

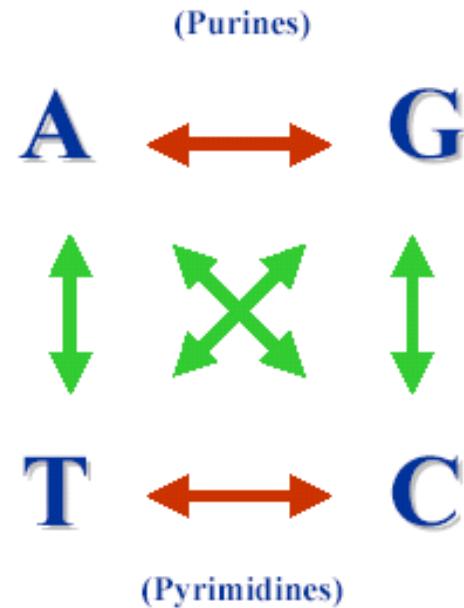
MUTAZIONI E MECCANISMI DI RIPARAZIONE

Le mutazioni sono modificazioni della sequenza nucleotidica del DNA. Queste possono essere puntiformi o possono prevedere l'inserimento, o la delezione di una o più nuove coppie di basi.

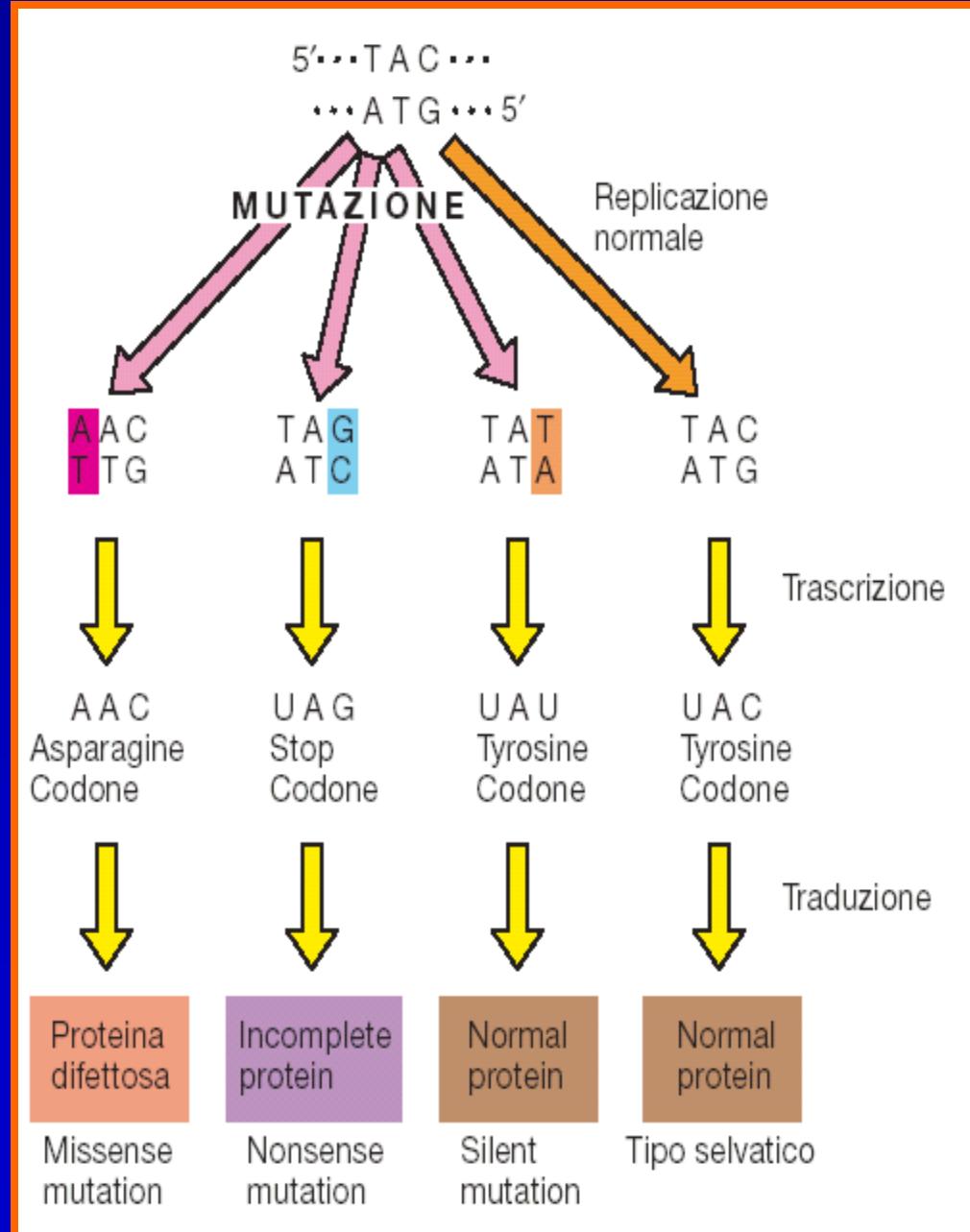
GATTAG**G**CTG ← GATTAC**C**CTG → GATTAC**C**CTG

Le mutazioni puntiformi possono essere classificate come: transizioni, quando vi è la sostituzione di una coppia purina-pirimidina con una coppia purina-pirimidina differente (es. GC→AT) e trasversioni quando una purina-pirimidina sostituisce una pirimidina-purina e viceversa (TA→GC)

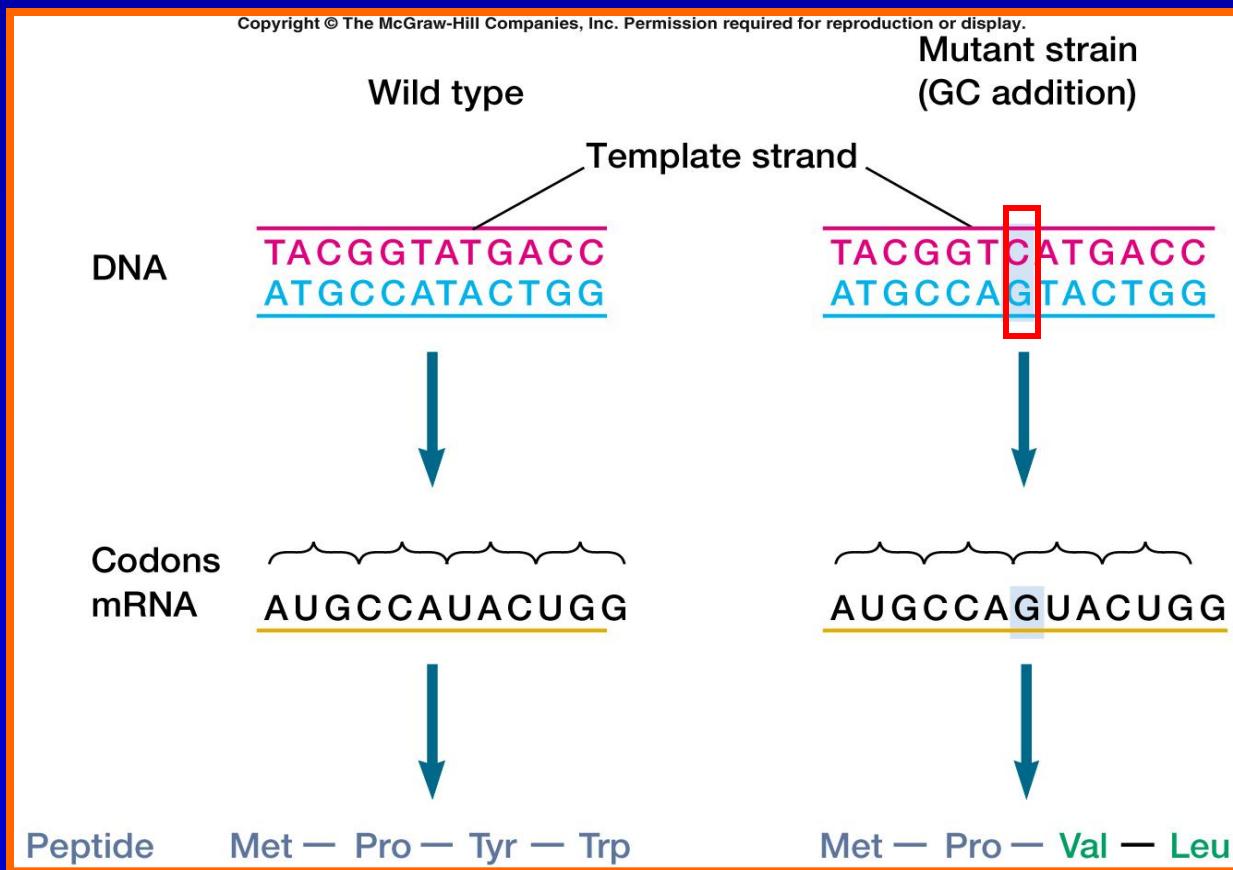
- Base substitution
 - Transitions
 - Transversions



- Una mutazione puntiforme può determinare una mutazione:
- MISSENZO
- NONSENZO
- SILENTE



Le inserzioni e le delezioni di singoli o più nucleotidi determinano un effetto drammatico sull'espressione delle proteine. Esse producono infatti un *frame shift* dello schema di lettura sconvolgendone la sequenza aminoacidica.



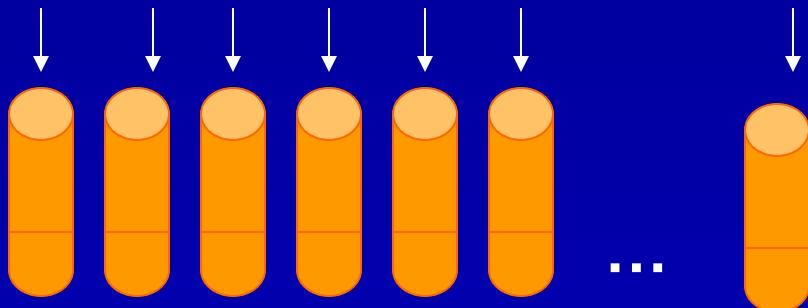
Le mutazioni possono derivare da:

- Errori naturalmente commessi dalla DNA polimerasi durante la replicazione del DNA
- Danni al DNA di tipo endogeno: ossidazione, depurinazione, etc
- Danni al DNA di tipo esogeno: radiazioni o agenti chimici
- Meccanismi di riparazione del DNA “error prone”

Ma la loro insorgenza è indotta o spontanea ?

