioni e radiazioni danneggiano il DNA

Alchilazione: trasferimento di gruppi metile o etile sulle basi o sui fosfati (es. nitrosammine).

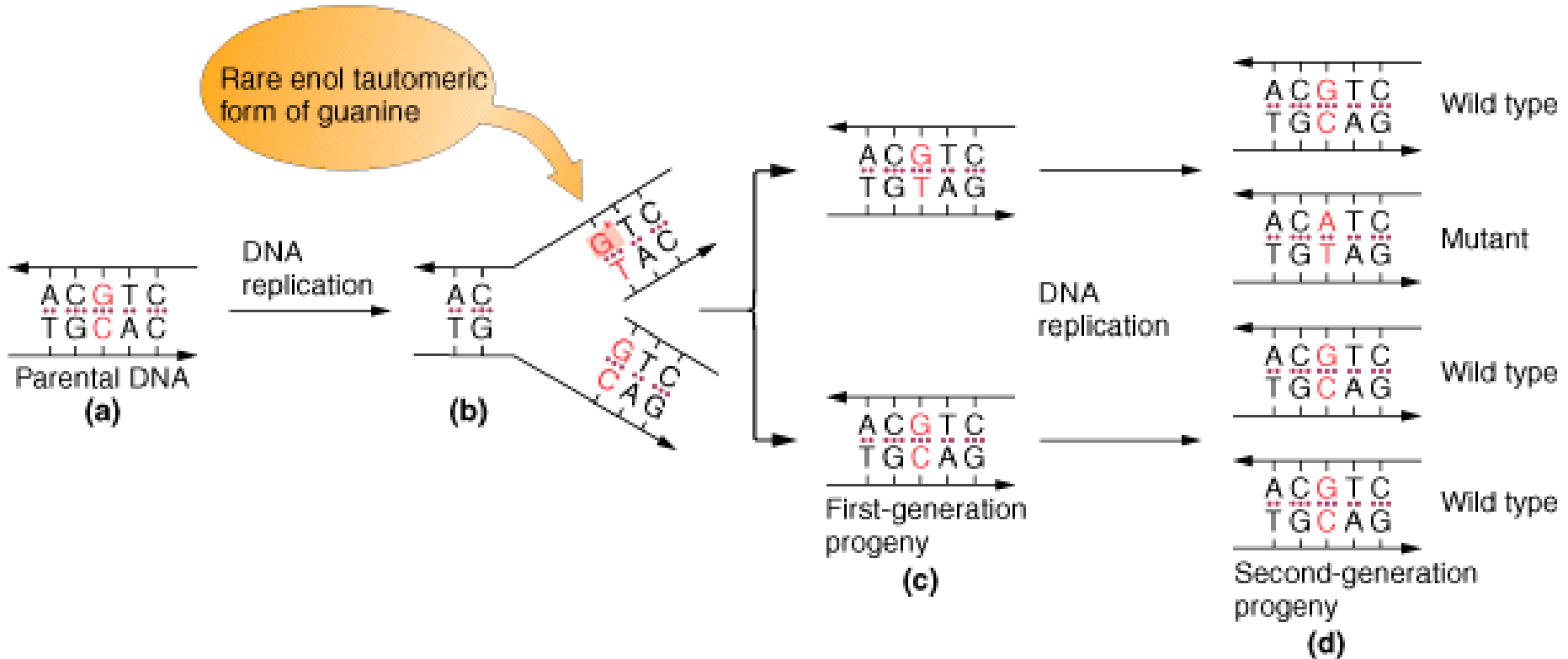
Siti specifici della G sono suscettibili al danno chimico o fisico: ad es. O6-metil G si appaia con T.

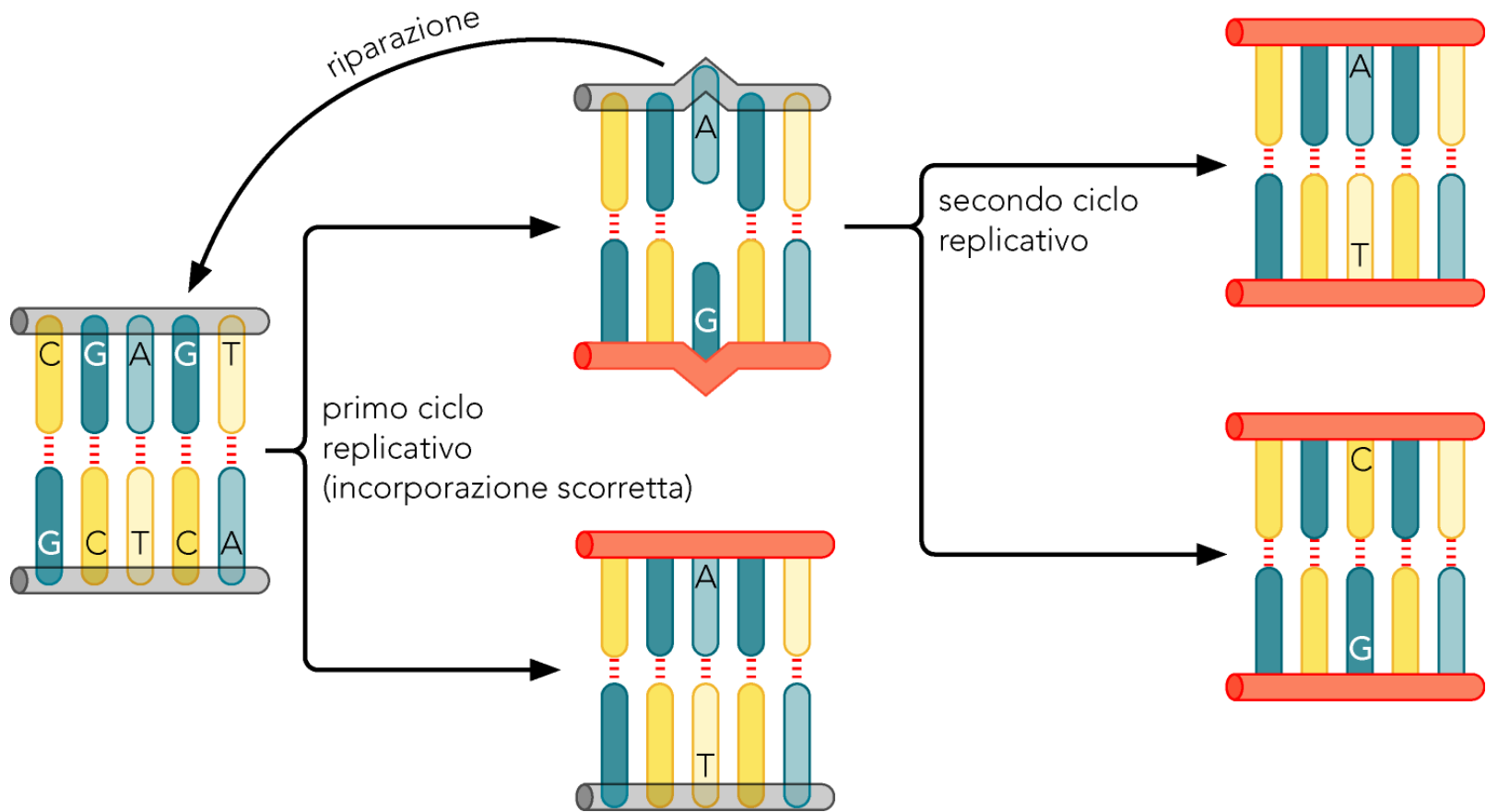
Ossidazione: reazione con forme reattive dell'ossigeno (O₂⁻, H₂O₂, OH[·]), generate da radiazioni o agenti chimici che producono radicali liberi. Per ossidazione G → 8 oxoG, fortemente mutageno perché si può appaiare con A, originando trasversioni GC→TA, molto frequenti nei tumori umani. Gli effetti cancerogeni di radiazioni e agenti ossidanti attribuiti a radicali liberi che portano a oxoG.

