

Le mutazioni e la riparazione del DNA

- L'insorgenza di **mutazioni** a livello del materiale genetico è un prerequisito fondamentale per garantire la **variabilità genetica** necessaria per l'evoluzione.
- Tuttavia è necessario un **basso tasso** di mutazione per permettere che il materiale genetico venga trasmesso in maniera corretta: mutazioni a livello della linea GERMINALE possono essere trasmesse alla progenie con gravi danni, così come mutazioni a livello della linea SOMATICA sono alla base di molte patologie, come il CANCRO
- Per questo le cellule hanno investito molto in **enzimi** in grado di **riparare** il DNA

Il danno al DNA

Causa	Sistema di riparazione
Errori durante il processo di replicazione del DNA	Attività proof-reading della DNA polimerasi
Interazione con sostanze chimiche o radiazioni	meccanismi di riparazione specifici o generici
Trasposoni	nessuno

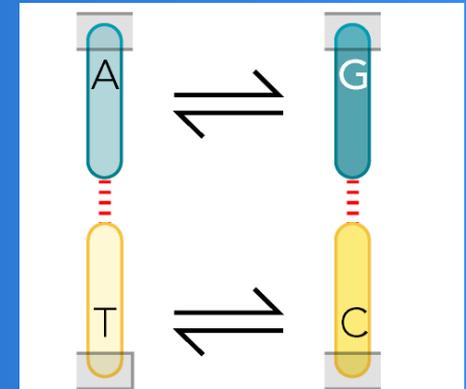
Tipi di mutazioni

Sostituzioni di singola base:

A. Transizioni

purina / purina G-A

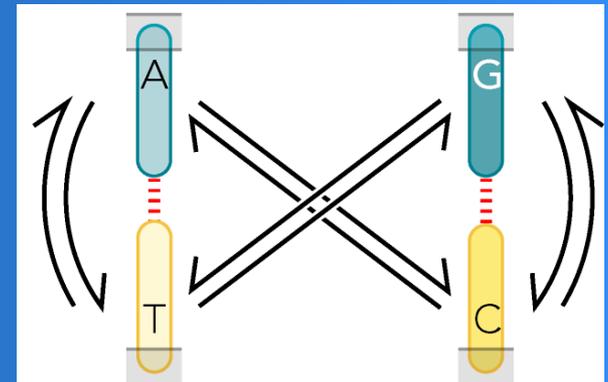
pirimidina / pirimidina C-T



B. Trasversioni

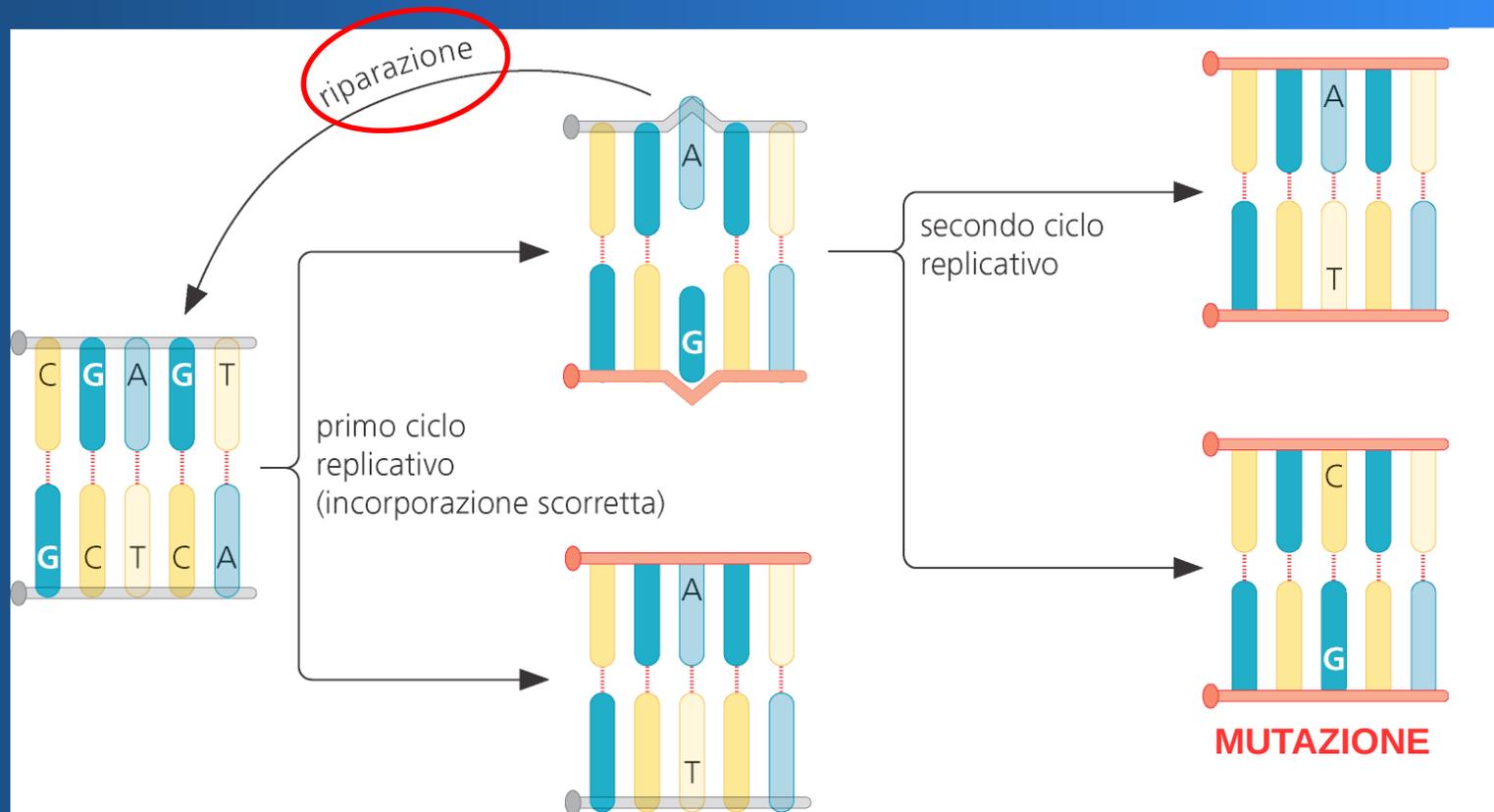
pirimidina / purina

purina / pirimidina



Mutazioni nel DNA

Una mutazione è un cambiamento nella sequenza del DNA che si fissa nel genoma

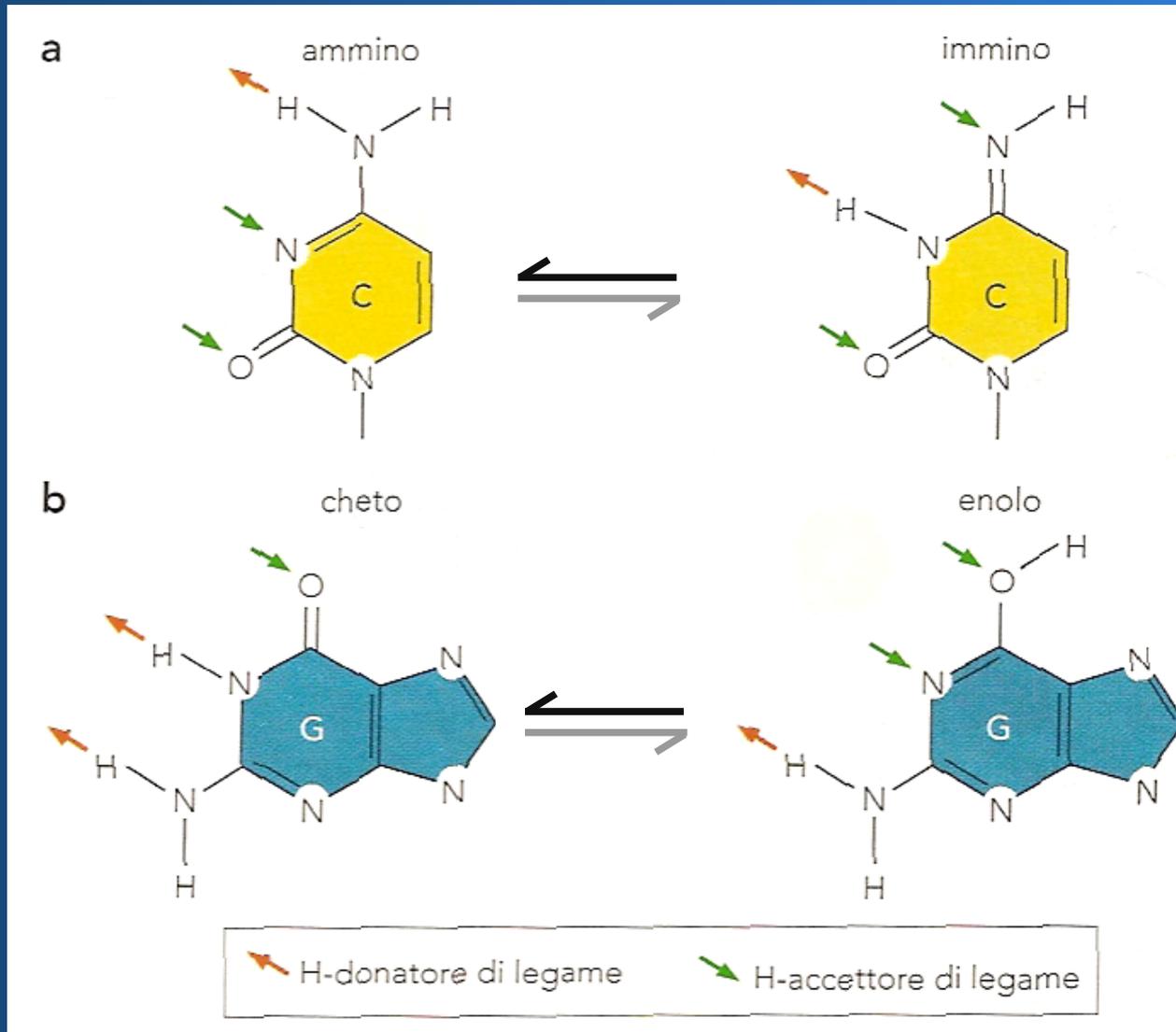


Accuratezza nella sintesi della copia del DNA

Il genoma umano contiene circa 3×10^9 coppie di basi

- la DNA polimerasi inserisce 1 nucleotide non corretto ogni 10^5 nucleotidi polimerizzati
- L'attività di proof reading abbassa la presenza di errori ad uno ogni 10^7
- Altri processi di riparazione abbassano il numero di mutazioni ad uno ogni 10^{10} nucleotidi

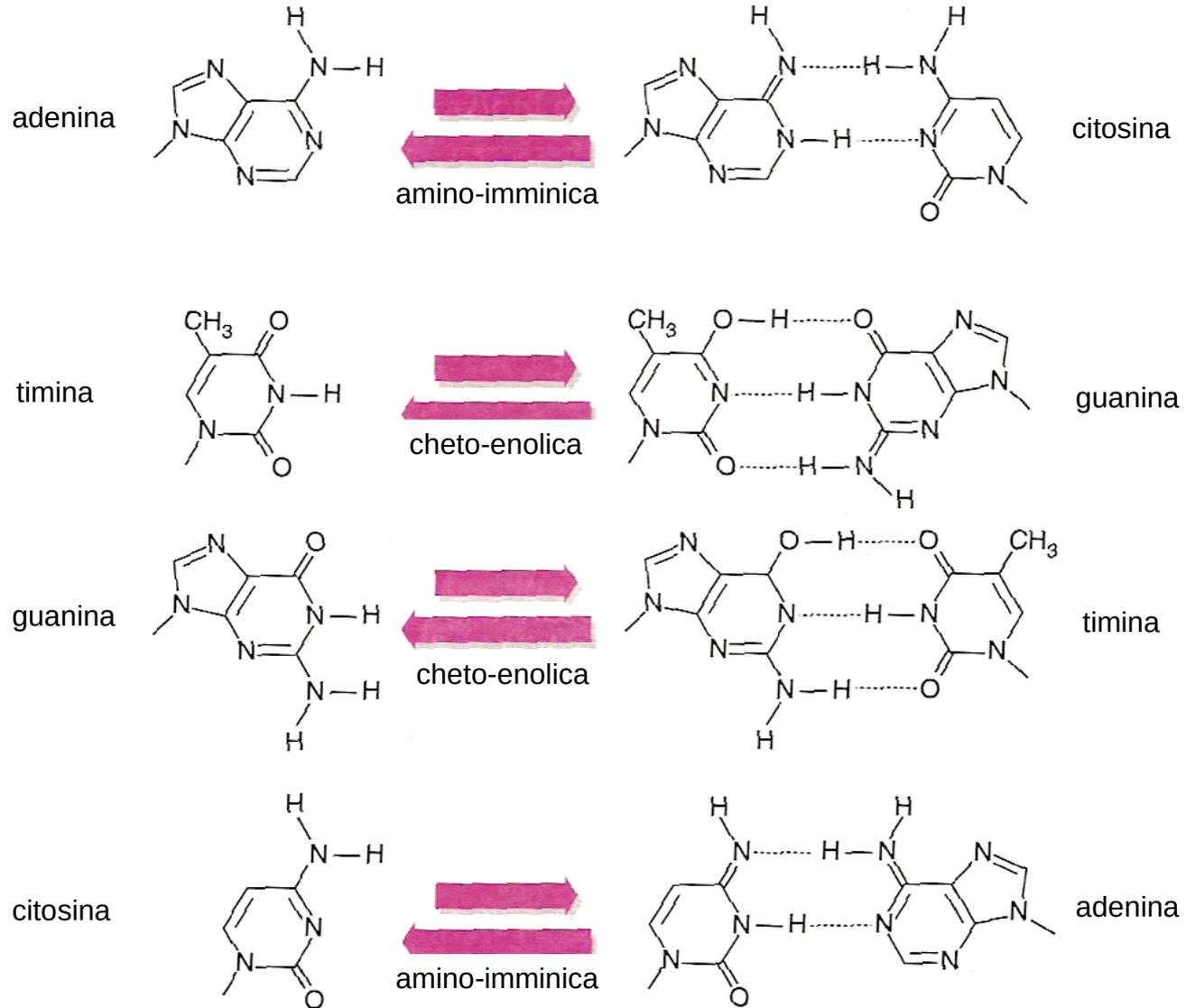
Conformazioni tautomeriche delle basi



Tautomeria
ammino-imminica

Tautomeria
cheto-enolica

Tautomeria e appaiamenti scorretti tra le basi



Attività di correzione delle bozze (proof reading)

