

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→U crea il mismatch U:G, che alla replicazione induce la transizione C:G →T:A su uno dei cromosomi.

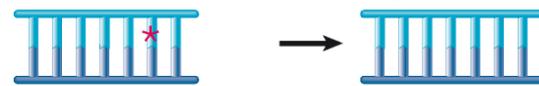
Le cellule hanno evoluto meccanismi di riparo, per impedire tali effetti e permettere la loro sopravvivenza.

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.

Reversione diretta del danno: numerosi geni



Riparazione per escissione di basi: 15 geni



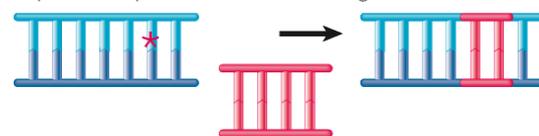
Riparazione per escissione nucleotidica: 28 geni



Riparazione per escissione di basi male appaiate: 11 geni



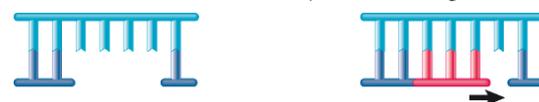
Riparazione per ricombinazione: 14 geni



Unione non omologa delle estremità: 5 geni



Subunità catalitiche delle DNA polimerasi: 16 geni



Sistemi di riparazione

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

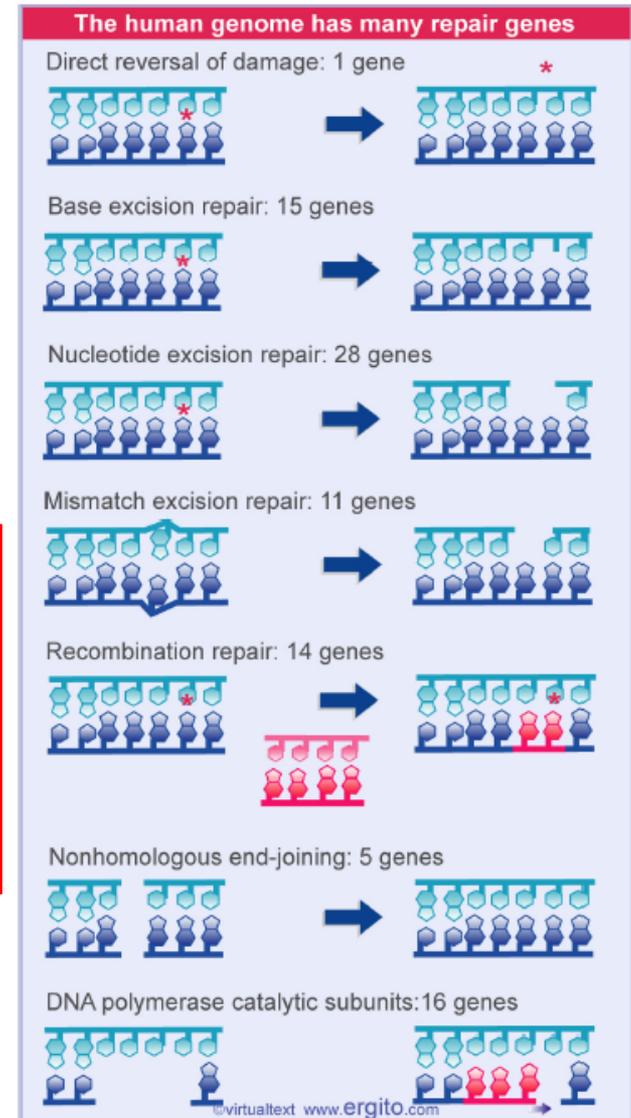
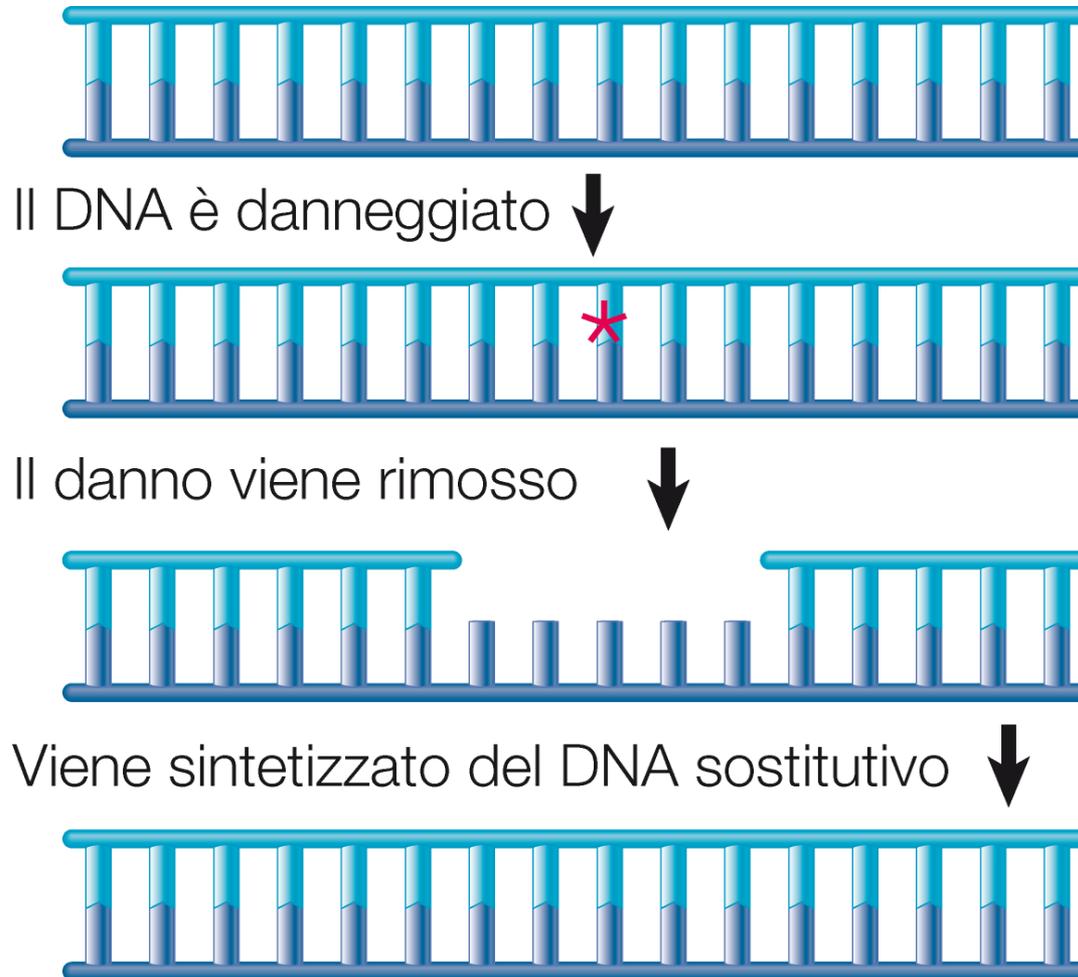


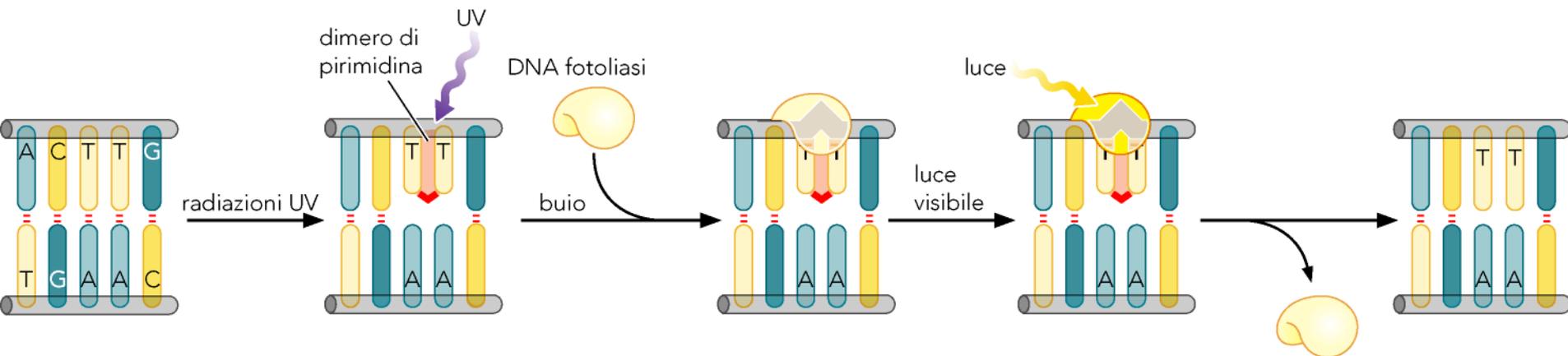
Figure 15.37 Repair genes can be classified into pathways that use different mechanisms to reverse or bypass damage to DNA.

Riparo per escissione di nucleotidi

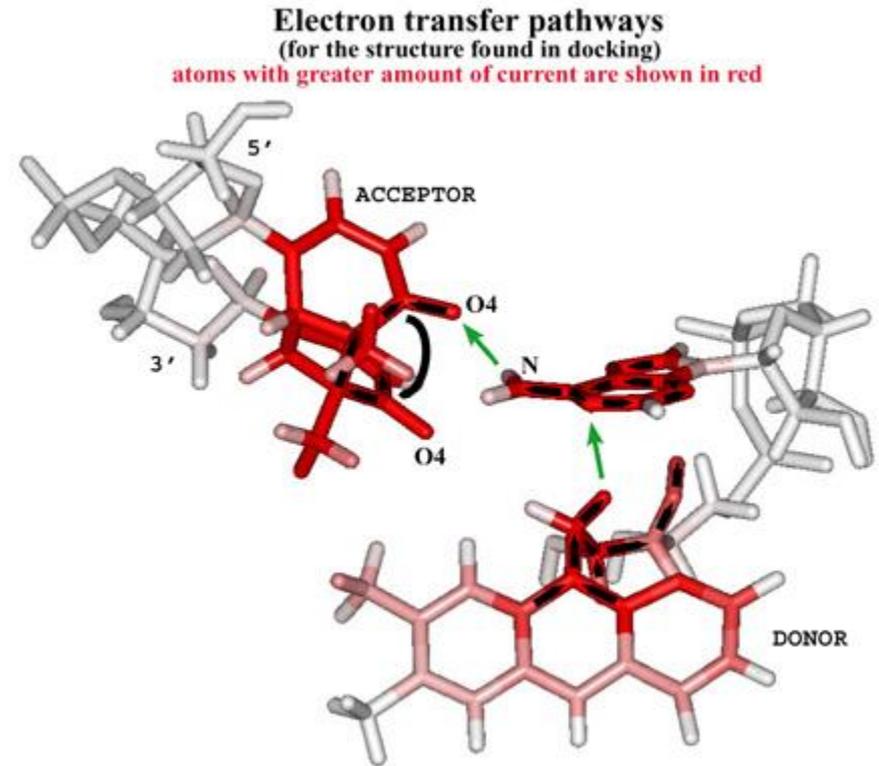
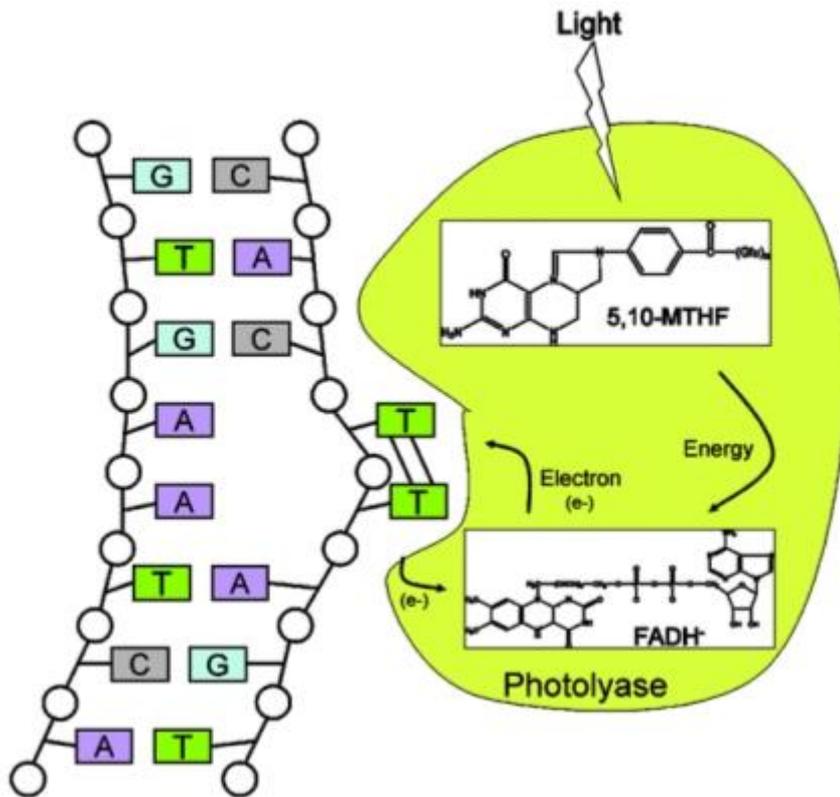