Esperimento di Luria e Delbrück (1943)

Inoculate con 10^3 cells/ml



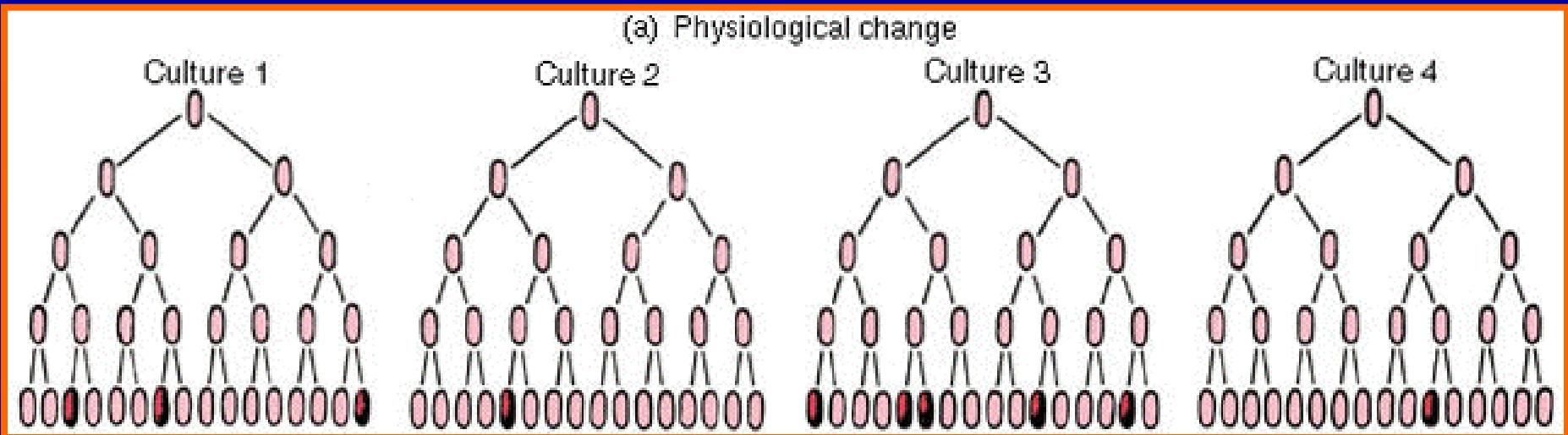
20 colture indipendenti (0.2 ml)

Crescita della colture sino a 10^8 cellule/ml

Piastrate 0,2 ml di ciascuna
coltura su piastre contenenti il
fago T1

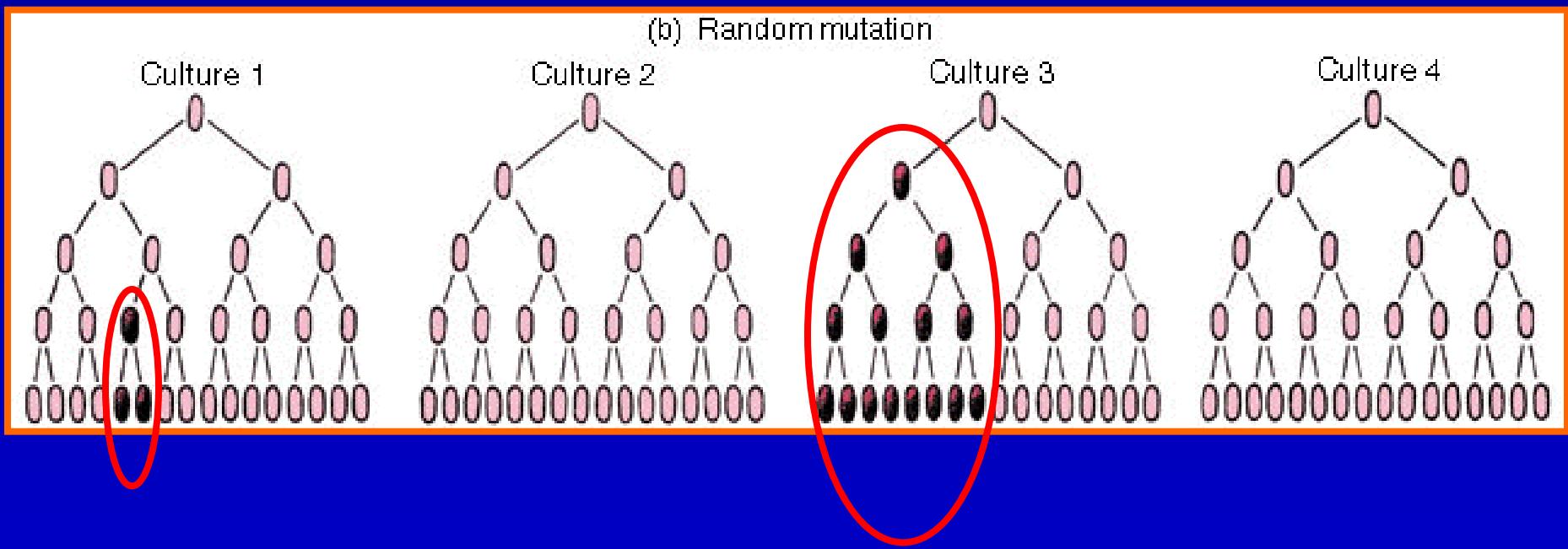
Analisi dei resistenti

I° possibilità: induzione dall'ambiente



**Si dovrebbe osservare una
piccola variazione del numero
dei resistenti per ogni coltura**

II° possibilità: mutazione spontanea



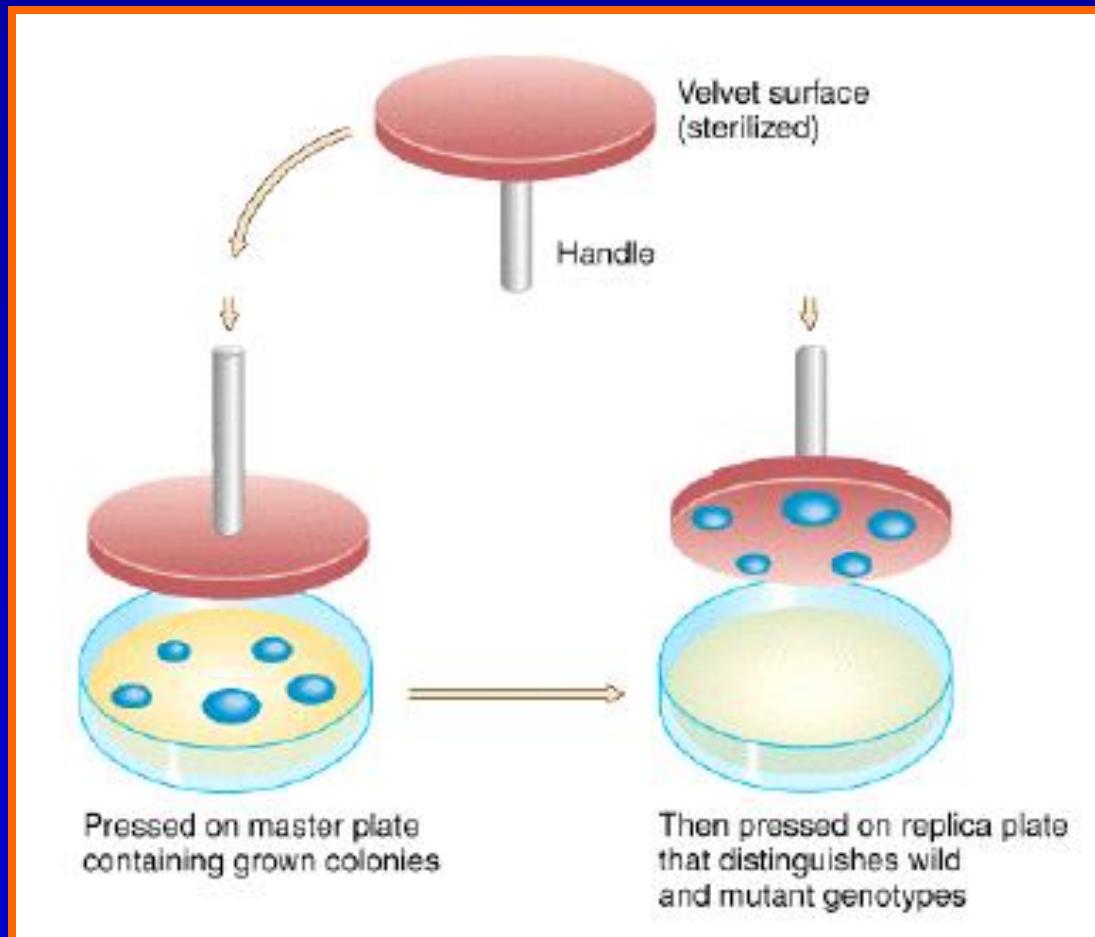
**Grossa variazione del numero dei
mutanti ottenuti dalle differenti
colture**

RISULTATI DEL TEST DI FLUTTUAZIONE

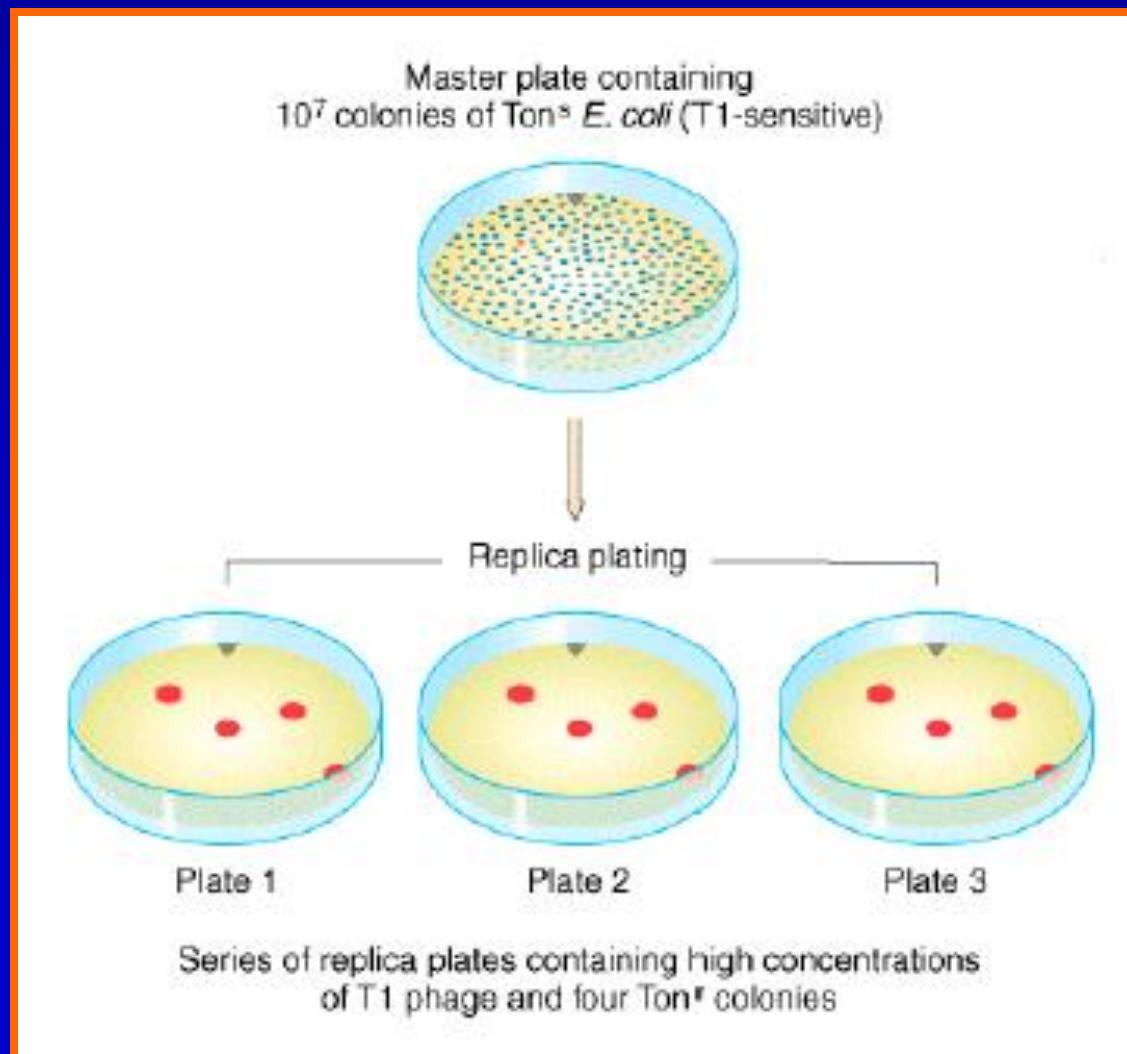
Table 7-3 Results of Luria and Delbrück's Test

