



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

---

## Le mutazioni 2



### Lezione 11



## 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

## 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

## Dominanza e recessivita' I



 Alleli: forme alternative del locus che originano fenotipi distinguibili. Nella popolazione possono esistere n alleli, ma ogni individuo diploide ne possiede 2 degli n possibili. Gli alleli si originano per effetto delle mutazioni, e generano variabilita' nella popolazione. Non e' detto che ci sia un allele che genera fenotipo patologico. (gruppi sanguigni)



quello che conta per la dominanza e la recessivita' e' la funzione che svolge il prodotto del gene e la nostra capacita' di vedere il prodotto e identificarlo quando si origina da alleli diversi.

La mutazione che genera gli alleli ha un effetto diverso se:

\* avviene in un punto che non intacca l'efficienza del prodotto e quindi la funzione e' mantenuta: polimorfismo

\* avviene in un punto critico del prodotto





## Dominanza e recessività II



\* avviene in un punto critico del prodotto: che cosa succede al prodotto?

/ il prodotto è strutturalmente alterato e interagisce con il prodotto non mutato: effetto dominante negativo

/ il prodotto non c'è o è inattivo e per la sua funzione il 50% non è sufficiente: aploinsufficienza, fenotipo dominante

/ il prodotto non c'è o è inattivo e per la sua funzione il 50% è sufficiente: fenotipo recessivo



## Effetto delle variazioni



Quindi bisogna cercare di conoscere non solo la sequenza, ma anche cosa questa sequenza mutata e' in grado di fare:

la mutazione produce una perdita o un'acquisizione di funzione?

non e' semplice definirlo in assenza di informazioni sulla funzione e/o sul prodotto, possono aiutare:

? il modello di ereditarieta': se il prodotto dell'allele wild type non riesce a compensare sara' un fenotipo dominante e probabilmente c'e' aumento di funzione anche se.....

● l'aploinsufficienza e l'effetto dominante negativo legati alla perdita di funzione possono dar luogo ad un fenotipo dominante

? in linea di massima i fenotipi recessivi sono originati da perdita di funzione

? l'eterogeneita' allelica (allelia multipla) depone a favore di una perdita di funzione (perche'?)



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## due parole su aploinsufficienza



indica quel fenomeno per cui il 50% del prodotto non e' sufficiente a garantire la funzione. sono pochi i geni sensibili al dosaggio perche' la selezione ha agito favorendo le varianti ad alto rendimento (compatibilmente con il tipo di funzione: elastina). possiamo tuttavia inquadrare in alcune categorie quelli sensibili:

- ? geni i cui prodotti interagiscono a livello quantitativo con il DNA o con recettori
- ? geni i cui prodotti competono con altri in momenti particolari del differenziamento o nello sviluppo
- ? geni i cui prodotti cooperano in rapporti stechiometrici con altri
- 💣 cioe' prodotti per i quali e' necessario che l'insieme dei prodotti coinvolti abbia un equilibrio complessivo (ecco perche' c'e' di solito espressivita' variabile)



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Quando si trova una mutazione

La mutazione che genera gli alleli ha un effetto diverso se:

? avviene in un punto che non intacca l'efficienza del prodotto e quindi la funzione e' mantenuta: polimorfismo

? avviene in un punto critico(?) del prodotto

? **Mutazione mai descritta in letteratura, ma che potrebbe essere patogenetica (il meccanismo di azione del prodotto e' noto): e' presente in altri soggetti sani della famiglia?**

? **Mutazione mai descritta in letteratura, con effetto ignoto sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?**