Fotoriattivazione

- 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)

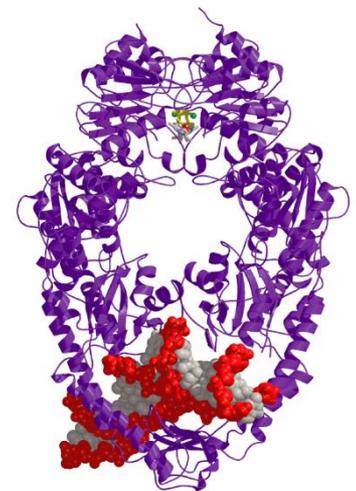
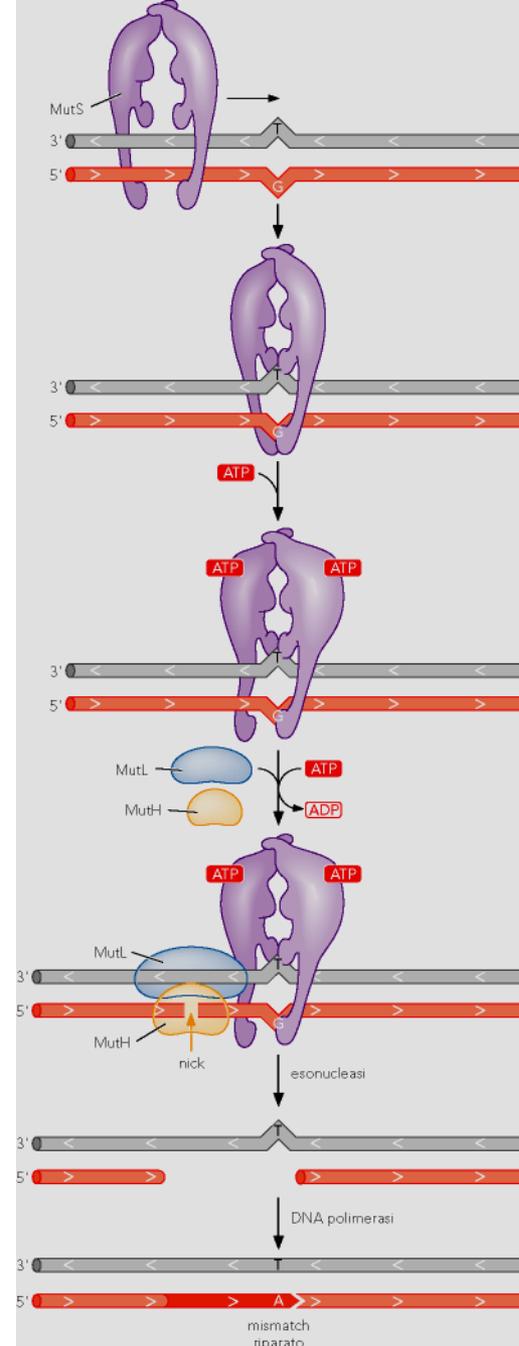
Riparazione del mismatch

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

In *E. coli* il DNA viene analizzato per distorsioni da **Mut S (un dimerico)**, 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.

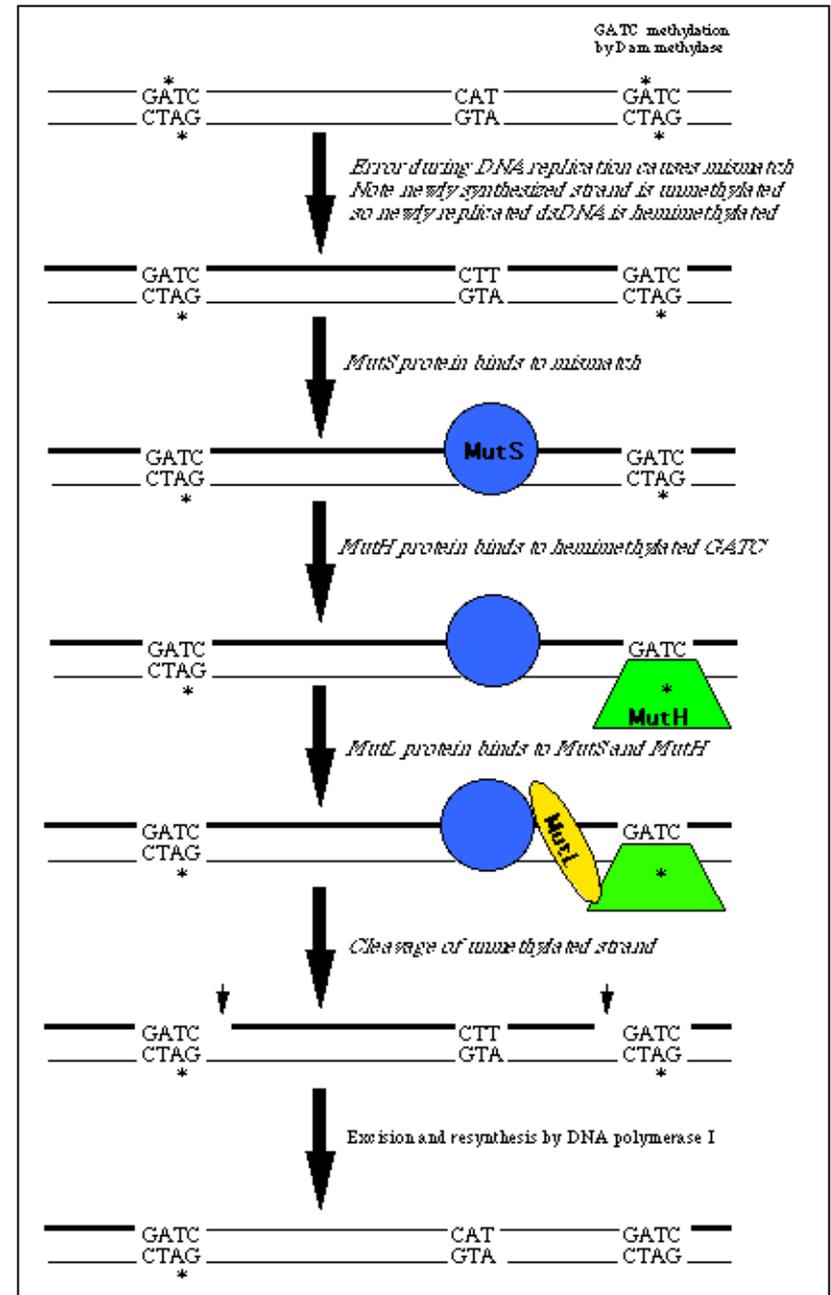
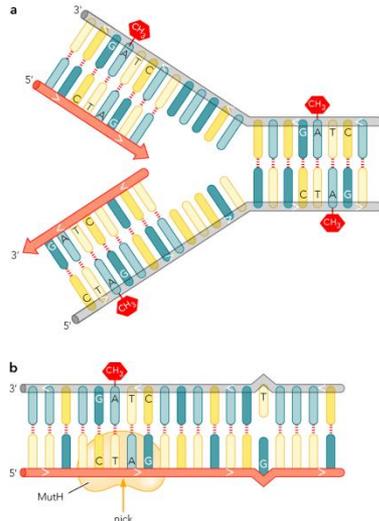


Mismatch repair in *E. coli*

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

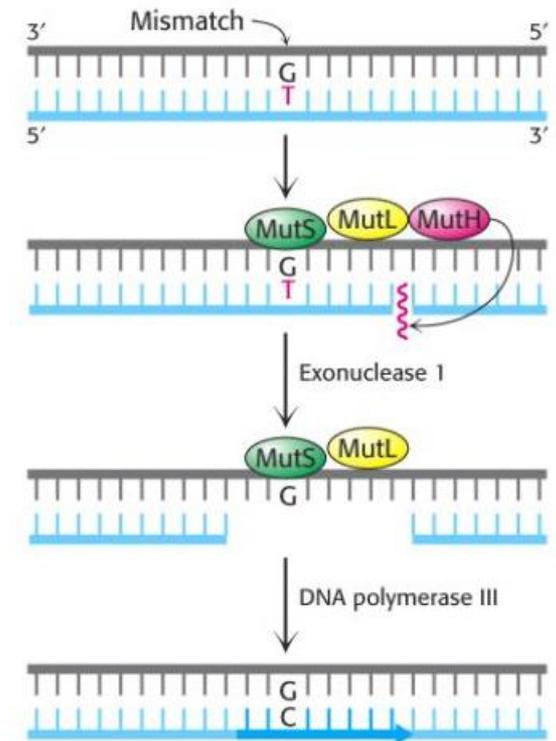
Dalla **metilazione della A** nella sequenza CTAG ad opera della **Dam metilasi**

MutS si lega al filamento non metilato

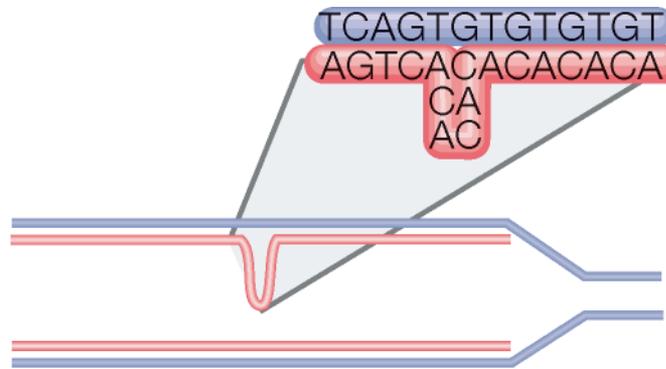


Mismatch repair in Eucarioti

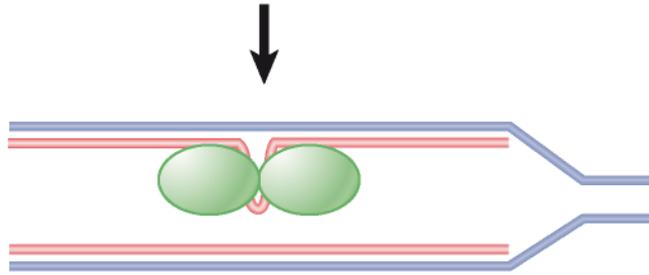
- Gli eucarioti hanno omologhi di Mut(s) con più alta specificità (per mismatch, indels etc)
- Non hanno Dam Metilasi, riconoscono il filamento stampo dalle incisioni dei frammenti di Okasaki. Sono associate al sliding clamp
- Mutazioni dei geni predispongono ai tumori



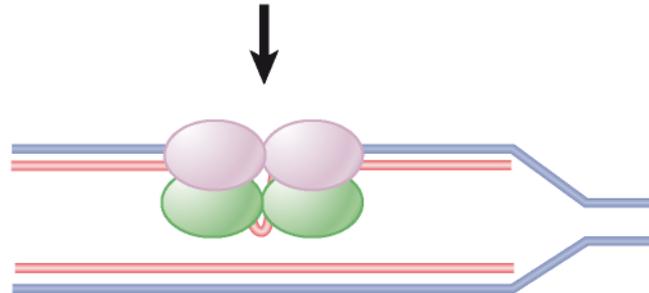
Lo slittamento replicativo genera un'ansa a singolo filamento



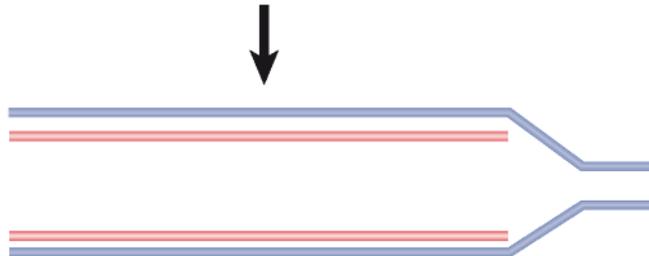
MutS si lega al sito dell'accoppiamento sbagliato



MutL si lega



L'accoppiamento sbagliato è corretto attraverso l'azione di esonucleasi, elicasi, DNA polimerasi e ligasi