Avviene durante la sintesi del DNA

Forma imminica

3' --- AGGATGCGCATGAGG**A**CTAC --- 5' stampo

5' --- TCCTACGCGTACTCCC 3'

mismatch

3' --- AGGATGCGCATGAGG**A**CTAC --- 5' stampo

5' --- TCCTACGCGTACTCCC 3'

esonucleasi

3' --- AGGATGCGCATGAGGACTAC --- 5' stampo

5' --- TCCTACGCGTACTC 3'

3' --- AGGATGCGCATGAGGACTAC --- 5' stampo

5' --- TCCTACGCGTACTCCTGATG --- 3'

Il ritorno allo stato stabile distorce la geometria della coppia



La polimerasi sente il "bulge"

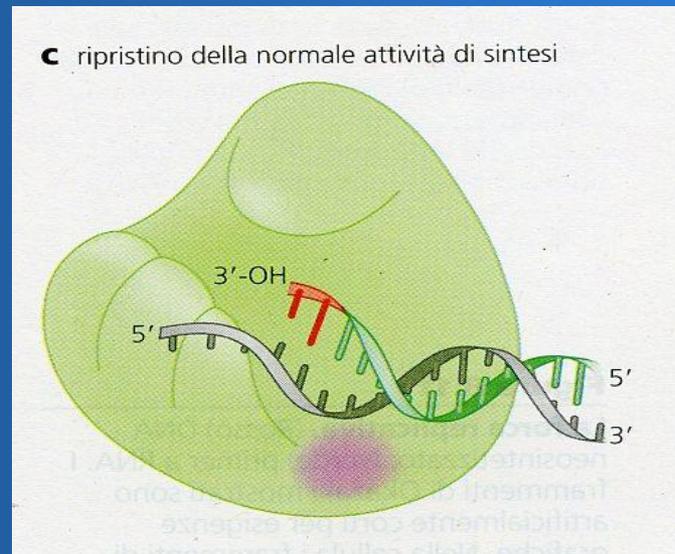
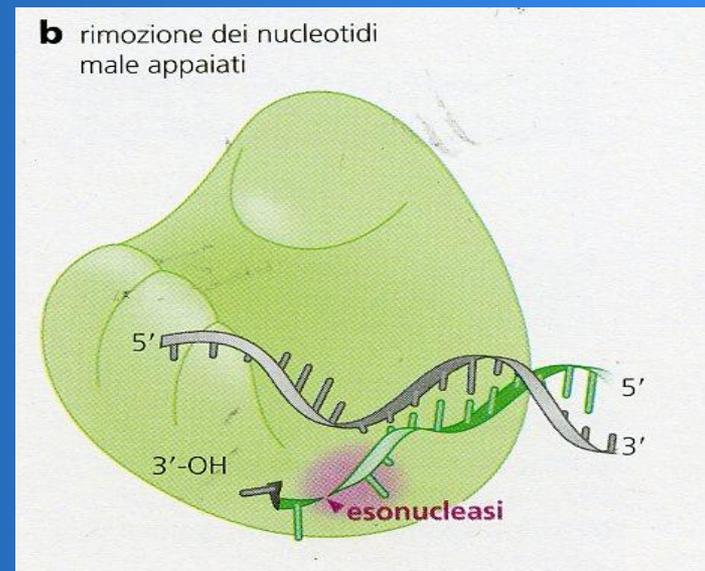
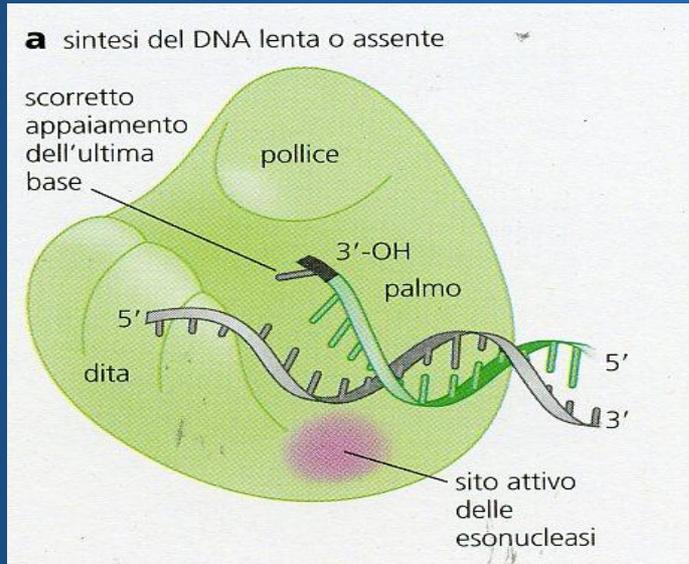


Attività eso-nucleasica



refill e riparazione

Attività di correzione delle bozze



... se il proof-reading fallisce ...



Come si corregge l'errore ???

- La base giusta viene dal filamento originale
- La base sbagliata è quella nuova
- Come riconosco il DNA originale?

Metilazione delle adenine nei batteri (*E. coli*)

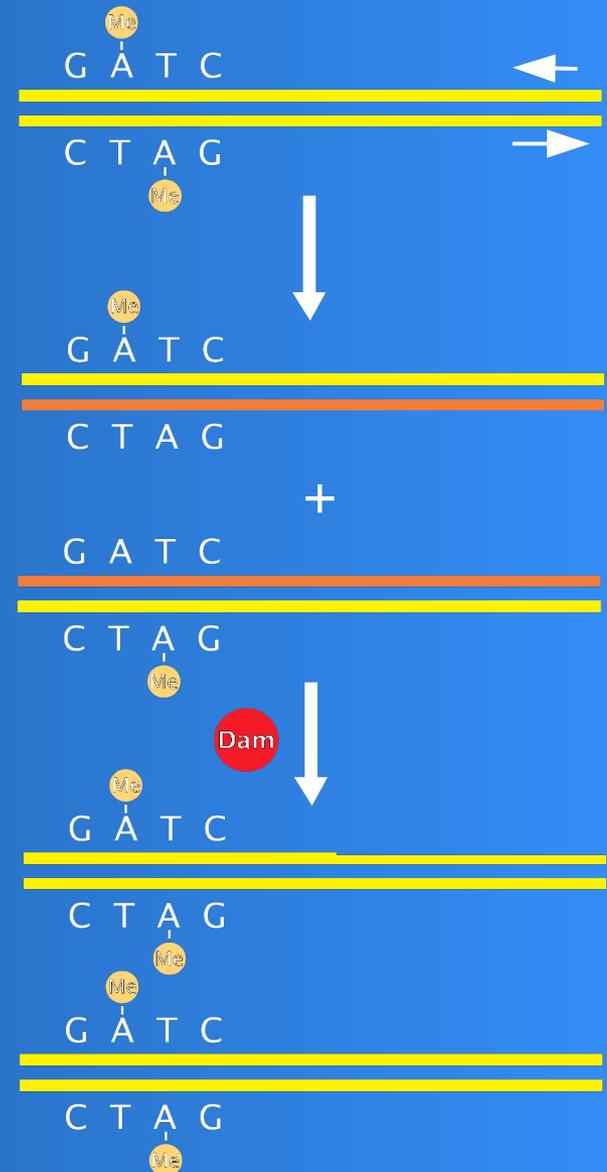
Prima della duplicazione il DNA è metilato in A su entrambi i filamenti.

La polimerasi non inserisce nucleotidi metilati, quindi il **nuovo filamento non è metilato**.

La metilazione del nuovo filamento avviene ad opera della **DNA adenina metilasi DAM** che metila la A della sequenza palindroma **GATC**

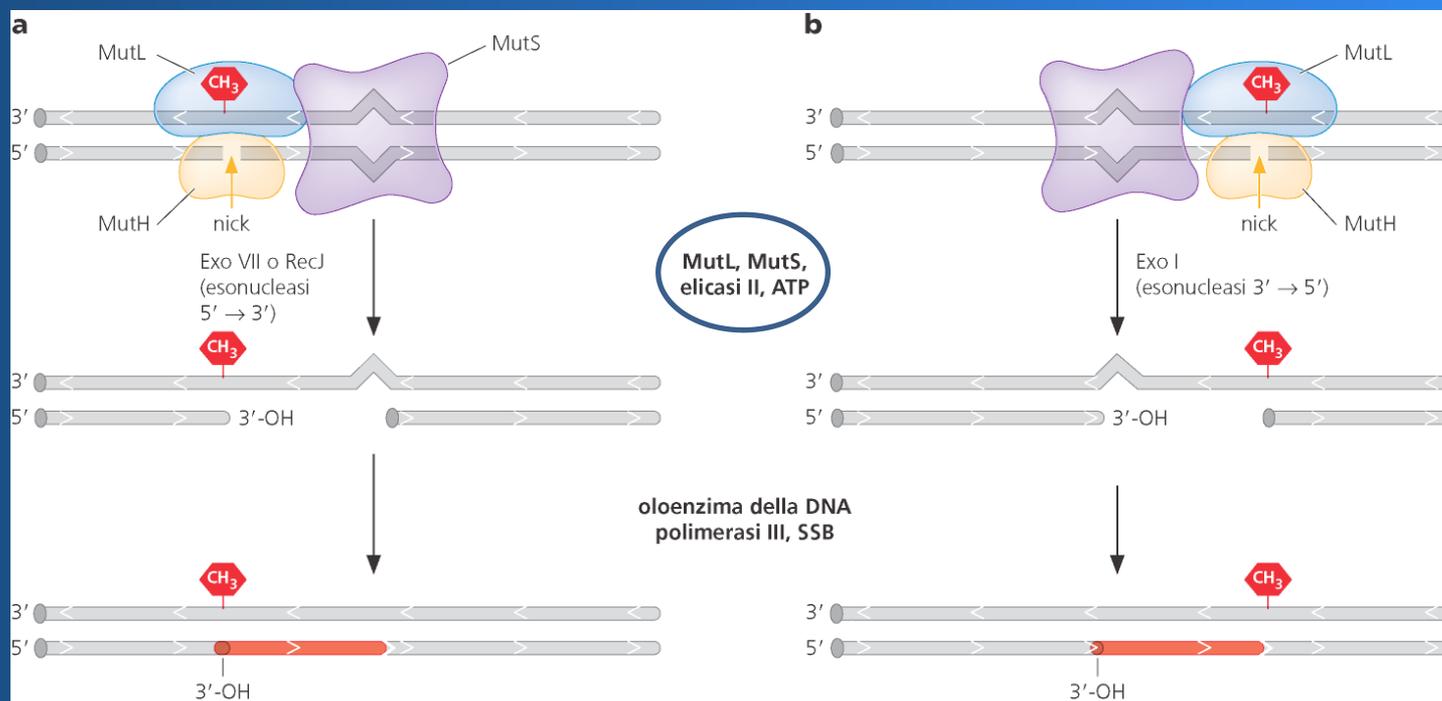


Le correzione deve avvenire subito prima della rimetilazione del filamento non metilato.

