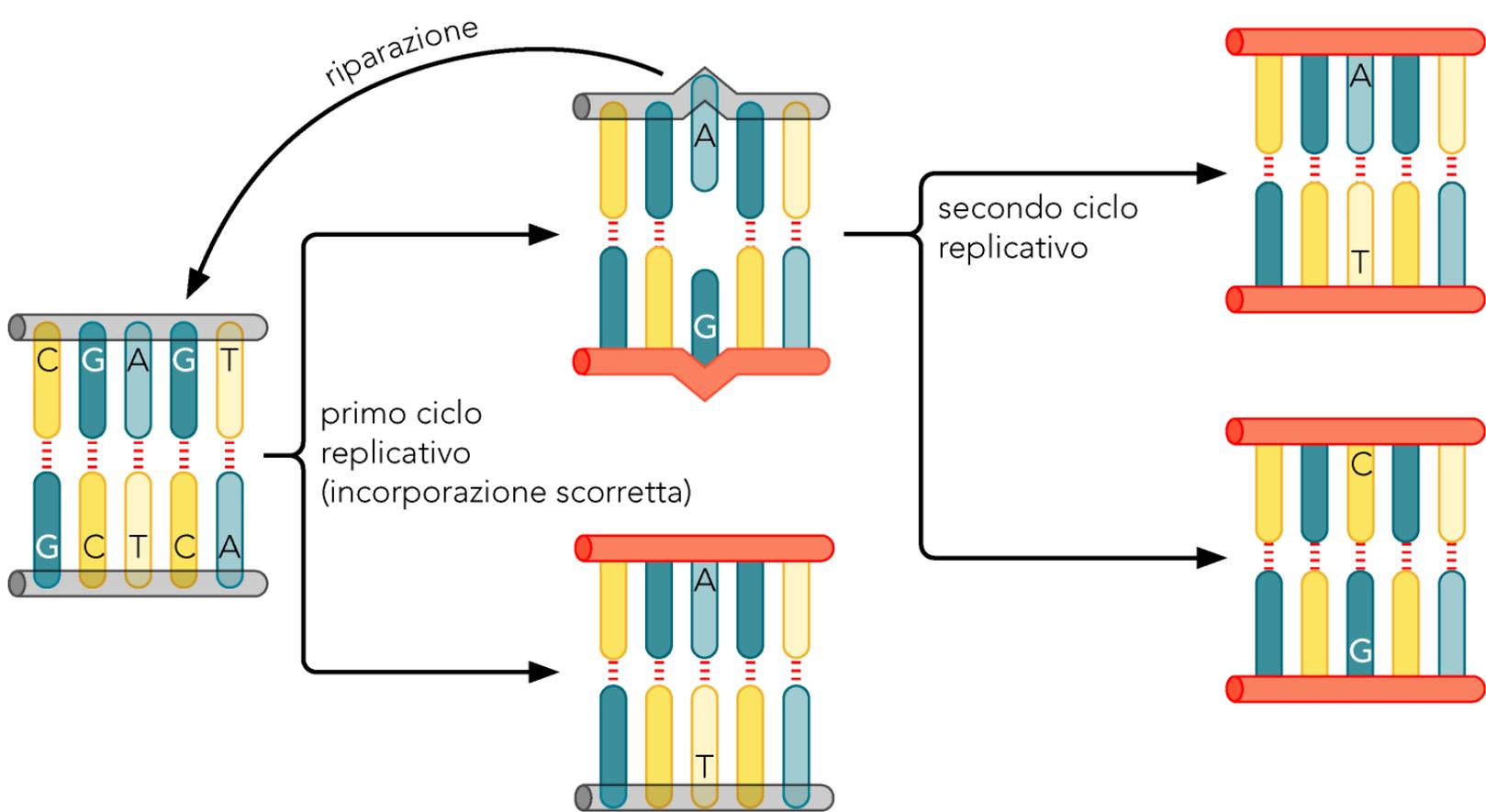


CLASSI GENERALI DEL DANNO AL DNA

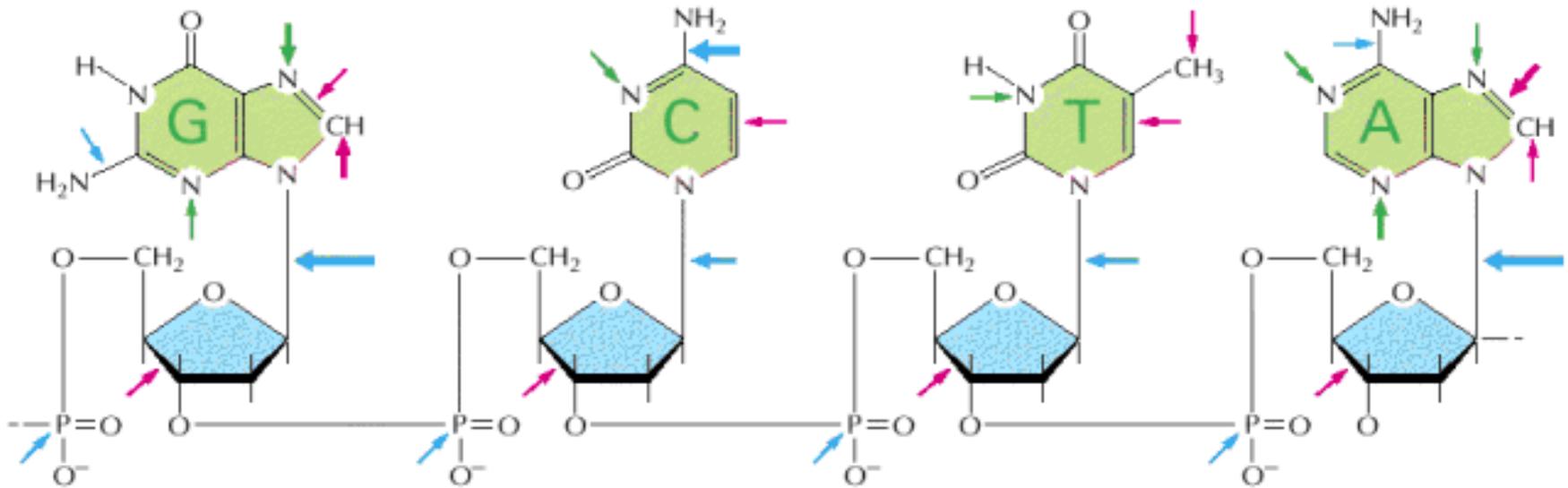
- Tre classi principali di danno al DNA:
 - ✓ Cambiamenti di singole basi;
 - ✓ Distorsione strutturale;
 - ✓ Danno all'ossatura del DNA.



Alcuni errori di replicazione sfuggono alla correzione

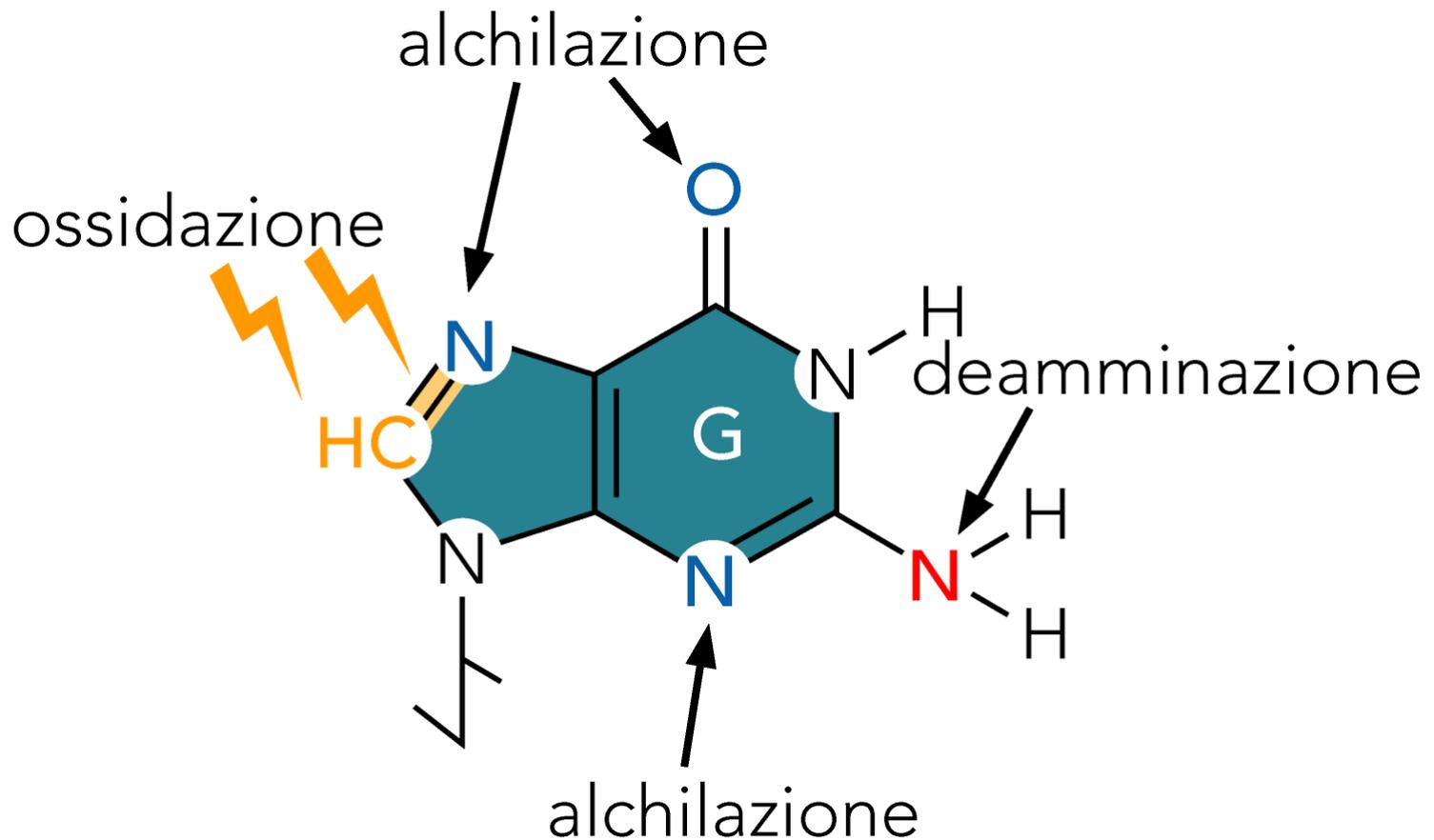
Come visto, l'attività di correzione delle bozze (proofreading) aumenta la fedeltà replicativa di 100 volte.

Le basi incorrette, sfuggite a questa attività, portano ad errori di appaiamento tra neofilamento e stampo (in totale sono di 12 tipi, 3 per base). Tali mismatch, se non corretti in tempo, alla successiva replicazione vengono stabilizzati nel DNA come mutazioni.



A summary of spontaneous alterations likely to require DNA repair.

The sites on each nucleotide that are known to be modified by spontaneous oxidative damage (*red arrows*), hydrolytic attack (*blue arrows*), and uncontrolled methylation by the methyl group donor S-adenosylmethionine (*green arrows*) are shown, with the width of each arrow indicating the relative frequency of each event.



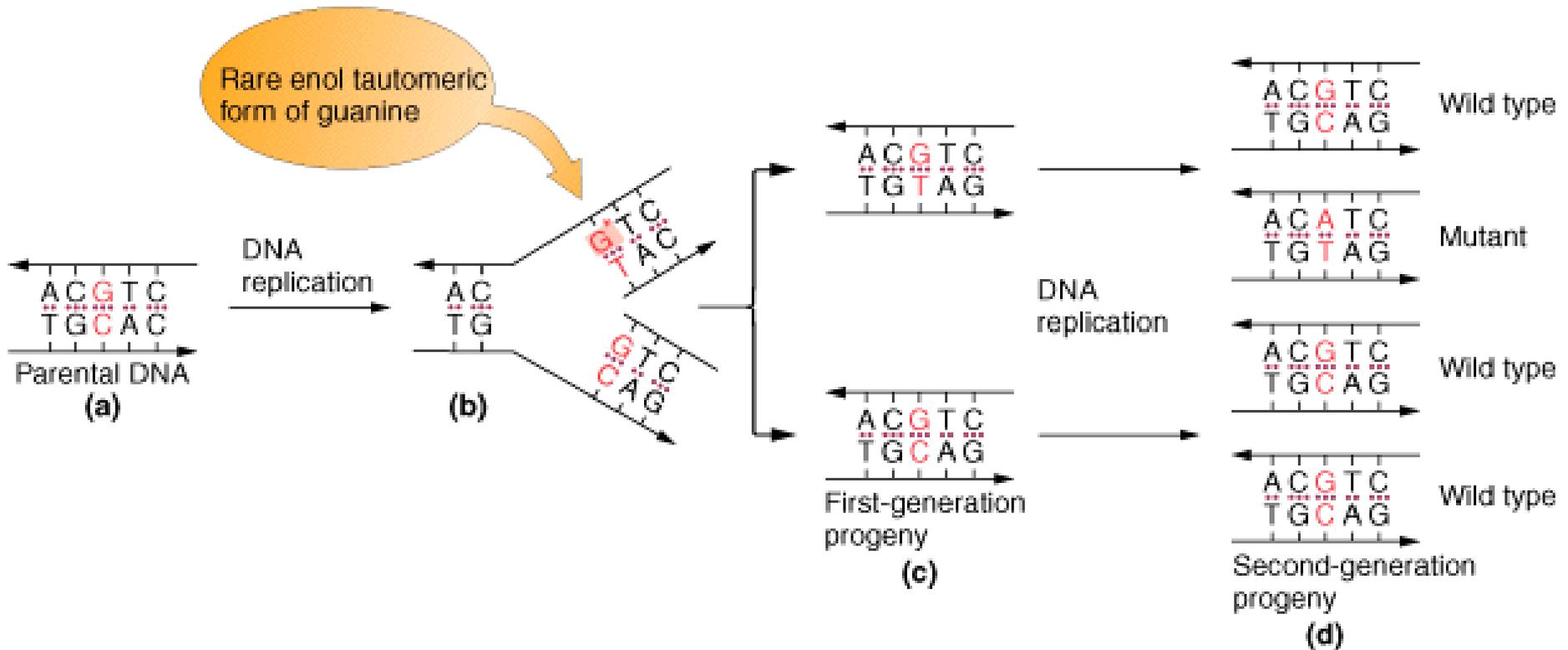
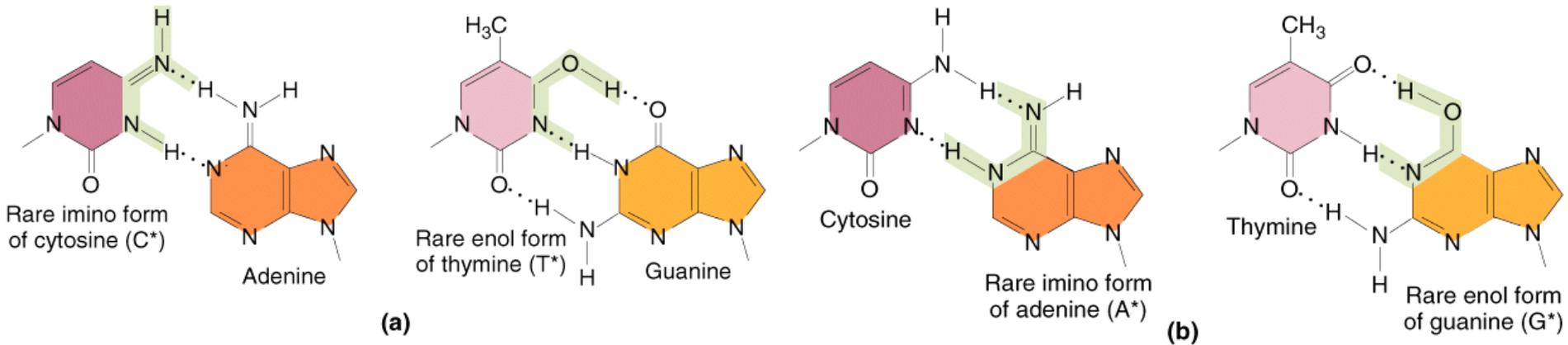
Alchilazioni, ossidazioni e radiazioni danneggiano il DNA

Alchilazione: trasferimento di gruppi metile o etile sulle basi o sui fosfati (es. nitrosammine).

Siti specifici della G sono suscettibili al danno chimico o fisico: ad es. O6-metil G si appaia con T.

Ossidazione: reazione con forme reattive dell'ossigeno (O₂⁻, H₂O₂, OH[·]), generate da radiazioni o agenti chimici che producono radicali liberi. Per ossidazione G → 8 oxoG, fortemente mutageno perché si può appaiare con A, originando trasversioni GC→TA, molto frequenti nei tumori umani. Gli effetti cancerogeni di radiazioni e agenti ossidanti attribuiti a radicali liberi che portano a oxoG.

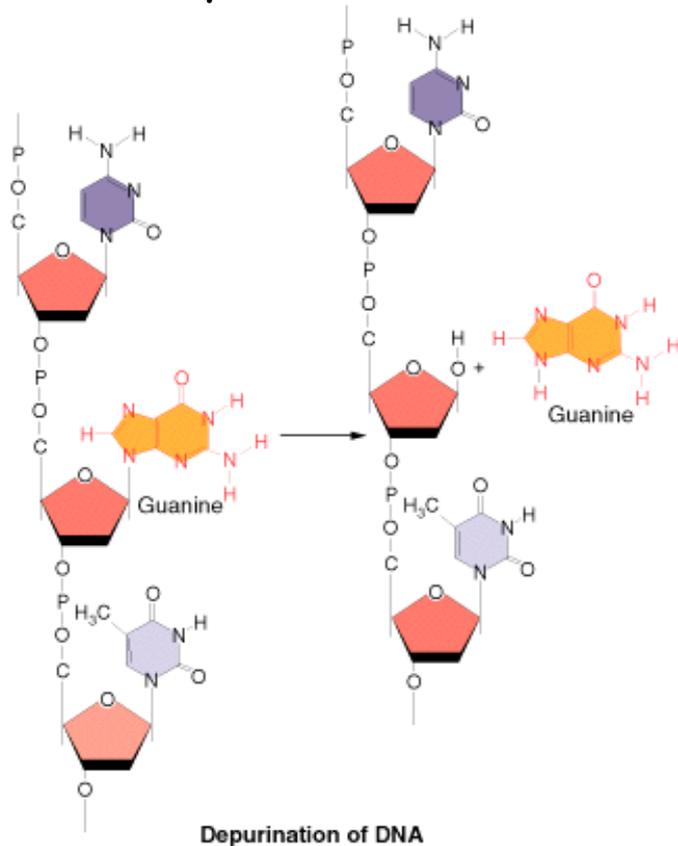
Shift Tautomerici delle basi causano errori nella replicazione del DNA



Il danno spontaneo da idrolisi

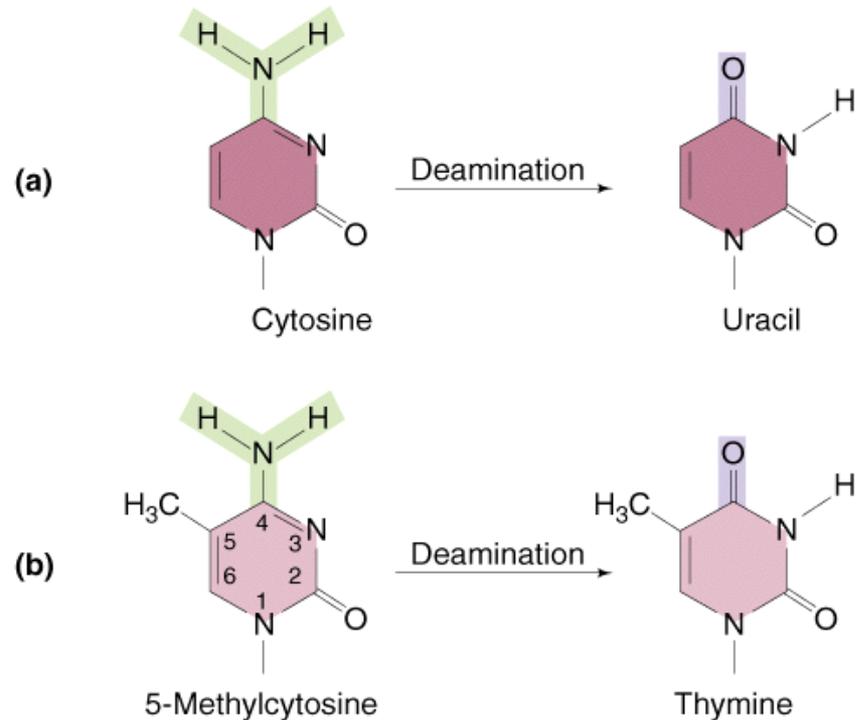
- La deaminazione delle C, A e G: C in U; A in ipoxantina; G in xantina
- La deaminazione della 5meC: C in T
- L'attacco al legame N- β -glicosidico tra la base e lo zucchero: sito AP (problema del sito AP durante la replicazione)

Depurinazione



Un a singola cellula perde >10,000 purine/giorno! Ma la maggior parte dei siti sono riparati

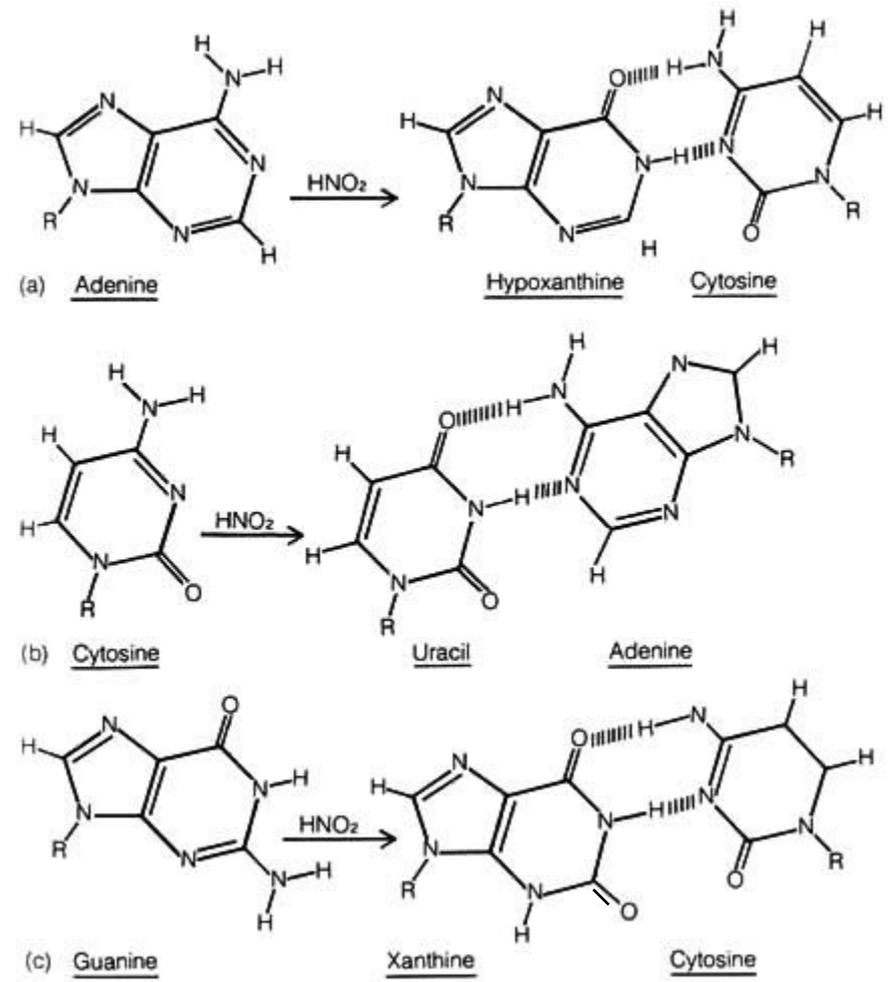
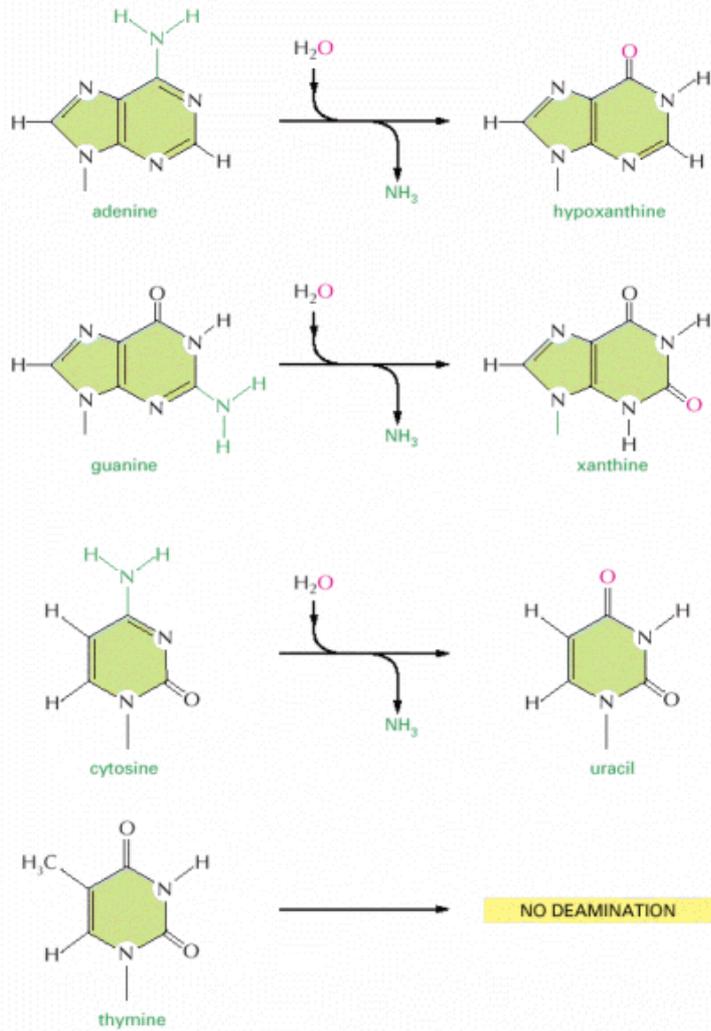
Deaminazione



La timina invece non e' riconosciuta dai sistemi di riparo, per cui questo meccanismo e' comune causa di mutazione .

