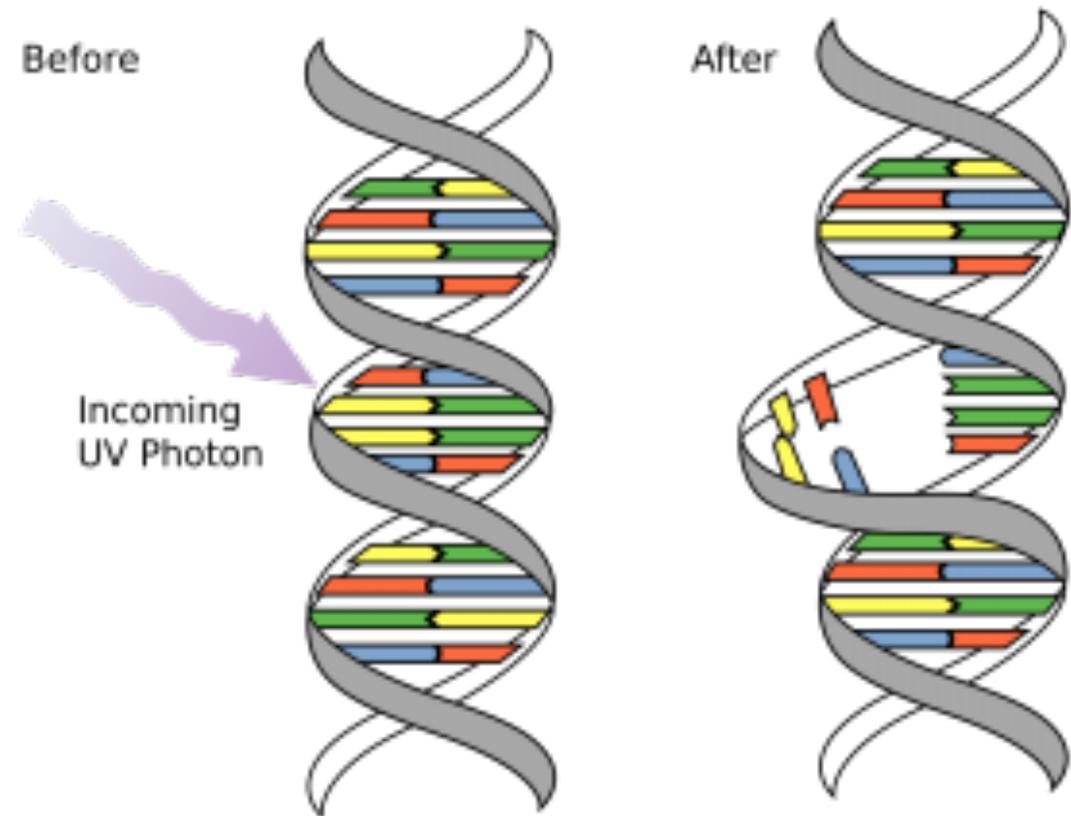


PASSWORD MOODLE FEDERALE

biomol

La mutabilita e la riparazione del DNA

Mutations are alterations to a DNA sequence



A. MUTAZIONI

- **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. (Ma la mutabilità in sé può esserlo...).

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, anche in ragione del fatto che il sito di inserzione è definito da poche copie di basi e quindi comune nel genoma. 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**) o **processi biologici** (malattie neurodegenerative)
- 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
- 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 **deamminanti**
 - Da agenti **intercalanti**
 - Da agenti **ossidanti** (anche intrinseci al metabolismo)
 - Da agenti **mimetici delle basi**

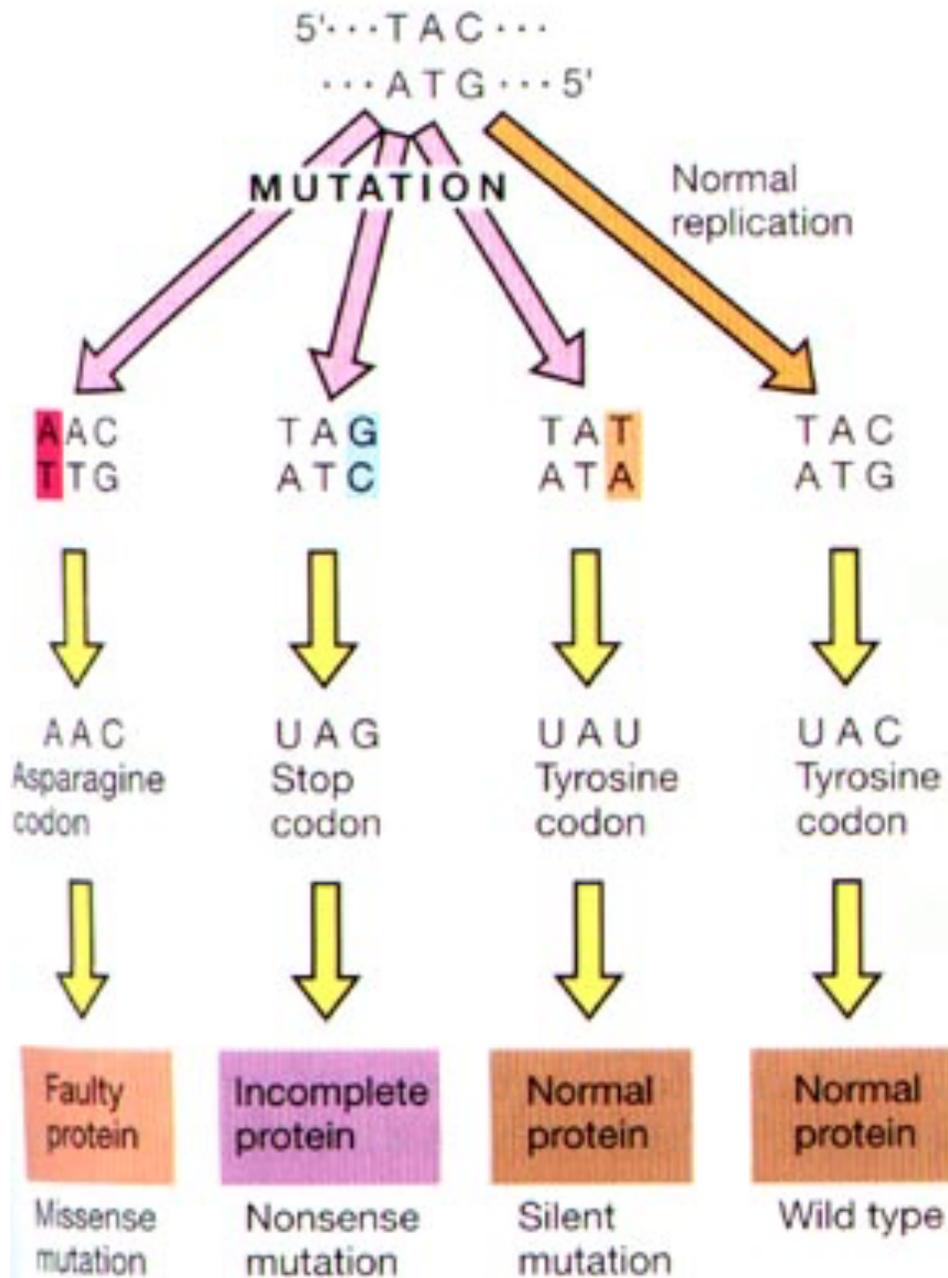
TIPI DI MUTAZIONI

Frequenza: In media la frequenza con cui insorge una nuova mutazione su un qualunque sito varia fra 10^{-6} e 10^{-11} per ciclo di replicazione.

Errori della DNA Polimerasi: 10^{-7}

→ Meccanismi di riparazione del danno al DNA

CONSEQUENCES OF “UNREPAIRED” MUTATIONS

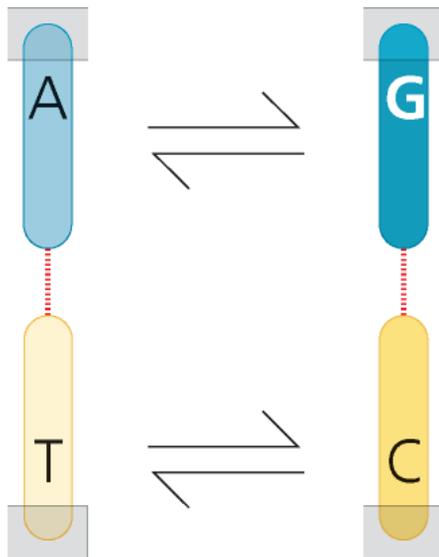


TIPI DI MUTAZIONI

Mutazioni puntiformi: mutazioni a carico di un solo nucleotide

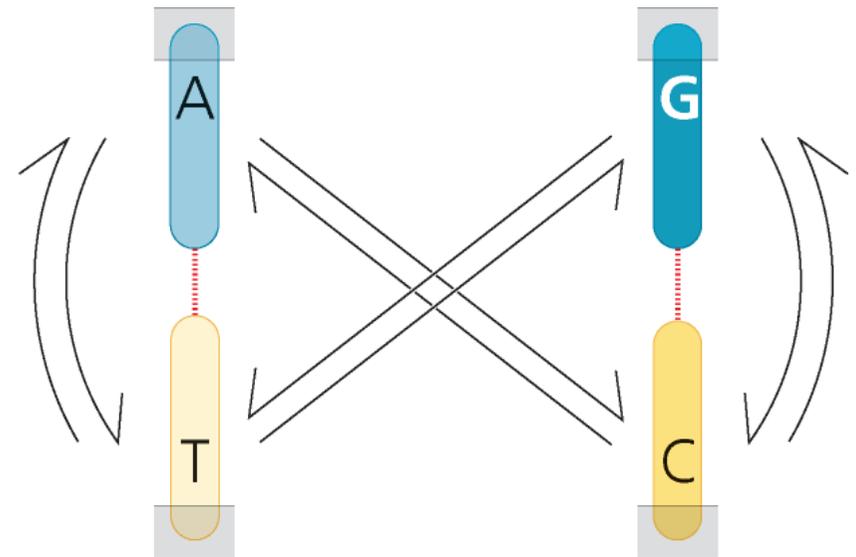
Transizioni: purina con purina e
pirimidina con pirimidina

a



Transversioni: purina con pirimidina e
pirimidina con purina

b

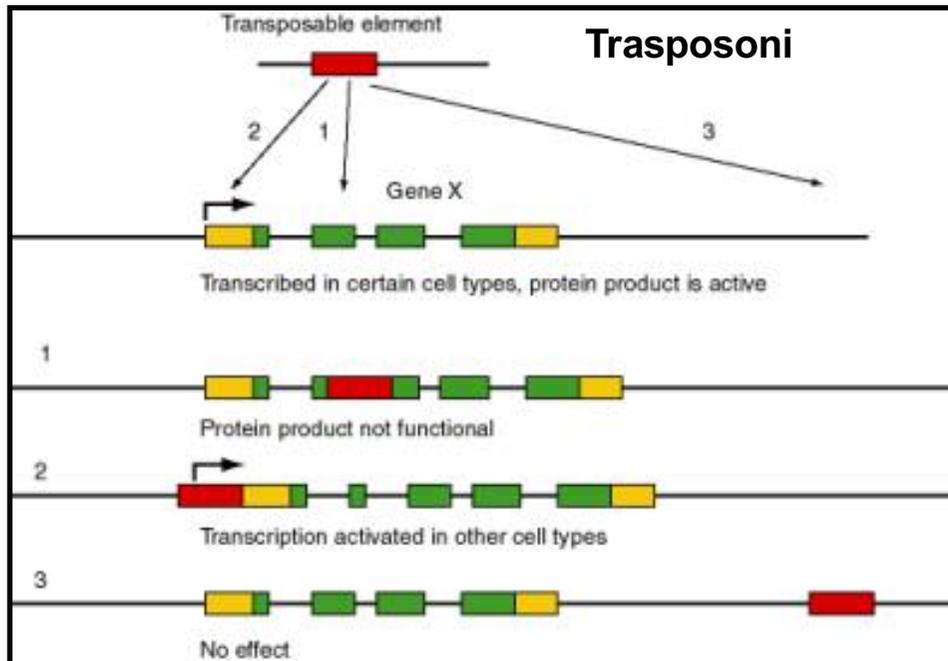


Inserimento o delezione di uno o qualche nucleotide

TIPI DI MUTAZIONI

Altre mutazioni:

- Lunghe inserzioni o delezioni
- Riarrangiamenti grossi della struttura cromosomica
 - Transposoni
 - Ricombinazione anomalo
 - Traslocazioni
 - DNA microsatellite expansions



CML Chronic Myelogenous leukemia

The diagram illustrates the formation of the Philadelphia chromosome through a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22. Chromosome 9 has a red band at 9q34.12 (ABL1 gene), and chromosome 22 has a green band at 22q11.21 (BCR gene). The resulting Philadelphia chromosome (9+22-) contains a fusion of the BCR and ABL1 genes, labeled as "Филаделфийская хромосома".