Shift Tautomerici delle basi causano errori nella replicazione del DNA



Rare enol tautomeric form of guanine





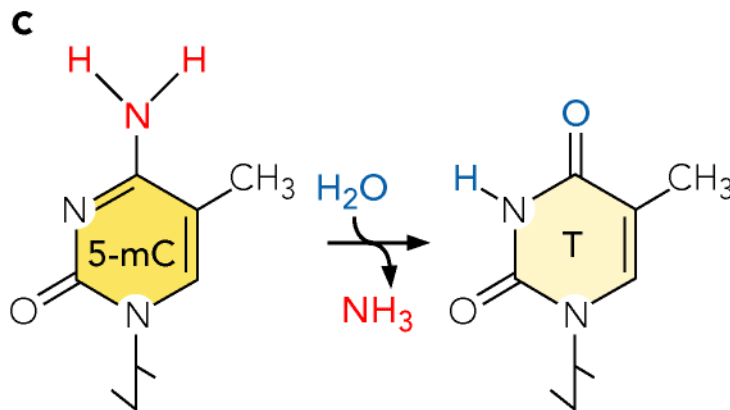
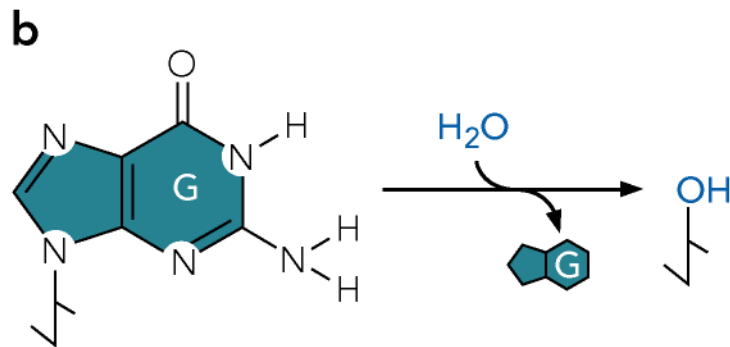
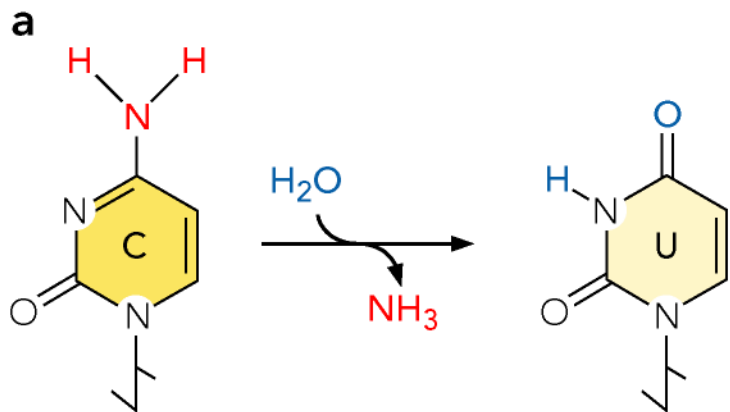
Alcuni errori di replicazione sfuggono alla correzione

Come visto, l'attività di correzione delle bozze (proofreading) aumenta la fedeltà replicativa di 100 volte.

Le basi incorrette, sfuggite a questa attività, portano ad errori di appaiamento tra neofilamento e stampo (in totale sono di 12 tipi, 3 per base). Tali mismatch, se non corretti in tempo, alla successiva replicazione vengono stabilizzati nel DNA come mutazioni.

Il danno spontaneo da idrolisi

- La deaminazione delle C, A e G: C in U; A in ipoxantina; G in xantina
- La deaminazione della 5meC: C in T
- L'attacco al legame N- β -glicosidico tra la base e lo zucchero: sito AP (problema del sito AP durante la replicazione)



Mutazioni dovute a danno idrolitico

Le mutazioni possono insorgere non solo per errori di replicazione ma anche per danni al DNA.

Alcuni sono danni ambientali (radiazioni, sostanze mutagene), altri spontanei.

Ad es. l'acqua può originare, per idrolisi, i seguenti danni spontanei:

Deaminazione di $C \rightarrow U$ (per questo il DNA contiene T invece di U). Anche le Pu possono essere deaminate:

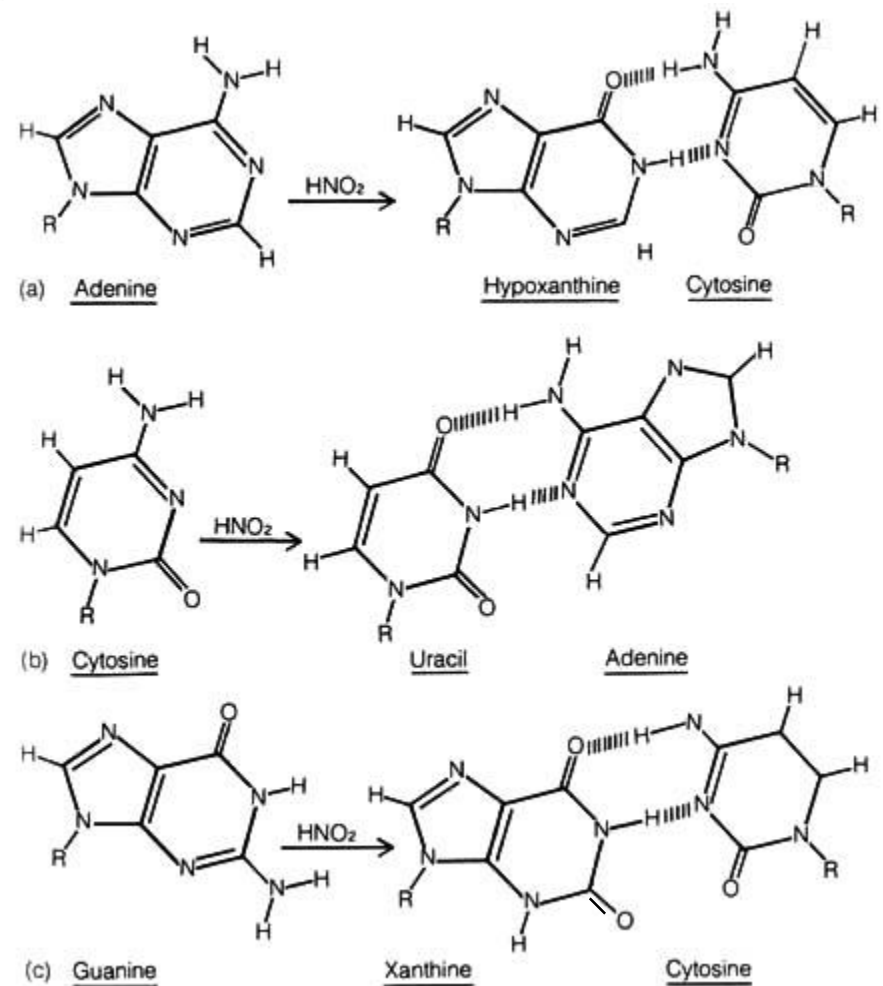
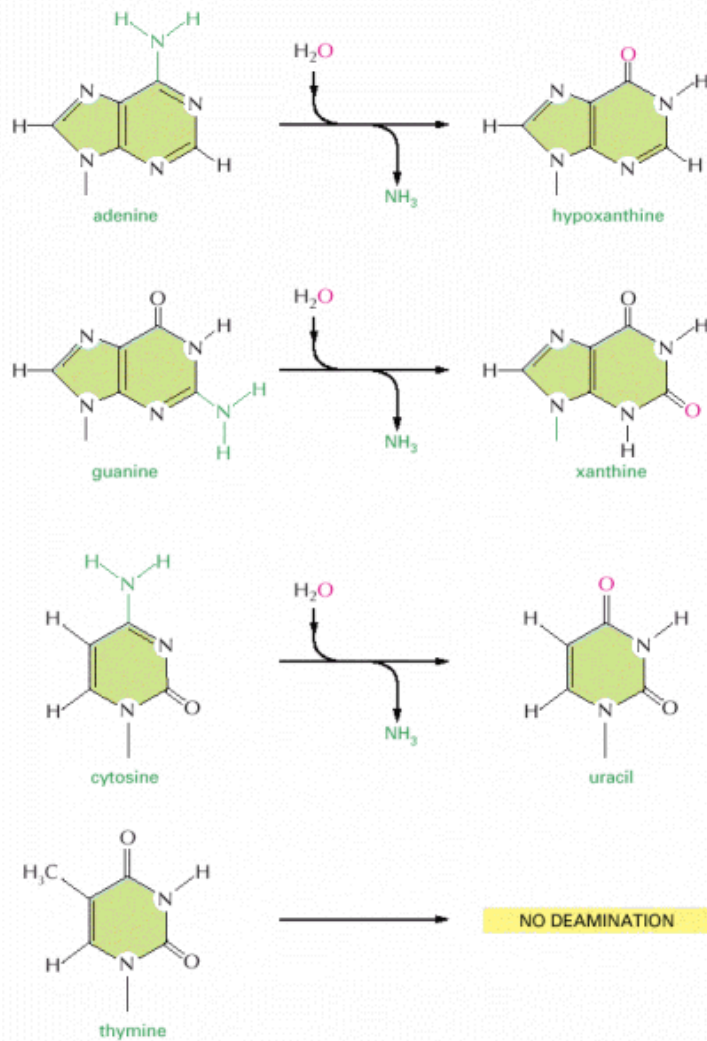
$A \rightarrow I$ (Ipoxantina si lega a C);
 $G \rightarrow X$ (Xantina si lega a C);

Depurinazione (es. idrolisi del legame glicosidico di G) $\rightarrow$ DNA apurinico;

Deaminazione della 5-MeC $\rightarrow$ T. Nei vertebrati la 5-MeC è frequente ed importante nel silenziamento genico; la sua deaminazione fissa la transizione $C \rightarrow T$ alla replicazione successiva, per cui le 5MeC sono punti caldi di mutazione.