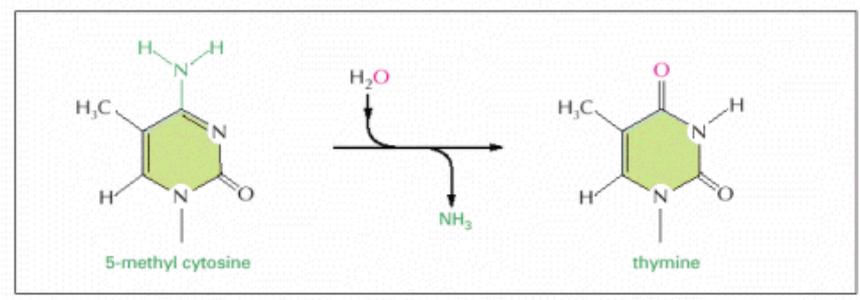
NATURAL DNA BASES

UNNATURAL DNA BASES

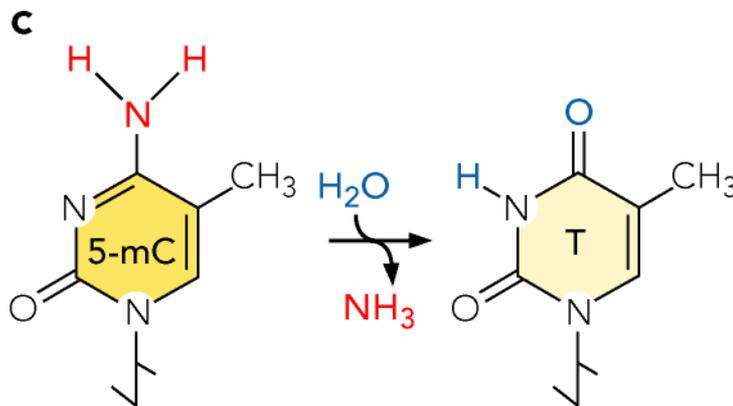
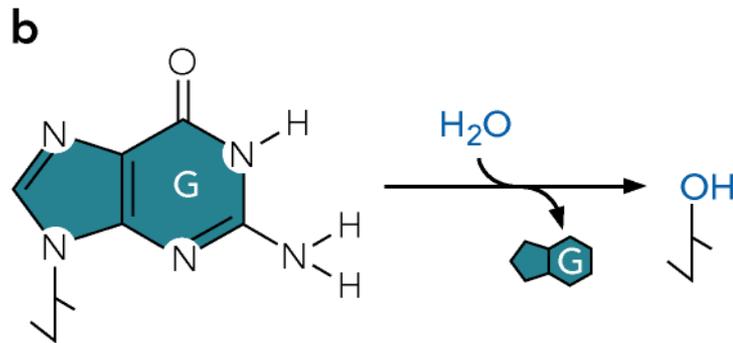
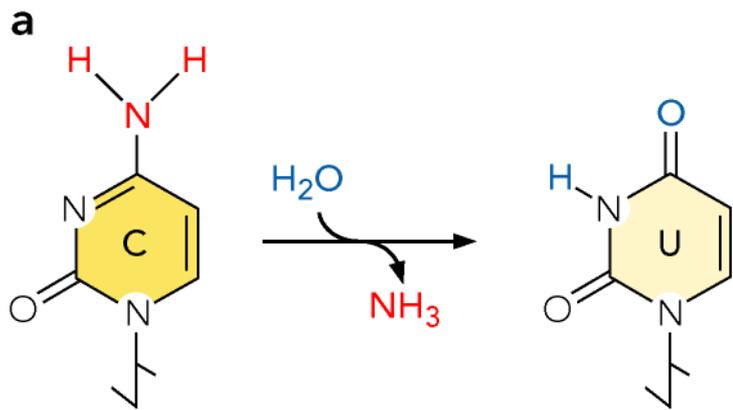


Deamination of bases and mispairing in the subsequent DNA replication round if damage is not repaired.

(A)



(B)



Mutazioni dovute a danno idrolitico

Le mutazioni possono insorgere non solo per errori di replicazione ma anche per danni al DNA.

Alcuni sono danni ambientali (radiazioni, sostanze mutagene), altri spontanei.

Ad es. l'acqua può originare, per idrolisi, i seguenti danni spontanei:

Deaminazione di C → U (per questo il DNA contiene T invece di U). Anche le Pu possono essere deaminate:

A → I
(Iloxantina si lega a C);
G → X
(Xantina si lega a C);

Depurinazione (es. idrolisi del legame glicosidico di G) → DNA apurino;

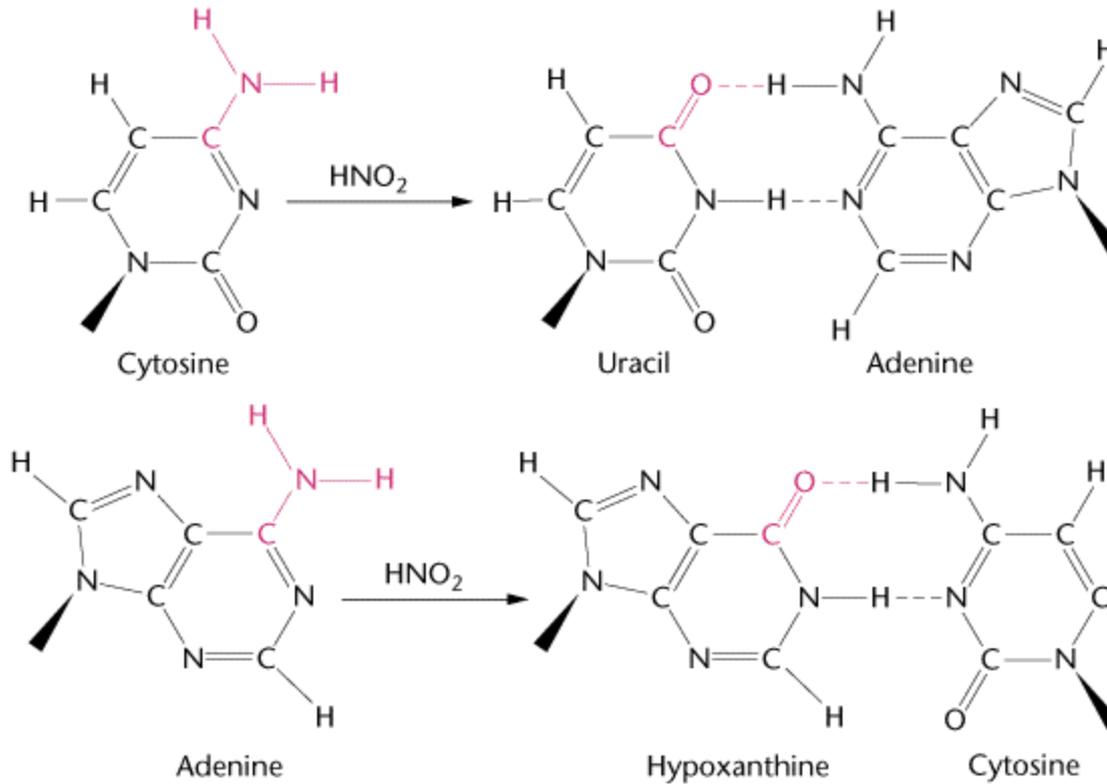
Deaminazione della 5-MeC → T. Nei vertebrati la 5-MeC è frequente ed importante nel silenziamento genico; la sua deaminazione fissa la transizione C→T alla replicazione successiva, per cui le 5MeC sono punti caldi di mutazione.

Il danno ossidativo

Responsabili: agenti alchilanti (ambiente) e specie reattive dell'ossigeno (derivati del metabolismo aerobico e dai sistemi di detossificazione epatici)

- Deaminazione da acido nitroso (da NaNO_3 e nitrosamine e altri sali di nitrato) o da ione bisolfito; HNO_2 e HSO_3^- reagiscono con A e C.
- Ossidazione di basi e zucchero da H_2O_2 , $\cdot\text{OH}^-$, $\cdot\text{O}_2^-$: ossidazione di basi e di zuccheri, sito AP e rotture sul DNA.

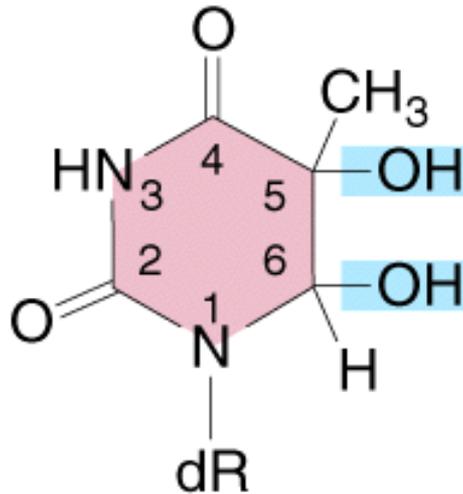
Mutagenesis by Nitrous Acid (HNO₂)



(Klug & Cummings 1997)

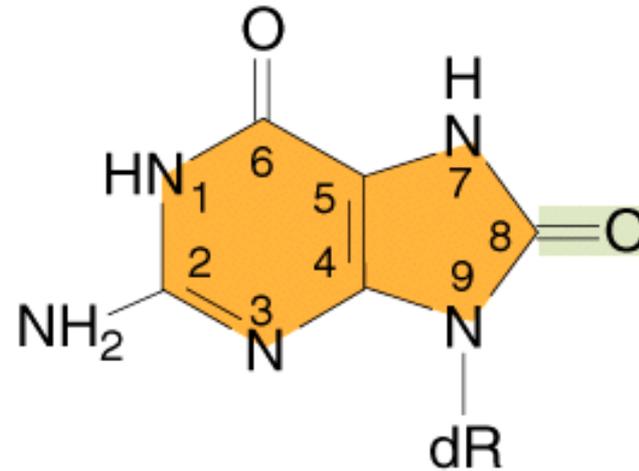
Lesioni spontanee

basi danneggiate da danno ossidativo



Thymidine glycol

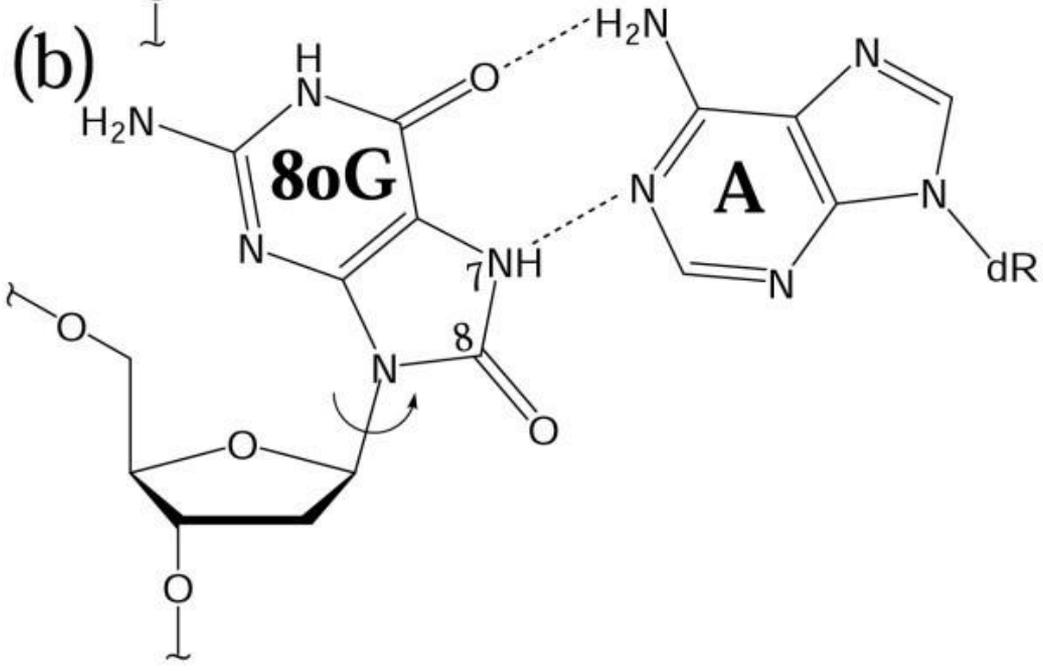
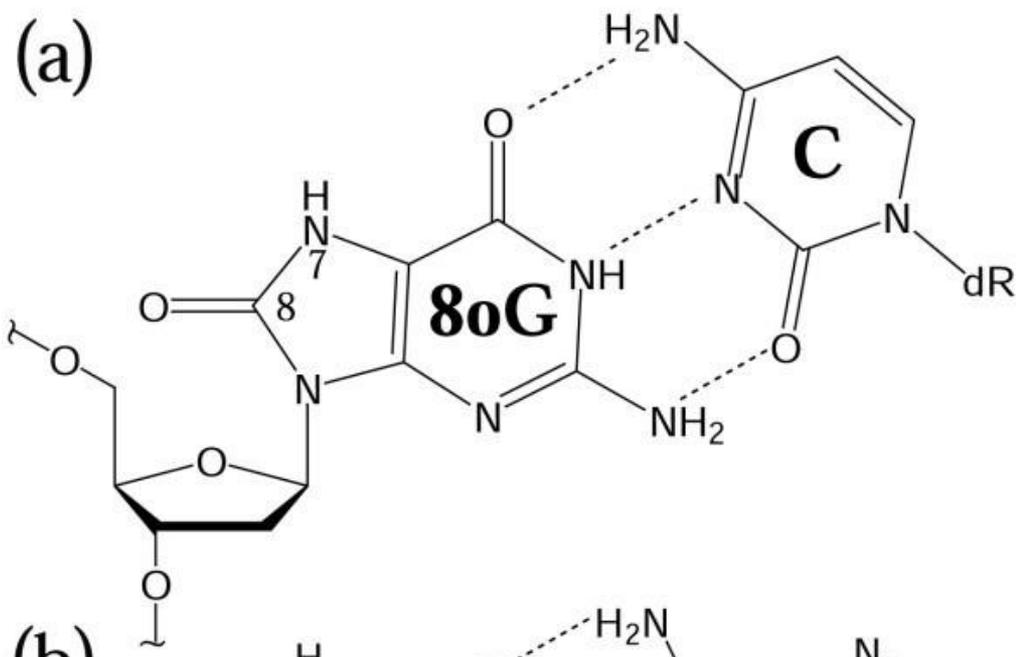
Blocca la replicazione del DNA



8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine
(8-oxodG)

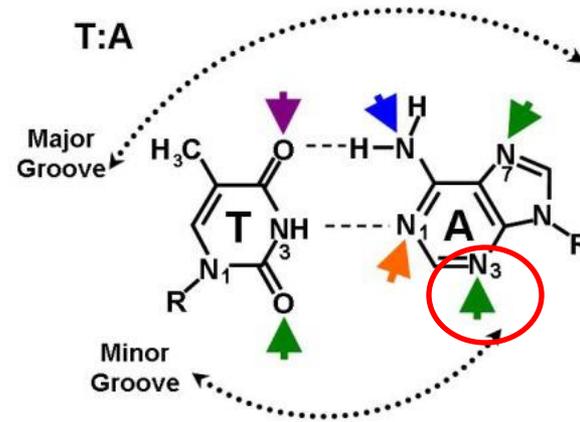
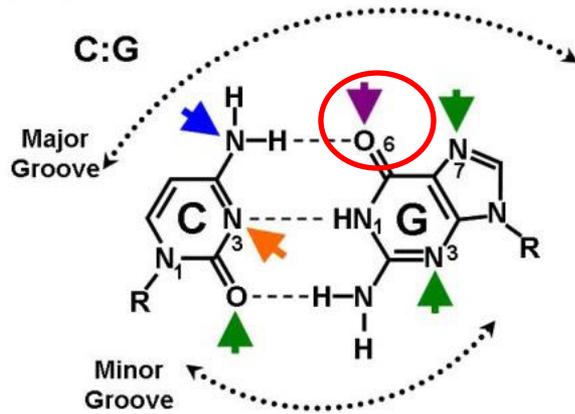
Si appaia con A dando luogo ad una
trasversione G-T

Il danno ossidativo avviene naturalmente, ma la sua frequenza aumenta con le radiazioni ionizzanti che creano specie reattive dell'ossigeno.

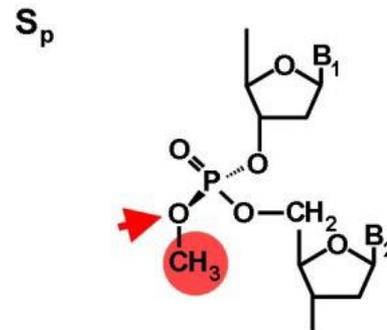
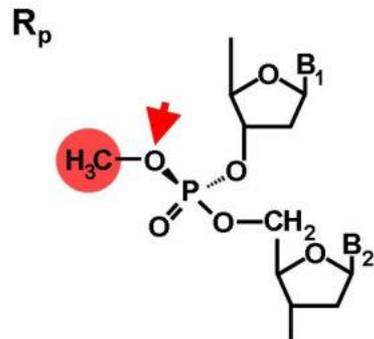


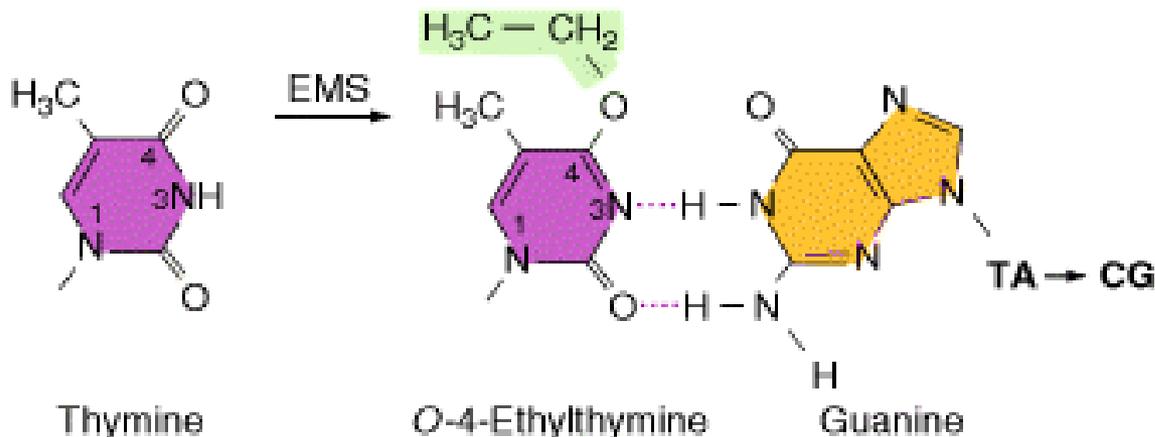
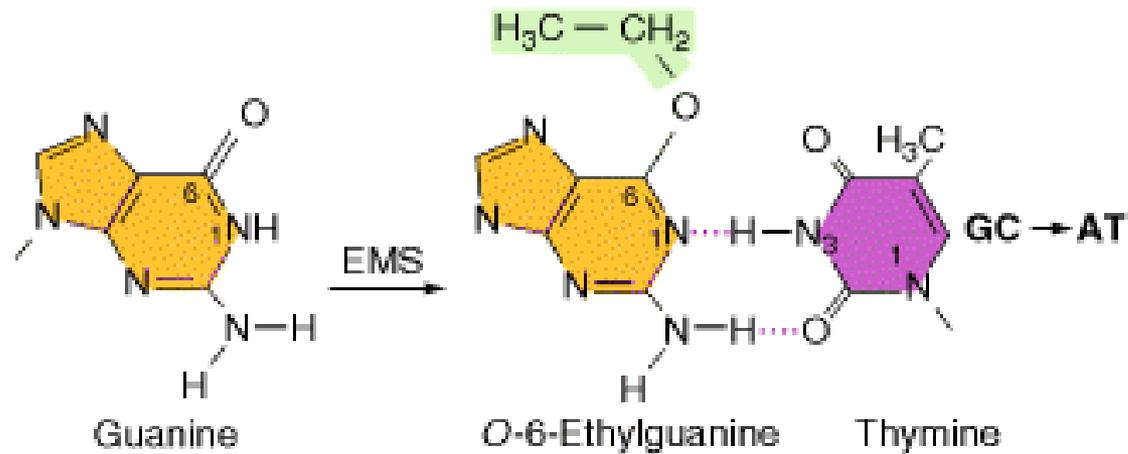
La 8-oxoguanina può indurre una transversion appaiandosi con un'adenina se è in forma syn (trasversione più frequente nei tumori umani)

(A) DNA base pairs



(B) DNA backbone phosphate

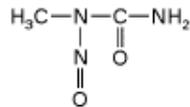
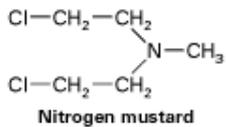
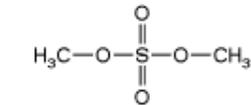
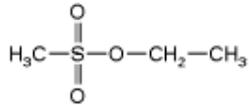
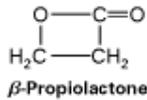




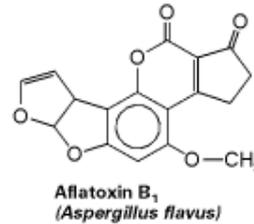
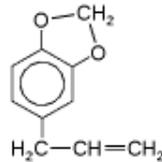
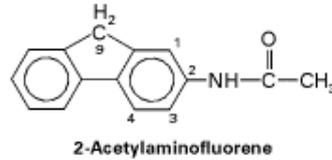
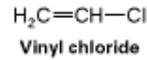
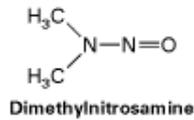
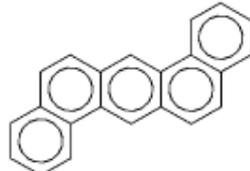
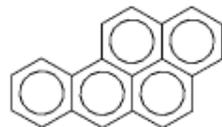
Alkylation-induced mispairing.

The alkylation (in this case, EMS-generated ethylation) of the O-6 position of guanine, as well as the O-4 position of thymine, can lead to direct mispairing with thymine and guanine, respectively, as shown here. In bacteria, where mutations have been analyzed in great detail, the principal mutations detected are G·C to A·T transitions, indicating that the O-6 alkylation of guanine is most relevant to mutagenesis.

DIRECT-ACTING CARCINOGENS

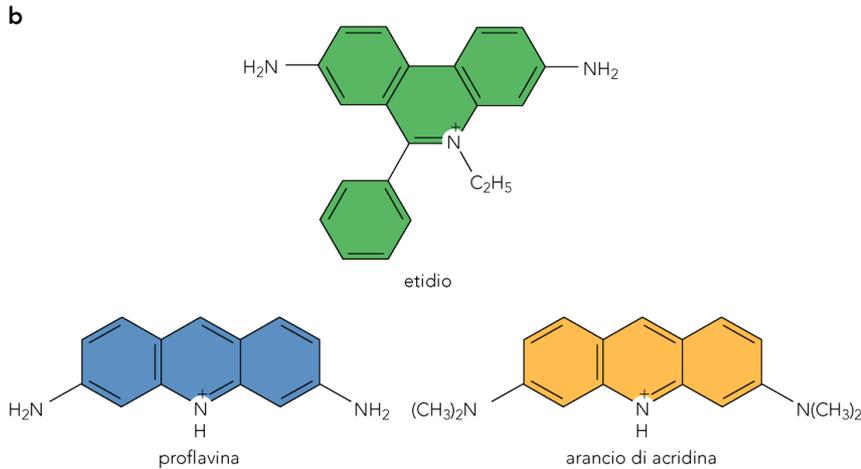
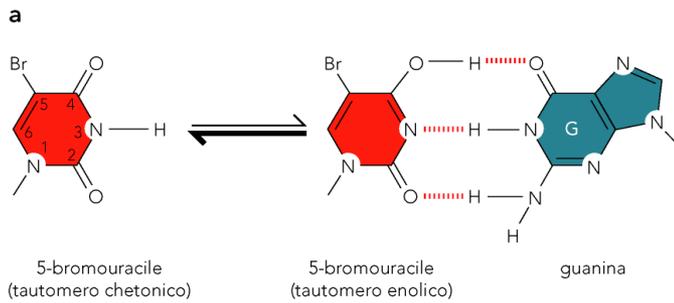


INDIRECT-ACTING CARCINOGENS



BaP tramite ossidrilazione enzimatica diventa un epossido che reagisce con N2 guanina e N6 adenina

La mostarda azotata (mecloretamina) corsslinka due G contigue



Mutazioni causate da analoghi delle basi ed agenti intercalanti

A) Molti analoghi, essendo simili alle basi, sono assunti dalle cellule, convertiti in dNTP e incorporati nel DNA nella replicazione, ma spesso si appaiano in modo incorretto: es. il 5-bromouracile, analogo della T, è uno dei mutageni più potenti, potendosi appaiare in forma enolica alla G.