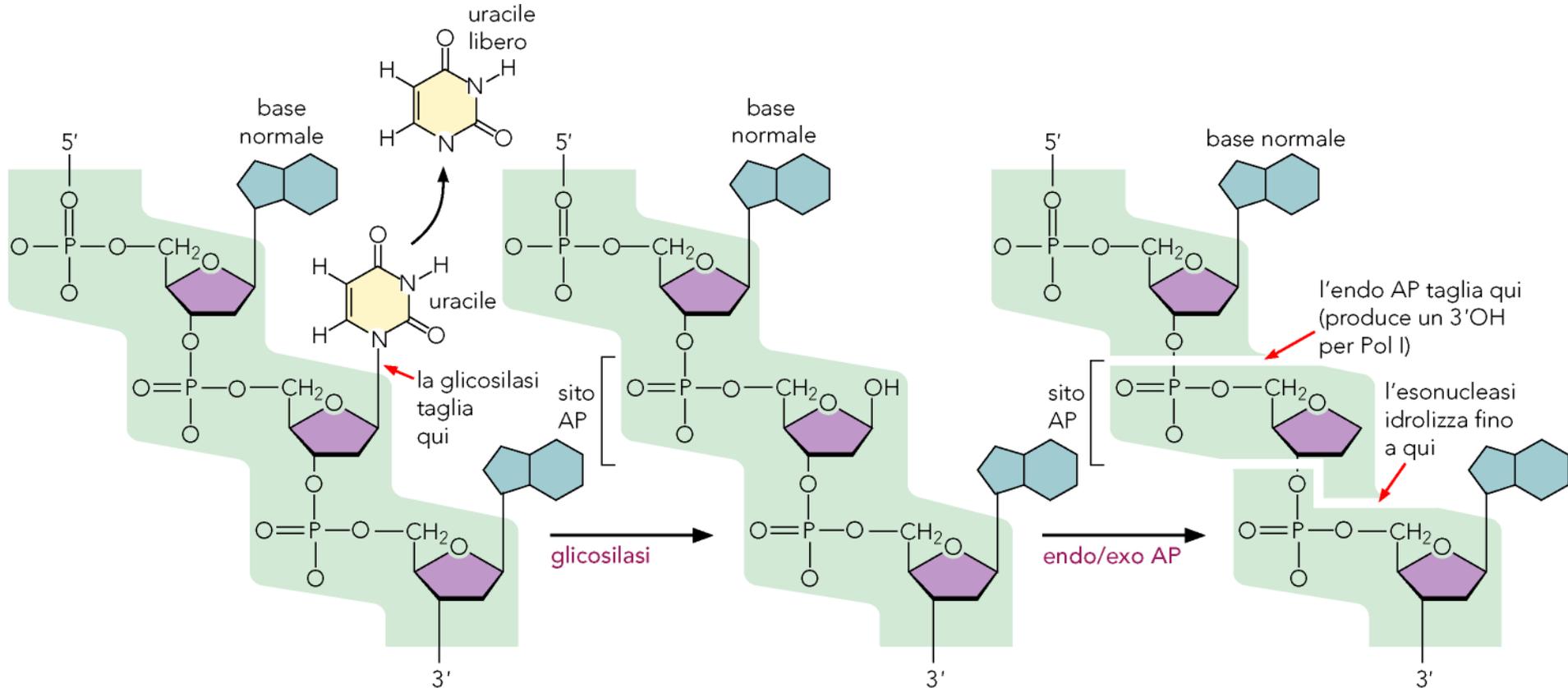


Escissione delle basi

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 d-ribosio 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.



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

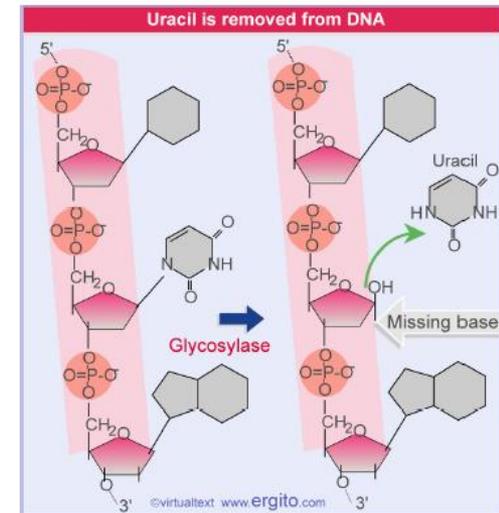


Figure 15.41 A glycosylase removes a base from DNA by cleaving the bond to the deoxyribose.

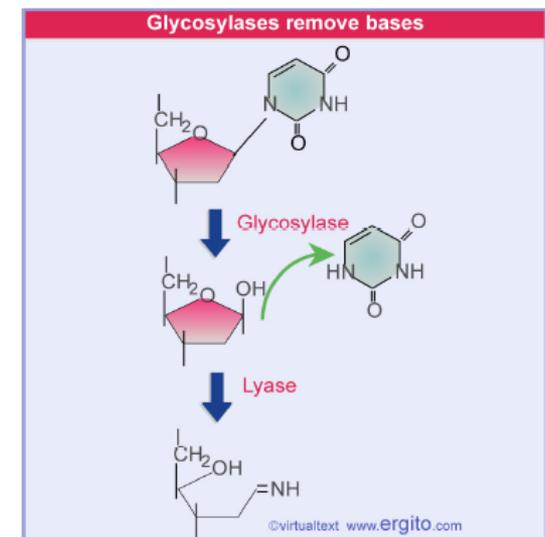
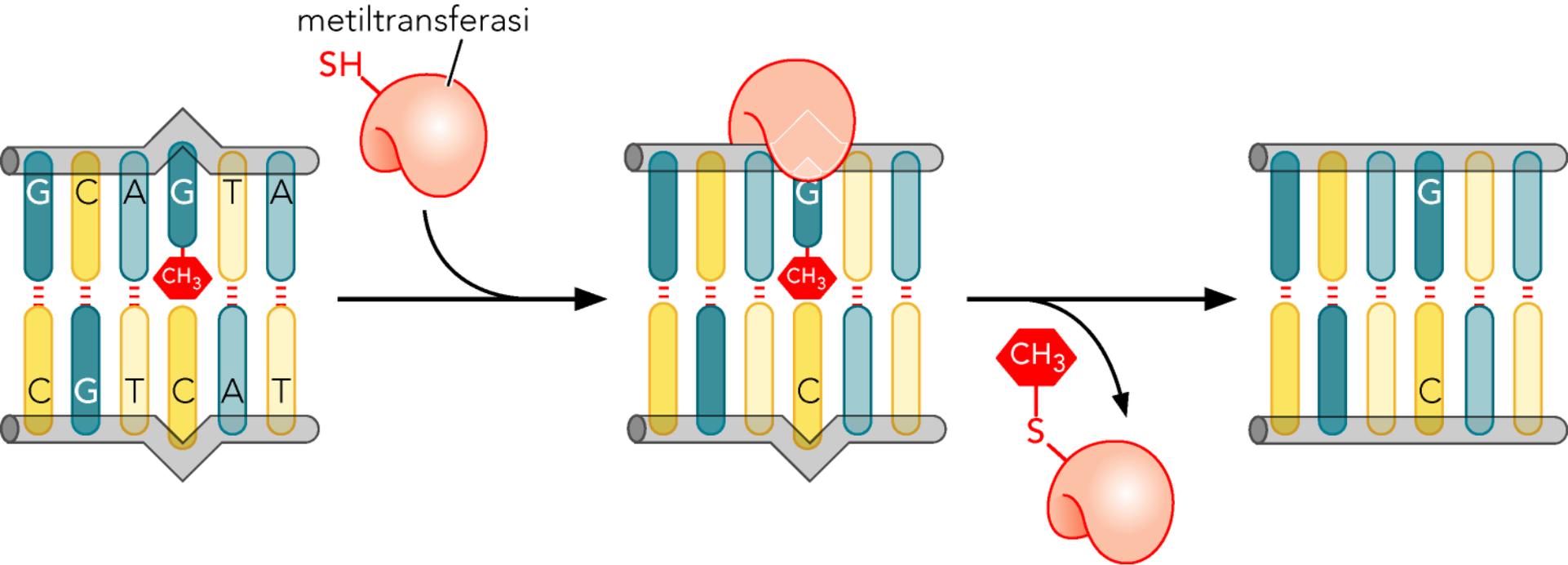
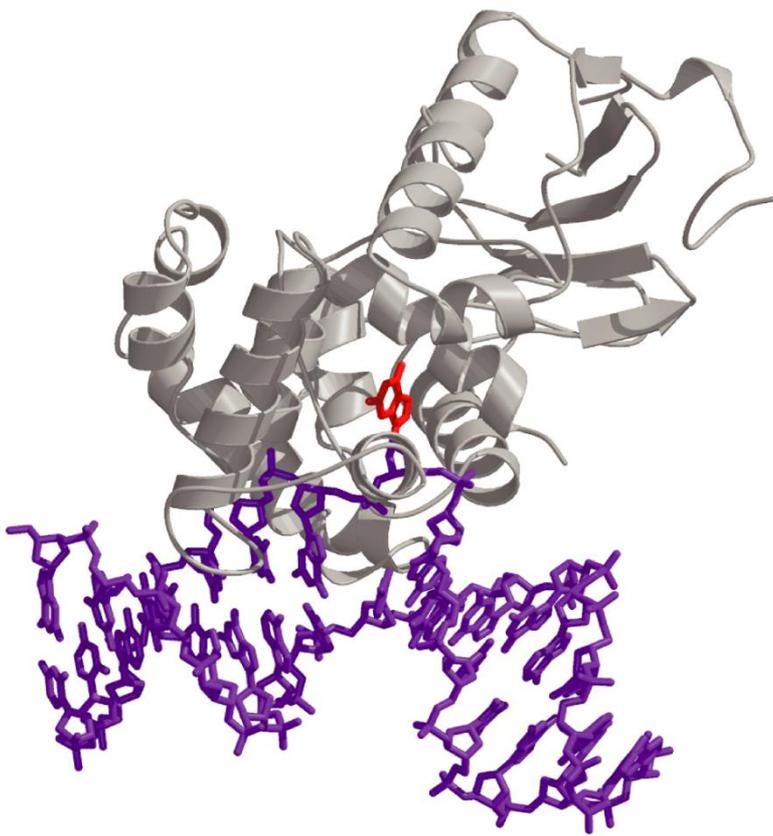


Figure 15.42 A glycosylase hydrolyzes the bond between base and deoxyribose (using H_2O), but a lyase takes the reaction further by opening the sugar ring (using NH_2).



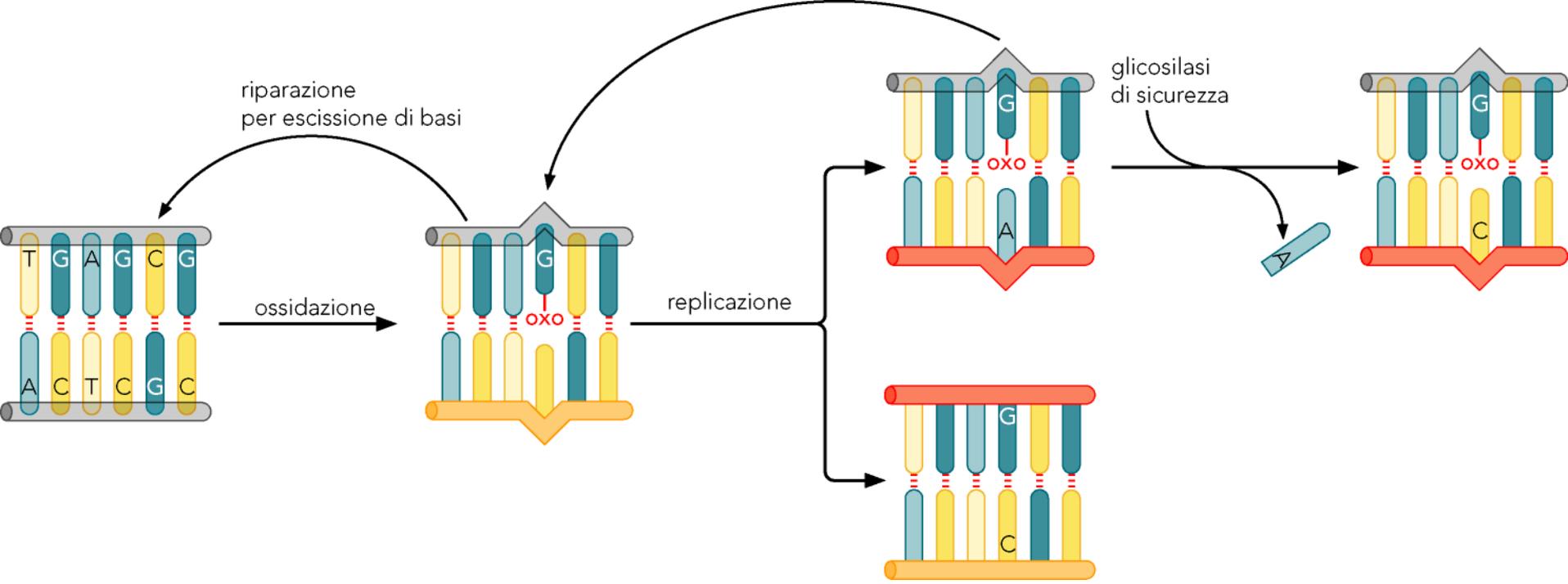
Demetilazione della G

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).