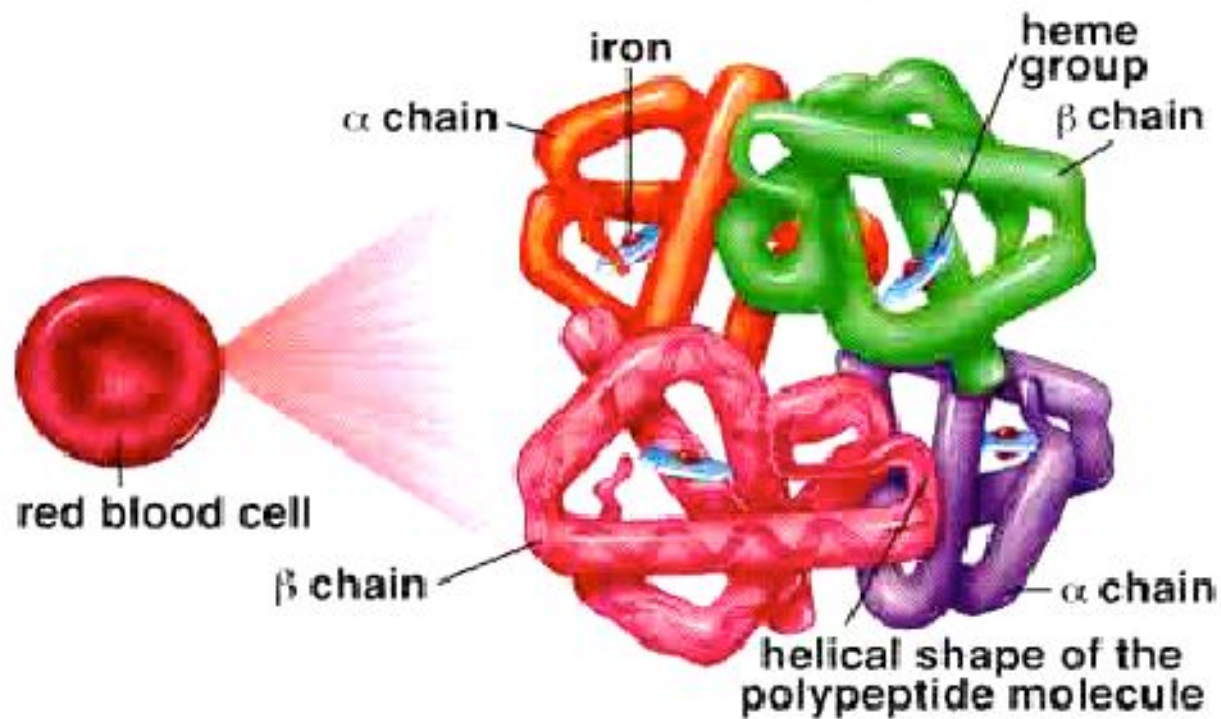
? **Mutazione mai descritta in letteratura, ma il cui effetto si ritiene innocuo sulla funzionalita': e' presente in soggetti sani della famiglia?**

? **Mutazione descritta in letteratura, il cui effetto e' accertato essere innocuo sulla funzionalita' (come?)**





# L'EMOGLOBINA e le "EMOGLOBINOPATIE"





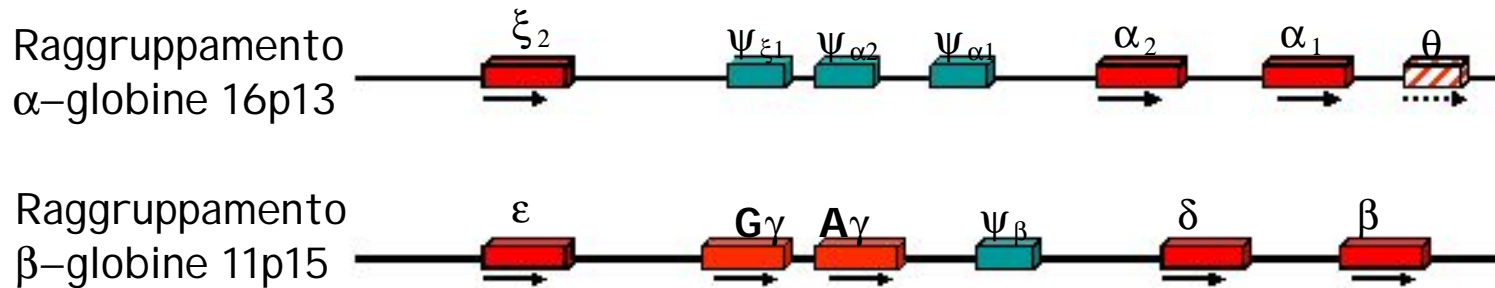
## MUTAZIONI NEI GENI DELL'EMOGLOBINA

Ci sono 4 geni per ogni catena: formalmente anche per la componente non  $\alpha$  dell'Hb adulta, il fatto che il promotore di  $\delta$  non sia efficace sul piano dell'organizzazione del cluster DNA e' irrilevante: ma cosa significa sul piano funzionale? E cosa succede se i geni mutano?

Gli effetti sul fenotipo "salute" sono diversi perche' diverse sono le conseguenze sul prodotto e quindi sulla funzione: la presenza di 4 geni  $\alpha$  fa si' che una mutazione in uno di loro alteri solo il 25% delle molecole, mentre nel caso di  $\beta$  vengono alterate il 50% e causano piu' facilmente problemi, senza tuttavia intaccare lo sviluppo fetale



## MUTAZIONI NEI GENI DELL'EMOGLOBINA



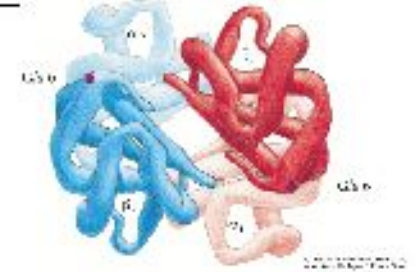
Gli effetti sul fenotipo "salute" sono diversi perché diverse sono le conseguenze sulla funzione

Mutazione vuol dire cambiamento rispetto ad una sequenza di riferimento. Sto parlando del cambiamento del DNA? o del suo prodotto? e quest'ultimo come è mutato? Vi ricordo che missenso, nonsense, conservativa si riferiscono all'effetto sul prodotto e/o sulla funzione corrispondente, non al DNA che è comunque mutato

Quale prodotto vogliamo guardare dando per scontato che il DNA sia mutato?