Philadephia chromosome

95% of Carriers Develop CML Leucemia Mieloide cronica

Translocation results in a constitutively active Abl kinase

Translocation

TIPI DI MUTAZIONI

Altre mutazioni:

- Lunghe inserzioni o delezioni
- Riarrangiamenti grossi della struttura cromosomica
 - Transposoni
 - Ricombinazione anomalo
 - Traslocazioni
 - DNA microsatellite expansions

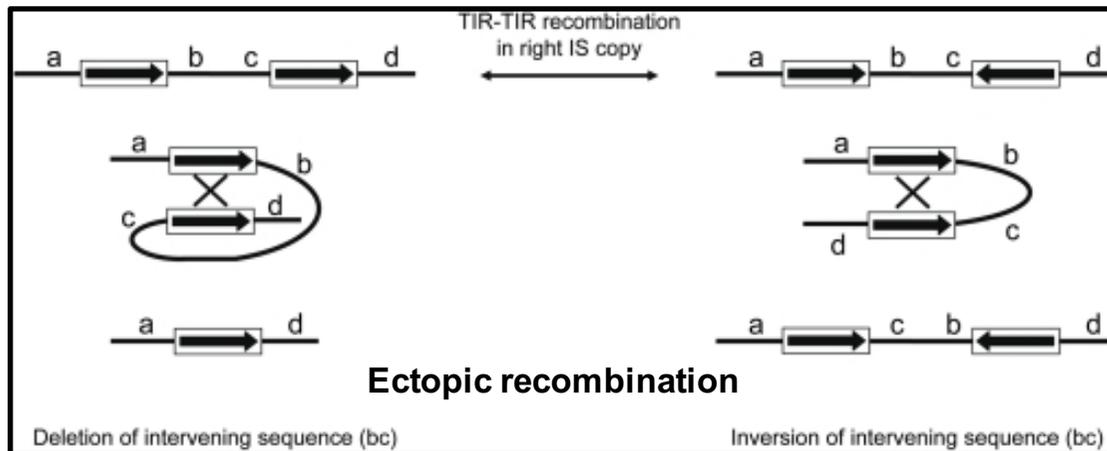
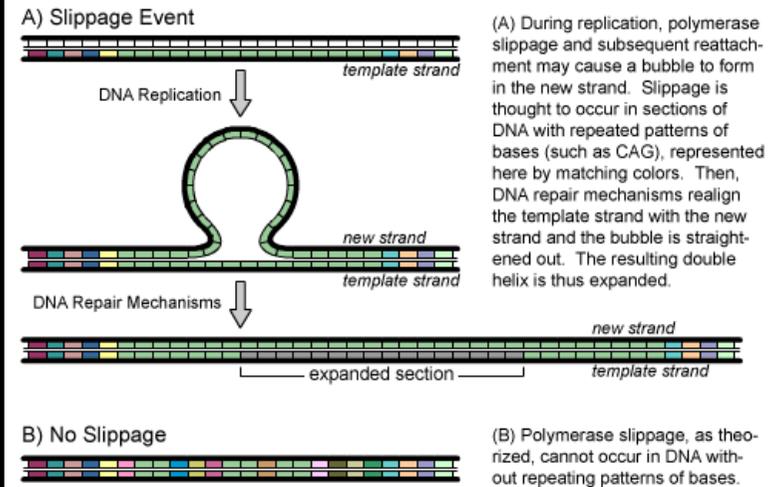


Figure Q-5: The Polymerase Slippage Model



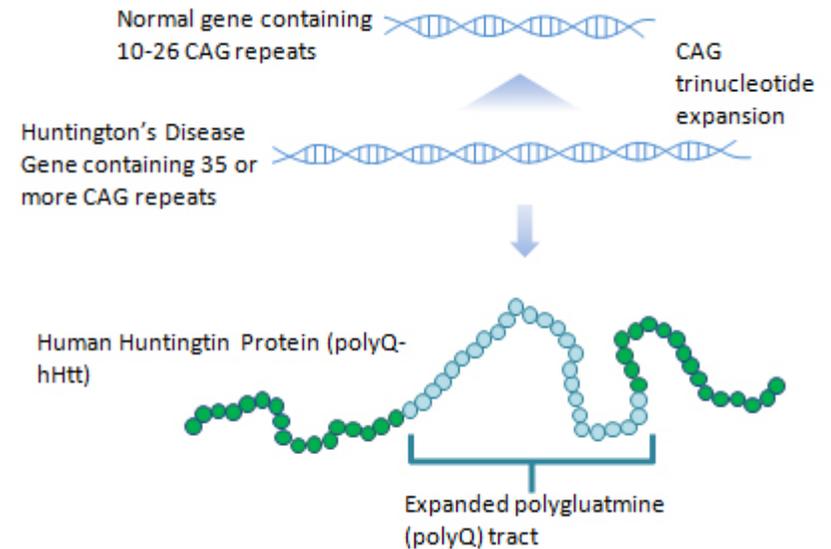
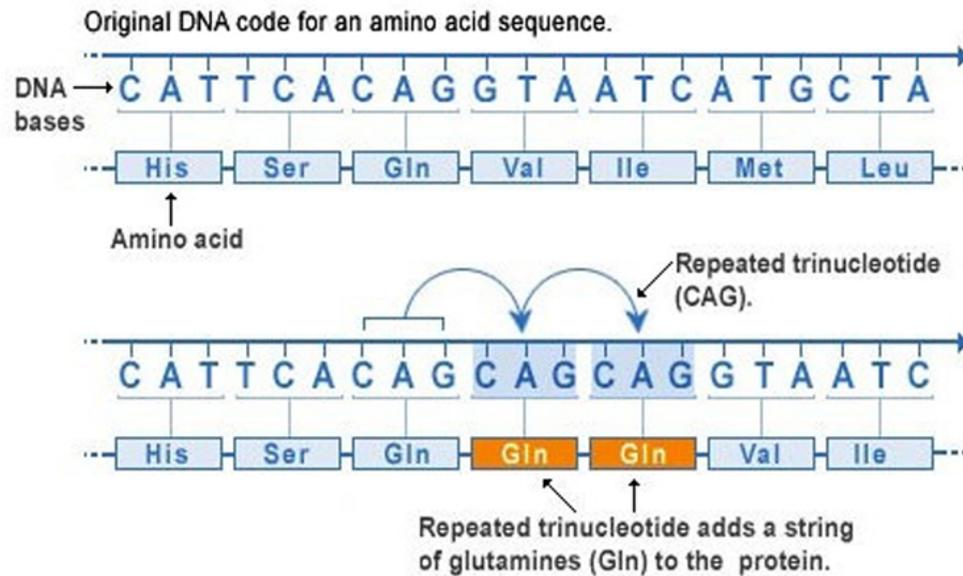
DNA microsatellite: classe di sequenze incline a mutazione, costituite da ripetizioni di brevi sequenze di 2,3 o 4 nucleotidi. Ad es. ripetizione CAG o CA. Il sistema di replicazione ha difficoltà nel copiare in maniera accurata → scivolamento (REPLICATION SLIPPAGE) → allungamento o riduzione della ripetizione → polimorfismo nella popolazione.

Questa espansione può essere causa di malattia. Distrofia muscolare adulta, sindrome dell' X fragile (causa ritardo mentale) e la malattia di Huntington (neurodegenerativa) causate da espansione di triplette.

L' espansione della tripletta CAG (Gln) nella hungtintina → aggiunta di Q nella seq. della proteina → alterazione della funzione.

CAG repeat amplification in the huntington gene

CAG repeat expansion in *HTT*

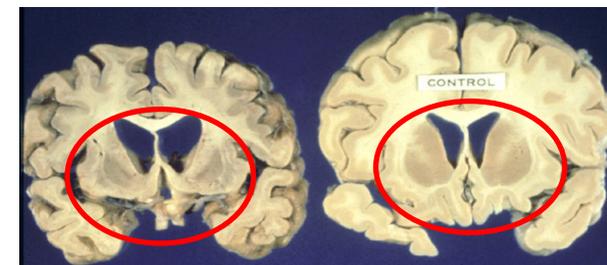
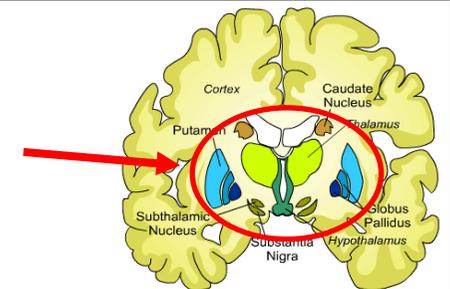


3144-amino-acid neuronal protein. Expansion of microsatellite in *Huntingtin* gene causes the disease. 28 or fewer CAG repeats: normal. Individuals with HD usually have 40 or more repeats. A small percentage of individuals, however, have a number of repeats that fall within a borderline region.

No. of CAG repeats	Outcome
<28	Normal range; individual will not develop HD
29-34	Individual will not develop HD but the next generation is at risk
35-39	Some, but not all, individuals in this range will develop HD; next generation at risk
>40	Individual will develop HD

Huntington's disease results from nerve cell degeneration in the basal ganglia

autosomal dominant

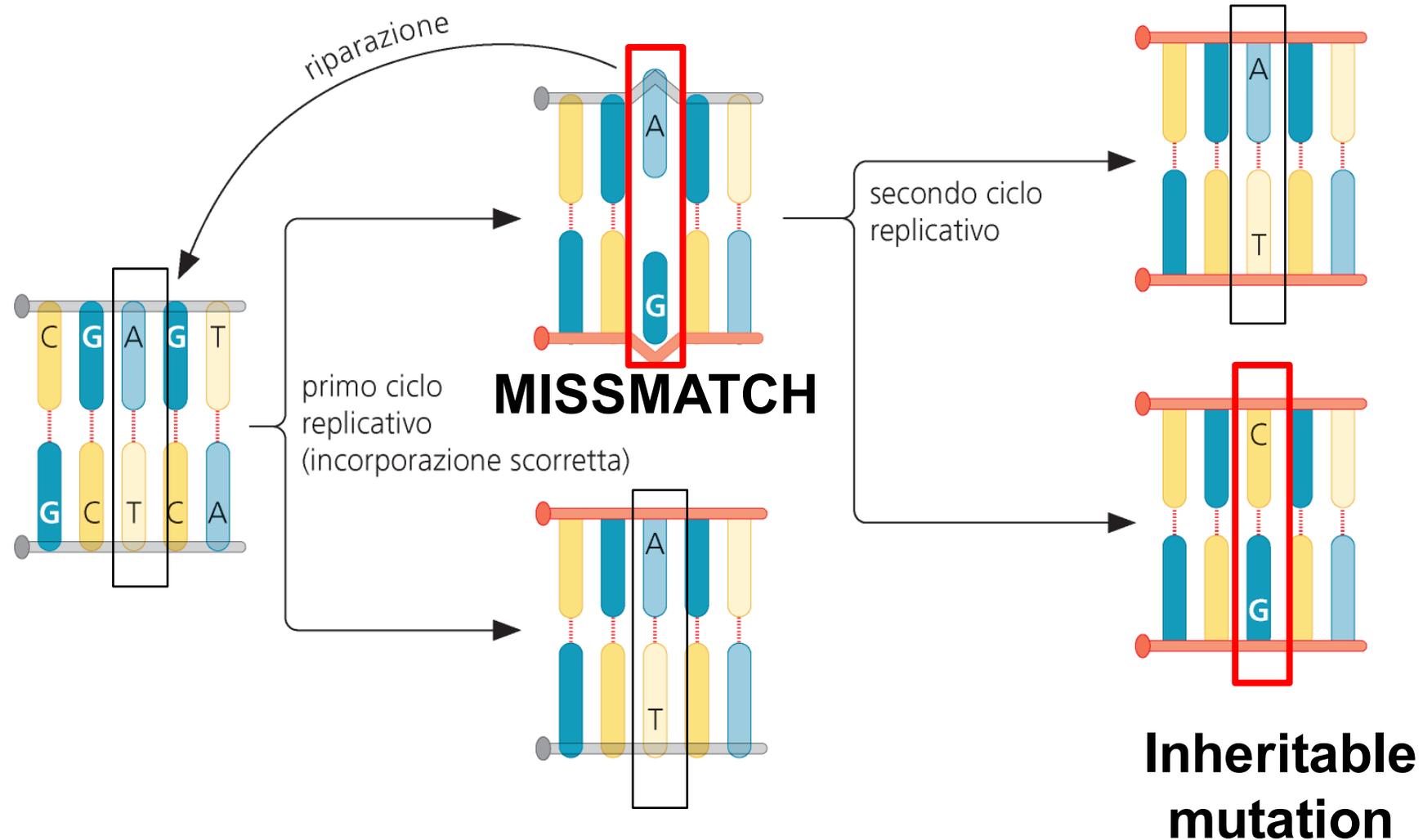


HD brain

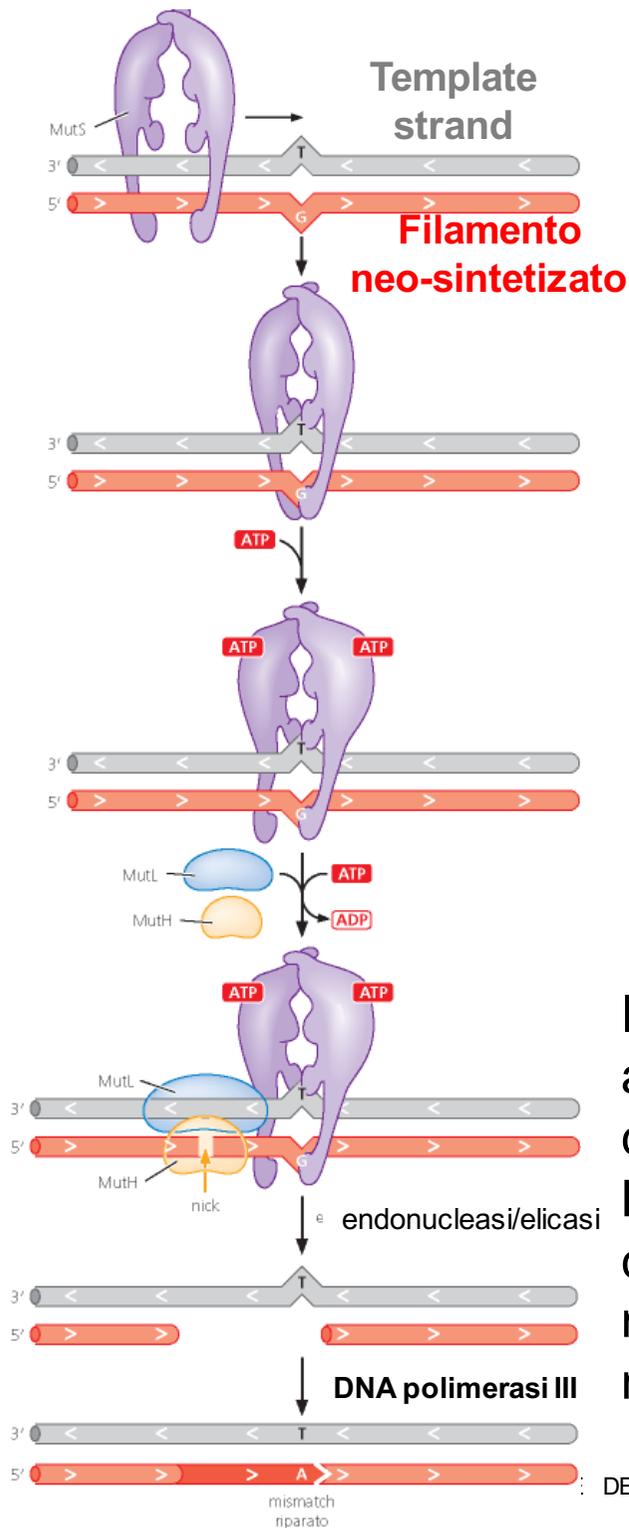
Normal brain

Alcuni errori di replicazione sfuggono alla correzione

Nonostante la capacità proofreading → errori di incorporazione che portano ad appaiamenti scorretti, se non vengono riparati subito portano a mutazione perchè non possono essere più rilevati.