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.



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

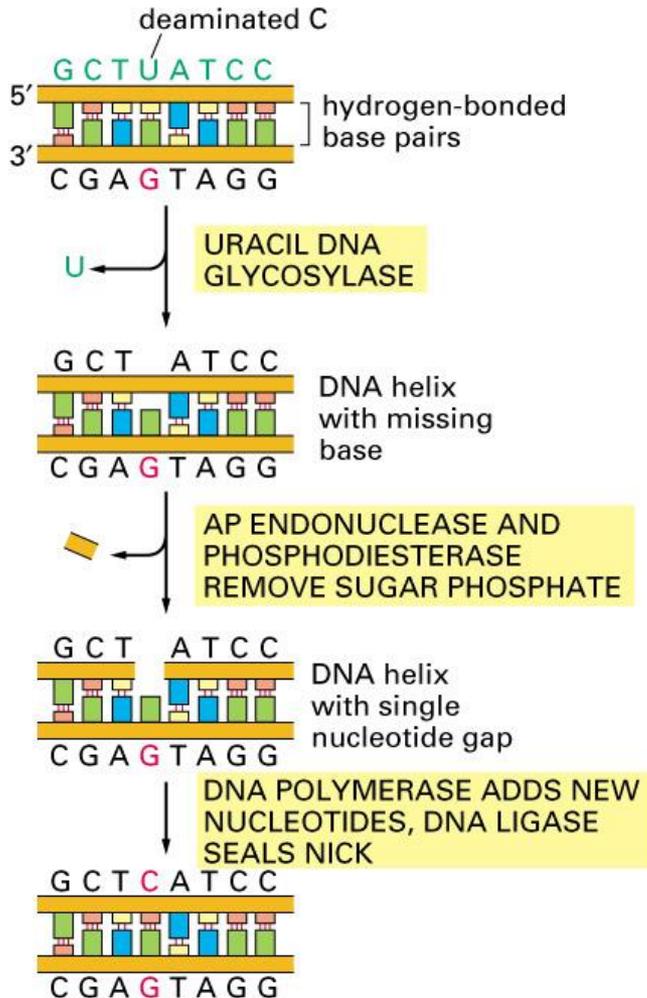


Figure 5-50 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Riconoscimento da base-flipping

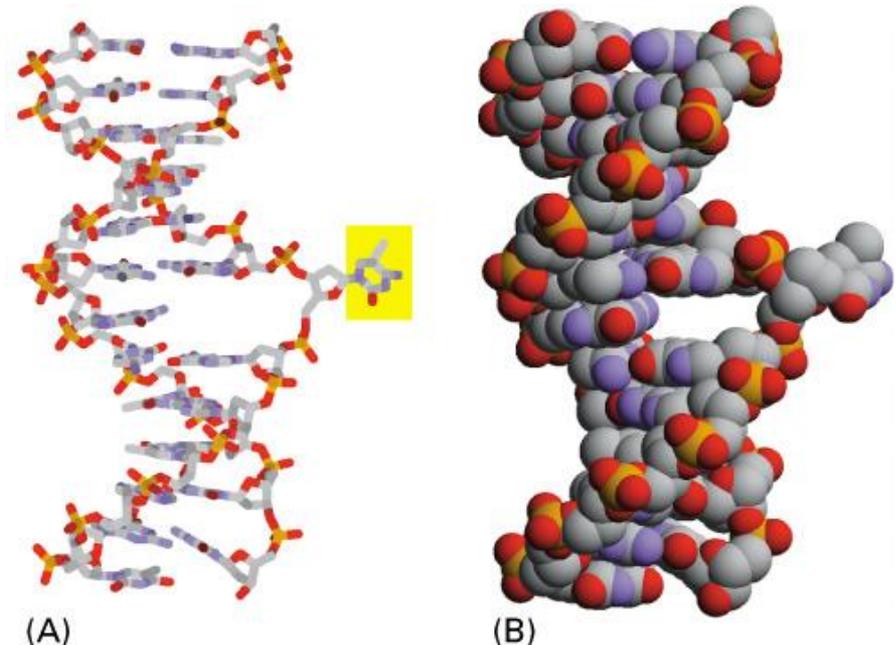
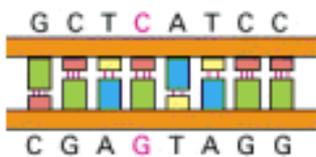
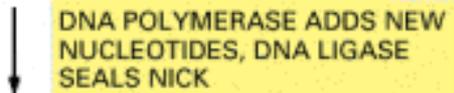
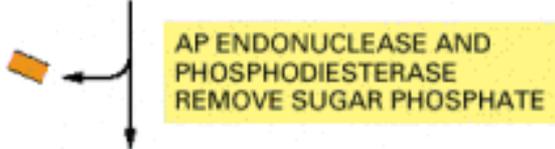
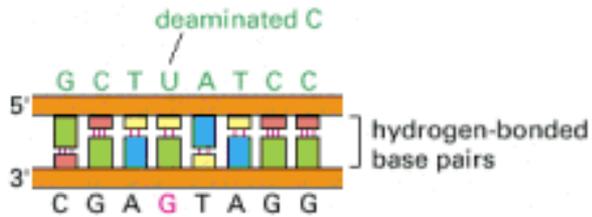
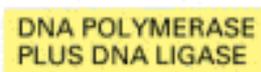
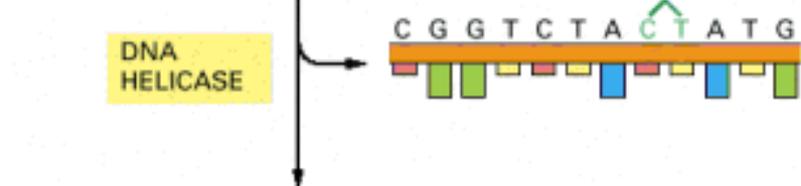
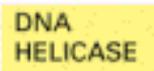
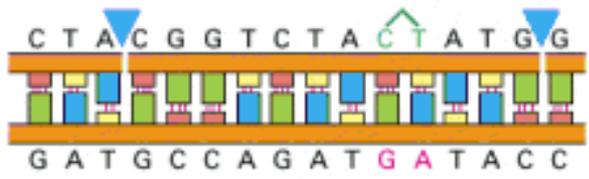
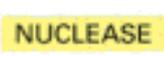
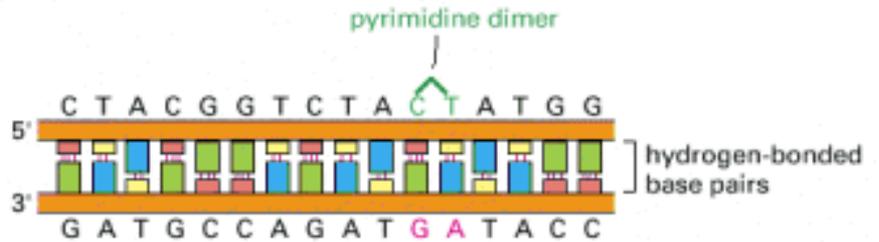


Figure 5-51. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

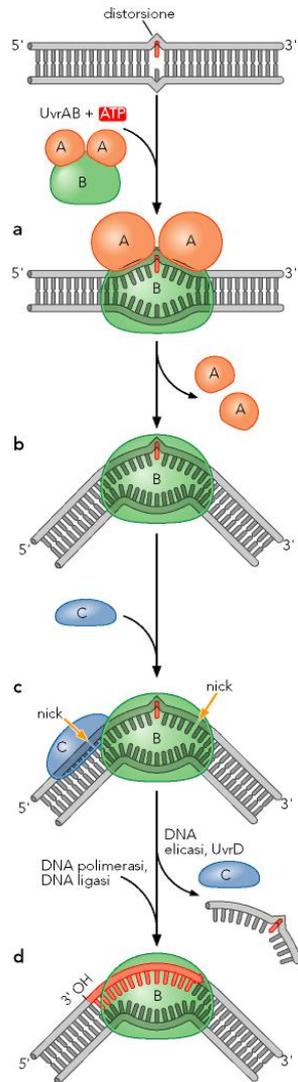
(A) BASE EXCISION REPAIR



(B) NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

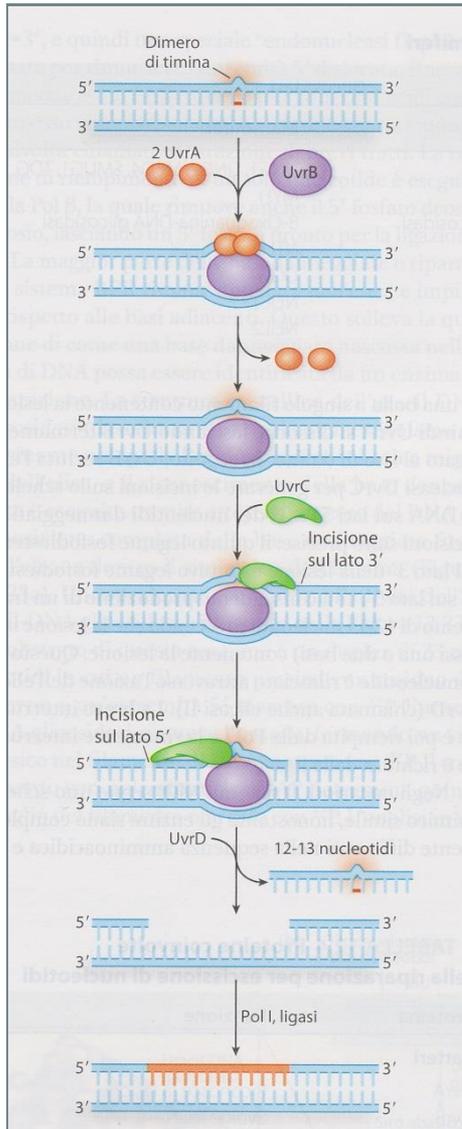


Sistema di riparo per escissione di nucleotidi

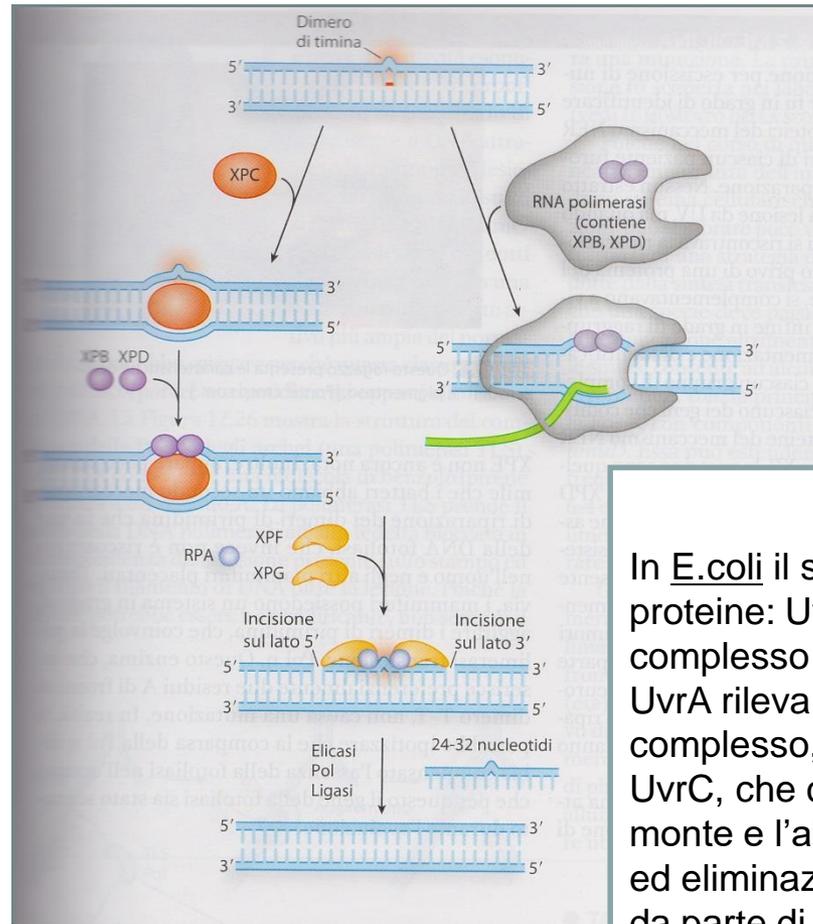


Gli enzimi di questo sistema di riparo non riconoscono le lesioni come tali, ma le conseguenti distorsioni della doppia elica, con rimozione di un corto segmento di DNA a cavallo della lesione.

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.