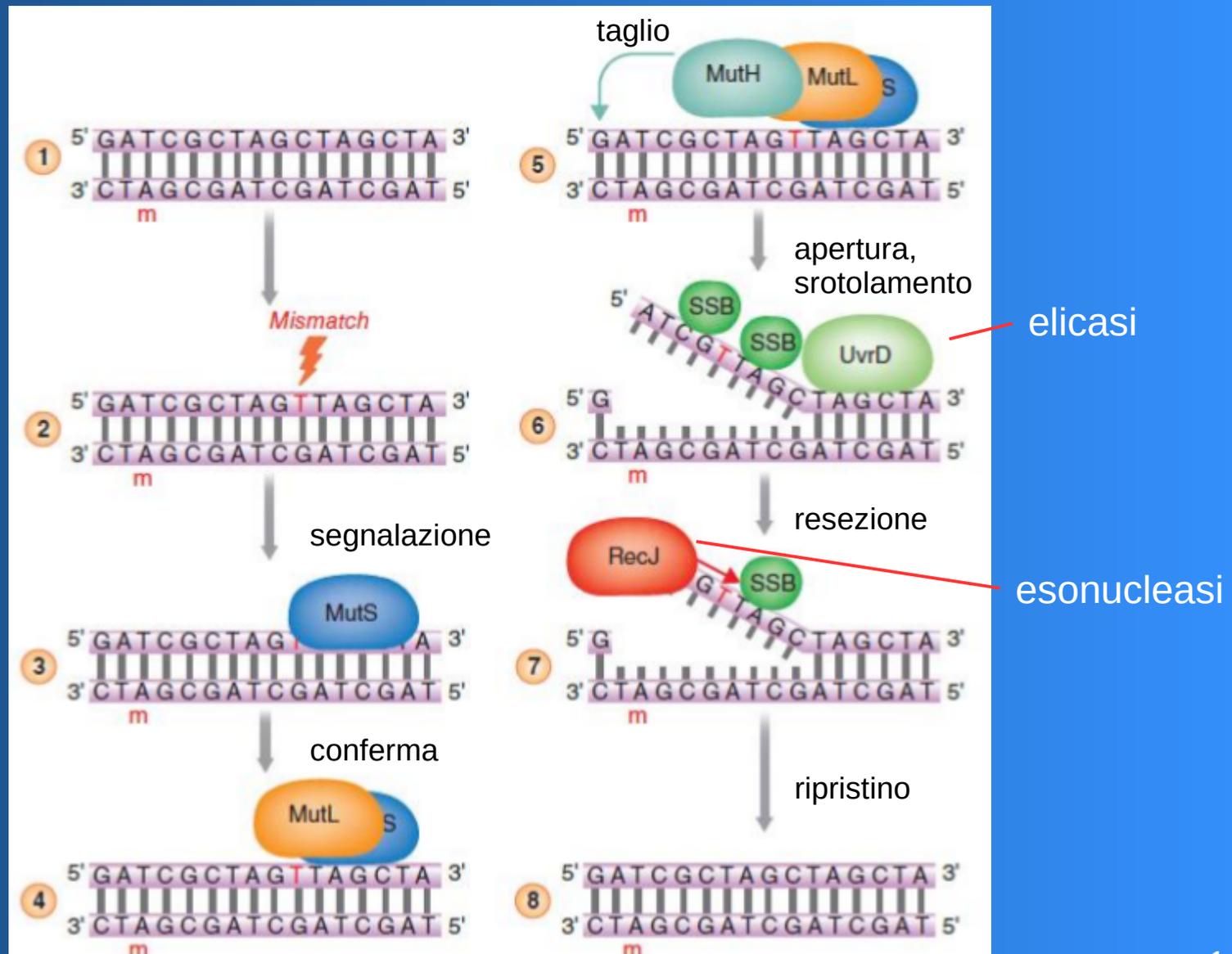


Il complesso enzimatico Mut ripara i mismatch residui nei batteri (*E. coli*)

- MutS sente la distorsione dovuta al mismatch
- MutS richiama MutL che sente il gruppo CH₃ e richiama MutH
- MutH richiama una esonucleasi (dipende dalla direzione) ed una elicasi per rimuovere un frammento di DNA contenente la base errata
- La lesione è ripristinata dalla DNA polimerasi III

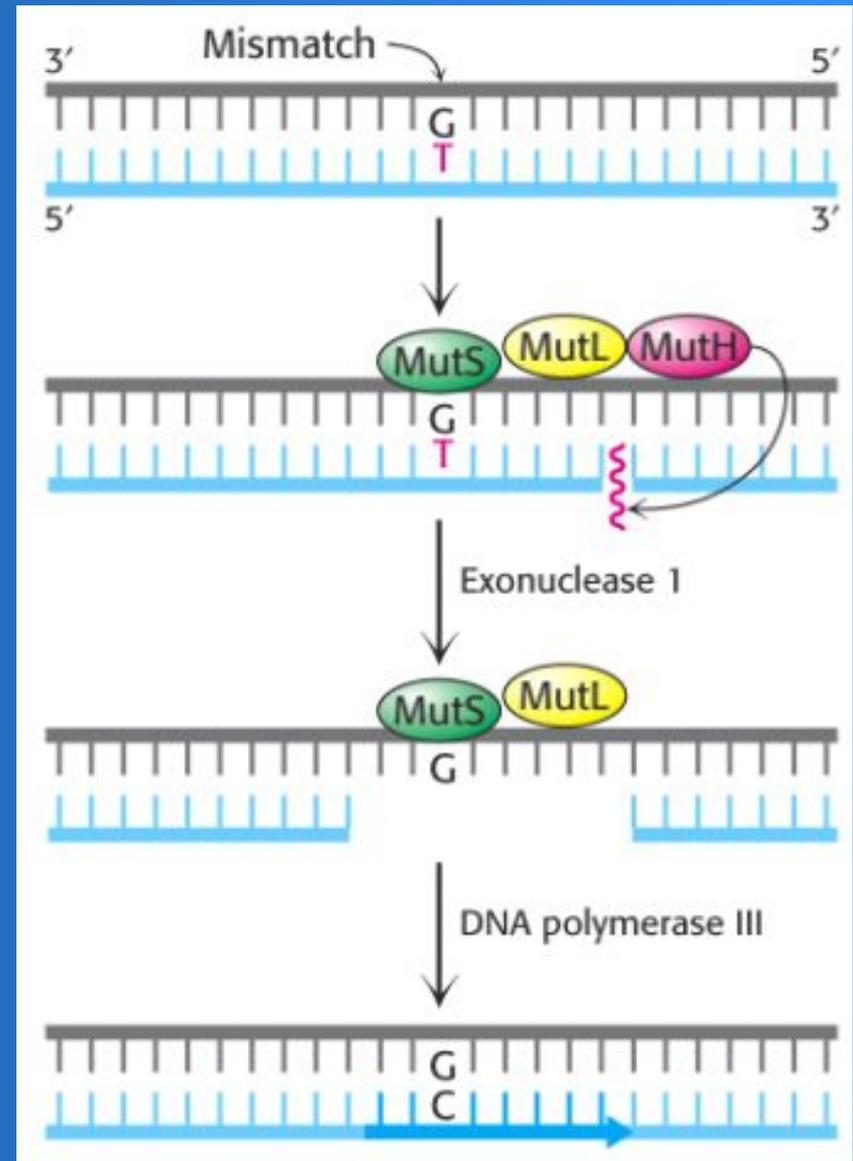


Il complesso enzimatico Mut gestisce la riparazione dei mismatch singoli nei batteri (*E. coli*)



Riparazione dei mismatch negli eucarioti

- Gli eucarioti hanno **omologhi** di Mut(s)
- Non hanno le metilasi Dam, riconoscono il filamento stampo dalle incisioni dei frammenti di **Okazaki**.
- Mutazioni dei geni Mut predispongono ai tumori



Riparazione per escissione di ribonucleotidi

Duplicazione del DNA



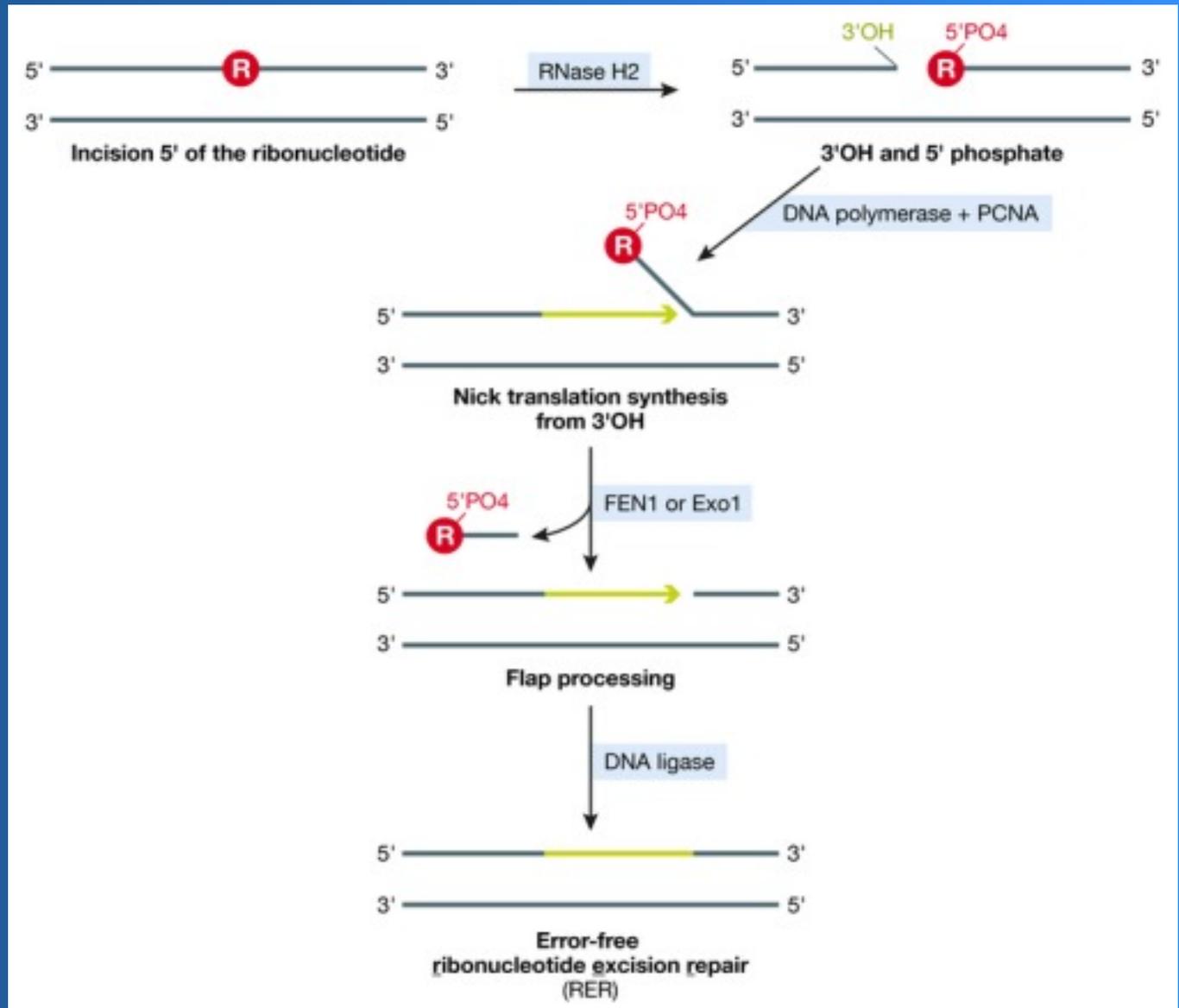
Frequenza 1-2 / 1000 inserimento di ribonucleotidi



