

# Le Mutazioni

# I genomi mutano nel tempo

- I genomi con il passare del tempo accumulano mutazioni.
- Le mutazioni sono causate da molteplici fattori, tra cui il fatto che il DNA nel nucleo si trova in soluzione acquosa e che l'aggiunta di acqua può per esempio determinare danni alle basi azotate.
- Altri danni al DNA possono per esempio derivare dall'esposizione all'energia luminosa.

# I genomi mutano nel tempo

- Mutazioni possono derivare da errori della DNA polimerasi, che soprattutto in prossimità delle sequenze ripetute incontrano difficoltà nella sintesi.
- Anche durante la ricombinazione (crossing-over) vi possono essere degli errori durante lo scambio di sequenze omologhe tra i cromatidi.

# Il DNA può essere riparato

- Nelle cellule sono presenti sistemi in grado di riparare i danni subiti dalla molecola di DNA, tuttavia alcuni errori risultano duraturi.
- Quando questi errori si verificano nelle cellule dalle quali derivano i gameti, le mutazioni passano alla generazione successiva.

# MUTAZIONI geniche

Determinano un cambiamento nell'informazione genetica

## TIPI DI MUTAZIONI

- **Sostituzione** di basi azotate: A-T diventa C-G;
- **Inserzione** di basi (se il numero di basi è diverso da tre si ha uno sfasamento della fase di lettura);
- **Delezione** di basi o sequenze di DNA generalmente causate da fattori mutageni;

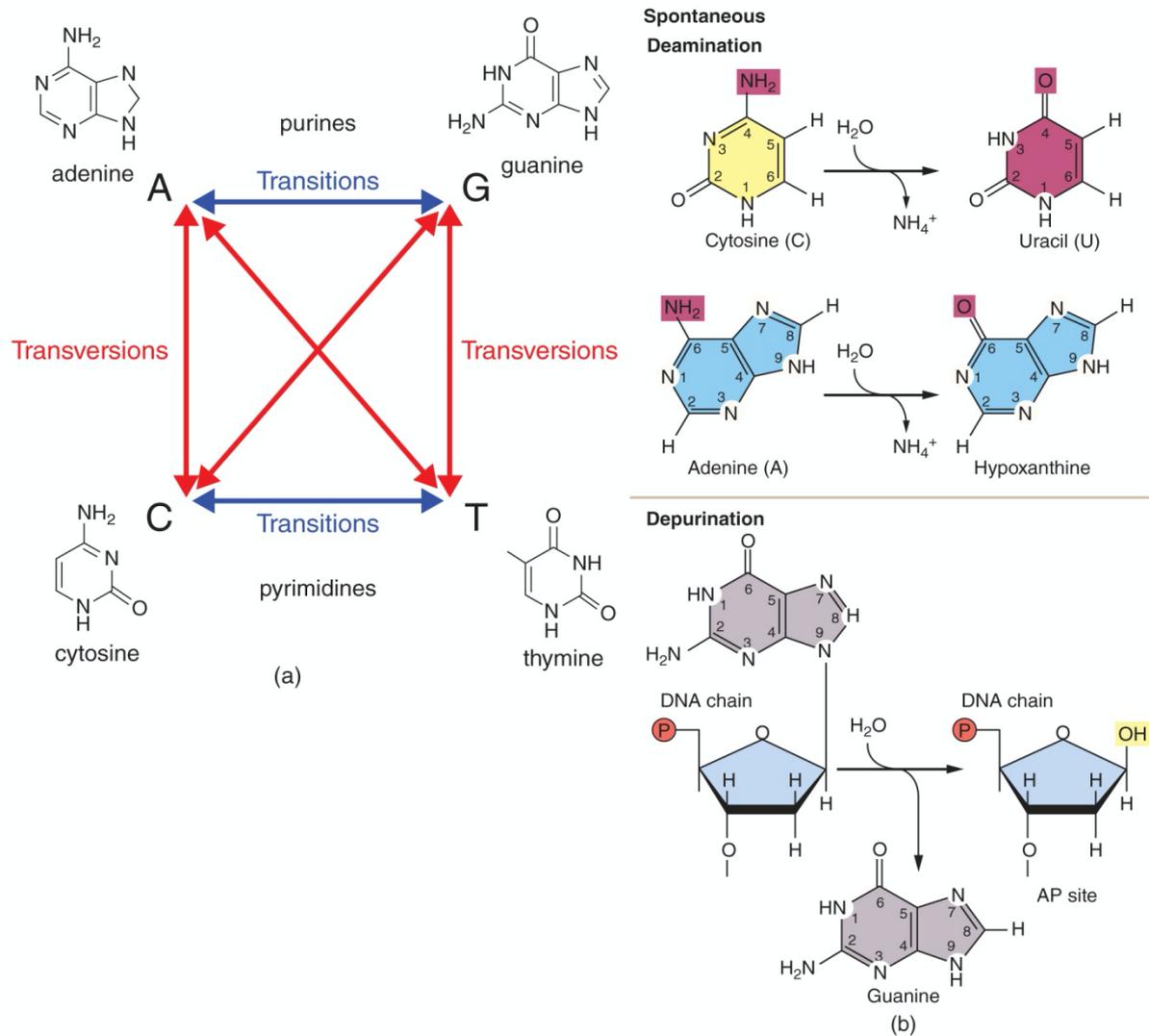
# MUTAZIONI geniche

I geni sono normalmente trasferiti alla progenie invariati nella loro sequenza. Occasionalmente mutano e possono conferire un vantaggio o uno svantaggio per l'individuo che li eredita

**MUTAZIONI PUNTIFORMI**  $\Rightarrow$  si ha la sostituzione di una singola base azotata

**TRANSIZIONE:** determina la sostituzione di una purina (o di una pirimidina) con un'altra purina es.  
 $A \Rightarrow G$  (o pirimidina  $T \Rightarrow C$ )

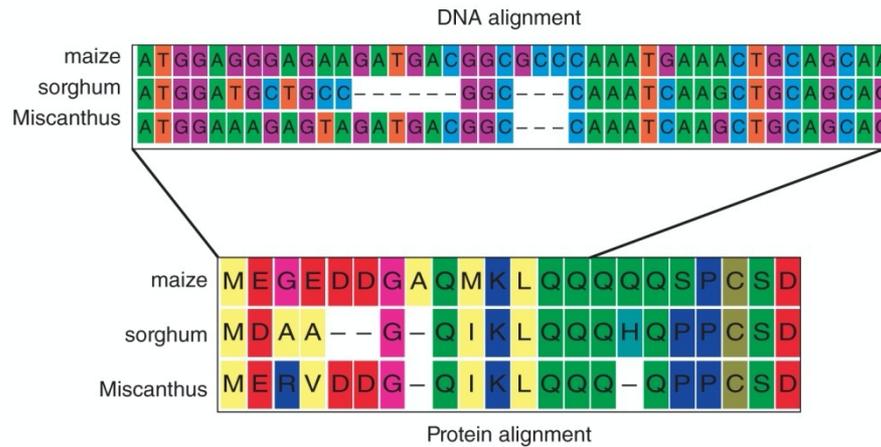
**TRANSVERSIONE:** determina la sostituzione di una purina con una pirimidina o viceversa



**Figure 2.1** Common single base pair mutations. (a) Structures of the bases and the distinction between transitions and transversions. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transitions-transversions-v3.png>. By Petulda (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons. (b) Results of deamination (top) and depurination (bottom), both of which are spontaneous mutations. From Buchanan *et al.* (2000). Reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc.

# Inserzioni e Delezioni: indels

- In alcune regioni del genoma si possono avere inserzioni o delezioni di nucleotidi.
- Le inserzioni e delezioni possono coinvolgere uno più nucleotidi e non sempre risulta chiaro se la variazione di una sequenza genica sono dovute ad un'inserzione o ad una delezione.
- In generale quindi vengono indicate con il termine **indels**



**Figure 2.2** Alignment of nucleotides and the corresponding amino acids from the beginning portion of the *ramosa1* locus in maize, sorghum, and the ornamental plant *Miscanthus sinensis*. The 42 base pairs of the DNA alignment correspond to the first 14 amino acids in the protein. Two indels are visible in these first 42 base pairs, plus 9 single nucleotide polymorphisms

# Allineamento di sequenze geniche

- Il modo più utilizzato per comparare tra di loro sequenze geniche è allinearle: ciascuna sequenza viene allineata dal 5' al 3'.
- In questo modo le indels e le sostituzioni di singoli nucleotidi divengono evidenti.
- Le sostituzioni di singoli nucleotidi vengono indicate con il termine di **polimorfismi da singolo nucleotide** o **SNP**