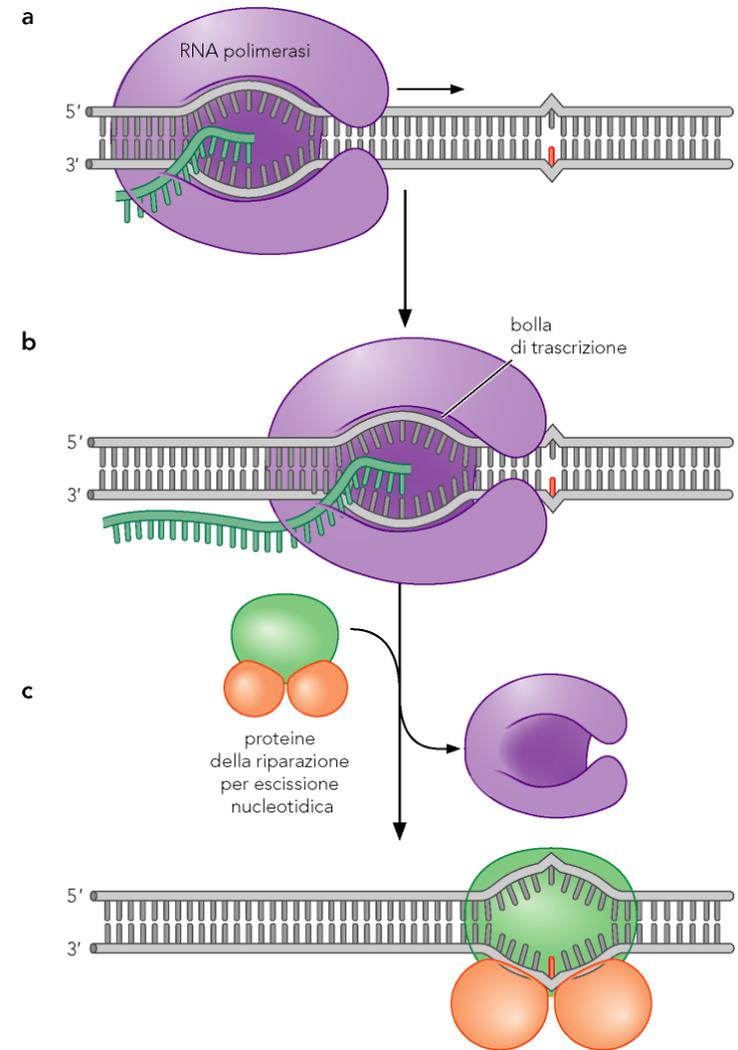
● **TABELLA 12.4 Proteine coinvolte nella riparazione per escissione di nucleotidi**

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

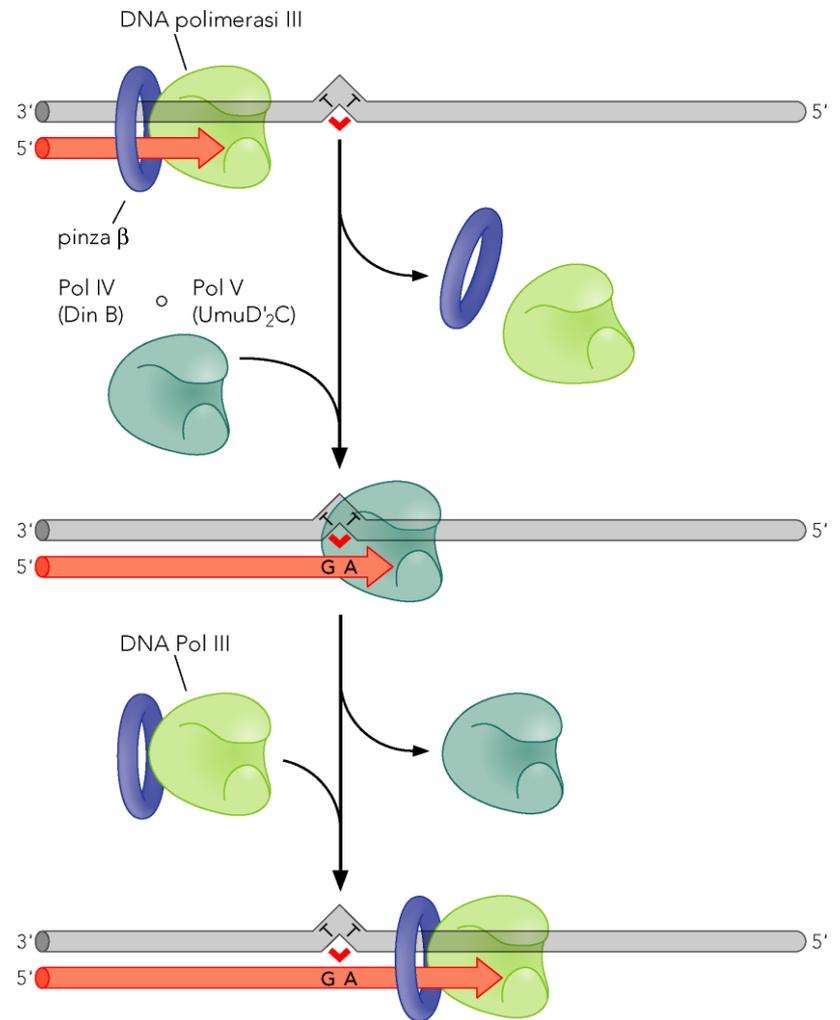
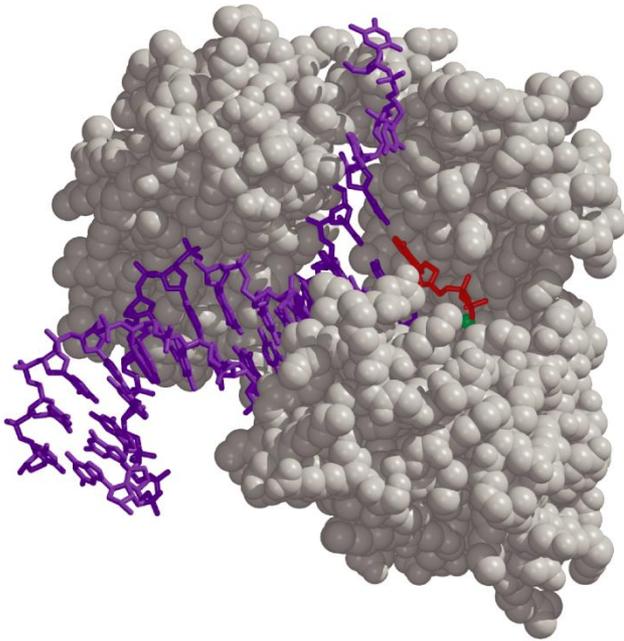
Riparo per ricombinazione omologa o non omologa

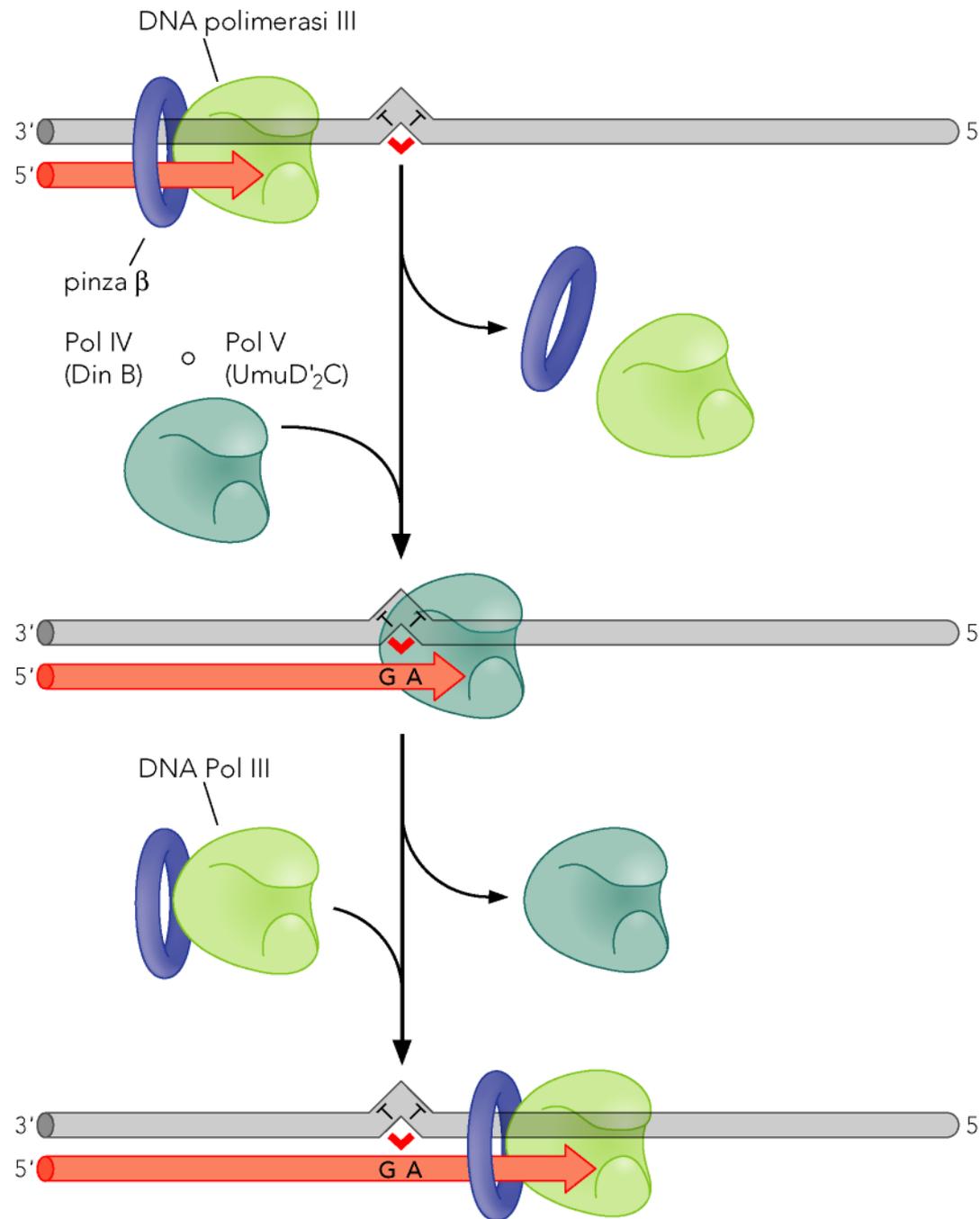
Sintesi translesione

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

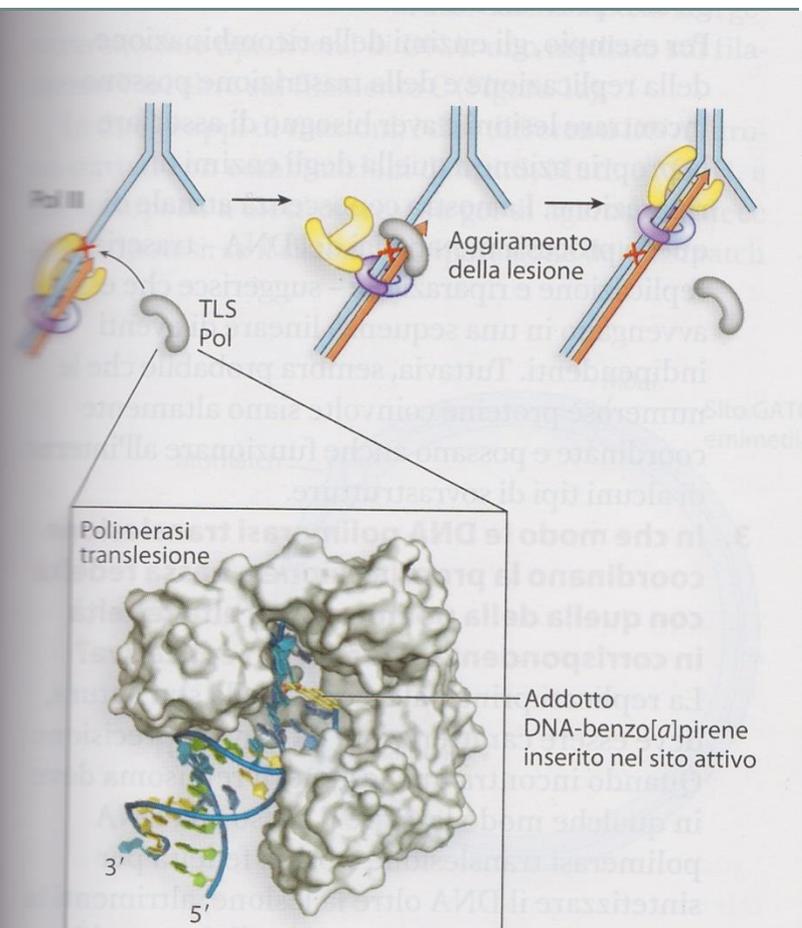




Sintesi translesione del DNA

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.