B) Gli agenti intercalanti, caratterizzati da strutture policicliche possono infilarsi fra 2 bp nella doppia elica. Proflavina, acridina e etidio inducono inserzioni/delezioni di una o più bp alla replicazione.

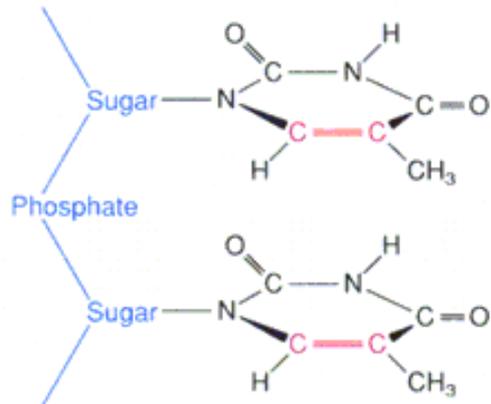
Danni da radiazioni

- Radiazioni ionizzanti: raggi UV, cosmici e elementi radioattivi

Raggi UV (200-400 nm): dimeri di T o C generano anello ciclobutanico (C5-C6) e fotoprodotto 6-4 (C6-C4).

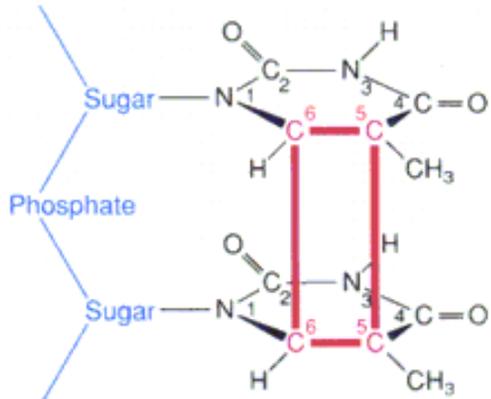
Raggi X e γ generano specie reattive dell'ossigeno e generano rotture sul singolo o doppio filamento

Formazione di dimeri di pirimidine per azione di raggi UV (220-300 nm)

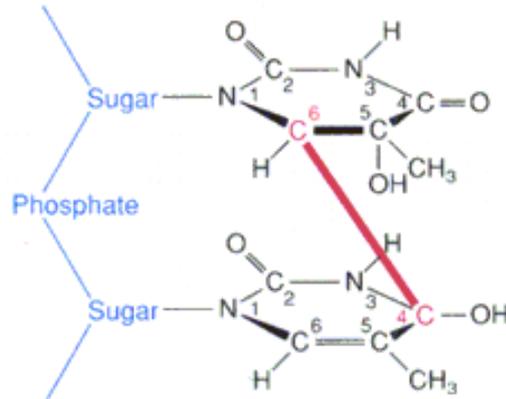


Adjacent thymine residues

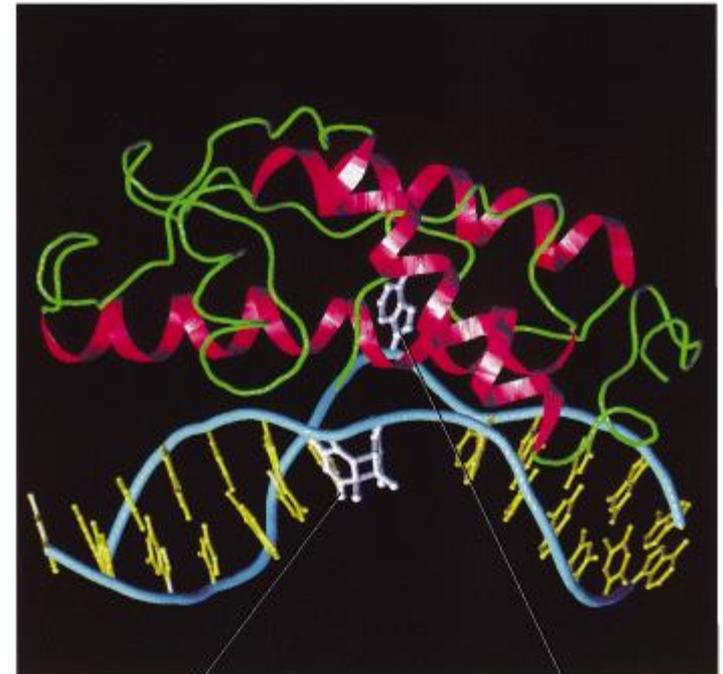
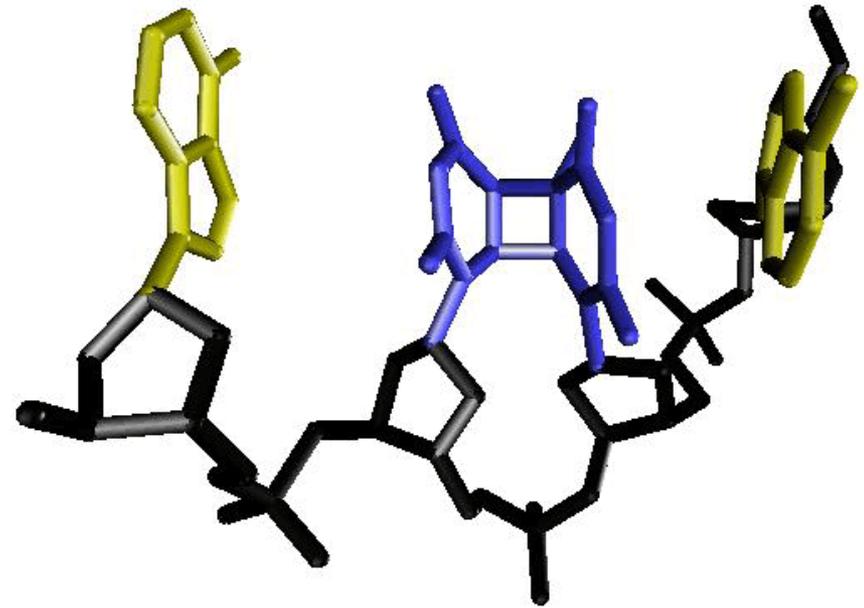
UV light



(a) Cyclobutane thymine dimer

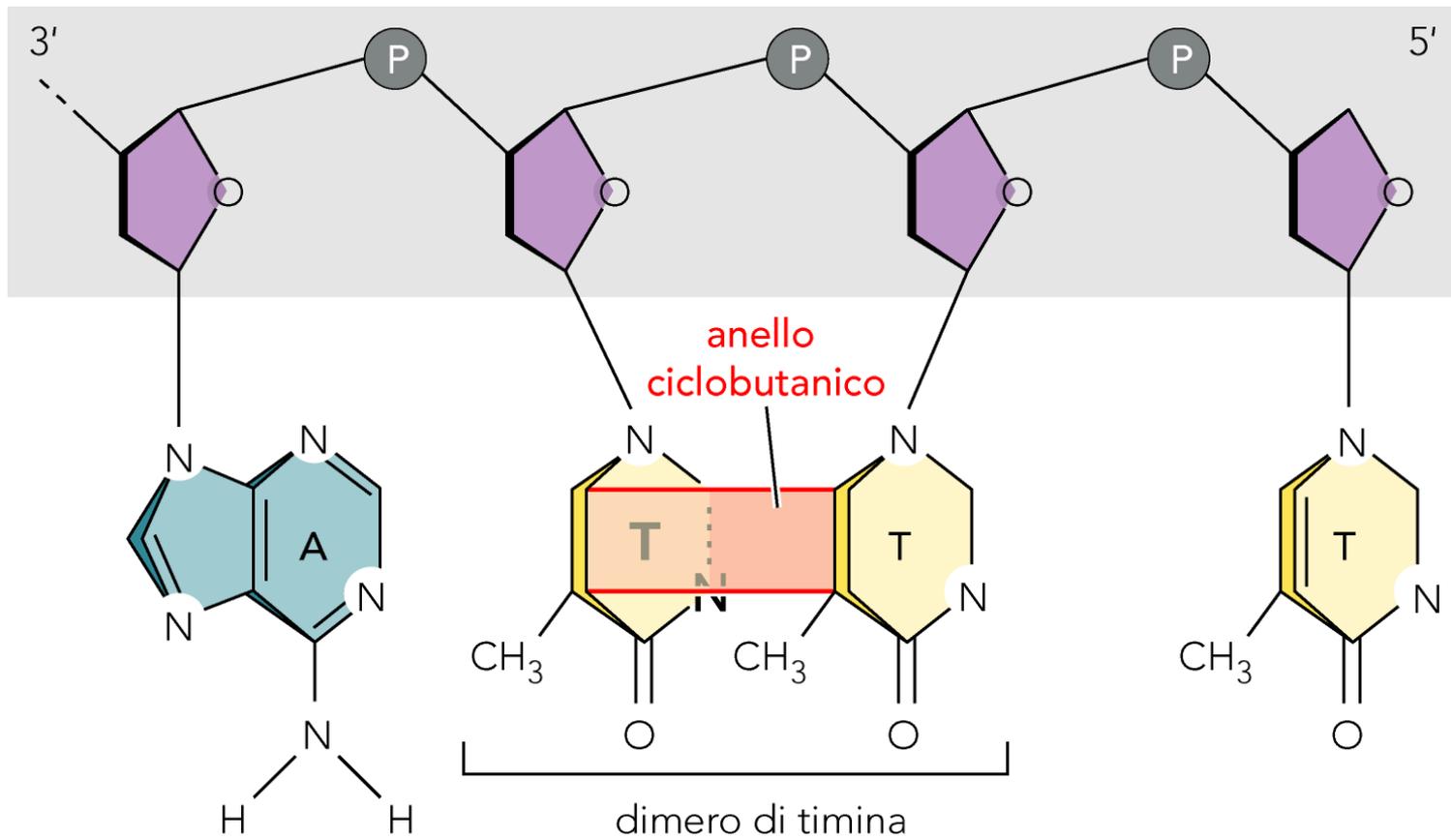


(b) 6-4 photoproduct



Thymine-thymine dimer

Adenine



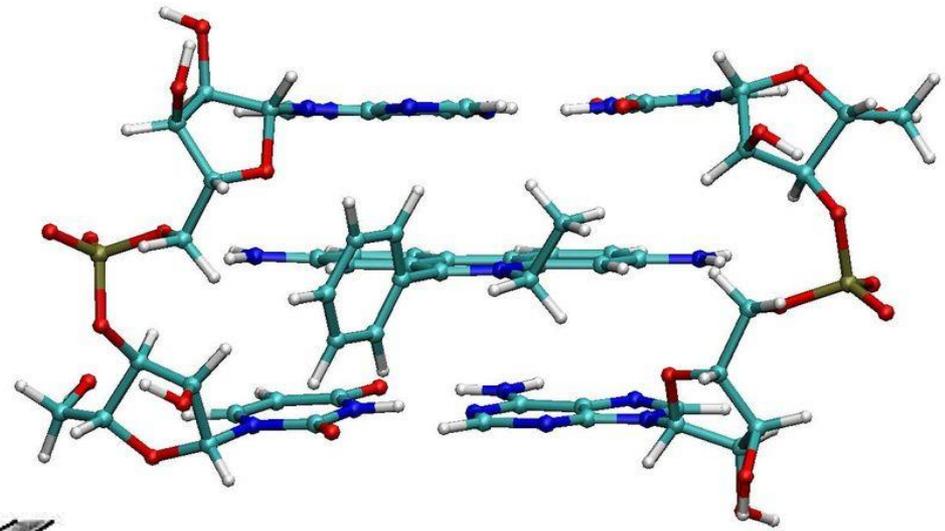
Radiazioni UV e ionizzanti

I raggi UV inducono fusione fotochimica di 2 pirimidine adiacenti (formazione di anello ciclobutilico). I dimeri di T sono incapaci di legarsi a H con le basi complementari e bloccano la replicazione.

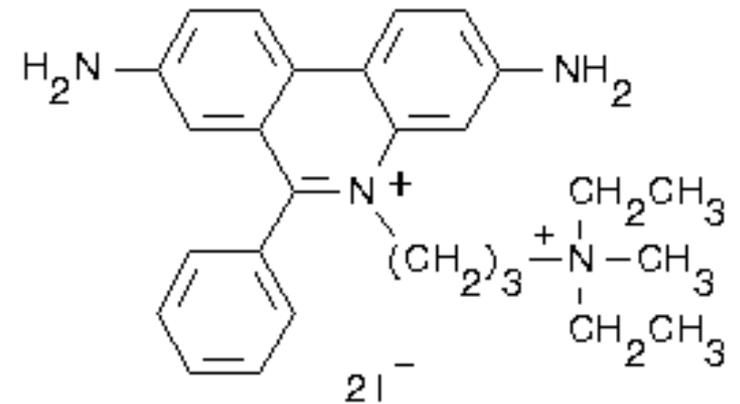
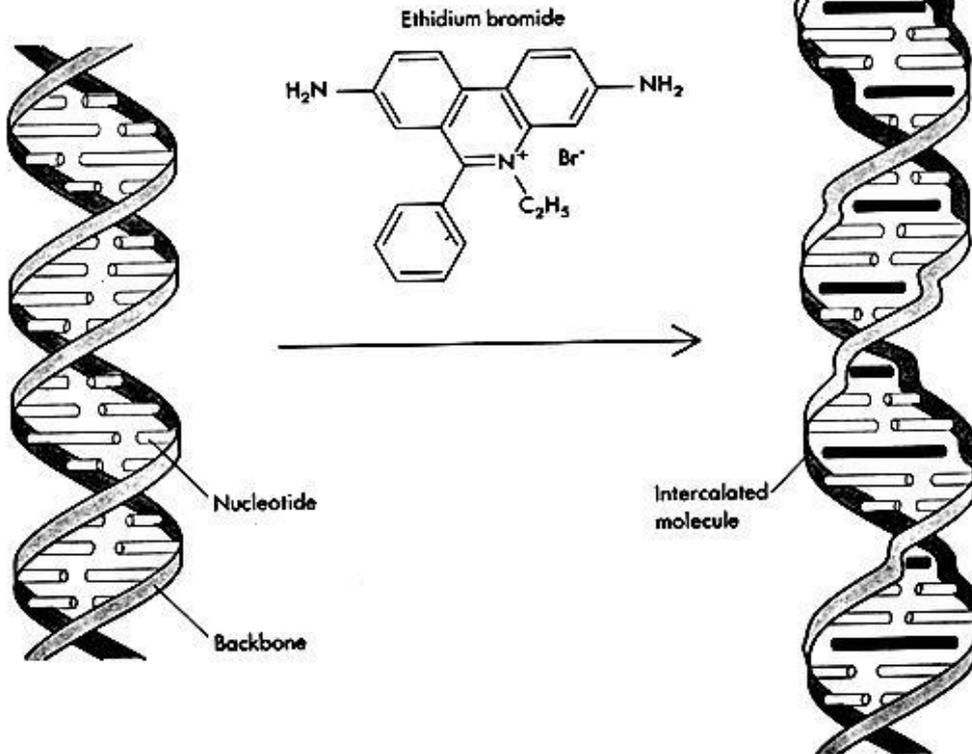
Le radiazioni ionizzanti (raggi x e γ) possono provocare: a) rotture a doppio filamento, molto difficili da riparare, b) ionizzare il d-ribosio, c) creare specie reattive dell'ossigeno.

Paradossalmente sia le radiazioni ionizzanti che le sostanze che rompono il DNA, come bleomicina (clastogeni), sono utilizzate nella terapia antitumorale perché impediscono la proliferazione.

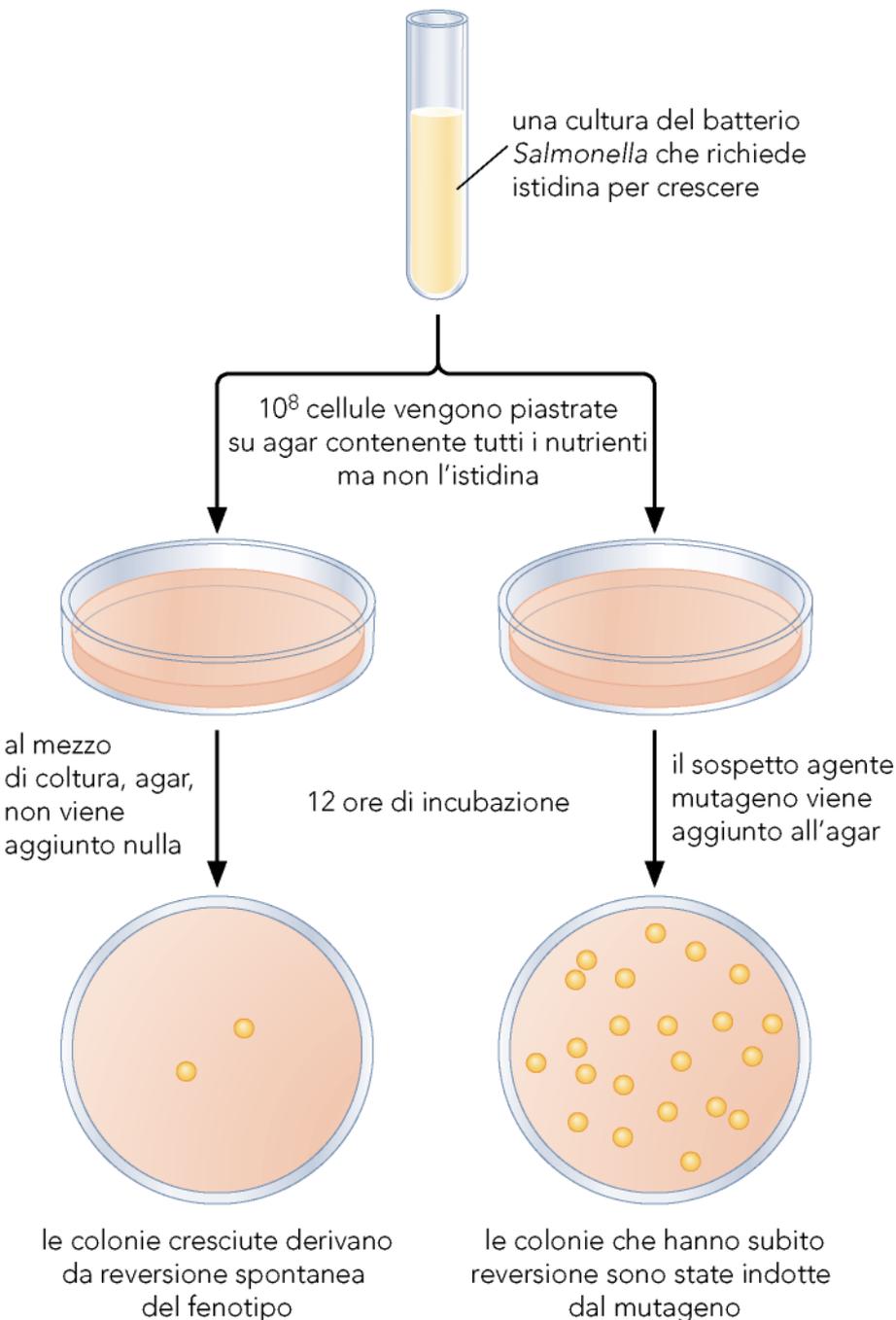
DNA intercalating agents



Intercalated ethidium

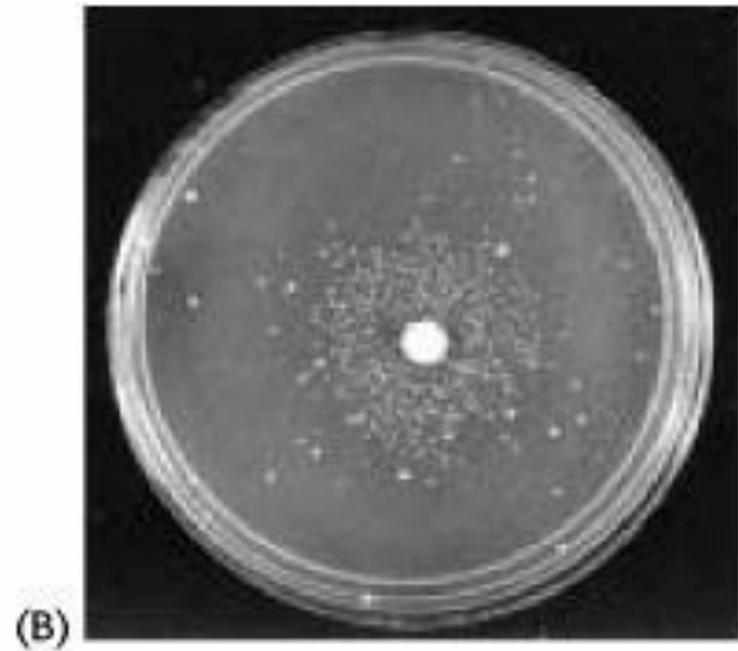
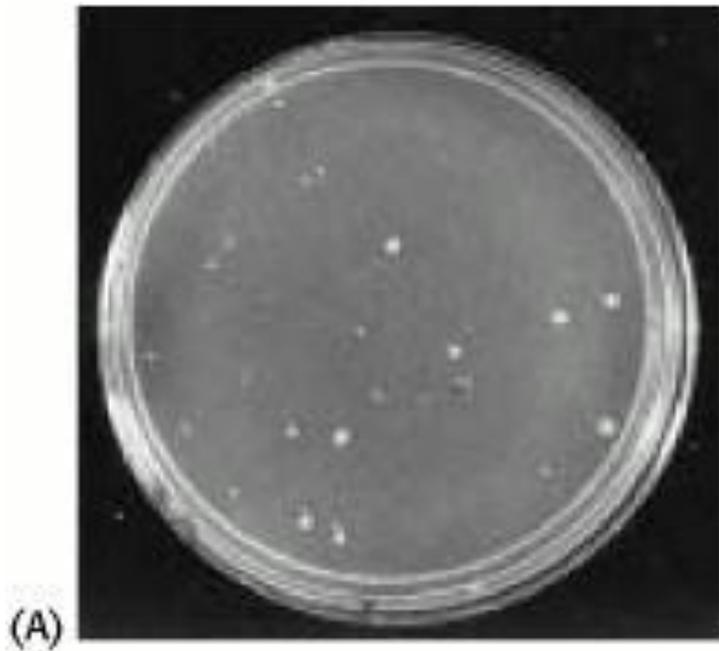


Propidium



Test di Ames

Serve per stabilire la mutagenicità (e quindi potenziale cancerogenicità) di una sostanza. Viene utilizzato un particolare ceppo mutante (auxotrofo) di *Salmonella typhimurium*, che richiede istidina per crescere. In presenza di una sostanza mutagena, alcune cellule recuperano la capacità di crescere anche in assenza dell'amminoacido, per reversione della mutazione originale. Più è potente il mutageno, maggiore è il numero di colonie. Alcune sostanze diventano cancerogene solo dopo essere passate dal fegato, pertanto nel test di Ames vengono prima trattate con un estratto epatico, prima di essere saggiate negli animali.



Test di mutagenicità di Ames:

A) controllo: sporadici cloni retromutanti “spontanei”

B) test: nel centro del piatto è stata posta una quantità della sostanza mutagenica che diffondendo ha provocato numerosi cloni retromutanti

Il DNA è l'unica molecola che viene riparata

A livello evolutivo i sistemi di riparo possono essere divisi in tre categorie:

- Riparo diretto del danno
- Riparo per escissione della lesione e/o di segmenti contigui
- Riparo per ricombinazione

RISPOSTA CELLULARE AL DANNO AL DNA

- ❑ Aggiramento del danno.
- ❑ Inversione del danno.
- ❑ Rimozione del danno.

Riparo del DNA

Il danno al DNA può avere due conseguenze:

- 1) Impedire la replicazione e la trascrizione (dimeri, nick e rotture scheletro);
- 2) Errori di appaiamento (basi modificate, fissate poi per replicazione); ad es. la deaminazione $C \rightarrow U$ crea il mismatch $U:G$, che alla replicazione induce la transizione $C:G \rightarrow T:A$ su uno dei cromosomi.

Le cellule hanno evoluto meccanismi di riparo, per impedire tali effetti e permettere la loro sopravvivenza.

I meccanismi di riparo del DNA sono : 1) INVERSIONE DELLA REAZIONE CHIMICA; 2) ESCISSIONE DI BASI; 3) ESCISSIONE DI NUCLEOTIDI; 4) RICOMBINAZIONE OMOLOGA o NON OMOLOGA.

I principali sistemi di riparo agiscono per:

- 1) Fotoriattivazione e Glicosilazione (riparo diretto)
- 2) Riparo di Mismatch
- 3) Riparo di rotture a doppio filamento
- 4) Sintesi translesione.

