



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

---

## La conversione genica -le mutazioni 1



Lezione 10



## Mutazioni



A livello del DNA si distinguono classicamente diversi tipi di mutazione:



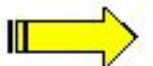
**Sostituzioni di base** : di solito comportano la sostituzione di singole basi. Sostituzioni simultanee di basi contigue possono derivare da fenomeni di conversione genica.



**Delezioni**: perdita di uno o piu' nucleotidi



**Inserzioni**: uno piu' nucleotidi vengono inseriti in una sequenza. Nell'uomo e piu'in generale nei mammiferi la trasposizione avviene attraverso un intermedio di RNA.





## **CONVERSIONE GENICA questa sconosciuta**

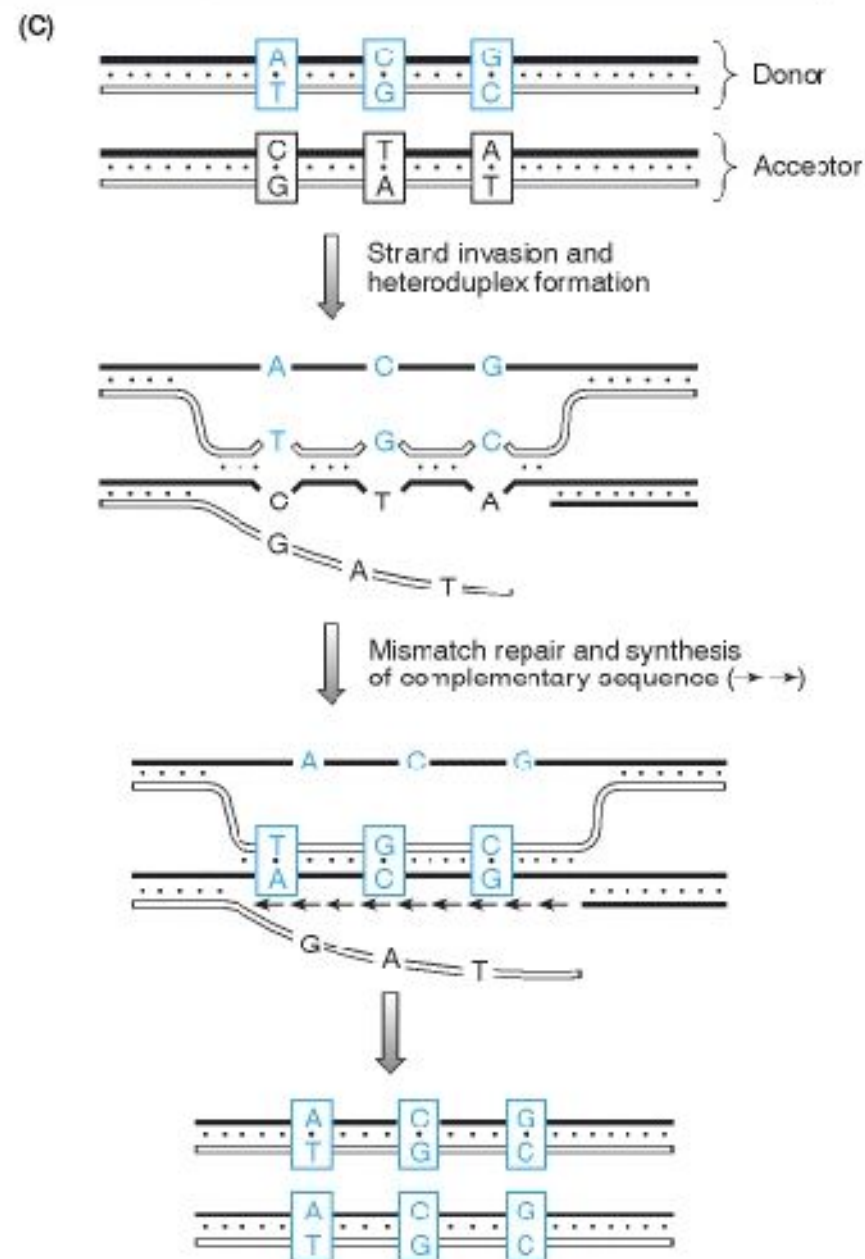
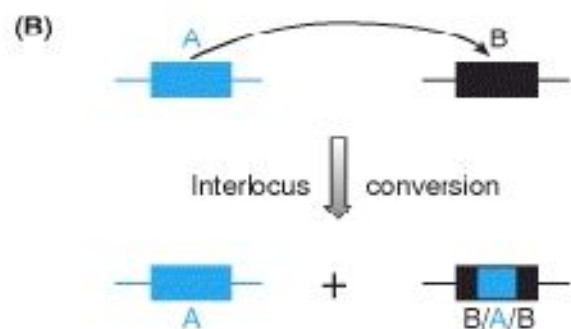
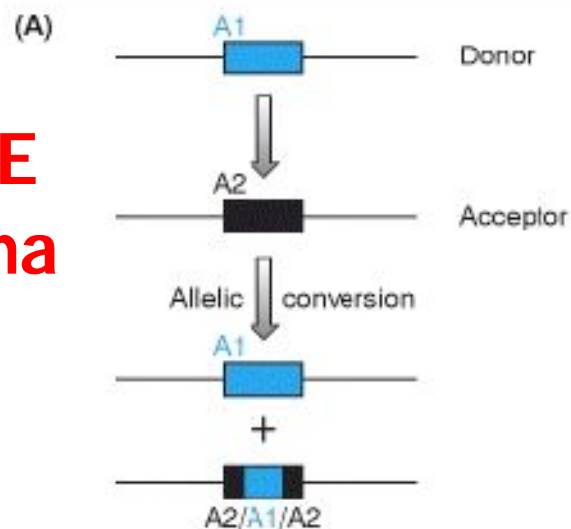
**Definizione: scambio non reciproco fra sequenze per effetto del quale una sequenza (accettrice) diventa identica alla sequenza donatrice che rimane inalterata. Può avvenire fra sequenze alleliche (conversione genica interallelica) o non alleliche (conversione genica interlocus)**