## MUTAZIONI NEI GENI DELL'EMOGLOBINA



Il trascritto? e quale trascritto mRNA immaturo o maturo?, il tradotto? quale? il polipeptide o la proteina matura? (questo concetto vale per tutti i geni e i loro prodotti. Per questo lo studio delle varianti dell'Hb e' un modello perfetto)

gli effetti di una mutazione nel DNA possono essere:

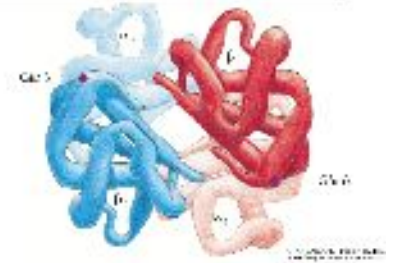
- nulli: POLIMORFISMI
- qualitativi: EMOGLOBINOPATIE: per effetto della mutazione viene modificata la sequenza della catena, provocando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisico della molecola
- quantitativi: THALASSEMIE



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## EFFETTI QUALITATIVI: Gene HBA(1-2)

Per effetto della mutazione viene modificata la sequenza della catena, provocando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisico della molecola



### DNA:

? $\alpha$ :ATT ->GTT  
? $\alpha$ :ATT ->TTT  
? $\alpha$ :ATT ->GTT  
? $\alpha$ :ATT ->AGT

### RNA:

? $\alpha$ 142:UAA(stop)->CAA(Gln)  
? $\alpha$ 142:UAA(stop)->AAA(Lys)  
? $\alpha$ 142:UAA(stop)->GAA(Glu)  
? $\alpha$ 142:UAA(stop)->UCA(Ser)

### EFFETTO:

HbConstant Spring e sue varianti:  
allungamento (31aa) della catena e instabilità della molecola, non dannosa se non associata ad alleli talassemici

? $\alpha$ :GTA ->ATA  
GTG ->ATG  
? $\alpha$ :CCA ->CTA  
GGC ->GAC  
? $\alpha$ :GTA ->ATA  
GTG ->ATG

? $\alpha$ 58: CAU(His) ->UAU(Tyr)  
CAC(His) ->UAC(Tyr)  
? $\alpha$ 57: GGU(Gly) ->GAU(Asp)  
GGC(Gly) ->GAC(Asp)  
? $\alpha$ 87: CAU(His) ->UAU(Tyr)  
CAC(His) ->UAC(Tyr)

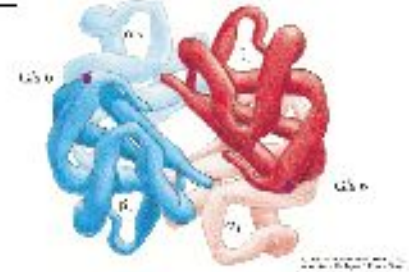
Metaemoglobine: viene alterata la capacità di trasportare l'O<sub>2</sub> perché il ferro non riesce a passare alla forma ridotta, AD. lo stesso effetto si ottiene per mutazioni del gene della metaemoglobina-riduttasi (AR).  
N.B. il residuo di istidina è il più conservato nelle catene dell'emoglobina



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## EFFETTI QUALITATIVI:

### Gene HBB



Per effetto della mutazione viene modificata la sequenza della catena, provocando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisico della molecola

#### DNA:

#### RNA:

#### EFFETTO:

β: CTC → CAC

β<sub>6</sub>: GAG(Glu) → GUG(Val)

HbS: nella forma deossigenata polimerizza

β: CTC → TTC

β<sub>6</sub>: GAG (Glu) → AAG(Lys)

HbC: nella forma deossigenata cristallizza

β: CTC → CGC

β<sub>6</sub>: GAG(Glu) → GCG(Ala)

HbMakassar: INNOCUA

β: GTA → ATA  
GTG → ATG

β<sub>63</sub>: CAU(His) → UAU(Tyr)  
CAC(His) → UAC(Tyr)

β: GTA → ATA  
GTG → ATG

β<sub>92</sub>: CAU(His) → UAU(Tyr)  
CAC(His) → UAC(Tyr)

β: CAC → CTC

β<sub>67</sub>: GUG(Val) → GAG(Glu)

Metaemoglobine: viene alterata la capacità di trasportare l'O<sub>2</sub> perché il ferro non riesce a passare alla forma ridotta, AD. lo stesso effetto si ottiene per mutazioni del gene della metaemoglobina-riduttasi (AR).