Sistemi di riparazione

- Riparazione di mismatch
- Correzione diretta
- Escissione di basi (specifica)
- Escissione di nucleotidi
- Ricombinazione omologa e non omologa (uomo)

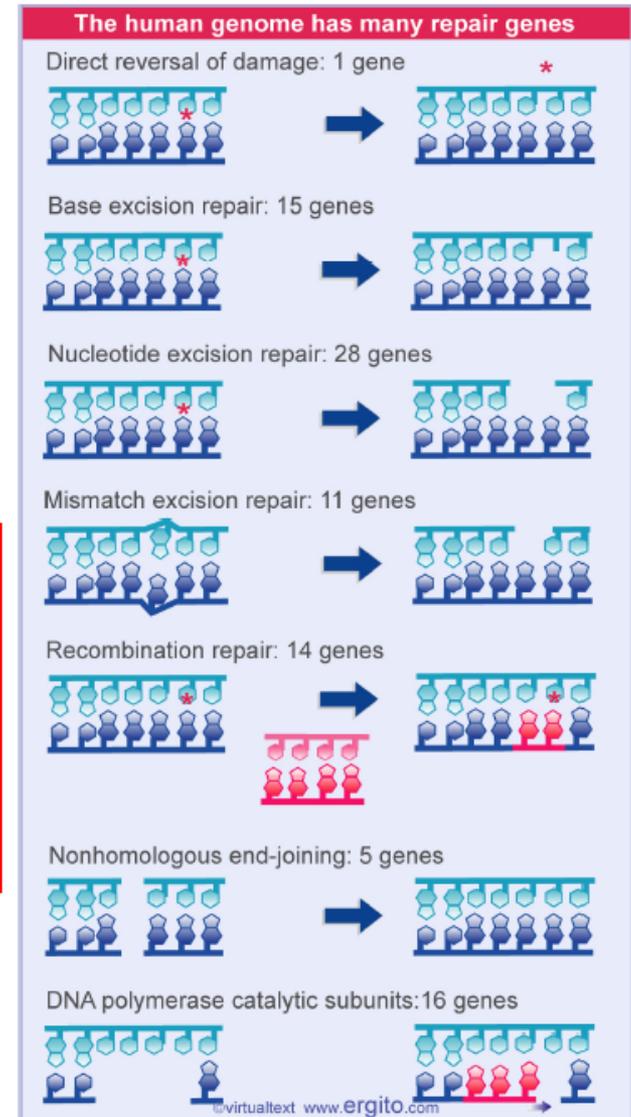
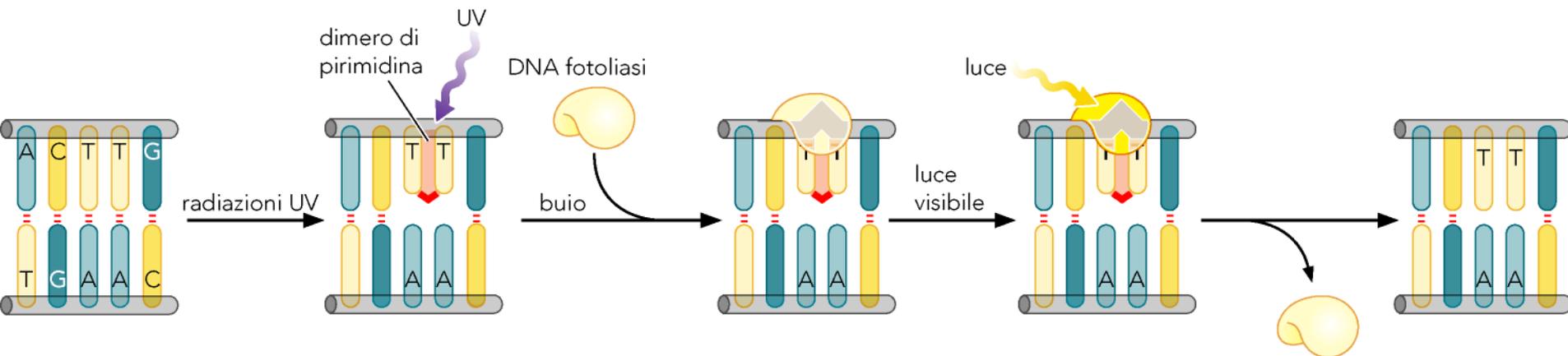


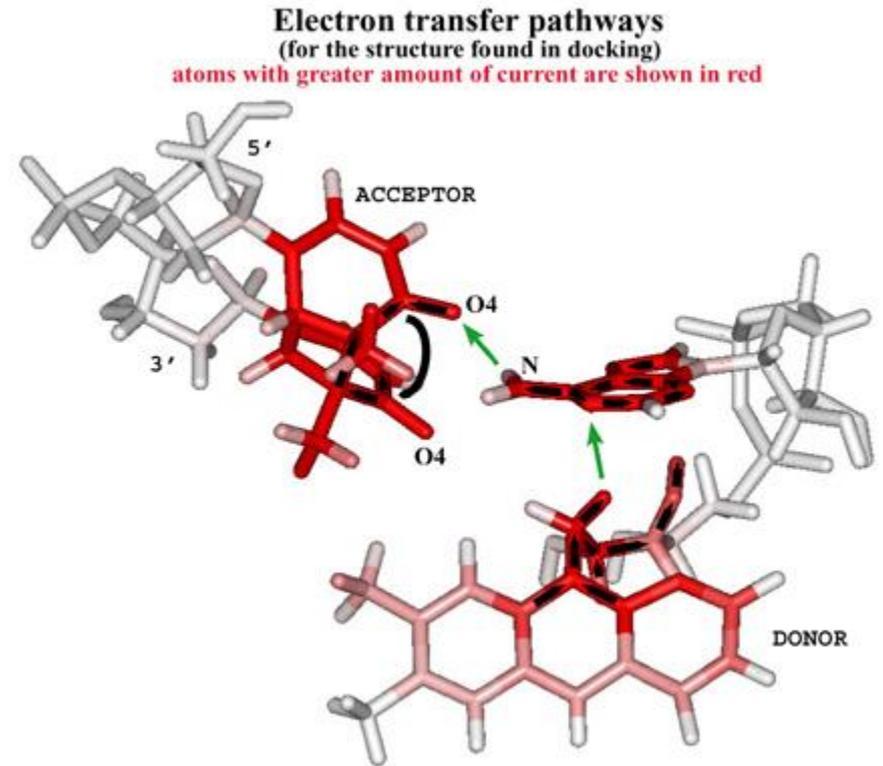
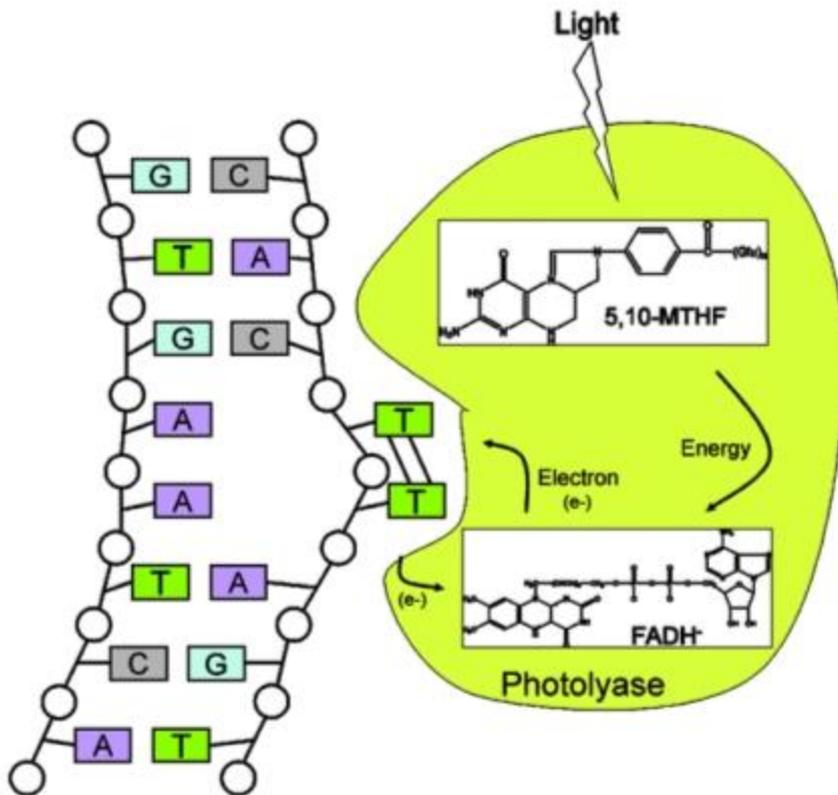
Figure 15.37 Repair genes can be classified into pathways that use different mechanisms to reverse or bypass damage to DNA.

Fotoriattivazione

- La DNA fotoliasi è attivata dalla luce e rompe i legami covalenti che uniscono le pirimidine



Un esempio di riparo diretto: la fotoliasi batterica, attivata dalla luce UV-A separa direttamente i dimeri di pirimidine utilizzando il metilene-tetraidrofolato (MTHF) e il flavin-adenin-dinucleotide (FAD) come cofattori



Il mismatch repair

- MMR si prende cura degli errori che sono stati commessi durante la replicazione (errori commessi dalle polimerasi e non riparati con proof-reading) o che sono indotti da ricombinazione, deaminazione o altre forme di danno che generano appaiamenti non corretti (può riparare anche alcuni slittamenti)

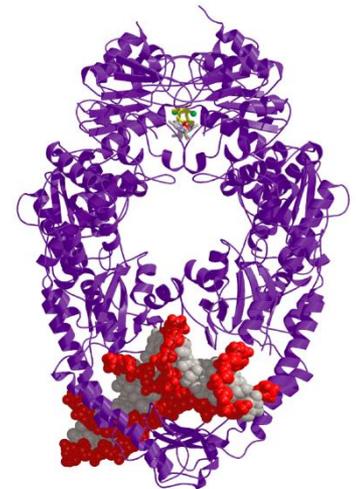
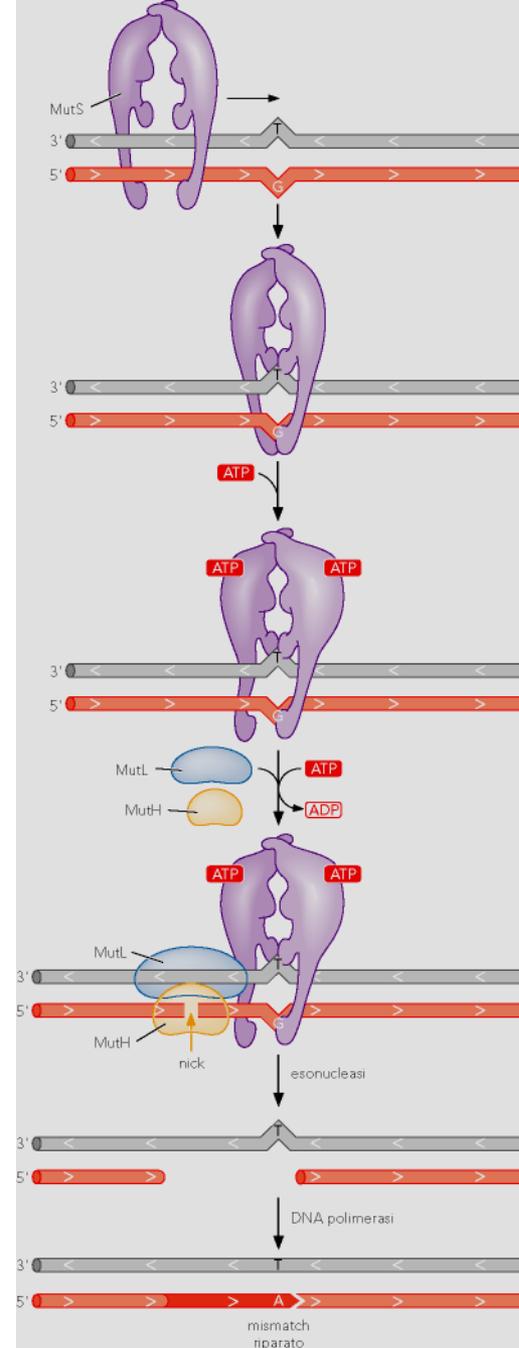
Riparazione del mismatch

Mismatch repair è parte della replicazione (almeno 12 proteine coinvolte).

In *E. coli* il DNA viene analizzato per distorsioni da **Mut S (un dimero)**, lo distorce ulteriormente

Recluta **Mut L**, che recluta **Mut H** che taglia il filamento vicino al mismatch

Poi intervengono: **elicasi**, **esonucleasi**, DNA Pol (III) e ligasi.

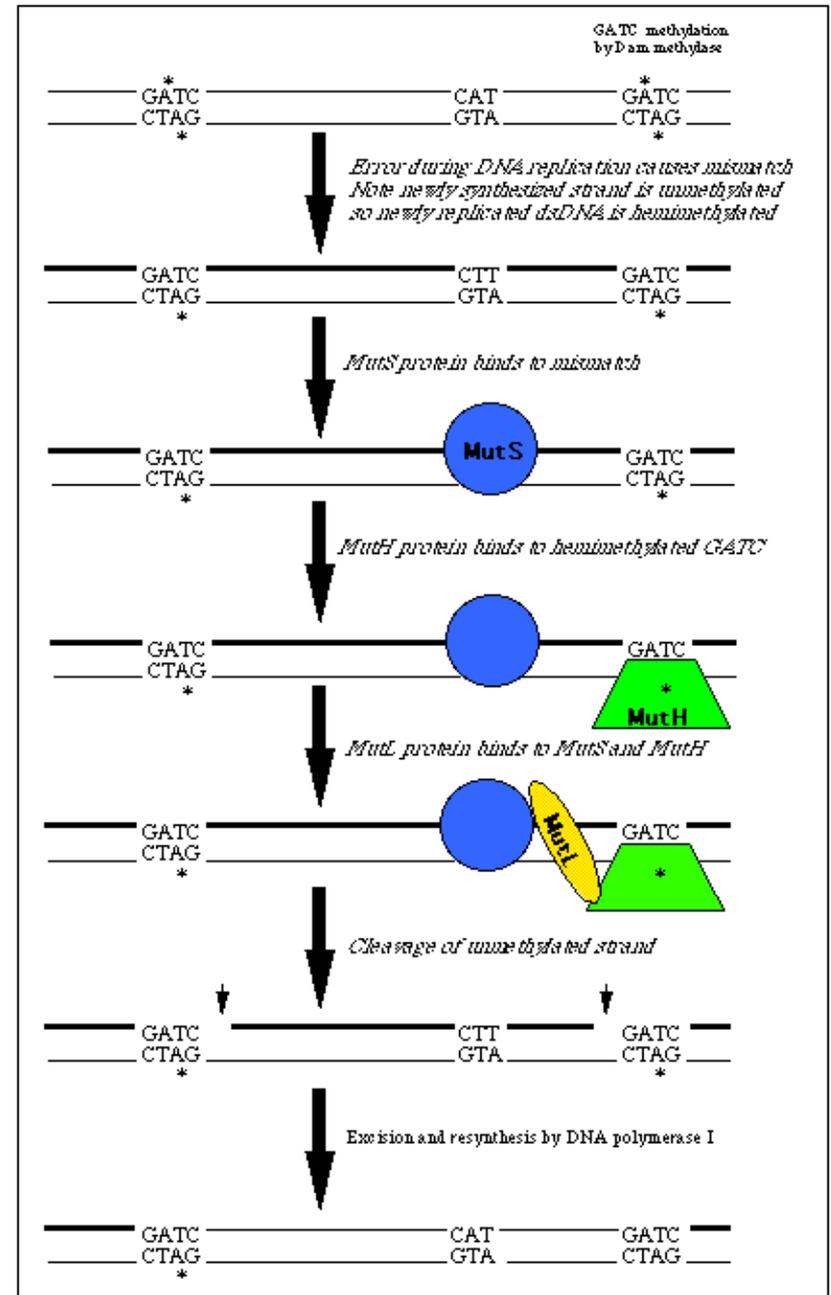
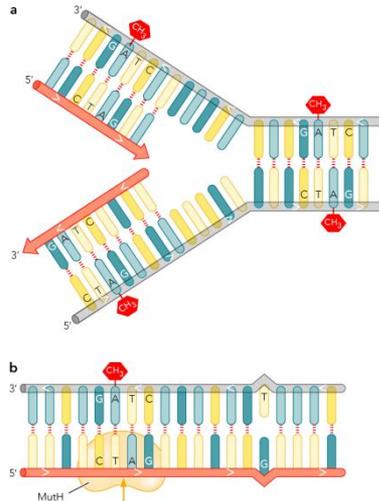


Mismatch repair in *E. coli*

Come fa a identificare il filamento nuovo su cui operare il taglio ed escissione?

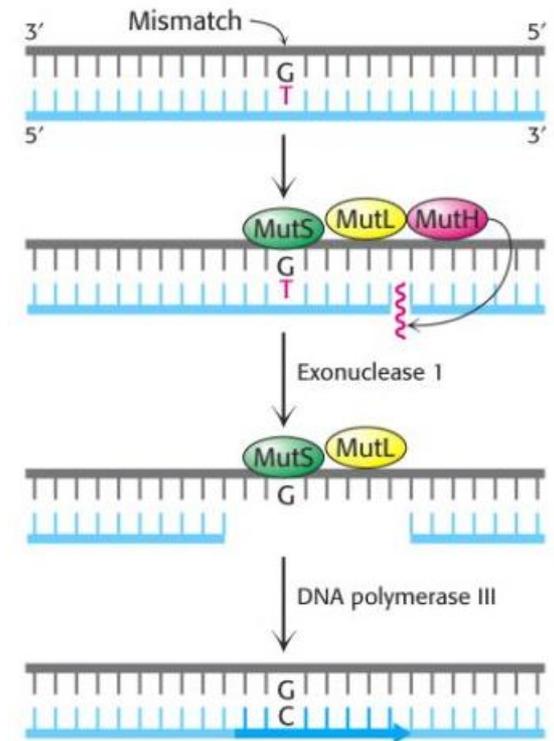
Dalla **metilazione della A** nella sequenza CTAG ad opera della **Dam metilasi**

MutS si lega al filamento non metilato



Mismatch repair in Eucarioti

- Gli eucarioti hanno omologhi di Mut(s) con più alta specificità (per mismatch, indels etc)
- Non hanno Dam Metilasi, riconoscono il filamento stampo dalle incisioni dei frammenti di Okasaki. Sono associate al sliding clamp
- Mutazioni dei geni predispongono ai tumori



Base flipping

l'uracile e la basi alchilate sono riconosciute dalle glicosilasi e tolte direttamente dal DNA.

I dimeri delle pirimidine sono tolti rompendo i legami covalenti tra di loro.

Le *metilasi* aggiungono un gruppo metile alle citosine

Tutti questi tipi di enzimi agiscono girando la base fuori dalla doppia elica dove può essere eliminata o modificata e riportata nella alfa elica

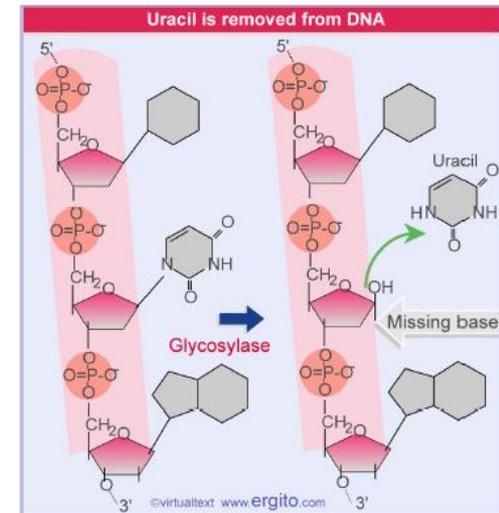


Figure 15.41 A glycosylase removes a base from DNA by cleaving the bond to the deoxyribose.

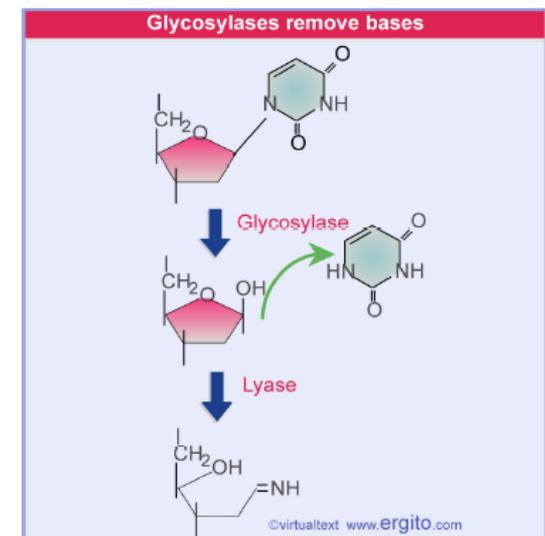
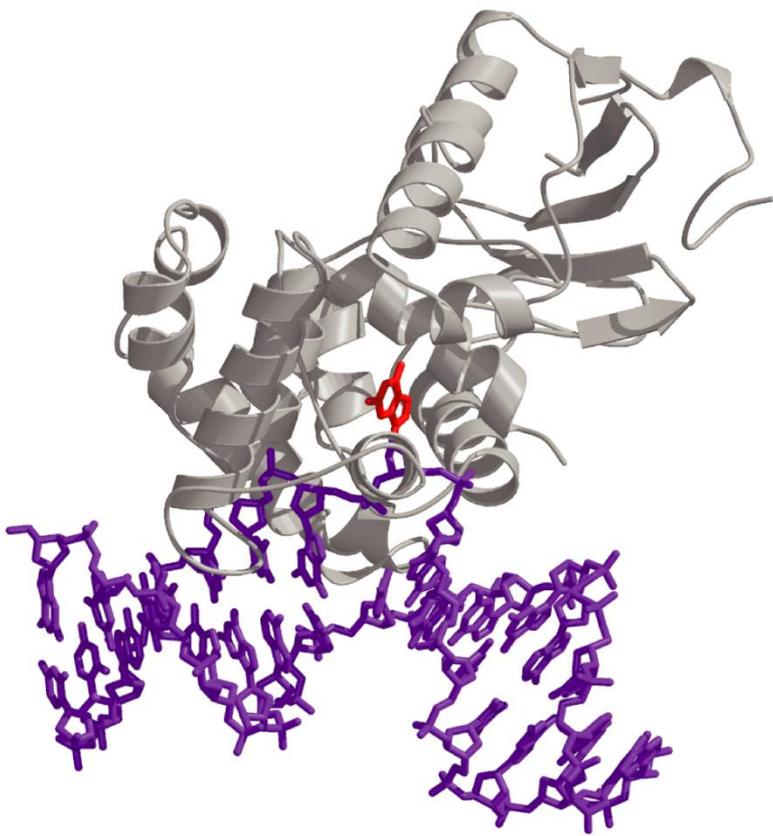
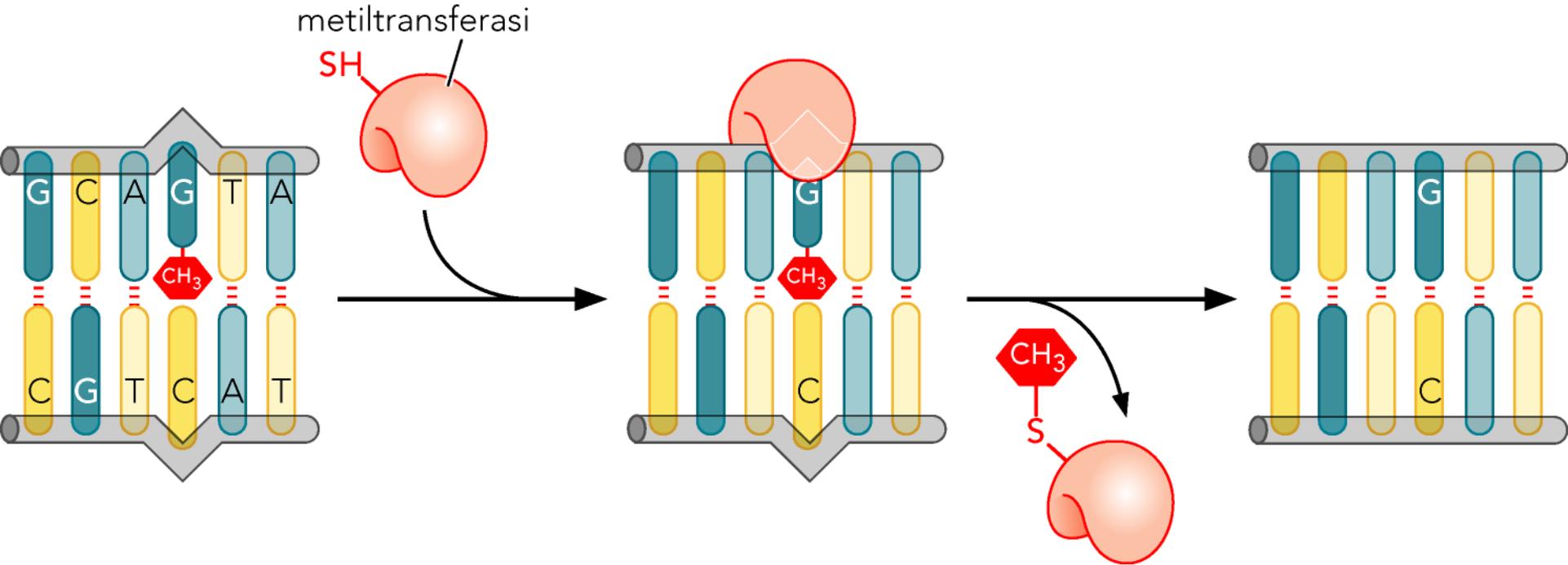


Figure 15.42 A glycosylase hydrolyzes the bond between base and deoxyribose (using H_2O), but a lyase takes the reaction further by opening the sugar ring (using NH_2).