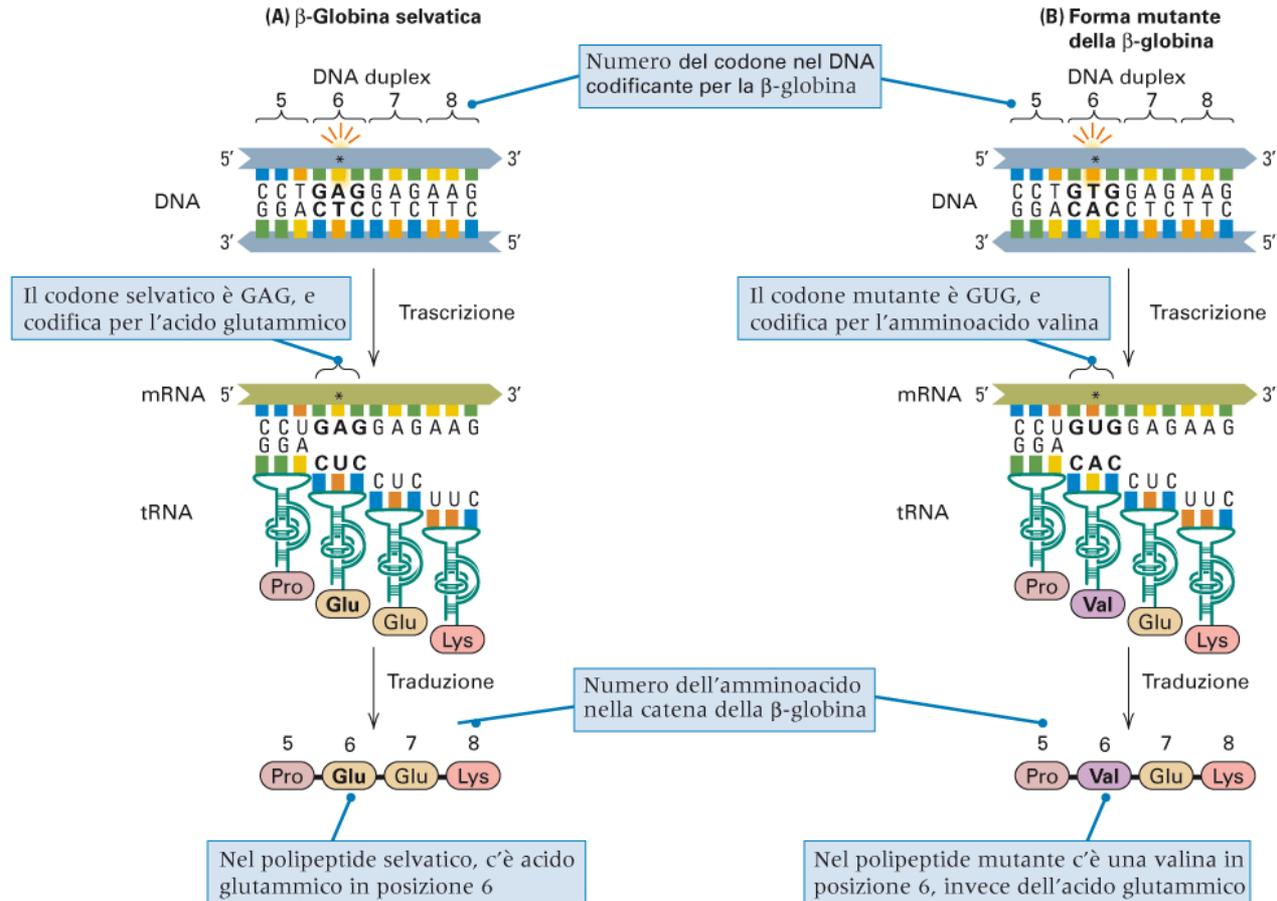
# Allineamenti di sequenze

- In un allineamento tra sequenze il numero di nucleotidi (base pair bp) che coincidono viene espresso come **percentuale di similarità**, ed è dato dal rapporto tra il numero di nucleotidi che coincidono sul numero totale dei nucleotidi allineati.
- La **similarità** è diversa dall'**identità** perché nel primo caso si assume che le pirimidine siano simili ma ovviamente non identiche.

# Effetto delle mutazioni

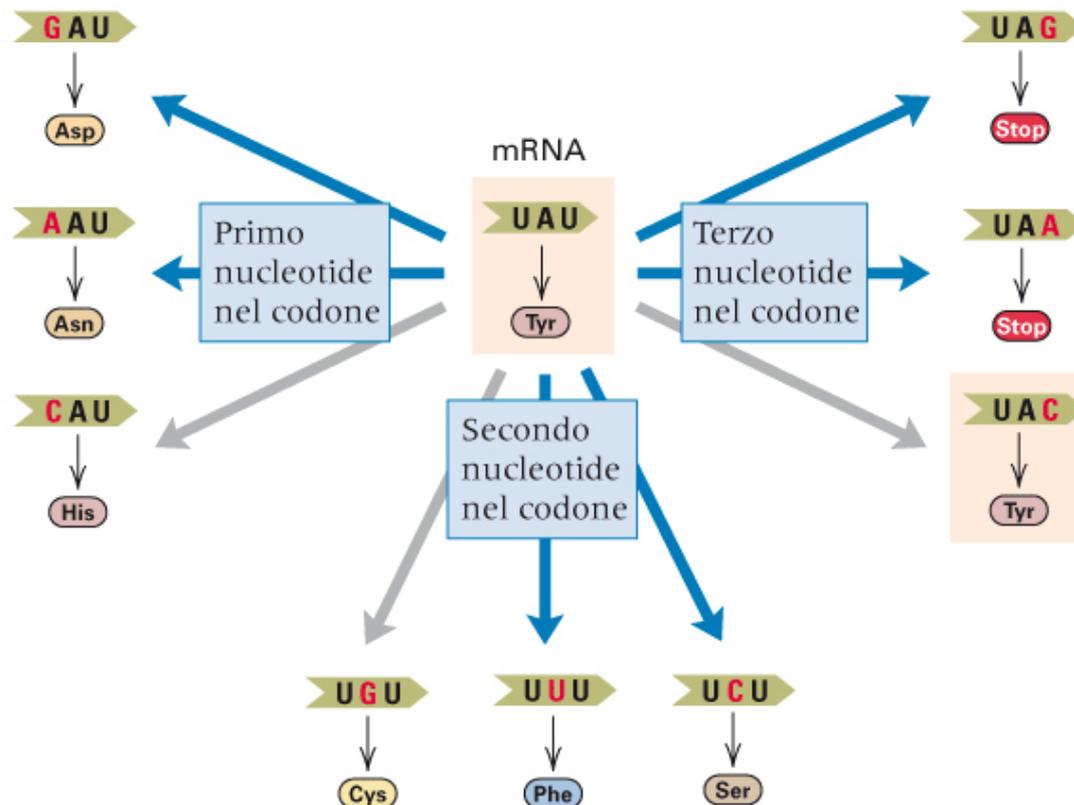
## Sostituzione di una coppia di basi

- Mutazioni silenti  $\Rightarrow$  l'a.a codificato non cambia come conseguenza della degenerazione del codice genetico, *GGA* muta in *GGC* ed entrambe codificano per una glicina.
- Per l'insorgenza di codoni di stop si possono avere proteine troncate.
- Quando si ha la sostituzione di un a.a. con un altro l'effetto può essere più o meno deleterio (mutazioni missense).

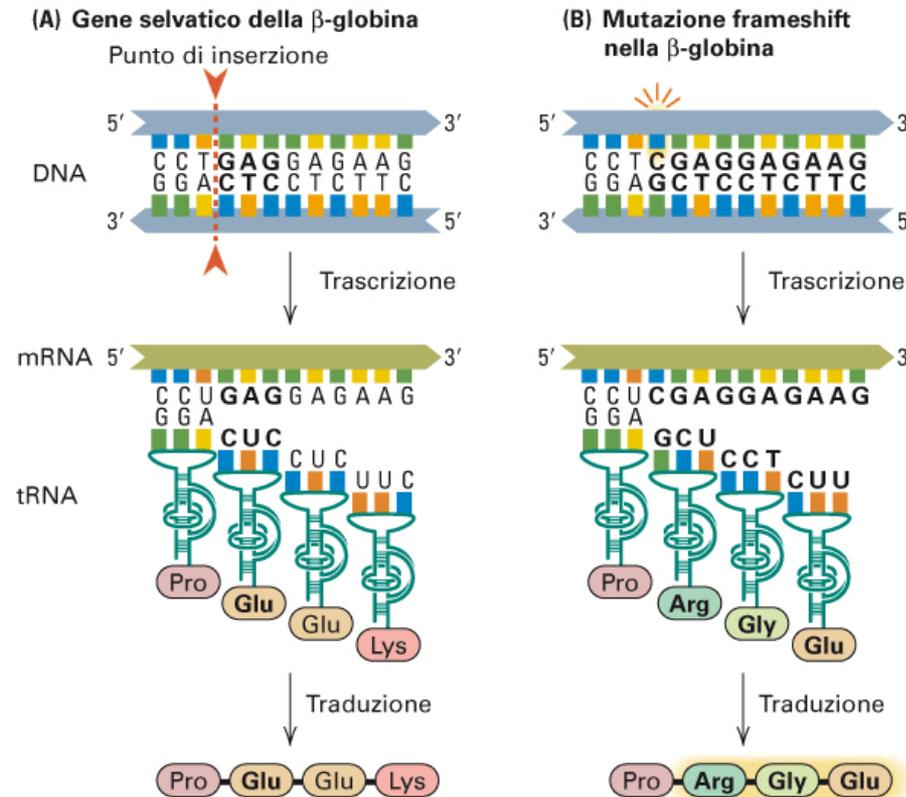


**FIGURA 14.3** Basi molecolari dell'anemia falciforme. (A) Parte della sequenza del gene normale della  $\beta$ -globina è trascritta nell'mRNA che codifica per il polipeptide Pro-Glu-Glu-Lys. La T della coppia nucleotidica evidenziata A-T viene trascritta come una A nel codone GAG dell'acido glutammico. (B) La mutazione della coppia di basi normale A-T in T-A dà origine al codone GUG, invece del normale codone GAG. Il codone GUG codifica per la valina (Val), per cui la sequenza amminoacidica di questa regione della proteina è: Pro-Val-Glu-Lys. L'emoglobina che ne deriva è difettiva e tende a polimerizzare a basse concentrazioni di ossigeno.

# Anemia Falciforme mutazione missenso



**FIGURA 14.4** I nove codoni che possono essere originati da mutazioni di un singolo nucleotide nel codone UAU. Le frecce blu indicano le transversioni, quelle grigie le transizioni. I due possibili codoni che codificano per la tirosina sono evidenziati in due riquadri. I due possibili codoni di stop (non senso) sono evidenziati in rosso. Quindi, il codone UAU può dare origine a sei mutazioni missenso, due non senso e una silente.