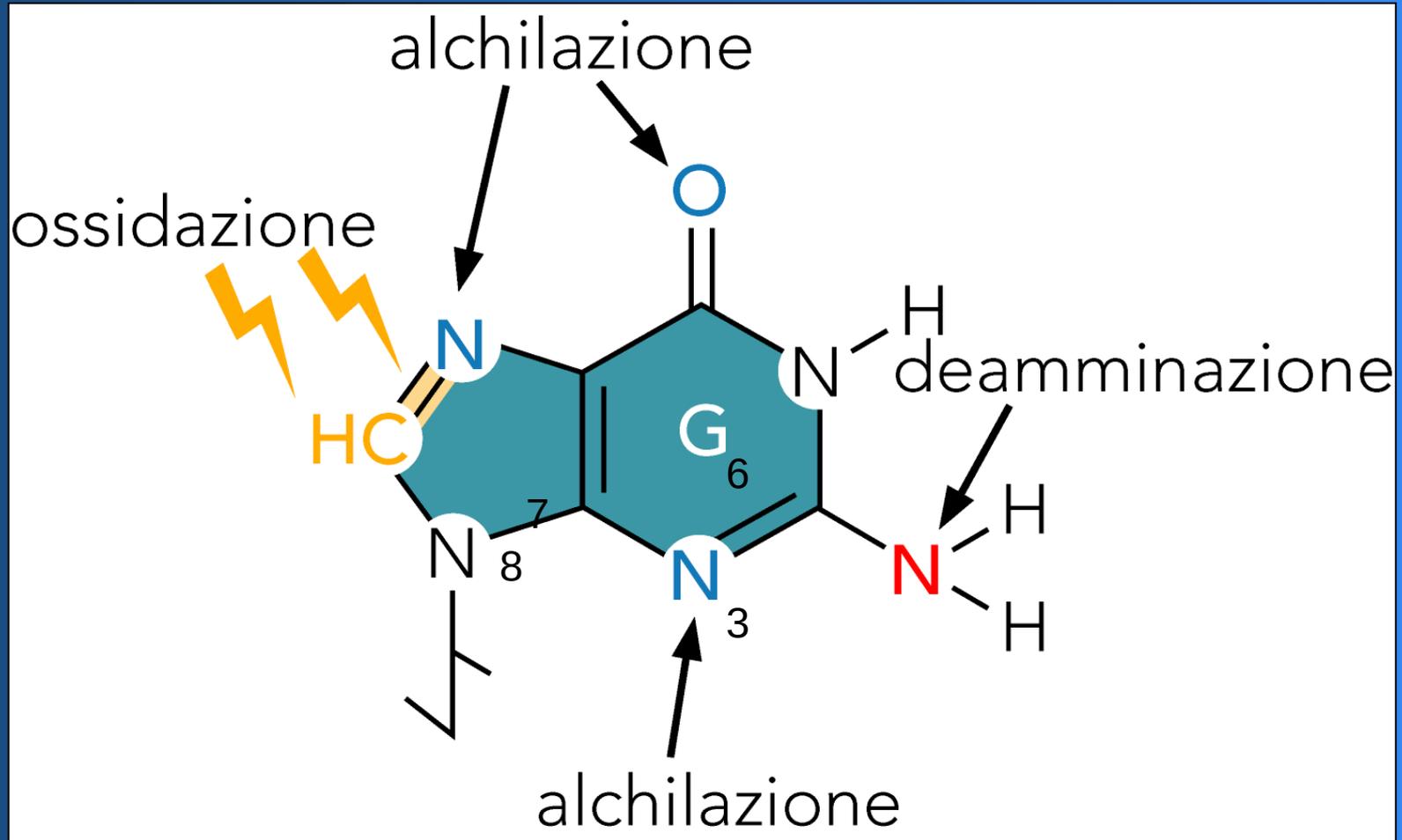
Mancata correzione in proof reading



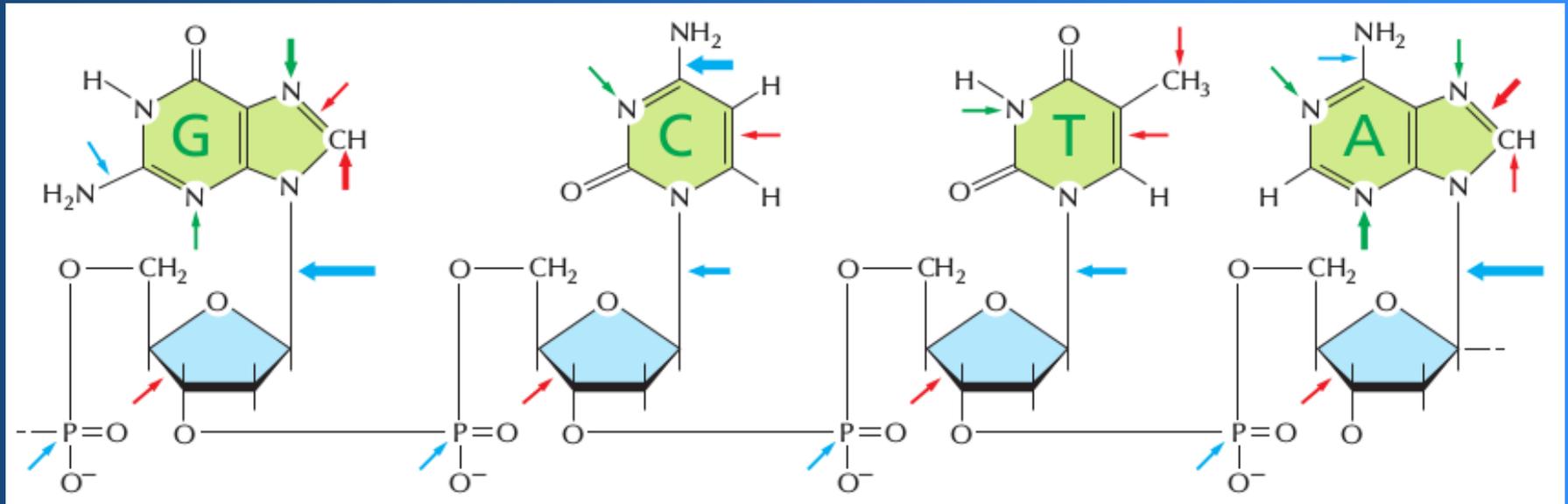
RER



Danni al DNA



Lesioni spontanee al DNA



- danno ossidativo
- attacco idrolitico
- metilazione anomala

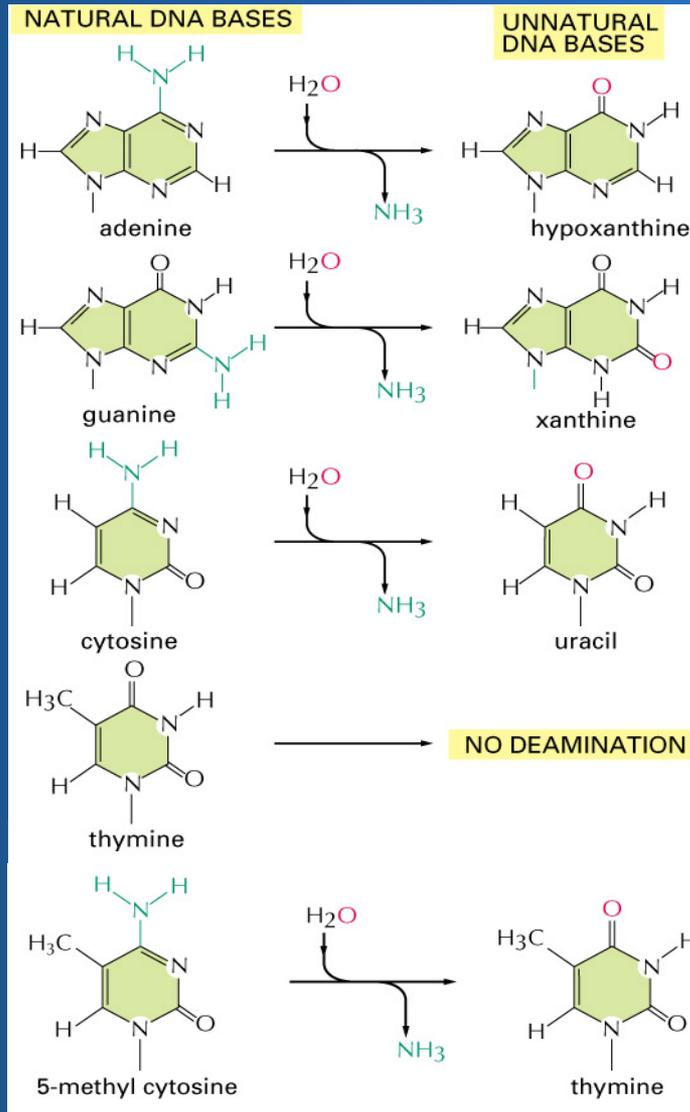
Lesioni spontanee al DNA

TABLE 5–3 Endogenous DNA Lesions Arising and Repaired in a Diploid Mammalian Cell in 24 Hours

DNA lesion	Number repaired in 24 h
Hydrolysis	
Depurination	18,000
Depyrimidination	600
Cytosine deamination	100
5-Methylcytosine deamination	10
Oxidation	
8-oxo G	1500
Ring-saturated pyrimidines (thymine glycol, cytosine hydrates)	2000
Lipid peroxidation products (M1G, etheno-A, etheno-C)	1000
Nonenzymatic methylation by S-adenosylmethionine	
7-Methylguanine	6000
3-Methyladenine	1200
Nonenzymatic methylation by nitrosated polyamines and peptides	
O ⁶ -Methylguanine	20–100

The DNA lesions listed in the table are the result of the normal chemical reactions that take place in cells. Cells that are exposed to external chemicals and radiation suffer greater and more diverse forms of DNA damage. (From T. Lindahl and D.E. Barnes, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 65:127–133, 2000.)