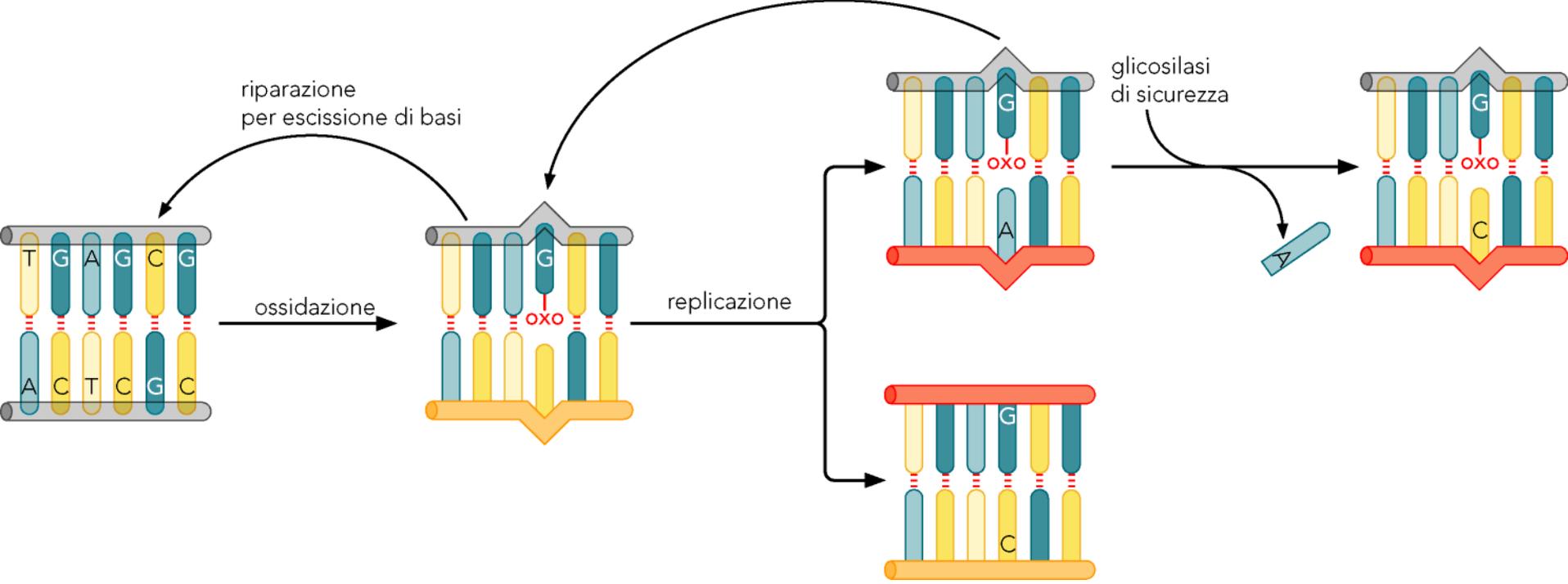
Struttura del complesso DNA-glicosilasi

Una base lesionata viene riconosciuta grazie al fatto che può ribaltarsi all'esterno della doppia elica e quindi essere accomodata in un tasca dell'enzima.



Demetilazione della G

Anche questo è un sistema di riparo diretto: la rimozione del gruppo metile dall'O6 della G è catalizzata da una metil-transferasi, con trasferimento su un residuo di Cys e inattivazione (sistema dispendioso).



Riparo di oxoG:A

Una base danneggiata, che non viene rimossa prima della replicazione, non porta necessariamente a mutazione. Nel caso della oxoG esiste una glicosilasi di sicurezza, che riconosce il mismatch oxoG:A, elimina A, anche se questa è una base normale del DNA, e la sostituisce con C senza rimuovere il danno.

Un'altra glicosilasi di sicurezza è quella che rimuove T dai mismatch G:T, derivanti dalla deaminazione di 5Me-C, assumendo "per default" che T sia la base sbagliata.

Meccanismo di escissione delle basi

(A) BASE EXCISION REPAIR

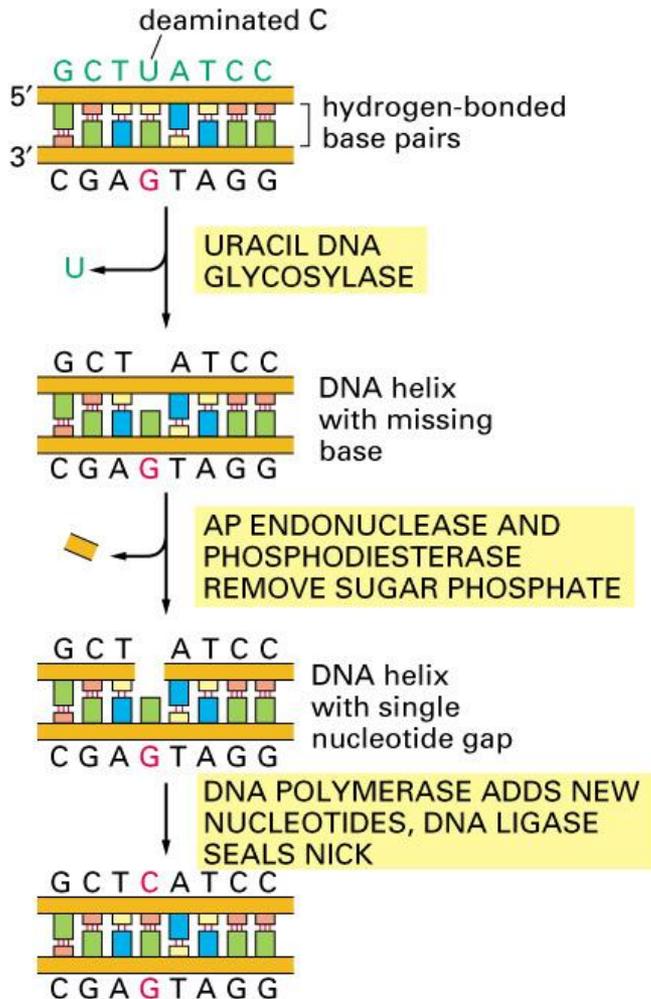


Figure 5-50 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Riconoscimento da base-flipping

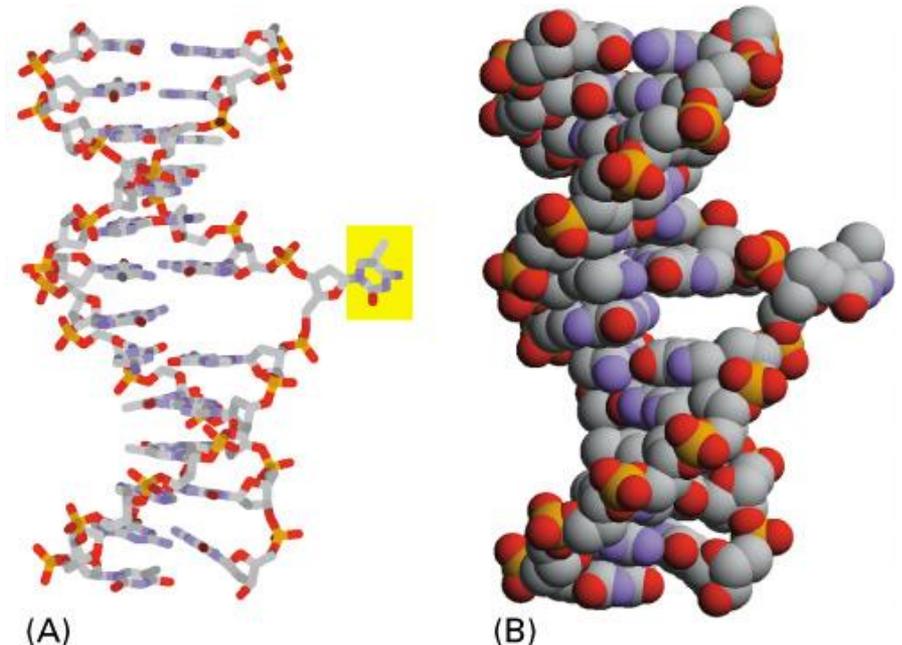


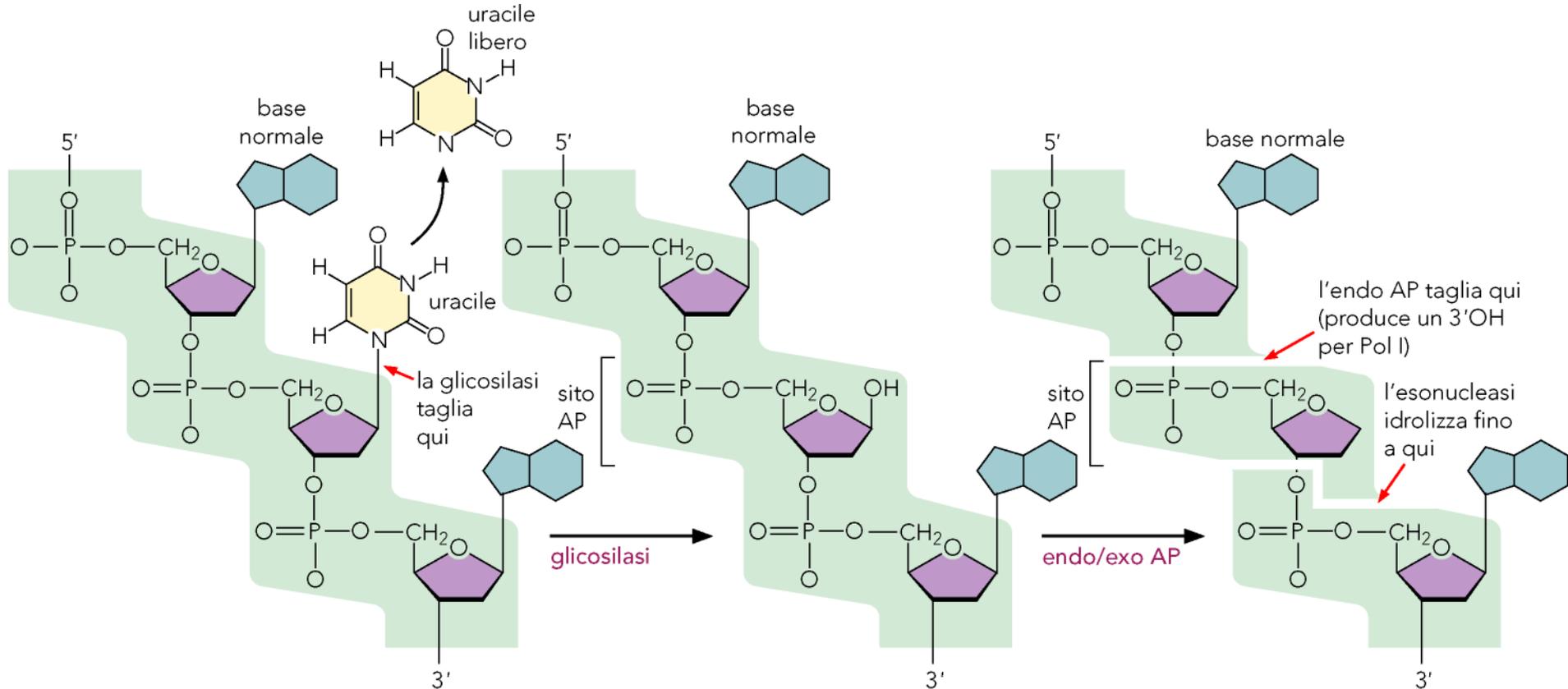
Figure 5-51. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Escissione delle basi

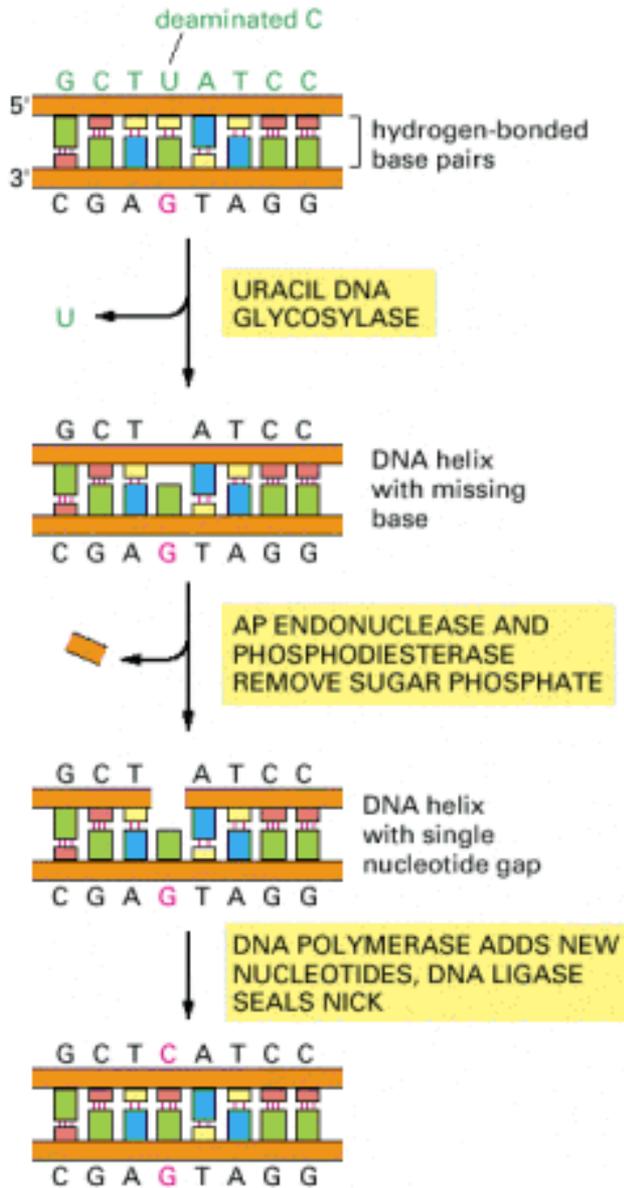
E' il meccanismo più comune di riparo delle basi danneggiate. Ne esistono due tipi: il primo usa le **glicosilasi**, enzimi che riconoscono e rimuovono le basi danneggiate per scissione del legame glicosidico, rimozione del deossiribosio da parte una AP endonucleasi e ricostruzione del DNA da DNA Pol + ligasi.

Le glicosilasi sono enzimi che riconoscono lesioni specifiche, ad es. una riconosce l'U formato dalla deaminazione di C, un'altra la oxoG formatasi per ossidazione di G, ecc.

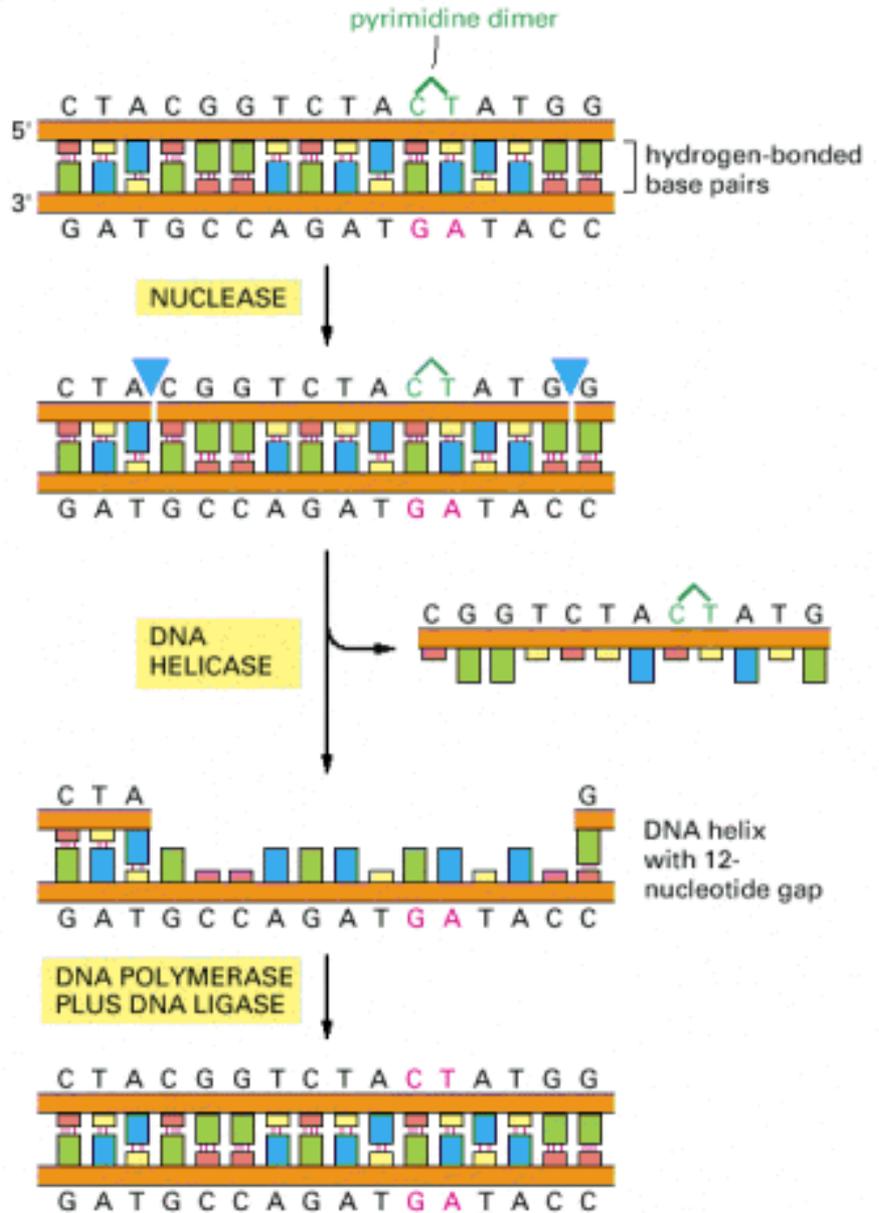
Nei nuclei delle cellule di mammifero ne sono state identificate 8. Agiscono scorrendo lungo il genoma.



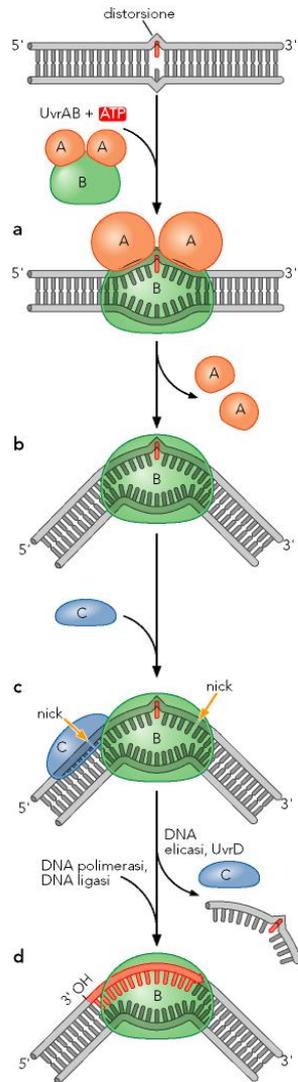
(A) BASE EXCISION REPAIR



(B) NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

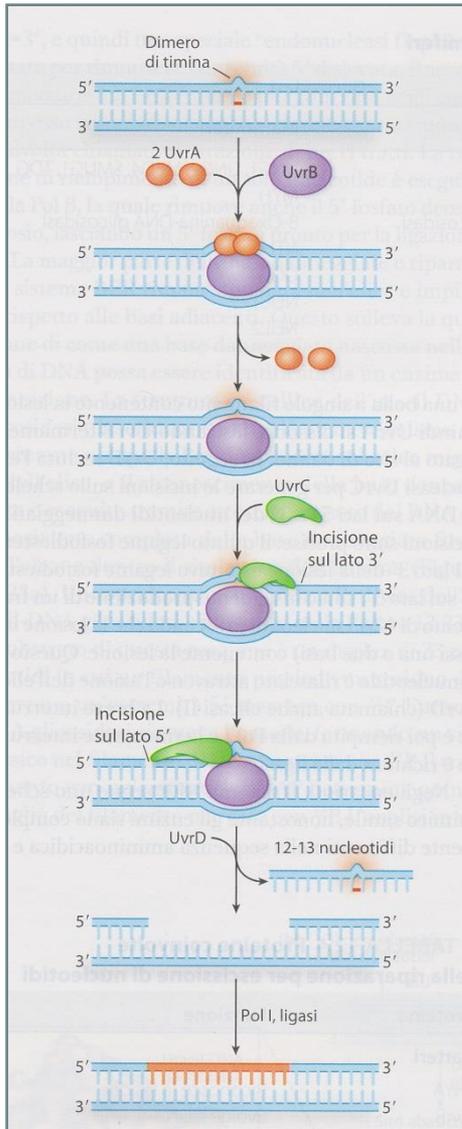


Sistema di riparo per escissione di nucleotidi

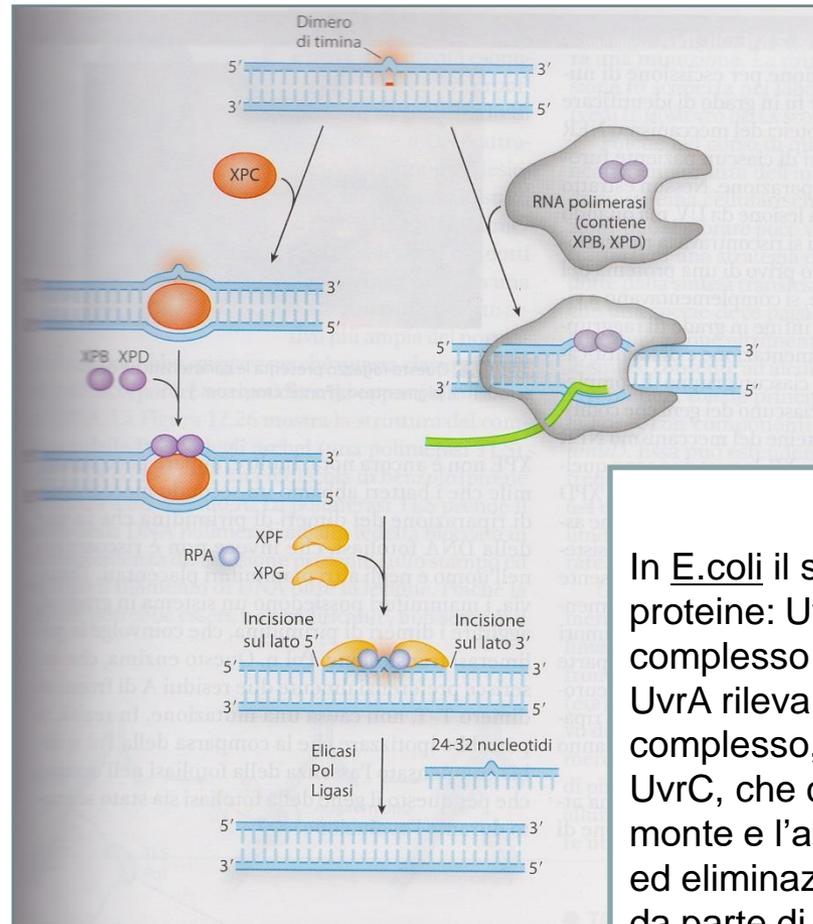


Gli enzimi di questo sistema di riparo non riconoscono le lesioni come tali, ma le conseguenti distorsioni della doppia elica, con rimozione di un corto segmento di DNA a cavallo della lesione.

Procarioti



Eucarioti



In E.coli il sistema è composto da 4 proteine: UvrA, UvrB, UvrC, UvrD. Il complesso AB scorre lungo il DNA, finché UvrA rileva un danno, poi lascia il complesso, UvrB apre il DNA e recluta UvrC, che crea 2 incisioni, una 8 basi a monte e l'altra 4-5 basi a valle della lesione, ed eliminazione del frammento di 12-13 basi da parte di UvrD (elicasi). Infine DNA Pol + ligasi riempiono il buco.

Negli eucarioti il macchinario è molto più complesso (oltre 25 proteine) ma il meccanismo è simile.

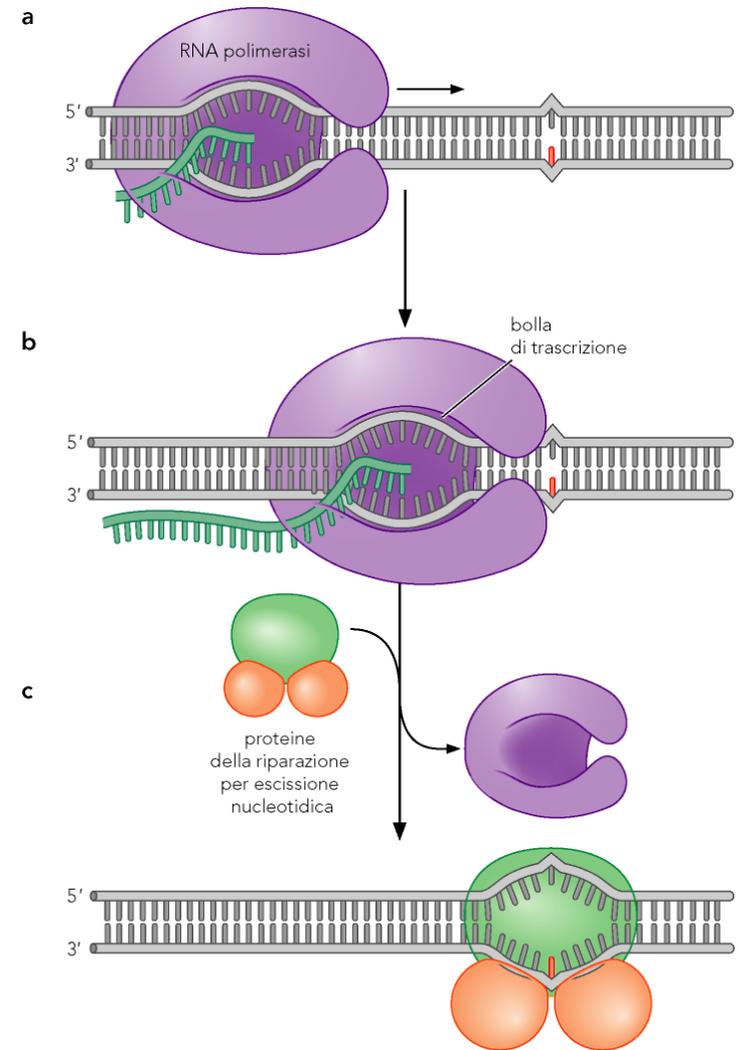
● **TABELLA 12.4 Proteine coinvolte nella riparazione per escissione di nucleotidi**

Proteina	Funzione
Batteri	
UvrA	Riconosce la lesione
UvrB	Svolge il DNA
UvrC	Excinucleasi
UvrD	Elicasi
Pol I	Riempie l'interruzione
DNA ligasi	Richiude il DNA
Eucarioti	
XPC	Riconosce la lesione
RNA polimerasi	Riconosce la lesione: TCR
XPA	Accerta la lesione
XPB	Svolge il DNA (subunità TFIIID)
XPD	Svolge il DNA (subunità TFIIID)
XPF	5' excinucleasi
XPG	3' excinucleasi
RPA	Stabilizza la bolla
Pol δ o ϵ , RFC, PCNA	Riempie l'interruzione
Ligasi I o IV	Richiude il DNA

Nell'uomo lo Xeroderma pigmentoso è una grave malattia genetica, conseguente all'elevata sensibilità ai raggi UV solari, che provoca gravi lesioni cutanee, inclusi tumori della pelle, dovuta a mutazioni in uno dei 7 geni XP che codificano una di queste proteine.