**FIGURA 14.5** (A) Una piccola parte del gene che codifica per gli amminoacidi 5-8 della  $\beta$ -globina. (B) Il risultato di una mutazione frameshift (in questo esempio l'inserzione della coppia di basi C-G alla posizione indicata con la "scintilla"). Tutti i codoni a valle del sito di mutazione risultano modificati a causa dello slittamento del modulo di lettura, così che la sequenza amminoacidica differisce da quel punto in poi.

## Base-pair substitution mutation

DNA    5' A G A T G G A A C G G T T C T A A G C C 3'  
         | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
         3' T C T A C C T T G C C A A G A T T C G G 5'

RNA    5' A G A U G G A A C G G U U C U A A G C C 3'

Protein    met - glu - arg - phe

DNA    5' A G A T G G A A C **T** G T T C T A A G C C 3'  
         | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
         3' T C T A C C T T G **A** C A A G A T T C G G 5'

RNA    5' A G A U G G A A C **U** G U U C U A A G C C 3'

Protein    met - glu - **leu** - phe

## Frame-shift mutation

**T**  
↓

DNA 5' A G A T G G A A C G G T T C T A A G C C 3'  
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
      3' T C T A C C T T G C C A A G A T T C G G 5'

RNA 5' A G A U G G A A C G G U U C U A A G C C 3'

Protein met - glu - arg - phe

DNA 5' A G A T G **T** G A A C G G T T C T A A G C C 3'  
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | |  
      3' T C T A C **A** C T T G C C A A G A T T C G G 5'

RNA 5' A G A U G **U** G A A C G G U U C U A A G C C 3'

Protein met - (STOP)

# Mutageni

1. Mutazioni spontanee: errori nella replicazione del DNA
2. Mutageni chimici:
  - a) intercalanti;
  - b) Nitrosamine (nicotina)
3. Mutageni fisici:
  - a) Radiazioni
  - b) UV
  - c) Radicali liberi

# Esempi di mutazioni puntiformi: la resistenza ad un erbicida

La resistenza ad un erbicida viene definita come un carattere geneticamente ereditato da un biotipo, grazie al quale il biotipo stesso può resistere e riprodursi dopo il trattamento con una dose di erbicida che è normalmente letale per il biotipo stesso.

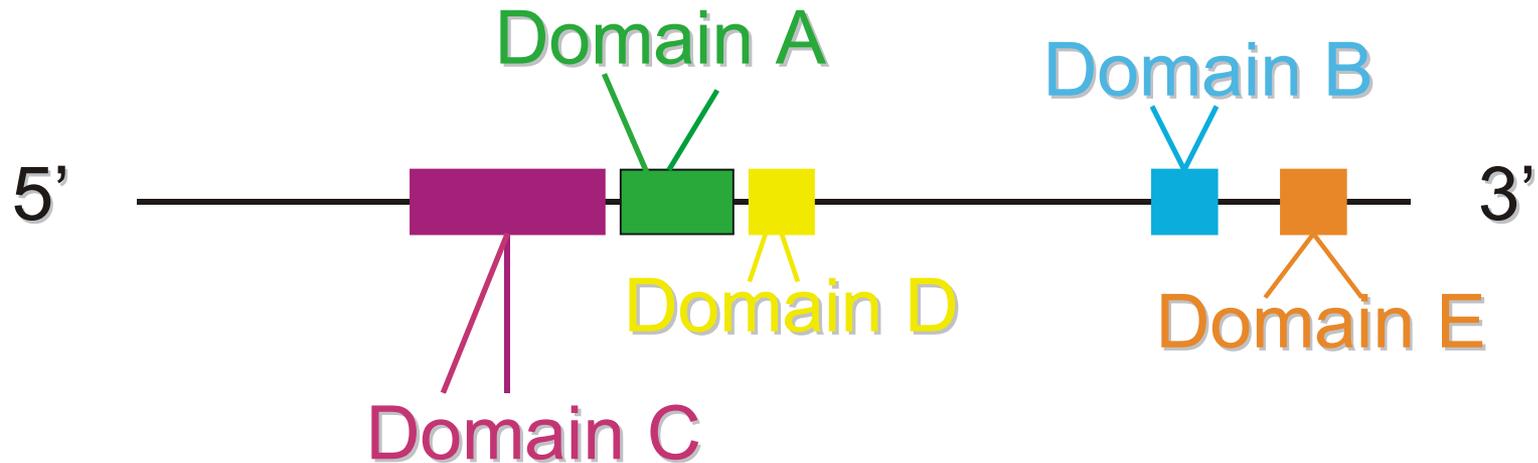


# Sviluppo della resistenza

- In una popolazione di piante infestanti lo sviluppo della resistenza è un processo evolutivo. In conseguenza di ripetuti trattamenti con una particolare classe o famiglia di erbicidi , le frequenze geniche nelle popolazioni infestanti si modificano in modo tale che la frequenza degli alleli di resistenza e gli individui resistenti aumentano.



# Il gene Aceto Lattato -Sintasi (ALS) bersaglio degli erbicidi



**Mutations in Domain A**

**High resistance to SU**

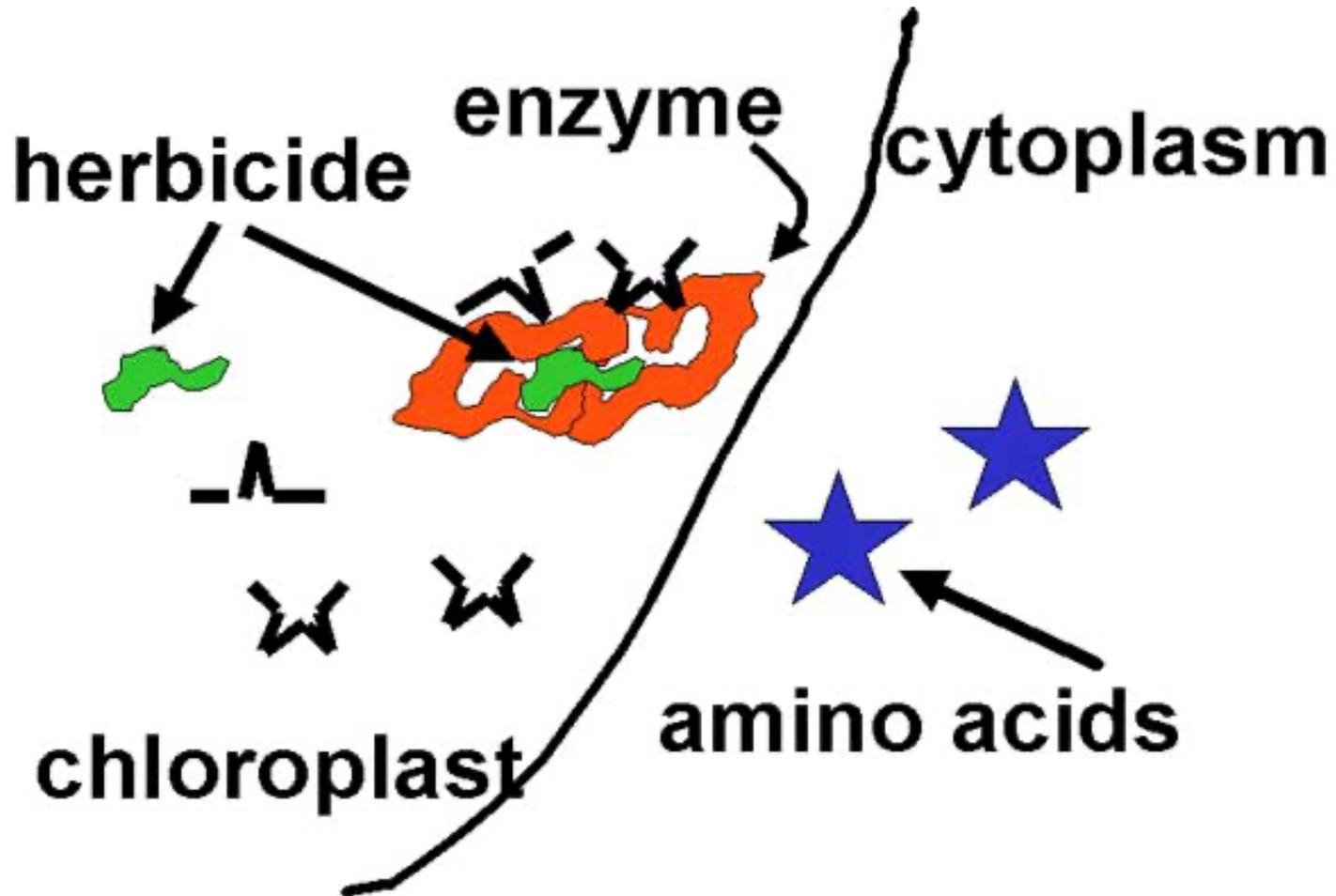
**Mutations in Domain B**

**High resistance to SU and IM**

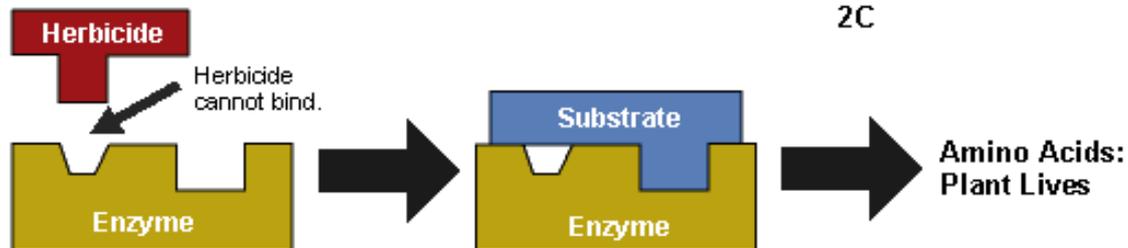
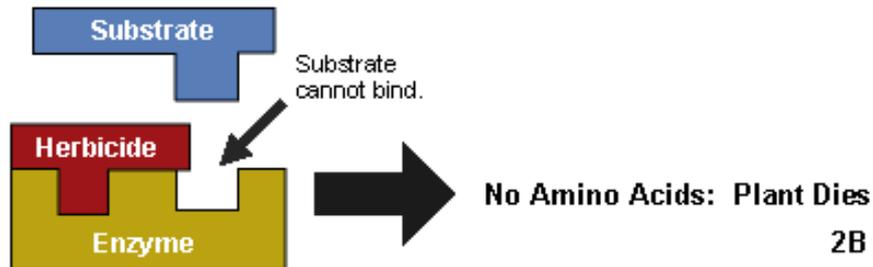
# Mutazioni per la resistenza