| Culture number | Individual cultures | | Bulk culture | |
|----------------|---------------------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| | Number of T1-resistant colonies | Culture number | Number of T1-resistant colonies | Culture number |
| 1 | 1 | 1 | 14 | |
| 2 | 0 | | | |
| 3 | 3 | 2 | 15 | |
| 4 | 0 | | | |
| 5 | 0 | 3 | 13 | |
| 6 | 5 | | | |
| 7 | 0 | 4 | 21 | |
| 8 | 5 | | | |
| 9 | 0 | 5 | 15 | |
| 10 | 6 | | | |
| 11 | 107 | 6 | 14 | |
| 12 | 0 | | | |
| 13 | 0 | 7 | 26 | |
| 14 | 0 | | | |
| 15 | 1 | 8 | 16 | |
| 16 | 0 | | | |
| 17 | 0 | 9 | 20 | |
| 18 | 64 | | | |
| 19 | 0 | 10 | 13 | |
| 20 | 35 | | | |
| | Mean 11.3 | | Mean 16.7 | |

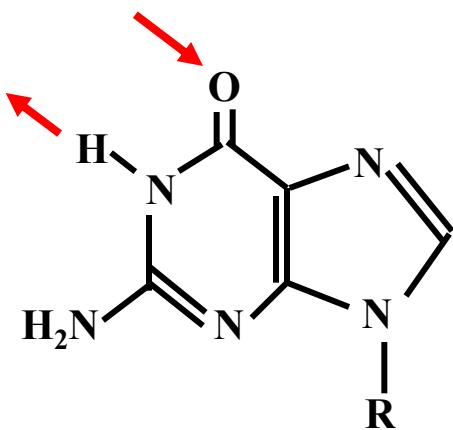
Replica Plating (1952): Joshua and Esther Lederberg...



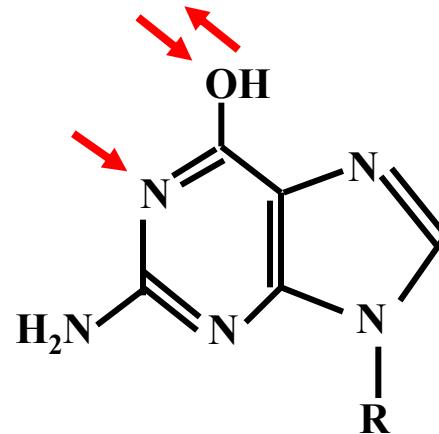
Replica Plating (1952): Joshua and Esther Lederberg...



Isomeri tautomerici



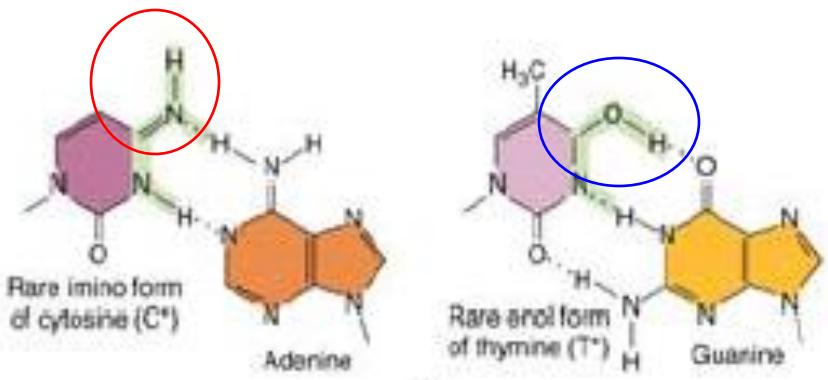
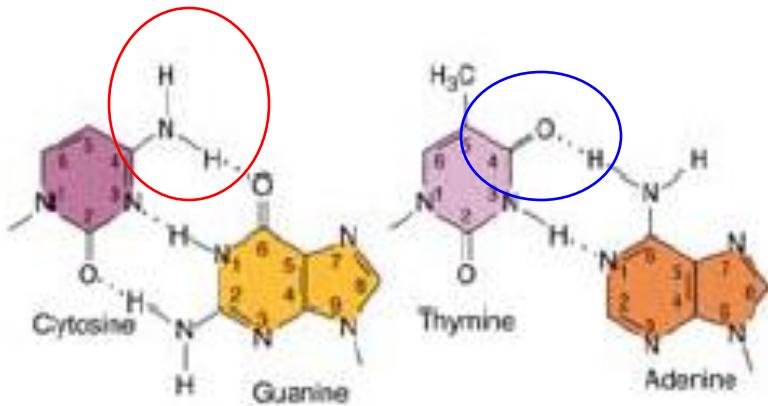
'KETO' - Guanine
(normal)



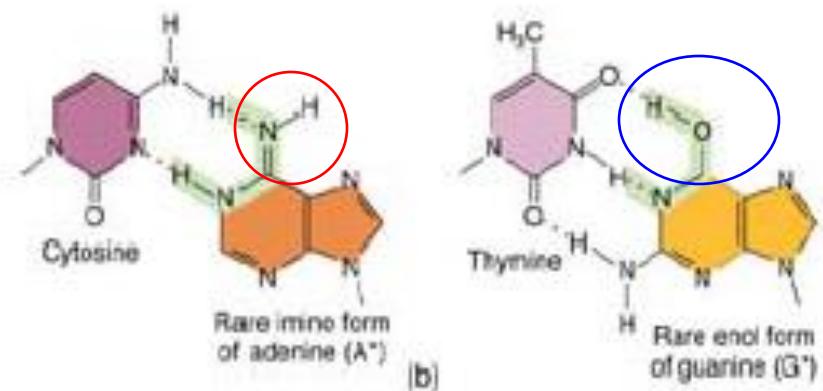
'ENOL' - Guanine

Il rapporto tra la forma Ketonica e quella Enolica è circa 10000:1

Errato appaiamento delle basi in forma enolica (T e G) ed Iminica (A e C)

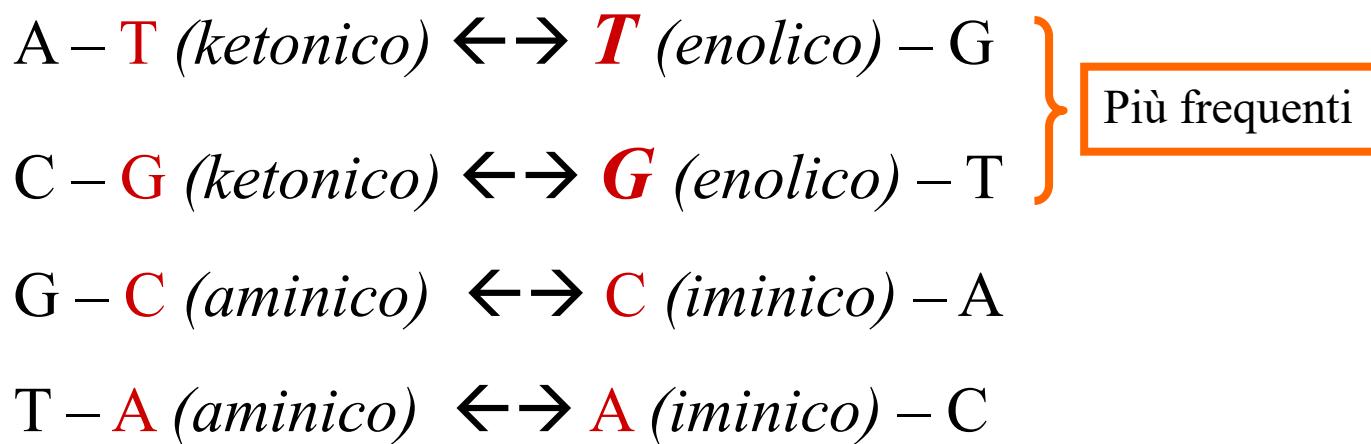


(a)



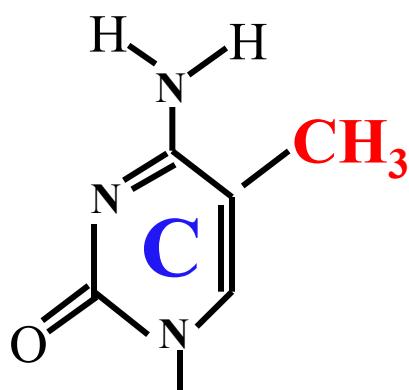
(b)

EFFETTO MUTAGENO DEGLI ISOMERI TAUTOMERICI

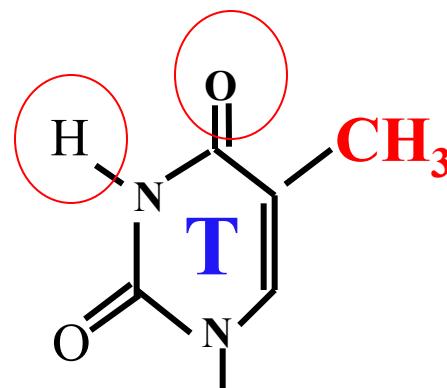
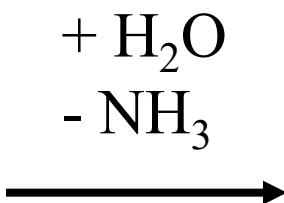


Il 99.9% di queste modificazioni vengono corrette dalla DNA polimerasi (proof reading activity)

Esistono numerosi agenti chimici in grado di determinare mutazioni. Tra questi l'acido nitroso provoca una deaminazione ossidativa che, nel caso della 5 metil-citosina, produce una timina