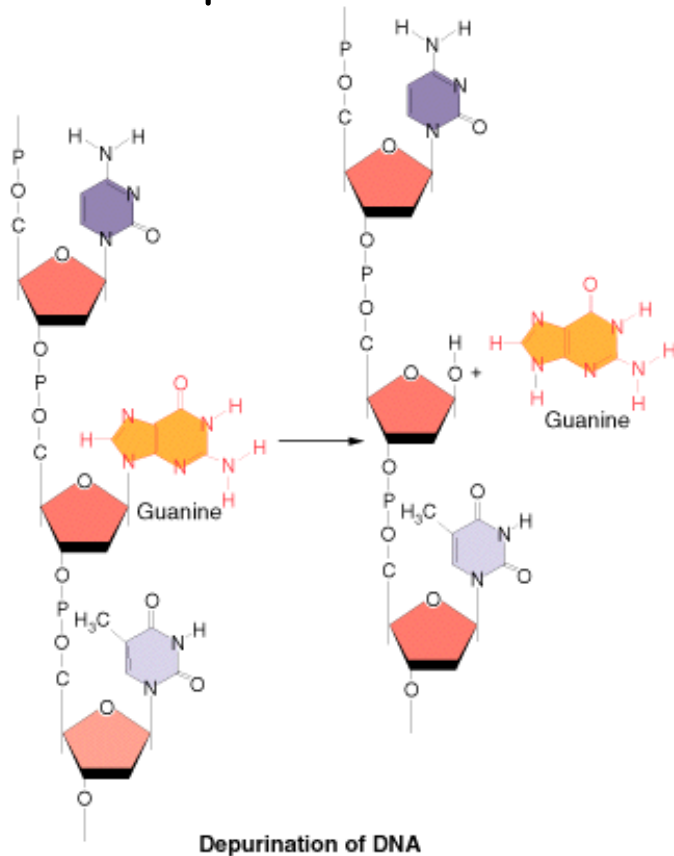
NATURAL DNA BASES

UNNATURAL DNA BASES



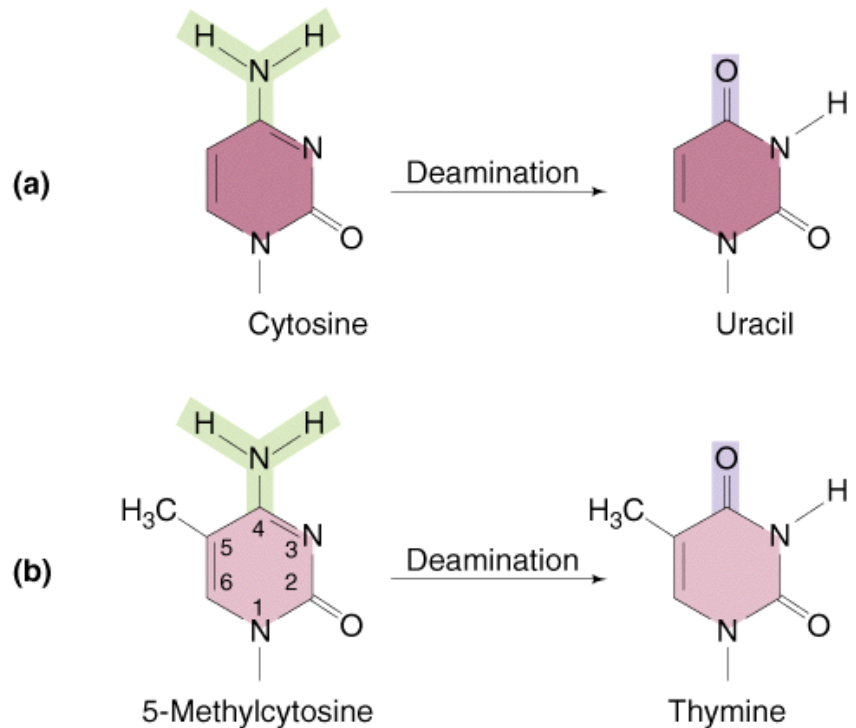
Deamination of bases and mispairing in the subsequent DNA replication round if damage is not repaired.

Depurinazione



Un a singola cellula perde
>10,000 purine/giorno! Ma la
maggior parte dei siti sono
riparati

Deaminazione



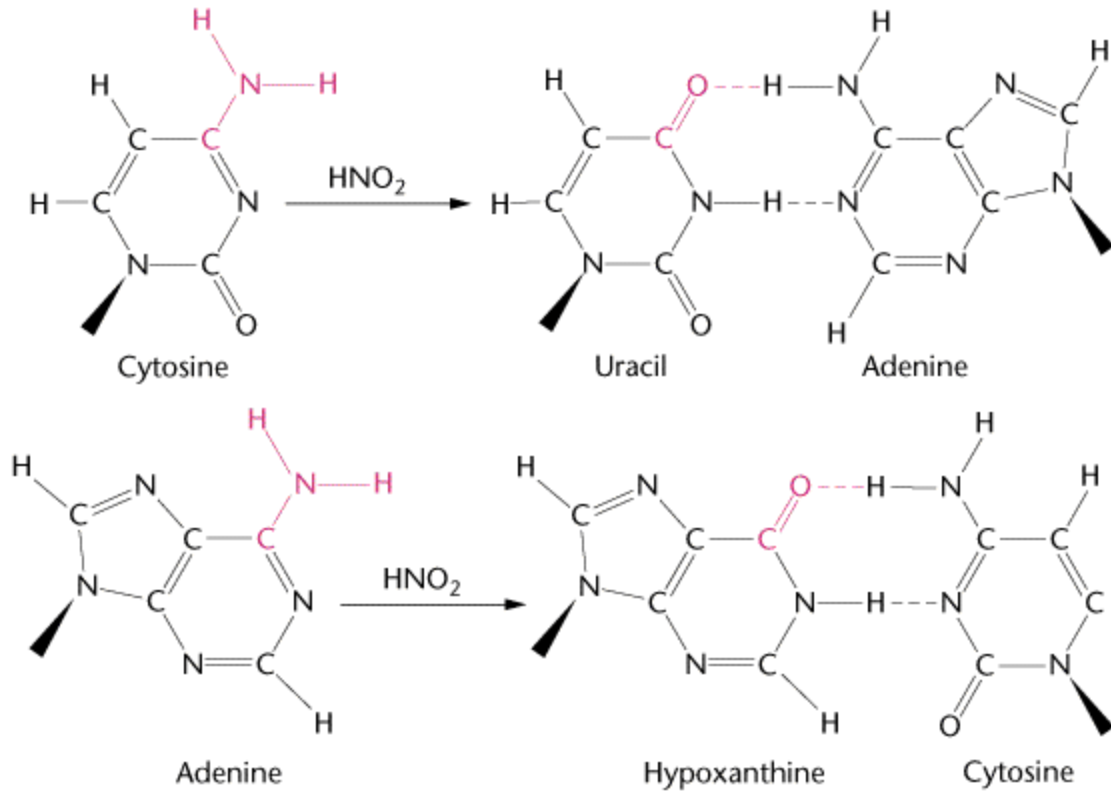
La timina invece non e' riconosciuta dai
sistemi di riparo, per cui questo
meccanismo e' comune causa di mutazione .