**Descritta nella Neurospora crassa (muffa del pane con aschi ordinati) grazie all'analisi delle tetradi ordinate....., in altri organismi solo supposta perché indistinguibile da un evento di doppio crossingover anche se statisticamente improbabile. La conoscenza della struttura del genoma umano e il suo sequenziamento oggi permettono di iscriverla fra i meccanismi che sono all'origine dell'instabilità e della variabilità anche nell'uomo.**



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

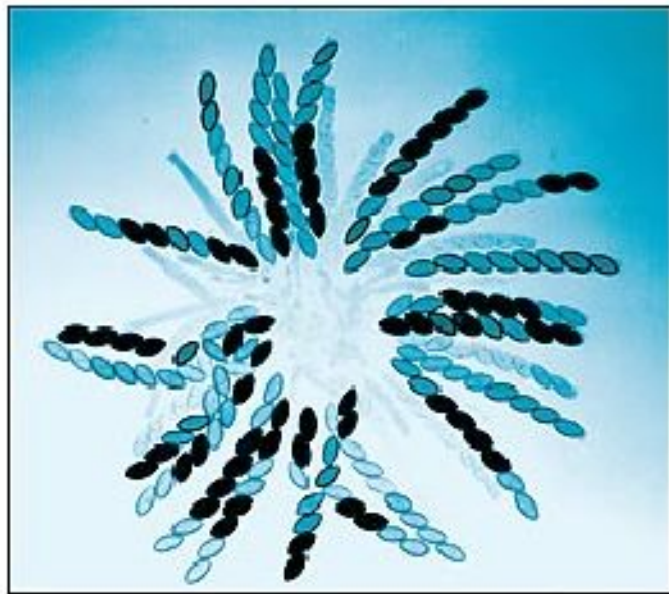
## CONVERSIONE GENICA schema



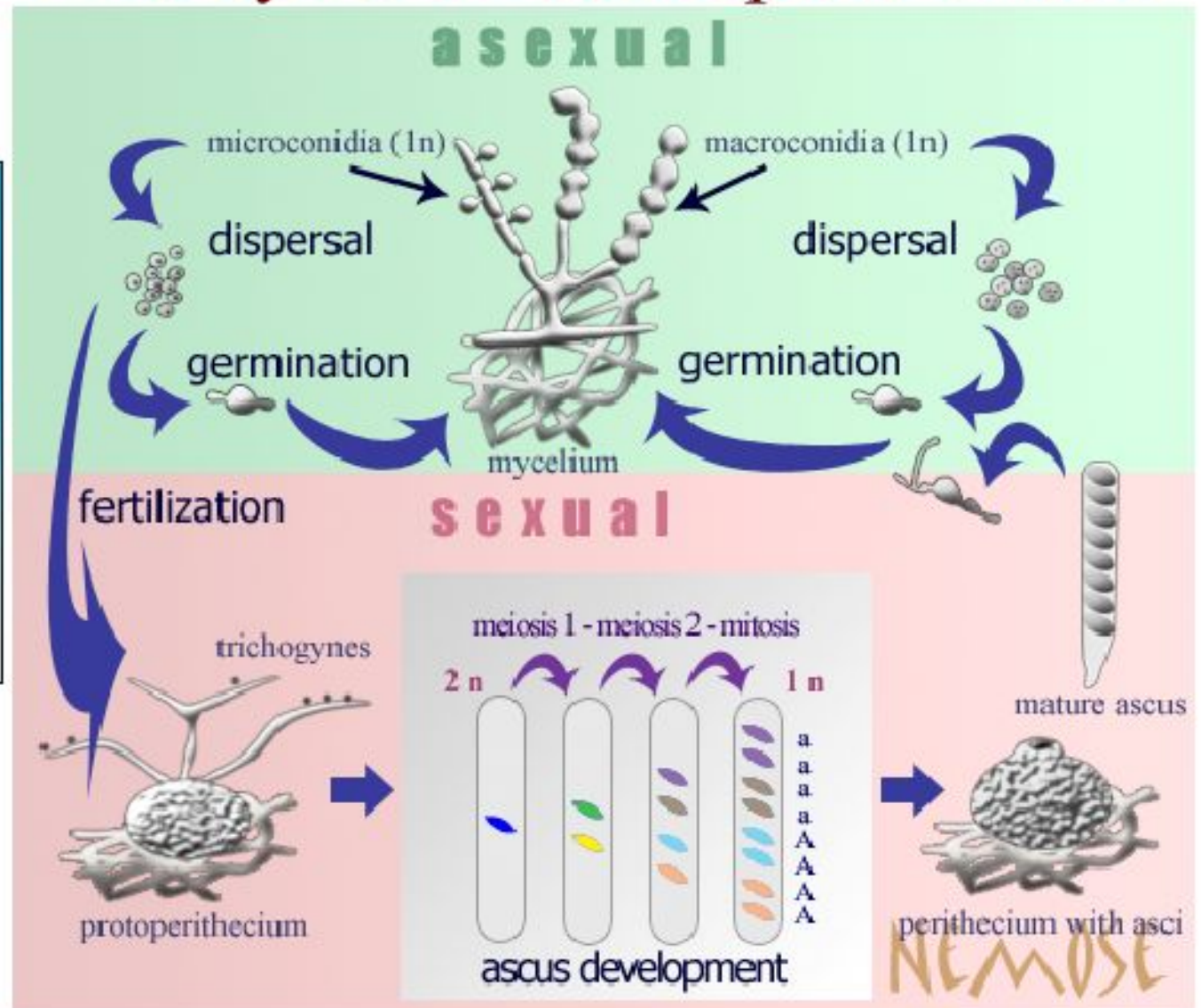


# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## La Neurospora



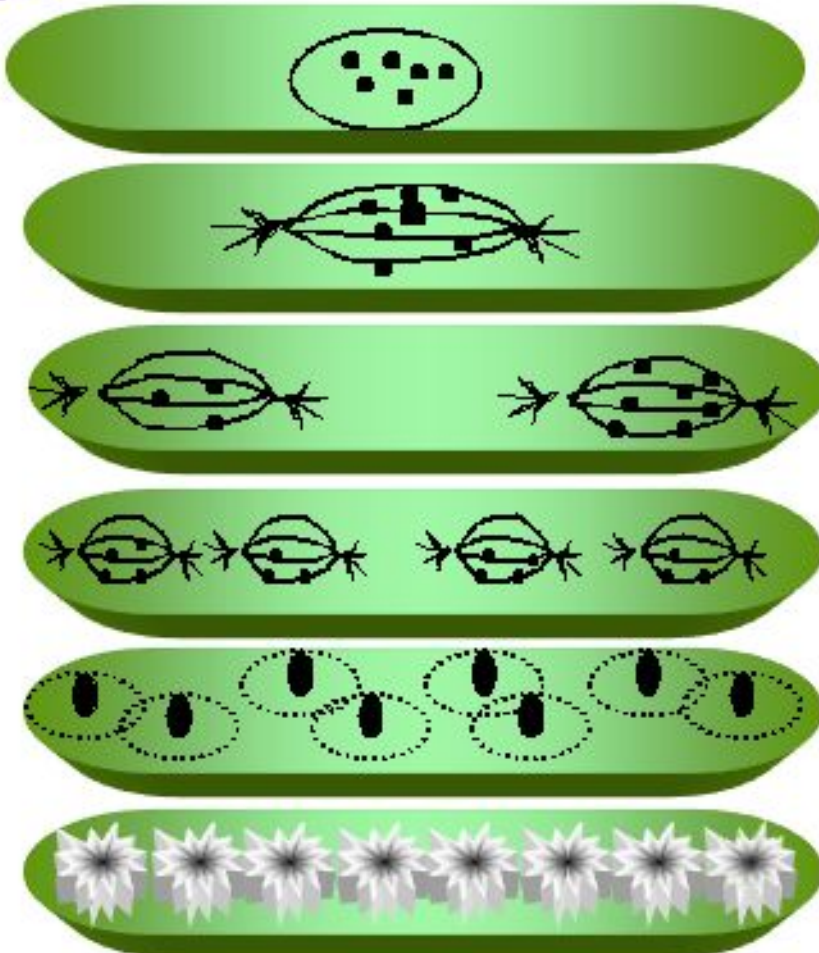
## Life cycle of *Neurospora crassa*





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## meiosi e formazione delle ascospore