5-METIL CITOSINA

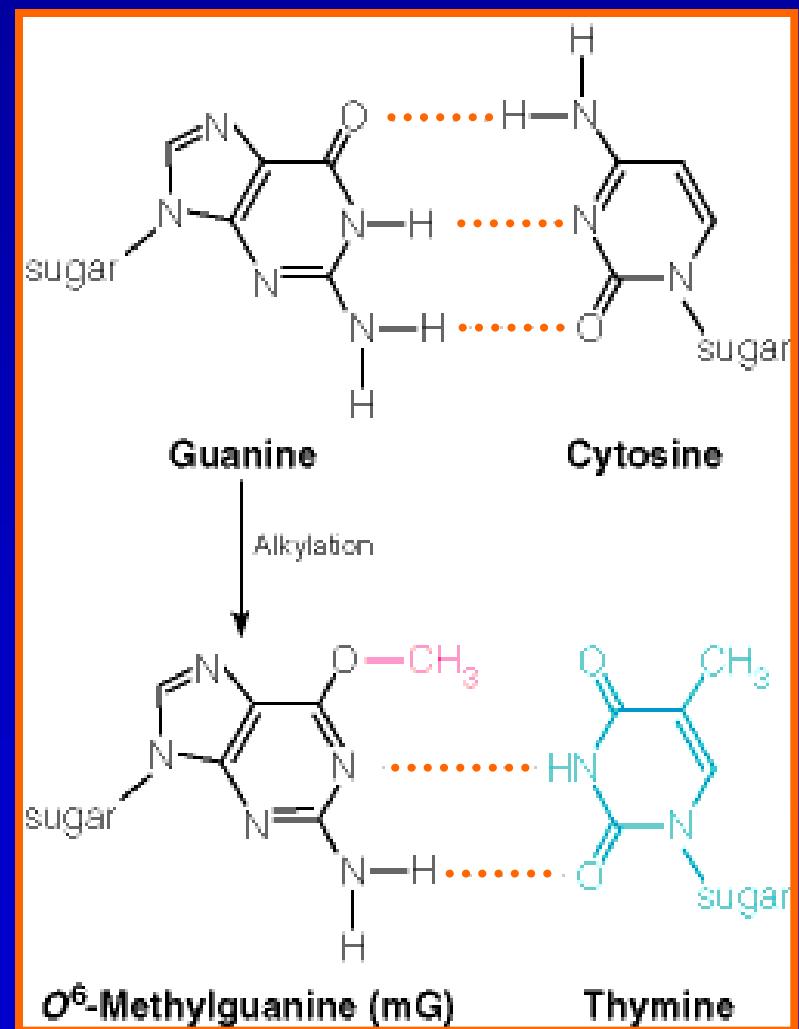


TIMINA

... oppure agenti chimici alchilanti, come la metilnitrosourea ed il metansulfonato, sono in grado

di determinare variazioni chimiche responsabili di provocare mutazioni.

In questo caso
l'alchilazione della
Guanina determina la
formazione di O⁶-mG che
si associa alla Timina
invece che la Citosina ...

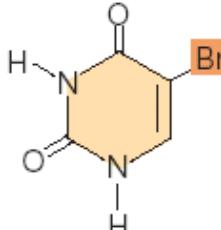
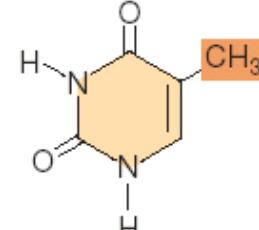
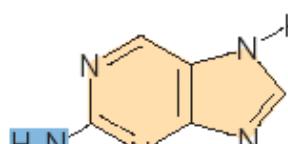
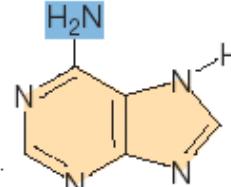


Analoghi nucleotidici

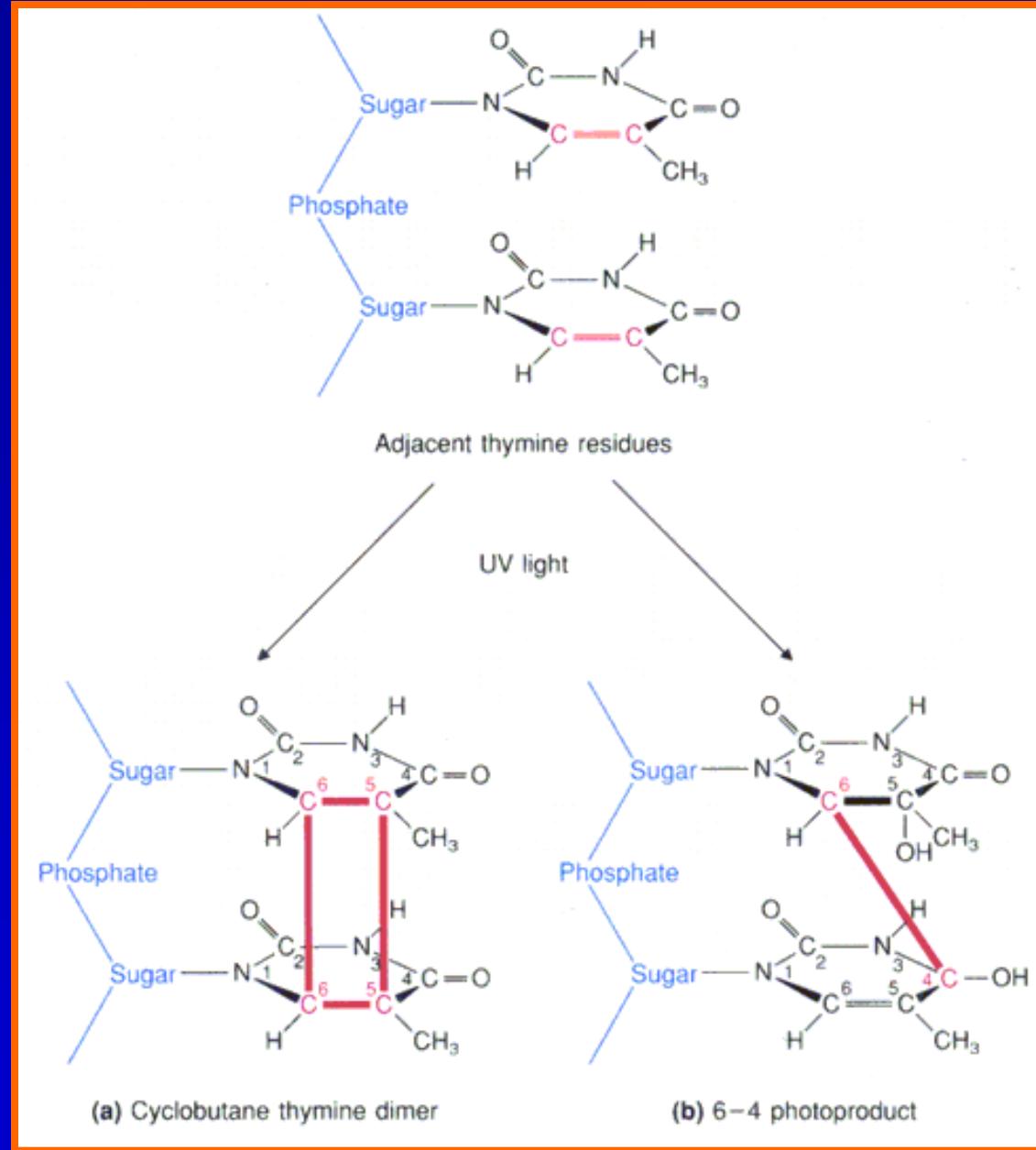
Gli analoghi nucleotidici hanno una maggiore tendenza alla isomerizzazione tautomerica

Il 5 bromo-uracile può appaiarsi con la G invece che con l'A

La 2-amino purina può appaiarsi con la C invece che con la T

| Analogs | Substitutes for |
|--|--|
|  5-Bromouracil |  Thymine |
|  2-Aminopurine |  Adenine |

.... Infine alcuni fattori fisici possono determinare un'alterazione chimica del DNA. L'esempio meglio noto è la formazione dei dimeri di pirimidina determinati dall'irradiazione di UV (254 nm)



La cellula è però dotata di meccanismi e strumenti che le permettono di correggere questi “errori”. Tra questi i più importanti sono:

- **La riparazione diretta**
- **Il NER (nucleotide excision repair)**
- **Il BER (base excision repair)**
- **L'MMR (mismatch repair)**
- **La riparazione SOS**
- **La riparazione ricombinazionale**

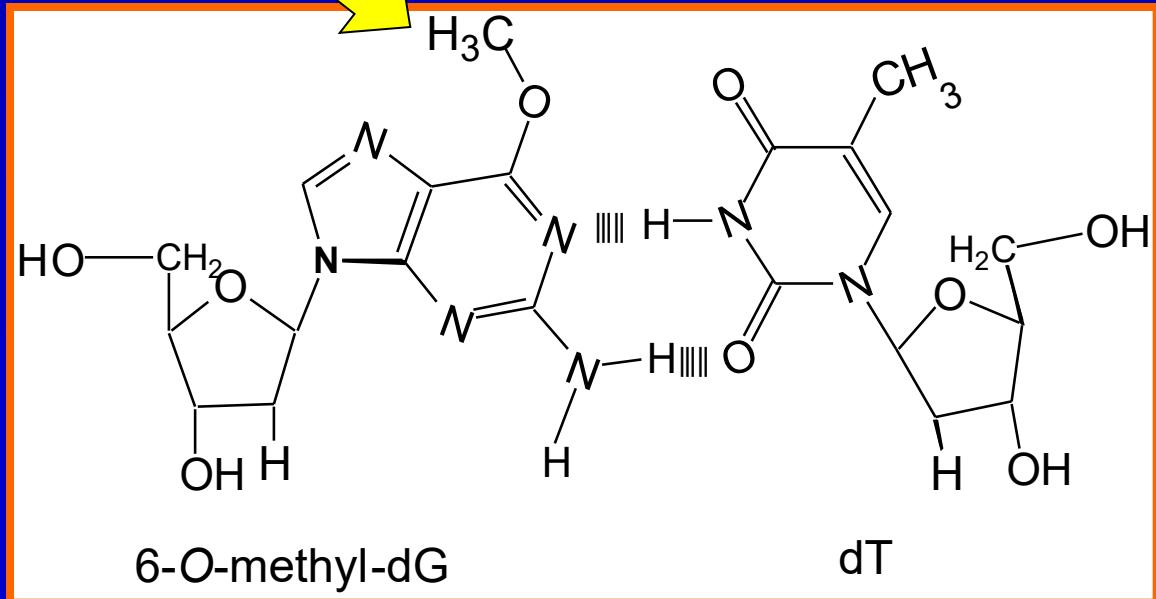
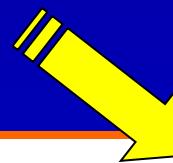
RIPARAZIONE DIRETTA