La **riparazione del mismatch** rimuove gli errori che sfuggono al sistema di correzione di bozze



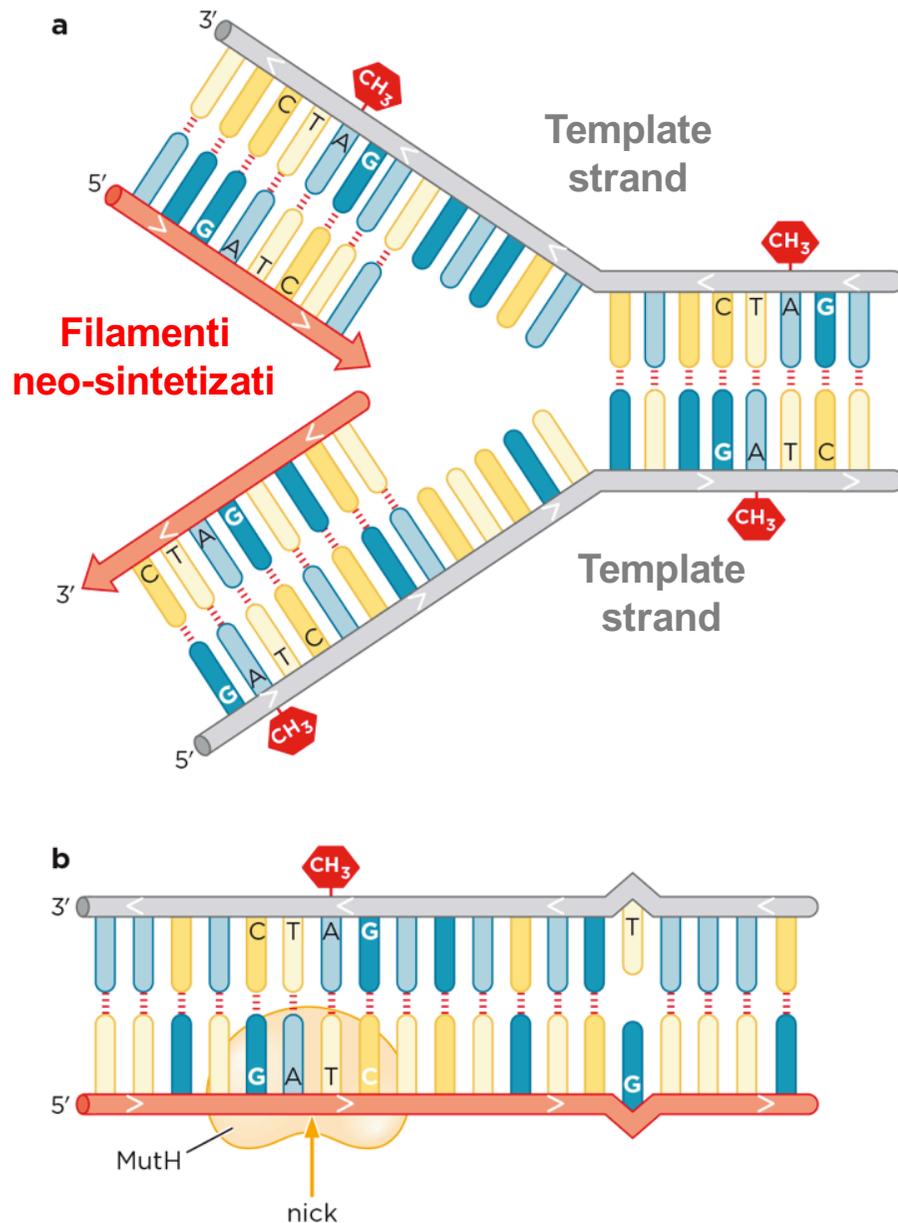
Esiste il **sistema di riparazione del mismatch** che aumenta la correttezza di 2-3 ordini di grandezza

Il sistema deve:

- 1) **Analizzare l'intero genoma** alla ricerca di errori nell'appaiamento (e deve trovarli rapidamente, prima del prossimo ciclo di divisione).
- 2) **Correggere l'errore nel filamento di neosintesi** e non su quello parentale.

In **E. coli** **MutS** analizza il DNA e riconosce mismatch in base alla **distorsione** che essi inducono, si chiude ed induce curvatura sul DNA, che recluta **MutL** che a sua volta attiva **MutH** enzima che introduce un nick, poi di una esonucleasi che rimuove un piccolo tratto di DNA, che viene poi risintetizzato (gap: few nucleotides – thousands of nucleotides).

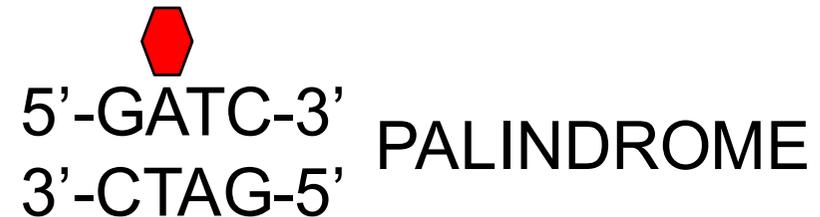
Come viene riconosciuto il filamento parentale? sistema di riparazione del mismatch



Dam metilasi metila la **A** in seq. 5' -GATC-3'
GATC presente 1 x ogni 256 pb (4⁴).

Quando passa la forza replicativa i due filamenti risultano emimetilati per qualche minuto fintantochè non vengono metilati nuovamente. MutH si lega a siti emimetilati ma diventa attiva solo se interagisce con MutL e MutS. Una volta attivata, MutH introduce nick.

Metilazione come strumento di “memoria”.

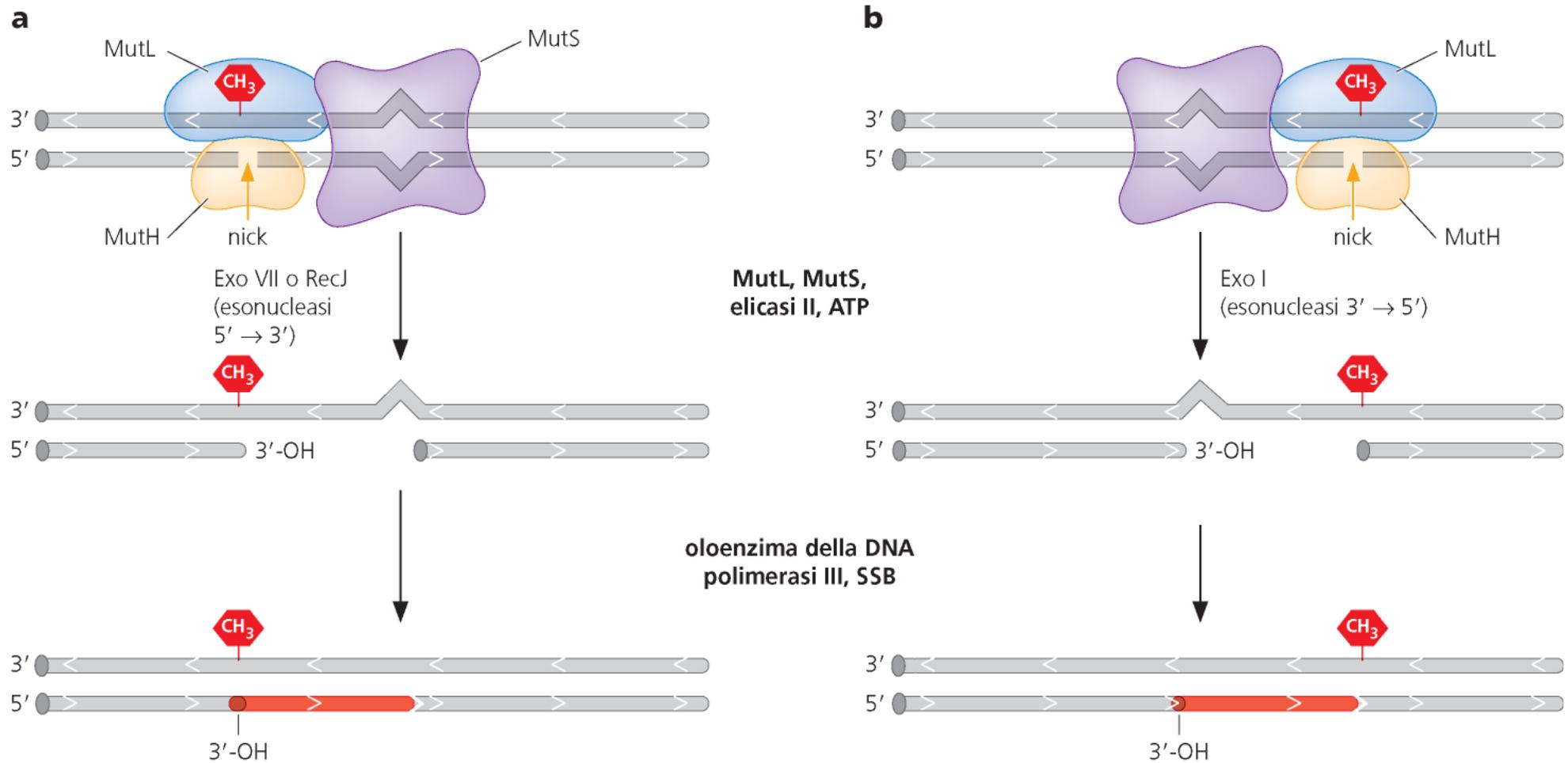


Eucarioti: MSH: MutS homolog
MLH: MutL homolog

Human: MSH2/MLH causa predisposizione per tumore al colon (carcinoma colon rettile non poliposo ereditario)
HERITABLE MUTATION → heritable cancer risk

Direzionalità del sistema di riparazione sistema di riparazione del mismatch

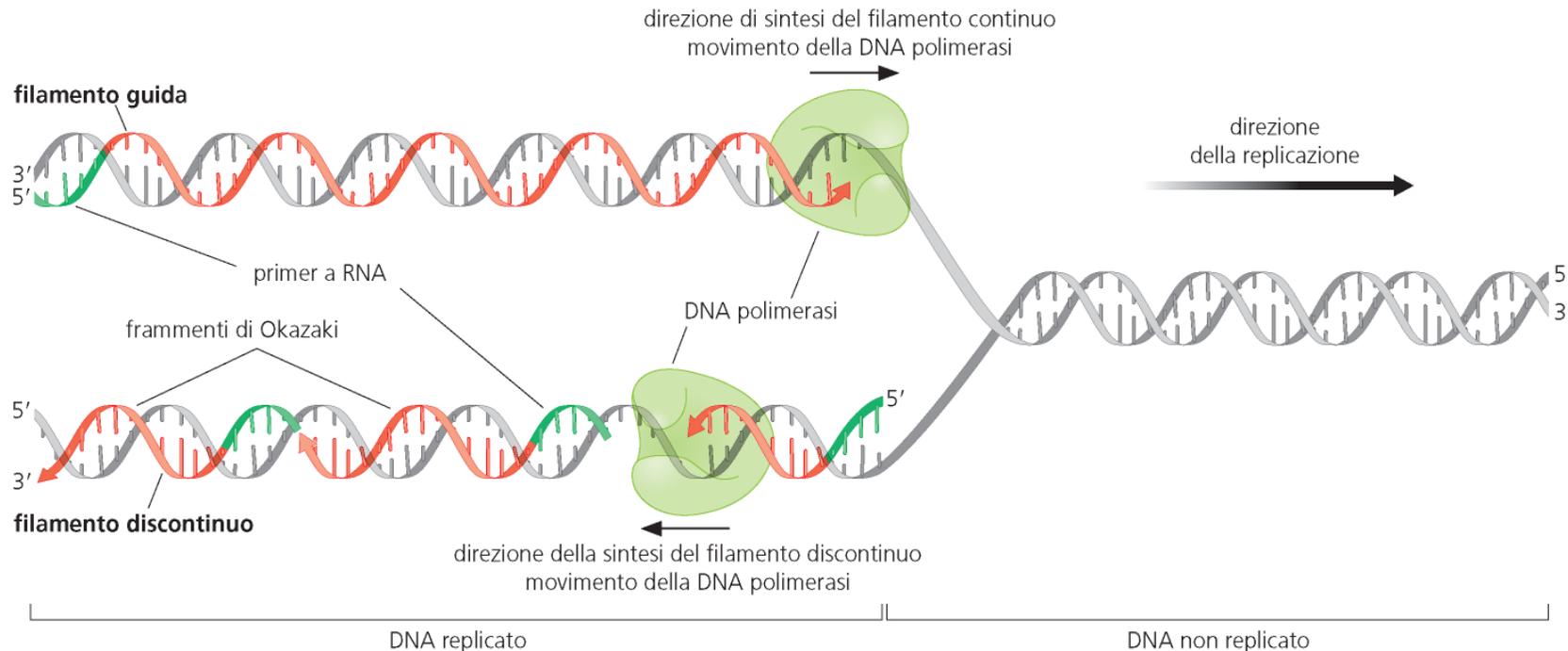
Intervengono esonucleasi diversa a seconda che il nick sia al 5' o al 3' del mismatch



Direzionalità del sistema di riparazione sistema di riparazione del mismatch

Gli eucarioti (e anche molti altri procarioti) sono privi della dam metilasi.

Come fanno a distinguere i filamenti???



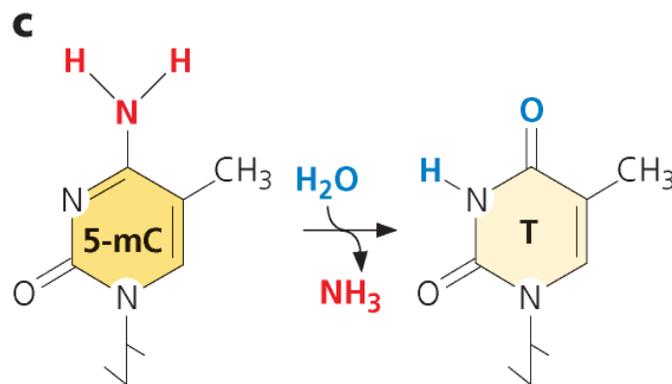
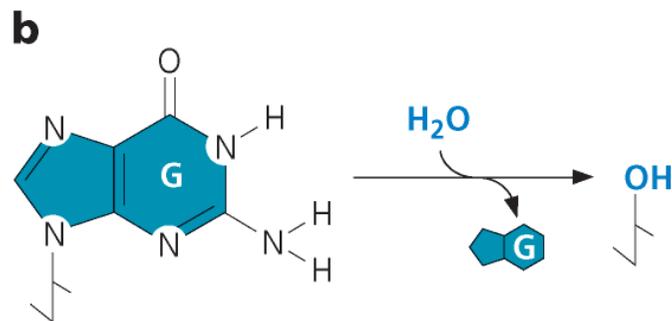
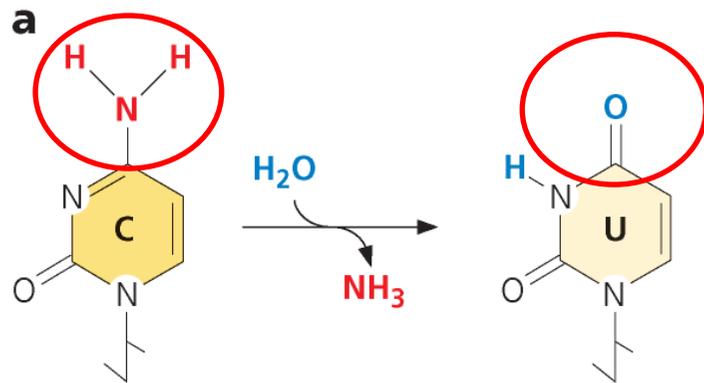
1. Okazaki fragments are separated by nicks → can serve as information to direct mismatch repair system to newly synthesized strand
2. Leading strand: also in leading strand nicks have been detected

Link mismatch repair and Replication: Human MSH interacts with sliding clamp

I DANNA AL DNA

I DANNA AL DNA

Il DNA va incontro a mutazione spontanea per IDROLISI



Danno **da idrolisi** del DNA:

a) Deamminazione idrolitica (hydrolytic deamination) della C or meC, ma anche di altre basi

b) Depurinazione della G (hydrolytic depurination) → deossiribosio apurinicco

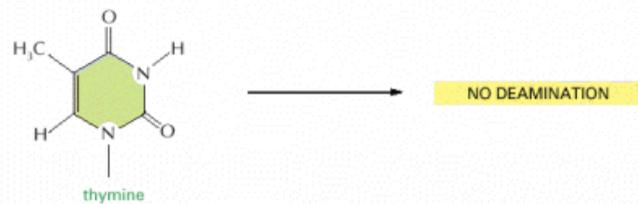
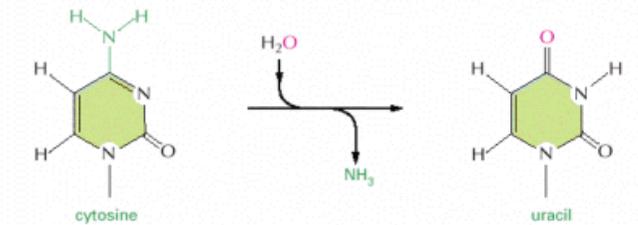
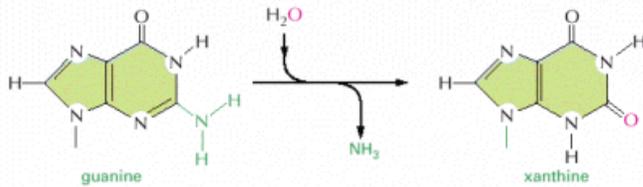
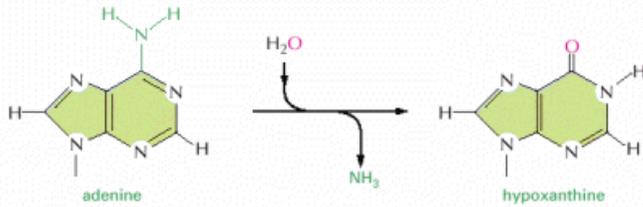
Portano tutte (quasi) alla formazione di basi non naturali per il DNA.