- Perché si manifestino fenomeni di resistenza in una popolazione infestante è necessario che in essa siano presenti alleli di resistenza;
- Tutti i geni sono interessati da mutazioni spontanee con una frequenza che varia da  $1 \times 10^{-5}$  per  $1 \times 10^{-9}$  per i geni analizzati

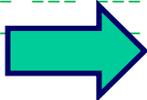
# Come agisce l'erbicida



# Target-site resistance



# Sequenza del gene ALS bersaglio dell'erbicida

DOMINIO C																
9808S	V	T	N	V	F	A	Y	P	G	G	A	S	M	E	I	15
9808S	GTA	ACA	<u>AAT</u>	<u>GTT</u>	<u>TTT</u>	<u>GCA</u>	<u>TAC</u>	<u>CCA</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	<u>GCA</u>	<u>TCA</u>	<u>ATG</u>	<u>GAG</u>	<u>ATA</u>	45
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9808S	H	Q	A	L	T	R	S	S	S	I	R	N	V	L	P	30
9808S	<u>CAT</u>	<u>CAA</u>	<u>GCT</u>	<u>TTA</u>	<u>ACT</u>	<u>AGA</u>	<u>TCT</u>	TCA	AGT	ATT	AGA	AAT	GTT	CTA	CCT	90
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9808S	R	H	E	Q	G	G	I	F	S	A	E	G	Y	A	R	45
9808S	AGA	CAT	GAA	CAA	GGT	GGG	ATT	TTT	TCT	GCT	GAA	GGT	TAT	GCT	CGT	135
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9808S	A	S	G	L	P	G	V	C	I	A	T	S	G	P	G	60
9808S	GCT	TCT	GGT	TTA	CCT	GGC	GTC	TGC	ATT	GCT	ACT	TCT	GGC	CCT	GGT	180
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9808S	A	T	N	L	V	S	G	L	A	D	A	L	L	D	S	75
9808S	GCT	ACT	AAT	CTT	GTT	AGC	GGT	CTT	GCC	GAT	GCA	TTG	CTC	GAC	AGC	225
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
DOMINIO A																
9808S	I	P	I	V	A	V	T	G	Q	V	P	R	R	M	I	90
9808S	ATC	CCA	ATT	GTT	<u>GCT</u>	<u>GTA</u>	<u>ACT</u>	<u>GGT</u>	<u>CAA</u>	<u>GTA</u>	<u>CCT</u>	<u>AGG</u>	<u>AGG</u>	<u>ATG</u>	<u>ATT</u>	270
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	A-	---	---	---	---	
																
DOMINIO D																
9808S	G	T	D	A	F	Q	E	T	P	I	V	E	V	T	R	105
9808S	<u>GGT</u>	<u>ACT</u>	GAT	<u>GCA</u>	<u>TTT</u>	<u>CAG</u>	<u>GAA</u>	<u>ACT</u>	<u>CCA</u>	ATC	GTT	GAG	GTA	ACA	AGA	315
9805R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
9810R	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--T	---	---	---	---	---	

Una mutazione puntiforme provoca una variazione nell'enzima bersaglio nel sito di attacco dell'erbicida; l'erbicida non è più in grado di inattivare l'enzima e la pianta risulta resistente all'erbicida

# Mutazioni



*Bz*

Normal form



*bz*

Point mutation



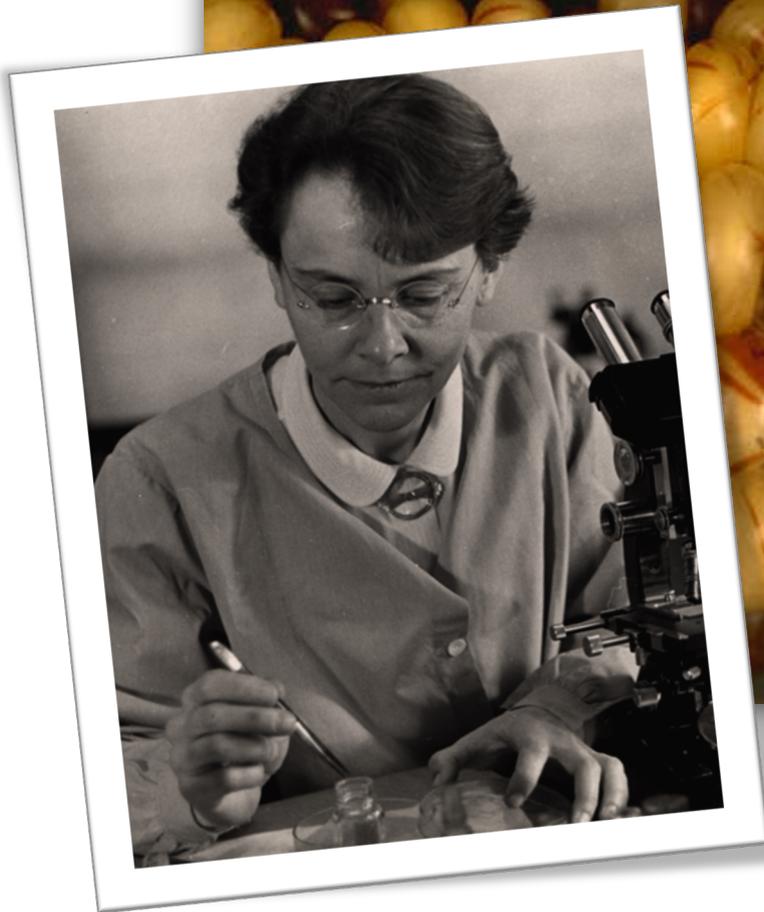
*bz-m*

Transposable  
element insertion



# The Dynamic Genome

## *Transposons*



# What are Transposons?

Variation in cereal genomes - transposons & genome duplications



**Rice 450 Mb**



**Sorghum 700 Mb**



**Maize 2,500 Mb**



**Barley 5,000 Mb**



**Wheat 20,000 Mb**



**Oats ~20,000 Mb**

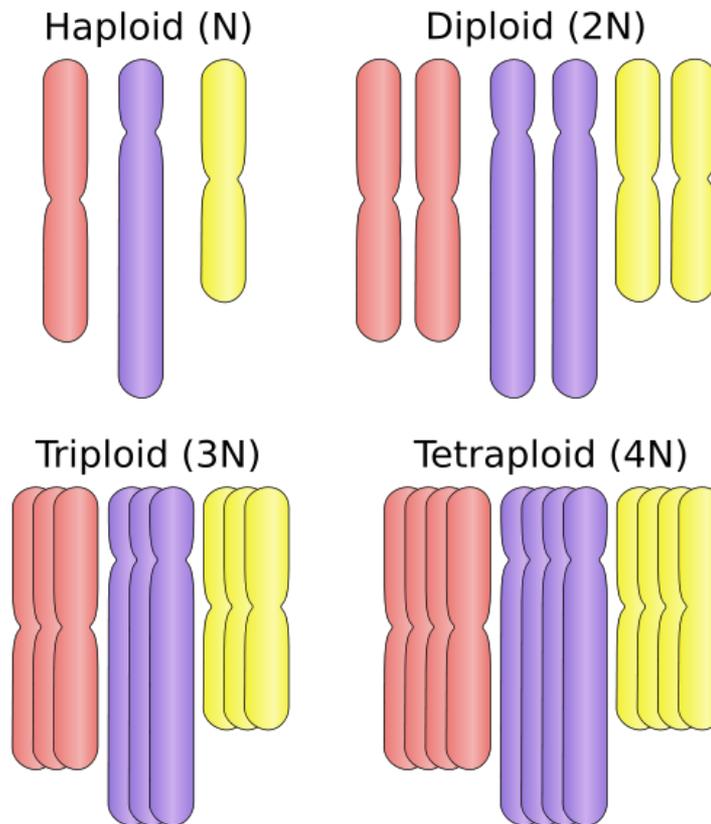
# Mutazioni

- Mutazioni Geniche
- Mutazioni per Inserzione di elementi trasponibili
- Mutazioni cromosomiche (inversioni duplicazioni delezioni traslocazioni)
- Mutazioni nel numero dei cromosomi

# La Poliploidia nelle Piante

# Poliploidia

presenza di un numero di cromosomi corrispondente a un multiplo del corredo aploide (n)