Trascrizione accoppiata alla riparazione del DNA.

- Quando la RNA polimerasi trova un mismatch, si ferma.
- Recluta il **sistema di riparazione per scissione nucleotidica** e si distacca.
- Al sistema partecipa FTIIH che fa parte del fattore generale di trascrizione
- **XPG** eucariotica taglia un frammento di 24-32 nt



Meccanismi di tolleranza al danno

Sintesi translesione

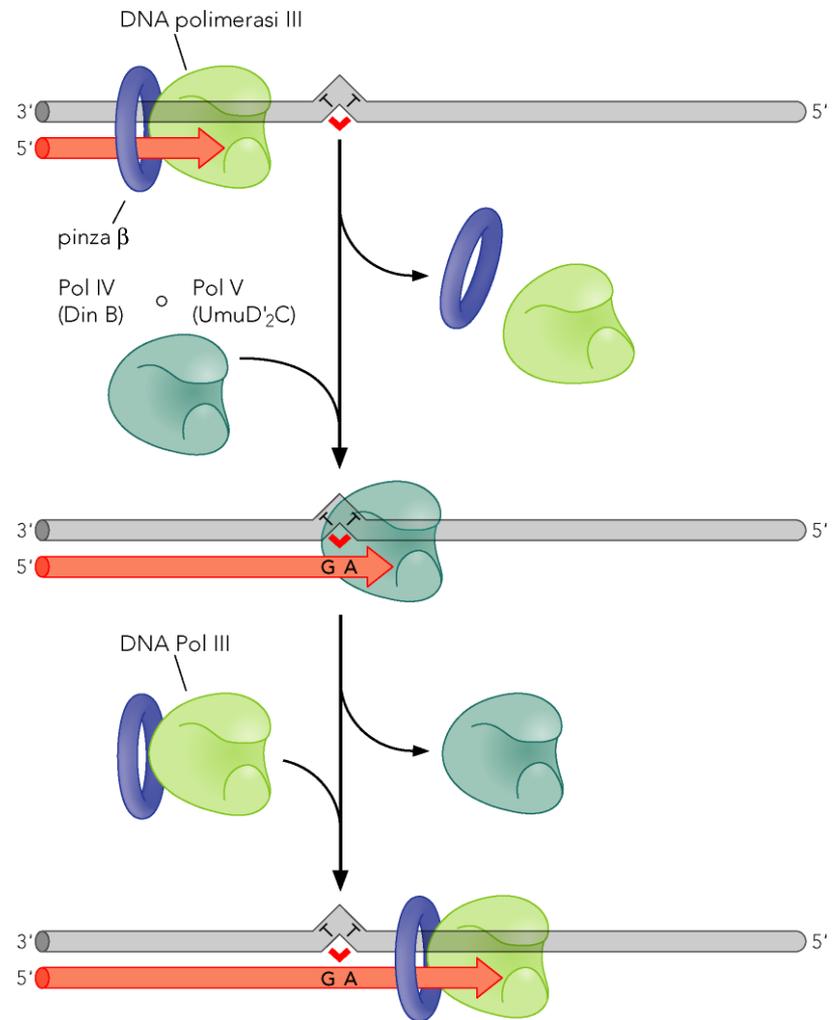
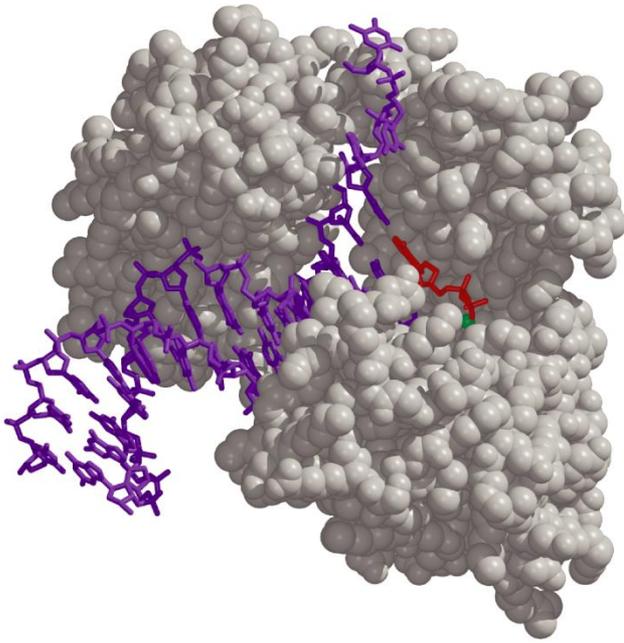
Riparo per ricombinazione omologa o non omologa

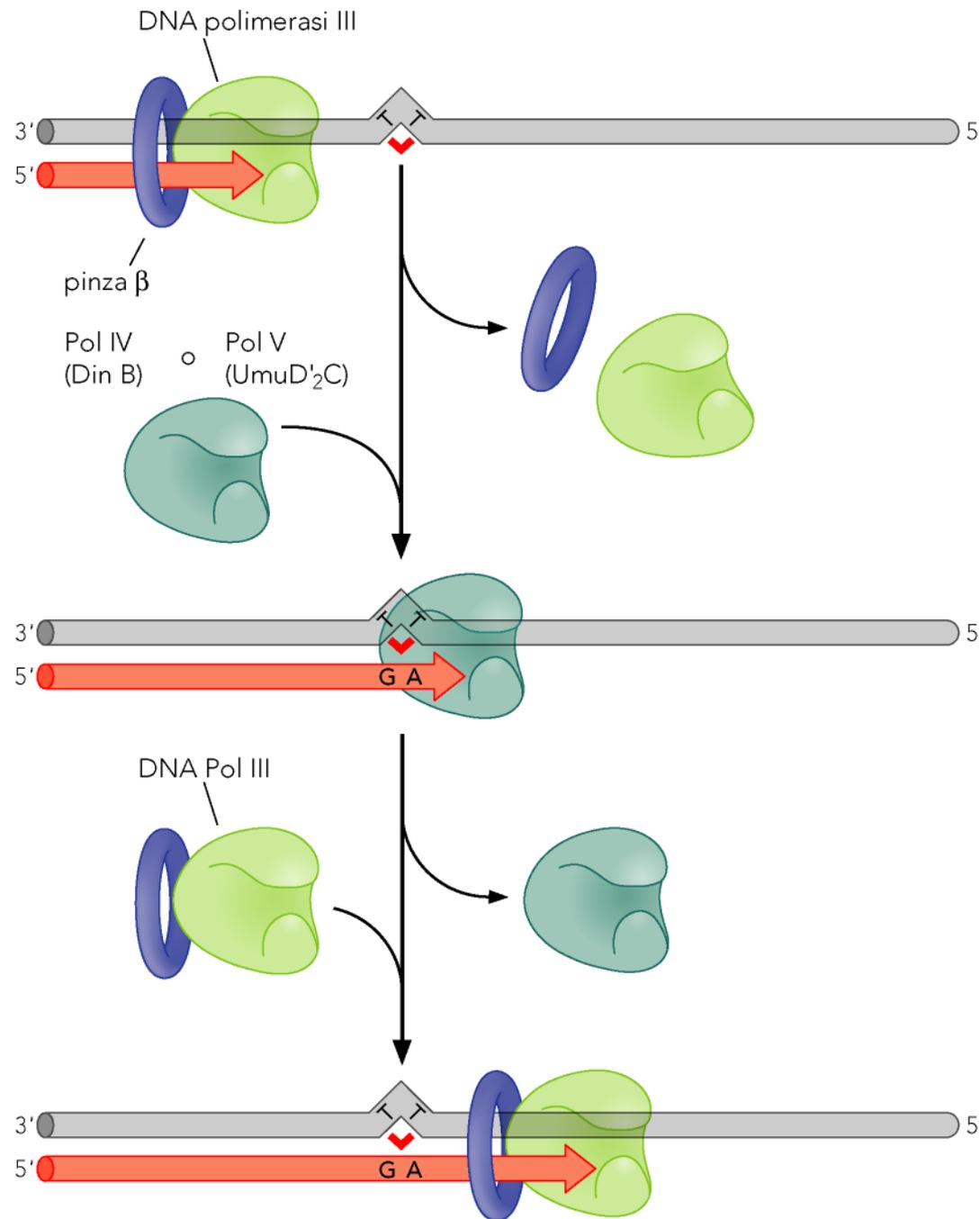
Sintesi translesione

La replicazione del DNA si blocca se trova una lesione. La Pol III si distacca e al suo posto entra

- La DNA pol translesione (**Pol IV o Pol V**).
- Copia il DNA con poca fedeltà, e poi si stacca per far posto alla Pol III.
- In *E. coli* queste polimerasi sono indotte dalla risposta SOS

Sintesi del DNA translesione

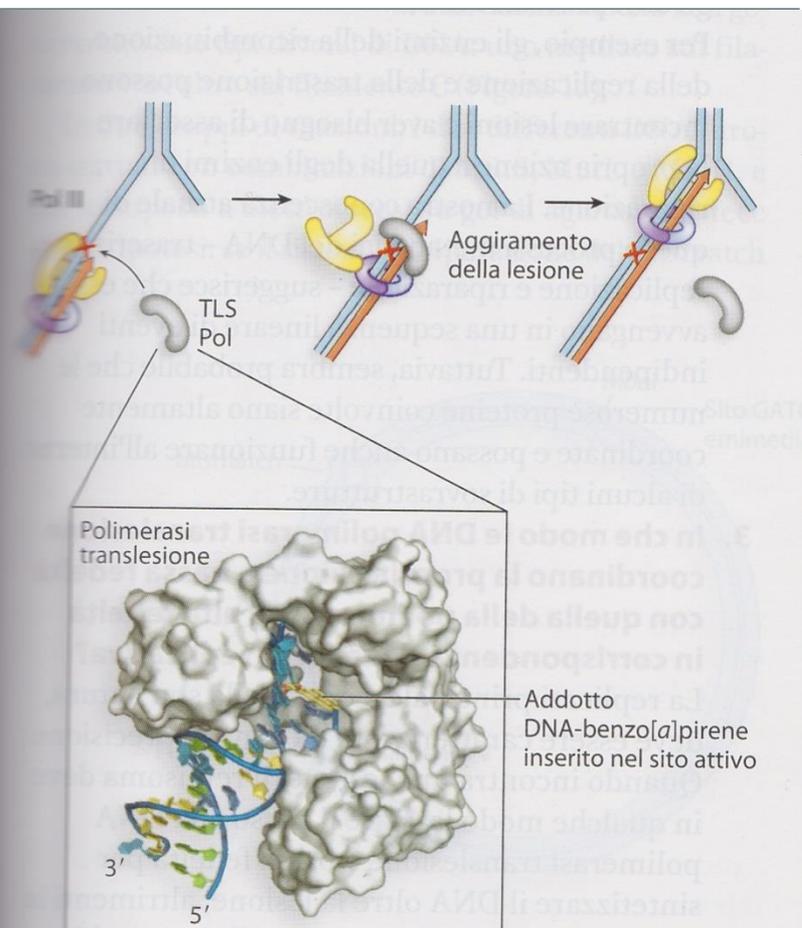




Sintesi translesione del DNA

È un sistema di sicurezza, che entra in azione quando certe lesioni, che bloccherebbero la replicazione (come dimeri di T, siti apurinici, ecc.), non sono state corrette dagli altri sistemi di riparo. Sebbene poco accurato, permette alla cellula di portare a termine la replicazione del cromosoma. È dovuto all'attività di particolari DNA Pol, appartenenti alla famiglia Y, in grado di sintetizzare DNA oltre il punto di lesione.

In E.coli queste DNA Pol (Pol IV o Pol V) subentrano alla DNA Pol III nella sintesi, ma introducono basi a caso di fronte allo stampo. Alcune introducono basi corrette, ad es. 2 A di fronte ad un dimero di T. Il sistema di sintesi translesione è l'ultima possibilità per la cellula di sopravvivere, anche se a caro prezzo (elevata probabilità di introduzione di mutazioni). I geni di queste DNA Pol appartengono alla così detta riposta SOS, che insorge quando la cellula risulta fortemente danneggiata.



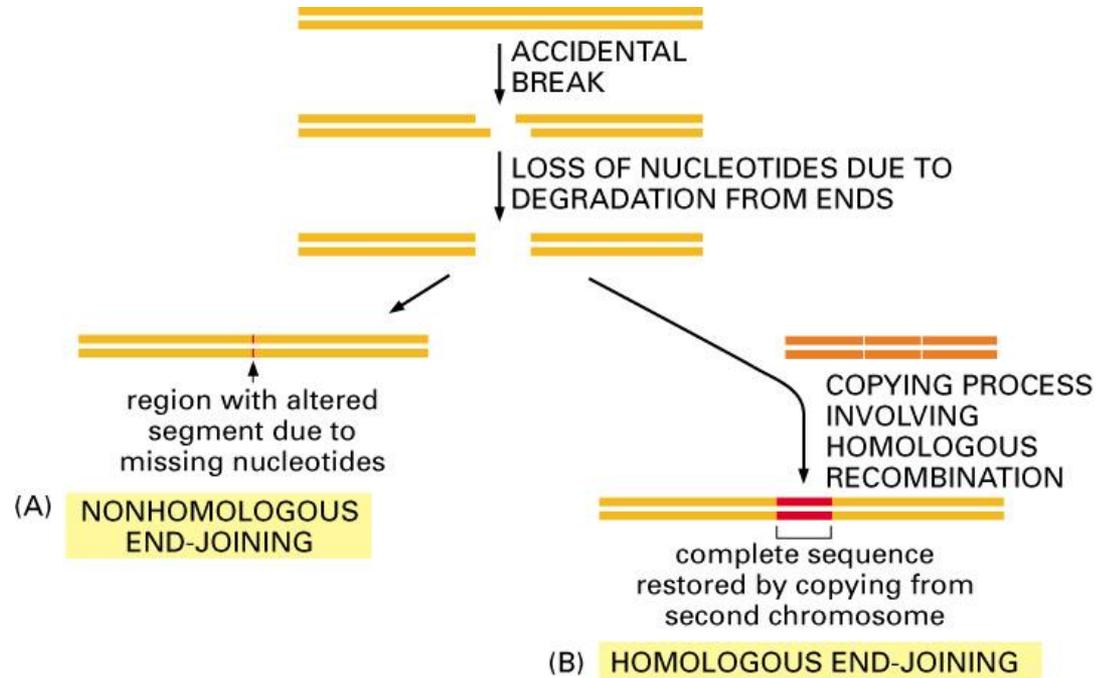
● **TABELLA 12.5 DNA polimerasi specializzate coinvolte nella sintesi translesione**

Polimerasi	Famiglia
Batterio (<i>E. coli</i>)	
Pol IV	Y
Pol V	Y
Pol II	B
Lievito (<i>S. cerevisiae</i>)	
Rev1	Y
Pol ξ	B
Pol η	Y
Uomo (<i>H. sapiens</i>)	
Rev1	Y
Pol ξ	B
Pol η	Y
Pol κ	Y
Pol ι	Y
Pol λ	X
Pol μ	X
Pol β	X
Pol θ	A
Pol ν	A

Le rotture alla doppia elica del DNA sono riparate efficientemente

Le cellule producono gli enzimi di riparazione in risposta al danno al DNA

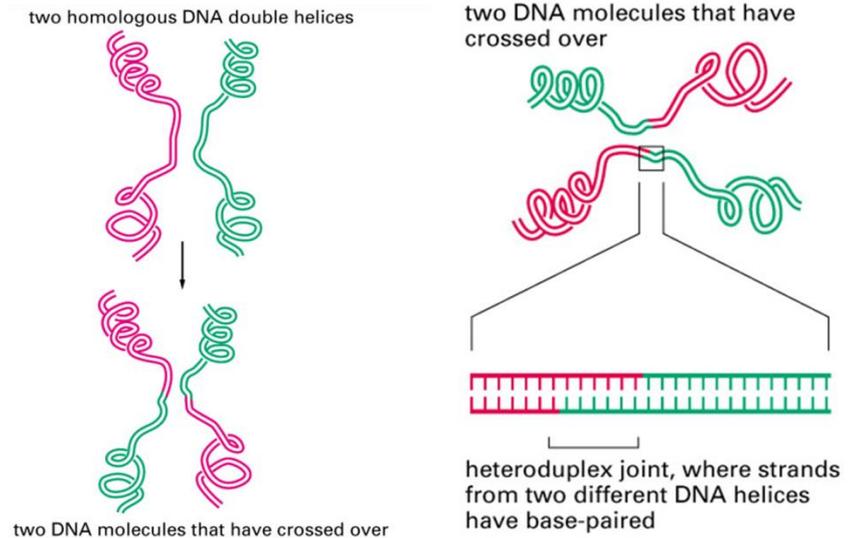
I danni al DNA rallentano la progressione del ciclo cellulare



La ricombinazione omologa

La ricombinazione omologa è coinvolta:

- Nel crossing over durante la meiosi
- Recuperare sequenze perse per danni al DNA
- Per far ripartire forche replicative danneggiate
- Può regolare l'espressione di alcuni geni.
- Produzione di animali Knock-out



Riparo per ricombinazione

I DSB (double strand breaks) insorgono come conseguenza dell'esposizione a radiazioni ionizzanti, radicali liberi, sostanze chimiche

I DSB inducono una cascata di eventi che bloccano il ciclo cellulare e reclutano i fattori del riparo

Questo processo è iniziato da una singola protein kinasi, ATM

Poi ATM, ATR e DNAPK fosforilano l'histone H2AX, in vicinanza dei DSB.

Il riparo viene effettuato da due diversi meccanismi:

NHEJ, non homologous end joining (ripara prevalentemente in G1)

HR, riparo basato sulla ricombinazione omologa (ripara in S, G2 e M)

Rotture di double strand

Non-homologous end-joining (NHEJ)

lega terminazioni piatte. Lo si trova in meccanismi di riparazione e di ricombinazione (come la ricombinazione delle immunoglobuline).

The NHEJ pathway può legare le estremità piatte del DNA duplex.

Mutazioni del NHEJ pathway causano malattie

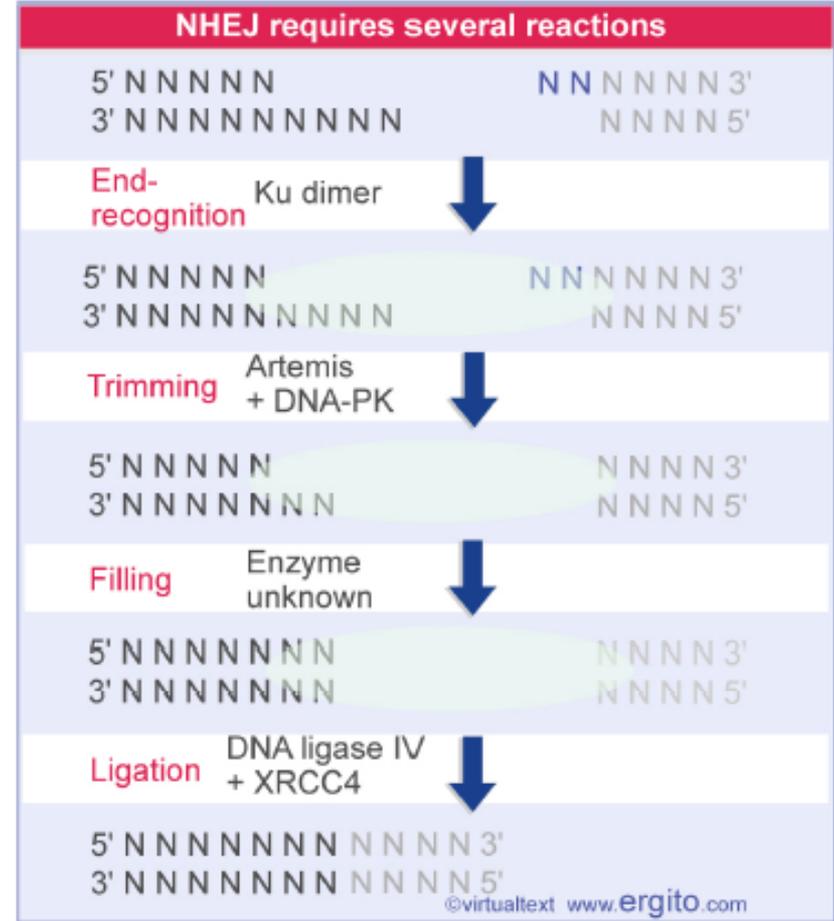


Figure 15.54 Nonhomologous end joining requires recognition of the broken ends, trimming of overhanging ends and/or filling, followed by ligation.

Modello della Rottura del double strand (DSB)

Lo scambio genetico solitamente inizia con un taglio del double strand (**double strand break**)

Il DNA ricevente si taglia.
Esonucleasi agiscono e liberano un 3'. Questo invade il DNA omologo e si estende. Si forma un D-loop.

Il D loop si estende e si annila al DNA ricevente, e viene ricopiato

Ci sono due regioni unite

Il DNA del donatore ha sostituito quello dell'acceptore

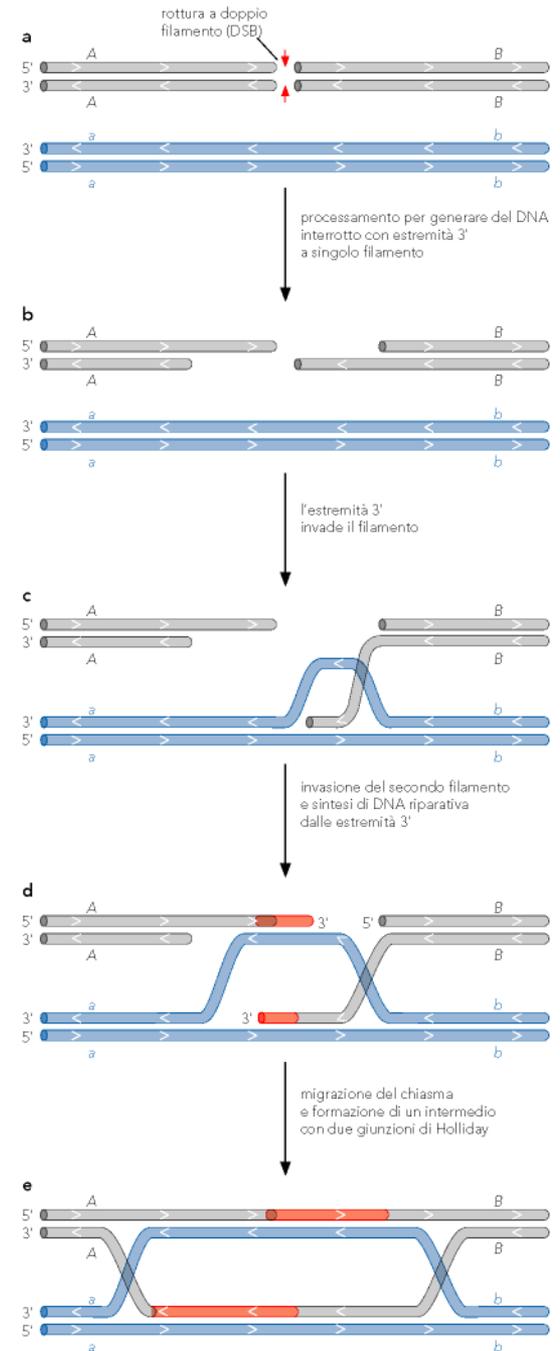


TABLE 5-2 Inherited Syndromes with Defects in DNA Repair

NAME	PHENOTYPE	ENZYME OR PROCESS AFFECTED
MSH2, 3, 6, MLH1, PMS2	colon cancer	mismatch repair
Xeroderma pigmentosum (XP) groups A–G	skin cancer, cellular UV sensitivity, neurological abnormalities	nucleotide excision-repair
XP variant	cellular UV sensitivity	translesion synthesis by DNA polymerase δ
Ataxia–telangiectasia (AT)	leukemia, lymphoma, cellular γ -ray sensitivity, genome instability	ATM protein, a protein kinase activated by double-strand breaks
BRCA-2	breast and ovarian cancer	repair by homologous recombination
Werner syndrome	premature aging, cancer at several sites, genome instability	accessory 3'-exonuclease and DNA helicase
Bloom syndrome	cancer at several sites, stunted growth, genome instability	accessory DNA helicase for replication
Fanconi anemia groups A–G	congenital abnormalities, leukemia, genome instability	DNA interstrand cross-link repair
46 BR patient	hypersensitivity to DNA-damaging agents, genome instability	DNA ligase I

Caretakers: HNPCC

- 1895 - Warthin describe la prima famiglia affetta
- 1966 - Henry Lynch riporta altre due famiglie
- 1989 - Definizione di HNPCC (cancro del colon ereditario non poliposico) per descrivere cancri del colon, dello stomaco e dell'endometrio in una famiglia
- Tipo I - Insorgenza precoce (40-50 anni, media 41), colon
- Tipo II - Insorgenza precoce ma con tumori dello stomaco e dell'endometrio.
- Sindrome di Muir-torre- come HNPCC ma con tumori delle ghiandole sebacee e cheratoacantomi.
- La frequenza e' 1/200 individui, costituisce il 5-7% dei ca coloretali ed e' autosomica dominante.