Il danno ossidativo

Responsabili: agenti alchilanti (ambiente) e specie reattive dell'ossigeno (derivati del metabolismo aerobico e dai sistemi di detossificazione epatici)

- Deaminazione da acido nitroso (da NaNO_3 e nitrosamine e altri sali di nitrato) o da ione bisolfito; HNO_2 e HSO_3^- reagiscono con A e C.
- Ossidazione di basi e zuccheri da H_2O_2 , $\cdot\text{OH}^-$, $\cdot\text{O}_2^-$: ossidazione di basi e di zuccheri, sito AP e rotture sul DNA.

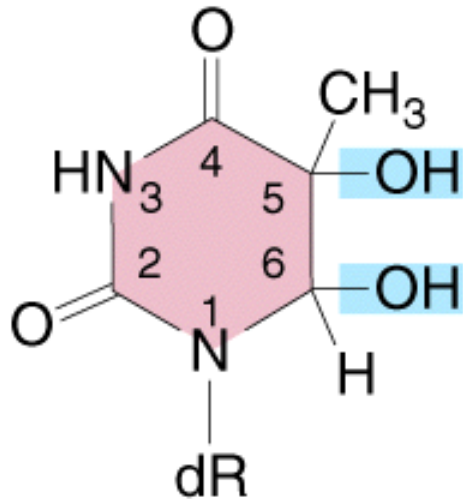
Mutagenesis by Nitrous Acid (HNO_2)



(Klug & Cummings 1997)

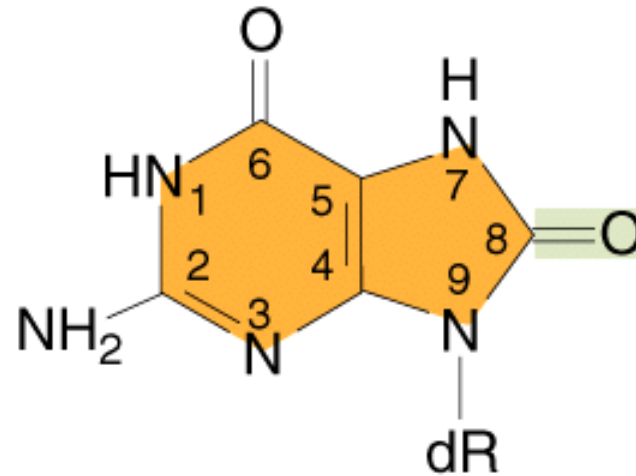
Lesioni spontanee

basi danneggiate da danno ossidativo



Thymidine glycol

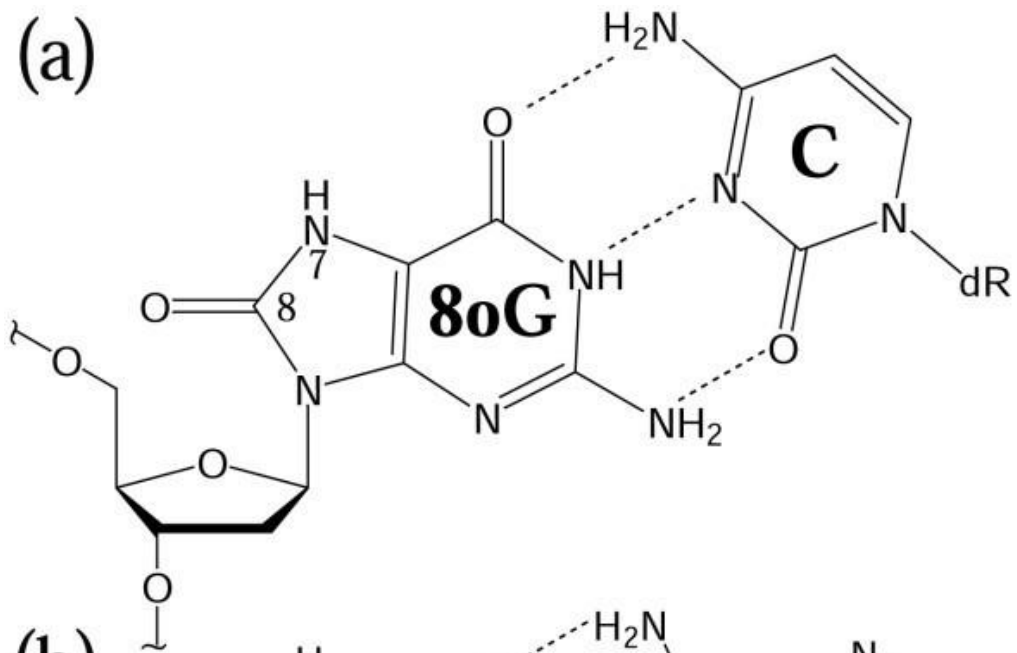
Blocca la replicazione del DNA



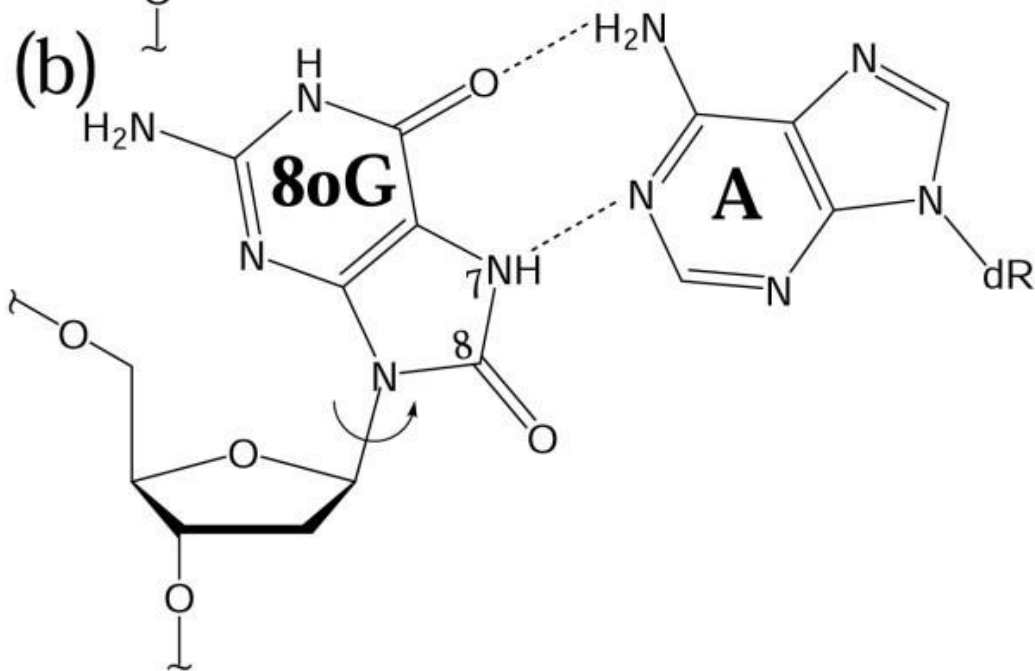
8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine
(8-oxodG)

Si appaia con A dando luogo ad una
trasversione G-T

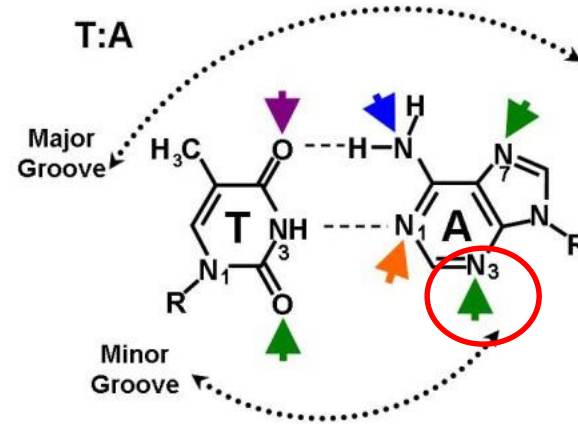
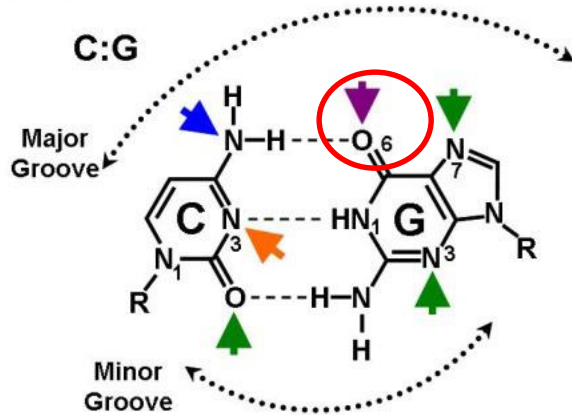
Il danno ossidativo avviene naturalmente, ma la sua frequenza aumenta con le radiazioni ionizzanti che creano specie reattive dell'ossigeno.