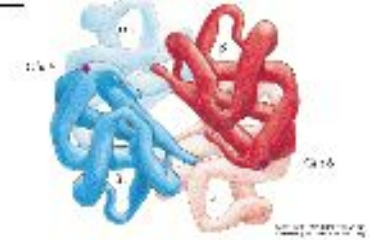
N.B. il residuo di istidina è il più conservato nelle catene dell'emoglobina



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## EFFETTI QUALITATIVI: Gene HBB

Per effetto della mutazione viene modificata la sequenza della catena, provocando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisico della molecola



### DNA:

$\beta$ : AAA  $\rightarrow$  AGA  
TTC  $\rightarrow$  TCC

$\beta$ : CTT  $\rightarrow$  TTA  
CTG  $\rightarrow$  TTG

$\beta$ : TTA  $\rightarrow$  TGA  
TTG  $\rightarrow$  TGG

?  $\beta$ : GTG.ATT.CGA...

$\beta$ : GT(G.T)GA.TTC.GA...

### RNA:

$\beta$  42: UUU(Phe)  $\rightarrow$  UCU(Ser)  
UUC(Phe)  $\rightarrow$  UCC(Ser)

$\beta$  99: GAU(Asp)  $\rightarrow$  AAU(Asn)  
GAC(Asp)  $\rightarrow$  AAC(Asn)

$\beta$  102: AAU(Asn)  $\rightarrow$  ACU(Tyr)  
AAC(Asn)  $\rightarrow$  ACC(Tyr)

$\beta$  146: CAC(Hys) -  $\beta$  147 UAA(Stop)

$\beta$  146: CAC(Hys) -  $\beta$  147 ACU(Thr) - AAG(Lys)....

### EFFETTO:

HbHammersmith (AD): instabile, i tetrameri si denaturano, precipitano, la Serina non è in grado di fissare l'eme  $\rightarrow$  ridotta affinità'

HbKempsey (AD): viene modificata l'interfaccia fra le catene, che rimangono bloccate nella forma ossigenata (R):  $\rightarrow$  affinità'

HbKansas (AD): viene modificata l'interfaccia fra le catene, che rimangono bloccate nella forma deossigenata (T):  $<$  affinità'

### HbTak (AR):

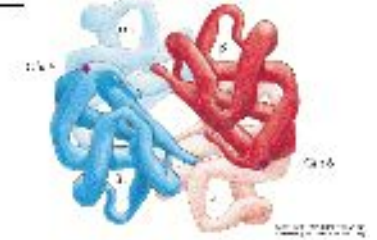
allungamento di 11aa  
C-terminale idrofobico  
e incapacità ad assumere la forma deossi:  $\rightarrow$  affinità'



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## EFFETTI QUALITATIVI: Gene HBB

Per effetto della mutazione viene modificata la sequenza della catena, provocando cambiamenti nelle proprietà chimico-fisico della molecola



**DNA:**

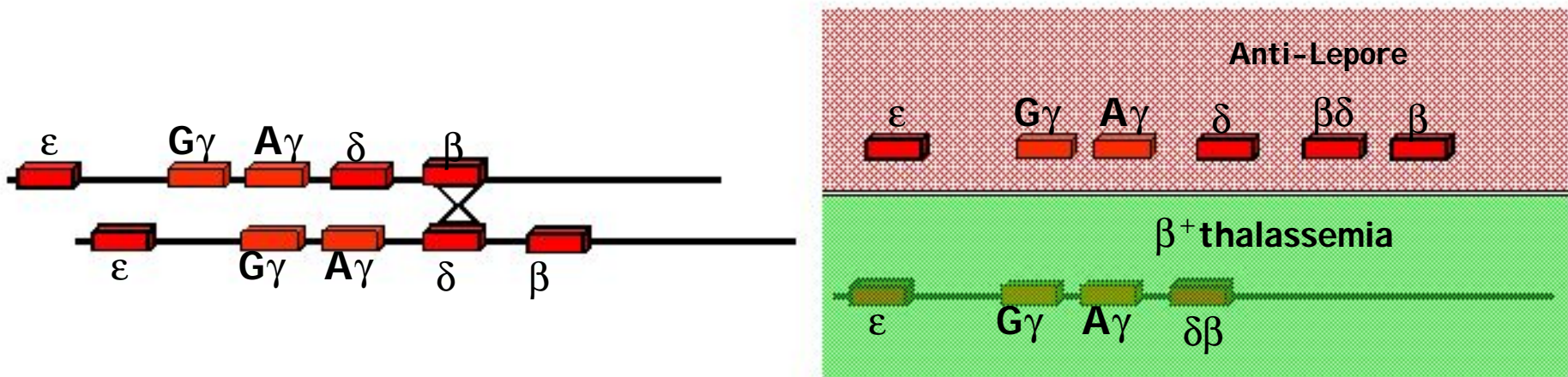
?  $\beta$ : CTC  $\rightarrow$  TTC     $\beta_2^6$ : GAG (Glu)  $\rightarrow$  AAG (Lys)

**RNA:**

**EFFETTO:**

HbE: sito critico di splicing utilizzato al 40% e un rallentamento nella maturazione dell'mRNA. E' un allele thalassemico  $\beta^+$

Hb Lepore/ Hb Miyada: Emoglobine chimeriche si formano per un crossing-over ineguale







## Le thalassemie



Gruppo di malattie ereditarie determinate dall'alterato rapporto fra le catene alfa e beta, per cui si hanno molecole di emoglobina aberranti.