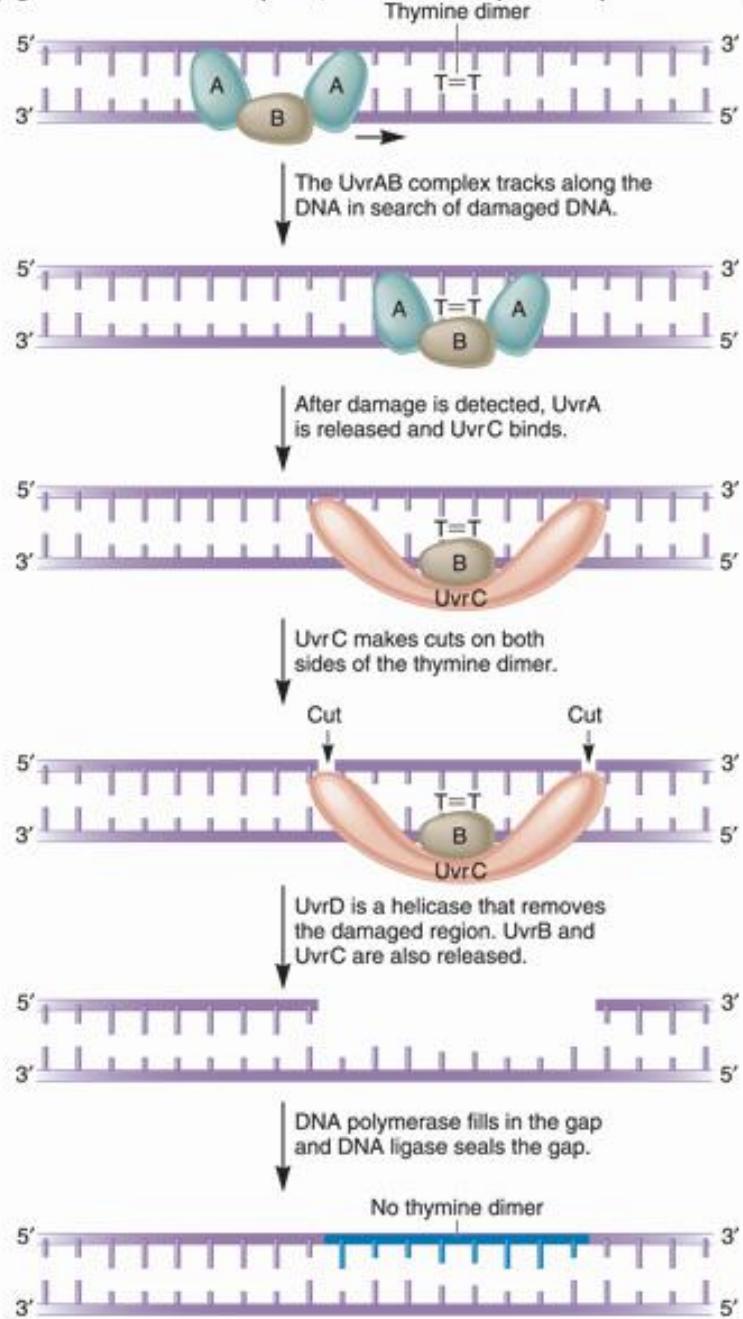
L'esempio principale è quello derivato dalla foto-riattivazione dei dimeri di pirimidina

Questa si ottiene mediante intervento di un enzima denominato FOTOLIASI (*phr*). Questo enzima catalizza la reazione inversa rispetto a quella determinata dall'irradiazione con UV. L'enzima si lega specificatamente ai dimeri di pirimidina e, in presenza di luce, li riconverte in due monomeri pirimidinici.

Un altro esempio di riparazione diretta è quello che è esercitato a livello delle basi alchilate

Il gruppo metile viene aggredito da una 6-O-metil guanina metiltrasferasi (codificata dal gene *ada* in *E.coli*)





NER (Nucleotide Excision Repair)

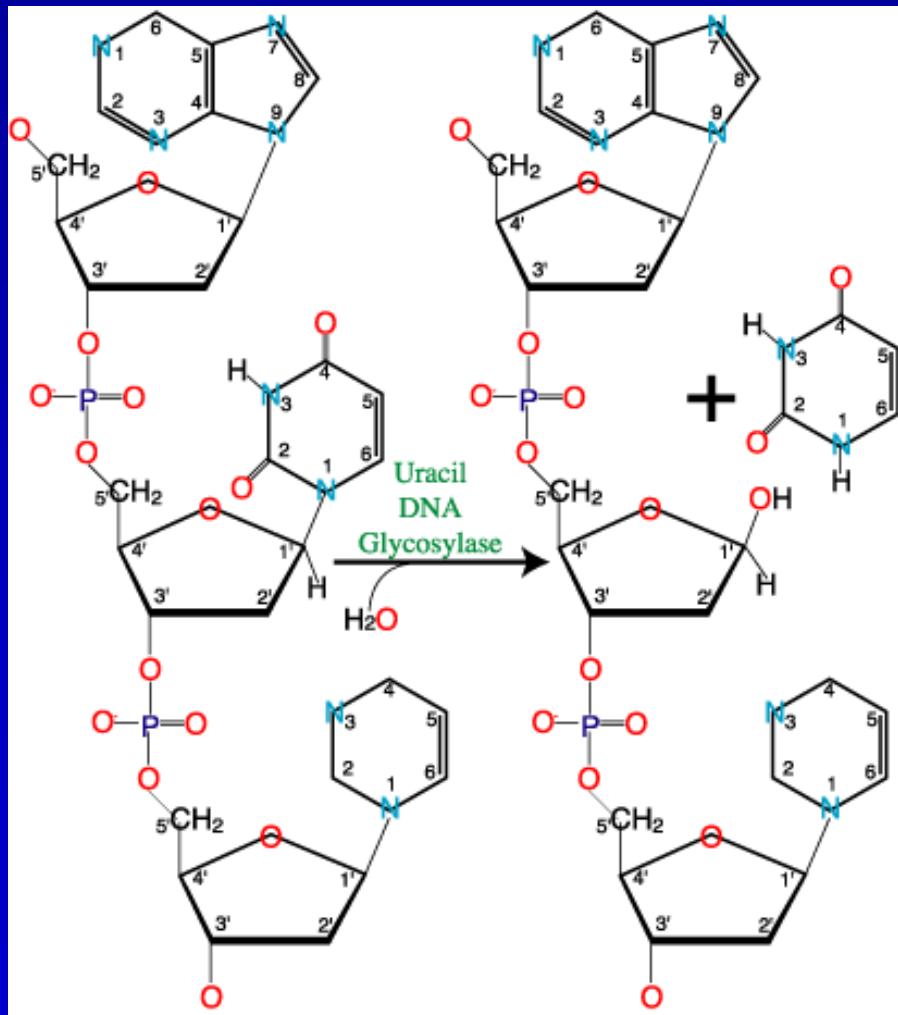
Il complesso delle proteine UvrAB scorre lungo il DNA sino a quando incontra una alterazione strutturale della molecola.

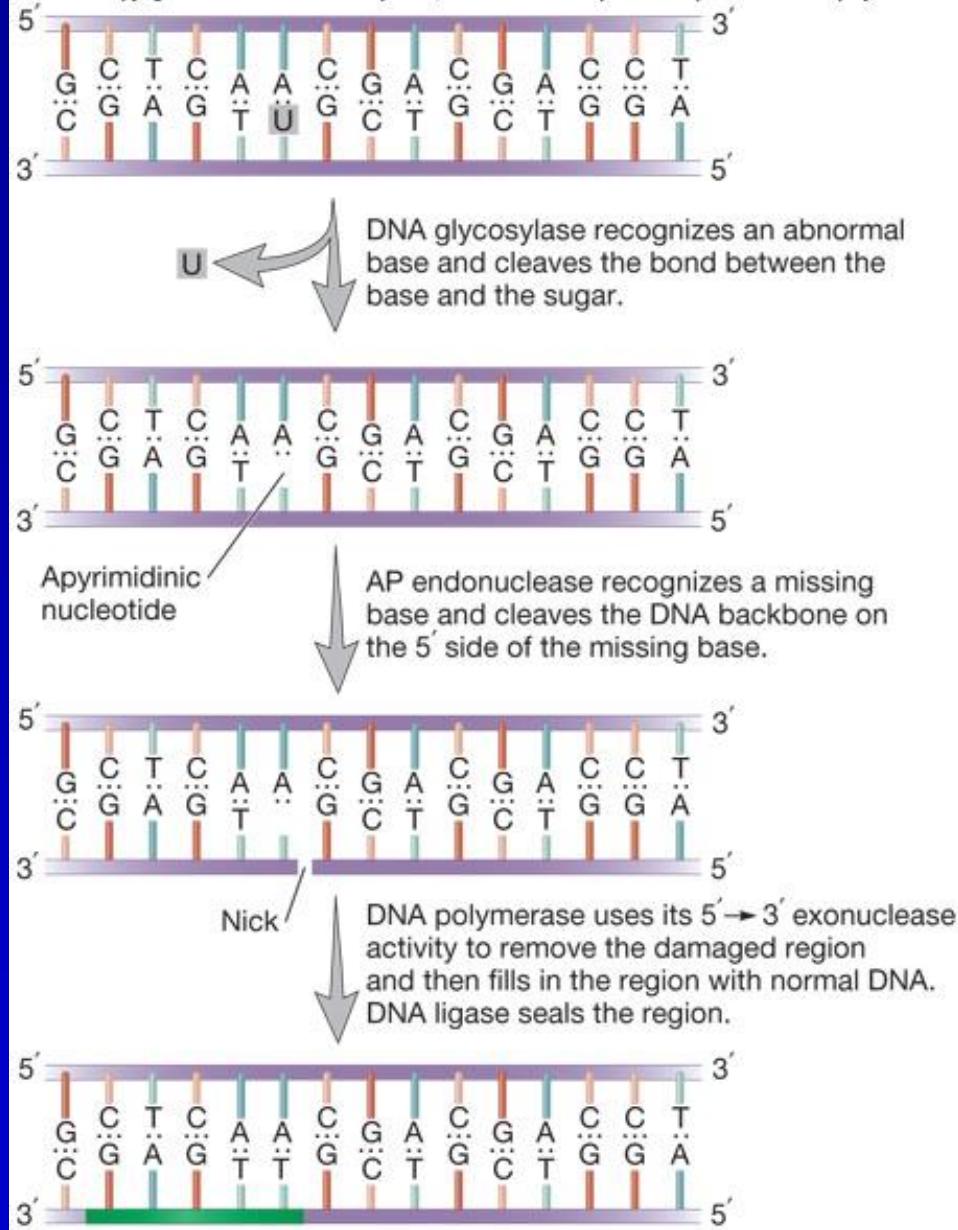
Quindi il dimero di UvrA viene sostituito da UvrC che taglia il DNA su singolo filamento 4 nt al 3' e 7 al 5' rispetto al danno.

Una elicasi (UvrD), la DNA pol I e la Ligasi completano il lavoro.

BER (Base Excision Repair)

In questo caso il sistema interviene solo sulla base da sostituire ... Infatti l'elemento principale del sistema è una GLICOSILASI. Questo enzima separa la base azotata dal deossiribosio intervenendo sul legame glicosidico





In seguito a questa eliminazione si forma nel DNA un sito AP (apurinico o apirimidinico). Questo viene riconosciuto da una AP endonucleasi che taglia l'impalcatura fosfato a livello del 5' del sito AP. A questo punto interviene la DNA pol I che chiude e corregge l'errore.