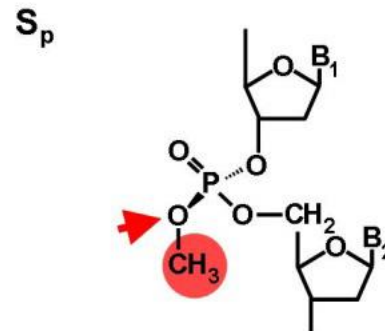
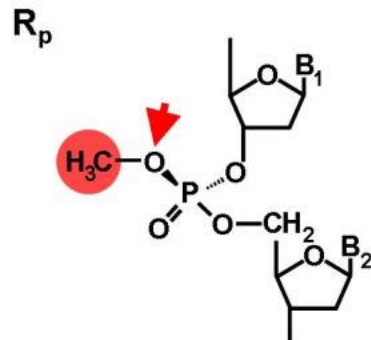
La 8-oxoguanina può indurre una transversione appaiandosi con un'adenina se è in forma syn (trasversione più frequente nei tumori umani)

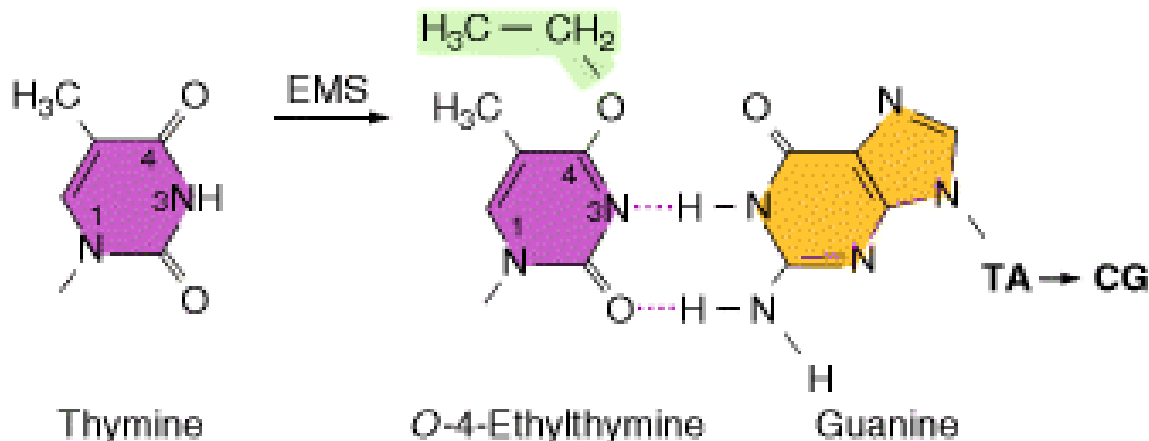
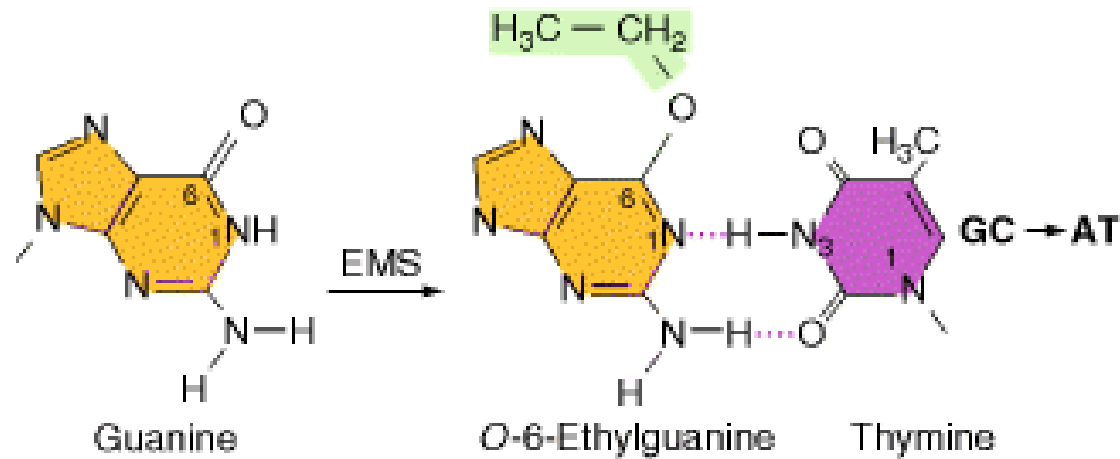


(A) DNA base pairs



(B) DNA backbone phosphate

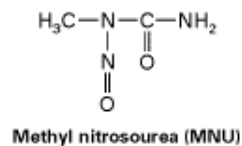
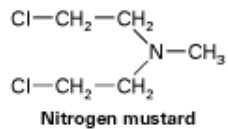
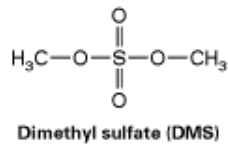
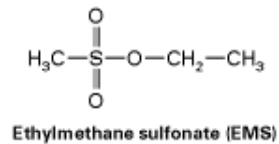
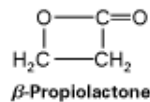




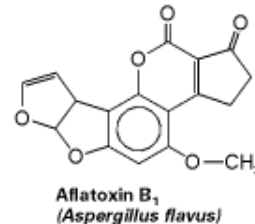
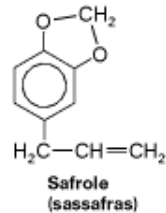
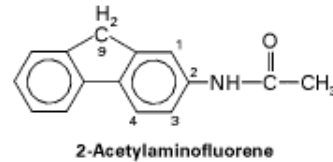
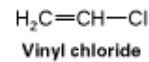
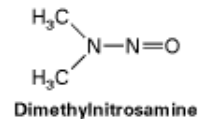
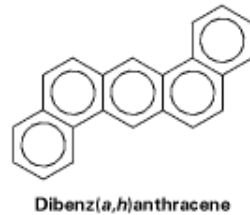
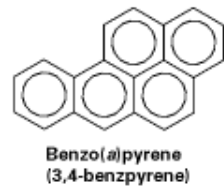
Alkylation-induced mispairing.

The alkylation (in this case, EMS-generated ethylation) of the O-6 position of guanine, as well as the O-4 position of thymine, can lead to direct mispairing with thymine and guanine, respectively, as shown here. In bacteria, where mutations have been analyzed in great detail, the principal mutations detected are G·C to A·T transitions, indicating that the O-6 alkylation of guanine is most relevant to mutagenesis.

DIRECT-ACTING CARCINOGENS



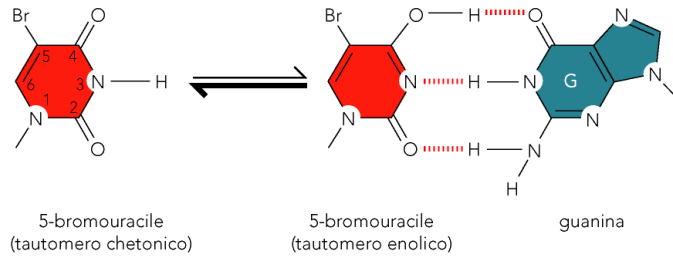
INDIRECT-ACTING CARCINOGENS



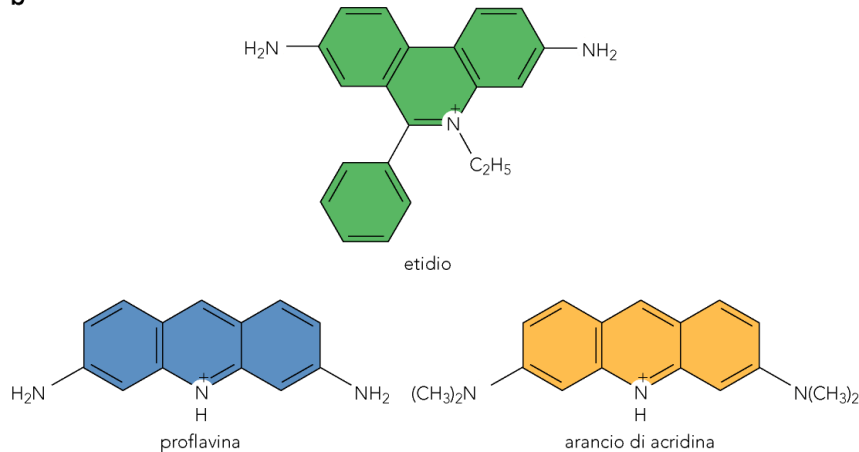
BaP tramite ossidrilazione enzimatica diventa un epossido che reagisce con N2 guanina e N6 adenina

La mostarda azotata (mecloretrammina) corsslinka due G contigue

a



b



Mutazioni causate da analoghi delle basi ed agenti intercalanti

A) Molti analoghi, essendo simili alle basi, sono assunti dalle cellule, convertiti in dNTP e incorporati nel DNA nella replicazione, ma spesso si appaiano in modo incorretto: es. il 5-bromouracile, analogo della T, è uno dei mutageni più potenti, potendosi appaiare in forma enolica alla G.