Thalassemia alfa : catene alfa ridotte o assenti

Thalassemia beta: catene beta ridotte o assenti

Sono autosomiche recessive, se considero il fenotipo anemia, sono dominanti se considero il fenotipo del globulo rosso, o fenotipo quantità delle catene globiniche

Non sono uniformemente distribuite nel mondo, hanno prevalenza massima in alcune aree.

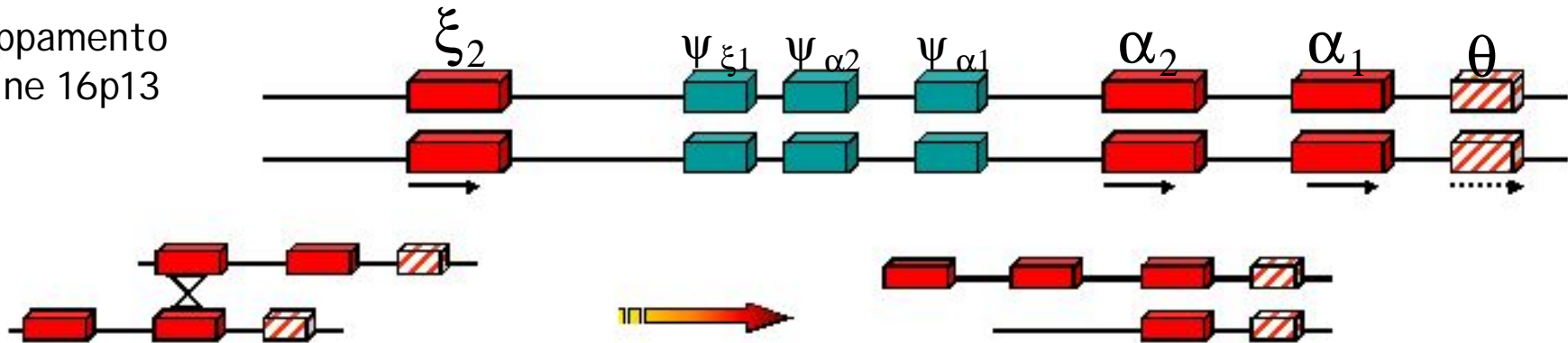
In ogni popolazione si trovano un numero molto limitato di mutazioni, ma una mutazione rara o assente in una popolazione può risultare frequente in un'altra



## $\alpha$ -Thalassemia

? Originata principalmente da delezioni dei geni alfa: su ogni cromosoma 16 sono presenti 2 copie espresse del gene alfa : la delezione puo' riguardare una o due copie, in cis o in trans

Raggruppamento  $\alpha$ -globine 16p13



Viene definito allele l'insieme dei due geni:  $\alpha\alpha, -\alpha, --$

? Nel sud est asiatico sono presenti entrambi i tipi di delezione, mentre in Africa e' praticamente assente l'allele --



I genotipi possibili sono 6 e i fenotipi sono diversi a seconda


delle combinazioni



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Genotipi e fenotipi nella $\alpha$ -thalassemia

Assetto genomico						
N. Geni $\alpha$	4	3	2	2	1	0
Stato	omozigote wild-type	eterozigote 1 allele wild type	eterozigote 1 allele <u>wild type</u>	omozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	eterozigote <u>nessun allele wild-type!</u>	omozigote
Anemia	nessuna	lieve	lieve	lieve	grave HbH	letale

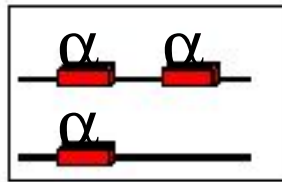
 Alcune forme di  $\alpha$ -thalassemia sono dovute all'instabilita' dell'mRNA o dell'emoglobina: mutazione nel sito di poliadenilazione, perdita del codone di stop...