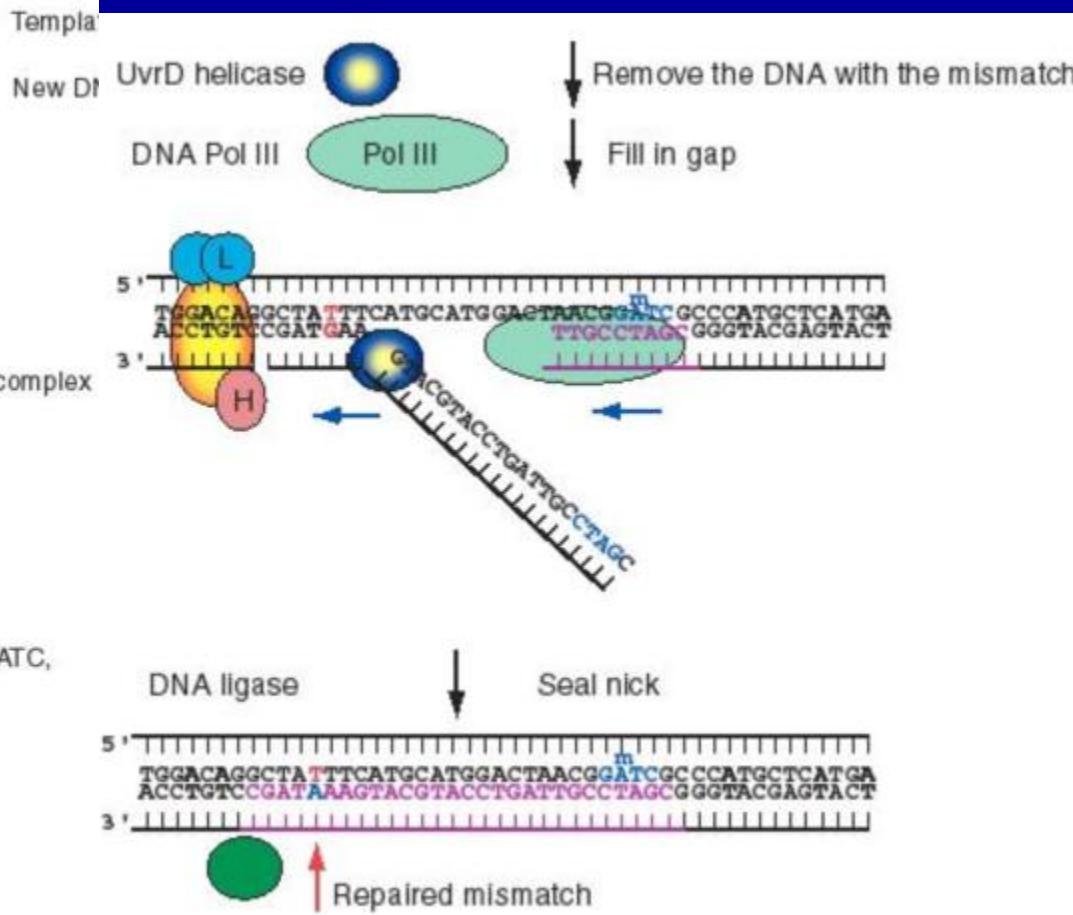
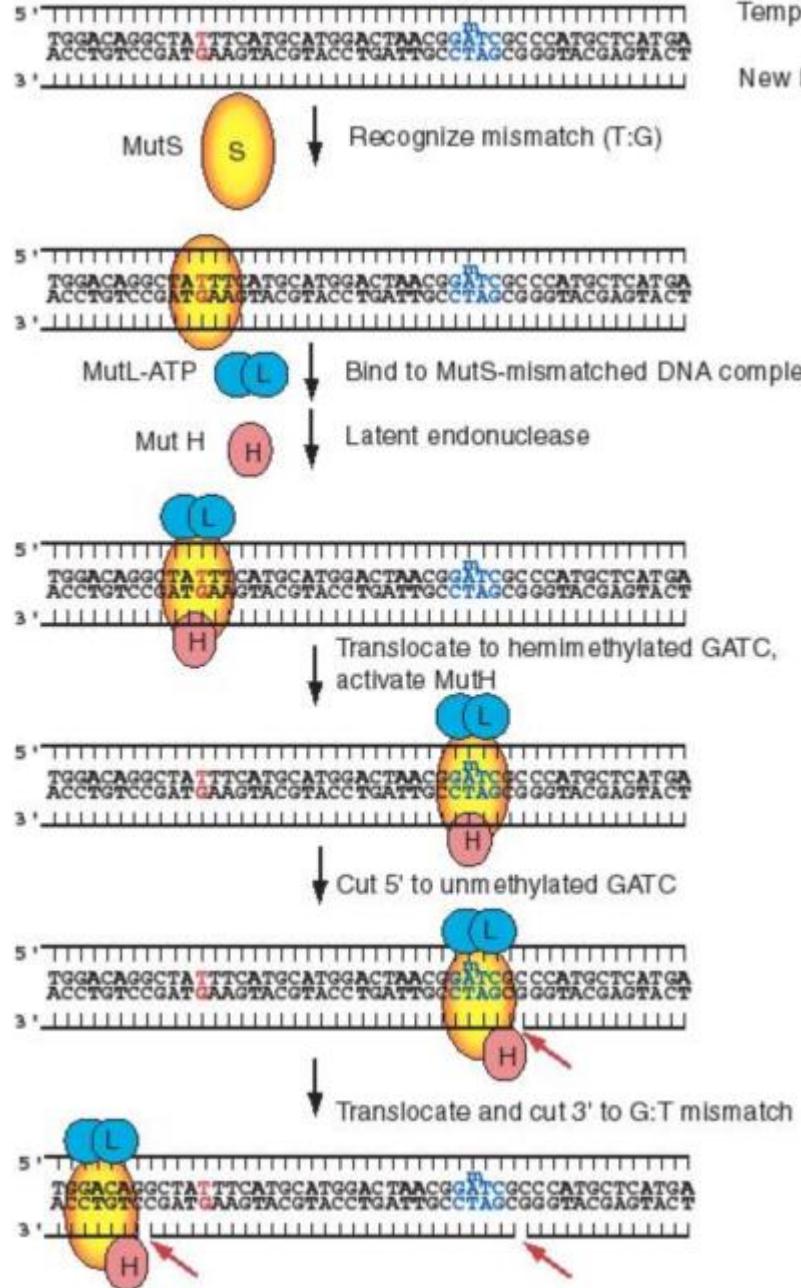
Sistema di riparazione di tipo MisMatch

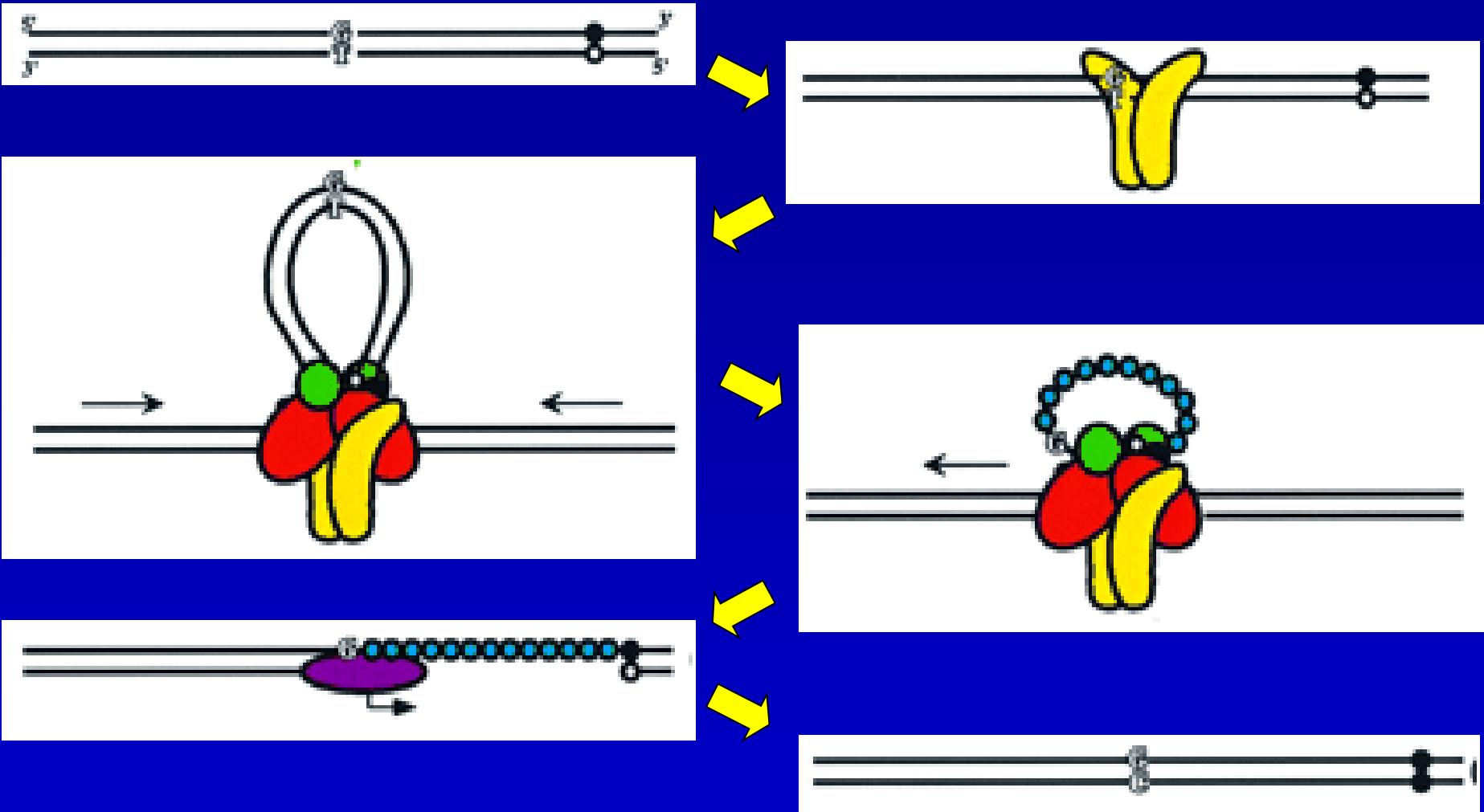
Questo sistema opera sugli appaiamenti errati che non determina alterazione strutturale della doppia elica del DNA (come per gli appaiamenti G-T e A-C)

Il sistema sembra, quindi, essere in grado di leggere il DNA

Le proteine coinvolte in questo sistema di riparazione sono: MutS, MutL e MutH

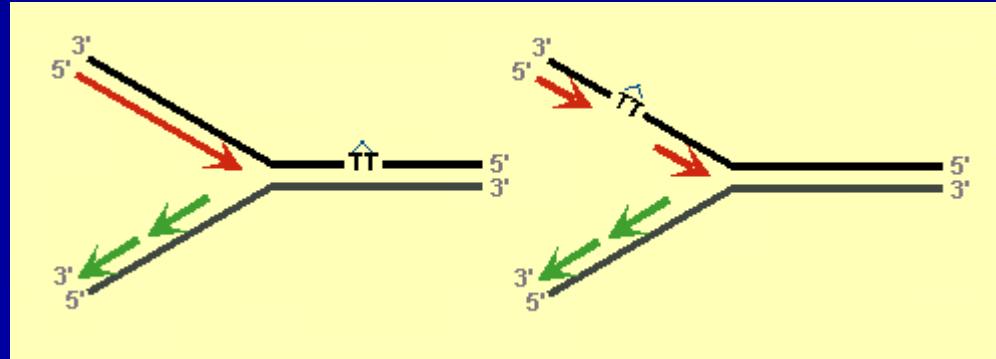
- **MutS**: riconosce l'appaiamento errato
- **MutL**: lega in presenza di ATP, come omodimero, il complesso MutS-DNA ed attiva MutH
- **MutH**: è l'endonucleasi che taglia al 5' in corrispondenza di una G di un sito GATC non metilato ed al 3' a valle del mismatch sul medesimo filamento