Zigote diploide

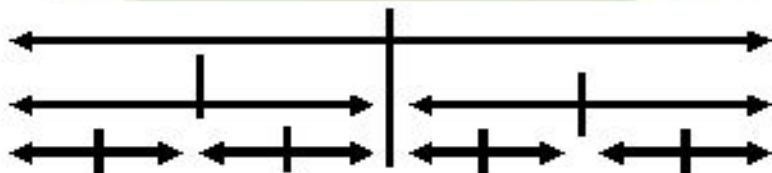
Anafase prima divisione meiotica

Anafase seconda divisione meiotica

Anafase divisione mitotica

Inizio formazione di otto spore aploidi per asco

Asco con otto spore aploidi mature



Prodotti prima divisione meiotica

Prodotti seconda divisione meiotica

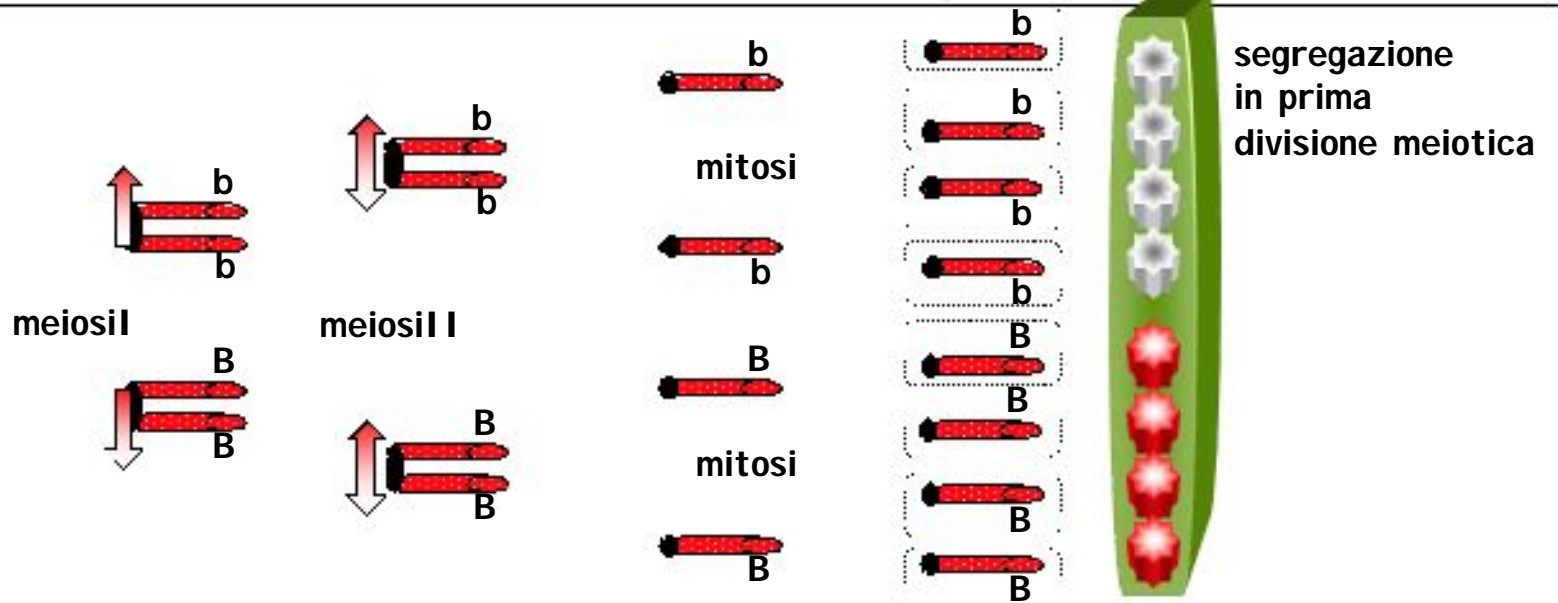
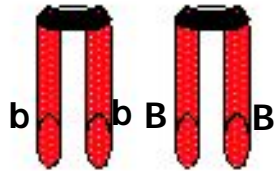
Prodotti divisione mitotica



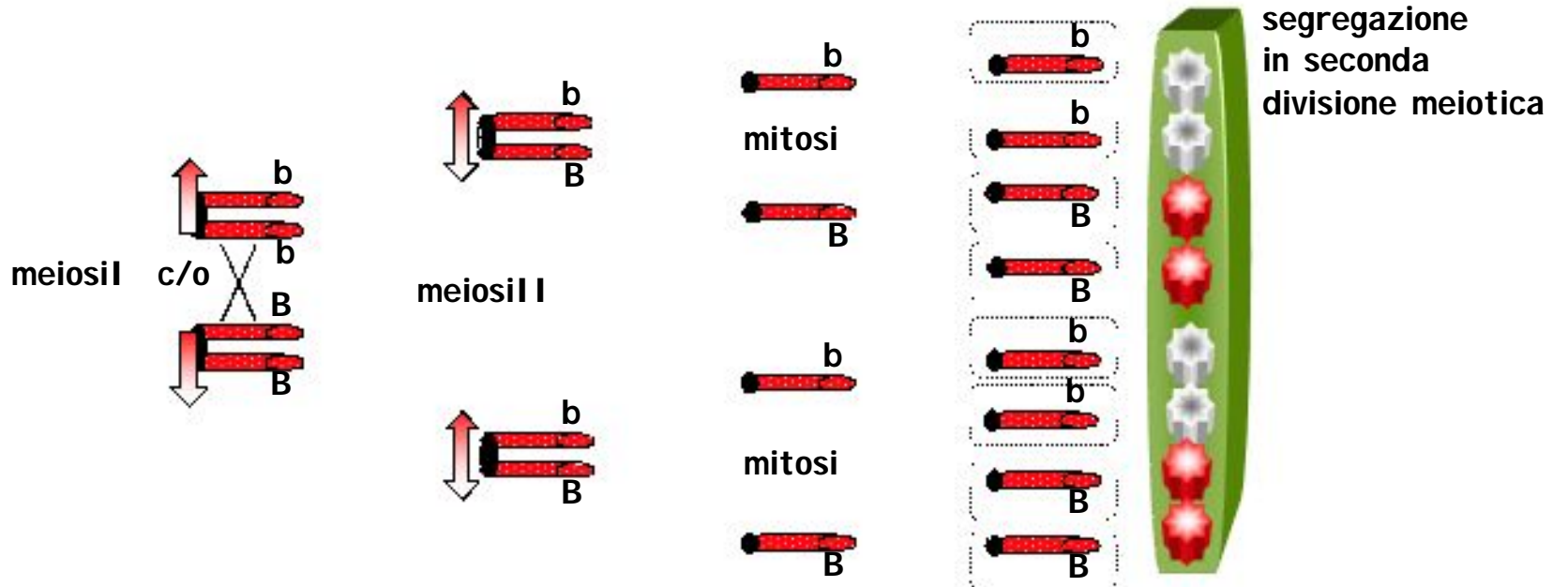
# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