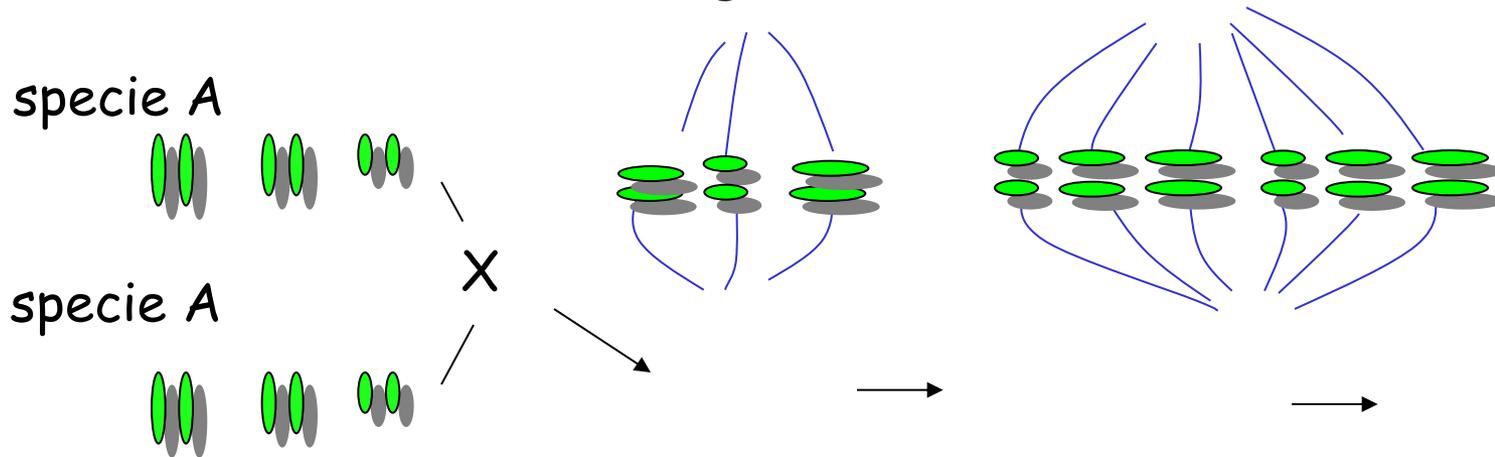
**La poliploidia è comune nelle felci, nelle piante da fiore, nel frumento, sia in natura che nelle varietà selezionate dall'uomo**



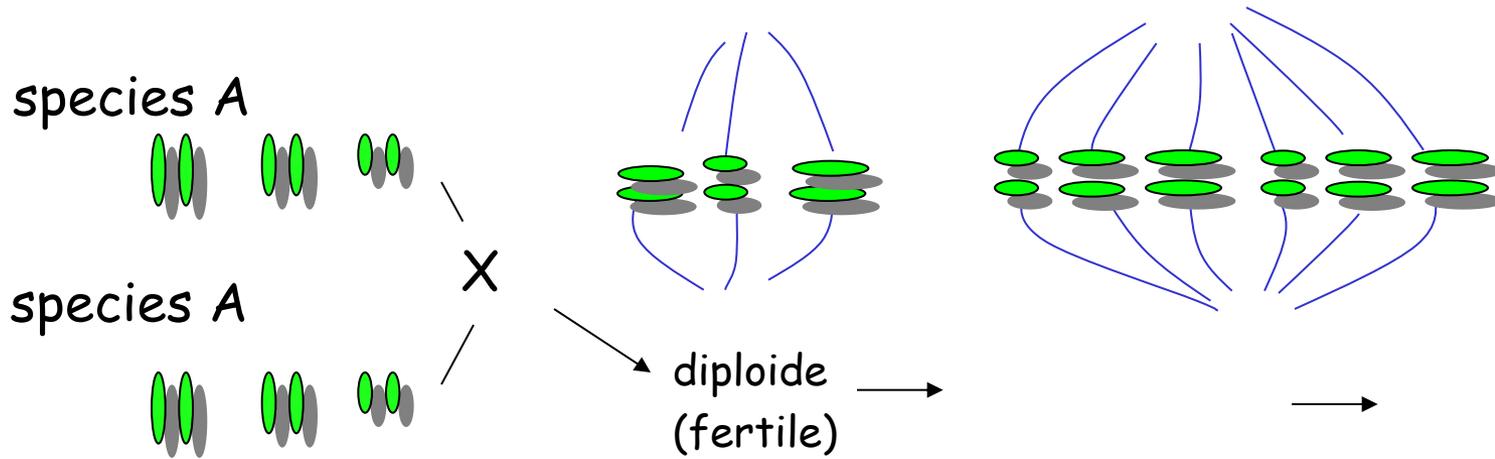
**La poliploidia è rara negli animali, nei mammiferi è sempre incompatibile con la vita**



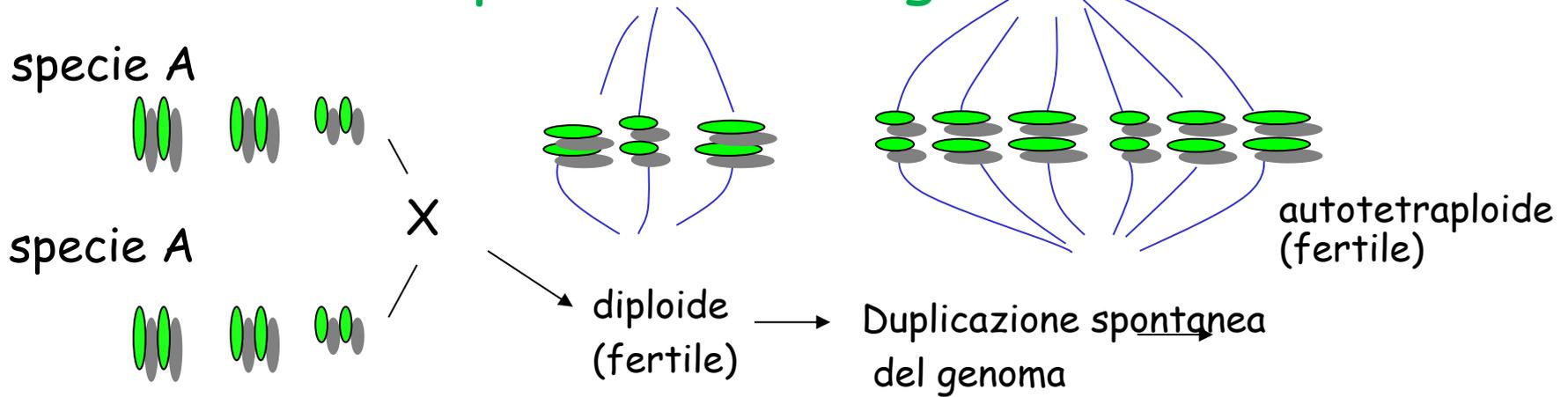
# I. Autopoliploidia origina dalla duplicazione del genoma



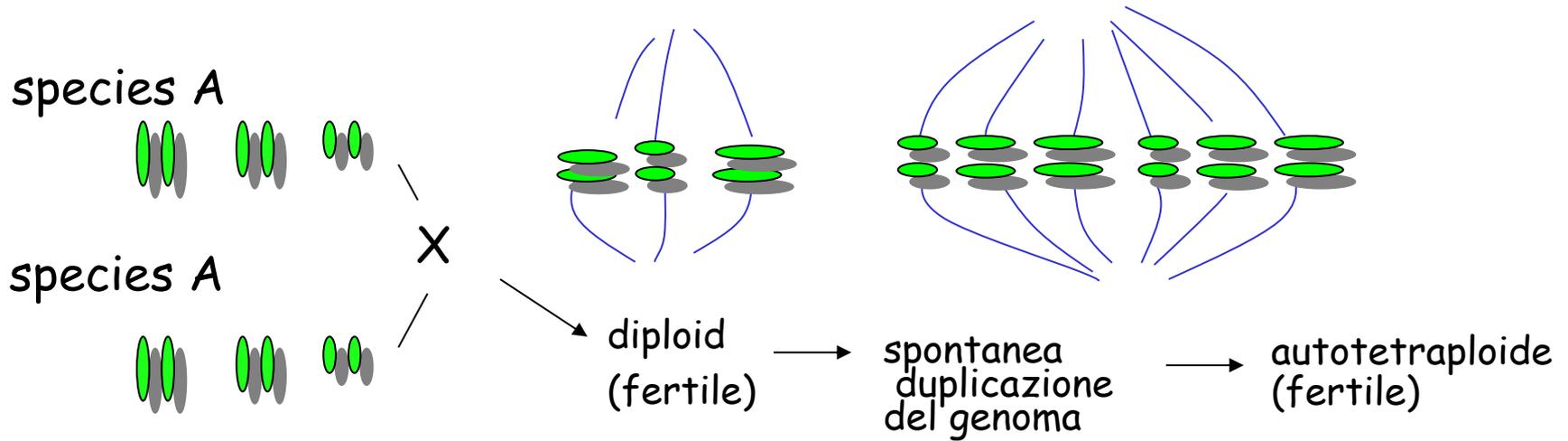
# I. Autopolyploidy arises from genome duplication