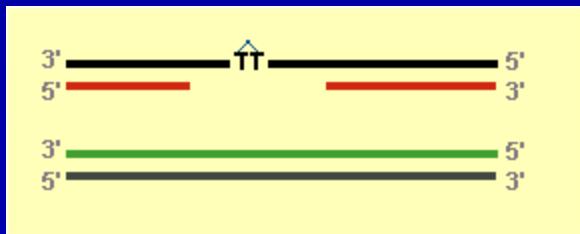


La riparazione ricombinazionale

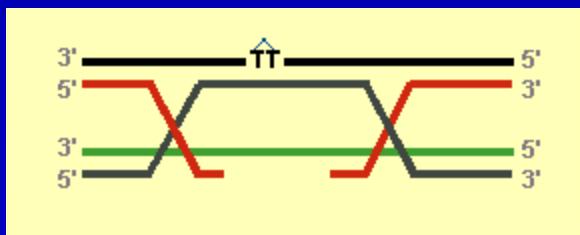
In alcuni casi i meccanismi di riparazione che abbiamo analizzato non sono in grado di intervenire prima che una forca replicativa giunga su un sito mutato. In questi casi la DNA polimerasi III “salta” questa regione (non polimerizza circa 1000 bp) e ricomincia a valle la sintesi di un nuovo filamento di DNA. Questo processo produce del DNA a singolo filamento e DNA con estremità 5' e 3' libere. Queste attivano il sistema SOS e la sintesi della proteina RecA



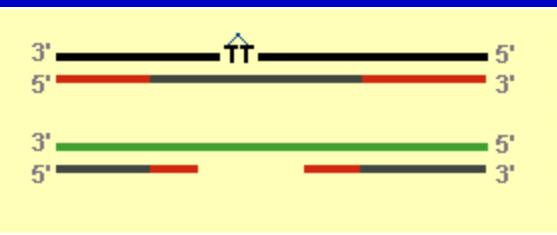
La replicazione del DNA salta il danno



Il risultato è una doppia elica completa ed una incompleta



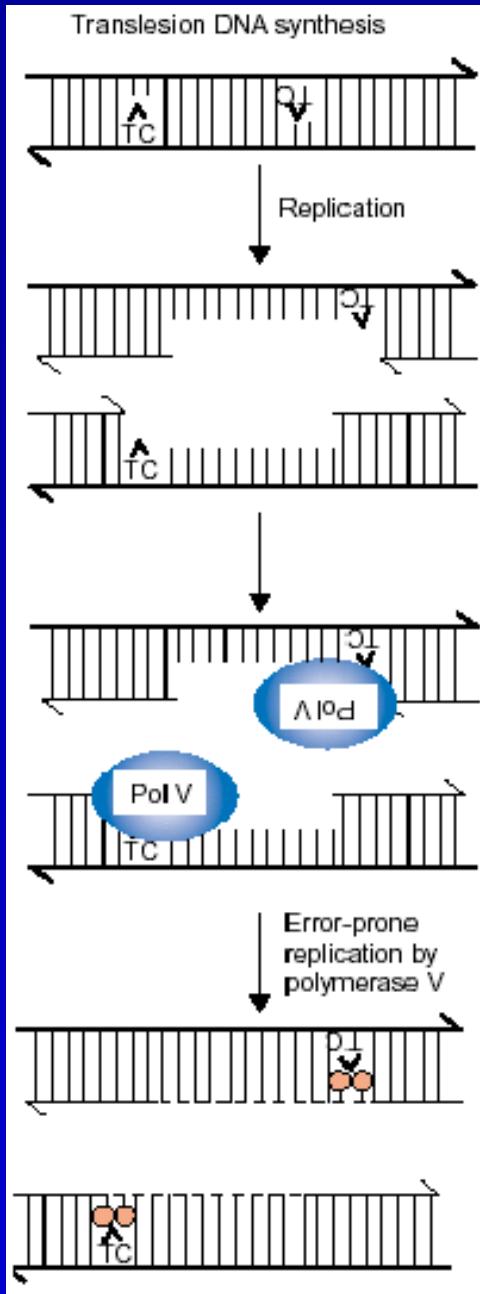
Il sistema SOS (RecA ed altre proteine) determinano lo scambio dei filamenti



A questo punto possono intervenire i sistemi di riparazione per excisione e di riparazione diretta

La riparazione di tipo SOS

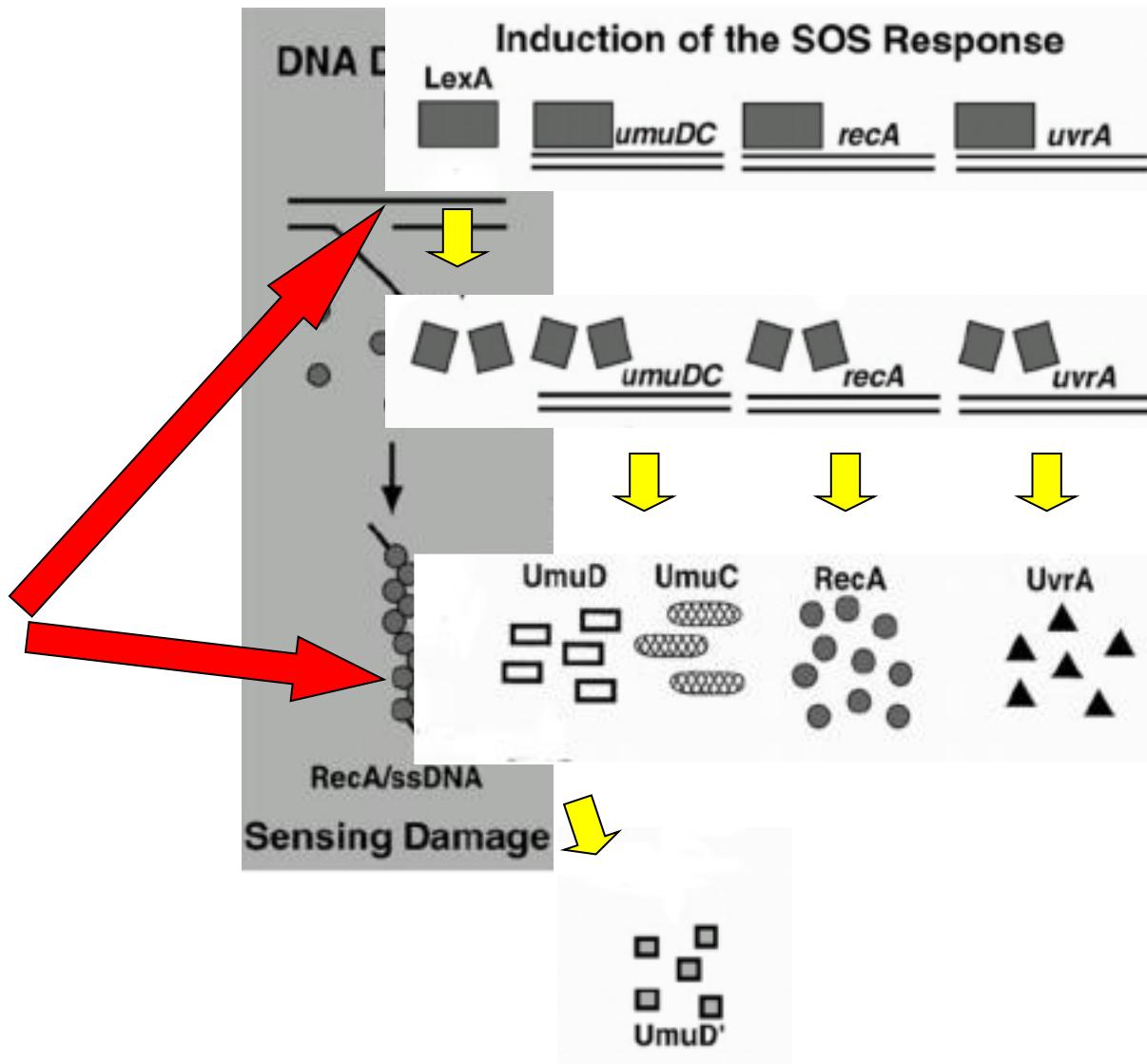
- Si tratta dell'ultima opportunità che cellula ha di correggere alcuni danni al DNA. Questo meccanismo interviene quando , a causa di mutazioni sul DNA concentrate nello stesso locus, la mancata sintesi di DNA da parte del replisoma porta alla perdita completa di informazione genetica.
- In questi casi la riparazione ricombinazionale non ha materiale per intervenire. Risolve la situazione una particolare polimerasi, codificata dal gene *umuD*, che è espressa quando il sistema SOS è attivato. Questa polimerasi inserisce in modo random i nucleotidi mancanti provocando 3 volte su 4 una mutazione.



La riparazione di tipo SOS

Il gene *umuD* e *umuC* codificano per la proteina UmuD'C. Questo complesso è stato riconosciuto come la V^a polimerasi di *E.coli*. Questa polimerasi, a differenza della I^a e della III^a non è dotata di attività exonucleasica e non ha bisogno di stampo ma solo di innesco. La proteina UmuD deve essere attivata proteoliticamente dalla proteina RecA.

INDUZIONE ED EFFETTO DEL SISTEMA SOS



Retromutazioni

REVERTANTI: ceppi nei quali il fenotipo originale che risulta modificato a causa di mutazioni è ristabilito attraverso una seconda mutazione

Retromutazioni che avvengono nel medesimo sito (reversioni)