Mismatch repair nell' uomo

Mutazioni di geni del riparo:

-hMLH1: Responsabile di HNPCC

-hMSH2: Responsabile di HNPCC (insieme a hMLH1 costituisce il 50% dei casi)

-HMLH6: associato a HNPCC atipico

-hPMS2 and hPMS1: pochissimi casi di HNPCC

CANCRO COLON-RETTALE EREDITARIO NON ASSOCIATO A POLIPOSIS

- ❑ L'80% dei cancri del colon è sporadico, mentre un 20% ha una suscettibilità ereditaria alla malattia.
- ❑ Il cancro colon-rettale non associato a poliposi (HPNCC) è la forma ereditaria più comune di cancro colonrettale.
- ❑ E' una condizione autosomica dominante dovuta a mutazioni in uno dei diversi geni della riparazione delle basi male appaiate.
- ❑ Le mutazioni nei geni MutS α o MutL α assommano a più del 90% delle mutazioni nelle famiglie con HPNCC.

❑ **Progressione verso l'HPNCC:**

- ✓ 1. Mutazione germinale in un allele dei geni di riparazione delle basi male appaiate.
- ✓ 2. Perdita somatica dell'allele normale.
- ✓ 3. Difetto del meccanismo di riparazione delle basi male appaiate.
- ✓ 4. Accumulo di errori durante la replicazione del DNA.
- ✓ 5. Instabilità dei microsatelliti.

Caretakers: XP

- Xeroderma pigmentosum. Disordine ereditario autosomico recessivo
- Estrema sensibilita' ai raggi UV.
- Drammatica incidenza di cancro alla pelle da esposizione ai raggi UV
- Neurodegenerazione, difetti della crescita.
- Insorge come conseguenza di mutazioni in uno dei sette geni (XPA-XPG) coinvolti nel NER e nel TCR

Lo **Xeroderma pigmentoso** è una malattia ereditaria dovuta a mutazioni di geni preposti alla riparazione del DNA. I pazienti affetti da tale patologia non sono in grado di riparare i danni che le radiazioni ultraviolette inducono nel DNA, e sono predisposti all'insorgenza di tumori maligni della pelle





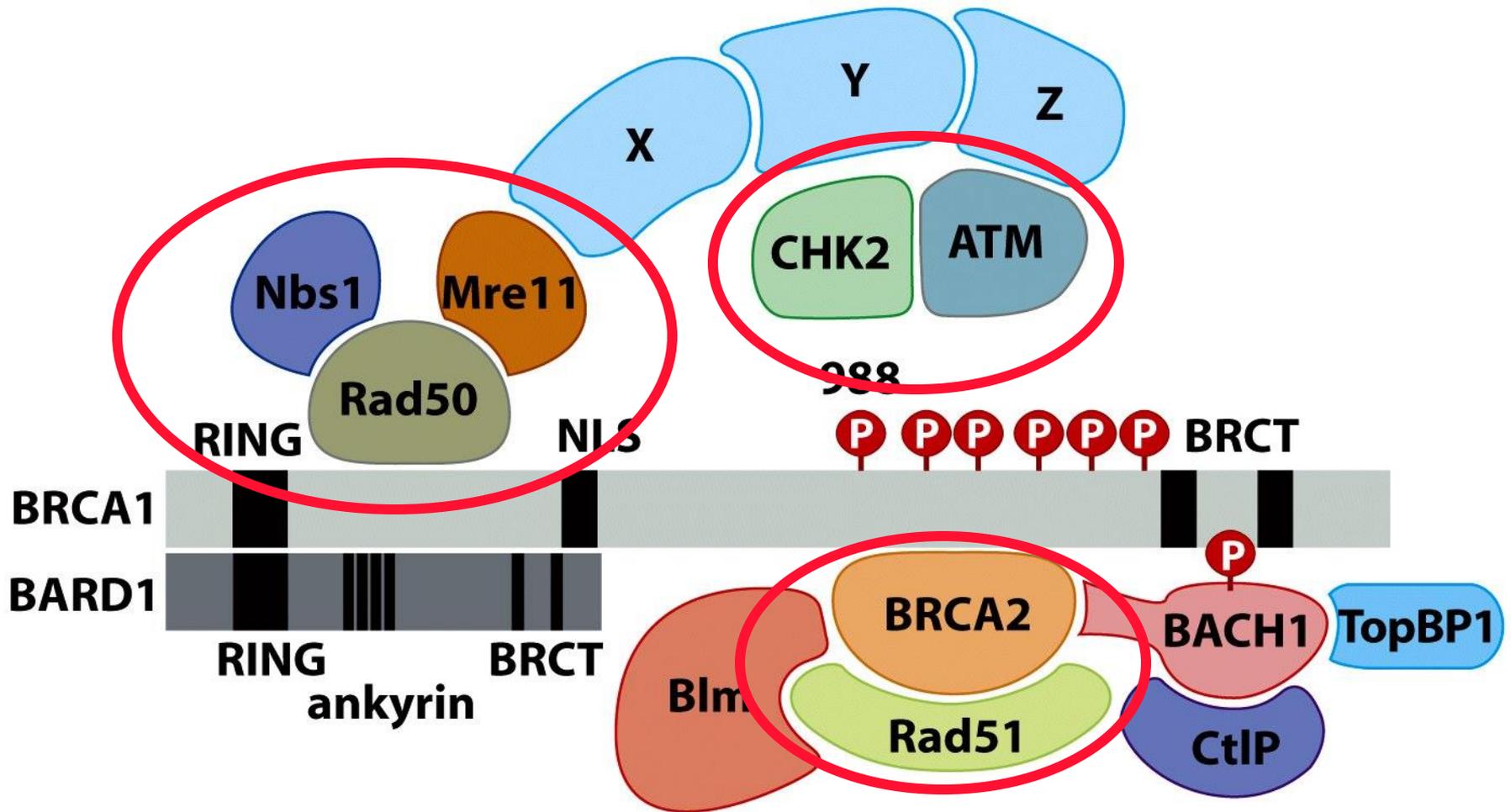
Fotografía 9. Xeroderma pigmentoso y carcinoma basocelular y melanoma maligno.



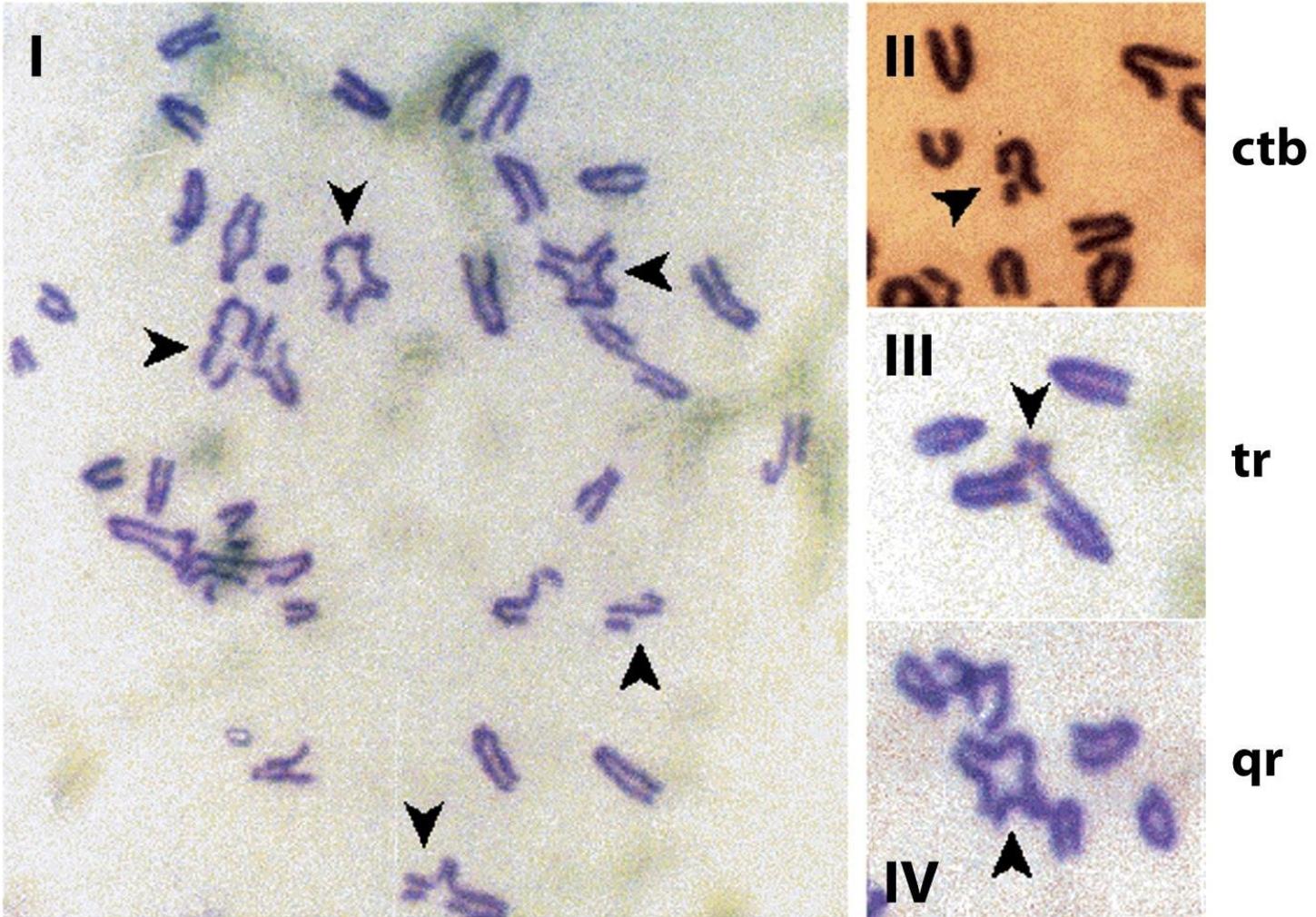
Tabella 17.6 Malattie genetiche associate a difetti nei sistemi di riparazione del DNA

<i>Malattia</i>	<i>Sintomi</i>	<i>Difetto genetico</i>
Xeroderma pigmentoso	Macchie cutanee simili a lentiggini, sensibilità alla luce solare, predisposizione ai tumori della pelle	Difetti nella riparazione per escissione di nucleotidi
Sindrome di Cockayne	Nanismo, sensibilità alla luce solare, invecchiamento precoce, sordità, ritardo mentale	Difetti nella riparazione per escissione di nucleotidi
Tricotiodistrofia	Fragilità dei capelli, anomalie cutanee, bassa statura, sviluppo sessuale immaturo, tratti tipici del volto	Difetti nella riparazione per escissione di nucleotidi
Cancro del colon ereditario non poliposico	Predisposizione al cancro del colon	Difetti nella riparazione dei malappaiamenti
Anemia di Fanconi	Iperpigmentazione cutanea, anomalie scheletriche, cardiache e renali, predisposizione alla leucemia	Possibili difetti nella riparazione dei legami crociati interfilamento
Atassia-teleangectasia	Deficit della coordinazione muscolare, vasodilatazione cutanea e oculare, immunodeficienze, sensibilità alle radiazioni ionizzanti, predisposizione al cancro	Difetti nel rilevamento e nella risposta al danneggiamento del DNA
Sindrome di Li-Fraumeni	Predisposizione al cancro in svariati tessuti	Difetti nella risposta al danneggiamento del DNA

BRCA1 e 2 fanno parte di un complesso multiproteico coinvolto nel riparo del DNA (HR)



Alterazioni cariotipiche in cellule con parziale perdita di BRCA2:
fusioni, rotture cromatidiche, cromosomi triradiali e quadriradiali



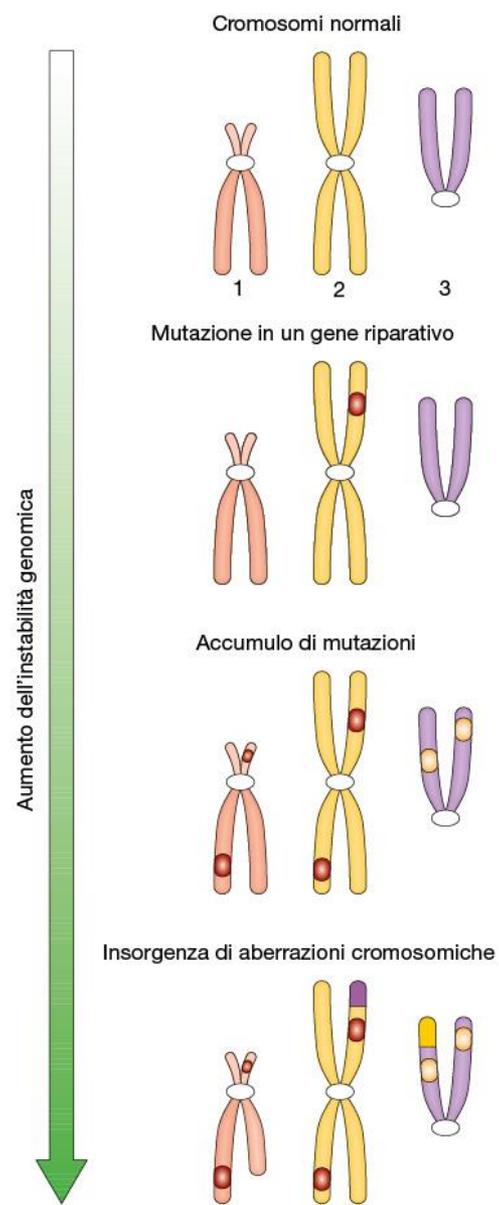


Figura 7.15A Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

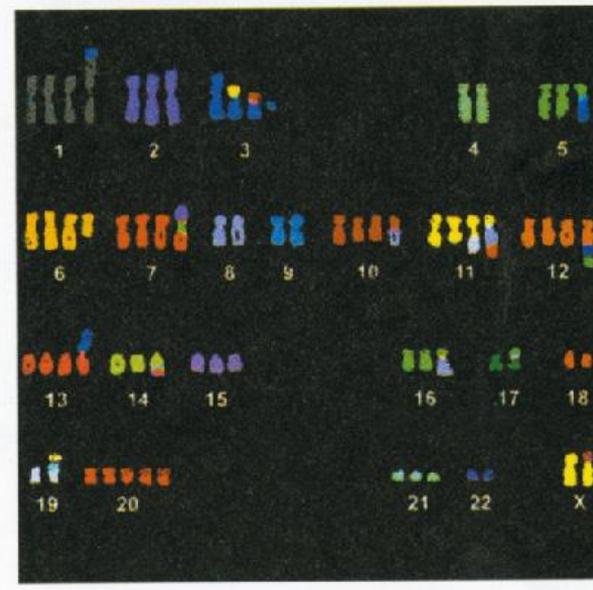
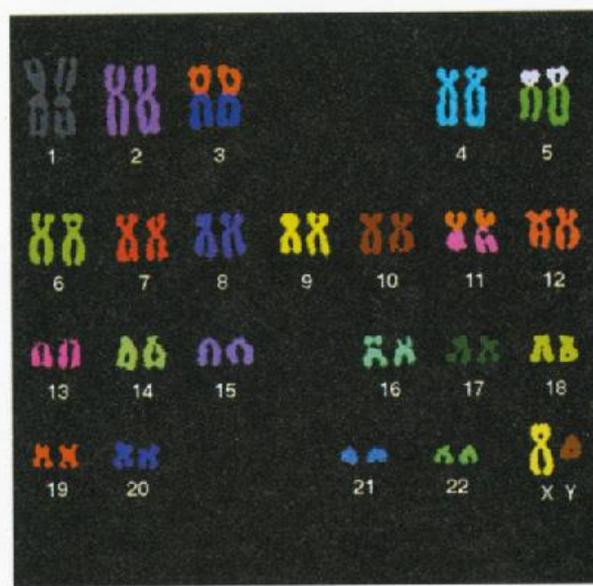


Figura 7.15B Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

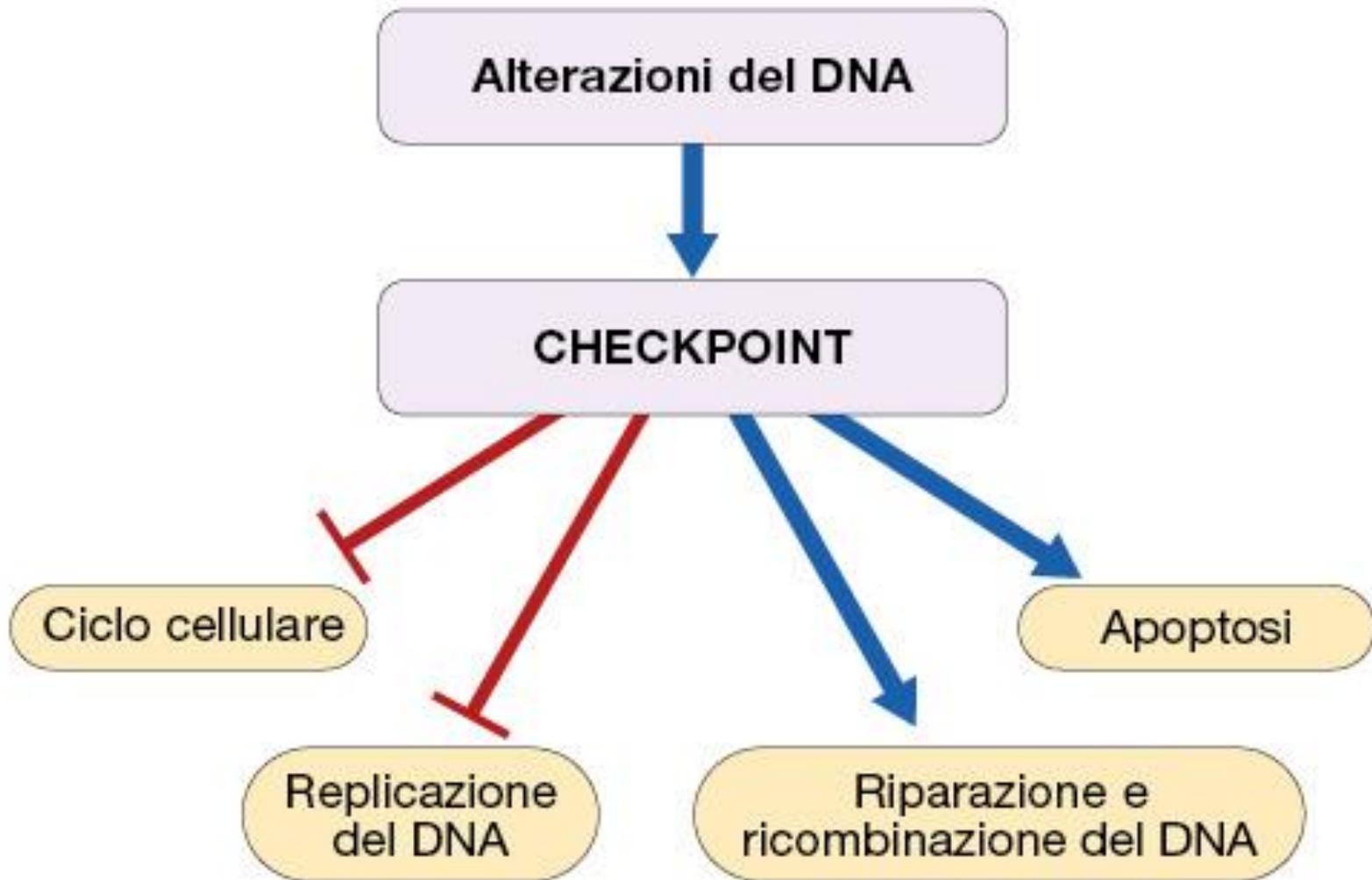


Figura 7.11 La risposta cellulare a danni al DNA attiva il checkpoint.

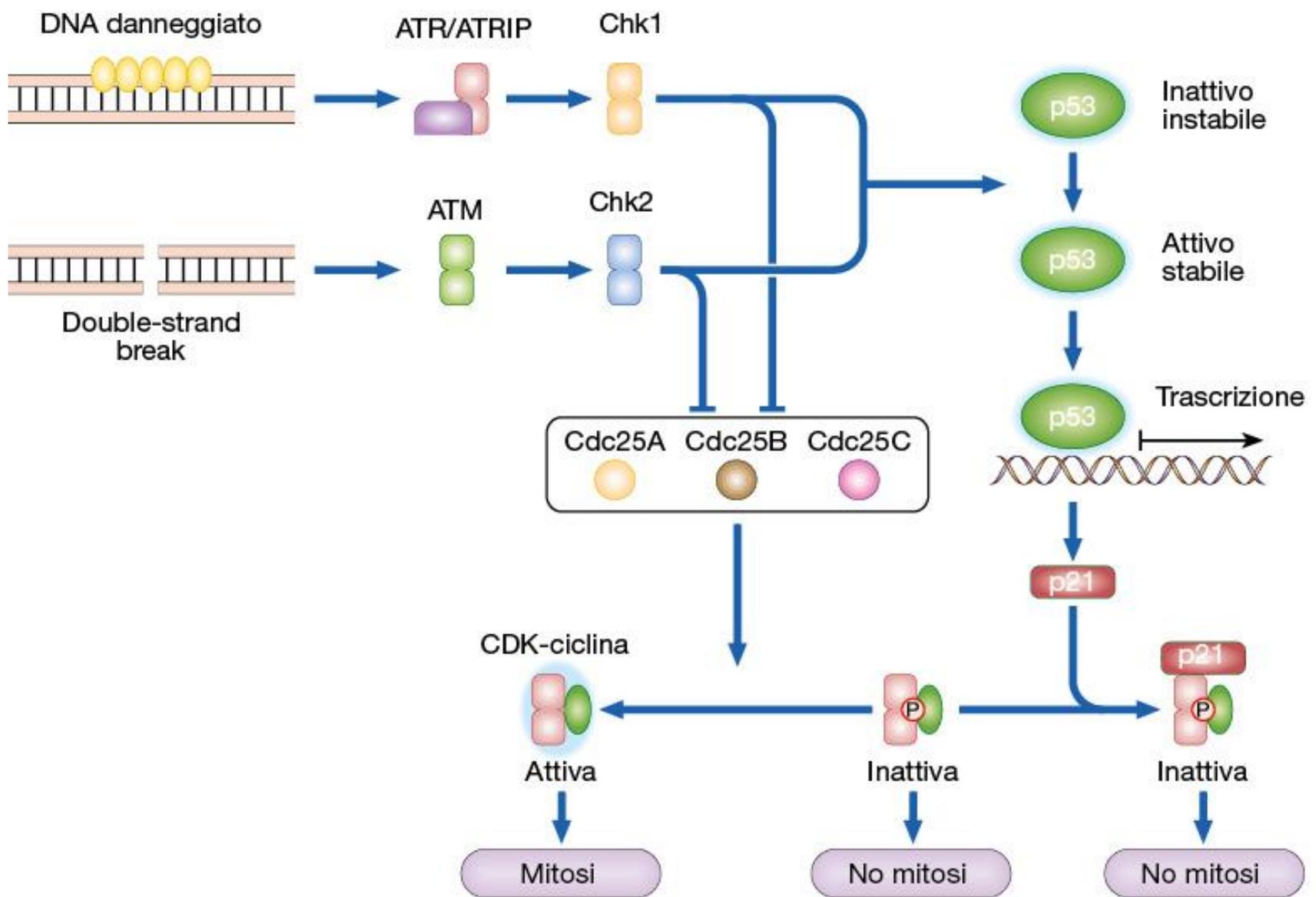


Figura 7.14 Il checkpoint da danno al DNA agisce su p53 e Cdc25 bloccando l'entrata in mitosi.

Gli eventi che modificano i genomi

Danni al DNA

Un basso tasso di mutazione del DNA è richiesto sia per trasmettere la corretta informazione genetica alle generazioni successive che per la vitalità individuale. Ognuno delle migliaia di geni di un organismo può subire danni da mutazioni nelle sequenze codificanti o regolative, ma deve restare il più possibile funzionale.

Le **malattie genetiche** sono dovute a mutazioni, pre-esistenti o insorte durante la meiosi, nel patrimonio genetico di almeno uno dei due genitori.

Certe **malattie somatiche** sono invece dovute a mutazioni insorte durante la vita dell'individuo. Ad es. il cancro insorge in seguito all'accumulo di mutazioni nei geni che regolano il ciclo cellulare, con perdita di controllo sulla crescita e proliferazione.

D'altra parte se il patrimonio genetico fosse trasmesso con assoluta fedeltà non ci sarebbe la variabilità genetica necessaria all'evoluzione delle specie.