meiosi

assenza di ricombinazione  
nessun crossing over



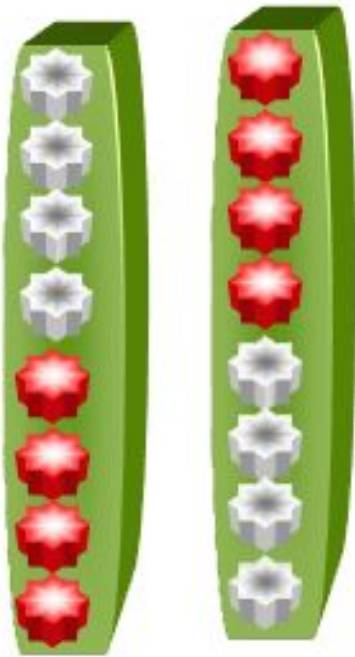
ricombinazione  
crossing over



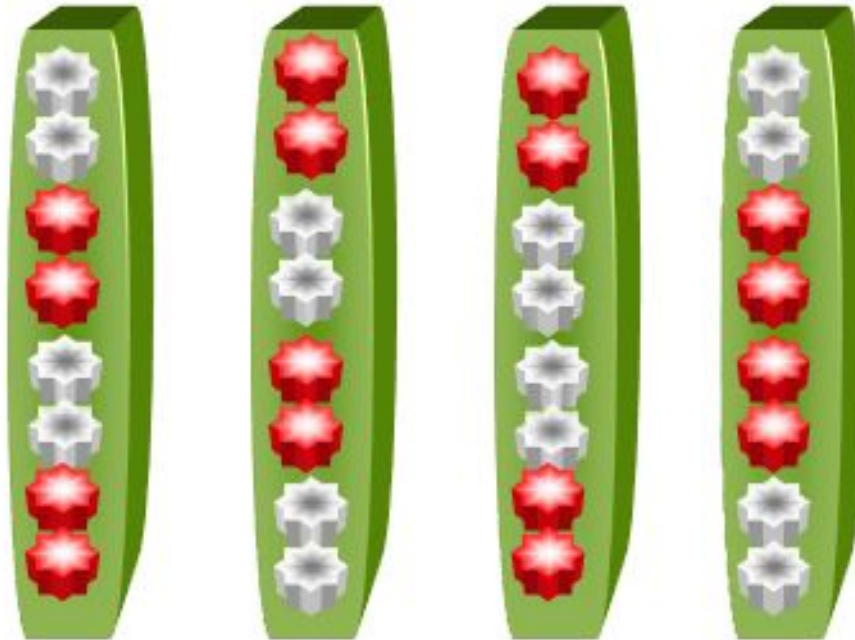


# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

aschi non ricombinanti vs. ricombinanti



Segregazione in I  
divisione meiotica



Segregazione in II divisione meiotica





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

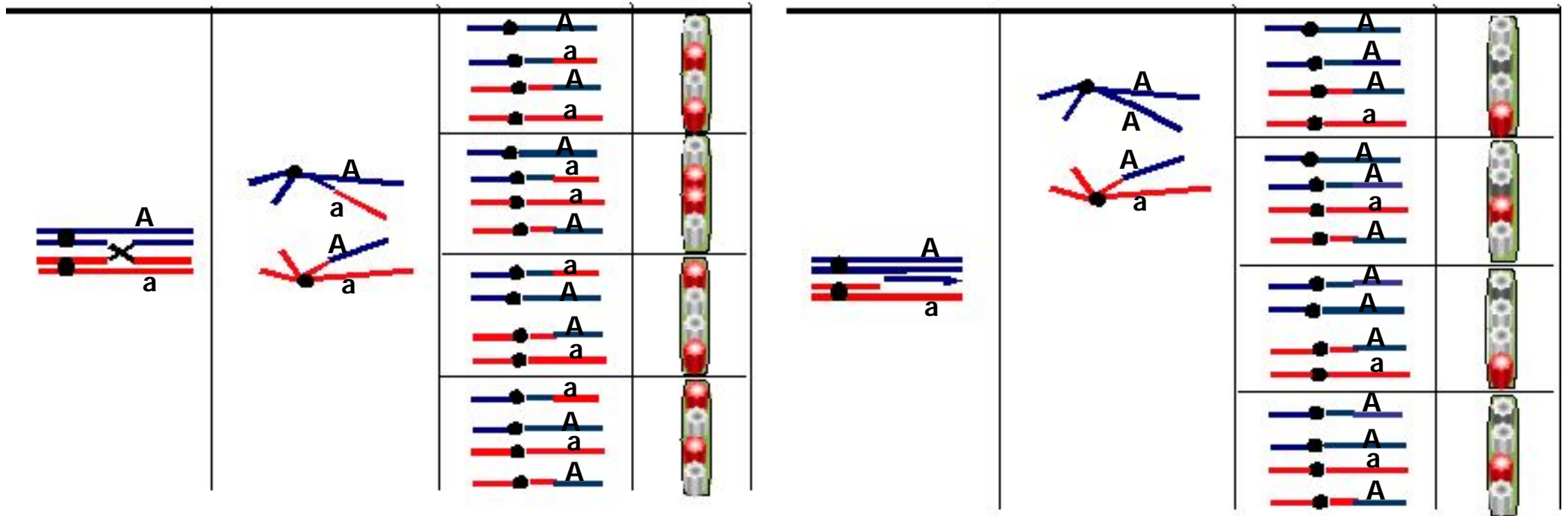
Posizione dei crossing-over e segregazione degli alleli