Danno da deaminazione



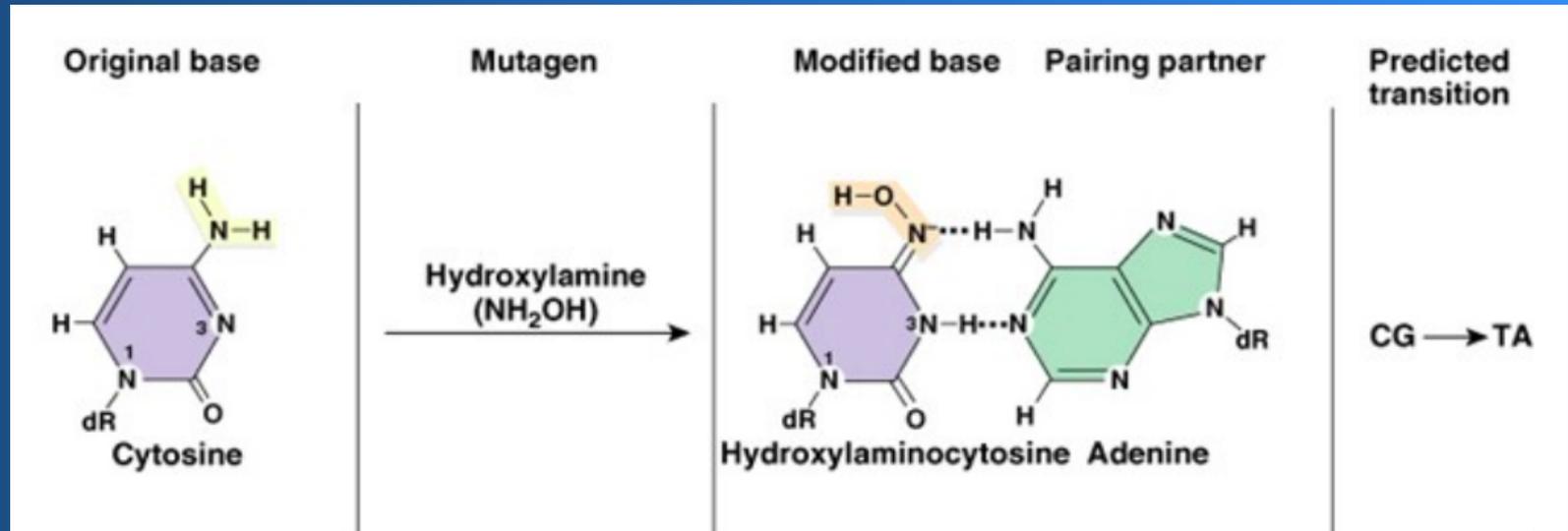
Si appaia con C

Si appaia con C

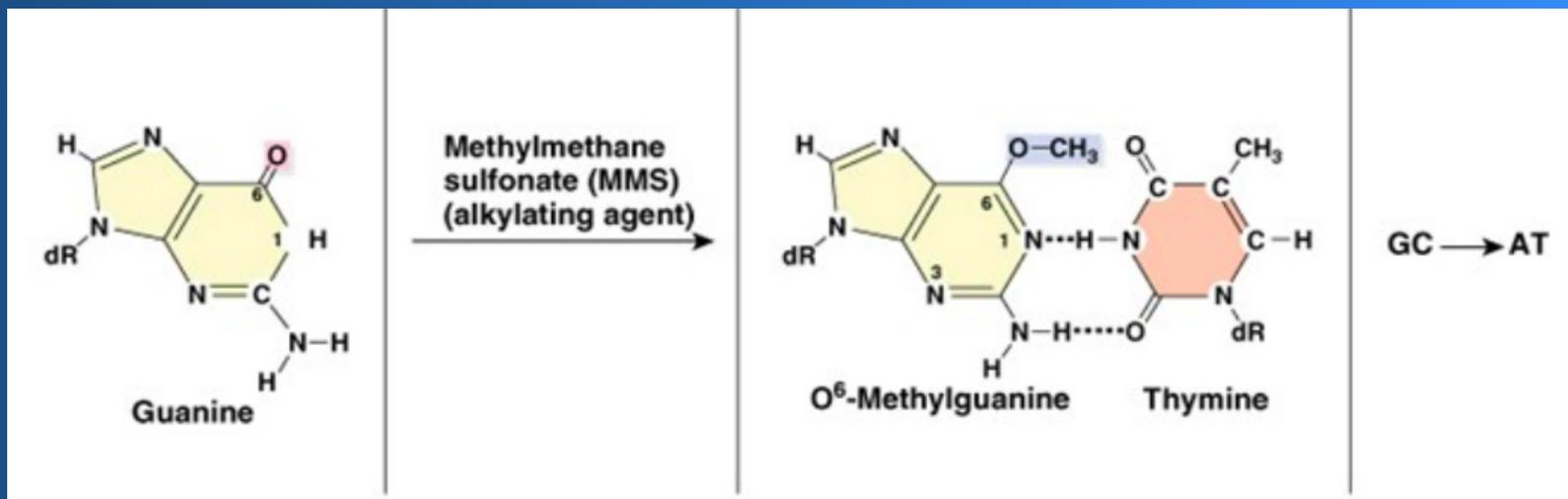
Si appaia con A

Si appaia con A

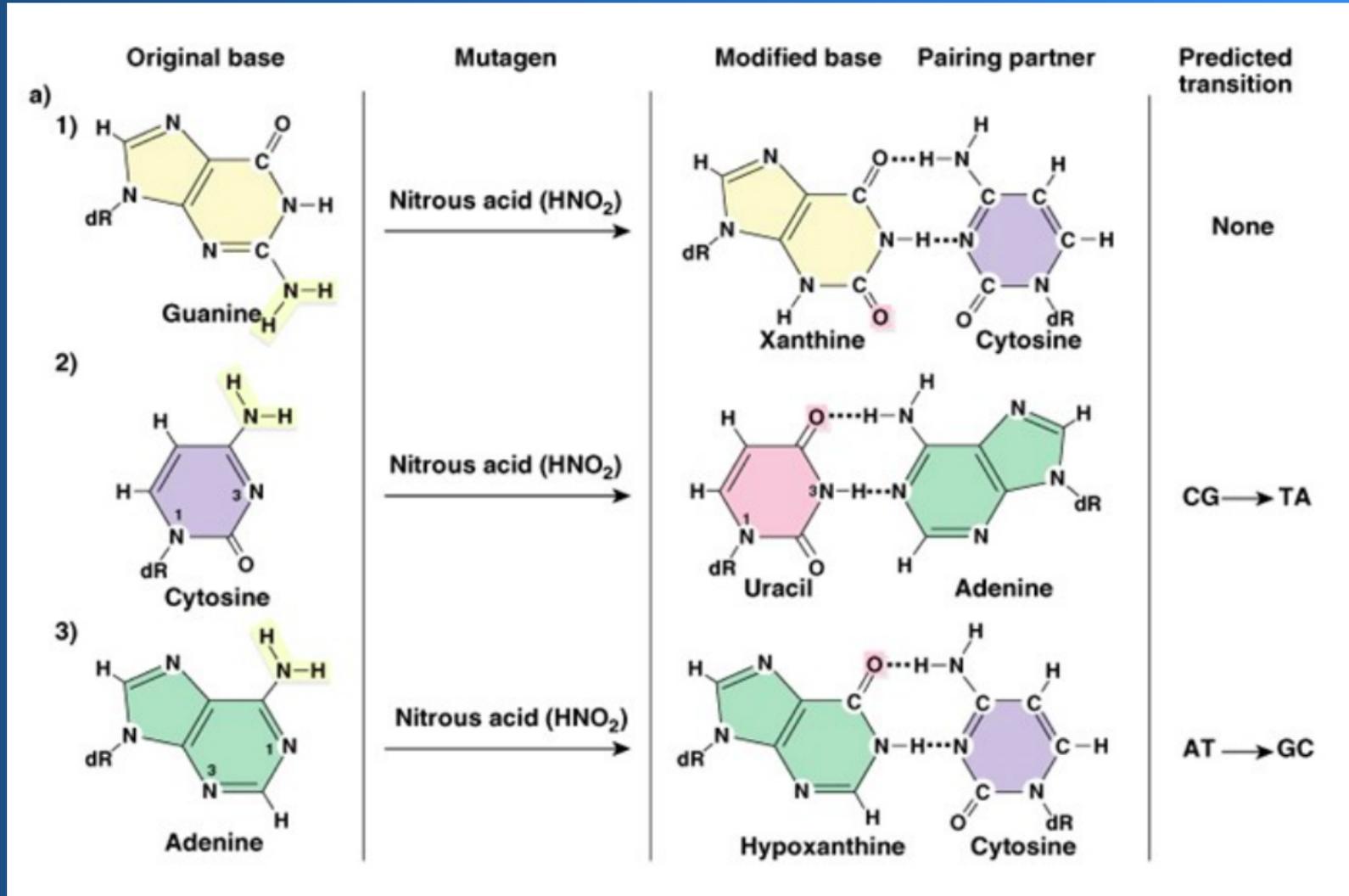
Danno da idrossilazione



Danno da alchilazione

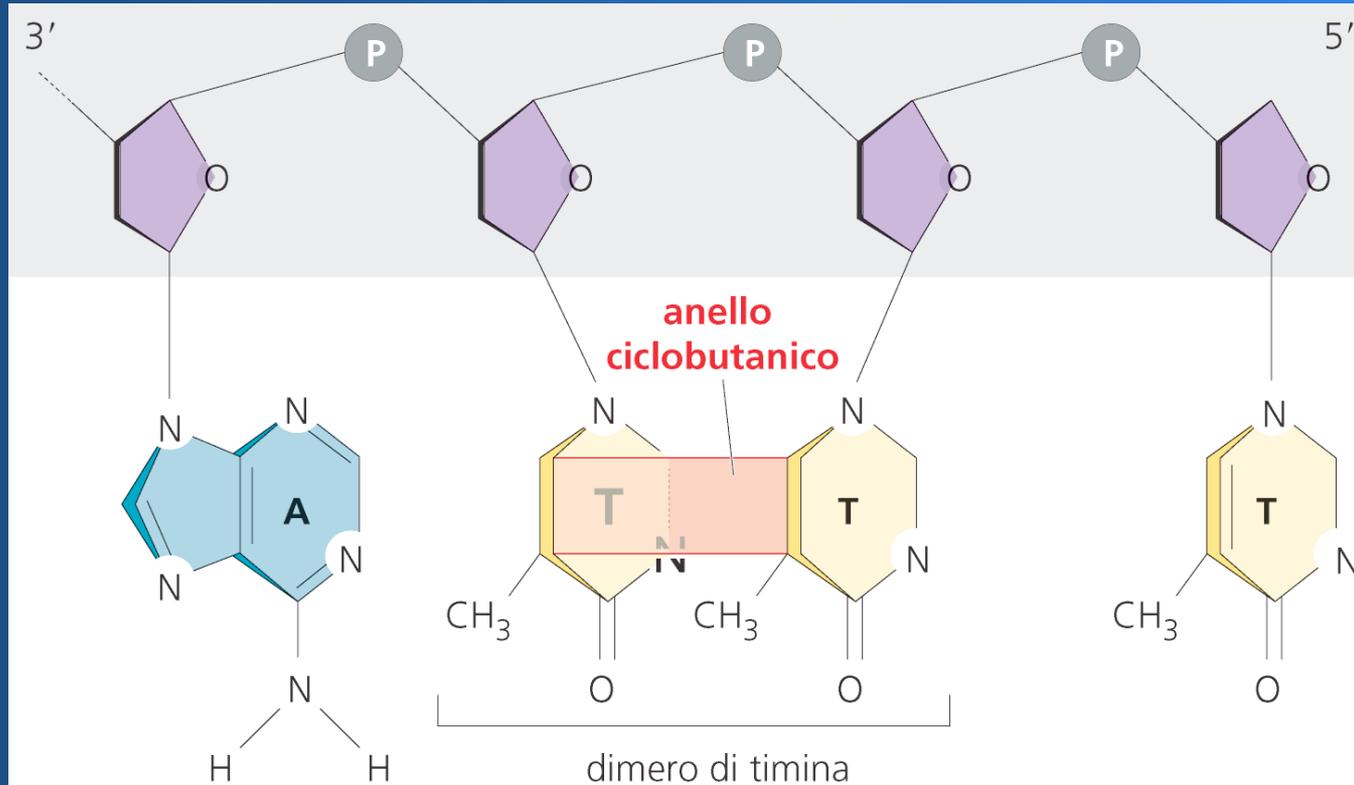


Danno da ossidazione



Danno da radiazione

Radiazione ultravioletta

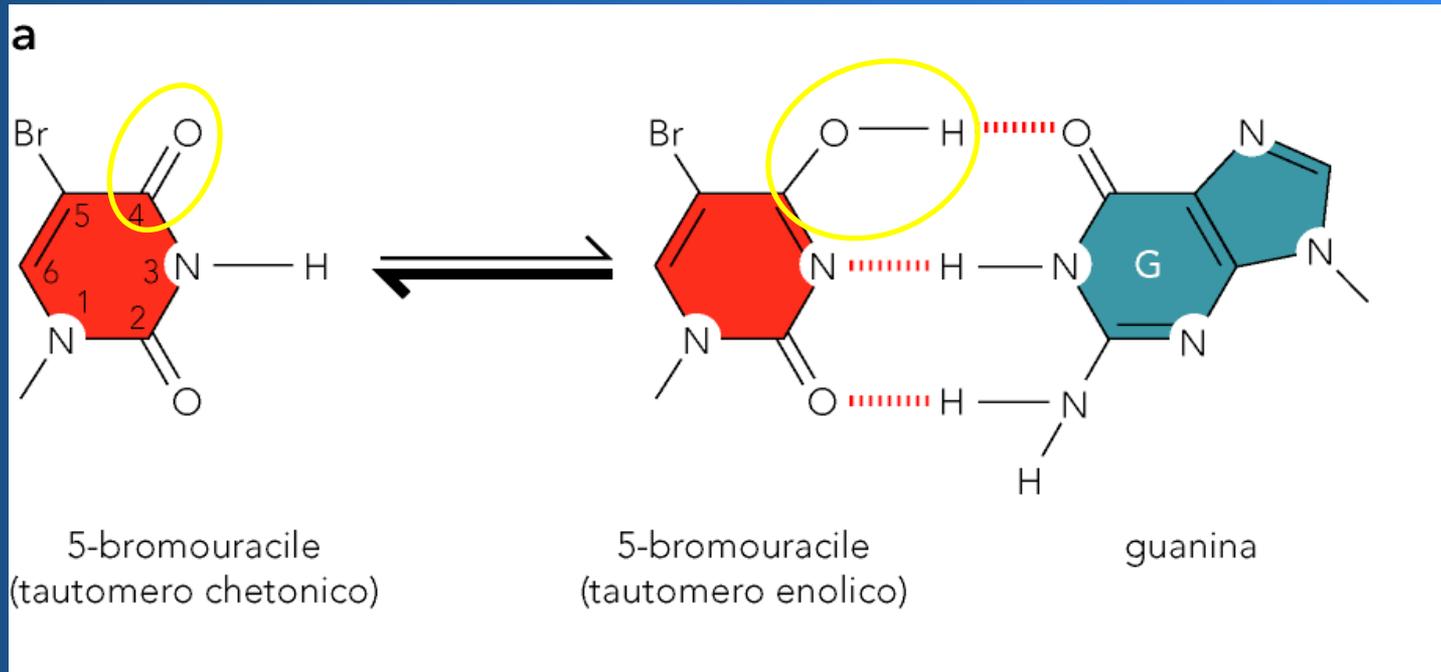


Radiazioni γ e raggi X

rotture del doppio filamento di DNA

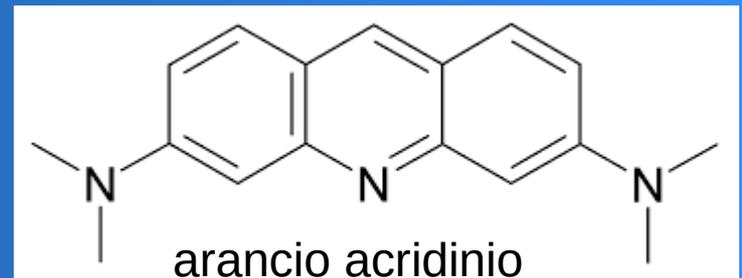
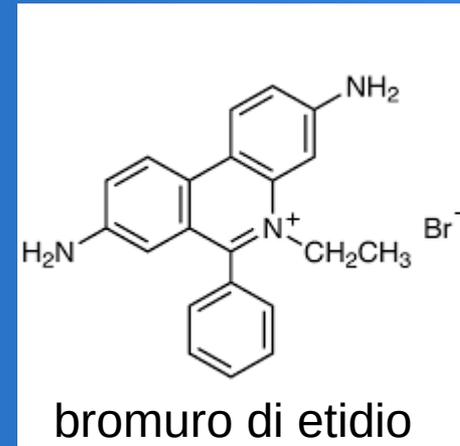
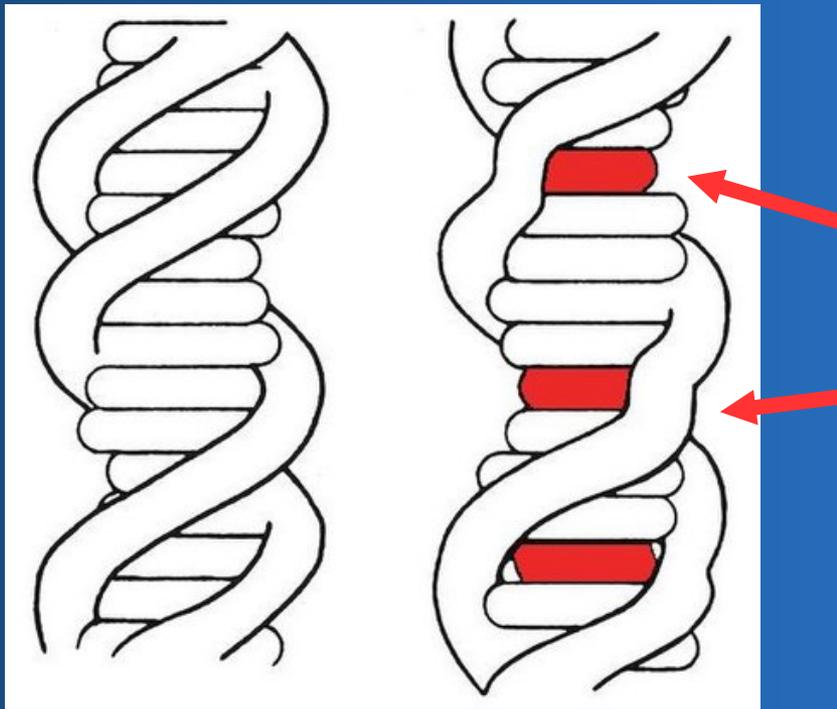
Analoghi delle basi

Il **5-bromouracile**, un analogo della timina nella forma enolica si lega a G

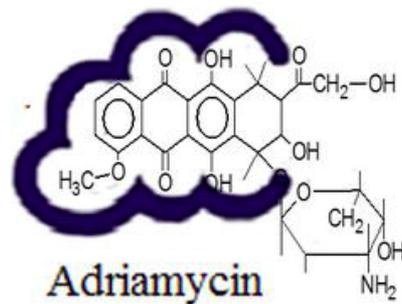
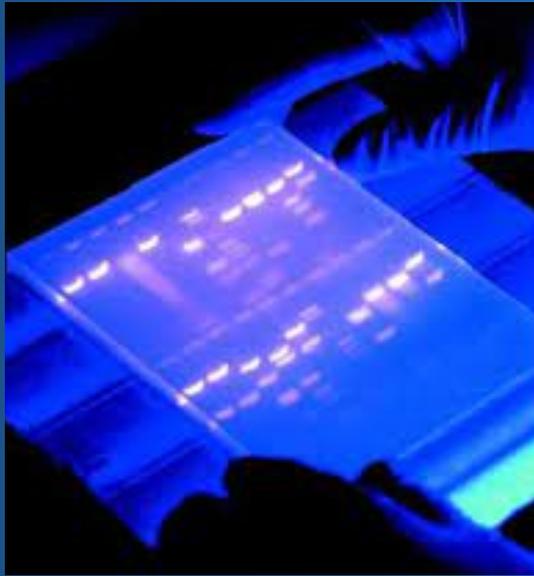


Molecole intercalanti del DNA

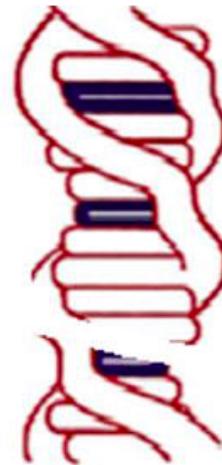
Sono molecole idrofobiche e planari in grado di inserirsi tra due basi azotate contigue lungo i filamenti della doppia elica