# I. Autopolyploidi originano da una duplicazione del genoma



# I. Autopolyploidy arises from genome duplication

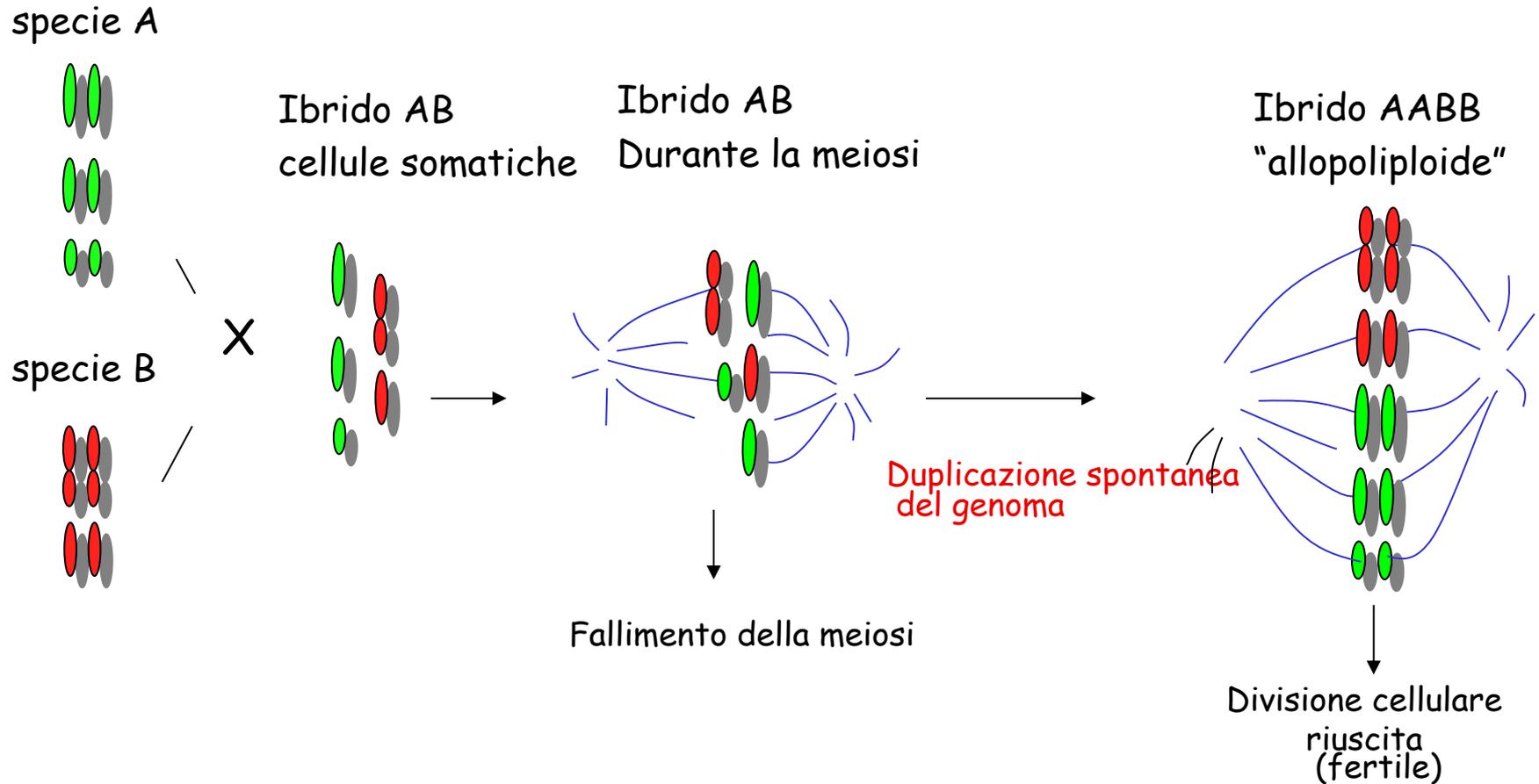


Cause di duplicazione del genoma:

a) Non Riduzione meiotica dei gameti (sia cellula uovo che microspora)

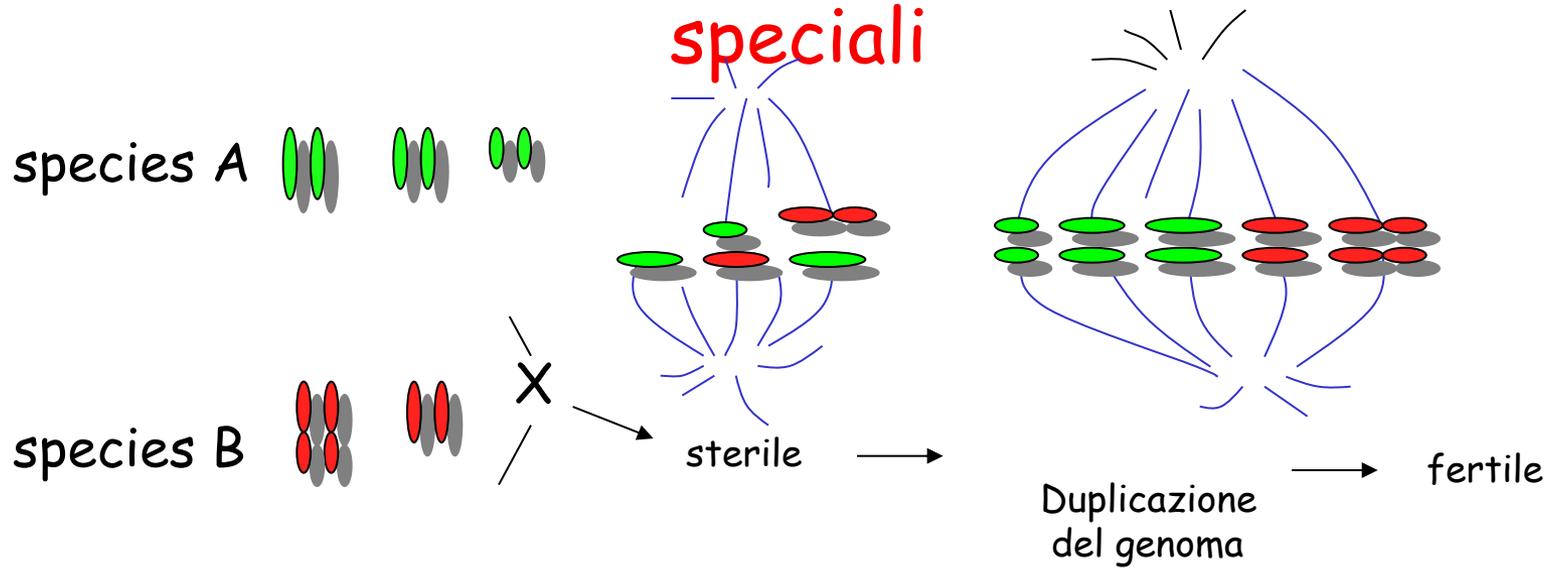
b) Duplicazione del genoma per assenza di citokinesi (dopo la fecondazione)

# II Allopoliploidi originano da incrocio seguito da duplicazione del genoma

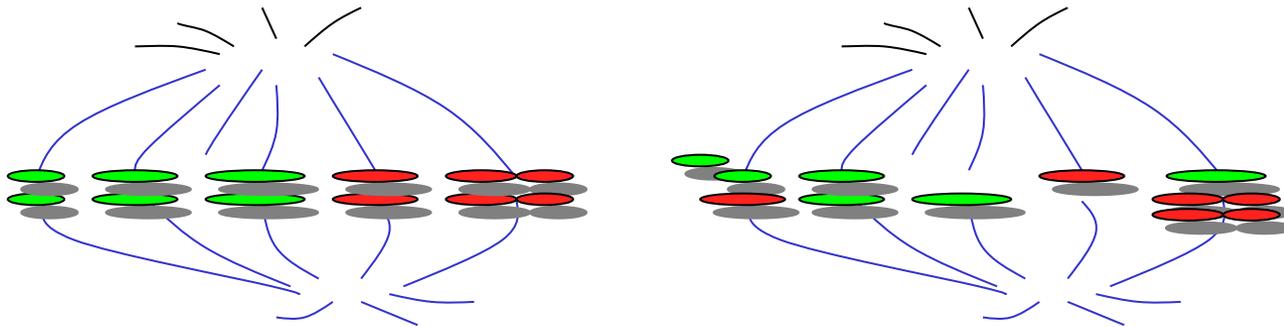


La duplicazione del genoma consente fertilità

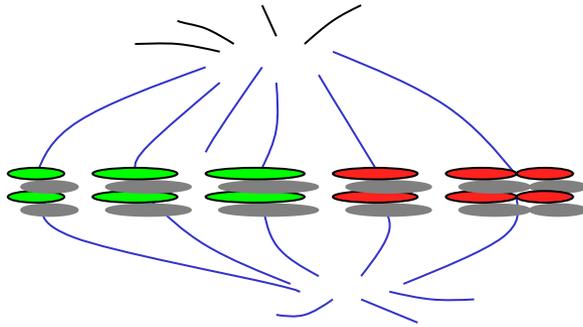
## II. Gli Allopoliploidi sono ibridi speciali



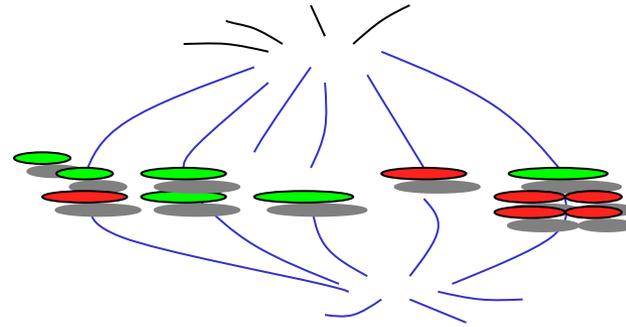
## III. L'appaiamento degli omologhi è prevalente negli allopoliploidi



## IV. L'appaiamento degli omologhi è prevalente negli allopoliploidi



*Appaiamento degli omologhi*



*Appaiamento degli omeologhi*

## V. Nomenclatura per gli autoploiploidi

Numero Base di cromosomi:  $X$

Humans:  $X=23$

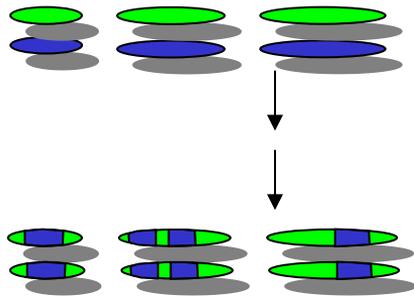
Numero genetico:  $N$

Humans:  $N=23$

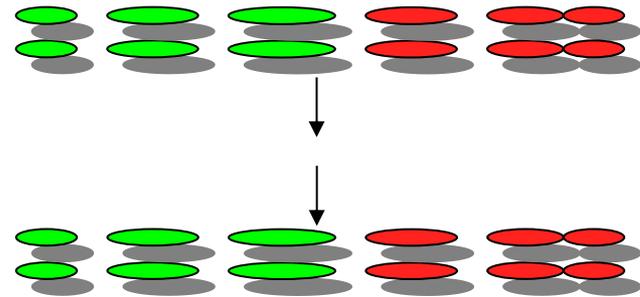
Numero somatico:  $2N$

Humans:  $2N=2X=46$

## VI. Incrocio nei diploidi e negli allopoliploidi



autofecondazione



I genomi si mantengono separati

# Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) può identificare i cromosomi dei progenitori