Diplotene/metafase	Anafase I	Anafase II	tetrade ordinata	Segr	Fattori coinvolti
				pre-riduzionale	orientamento dei bivalenti in metafase I
				post-riduzionale	orientamento degli univalenti in metafase II



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

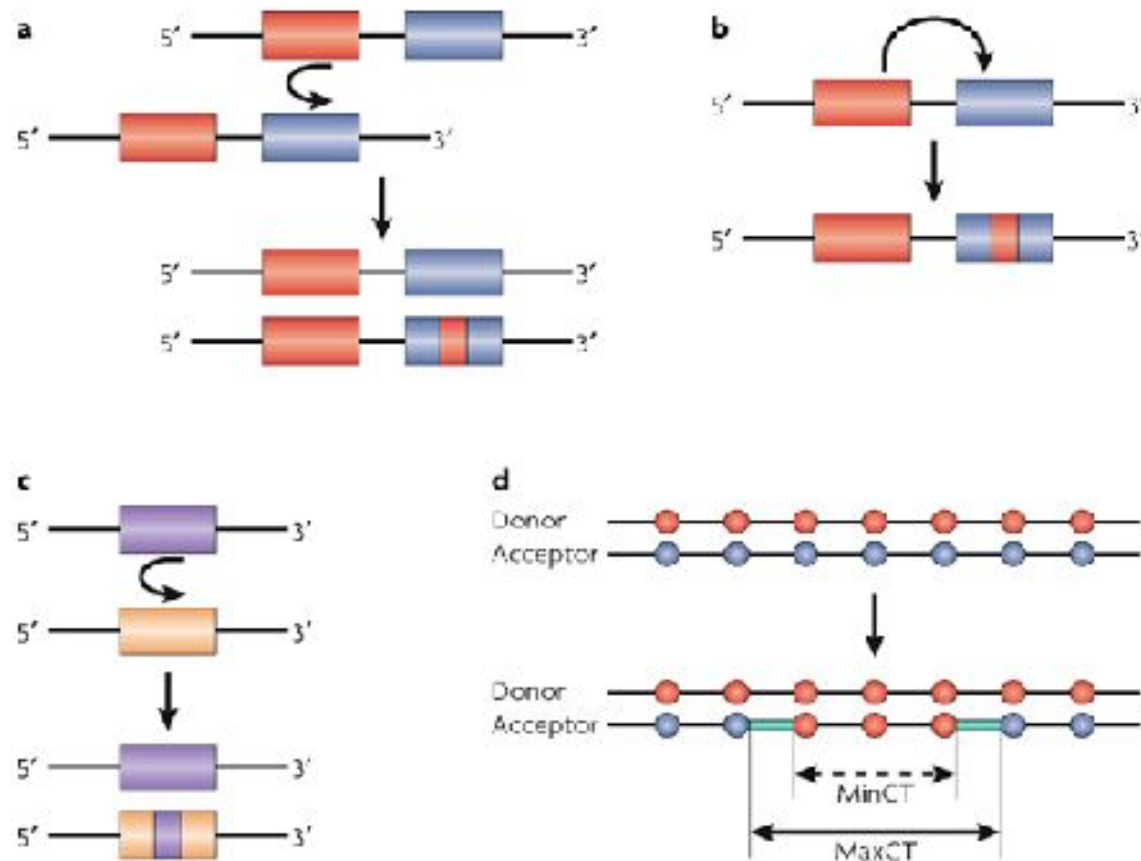
## Gene conversion in Neurospora





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

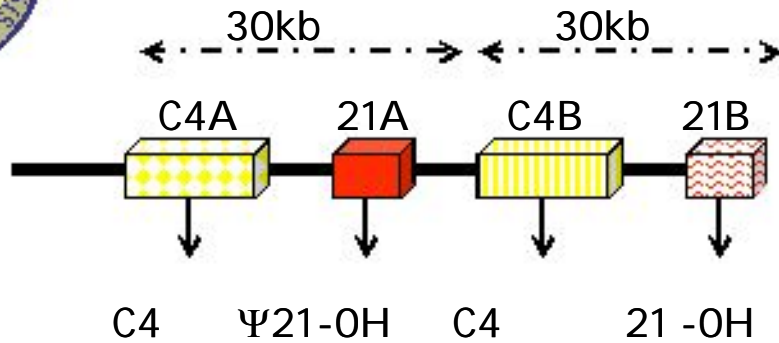
## Gene conversion



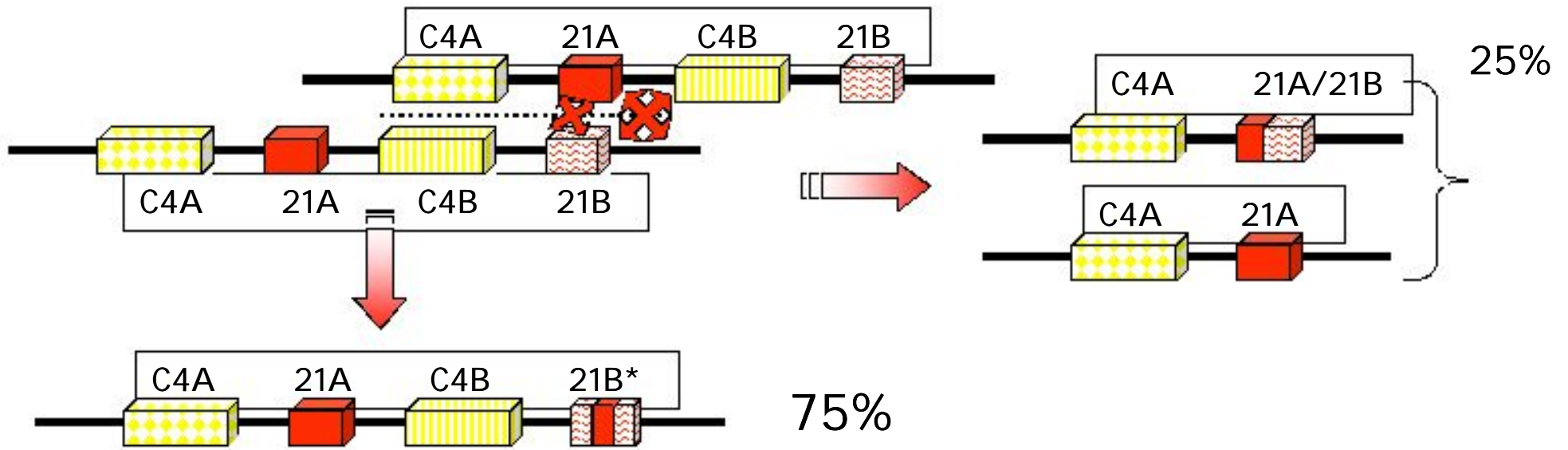
Nature Reviews | Genetics



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014



## Steroido-21 idrossilasi





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

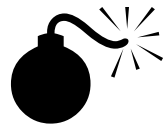
## Mutazioni



La variazione di una sequenza in una popolazione naturale non comporta necessariamente l'insorgenza di un fenotipo anomalo. Quando si parla di alleli di un locus questi sono il risultato di una mutazione che per caso, per effetto della deriva genetica si sono fissati nella popolazione



**Polimorfismo: variazione la cui frequenza sia maggiore di 0,01(1%)**



**Eterozigosi media per il DNA genomico umano: ~0,0037 (0,37%). Cio' significa che in due alleli circa 1:250-1:1000 basi sono diverse**



## Mutazioni



A livello del DNA si distinguono classicamente diversi tipi di mutazione:



Sostituzioni di base : di solito comportano la sostituzione di singole basi.

SNP



Delezioni: perdita di uno o piu' nucleotidi



Inserzioni: uno piu' nucleotidi vengono inseriti in una sequenza. Nell'uomo e piu'in generale nei mammiferi la trasposizione avviene attraverso un intermedio di RNA.



mutazioni dimaniche



CNV





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

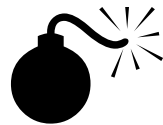
## Mutazioni



La variazione di una sequenza in una popolazione naturale non comporta necessariamente l'insorgenza di un fenotipo anomalo. Quando si parla di alleli di un locus questi sono il risultato di una mutazione che per caso, per effetto della deriva genetica si sono fissati nella popolazione