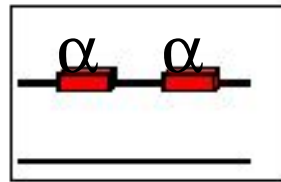
# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Possibile progenie dei portatori

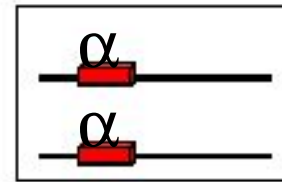
genotipi



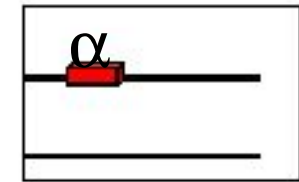
1



2

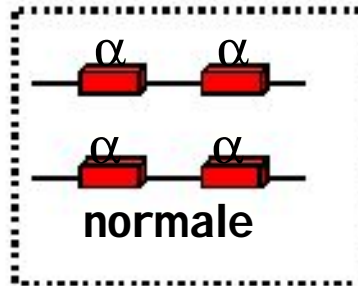


3

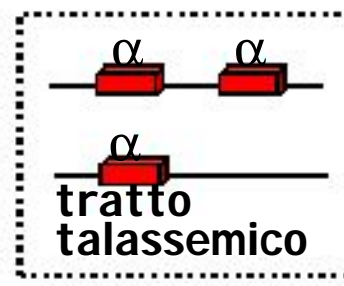


4 HbH

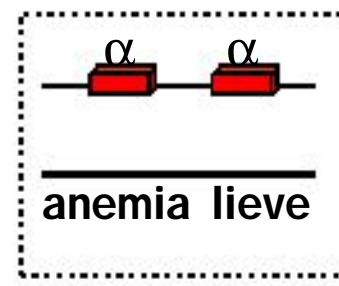
1 x 2



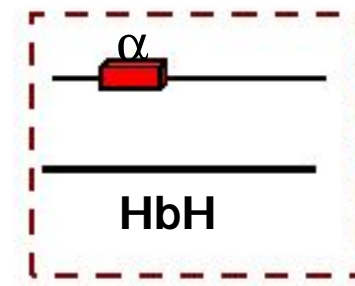
normale



tratto  
talassemico

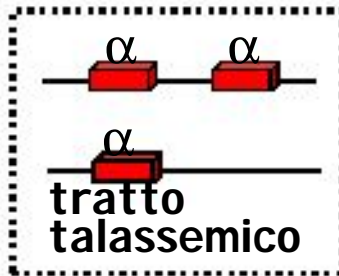


anemia lieve

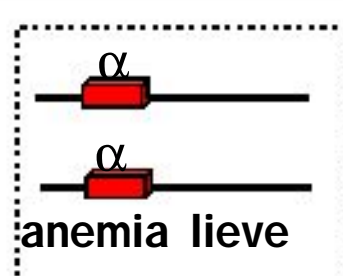


HbH

1 x 3

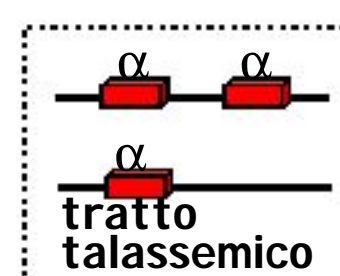


tratto  
talassemico

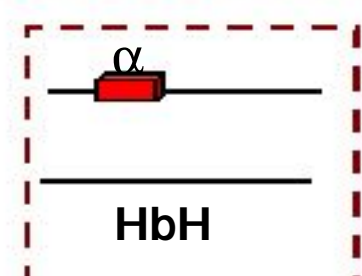


anemia lieve

2 x 3



tratto  
talassemico

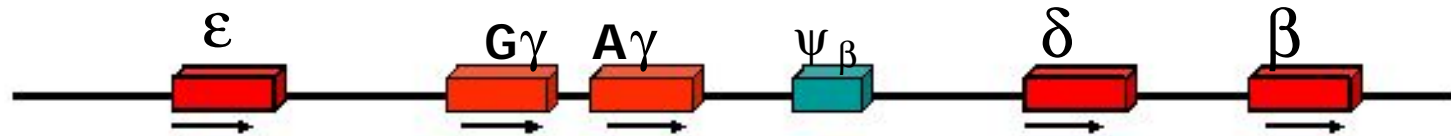


HbH

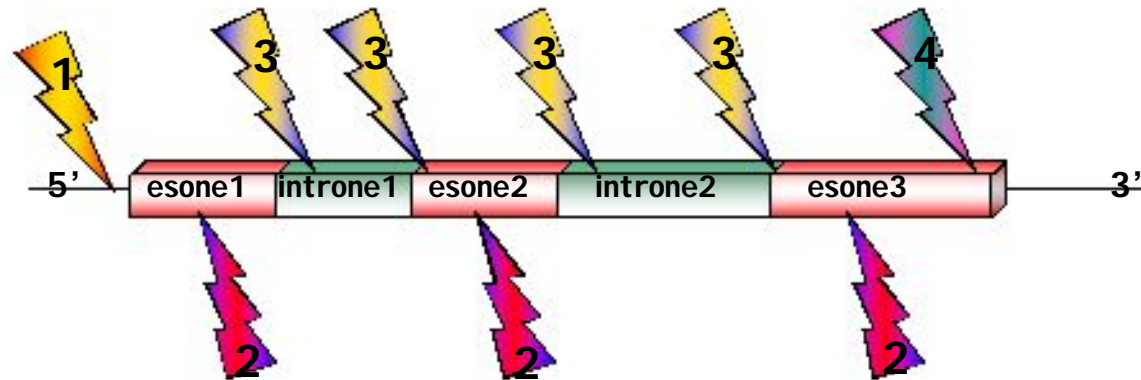


## $\beta$ -Thalassemia

Raggruppamento  
 $\beta$ -globine 11p15



☹ Originata principalmente da mutazioni il cui effetto attraverso meccanismi diversi e' quello di avere un deficit di catene  $\beta$ . I siti di mutazione sono caratteristici di una popolazione