I DANNA AL DNA

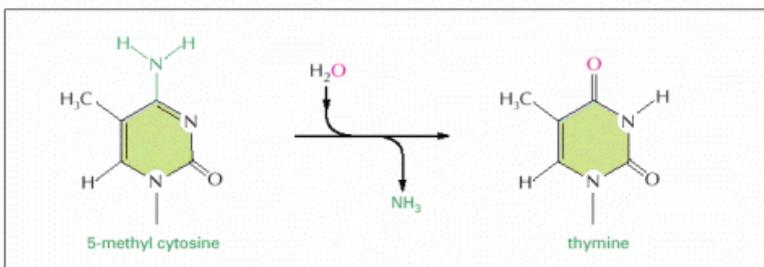
Il DNA va incontro a mutazione spontanea per IDROLISI

NATURAL DNA BASES

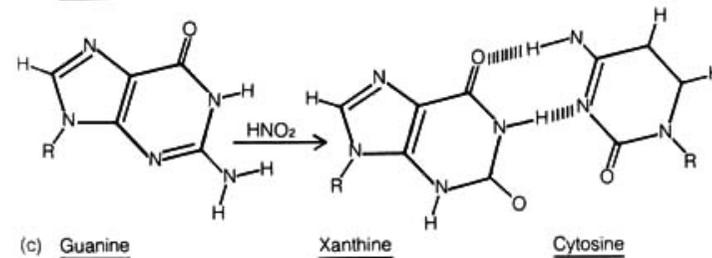
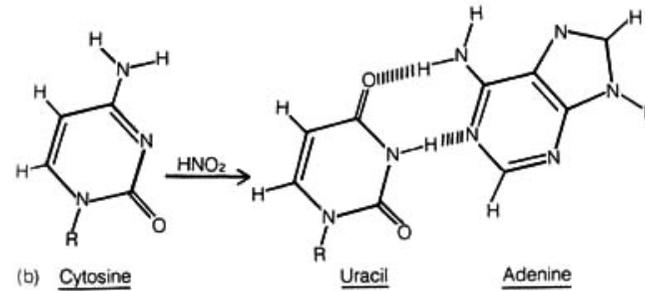
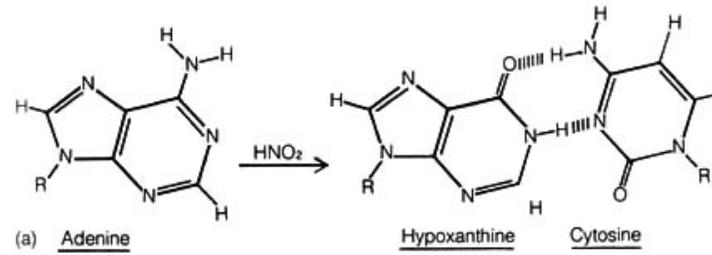
UNNATURAL DNA BASES



(A)



(B)



replication
AT → **GC**

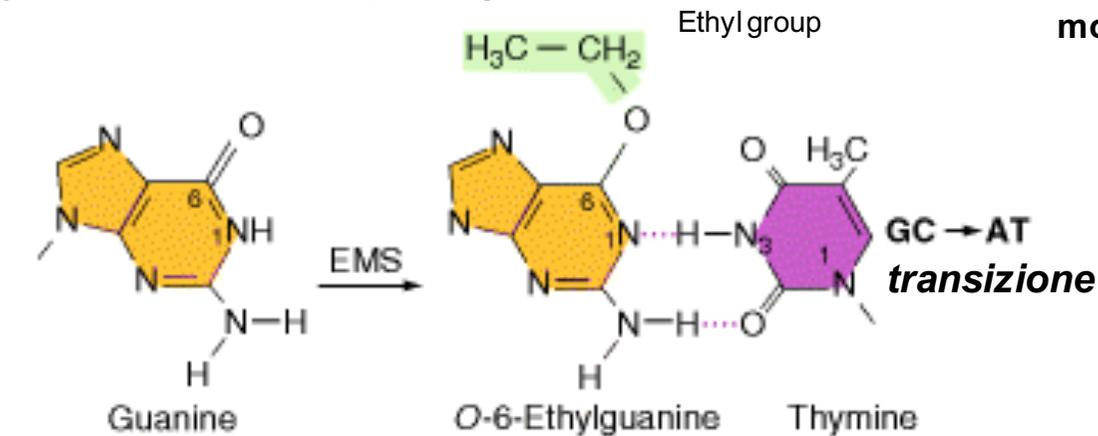
replication
CG → **TA**

replication
GC → **GC**

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

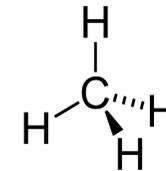
I DANNA AL DNA MISPAIRING A CAUSA DI ALCHILAZIONE (ALKYLATION)

Alkylation-induced mispairing



Ethyl methanesulfonate (EMS) is a mutagenic, teratogenic, and possibly carcinogenic organic compound with formula C₃H₈SO₃. It produces random mutations in genetic material by nucleotide substitution; particularly by guanine alkylation. This typically produces only point mutations. It can induce mutations at a rate of 5x10⁻⁴ to 5x10⁻² per gene without substantial killing.

Alkylation is the transfer of an alkyl group from one molecule to another.



Methan, the simplest alkane

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**.

I DANNA AL DNA

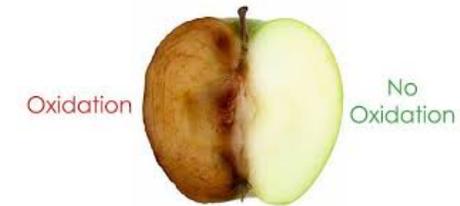
Il DNA viene anche attaccato da forme di ossigeno reattive

Per quanto riguarda il DNA si possono avere varie **rottture di legami** sia di tipo **idrolitico** che **ossidativo**. Una via rilevante passa attraverso la generazione di specie reattive dell'ossigeno a partire da molecole d'acqua, tra **cui anioni OH^- e radicali OH^\bullet** . In alternativa: agenti chimici: H_2O_2 Un esempio dei tanti eventi ossidativi è dato dalla **ossidazione in posizione 8 delle purine**. **La forma idrossi può tautomerizzare alla forma oxo**.

Origin of reactive oxygen species (ROS):

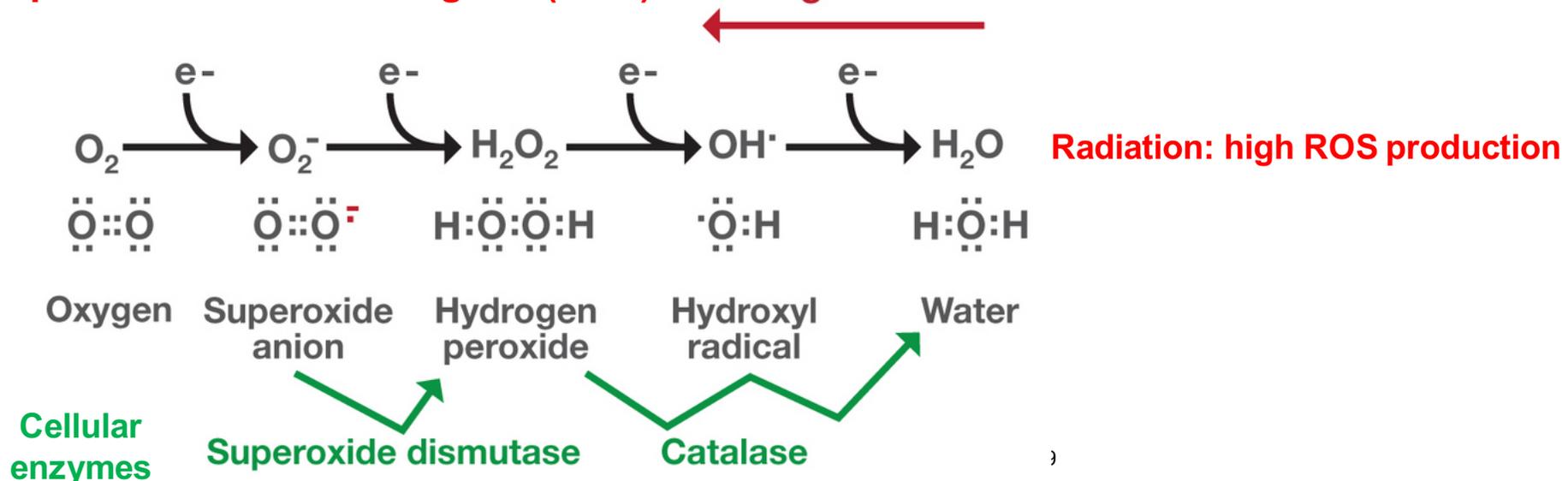
Exogenous ROS: *Radiation*, tabacco, pollution, drugs, etc...

Endogenous ROS: metabolism, mitochondria (ATP production)

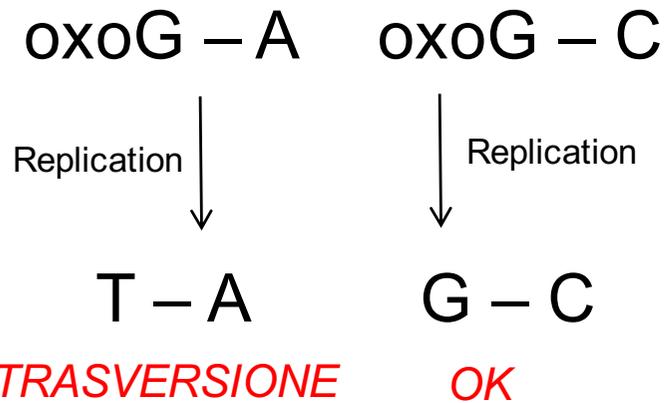
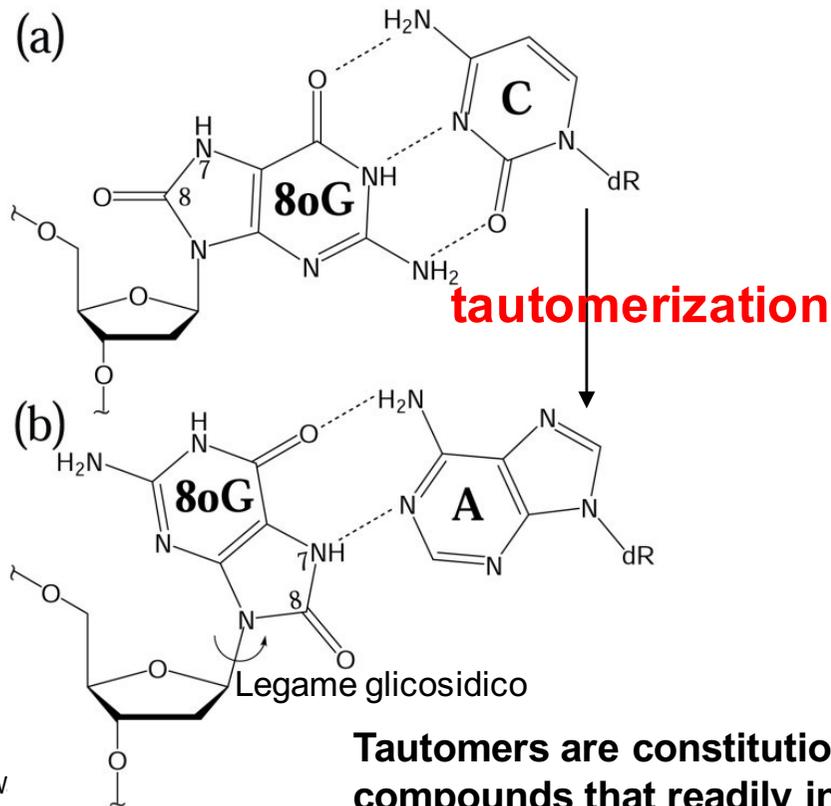
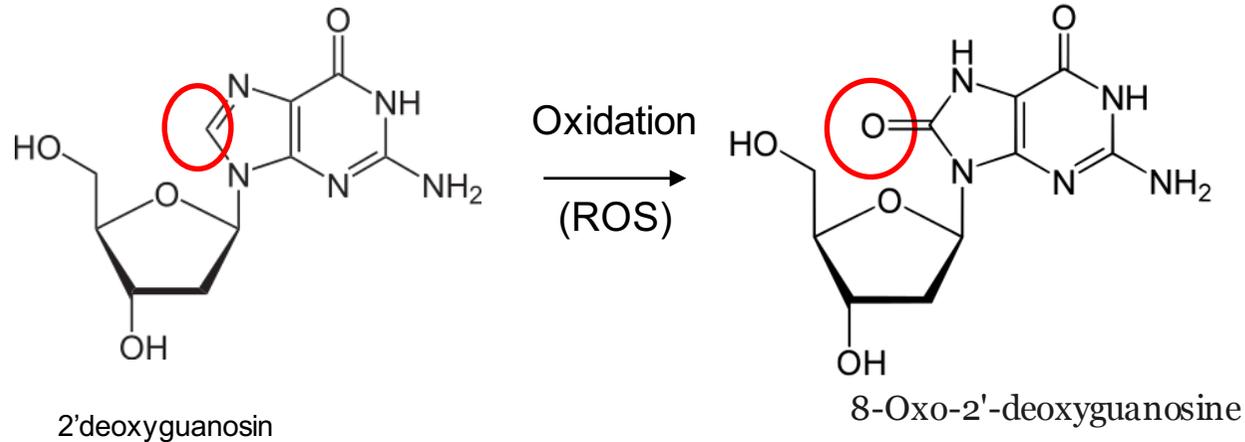


Il danno molecolare alla cellula da **radiazioni ionizzanti** (X , γ , α , β , ecc.) è vario, poiché l'alta energia di tali radiazioni è sufficiente ad indurre **numerose reazioni a carico delle molecole componenti** la cellula.