Applicazioni delle molecole intercalanti



Adriamycin



Adriamycin-DNA complex

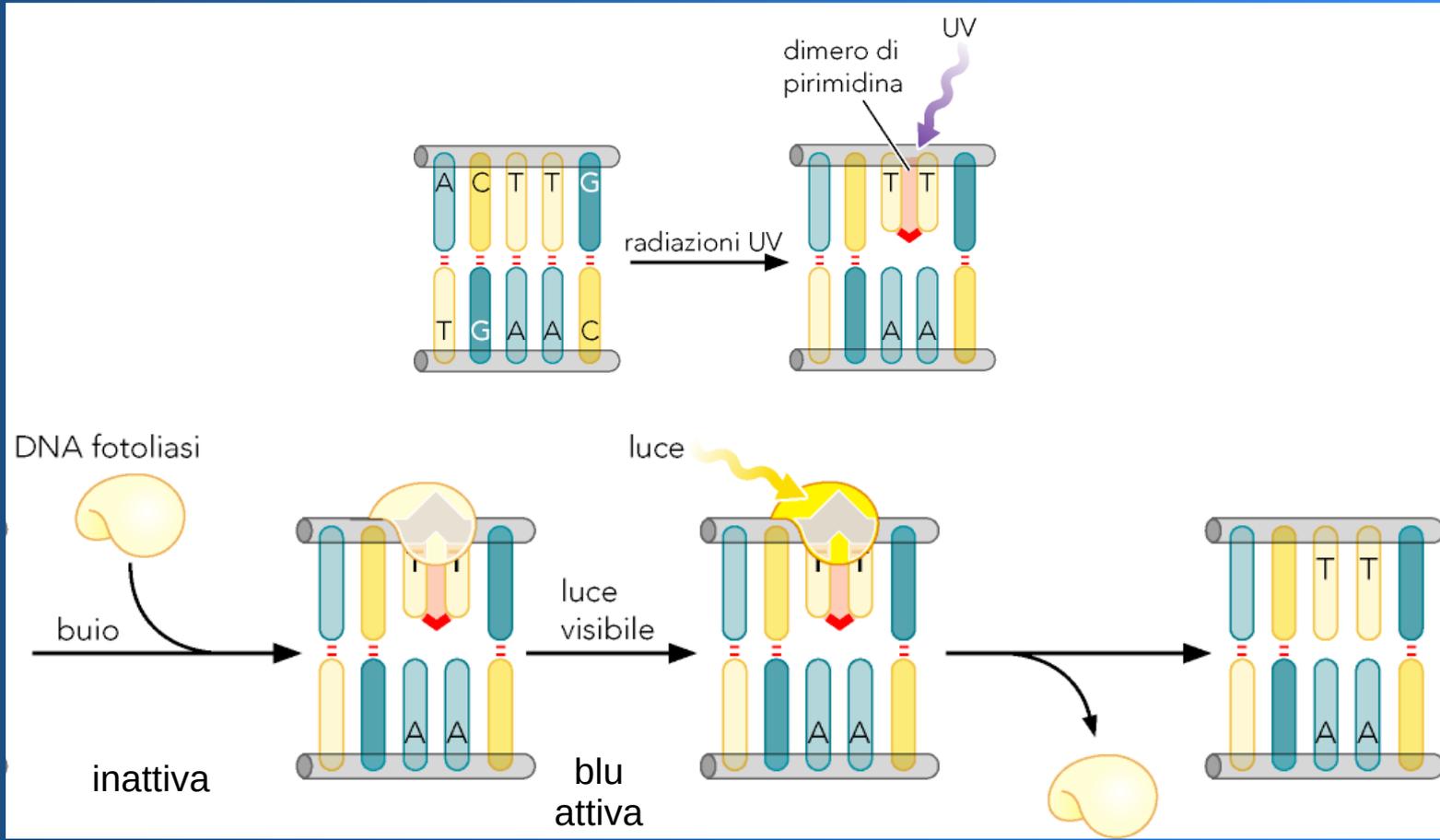
Sistemi di riparazione del DNA

TABELLA 9.1 I sistemi di riparazione del DNA

Tipo	Danno	Enzima
Riparazione dei mismatch	Errori di replicazione	MutS, MutL e MutH in <i>E. coli</i> ; MSH, MLH e PMS negli uomini
Fotoriattivazione	Dimeri di pirimidina	DNA fotoliasi
Riparazione per escissione di basi	Basi danneggiate	DNA glicosilasi
Riparazione per escissione nucleotidica	Dimeri di pirimidina Grossi addotti delle basi	UvrA, UvrB, UvrC e UvrD in <i>E. coli</i> ; XPC, XPA, XPD, ERCCI-XPF e XPG negli uomini
Riparazione delle rotture a doppio filamento	Rotture a doppio filamento	RecA e RecBCD in <i>E. coli</i>
Sintesi del DNA per translesione	Dimeri di pirimidina o siti apurinici	DNA polimerasi di tipo Y, come UmuC in <i>E. coli</i>

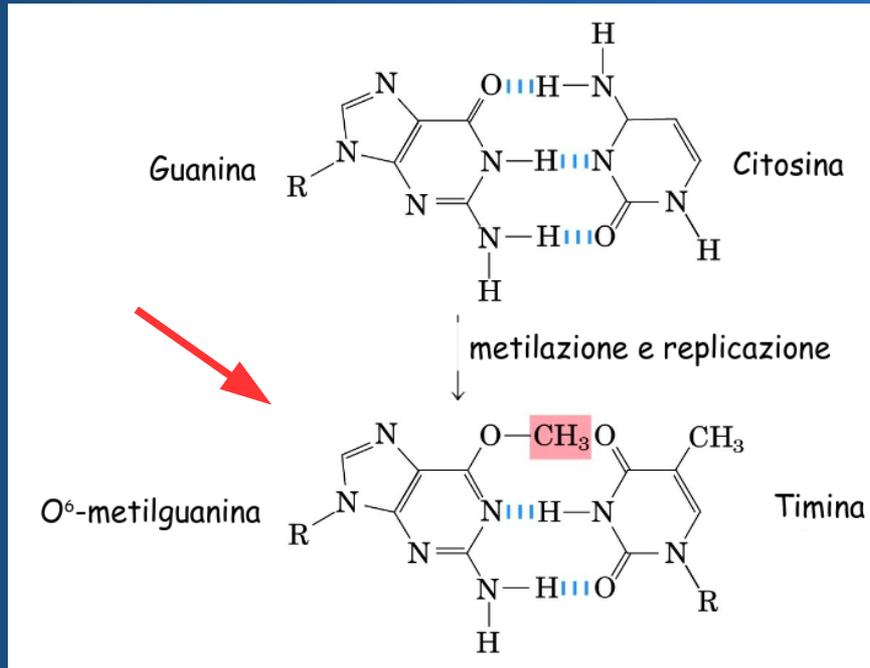
Fotoriattivazione

La **DNA fotoliasi** è attivata dalla luce e rompe i legami covalenti tra timine adiacenti indotti da radiazioni UV



...ma sfortunatamente non è presente nei mammiferi ...

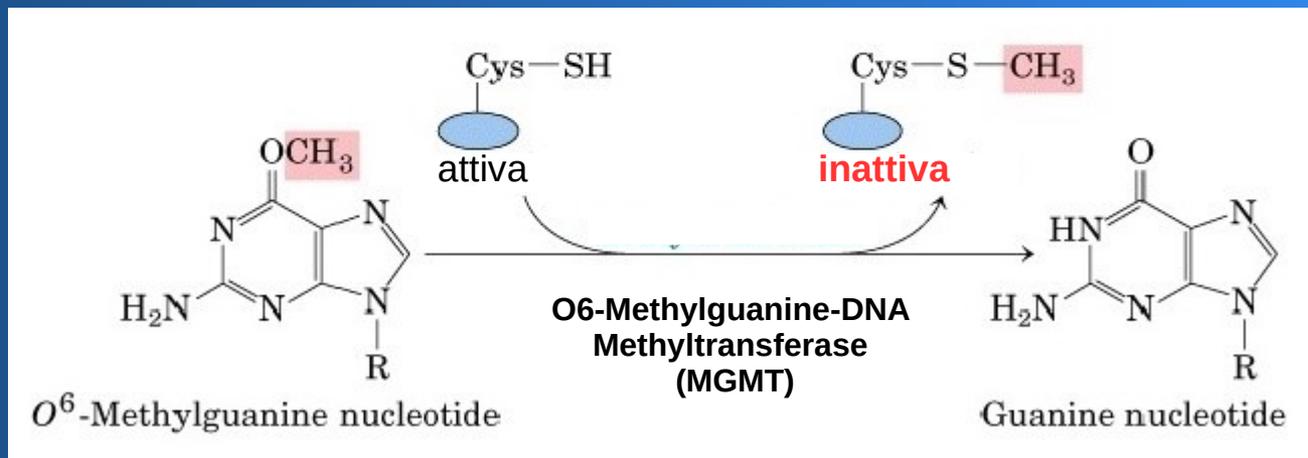
Rimozione del gruppo metilico dalla guanina