Vita e biodiversità dipendono quindi da un giusto equilibrio fra tasso di mutazioni e capacità di riparo.

Le principali cause di danno al genoma sono due:

- a) **inaccuratezza della replicazione** (soprattutto per la tautomerizzazione delle basi);
- b) **danno ambientale**, spontaneo o indotto (chimico: es. perdita di basi, reazioni con sostanze naturali o sintetiche; fisico: es. calore, radiazioni UV, X, ecc.).

L'inserzione di materiale genetico, dovuto ai trasposoni, è causa di mutazioni.

La cellula possiede sistemi che scandagliano l'intero genoma alla ricerca di errori replicativi o danni al DNA e mettono in atto diversi meccanismi di riparo.

A. **Mutazioni** per delezioni estese o per duplicazioni di segmenti

Mutazioni puntiformi

- i. **Mutazioni di sostituzione:** una coppia di basi viene invertita o sostituita dall'altra:
 - a. **Transizioni:** una purina (o una pirimidina) viene sostituita dall'altra
 - b. **Transversioni:** una purina viene sostituita da una pirimidina (e viceversa)
- ii. **Microdelezioni e microinserzioni:** una o pochissime coppie di basi vengono perse o acquisite.

B. **Ricombinazioni:**

- i. **Ricombinazioni omologhe:** avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze altamente omologhe (cioè identiche o quasi), quali che siano
- ii. **Ricombinazioni sito-specifiche:** avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze omologhe ben definite
- iii. **Trasposizioni:**
 - a. **Trasposizioni semplici:** un segmento genomico viene spostato da un sito ad un altro nel genoma
 - b. **Trasposizioni replicative:** un segmento genomico viene copiato e la copia trasposta in un nuovo sito del genoma
 - c. **Retrotrasposizioni:** un segmento di RNA viene retrotrascritto, cioè copiato in DNA a doppio filamento e questo viene inserito in un sito del genoma.

- Le **mutazioni** sono in natura eventi di per sé **puramente casuali**, cioè non sono condizionate dall'effetto che eventualmente produrranno.
- Le **ricombinazioni** sono in genere eventi complessi **biologicamente programmati**, cioè destinati a succedere di norma in date condizioni al fine di produrre un determinato effetto.
- Occasionalmente possono attuarsi in modo erroneo (**ricombinazioni illegittime**, causando a volte **duplicazioni geniche, delezioni, traslocazioni o fusioni cromosomiche**). Le **trasposizioni** sono eventi più o meno **sporadici** dagli effetti sostanzialmente non programmati. Infine accadono sporadicamente errori di segregazione durante la meiosi o la mitosi con conseguenti fenomeni di alterazione del corredo cromosomico (per raddoppio o perdita di singoli cromosomi – **aneuploidie** - o raddoppi dell'intero corredo - **poliploidizzazione**).

Effetti degli eventi modificatori del genoma: mutazioni non risolte dai sistemi di riparo del DNA, nonché eventi ricombinativi:

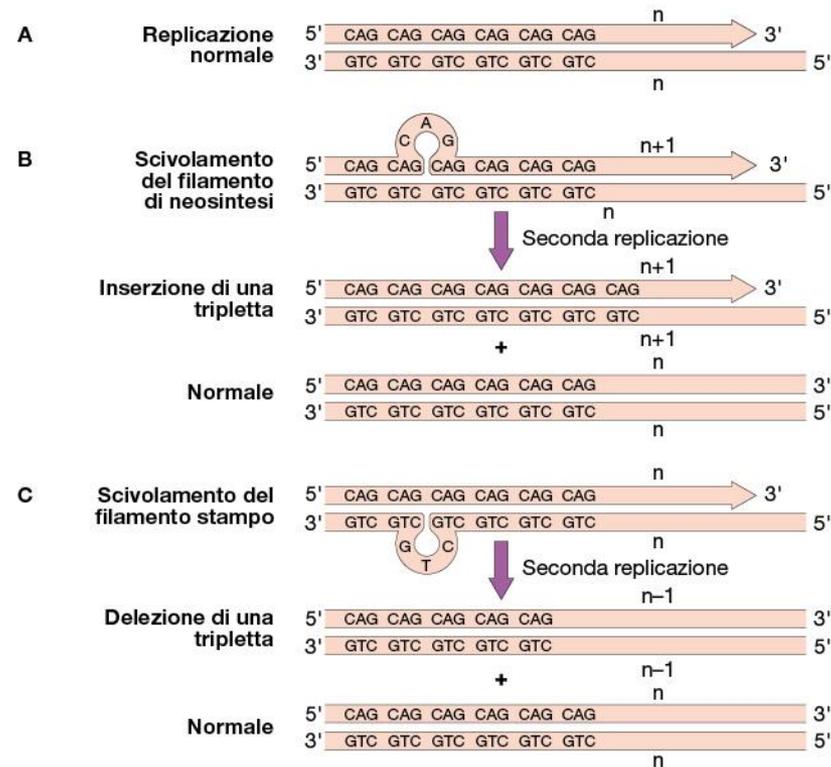
- A. Sugli organismi **unicellulari** e sulla linea **germinale** degli organismi **pluricellulari**:
- i. Conseguenze funzionali **incompatibili** con la vita (morte cellulare o mancato sviluppo dell'organismo pluricellulare)
 - ii. Conseguenze funzionali **peggiorative** dell'**adattamento** all'ambiente (minor successo riproduttivo di conspecifici nell'ambiente)
 - iii. Assenza di conseguenze funzionalmente rilevanti (**mutazioni neutre**)
 - iv. Conseguenze funzionali **migliorative** dell'**adattamento** all'ambiente (maggior successo riproduttivo di conspecifici nell'ambiente)

I punti **ii.** e **iv.** sono l'oggetto della **selezione naturale** darwiniana, il **iii.** è alla base del fenomeno della **deriva genica**. Entrambi contribuiscono all'**evoluzione** dei viventi.

- B. Sulle linee cellulari **somatiche** degli organismi pluricellulari:
- i. Morte cellulare (per **apoptosi**)
 - ii. Accumulo di mutazioni in geni rilevanti per il controllo del ciclo cellulare (sviluppo di **tumori**)
 - iii. **Invecchiamento** dell'organismo.

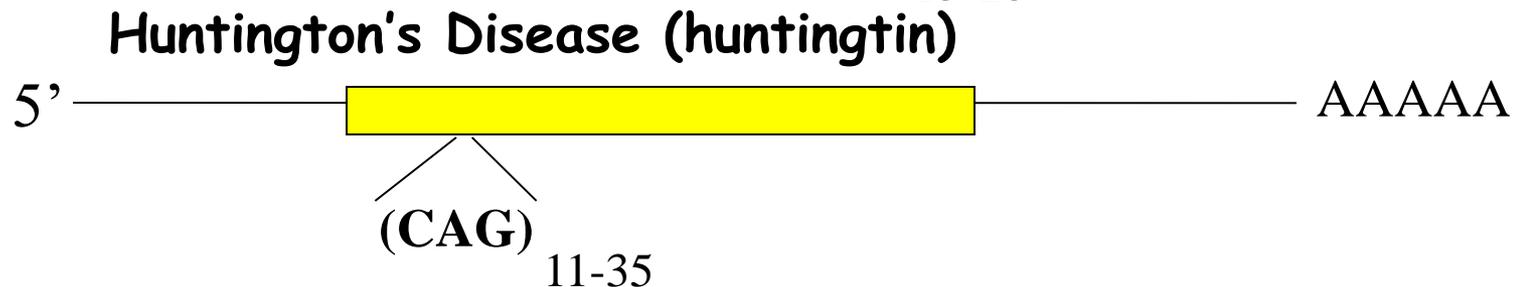
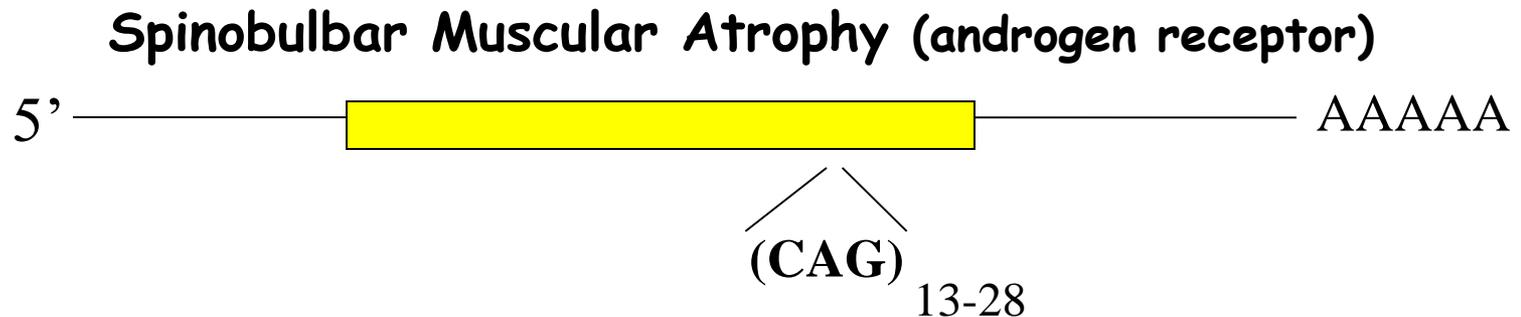
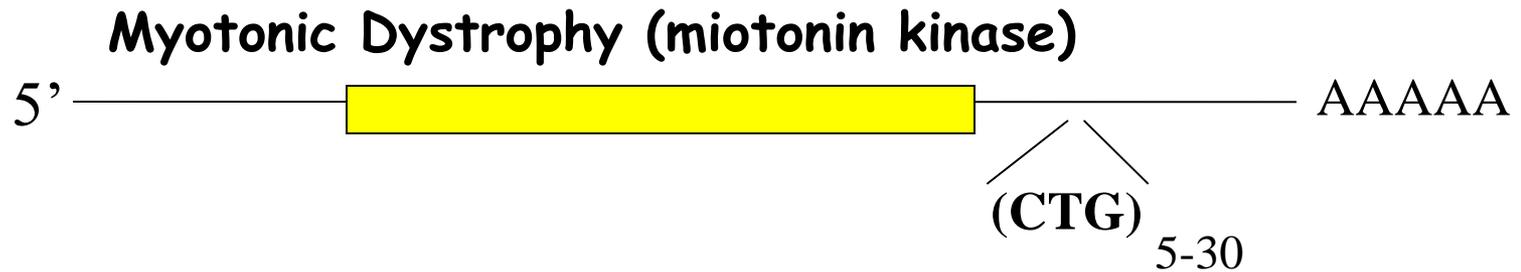
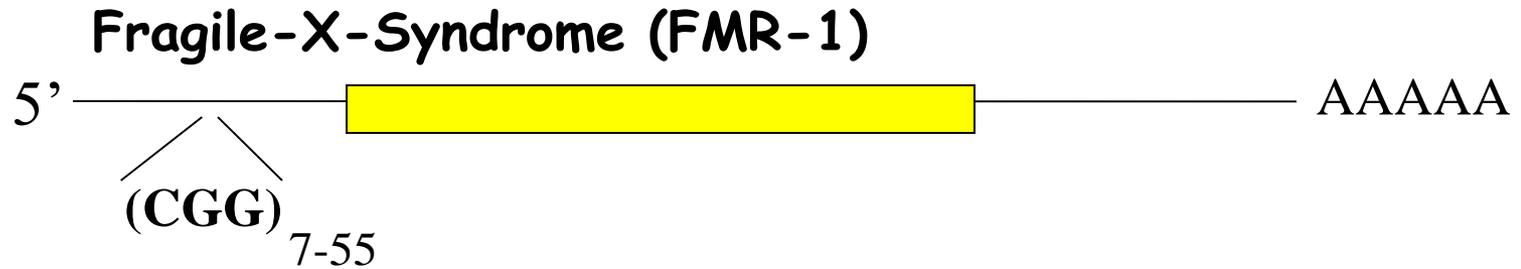
Cause più significative degli eventi mutazionali

- Intrinseci alla natura delle basi e della replicazione:
 - Eventi di **tautomerizzazione** delle basi
 - Eventi di **slittamento** durante la replicazione
 - Eventi di **deaminazione e depurinazione** spontanei.
- Dovuti ad **agenti fisici**:
 - Da **raggi UV**
 - Da radiazioni e.m. ad alta energia: **raggi X** e **raggi γ**
 - Da particelle ad alta energia: **raggi α** e **raggi β**
- Dovuti ad **agenti chimici**:
 - Da agenti **alchilanti**
 - Da agenti **deaminanti**
 - Da agenti **intercalanti**
 - Da agenti **ossidanti** (anche intrinseci al metabolismo)
 - Da agenti **mimetici delle basi**



Espansione o contrazioni di triplette durante la replicazione. Alcune regioni sul DNA contengono numerose copie di triplette uguali disposte in serie. La replicazione di tali regioni normalmente non provoca variazioni nel numero di triplette (**A**). Tuttavia, può accadere che durante la replicazione si formino degli appaiamenti intramolecolari (che si suppone siano dovuti a degli scivolamenti dell'apparato replicativo in tali regioni) sul filamento di neosintesi (**B**) o sul filamento stampo (**C**). Come conseguenza, alla seconda generazione, si genera nel caso (**B**) l'inserzione di una o più triplette e nel caso (**C**) la delezione di una o più triplette.

Mutazioni dinamiche

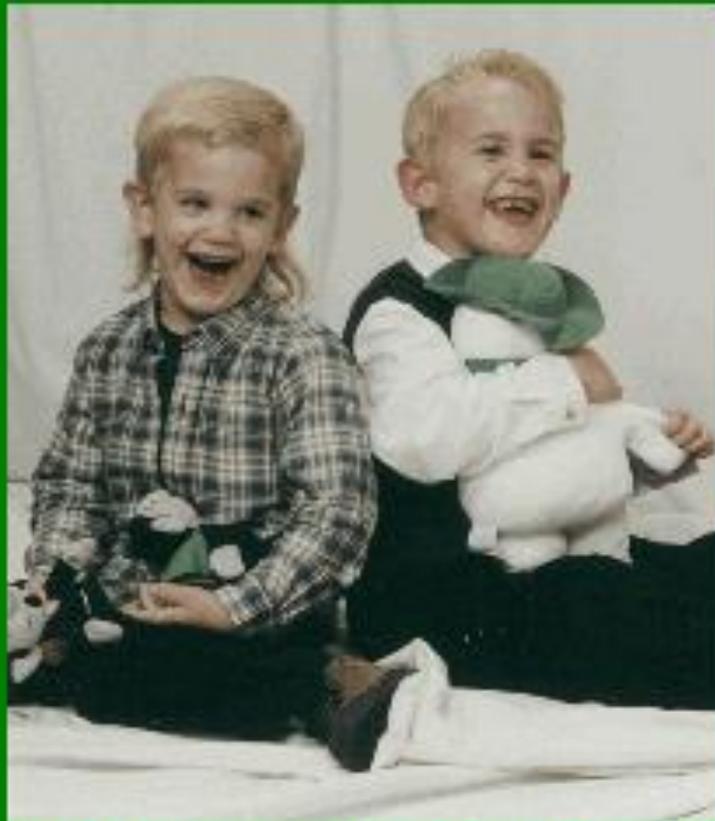


ESPANSIONE DELLE RIPETIZIONI TRINUCLEOTIDICHE

Disease	Gene Location	Repeat Sequence	Normal Repeat Number	Mutated Repeat Number
Huntington disease	4p16.3	CAG	9 - 35	37 - 100
Kennedy disease	Xq21	CAG	17 - 24	40 - 55
SCA1	6p23	CAG	19 - 36	43 - 81
DRPLA	12p	CAG	7 - 23	> 49
Fragile X site A	Xq27.3	CGG	6 - 54	> 200
Fragile X site E	Xq28	CCG	6 - 25	> 200
Fragile X site F	Xq28	GCC	6 - 29	> 500
Myotonic dystrophy	19q13	CTG	5 - 35	50 - 4000

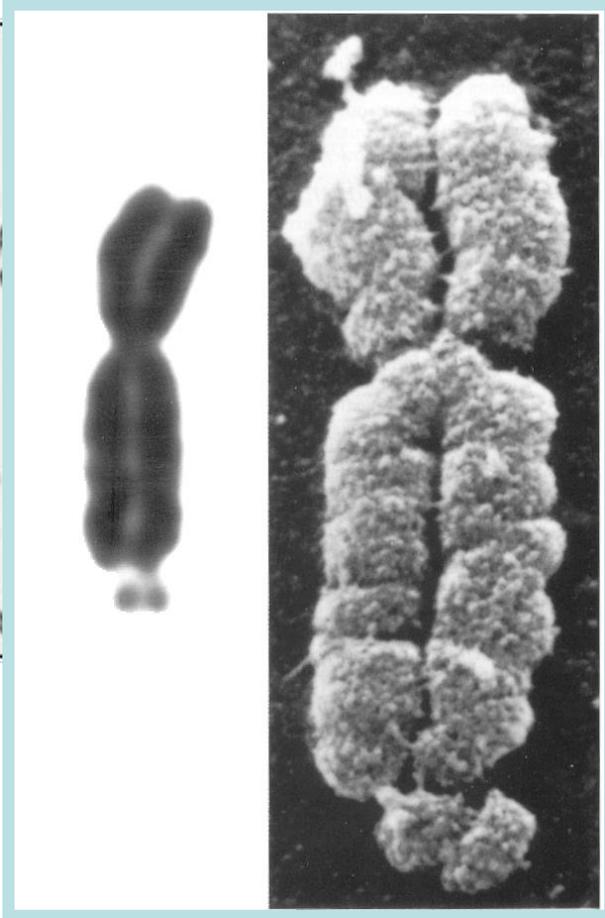
Fragile X syndrome

*Fragile X
is the world's leading cause
of inherited mental impairment*



The National Fragile X Foundation

La sindrome dell'X fragile è causata da un gene in Xq27.3



Fatti chiave sulla sindrome dell'X fragile

La più comune delle forme monogeniche di ritardo mentale (1/4000 maschi e, in forma meno grave, 1/7000 femmine)

La malattia è causata da espansione instabile di un repeat CGG alla regione 5'UTR (untranslated region) del gene FMR1 (fragile X-mental retardation protein). FMRP regola alcuni mRNA neuronali (de-regolazione nella segnalazione nei dendriti).

I pazienti con X fragile hanno un'espansione di >200 CGG che è metilata in modo anomalo. La **metilazione** si estende all'adiacente regione del promotore. Ciò dà una **conformazione inattiva alla cromatina** e impedisce la trascrizione del gene FMR1.

Le espansioni non metilate di ~60-200 repeats ("premutazioni") sono presenti in femmine e maschi senza manifestazioni cliniche ovvie ma che sono a rischio di avere rispettivamente figli e nipoti affetti.

La malattia di Huntington

Huntington's Disease.



- **An autosomal dominant neurodegenerative disorder first clinically described by Huntington in 1872.**
- **It is rare, with death rates of 1.6 per million, and is commonest among white Europeans.**
- **Initial symptoms occur in those aged 30 – 50.**
- **Sometimes it can strike in the 20's, when suicide is often the result.**
- **Death comes on average 12 years after the onset.**

Huntington's disease

- autosomal dominant disease
- juvenile to late adult onset
- associated with involuntary movements (chorea), behavioral disturbances, and cognitive impairment
- caused by mutations in the IT15 gene (whose function is unknown)
- normal gene has a CAG repeat that is polymorphic in the population and that ranges from 11-35 repeats
- patients have expanded numbers of repeats (>35 repeats)
- CAG repeat is translated into a polyglutamine tract in the protein
- disease shows anticipation, but the severity of the illness does not always correlate strictly with the degree of expansion
 - affected children of affected fathers have an age of onset 8-10 years earlier than their fathers
 - affected children of affected mothers have an age of onset similar to their mothers'

Mutazioni diverse dello stesso gene possono associarsi a sindromi diverse

*Es: distrofia
muscolare
di Duchenne e
di Becker (Xp21)*



Le delezioni che causano slittamento del modulo di lettura (e quindi totale perdita di funzione della proteina) causano la **distrofia muscolare di Duchenne** mentre le delezioni che non alterano il modulo e preservano parzialmente la funzione della proteina causano la forma più lieve di **distrofia di Becker**

Molte neoplasie sono ad eziologia **multifattoriale**, causate quindi dall'interazione tra fattori genetici ed ambientali

Il cancro e' una malattia genetica della **cellula somatica** perche' riguarda alterazioni del genoma riscontrabili soltanto nelle cellule cancerose di un individuo e derivate, probabilmente, dall'interazione tra geni e ambiente

La maggior parte dei tumori non viene ereditata dalle successive generazioni poiche' queste mutazioni non sono trasmesse per via ereditaria

Geni coinvolti nei tumori

GENI del riparo del DNA (caretakers): responsabili del mantenimento dell'integrità del genoma durante la replicazione cellulare. La perdita di funzione di entrambi gli alleli espone la cellula a commettere errori (mutazioni recessive);

ONCOGENI: derivano da mutazione di **proto-oncogeni** cioè geni la cui azione promuove positivamente la proliferazione cellulare. Un singolo allele mutante può influenzare il fenotipo dell'intera cellula (mutazioni dominanti)

ONCOSOPPRESSORI: i prodotti di tali geni inibiscono la proliferazione cellulare. Per cambiare il comportamento di una cellula devono essere inattivati entrambi gli alleli (mutazioni recessive).

Le mutazioni genomiche:

Cambiamenti nel numero dei cromosomi

-Aneuploidia : perdita o aggiunta di uno o pochi cromosomi

-Poliploidia : il numero cromosomico diventa multiplo di quello normale

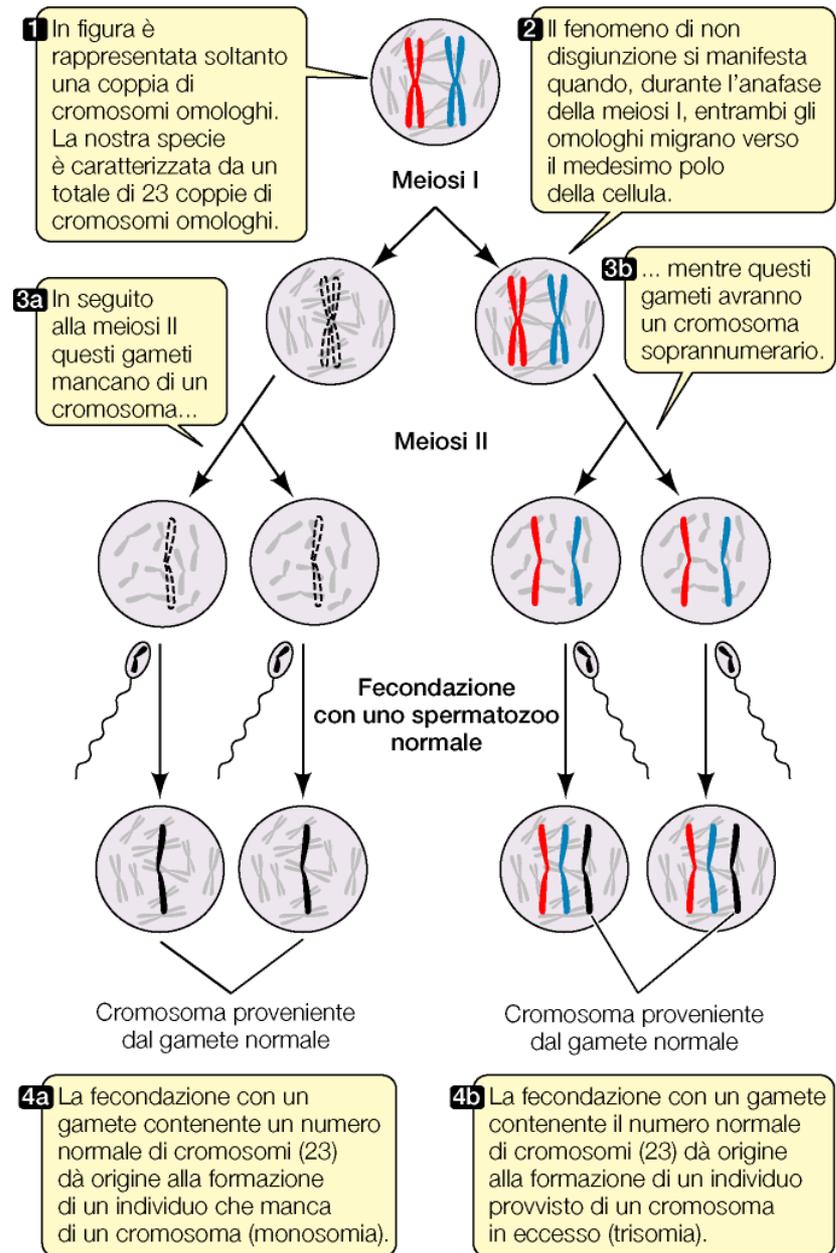
Mutazioni nel numero dei cromosomi (Aneuploidia)

Monosomie e trisomie. Accade talvolta che alla meiosi i due omologhi anziché separarsi, migrino entrambi nella stessa cellula figlia (**non disgiunzione**). In questo modo si creano due cellule figlie, una con un **cromosoma in meno** e una con un **cromosoma in più**

Dopo la fecondazione un tipo di zigote avrà **1 cromosoma omologo**, l'altro **3 cromosomi omologhi**

La trisomia del 21 determina la **sindrome di Down**

Per quel che riguarda gli autosomi, nella specie umana nessuna **monosomia** permette lo sviluppo dell'embrione



Monosomia

Trisomia