Specie reattive dell'ossigeno (ROS) Ionizing Radiation



A FREQUENT EVENT OF MUTATION CAUSED BY REACTIVE OXIGENE SPECIES: FORMATION OF 8-Oxo-2'deoxyguanosine (8-oxoG)



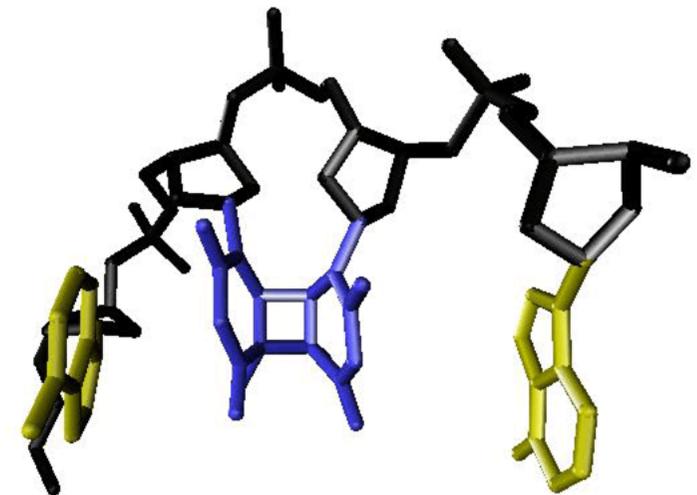
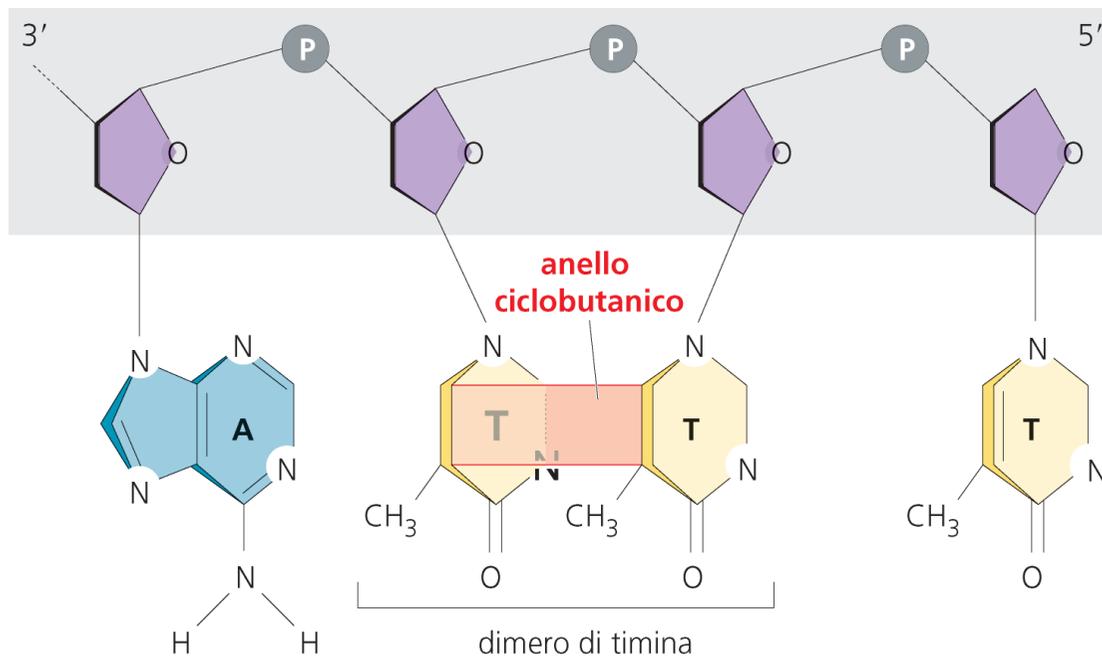
*frequente nelle tumori
dovuto a radicali liberi*

I DANNA AL DNA

Danno da luce UV (UV radiation)

Radiazioni con lunghezza d'onda a 260nm sono fortemente assorbite dalle basi
→ Assorbono energie → **fusione fotochimica di due pirimidine**
→ **tipicamente dimeri di timina (“thymidine-dimers”)** ma anche T:C dimers.

Structural change: Non possono formare appaiamento con le basi complementari
→ **arresto DNAPol → DANNO AL DNA**



Riconoscono distorsioni dell' elica → DANNO/MUTAZIONI

A cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) contains a four membered ring arising from the coupling of the C=C double bonds of pyrimidines

I DANNA AL DNA

Danni da radiazioni ionizzanti (raggi γ e raggi X)

Inducono rotture nel doppio filamento del DNA che sono difficili da riparare.

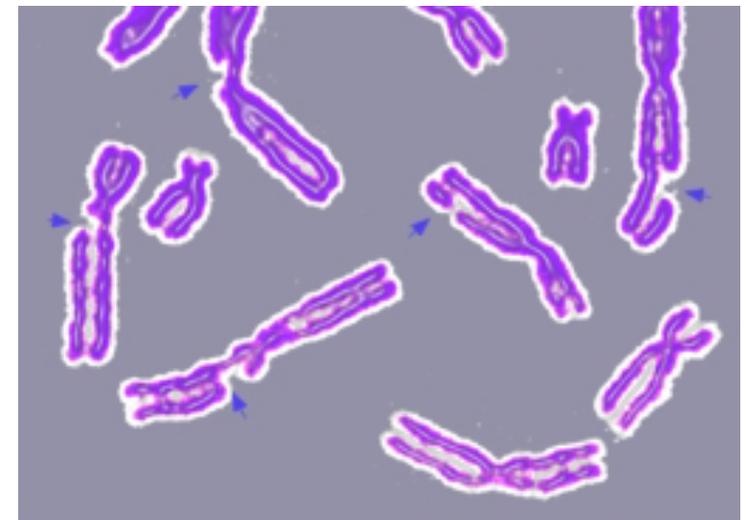
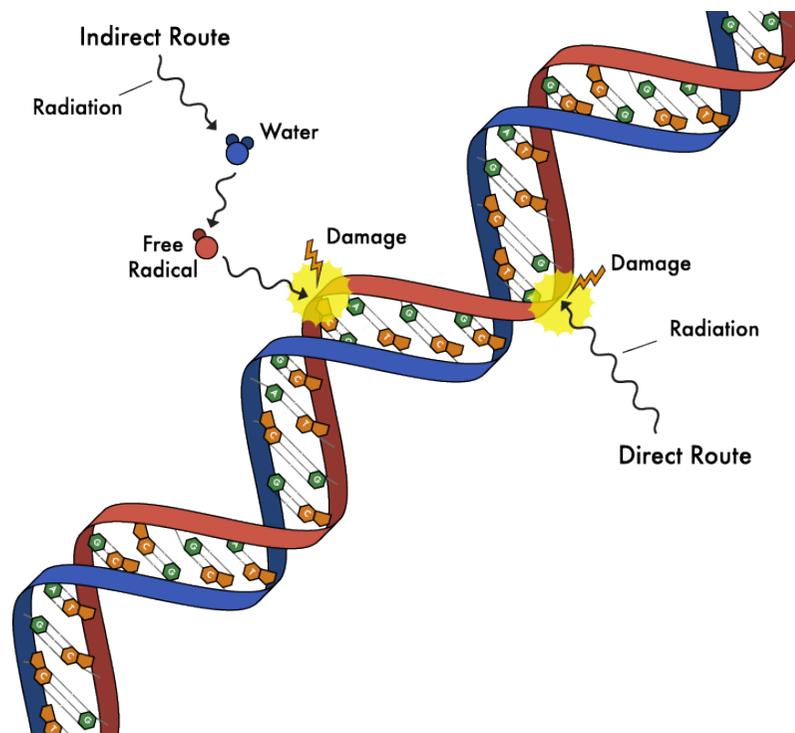
Possono agire:

- **direttamente attaccando** (ionizzando) il desossiribosio del DNA

- **indirettamente** (specie reattive dell'ossigeno)

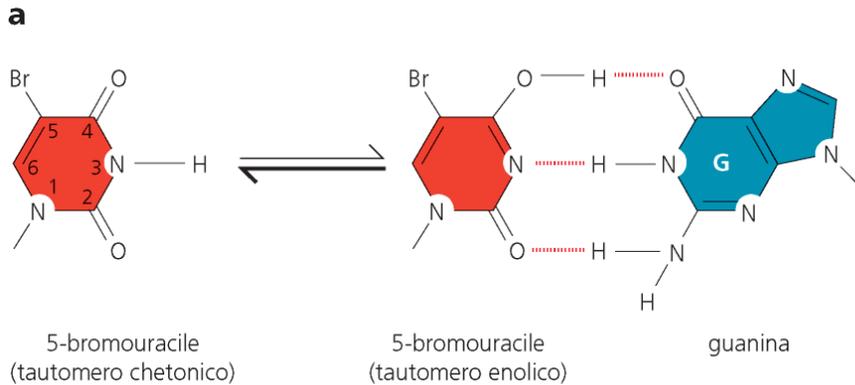
Radiazioni ionizzanti nella terapia antitumorale

(Farmaco bleomicina induce rotture simili)



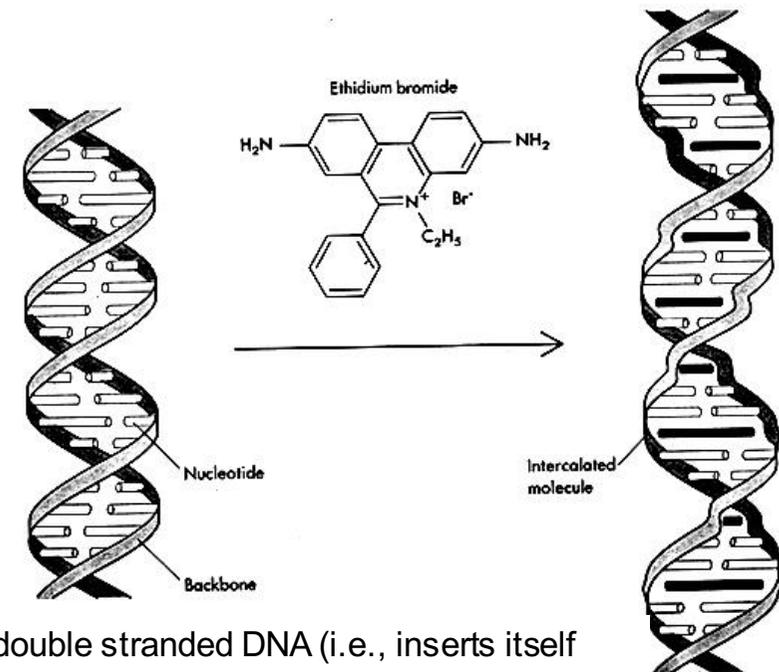
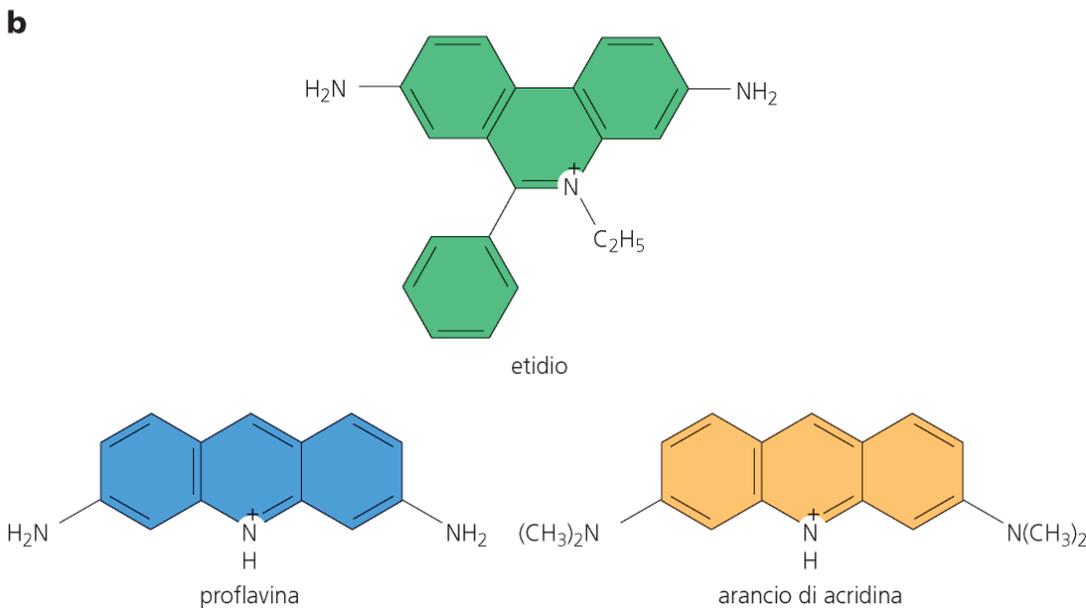
I DANNA AL DNA

Analoghi delle basi e agenti intercalanti



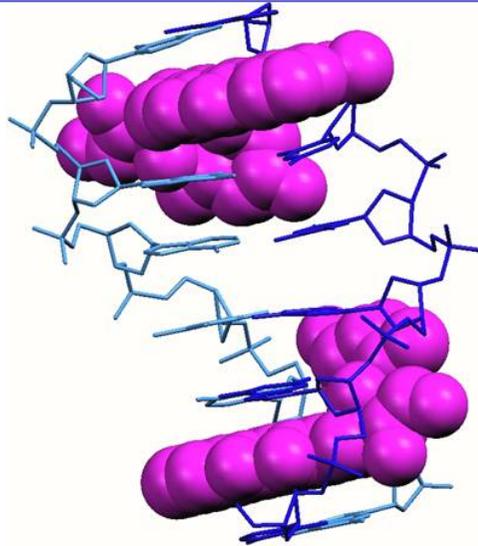
5-bromouracile: analogo della timina può appaiarsi alla guanina.

Agenti intercalanti: molecole piatte con anelli policiclici che possono legarsi alla struttura ugualmente piatta delle basi puriniche o pirimidiniche. Portano a mutazioni per inserzione o delezione. Portano problemi durante la replicazione → Insertion o deletion

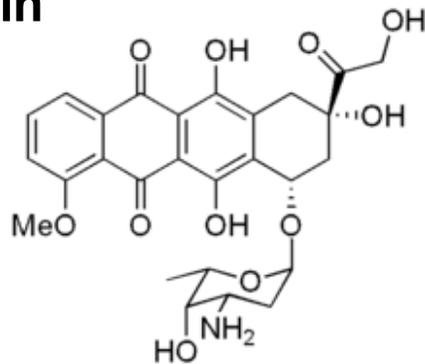


Ethidium bromide is thought to act as a mutagen because it intercalates double stranded DNA (i.e., inserts itself between the strands), deforming the DNA. This could affect DNA biological processes, like DNA replication and transcription.