Sonda fluorescente Specie-specifica ottenuta da due specie:  
*Arabidopsis thaliana* and *A. arenosa*



Sonda centromerica

*A. thaliana*  
sonda rossa



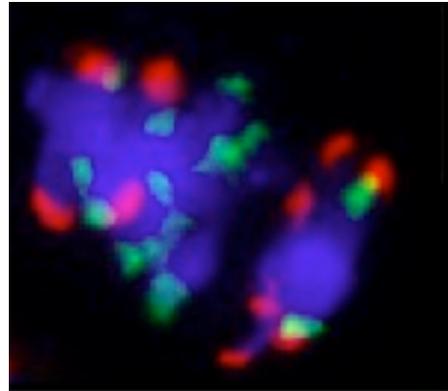
Sonda centromerica

*A. arenosa*  
sonda verde

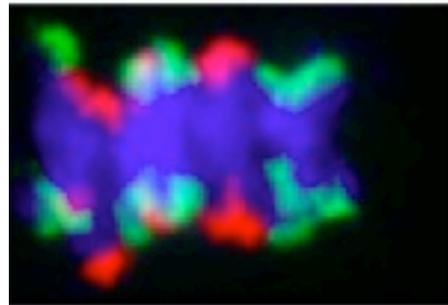
# Qual'è la composizione genomica degli allopoliploidi delle due specie *A. thaliana* and *A. arenosa*

Cellule allopoliploidi

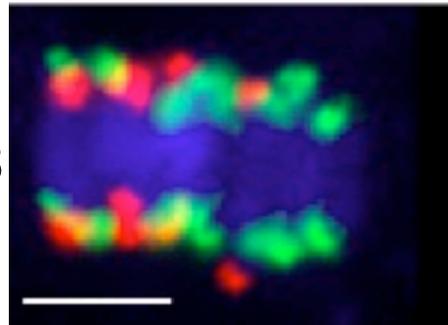
campione 1



campione 2



campione 3



FISH: fluorescent in situ hybridization

red: *A. th* centromero

green: *A. are* centromero

blue: braccia cromosomiche (DAPI)

Cellule madri del polline: Anafase I

# Polyploid Crops

– Examples of plants with polyploid genomes:



Wheat



Canola



Strawberries



Potatoes

**Allopolyploidy**

**Autopolyploidy**

# Allopoliploidia e speciazione

## Esempio: la speciazione nel cavolo!

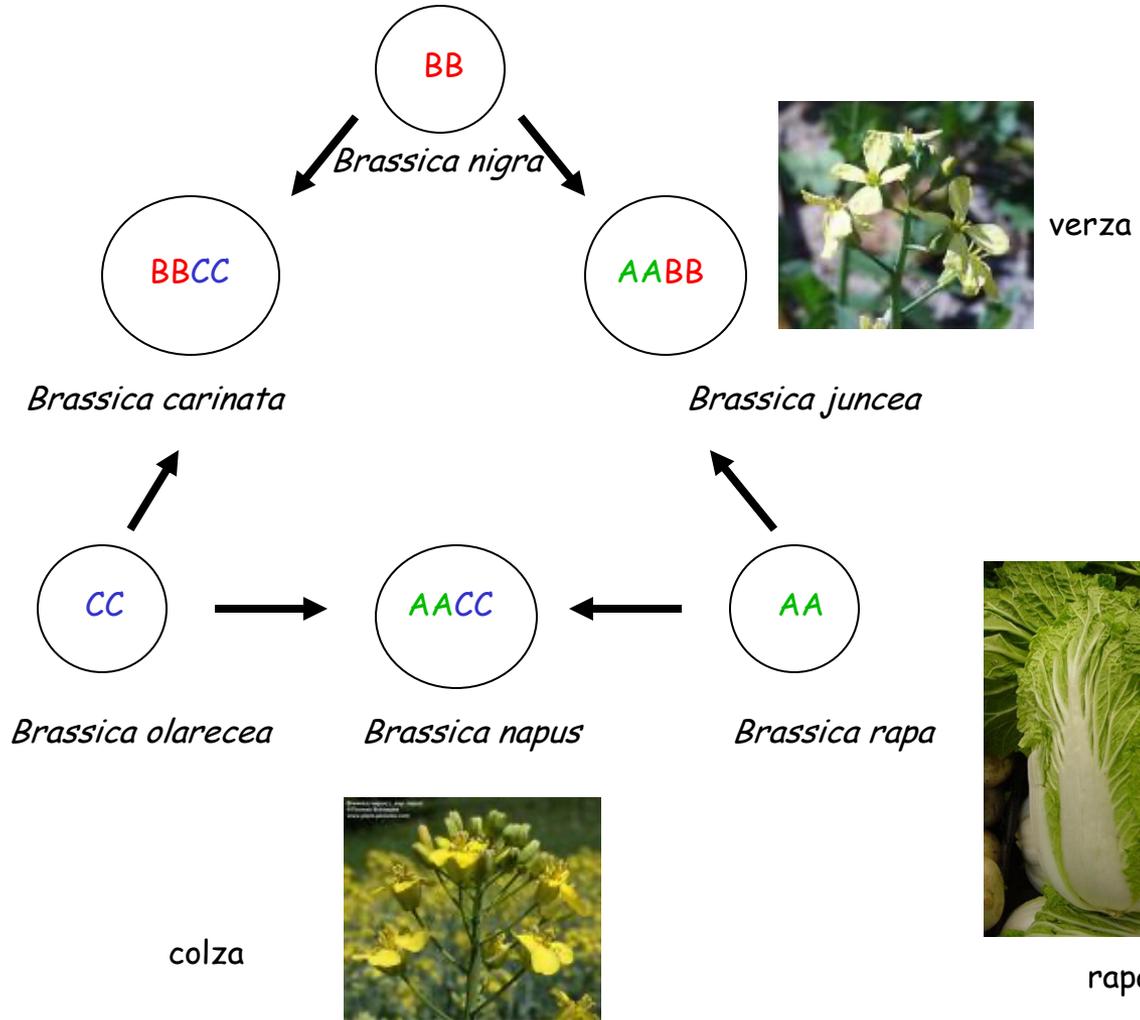
QuickTime™ and a TIFF (Uncompressed) file compressor are needed to see this picture.

Senape nera

Cavolo



broccoli



colza

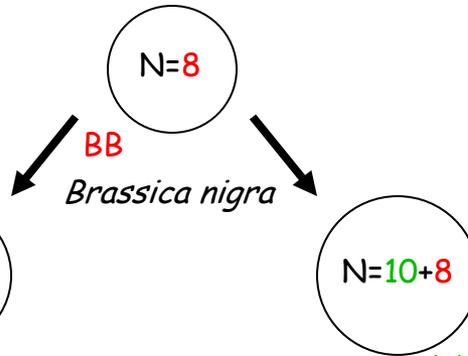
rapa

# The cabbage family: "Triangle of U"

QuickTime™ and a  
TIF (Uncompressed) decompressor  
are needed to see this picture.