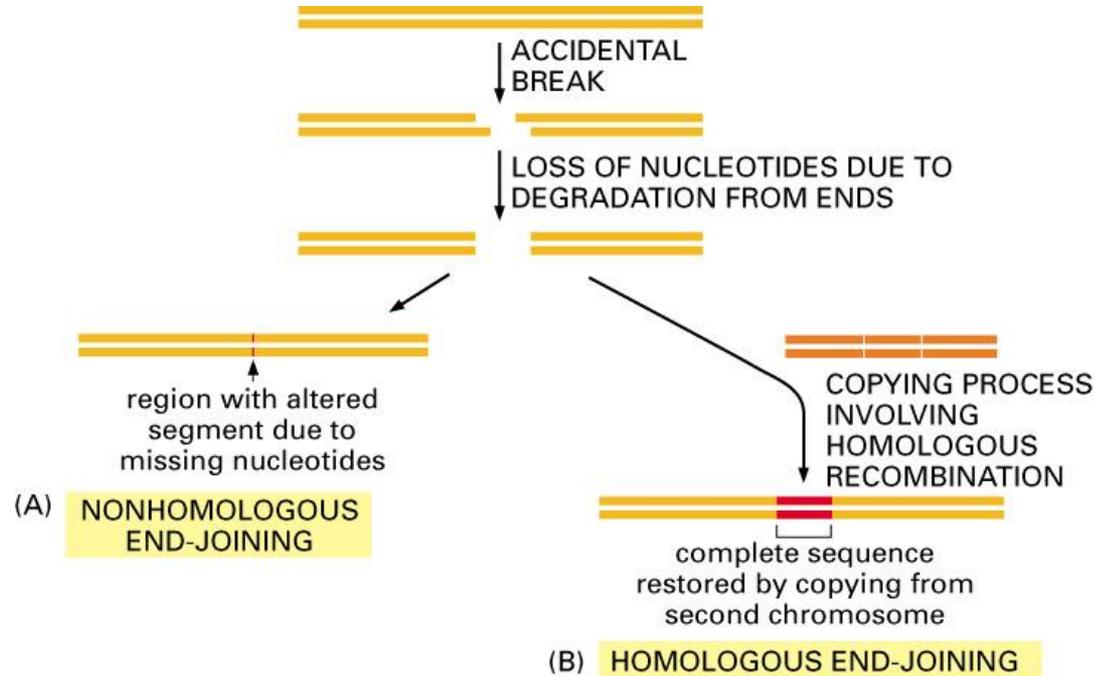
● **TABELLA 12.5 DNA polimerasi specializzate coinvolte nella sintesi translesione**

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



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.

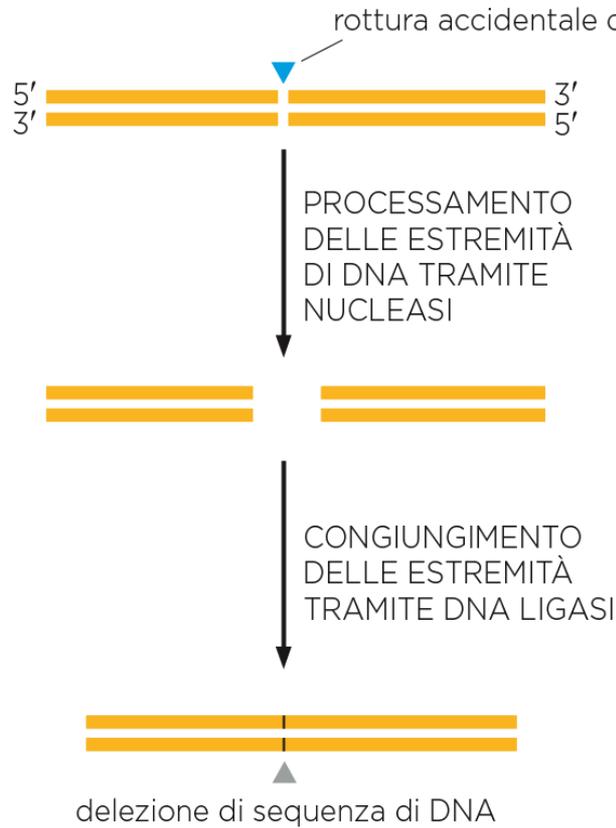
Questo processo è iniziato da una singola protein chinasi, ATM
Poi ATM, ATR e DNAPK fosforilano l'histone H2AX, in vicinanza dei DSB.

Il riparo viene effettuato da due diversi meccanismi:

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

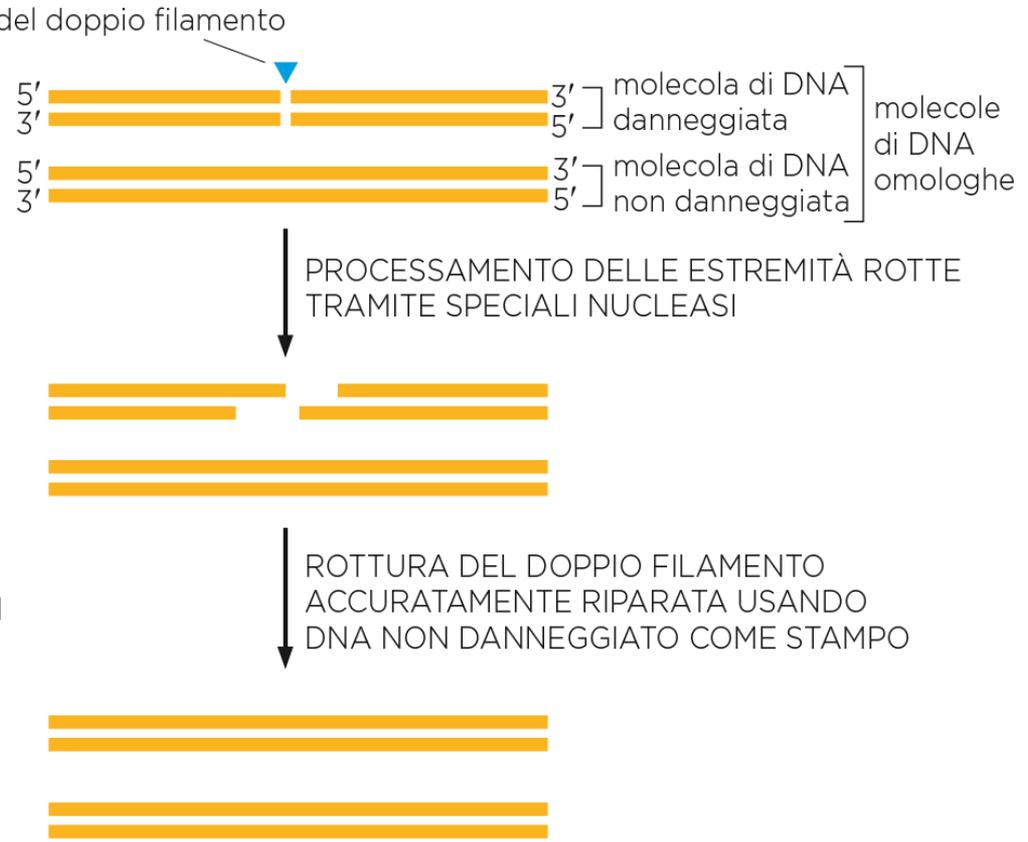
HR, riparo basato sulla ricombinazione omologa (ripara in S, G2 e M)

(A) CONGIUNGIMENTO DI ESTREMITÀ NON OMOLOGHE

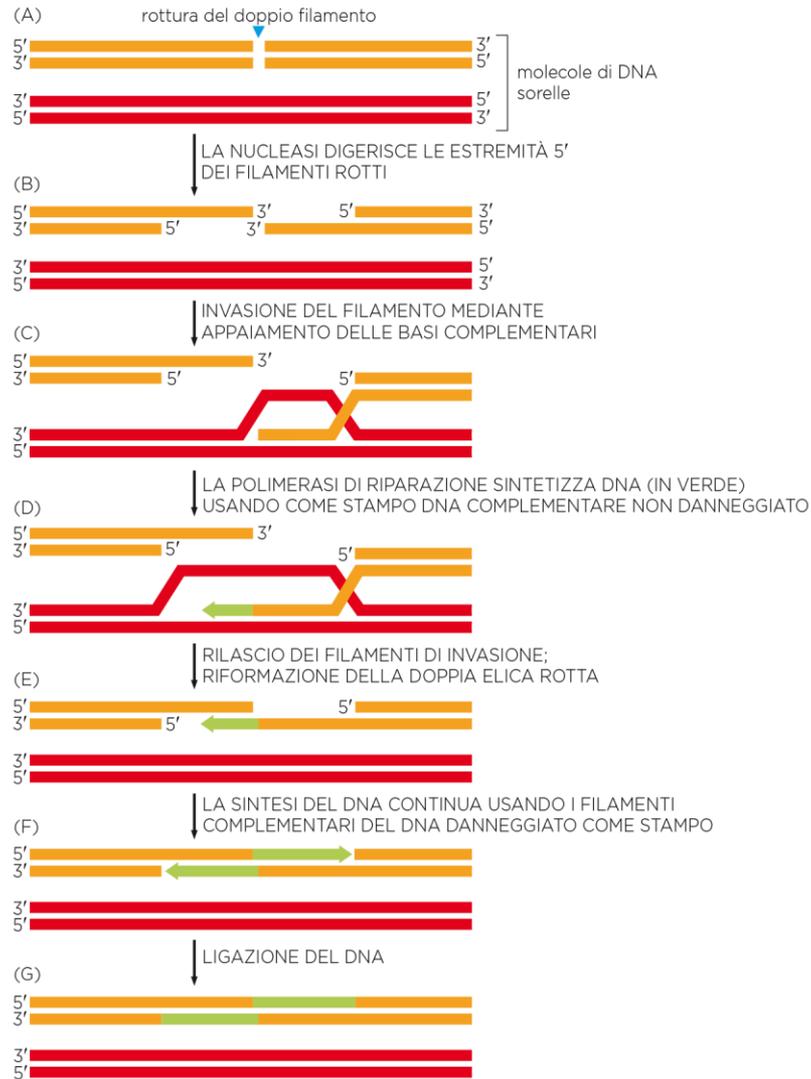


ROTTURA RIPARATA CON ALCUNE PERDITE DI NUCLEOTIDI IN CORRISPONDENZA DEL SITO DI RIPARAZIONE

(B) RICOMBINAZIONE OMOLOGA



ROTTURA RIPARATA SENZA PERDITE DI NUCLEOTIDI IN CORRISPONDENZA DEL SITO DI RIPARAZIONE



RIPARAZIONE ACCURATA DELLA ROTTURA DEL DOPPIO FILAMENTO

Modello della Rottura del double strand (DSB)

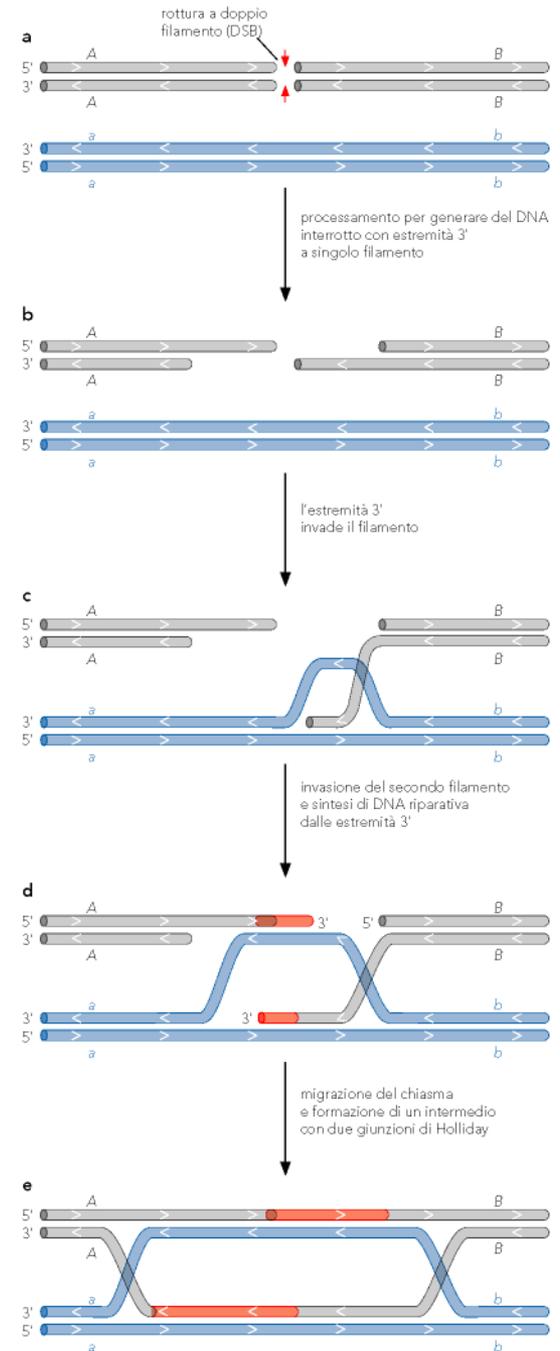
Lo scambio genetico solitamente inizia con un taglio del double strand (**double strand brake**)