I DANNA AL DNA CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS



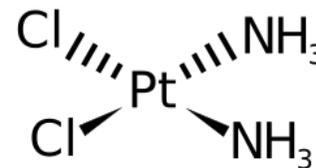
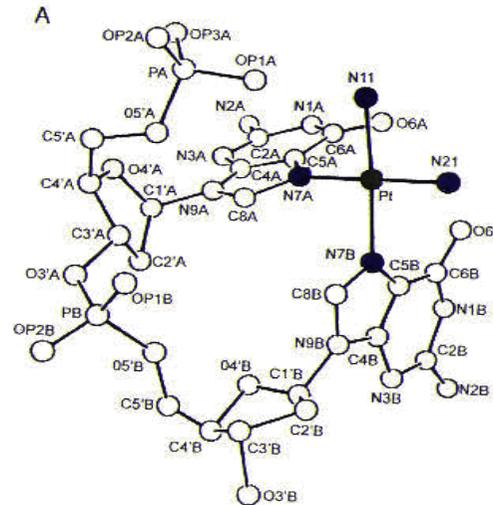
Doxorubicin



Doxorubicin interacts with DNA by **intercalation and inhibition of macromolecular biosynthesis**. This **inhibits the progression of the enzyme topoisomerase II**, which relaxes supercoils in DNA for transcription. Doxorubicin stabilizes the topoisomerase II complex after it has broken the DNA chain for replication, preventing the DNA double helix from being resealed and thereby stopping the process of replication. It may also increase quinone type **free radical production**, hence contributing to its cytotoxicity.

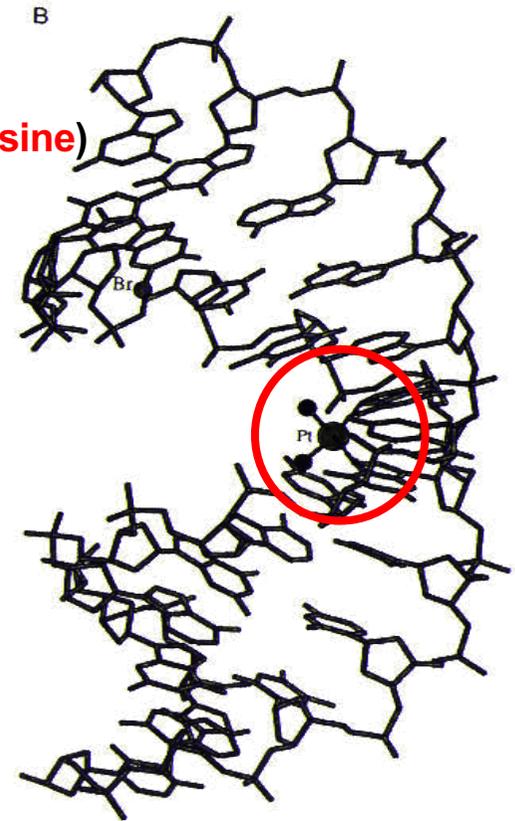
CISPLATIN

Covalently links bases (**guanosine**)



Cisplatin
(a “platinum drug”)

Cisplatin crosslinks DNA in several different ways, interfering with cell division by mitosis



Sostanze chimiche, raggi etc causano mutazioni

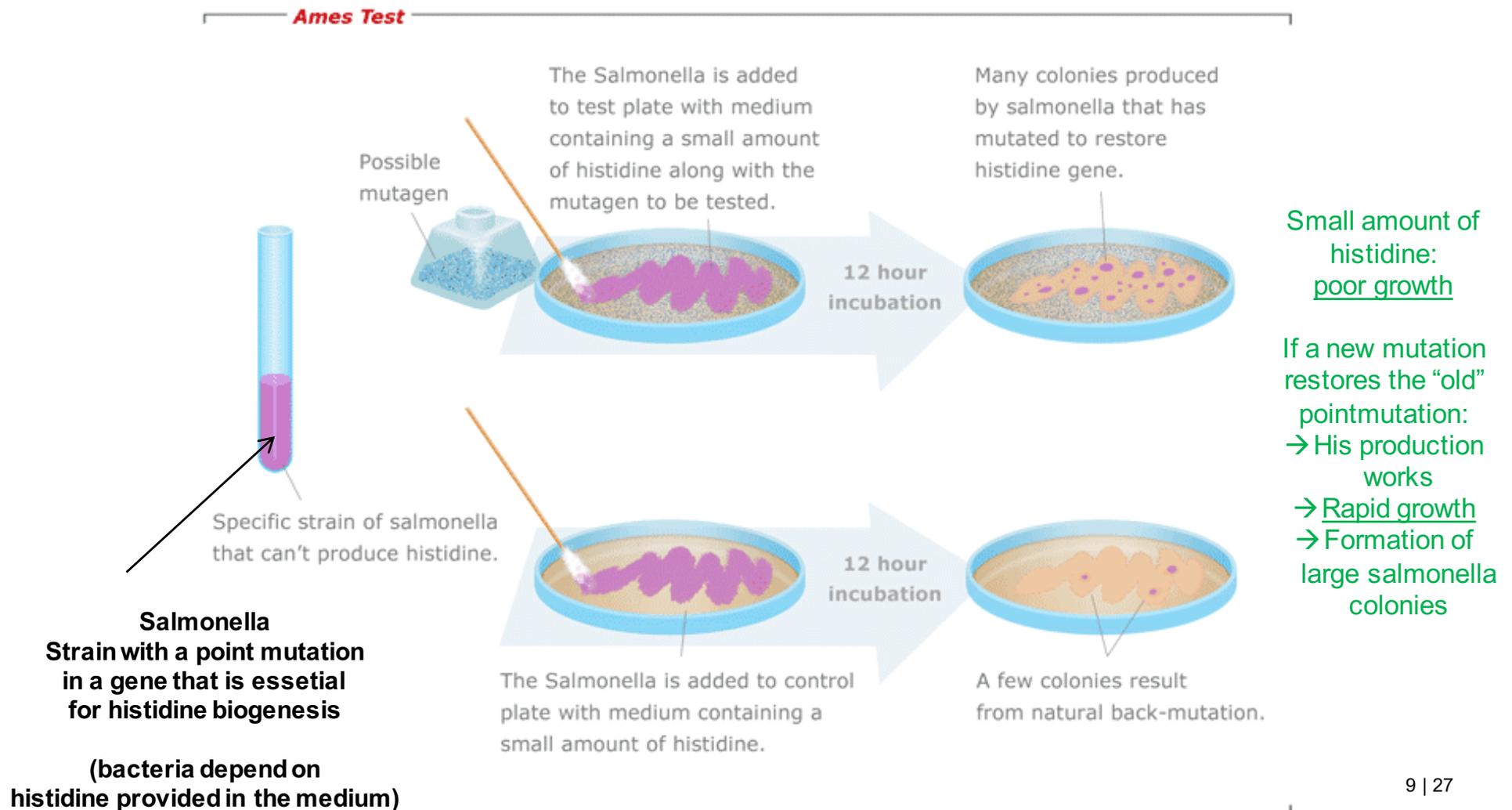
THE AMES TEST

Sostanze chimiche, raggi etc causano mutazioni

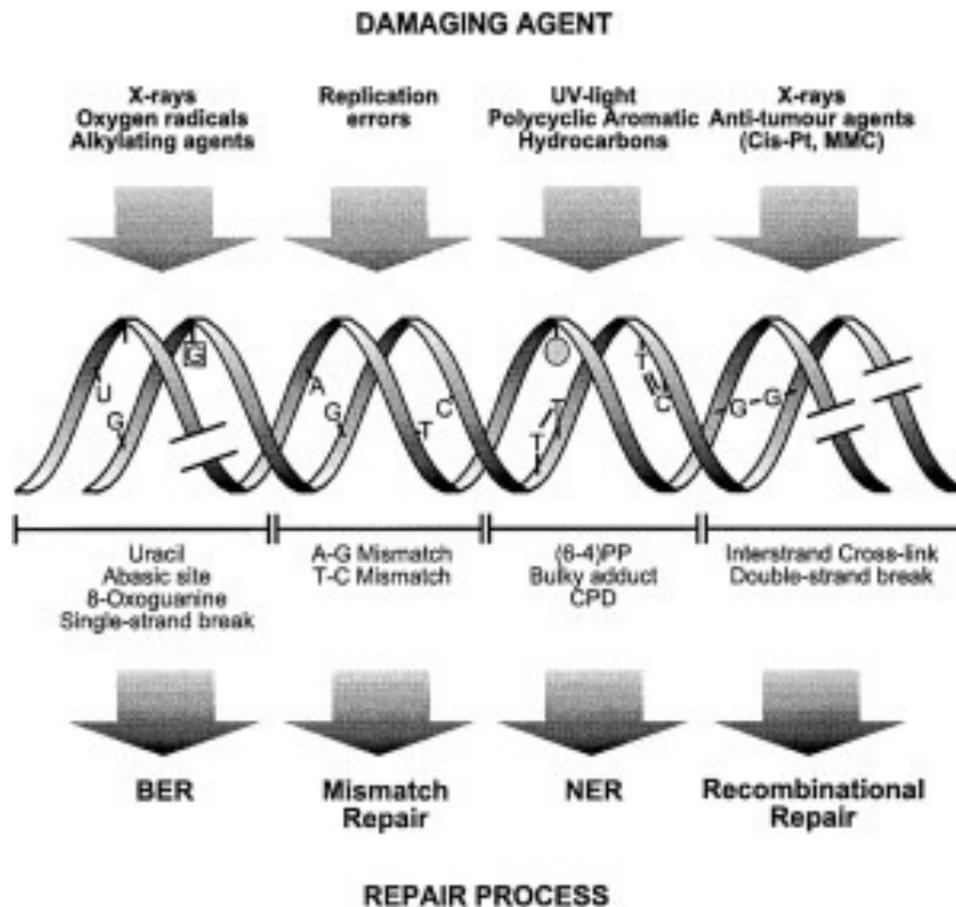
Ames test: Bruce Ames ha messo a punto un semplice test che determina i potenziali effetti

Carcinogeni (DIRETTI) di una sostanza chimica

THE AMES TEST IS BASED ON THE FREQUENCY OF A REVERSION OF A MUTATION IN A GENE THAT IS REQUIRED FOR HISTIDIN SYNTHESIS



Numerosi sistemi riparano il DNA



Damage per day and cell

Single strand breaks 50,000
 Depurination 10,000
 Deamination 600
 Oxidative base damage 2000
 Alkylated bases 5000
 Intrastrand cross links 10
 DNA double-strand break 10

**Total DNA damaging events per cell per day:
 >60,000**

Total DNA damaging events per cell per hour: 2,500
 Estimate 10^{13} - 10^{14} cells in human body

Adult body: ~ $3 \times 10^{16-17}$ DNA damaging events per hour!

Over 200 human genes known to be involved in DNA repair

Major mammalian DNA repair pathways:

1. Base excision repair (BER)
2. DNA Mismatch repair (MMR)
3. Nucleotide excision repair (NER)
4. DNA strand break repair pathways:
 - Single strand break repair (SSBR)
 - Double-strand break repair pathways (DSBR)
 - Homologous Recombination (HR)
 - Nonhomologous end joining (NHEJ)

“Mutations are rare because of repair”

Numerosi sistemi riparano il DNA

Alcuni possono essere definiti di **riparazione diretta**: un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall' evento anomalo.

Altri richiedono l' **azione coordinata di più enzimi**: i due sistemi più noti sono:

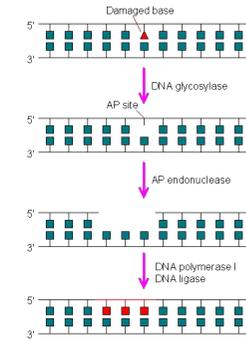
-riparazione per escissione della base, in cui l' evento iniziale è la rimozione della base chimicamente alterata da parte di una N-glicosilasi, a cui segue la rimozione del resto del nucleotide e il suo rimpiazzo ad opera di una DNA-polimerasi di riparo (ad es. la DNA polimerasi I di *E.coli*).

-riparazione per escissione di nucleotidi, in cui vengono idrolizzati enzimaticamente legami fosfoesterei alcune unità a monte e a valle del sito di danno e un segmento di alcuni nucleotidi comprendente il danno viene rimosso, quindi la ricostruzione avviene come nel caso precedente.

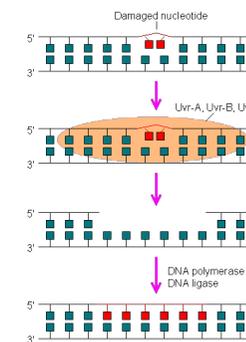
NB. La rottura spontanea del legame N-glicosidico tra base e zucchero non è un evento rarissimo nel caso delle purine e il sito apurinicico può dare adito al riparo.

La **riparazione** di una lesione al DNA può anche essere coordinata con eventi di tipo **ricombinativo**, in particolare durante la replicazione del DNA.

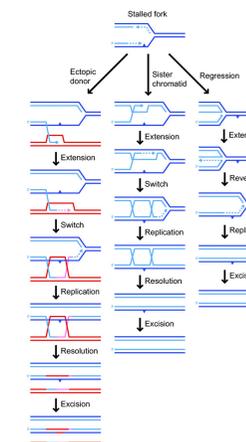
riparazione diretta



Escissione della base



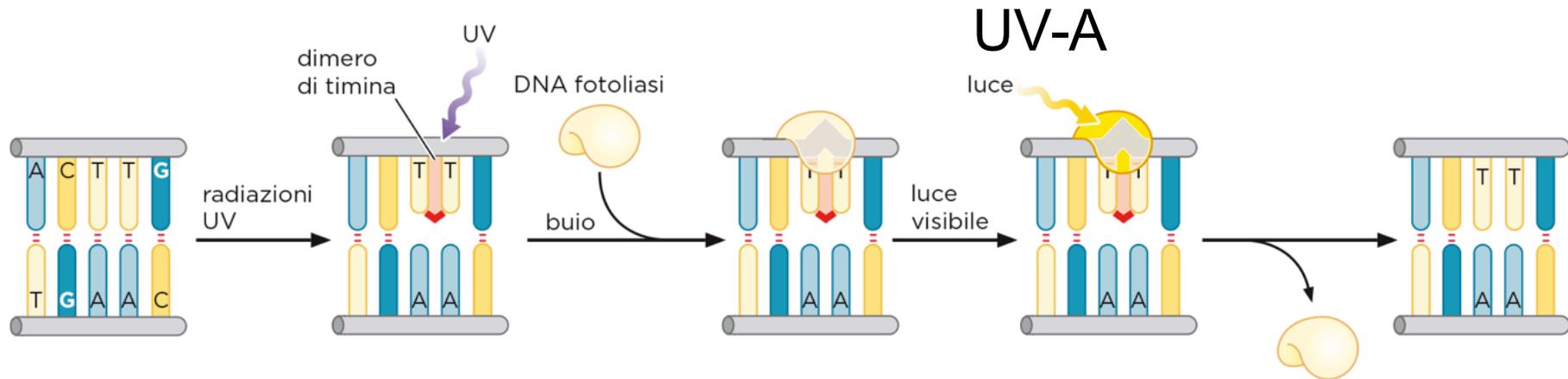
Escissione di nucleotide



Riparazione tipo ricombinativo

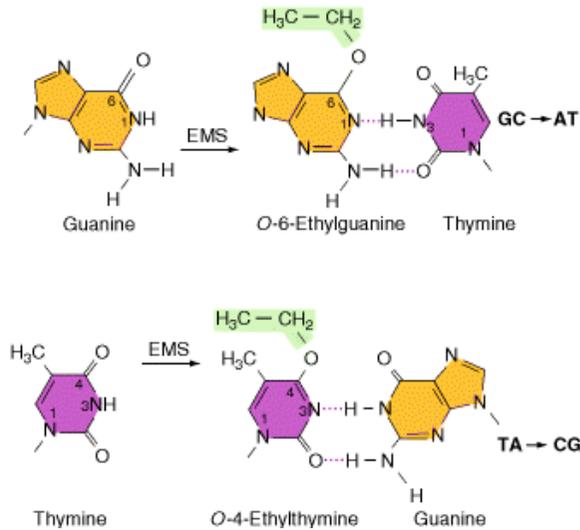
Riparazione diretta: la foto-riattivazione

Un esempio di riparazione diretta: la **fotoliasi** batterica, attivata dalla luce UV-A separa direttamente i dimeri di pirimidine.
Questo sistema è presente nei procarioti ed in alcuni eucarioti inferiori.