Black mustard

Collard green,  
good for cold  
climates  
biodiesel



Indian mustard  
Canola-type oil seeds

BBCC  
*Brassica carinata*

AABB  
*Brassica juncea*



Cauliflower, broccoli, kale

N=9  
CC  
*Brassica oleracea*

N=10+9  
AAC  
*Brassica napus*

N=10  
AA  
*Brassica rapa*



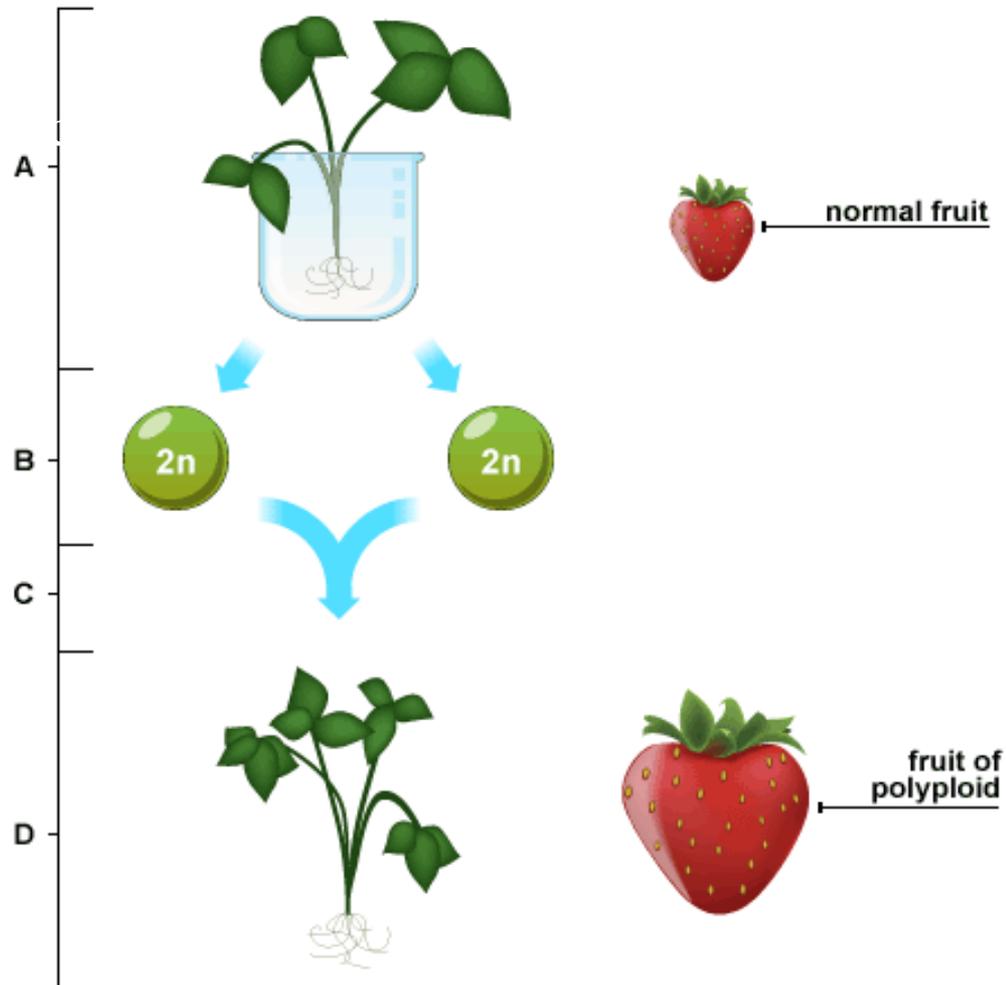
Chinese cabbage, Bok Choi



rape seed



# Nelle piante è possibile indurre la poliploidia usando determinate sostanze chimiche

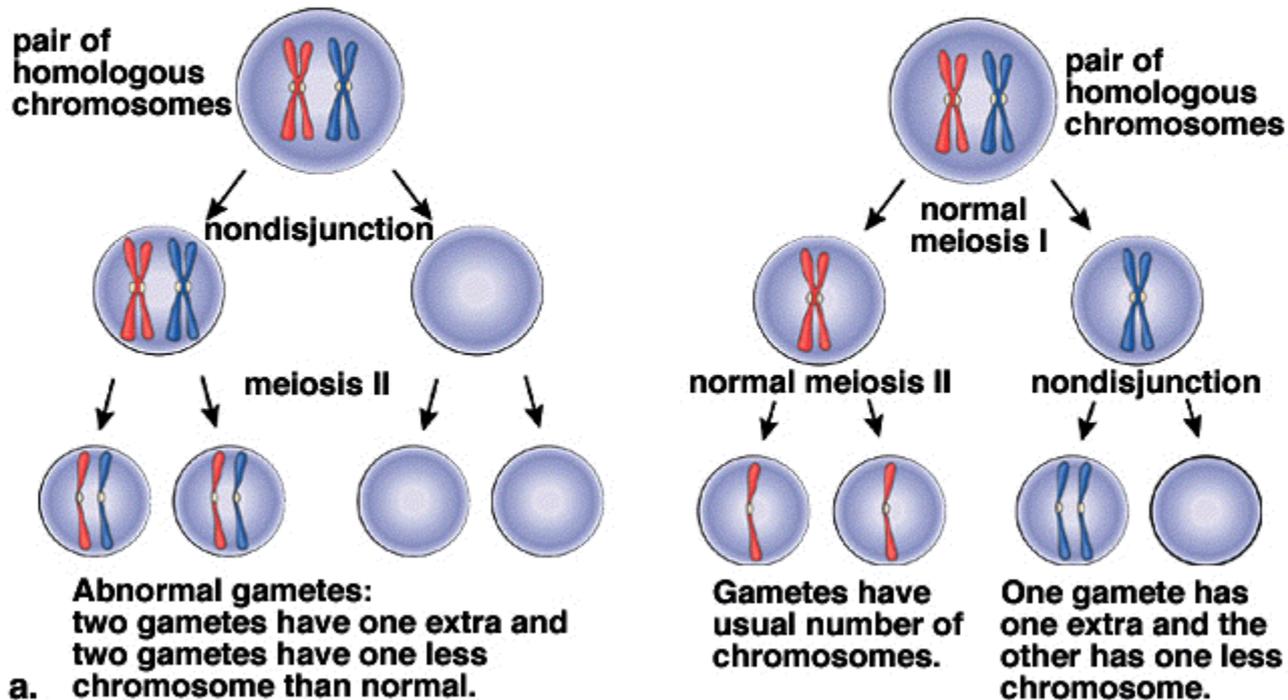


# Aneuploidia

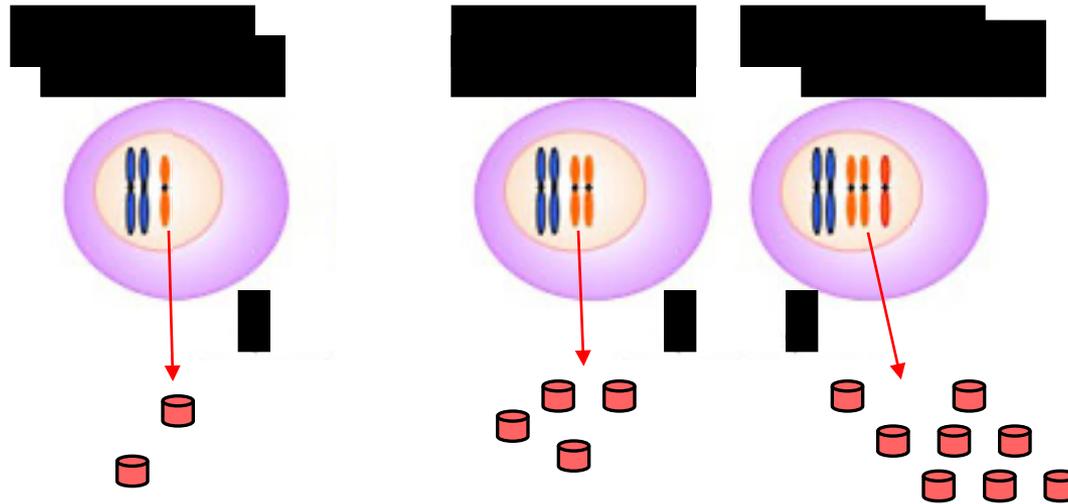
Aneuploidia: presenza di cromosomi in più o in meno rispetto al corredo diploide ( $2n+1$ ,  $2n-1$ ...)

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

## Nondisjunction of chromosomes during meiosis



# Effetto aneuploidie



**Diminuisce o aumenta la quantità di mRNA e quindi di proteine sintetizzate (vale per tutti i geni localizzati sul cromosoma interessato)**

**⇒ Sbilanciamento del dosaggio genico**

# Mutazioni cromosomiche

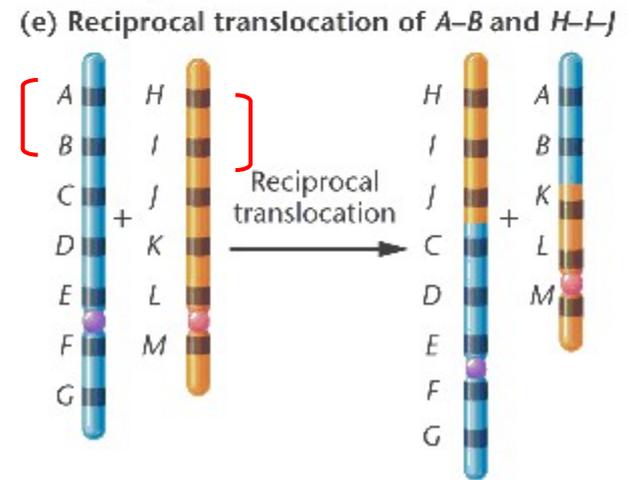
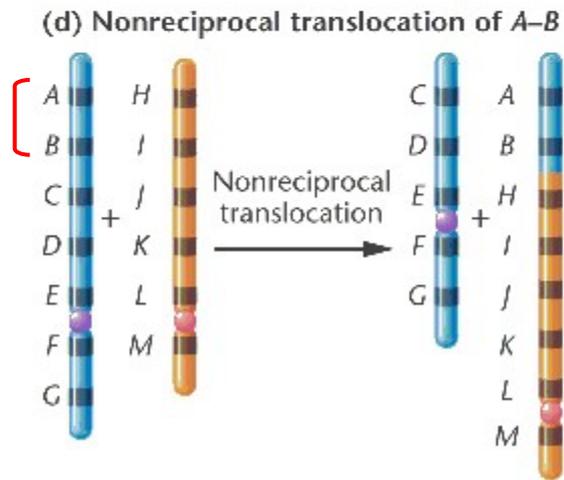
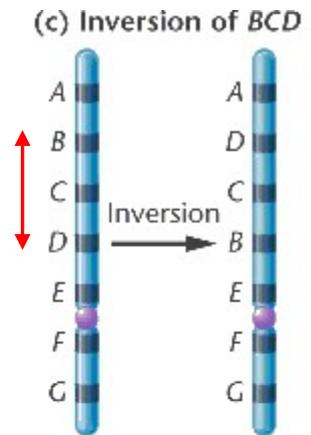
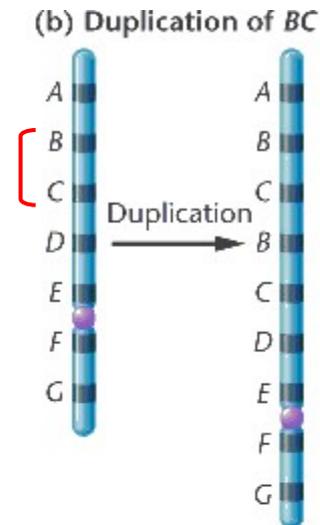
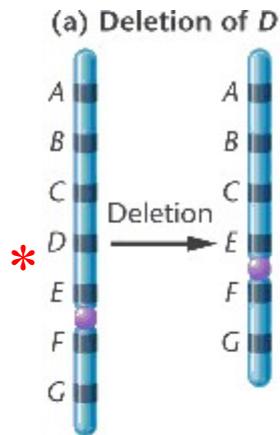
- anomalie di numero (ANEUPLOIDIE, POLIPLOIDIE)

conseguenza di errori di segregazione dei cromosomi durante la formazione dei gameti, o di anomalie nella fecondazione

- anomalie di struttura

conseguenza di rotture cromosomiche

# Anomalie di struttura dei cromosomi



# Conseguenze delle anomalie strutturali

- \* Duplicazioni/delezioni: sbilanciamento del dosaggio genico (monosomia / trisomia parziale)
- \* Inversioni/traslocazioni: potrebbe esserci rottura genica (la rottura avviene proprio all'interno di un gene)