- 1 mutazioni nel promotore portano diminuzione del livello promotore
- 2 mutazioni puntiformi all'interno degli esoni causano sostituzioni aa o fine traduzione
- 3 mutazioni introni, alterazione splicing
- 4 mutazione in siti di poliadenilazione



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

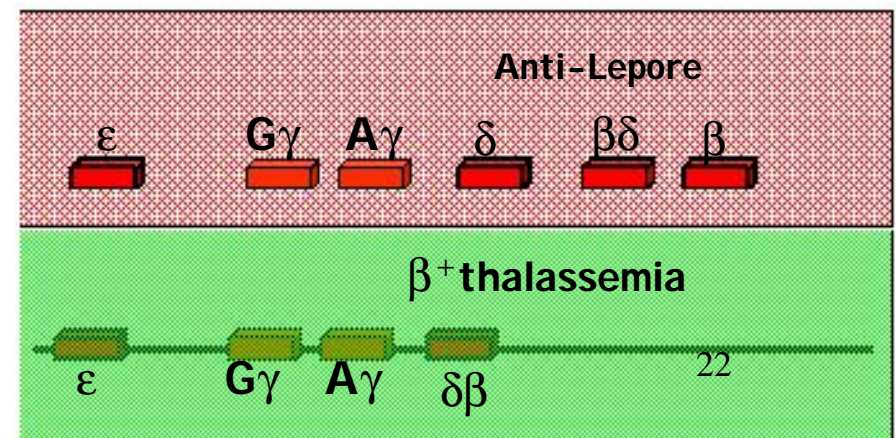
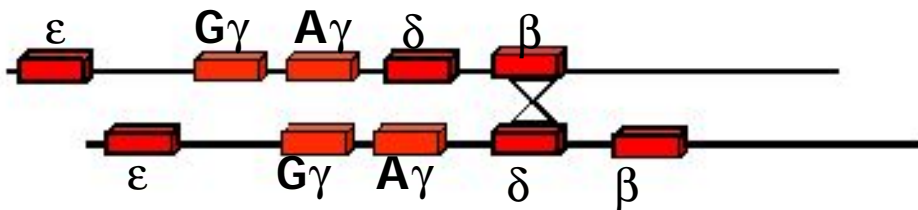
## $\beta$ -Thalassemia

?  $\beta^0$  thalassemia: tutte le forme in cui manca la catena  $\beta$ .  
l'mRNA puo' mancare completamente, degradato o inattivo

?  $\beta^+$  thalassemia: tutte le forme la catena  $\beta$  e' sottorappresentata  
l'mRNA puo' non venire processato in maniera corretta o essere poco rappresentato.



A questa categoria appartengono l'emoglobine Lepore: per effetto di un crossingover fra i geni  $\delta$  e  $\beta$  (che hanno una parziale omologia di sequenza) si ottiene un gene  $\delta\beta$  che viene trascritto in minor quantita' (il promotore di  $\delta$  e' piu' debole)





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Le mutazioni della $\beta$ -Thalassemia nelle diverse popolazioni

Sardegna:	codone 39 da glutamina a stop	proteina tronca	95 %	$\beta^0$
	codone 6 perdita di una base	frameshift	2.1%	$\beta^0$
	codone 76 perdita di una base	=	0.7%	$\beta^0$
	introne1 110 G $\longrightarrow$ A	splicing alterato	0.5%	$\beta^+$
	introne2 745 C $\longrightarrow$ G	==	0.4%	$\beta^+$

Nel delta del PO la mutazione piu' frequente provoca una  $\beta^+$  per un segnale di splicing ambiguo

Grecia:	codone 39 da glutamina a stop	proteina tronca	17.4 %	$\beta^0$
	introne1 1 G $\longrightarrow$ A	splicing alterato	13.6 %	$\beta^0$
	introne1 6 T $\longrightarrow$ C	splicing alterato	7.4 %	$\beta^+$
	introne1 110 G $\longrightarrow$ A	==	43.7 %	$\beta^+$
	introne2 745 C $\longrightarrow$ G	==	7.1%	$\beta^+$