Riparazione diretta: Rimozione del gruppo metilico

Alkylation

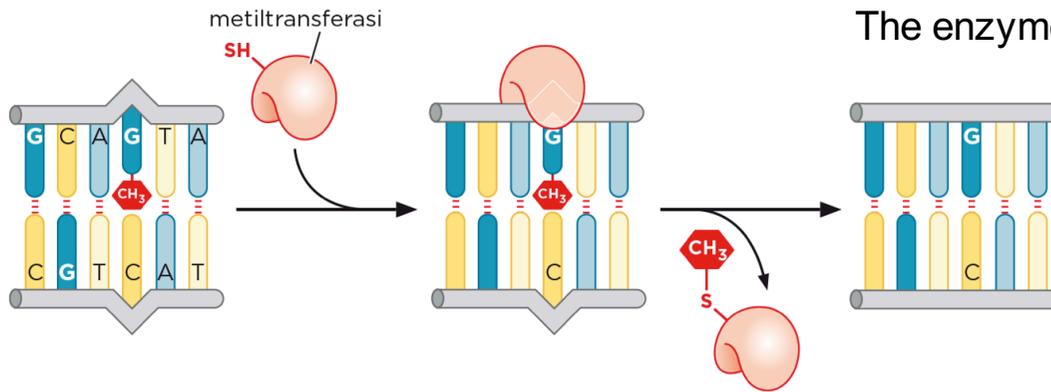


O-6-Ethylguanine
 ↓
 Riconosciuto da metiltrasferase

Metiltrasferase catalizza il trasferimento
 Di un gruppo metilico

Guanine

The enzyme does not regenerate, so it has been called
 “suicide enzyme”



Mechanism conserved in pro- and eucaryotes: humans: O6-alkylguanine DNA alkyltransferase (also known as AGT, MGMT or AGAT) is a protein that in humans is encoded by the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene. O6-methylguanine DNA methyltransferase is crucial for genome stability. It repairs the naturally occurring mutagenic DNA lesion O6-methylguanine back to guanine and prevents mismatch and errors during DNA replication and transcription. Accordingly, loss of MGMT increases the carcinogenic risk in mice after exposure to alkylating agents. The two bacterial isozymes are Ada and Ogt.

Numerosi sistemi riparano il DNA

Alcuni possono essere definiti di **riparazione diretta**: un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall' evento anomalo.

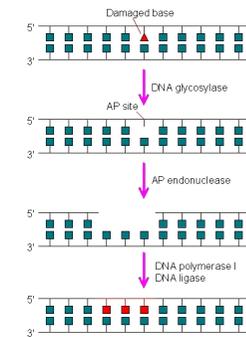
Altri richiedono l' **azione coordinata di più enzimi**: i due sistemi più noti sono:

-riparazione per escissione della base, in cui l' evento iniziale è la rimozione della base chimicamente alterata da parte di una N-glicosilasi, a cui segue la rimozione del resto del nucleotide e il suo rimpiazzo ad opera di una DNA-polimerasi di riparo (ad es. la DNA polimerasi I di *E.coli*).

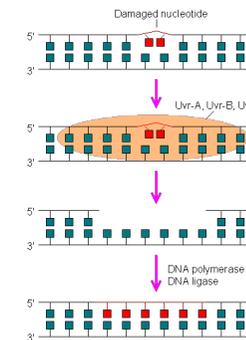
-riparazione per escissione di nucleotidi, in cui vengono idrolizzati enzimaticamente legami fosfoesterei alcune unità a monte e a valle del sito di danno e un segmento di alcuni nucleotidi comprendente il danno viene rimosso, quindi la ricostruzione avviene come nel caso precedente.

NB. La rottura spontanea del legame N-glicosidico tra base e zucchero non è un evento rarissimo nel caso delle purine e il sito apurinicico può dare adito al riparo.

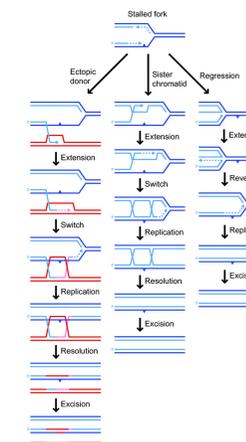
La **riparazione** di una lesione al DNA può anche essere coordinata con eventi di tipo **ricombinativo**, in particolare durante la replicazione del DNA.



Escissione della base



Escissione di nucleotide



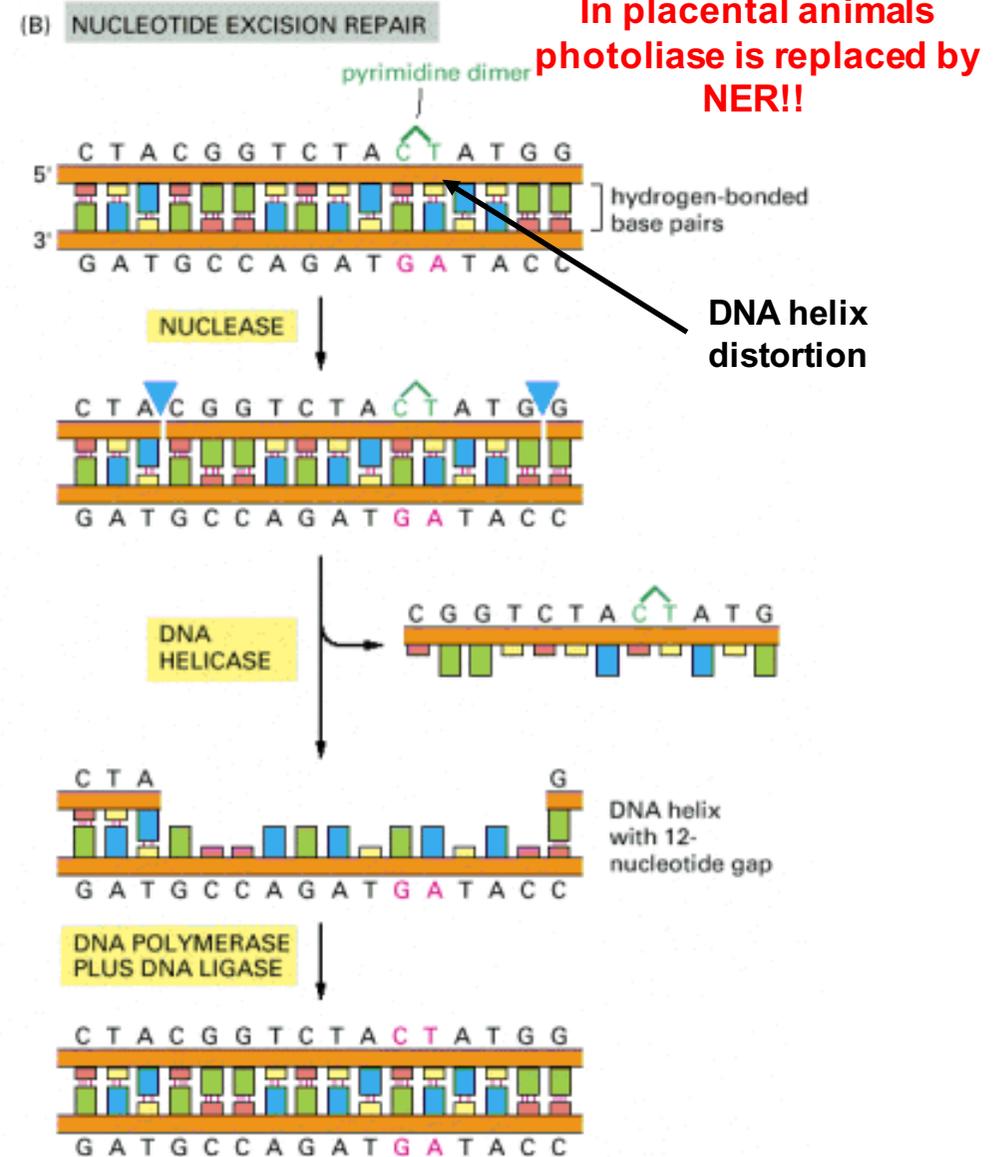
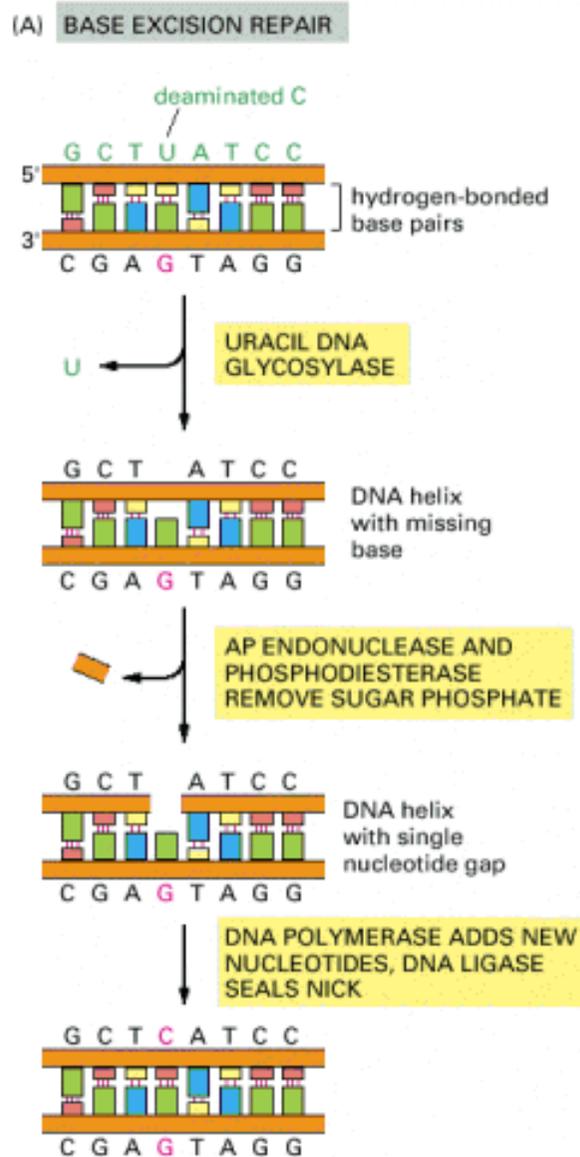
Riparazione tipo ricombinativo

Riparazione indiretta

-BASE EXCISION REPAIR

- NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

No DNA helix distortion



Numerosi sistemi riparano il DNA

Alcuni possono essere definiti di **riparazione diretta**: un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall' evento anomalo.

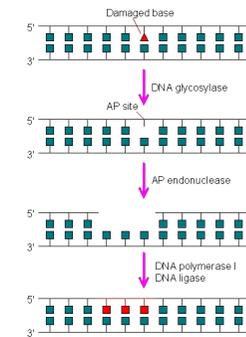
Altri richiedono l' **azione coordinata di più enzimi**: i due sistemi più noti sono:

-riparazione per escissione della base, in cui l' evento iniziale è la rimozione della base chimicamente alterata da parte di una N-glicosilasi, a cui segue la rimozione del resto del nucleotide e il suo rimpiazzo ad opera di una DNA-polimerasi di riparo (ad es. la DNA polimerasi I di *E.coli*).

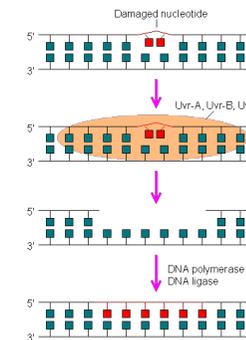
-riparazione per escissione di nucleotidi, in cui vengono idrolizzati enzimaticamente legami fosfoesterei alcune unità a monte e a valle del sito di danno e un segmento di alcuni nucleotidi comprendente il danno viene rimosso, quindi la ricostruzione avviene come nel caso precedente.

NB. La rottura spontanea del legame N-glicosidico tra base e zucchero non è un evento rarissimo nel caso delle purine e il sito apurinicico può dare adito al riparo.

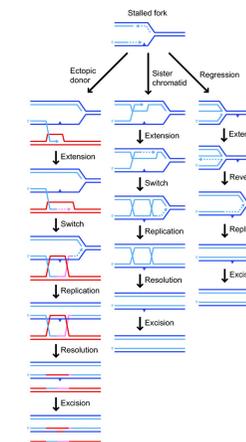
La **riparazione** di una lesione al DNA può anche essere coordinata con eventi di tipo **ricombinativo**, in particolare durante la replicazione del DNA.