B) Gli agenti intercalanti, caratterizzati da strutture policicliche possono infilarli fra 2 bp nella doppia elica. Proflavina, acridina e etidio inducono inserzioni/delezioni di una o più bp alla replicazione.

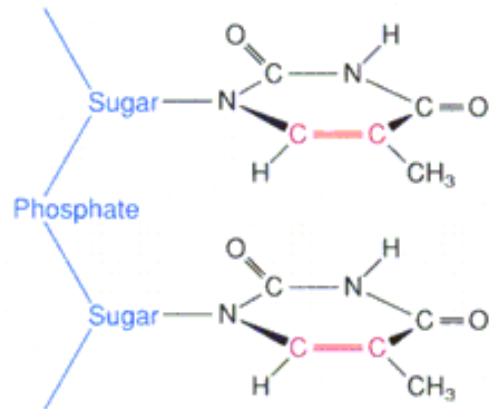
Danni da radiazioni

- Radiazioni ionizzanti: raggi UV, cosmici e elementi radioattivi

Raggi UV (200-400 nm): dimeri di T o C generano anello ciclobutanico (C5-C6) e fotoprodotto 6-4 (C6-C4).

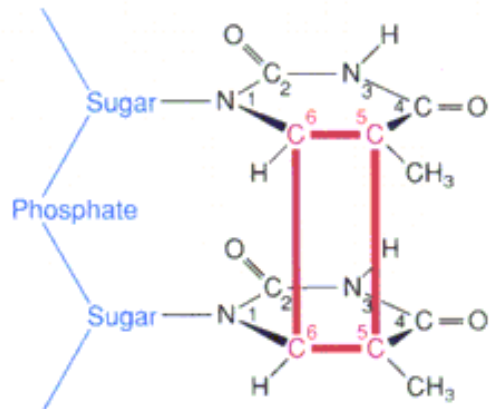
Raggi X e γ generano specie reattive dell'ossigeno e generano rotture sul singolo o doppio filamento

Formazione di dimeri di pirimidine per azione di raggi UV (220-300 nm)

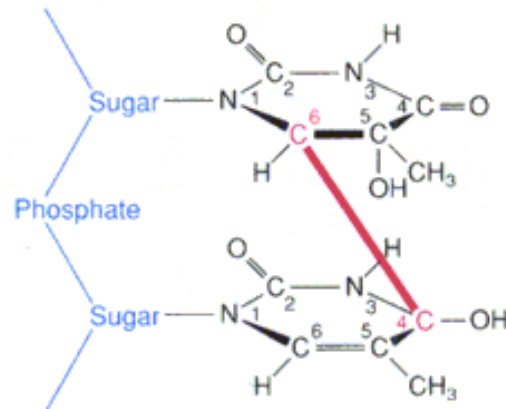


Adjacent thymine residues

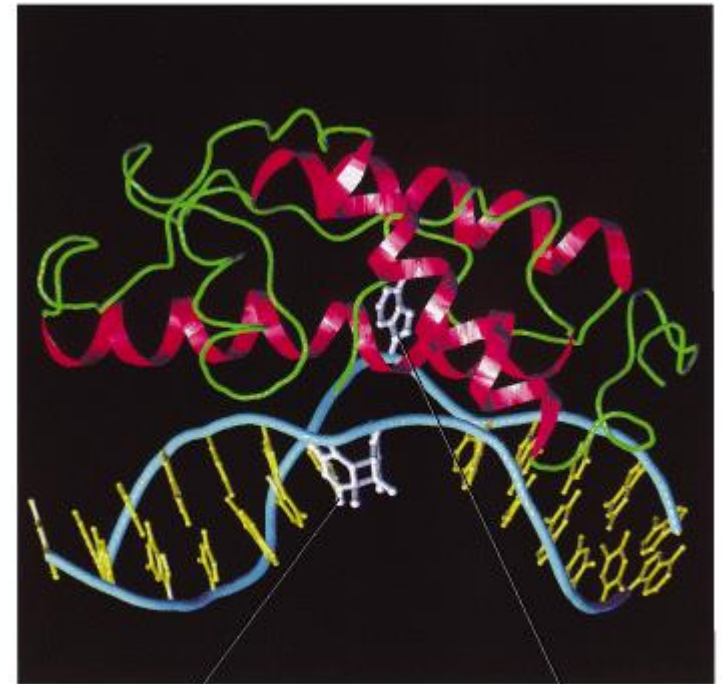
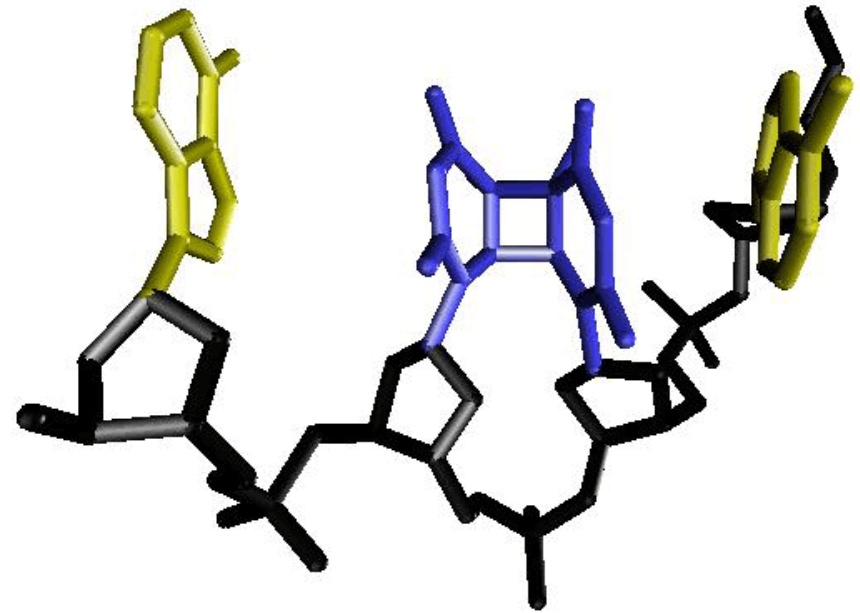
UV light