**Polimorfismo: variazione la cui frequenza sia maggiore di 0,01(1%)**



**Eterozigosi media per il DNA genomico umano: ~0,0037 (0,37%). Cio' significa che in due alleli circa 1:250-1:1000 basi sono diverse**



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

---

## Attenzione!



**Bisogna distinguere fra variazione del DNA e effetto sul prodotto e sulla sua funzione: silente, conservativa, missenso, non senso si riferiscono al prodotto (qualunque esso sia polipeptide, proteina, RNA)**



**Es.: Conservativa: non puo' riferirsi al DNA visto che la sequenza e' cambiata!!! cerchero' di sottolineare sempre questo aspetto, ma vedete di ricordarvelo perche' e' la chiave per capire**





## Mutazioni



Sostituzioni di base : di solito comportano la sostituzione di singole basi.



**Va ricordato che le mutazioni avvengono a caso perciò sia il DNA codificante che il non codificante sono egualmente suscettibili. Le conseguenze sono ovviamente diverse. Le conseguenze nella parte codificante (che costituisce circa il 3% del genoma umano) sono legate all'effetto della mutazione sul prodotto (questo vale per tutti i tipi di mutazione):**

**mutazioni silenti (sinonime)**

**mutazioni non sinonime**





## Mutazioni

Le mutazioni sinonime vengono considerate neutre, mentre le non sinonime vengono suddivise in tre classi a seconda dell'effetto che producono:



senza effetto



con effetto deleterio



forniscono un vantaggio selettivo



Il tasso di mutazione del DNA codificante risulta piu' basso rispetto al non codificante in quanto la pressione selettiva agisce eliminando dalla popolazione gli alleli negativi e rendendo di fatto assenti nella popolazione quelle mutazioni che alterino pesantemente la funzione del prodotto genico (per es. le "frameshift" piu' frequenti nel non codificante).





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Mutazioni



Le mutazioni del DNA non codificante hanno effetto se avvengono nelle sequenze regolatrici o nelle sequenze introniche deputate allo splicing. Quelle del DNA codificante non hanno un pattern casuale perché legate al mantenimento della funzionalità.