L'inattivazione di
MGMT è
permanente



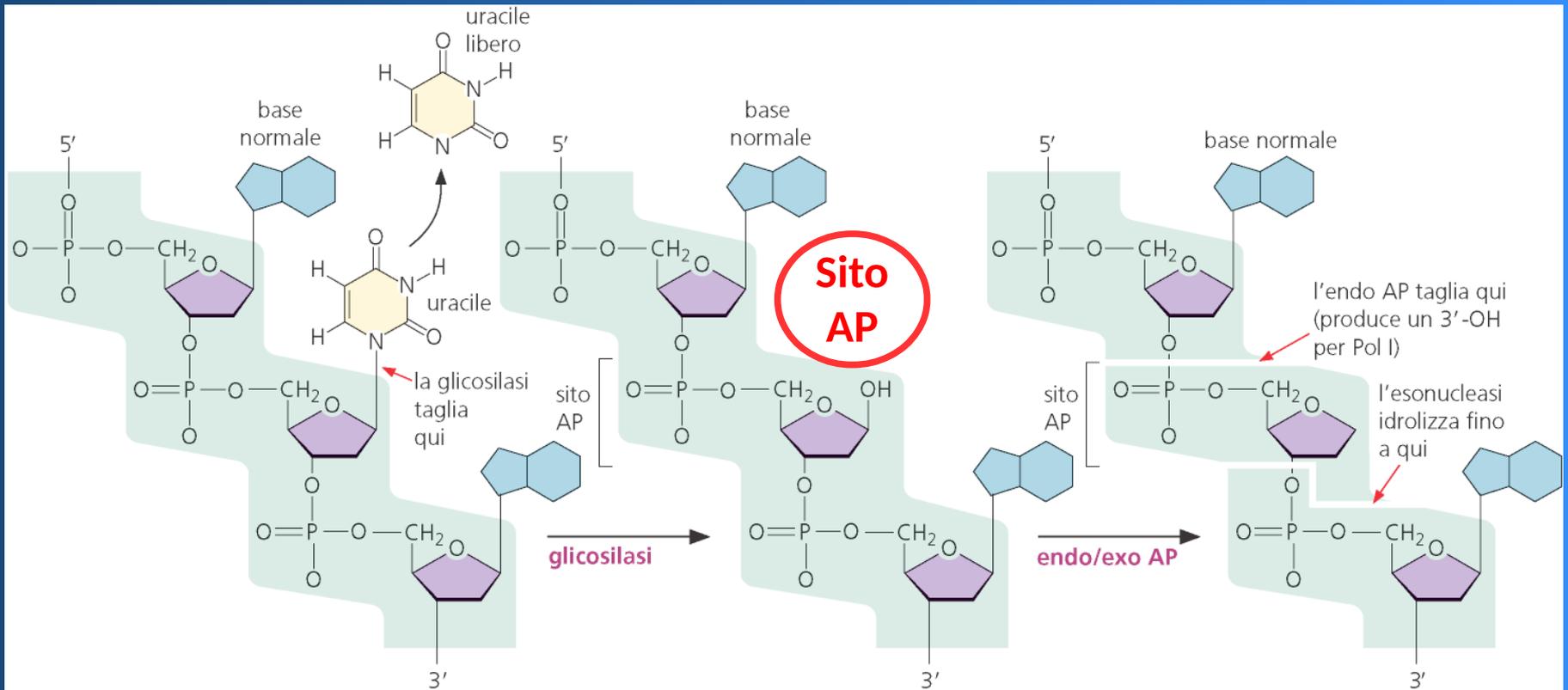
serve una
nuova proteina



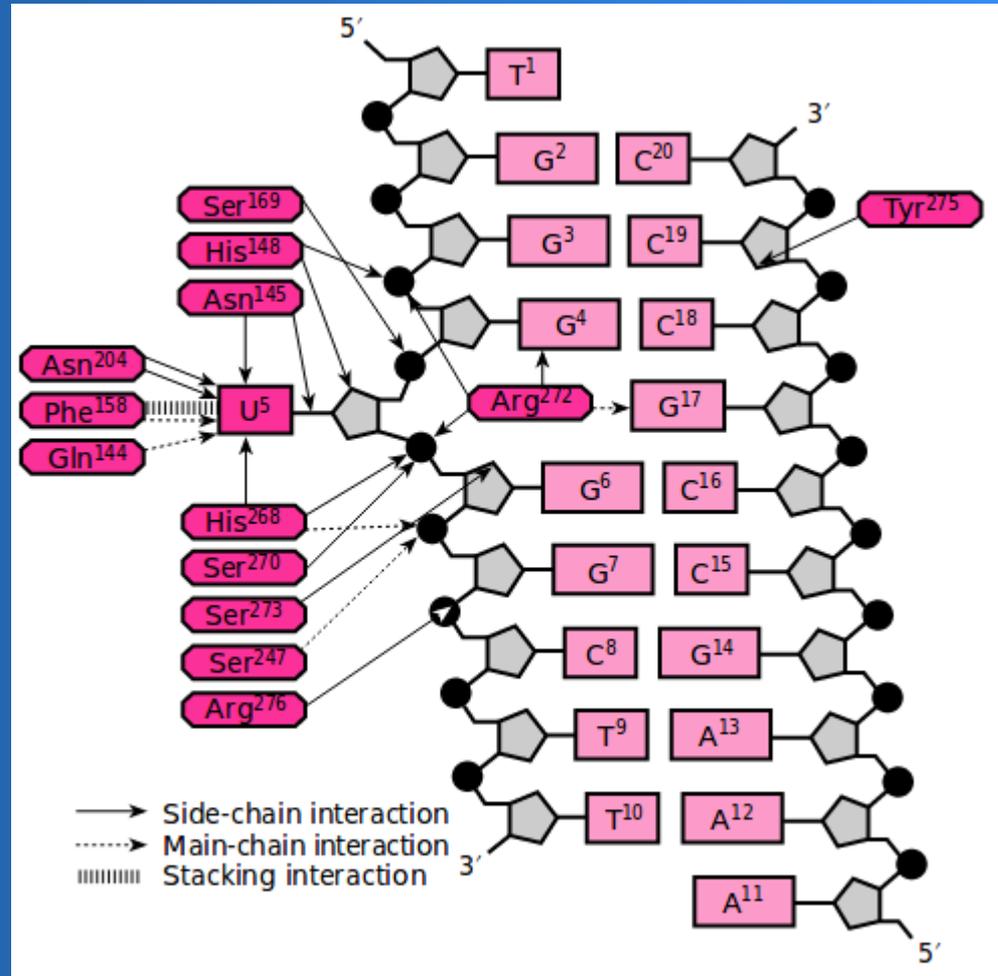
Riparazione per escissione di base (BER)

Azione di **glicosidasi specifiche** per vari tipi di danno

Le glicosidasi rimuovono le solo le basi azotate, lasciando un sito detto AP (apurinico/apridmidinico)



Riparazione per escissione di base (BER)

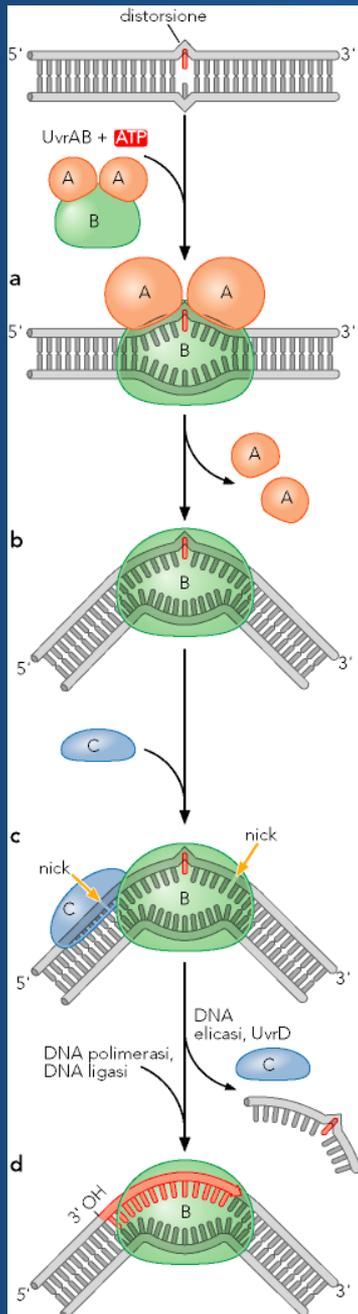


Riparazione per escissione di nucleotide (NER)

In *E. coli*, endonucleasi della famiglia UvrABC:

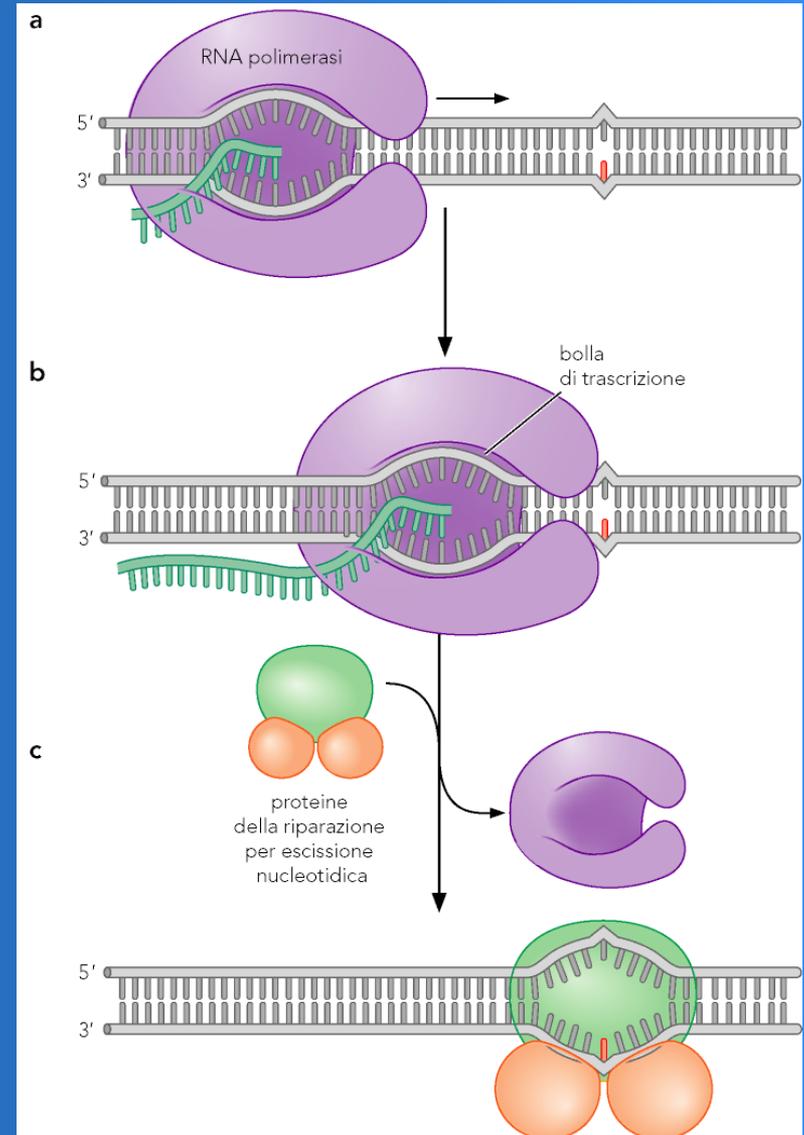
- Il dimerico Uvr**A**-Uvr**B** cerca distorsioni del DNA (dimeri di T, addotti chimici sulle basi).
- UvrA lascia il complesso
- UvrB piega il DNA e recluta Uvr**C** che taglia il DNA 8 nt a monte e 4 nt a valle.
- L'elicasi Uvr**D** toglie il frammento tagliato
- La **DNA Polimerasi** di tipo I riempie il gap
- Una **ligasi** sigilla la riparazione

Nell'uomo i geni per la riparazione sono detti **XP**: la malattia **Xeroderma Pigmentoso**, difettiva per questi geni, crea fotosensibilità e tumori alla pelle da dimeri di timine

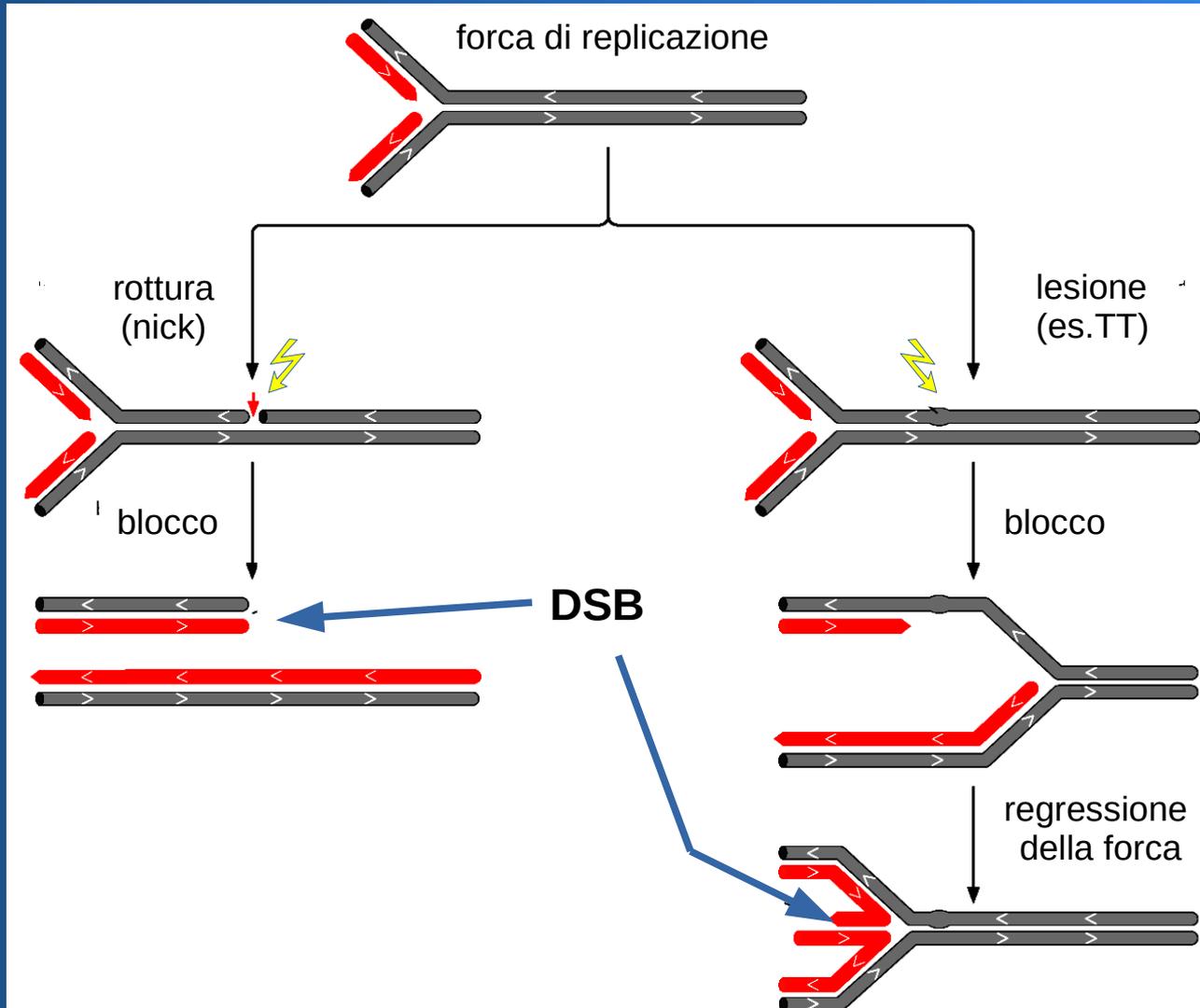


Riparazione accoppiata alla trascrizione

- Quando la RNA polimerasi trova un mismatch, si ferma.
- Recluta il sistema di riparazione per escissione nucleotidica e si distacca.
- Al sistema partecipa TFIIH: due subunità di questo fattore sono le elicasi XPA e XPD



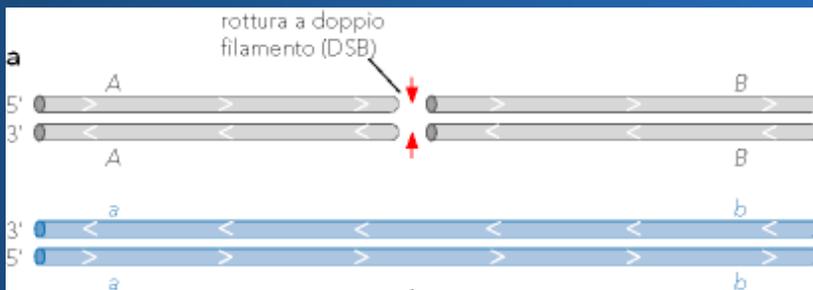
Rotture a doppio filamento nel DNA (double-stranded breaks, DSB)



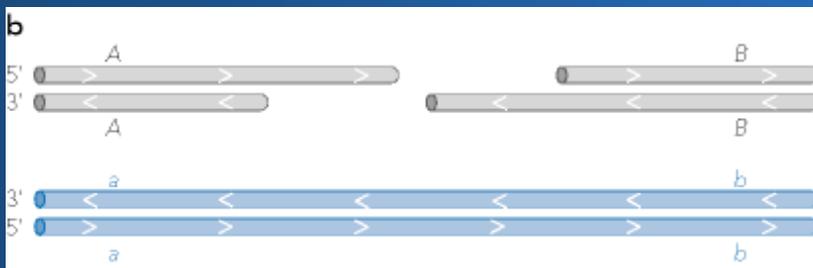
Riparazione dei DSB: ricombinazione omologa (HR)

la **HR** Avviene durante la mitosi (o la meiosi) e sfrutta la vicinanza fisica e la complementarietà del cromosoma danneggiato con il suo omologo, quindi praticamente identico ad esso

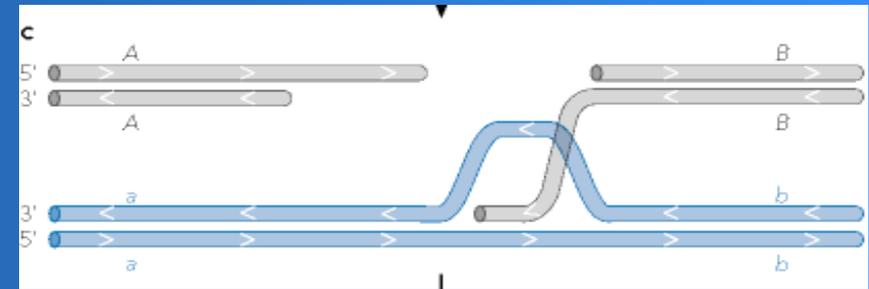
1. taglio del double strand.