(a) Cyclobutane thymine dimer

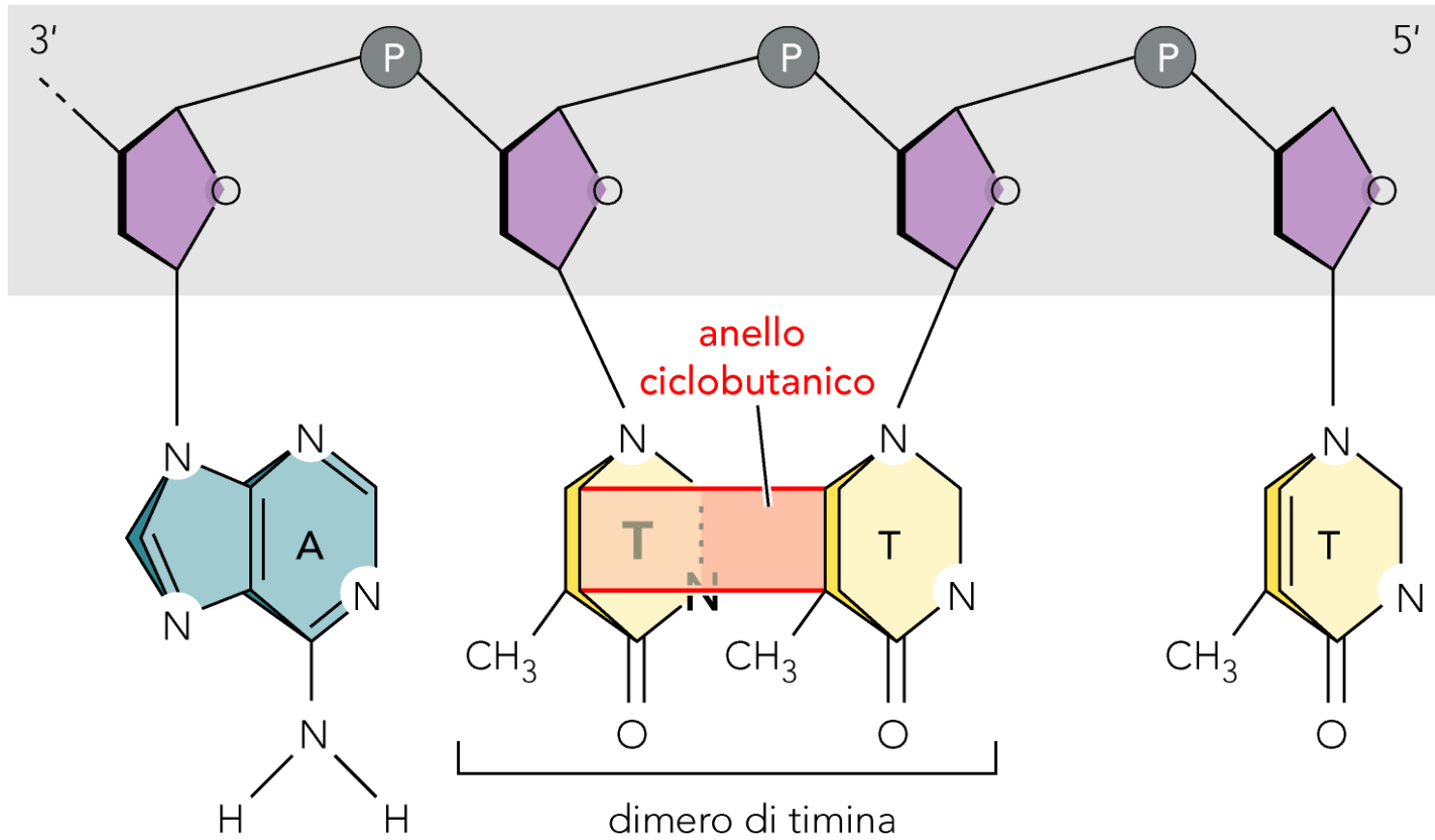


(b) 6-4 photoproduct



Thymine-thymine dimer

Adenine



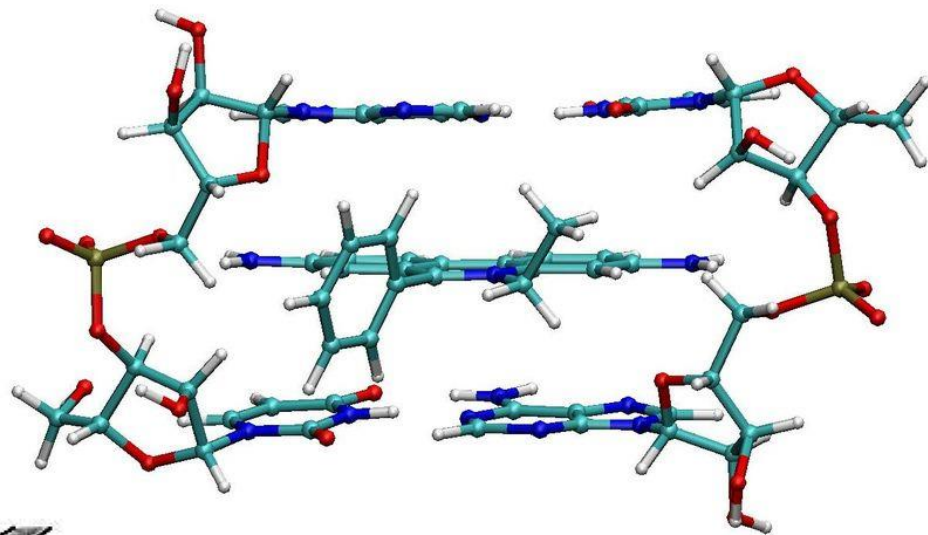
Radiazioni UV e ionizzanti

I raggi UV inducono fusione fotochimica di 2 pirimidine adiacenti (formazione di anello ciclobutilico). I dimeri di T sono incapaci di legarsi a H con le basi complementari e bloccano la replicazione.

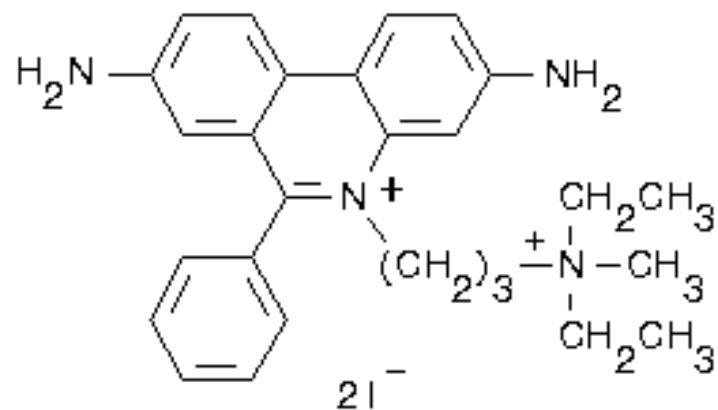
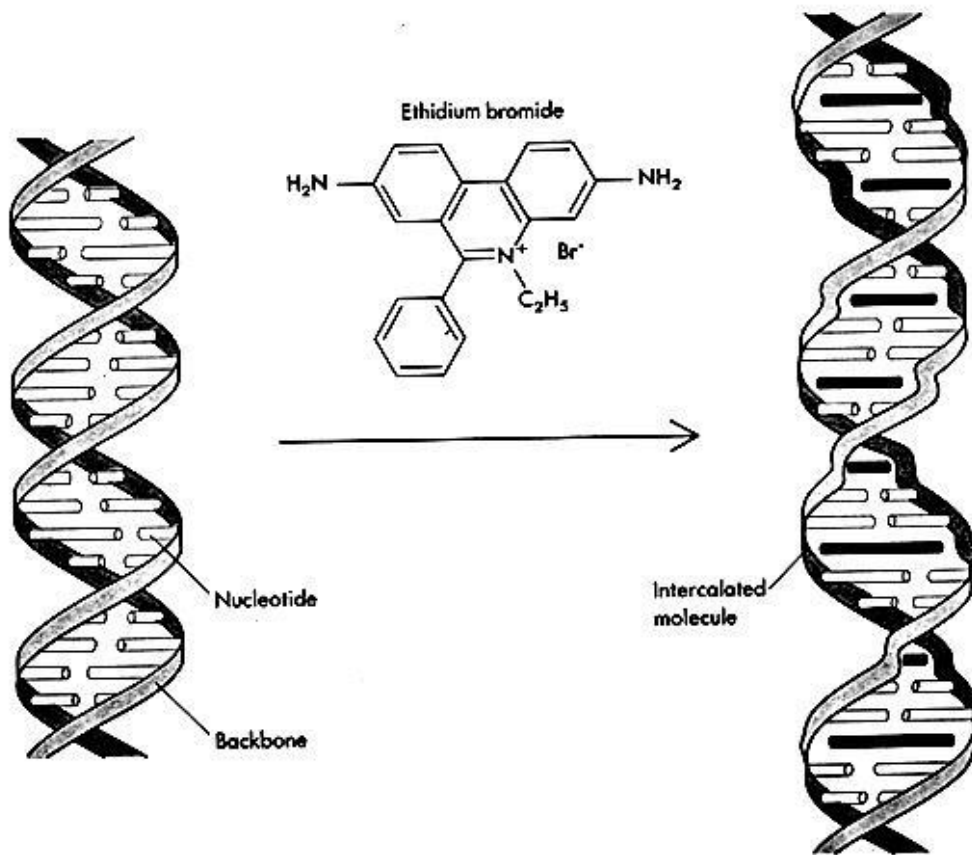
Le radiazioni ionizzanti (raggi x e γ) possono provocare: a) rotture a doppio filamento, molto difficili da riparare, b) ionizzare il d-ribosio, c) creare specie reattive dell'ossigeno.