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

## Le mutazioni della $\beta$ -Thalassemia nelle diverse popolazioni

Cina	codone 41/42	-TCTT	frameshift	38.6%	$\beta^0$
	introne2 654	C $\longrightarrow$ T		15.7%	$\beta^0$
	codone 71/76	+ una base	frameshift	12.4%	$\beta^0$
	-28G	A $\longrightarrow$ G		11.6%	$\beta^+$
	codone 17	A $\longrightarrow$ T		10.5%	$\beta^0$
Pakistan	codone 8/9	+ una base	frameshift	28.9 %	$\beta^0$
	introne1 5	G $\longrightarrow$ C		26.4 %	$\beta^+$
	delezione di 619bp			23.3%	$\beta^+$
	introne1 1	G $\longrightarrow$ T		8.2%	$\beta^0$
	codone 41/42	-TCTT	frameshift	7.9%	$\beta^0$
Afro americani:	-29	A $\longrightarrow$ G		60.3%	$\beta^+$
	-88	C $\longrightarrow$ T		21.4%	$\beta^+$
	codone 24	T $\longrightarrow$ A		7.9%	$\beta^+$
	codone6	- una base		0.8%	$\beta^0$ 24





# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

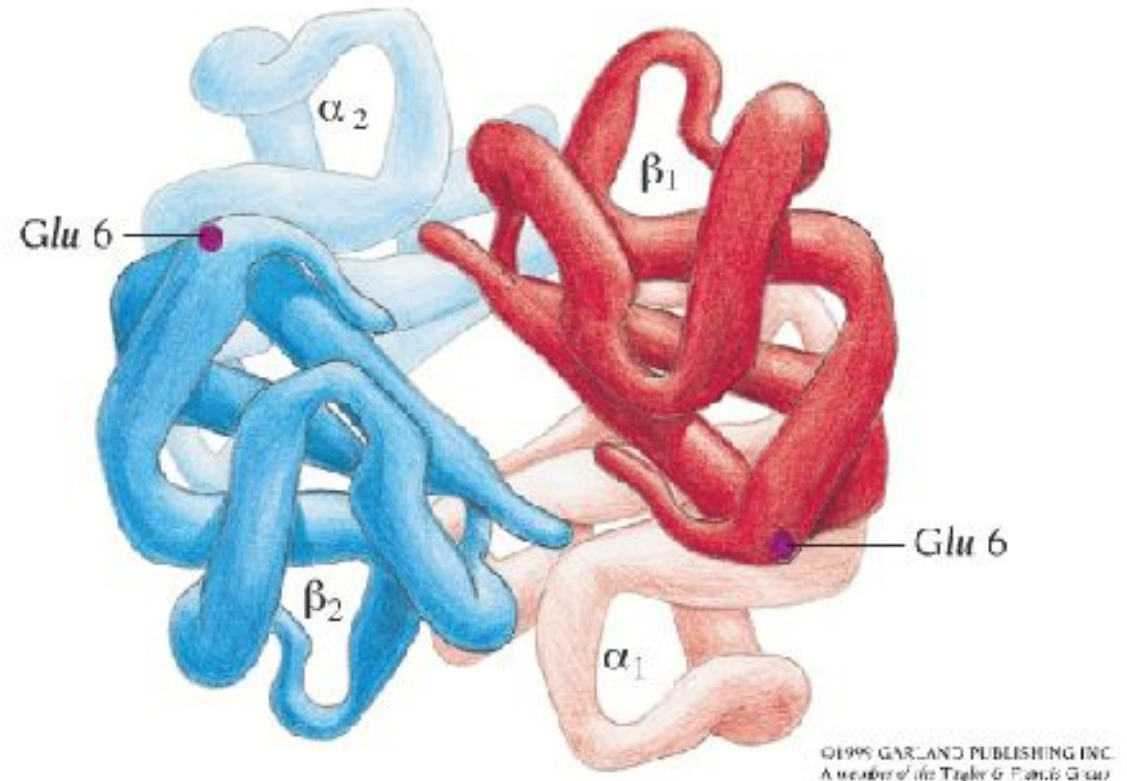
## esempio mutazione missenso: Falcemia

Allele S : e' presente una sostituzione del secondo nucleotide del sesto codone, mutazione E6V Acido glutammico > Valina

Allele C: e' presente una sostituzione del secondo nucleotide del sesto codone, mutazione E6K Acido glutammico > Lisina

Allele D-Punjab e' presente una sostituzione al codone 121, mutazione E121Q Acido glutammico > Glutamina

Allele O-Arab e' presente una sostituzione al codone 121, mutazione E121K Acido glutammico > Lisina



Nella emoglobina deossigenata una interazione fra la  $\beta$ -valina e le regioni complementari delle molecole vicine puo' indurre la formazione di polimeri che si aggregano e alterano la forma del globulo rosso, rendendolo fragile e poco flessibile.



# LM Sc. Biosanitarie Genetica Umana 2013-2014