💣 Il codice genetico è degenerato e questo fornisce una certa elasticità. Pertanto i gradi di tolleranza delle sostituzioni sono diversi a seconda dei siti:


- \* siti non degenerati: tutte e tre le possibili sostituzioni sono non sinonime
- \* siti degenerati quattro volte: tutte e tre le possibili sostituzioni sono sinonime
- \* siti degenerati due volte: una delle tre possibili sostituzioni è sinonima





## Mutazioni

- \* siti non degenerati: tutte e tre le possibili sostituzioni sono non sinonime

 **Includono la prima base di tutti i codoni eccetto otto, la seconda base di tutti i codoni e la terza base di due. Questo e' coerente con la presenza di una forte pressione selettiva**

- \* siti degenerati quattro volte: tutte e tre le possibili sostituzioni sono sinonime

 **Includono la terza base di circa un terzo dei codoni. Il tasso di sostituzione e' paragonabile a quello degli introni : evidentemente queste sostituzioni sono selettivamente neutre**

- \* siti degenerati due volte: una delle tre possibili sostituzioni e' sinonima

 **Includono la terza base di alcuni codoni e la prima di otto codoni. Costituiscono circa il 20% delle sostituzioni. Spesso sono conservative**





## Mutazioni



- ☺ **Sostituzione silente: non determina alcun cambiamento nel prodotto: l'amminoacido resta lo stesso. Dal momento che modifica la sequenza puo' originare un RFLP. In qualche caso puo' dare origine ad un sito di splicing criptico e quindi essere tutt'altro che neutre come la semplice sequenza potrebbe far pensare.**
- ☹ **Sostituzione non senso: si origina un codone di stop. Dal momento che la pressione selettiva e' forte su un prodotto troncato prematuramente, sono rare.**
- ☹ **Sostituzione di senso errato: si origina un codone per un altro amminoacido**
  - ☺ **conservativa : il nuovo amminoacido ha caratteristiche chimiche simili al vecchio. Pertanto l'effetto sul prodotto puo' essere minimo e puo' essere definito polimorfismo sia a livello di DNA che di prodotto.**
  - ☹ **non conservativa: il nuovo amminoacido e' completamente diverso dal vecchio. Puo' avere effetti deleteri.**





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Mutazioni



**Il tasso e il tipo di sostituzioni perciò e' estremamente variabile fra i diversi geni.**

**Alcune proteine come le ubiquitine hanno un livello di conservazione totale nella scala zoologica dall'uomo al lievito. La loro sequenza a livello di DNA indica che le sostituzioni ci sono, ma sono praticamente tutte sinonime.**

**All'estremo opposto ci sono geni pochissimo conservati se non in brevi domini nell'evoluzione come SRY. SRY ha una funzione chiave in tutti i mammiferi, ma questa e' demandata all' HMG box, che corrisponde a 78 aa. I segmenti N- e C- terminali sono estremamente variabili, indicando che per la funzione del gene questi segmenti non sono critici**



## Mutazioni



### Quando alterano i siti di splicing.....

Non sono importanti solo i siti accettori o donatori, ma anche le altre sequenze immediatamente adiacenti, come pure il sito di biforcazione.

Le conseguenze sono:



nel trascritto viene inserito l'introne o parte di esso  
(vengono utilizzati siti criptici)

omissione di esoni: sia ha perdita di un gruppo di aminoacidi, slittamento del modulo di lettura...

### Quando alterano le sequenze regolatrici.....

nella  $\beta$ -thalassemia alcune mutazioni eliminano le LCR con conseguente mancata espressione del gene che al sequenziamento risulta intatto, (non si trova nessun tipo di mRNA)



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Mutazioni



● Quando si origina un codone di stop per mutazione puntiforme, inserzione, delezione o exon skipping (se il suo contenuto non e' divisibile per 3)

mRNA instabile: e' la conseguenza piu' frequente, in seguito all'azione del sistema di sorveglianza nonsense-mediated mRNA decay. Si evitano le conseguenze tossiche legate alla presenza di polipeptidi tronchi che interferiscono con il prodotto normale

polipeptide tronco: l'effetto dipende da quanto la riduzione compromette la funzione, se il polipeptide e' stabile, se interferisce con il wt.....

exon skipping: se si perde un esone o parte di esso l'mRNA risultante utilizza il normale codone di stop e il sistema di sorveglianza non agisce e l'mRNA viene tradotto provocando un effetto dominante negativo (Marfan)





## Modifiche nella configurazione della cromatina



**Il cambiamento di configurazione, legato ad un effetto di posizione per un riarrangiamento, puo' portare alla manifestazione di fenotipi patologici:**

**Aniridia: silenziamento del gene PAX6**

**Distrofia Facioscapolomerale: una delezione di 3-4Kb elimina dalla regione compresa fra due geni: FRG1 e FRG2, delle sequenze ripetute denominate D4Z4. La perdita di queste sequenze porta questi due geni normalmente localizzati in due domini diversi, a mappare nello stesso dominio. L'assenza delle ripetizioni che interagiscono con proteine regolatrici per modificare l'espressione di questi geni, comporterebbe un over espressione, con conseguente fenotipo patologico**



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## MEMENTO



La cosiddetta patologia molecolare ha come fine quello di spiegare se e come un particolare allele sia collegabile ad un fenotipo clinico, quindi ci si domanda: la mutazione che effetto ha sulla quantità, qualità, funzione del prodotto? così si tenta di spiegare perché sia o meno patogenetica

ormai vi saranno chiare le difficoltà che si incontrano e la portata della sfida per comprendere il funzionamento del genoma umano: le malattie genetiche sono il risultato di un complesso network di interazioni, ma costituiscono il fulcro per lo studio delle funzioni.



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