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'accettore



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

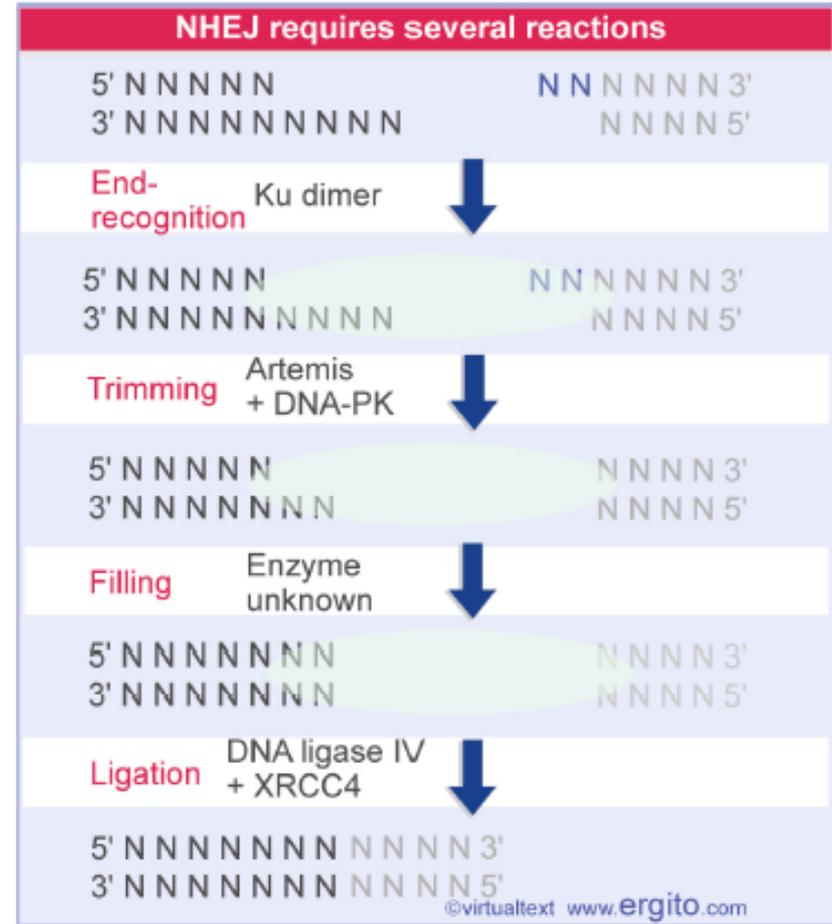
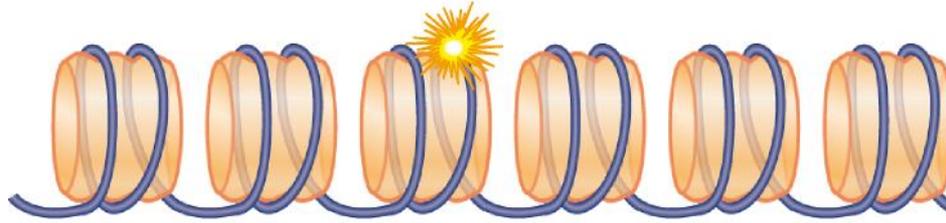


Figure 15.54 Nonhomologous end joining requires recognition of the broken ends, trimming of overhanging ends and/or filling, followed by ligation.

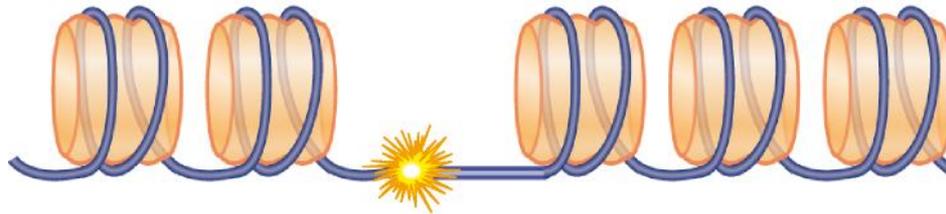
In una regione cromatinica avviene un danno



Rimodellamento



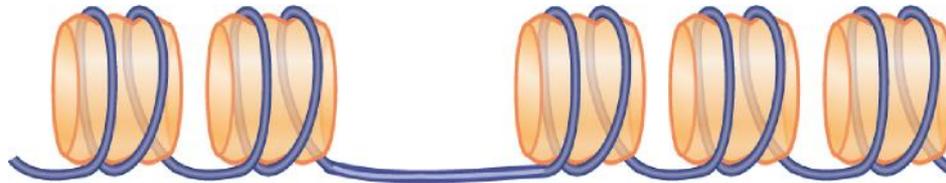
Il rimodellamento permette l'accesso alla lesione



Riparazione



La lesione è riparata



Ricostituzione



L'assemblaggio della cromatina ricostruisce la struttura originale

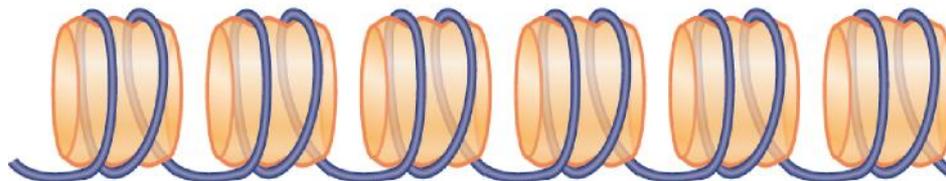


TABLE 5-2 Inherited Syndromes with Defects in DNA Repair

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.

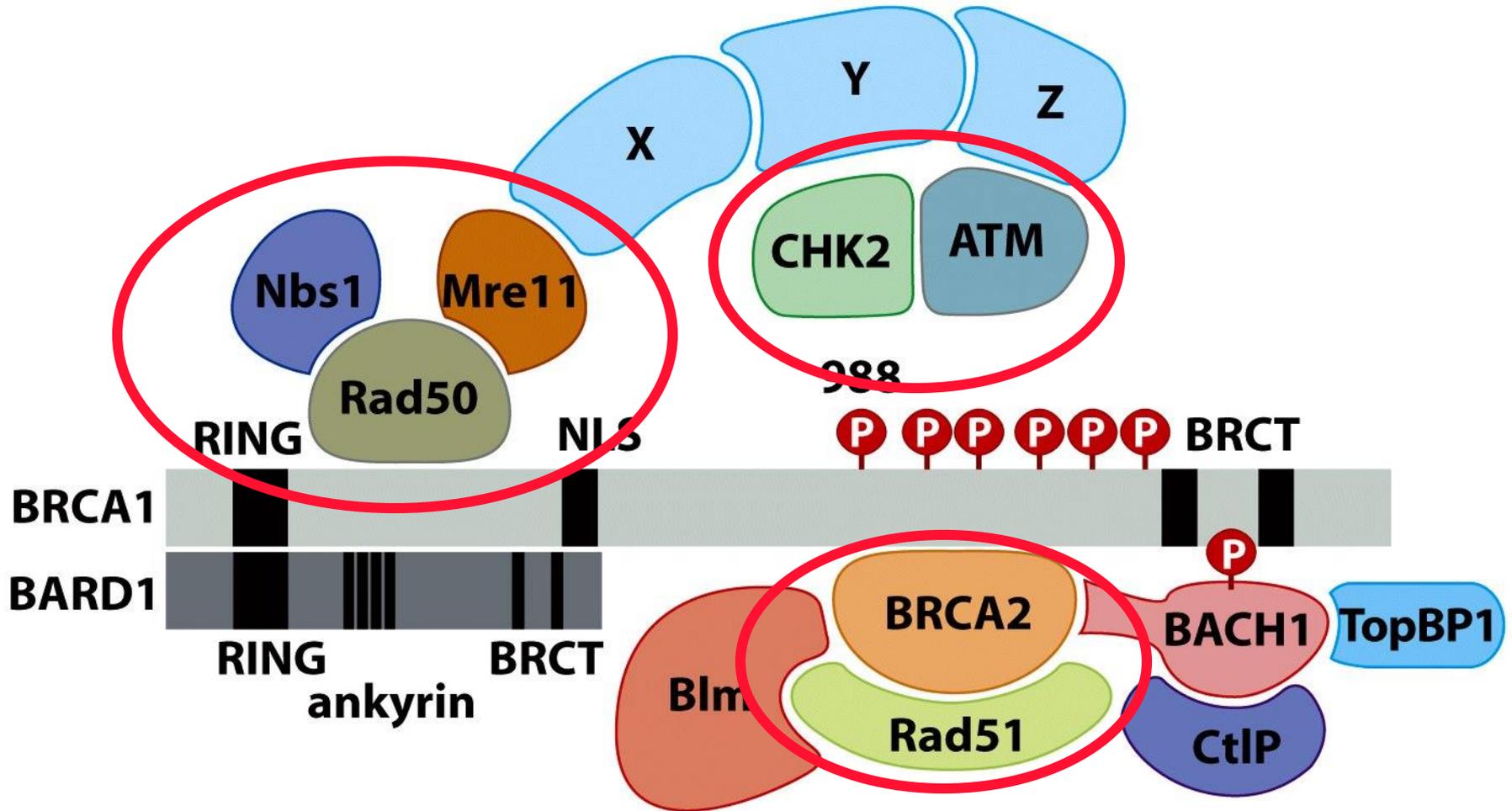


Dermatologia OnLine

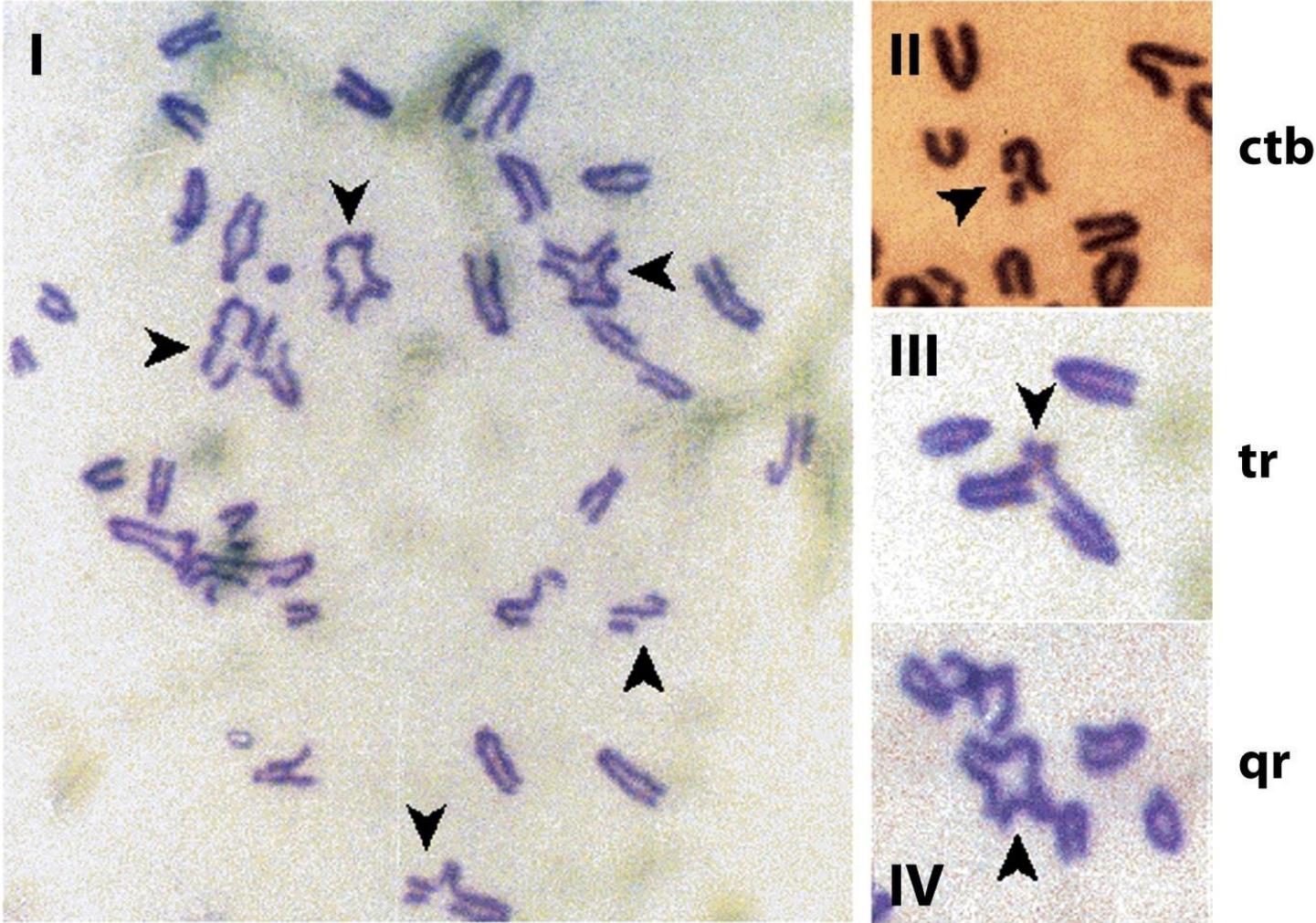
Tabella 17.6 Malattie genetiche associate a difetti nei sistemi di riparazione del DNA