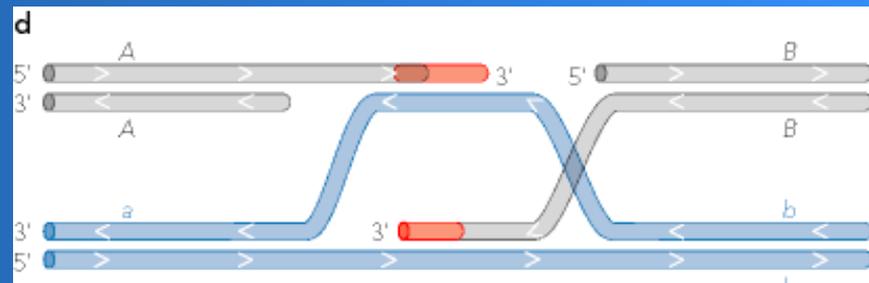
2. esonucleasi liberano il 3'-OH



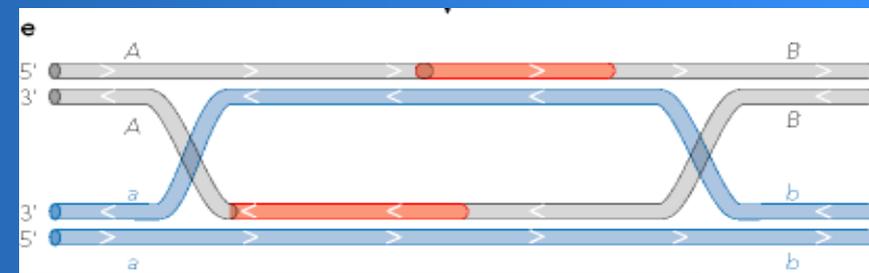
3. invasione del DNA omologo



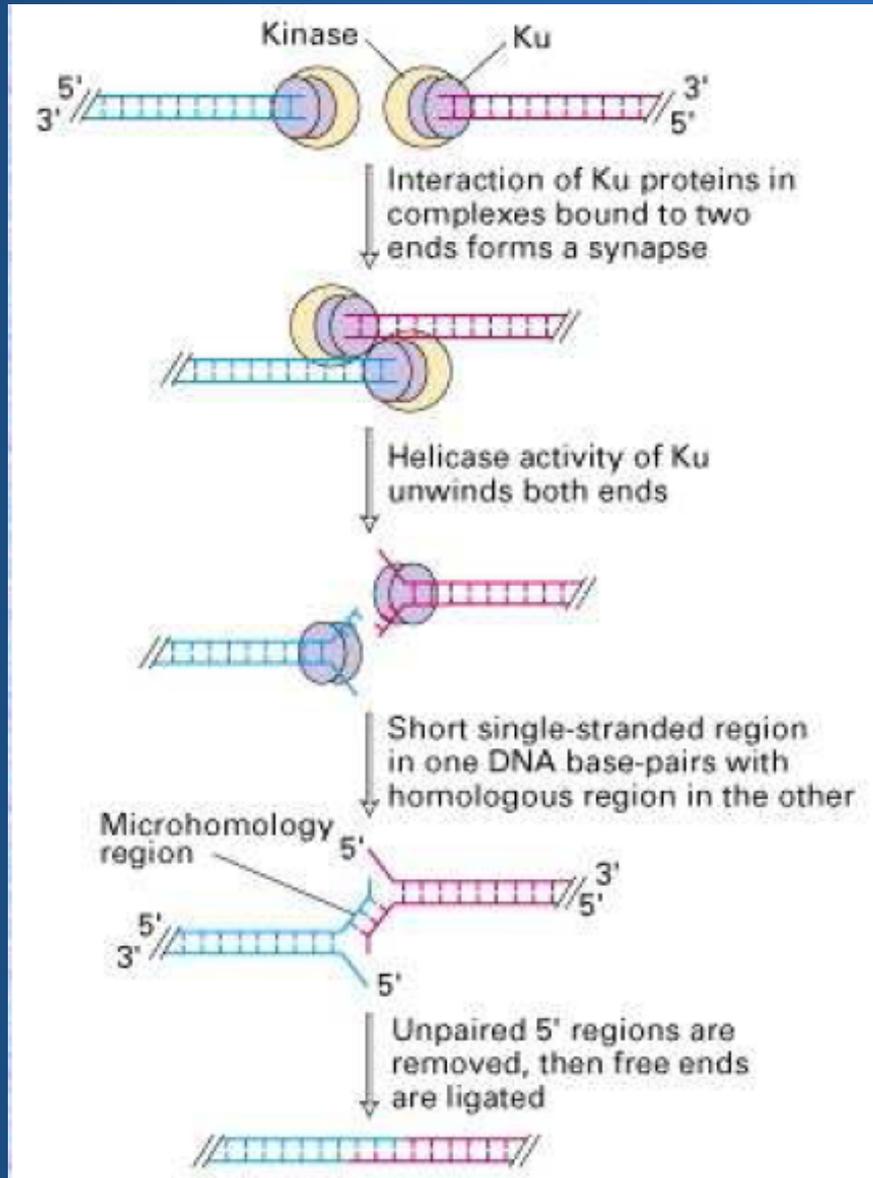
4. estensione nel DNA omologo



5. ligazione delle estremità



Riparazione dei DSB: ricombinazione non omologa



NHEJ

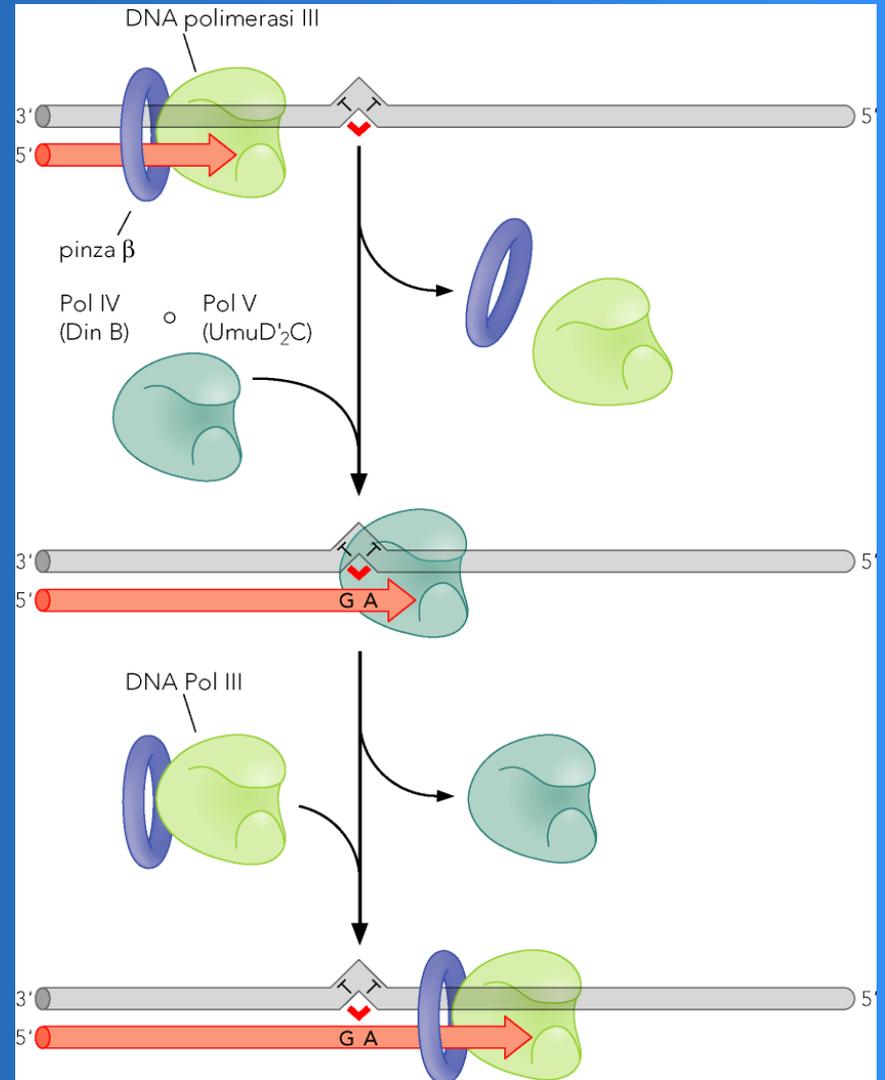
non-homologous end joining

- 1- Le proteine Ku polimerizzano a formare un sigillo che impedisce ai due filamenti di scollegarsi
- 2- L'attività elicastica di Ku favorisce la formazione di single strand
- 3- Le regioni esposte cercano microregioni ad alta similarità e vi si appaiano
- 4- le estramità sporgenti non legate vengono rimosse
- 5- si perde materiale genetico

Sintesi di DNA translesione

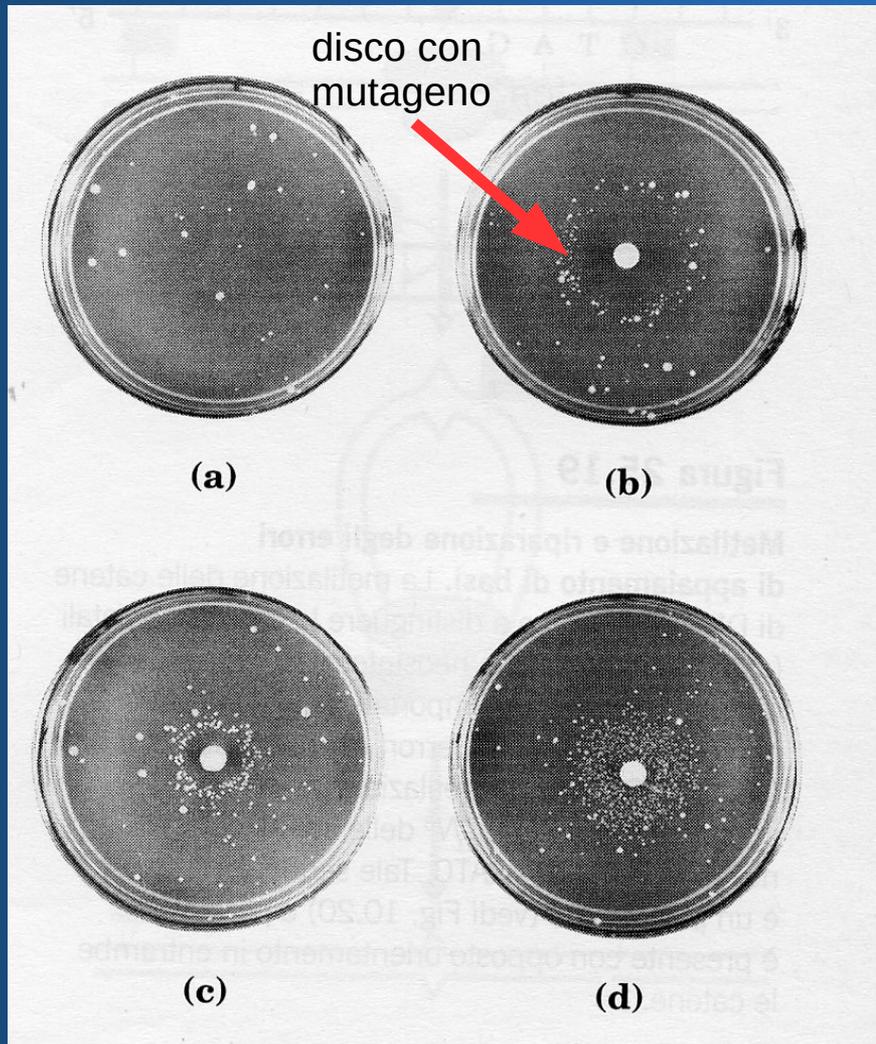
- 1) La replicazione del DNA si blocca se incontra una lesione.
- 2) La riparazione **non avviene** (*)
- 3) La Pol III si distacca e al suo posto entra la **DNA pol translesione** (Pol IV o Pol V).
- 4) Copia il DNA con poca fedeltà, e poi si stacca per far posto alla Pol III.
- 5) In *E. coli* queste polimerasi sono indotte dalla **risposta SOS**

(*) avvengono mutazioni. E' su questa base che la selezione naturale agisce e l'evoluzione può avvenire



Il test di Ames (genotossicità)

Un ceppo di *Salmonella Typhimurium* **difettivo per la biosintesi di istidina** non può crescere senza istidina nel terreno.



In terreno **senza** istidina

- a) Controllo negativo
- b) alta conc mutageno
- c) media conc. mutageno
- d) bassa conc. mutageno
- e) composto incognito**



Se osservo crescita in e) il composto che sto testando è **mutageno**, dato che in grado di ripristinare la biosintesi dell'istidina