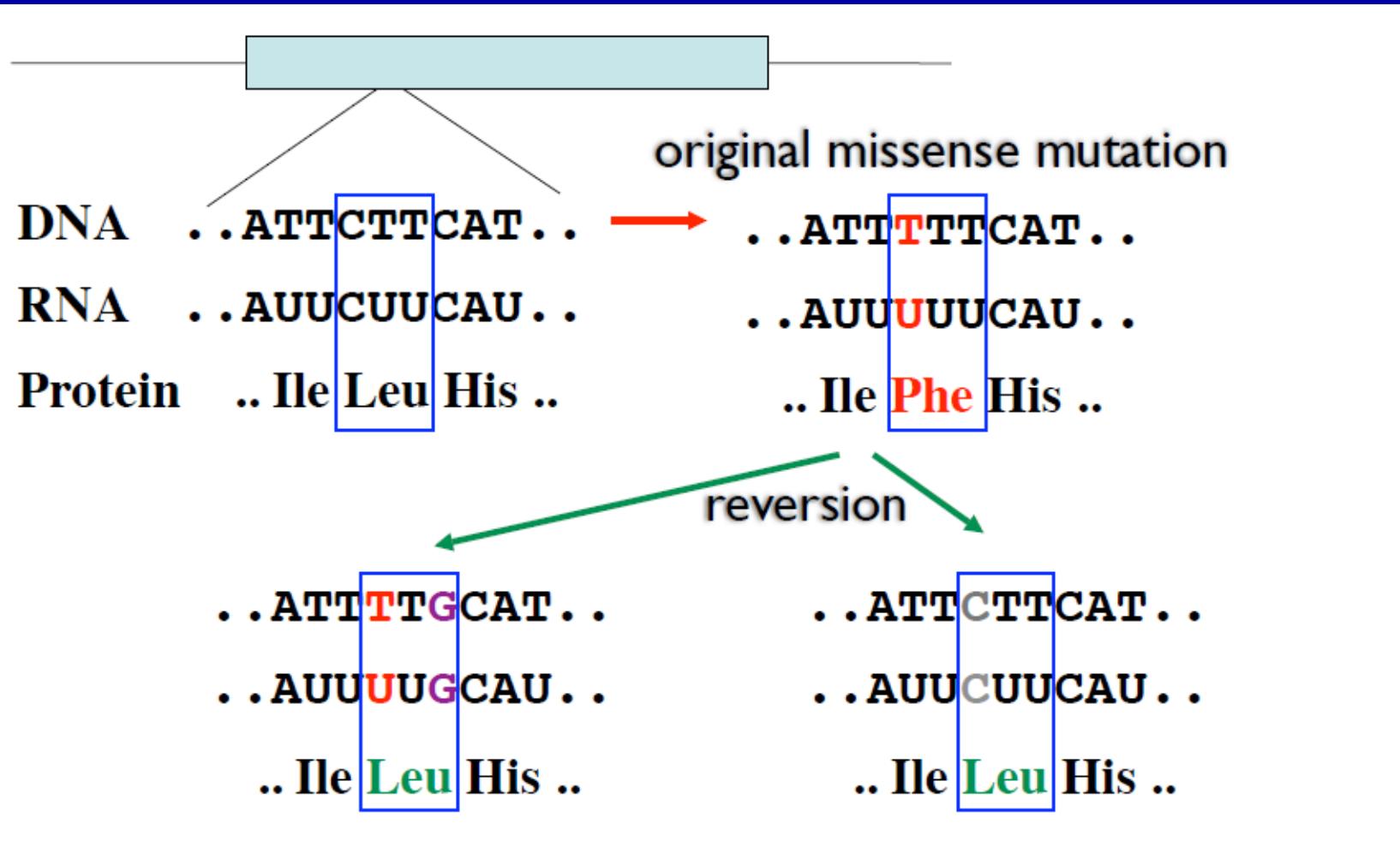


Mutazioni in un sito differente che ristabiliscono il fenotipo wild type
(Mutazioni soppressive)

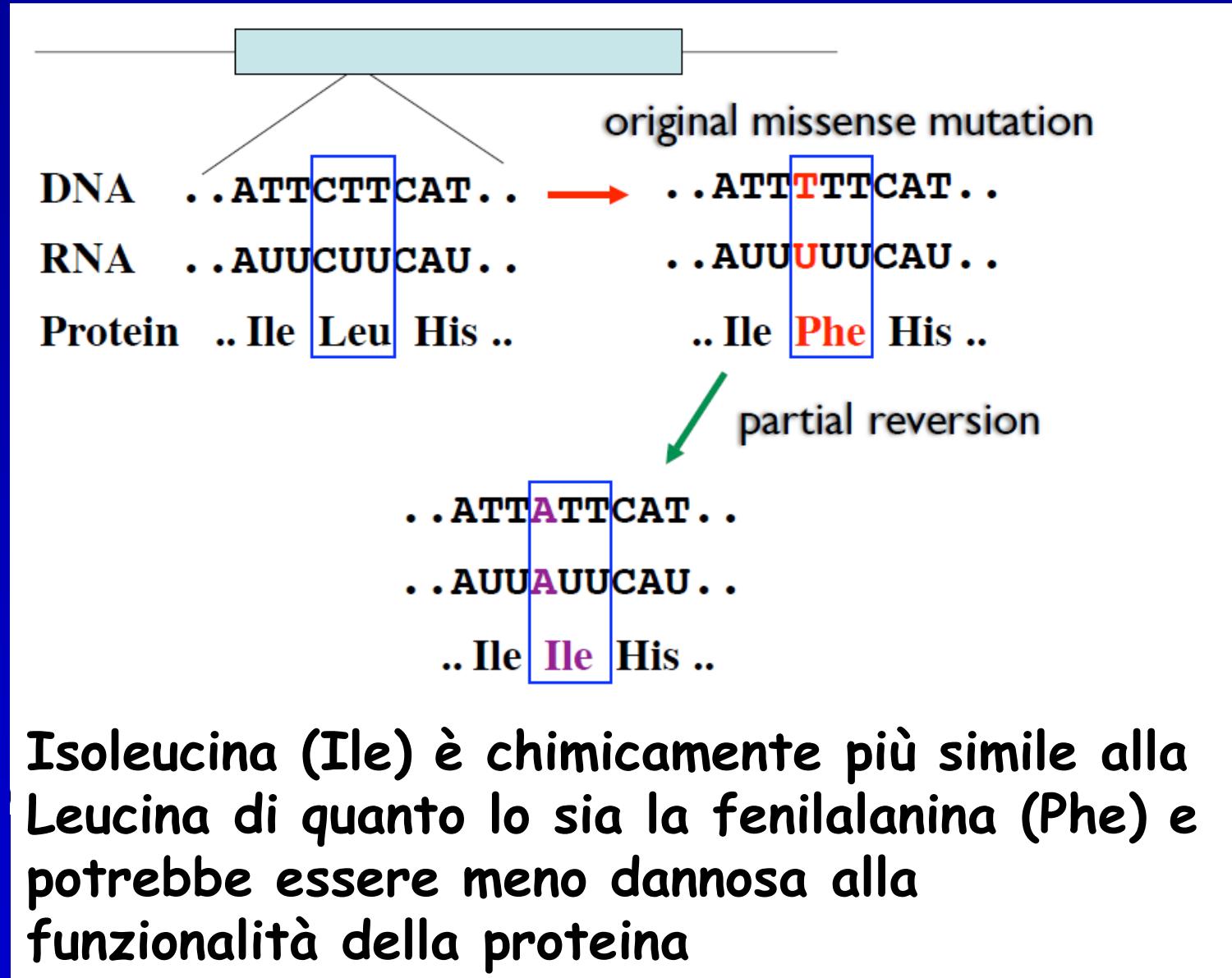


Possono aver luogo nel medesimo gene (ma in un sito differente) o in un altro o altri geni

Un esempio di reversione, i revertanti «veri»

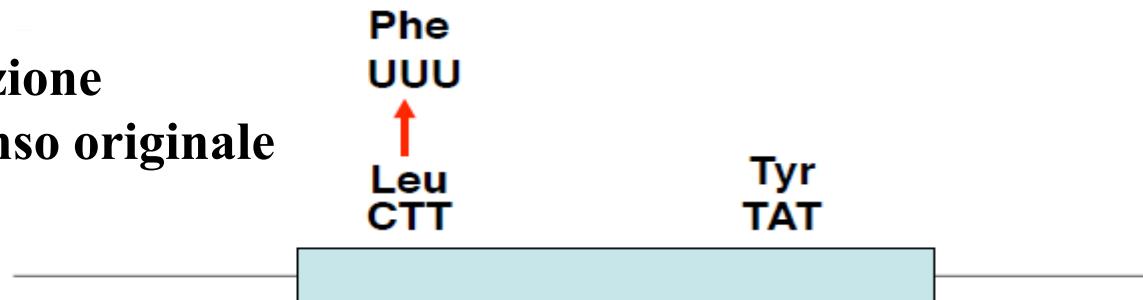


Un esempio di reversione: revertanti «parziali»

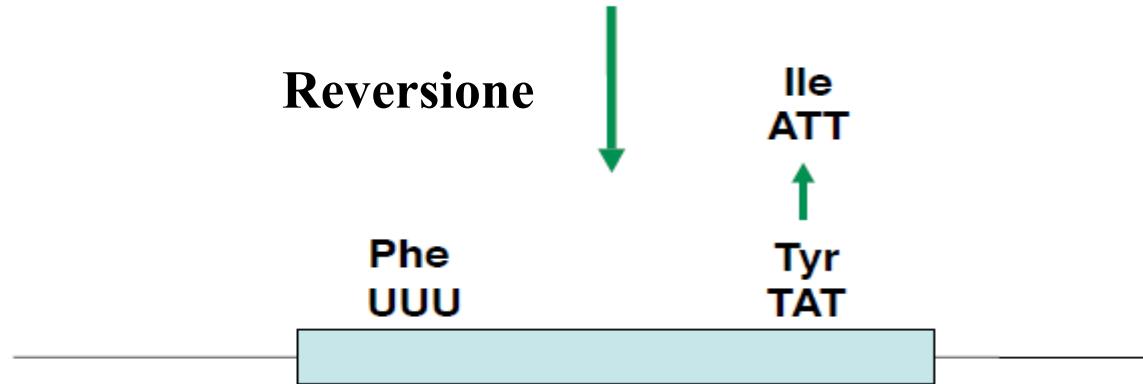


Mutazione soppressore: Mutazioni «compensatorie intergeniche»

**Mutazione
missenso originale**

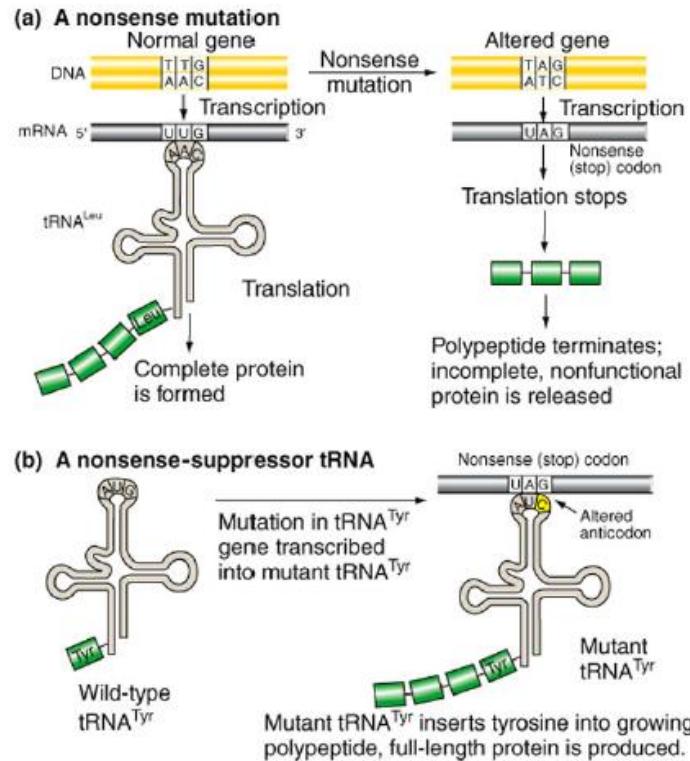


Reversione



Mutazione «soppressorie intrageniche»

Un «soppressore Amber» è una mutazione in un gene di un tRNA che fa sì che il ribosoma utilizzi un aminoacido in corrispondenza di un codone UAG (Stop)



Attenzione: un soppressore Amber è in grado di sopprimere solo mutazioni Amber (non le Opale e l'Ocra), ma agisce anche su codoni stop non mutati...

Mutazione «soppressorie intrageniche»

Interaction suppressors restore protein-protein interactions