Paradossalmente sia le radiazioni ionizzanti che le sostanze che rompono il DNA, come bleomicina (clastogeni), sono utilizzate nella terapia antitumorale perché impediscono la proliferazione.

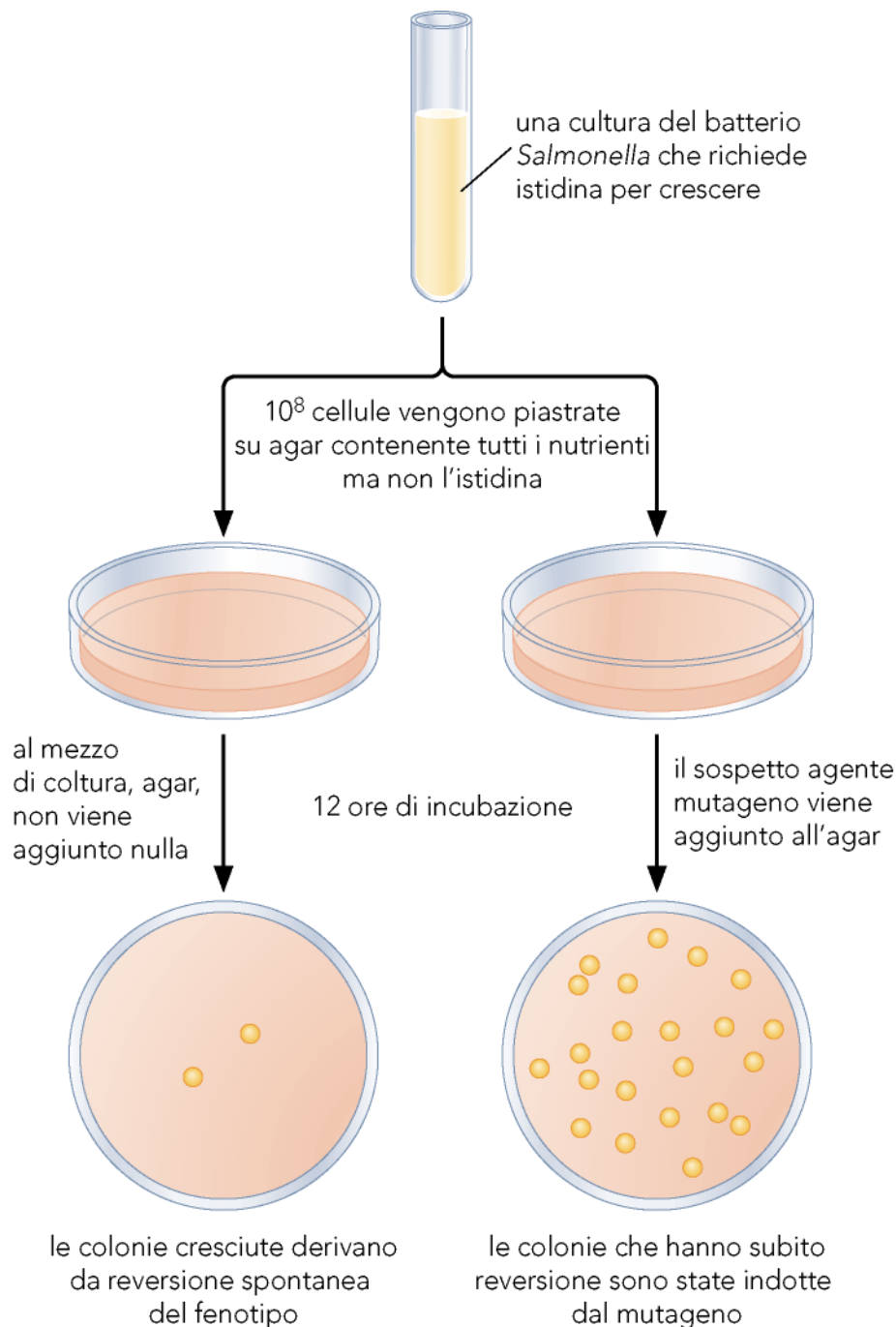
DNA intercalating agents



Intercalated ethidium

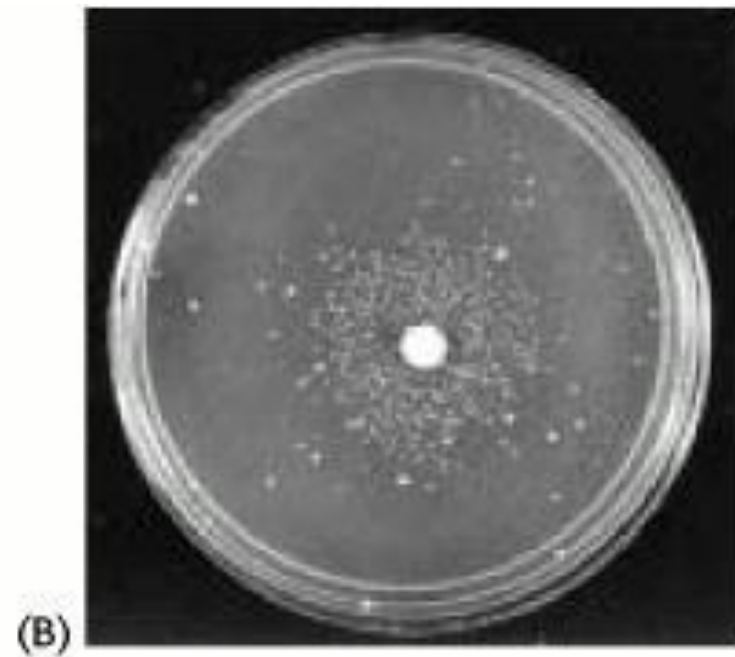
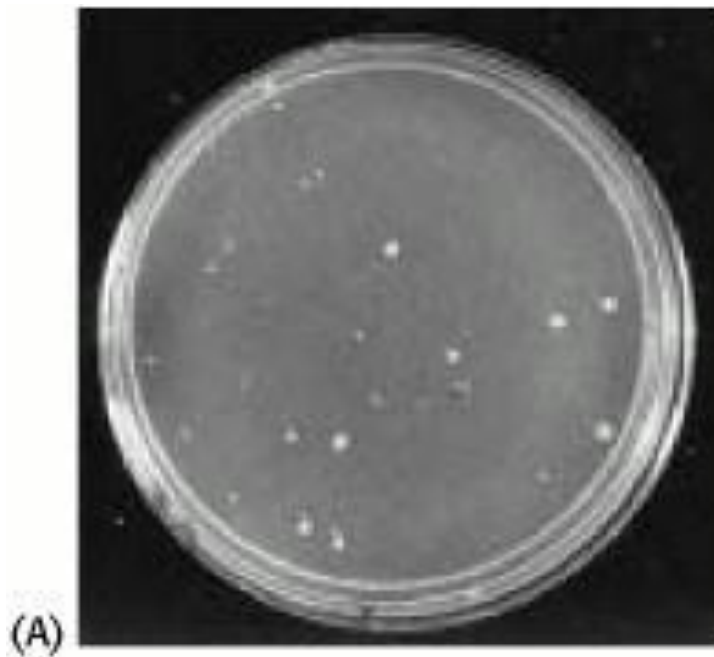


Propidium



Test di Ames

Serve per stabilire la mutagenicità (e quindi potenziale cancerogenicità) di una sostanza. Viene utilizzato un particolare ceppo mutante (auxotrofo) di *Salmonella typhimurium*, che richiede istidina per crescere. In presenza di una sostanza mutagena, alcune cellule recuperano la capacità di crescere anche in assenza dell'amminoacido, per reversione della mutazione originale. Più è potente il mutageno, maggiore è il numero di colonie. Alcune sostanze diventano cancerogene solo dopo essere passate dal fegato, pertanto nel test di Ames vengono prima trattate con un estratto epatico, prima di essere saggiate negli animali.



Test di mutagenicità di Ames:

A) controllo: sporadici cloni retromutanti “spontanei”

B) test: nel centro del piatto è stata posta una quantità della sostanza mutagenica che diffondendo ha provocato numerosi cloni retromutanti