<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



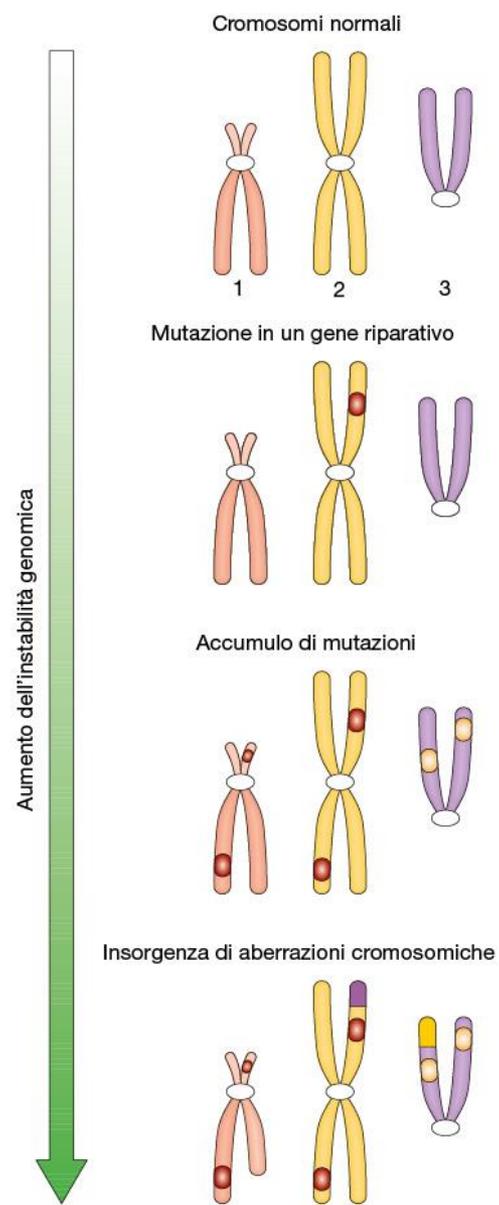


Figura 7.15A Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

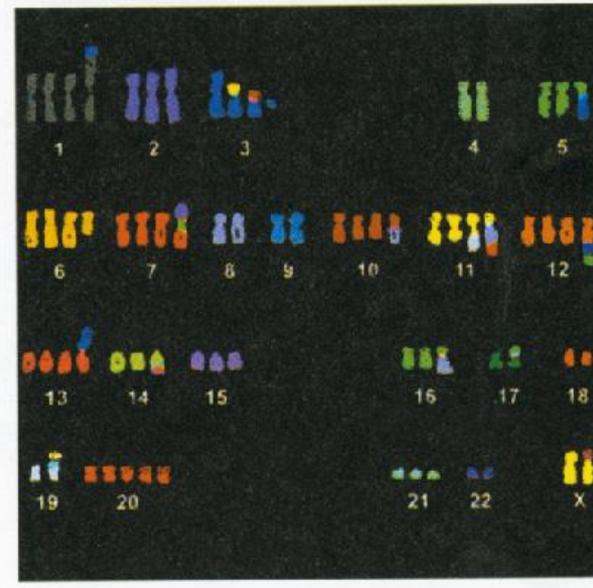
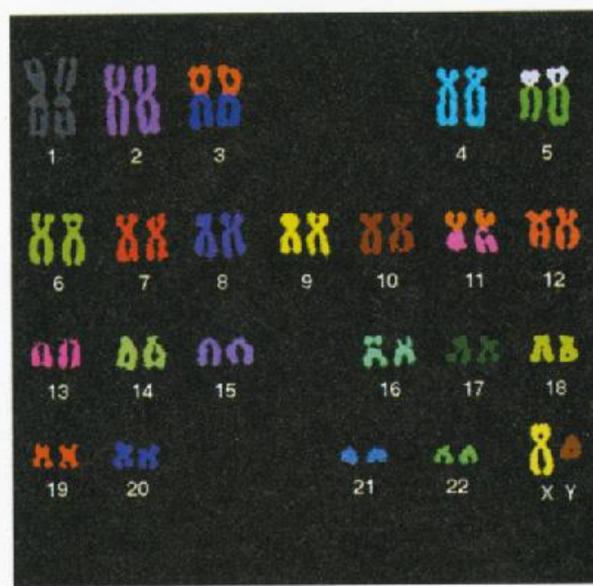


Figura 7.15B Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

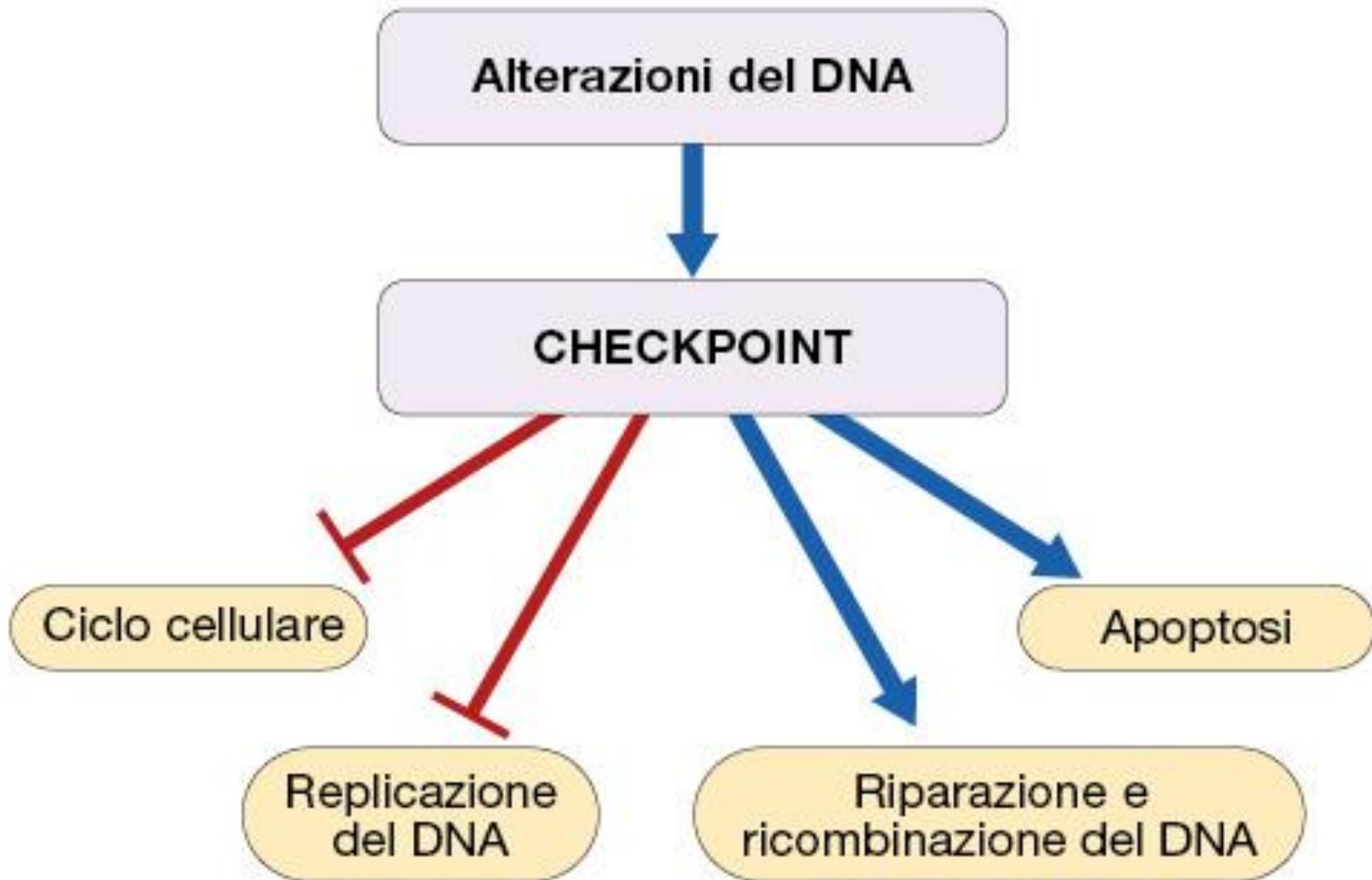


Figura 7.11 La risposta cellulare a danni al DNA attiva il checkpoint.

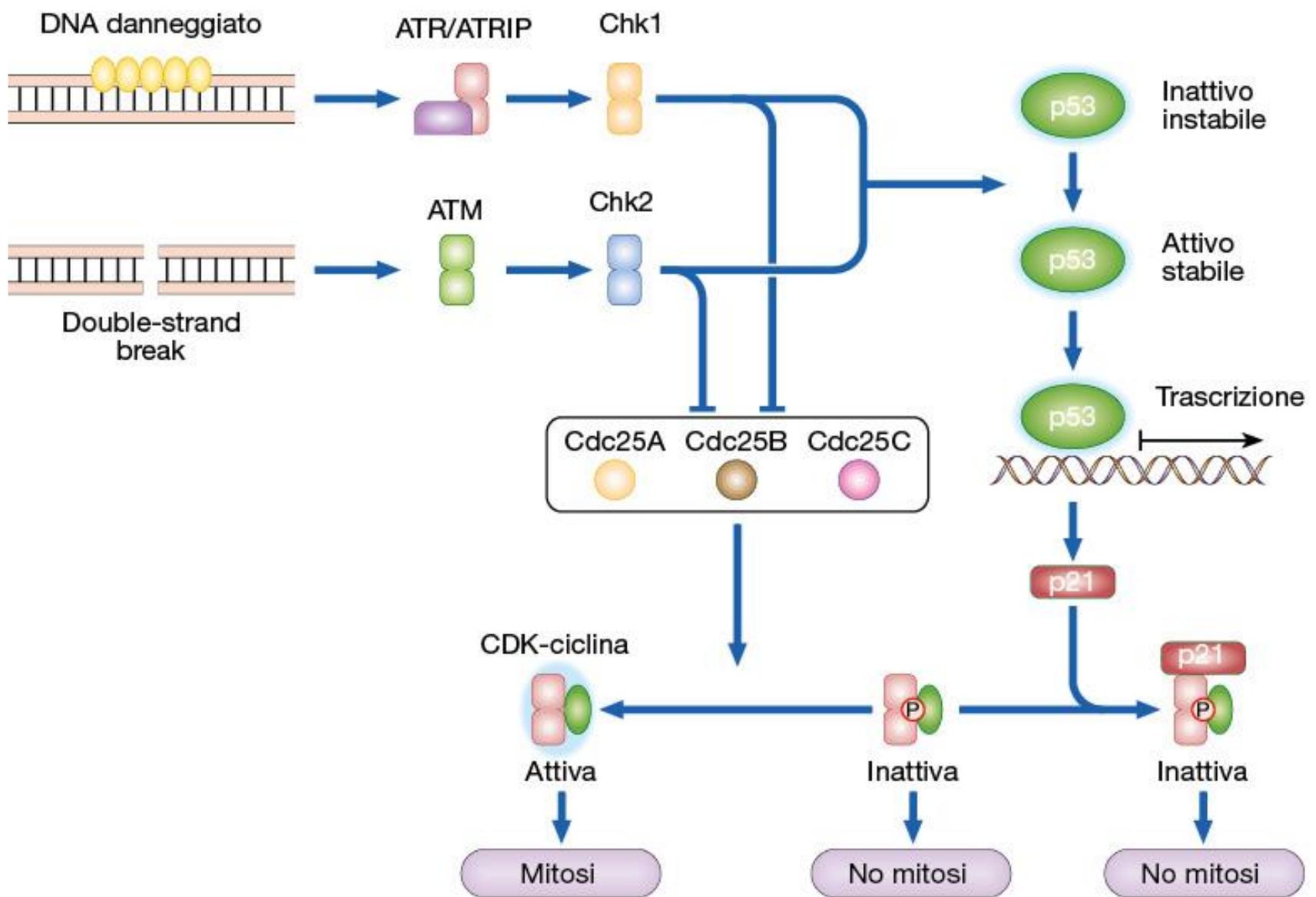


Figura 7.14 Il checkpoint da danno al DNA agisce su p53 e Cdc25 bloccando l'entrata in mitosi.