Escissione della base



Escissione di nucleotide

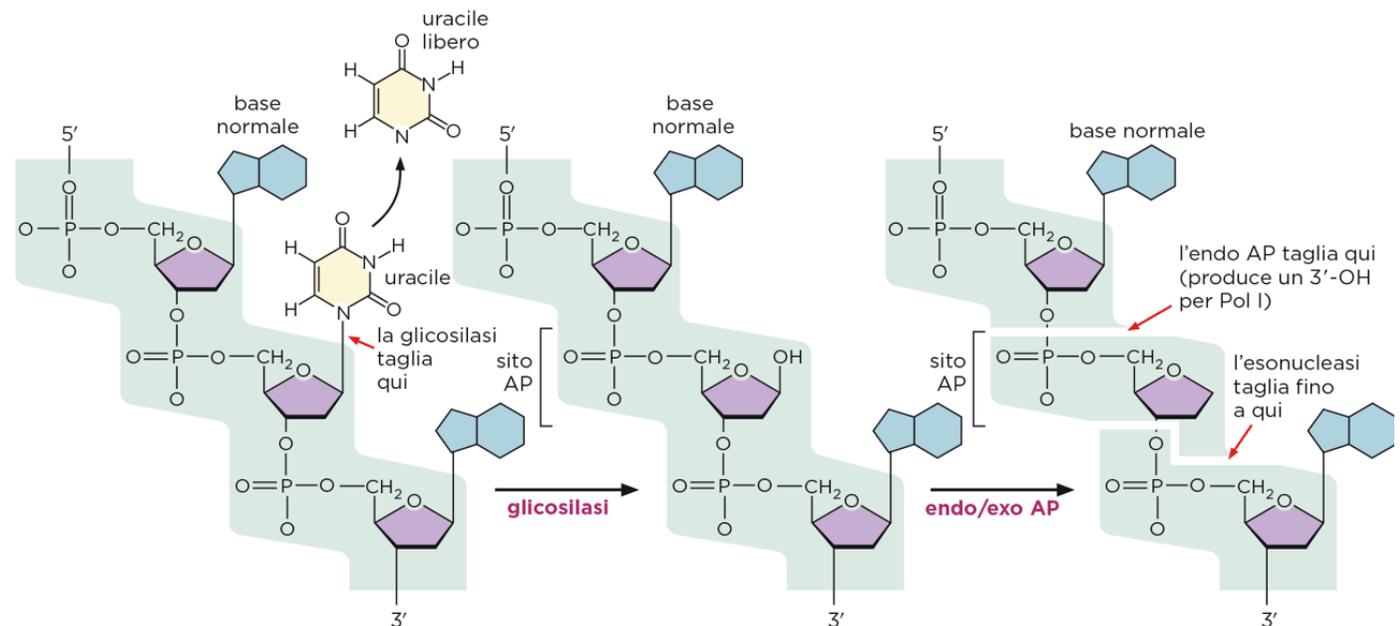
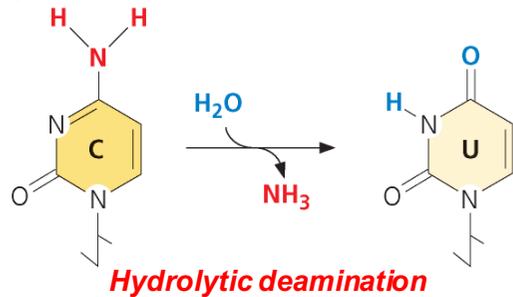


Riparazione tipo ricombinativo

Riparazione indiretta

BASE EXCISION REPAIR

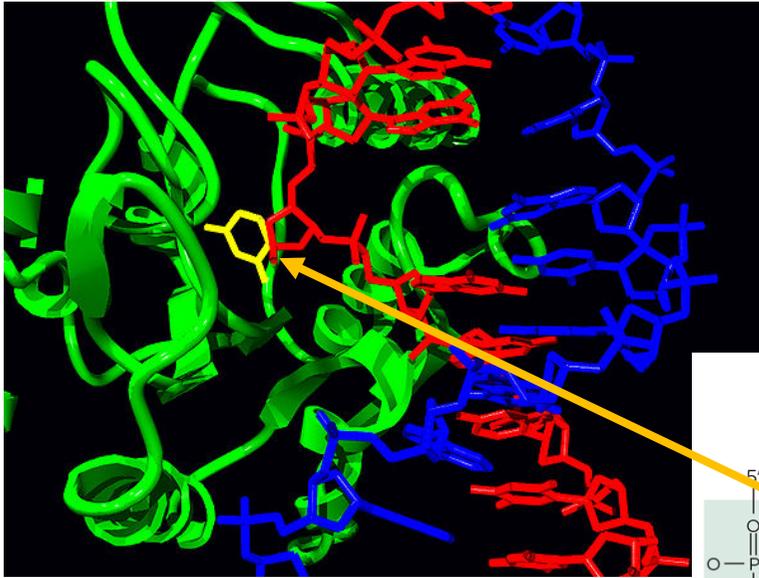
In biochemistry and genetics, base excision repair (BER) is a cellular mechanism that **repairs damaged DNA throughout the cell cycle**. It is responsible primarily for **removing small, non-helix-distorting base lesions** from the genome. The related nucleotide excision repair pathway repairs bulky helix-distorting lesions. BER is important for removing damaged bases that could otherwise cause mutations by mispairing or lead to breaks in DNA during replication.



1. De-amminazione di una citosina
2. L'uracil **Glicosilasi** riconosce la base danneggiata → idrolizza il legame glicosilico
3. Base viene rimosso dal scheletro del DNA
4. Taglio– **Apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease**
5. **Taglio esonucleolitico** (Impalcatura)
6. DNA polimerase + ligase

Glicosilasi specifici (human)
-Deamminazione citosina
- oxoG
+9 altre glicosilasi

Riparazione indiretta BASE EXCISION REPAIR



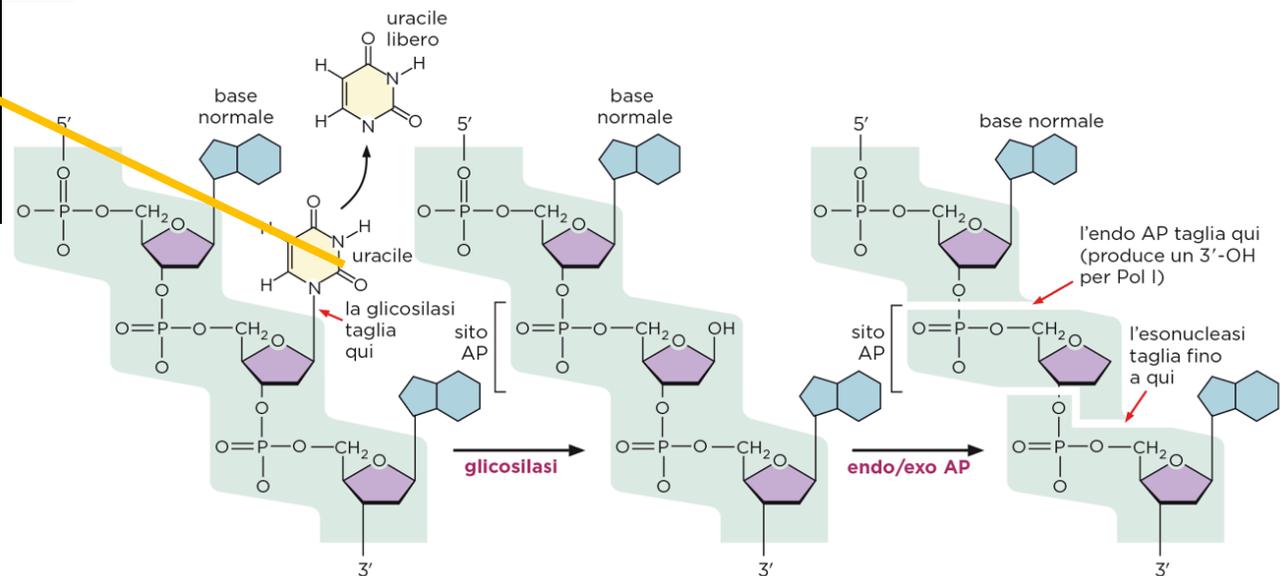
Uracil DNA glycosylase flips a uracil residue out of the duplex (shown in yellow) and removes Uracil; then AP endonuclease opens phosphodiester bond

Riconoscimento della base danneggiata:
Glicosilasi scorrono lungo il solco minore

Base flipping: base danneggiata viene ribaltata all'estero

Base entra nella tasca attiva

Base viene eliminato (taglio legame glicosidico)



Glicosilasi specifici (human)
-Deamminazione citosina
- oxoG
+9 altre glicosilasi

Numerosi sistemi riparano il DNA

Alcuni possono essere definiti di **riparazione diretta**: un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall' evento anomalo.

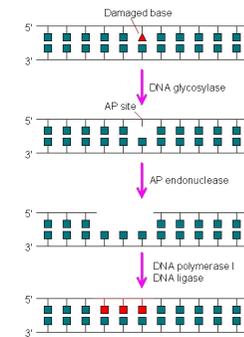
Altri richiedono l' **azione coordinata di più enzimi**: i due sistemi più noti sono:

-riparazione per escissione della base, in cui l' evento iniziale è la rimozione della base chimicamente alterata da parte di una N-glicosilasi, a cui segue la rimozione del resto del nucleotide e il suo rimpiazzo ad opera di una DNA-polimerasi di riparo (ad es. la DNA polimerasi I di *E.coli*).

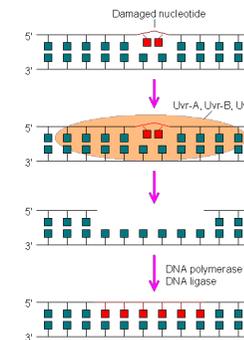
-riparazione per escissione di nucleotidi, in cui vengono idrolizzati enzimaticamente legami fosfoesterei alcune unità a monte e a valle del sito di danno e un segmento di alcuni nucleotidi comprendente il danno viene rimosso, quindi la ricostruzione avviene come nel caso precedente.

NB. La rottura spontanea del legame N-glicosidico tra base e zucchero non è un evento rarissimo nel caso delle purine e il sito apurinicco può dare adito al riparo.

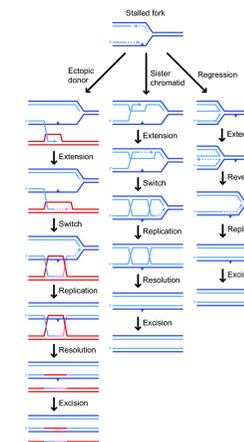
La **riparazione** di una lesione al DNA può anche essere coordinata con eventi di tipo **ricombinativo**, in particolare durante la replicazione del DNA.



Escissione della base



Escissione di nucleotide



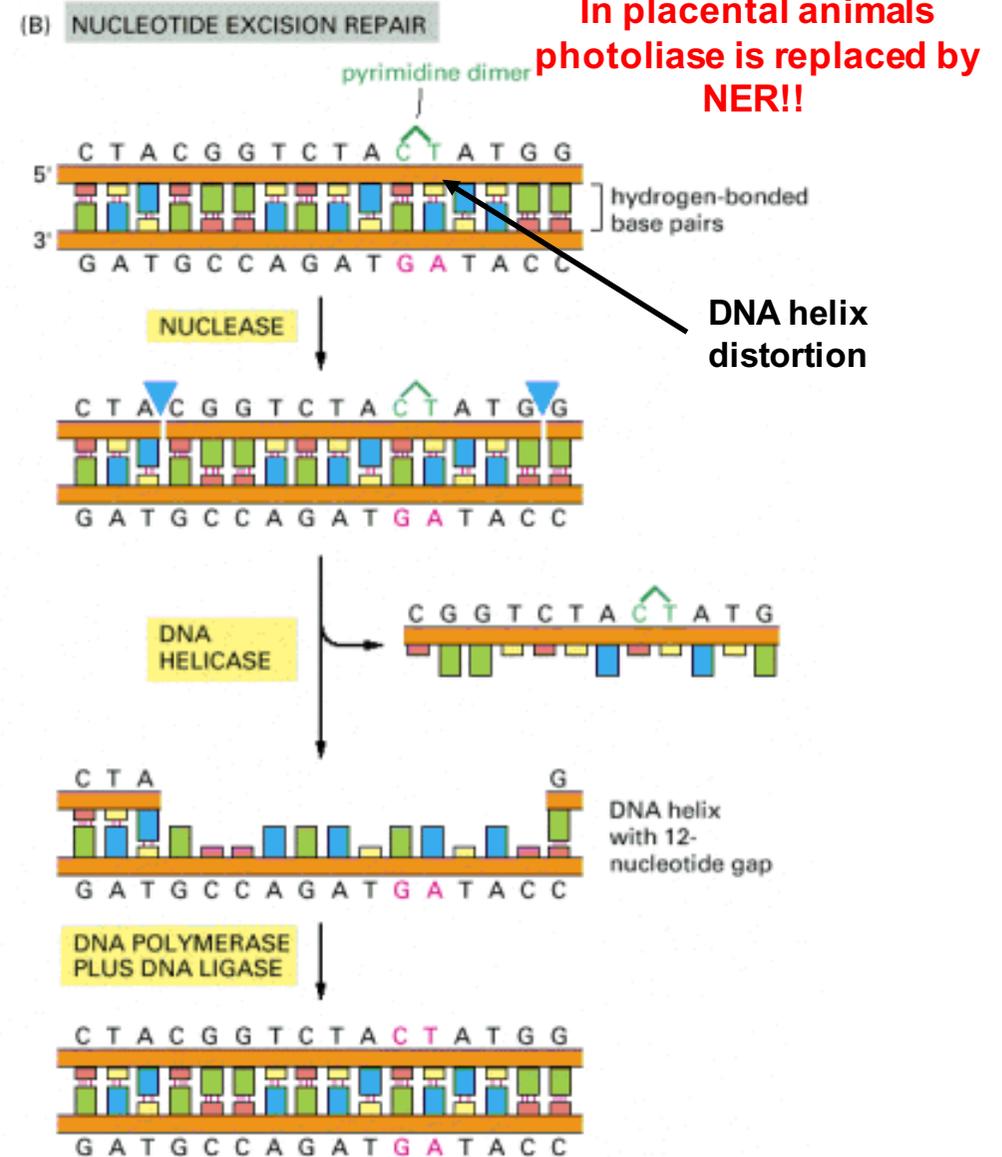
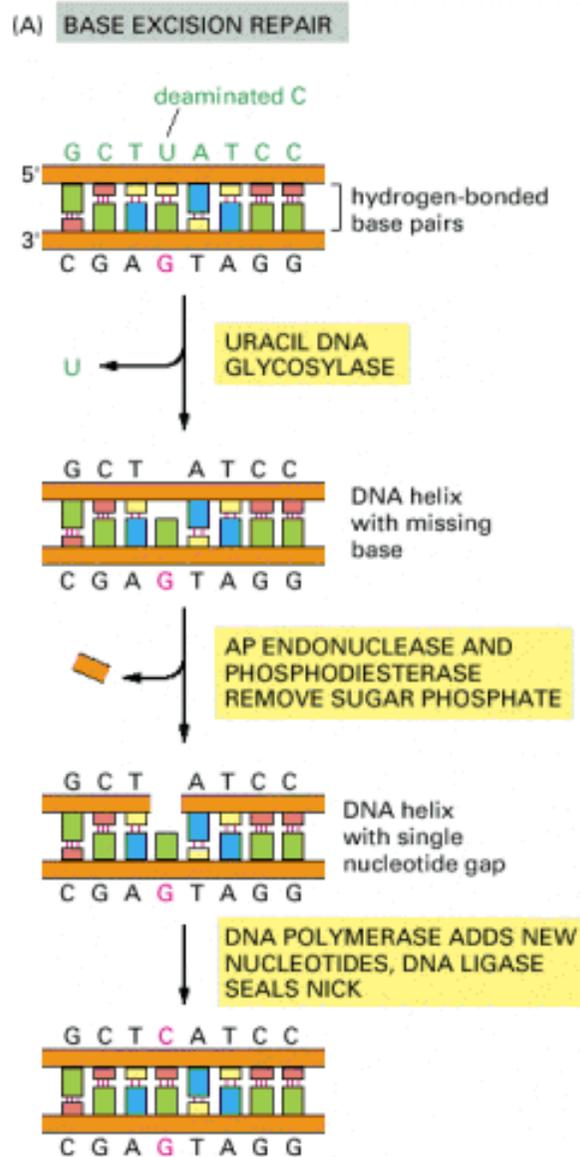
Riparazione tipo ricombinativo

Riparazione indiretta

-BASE EXCISION REPAIR

- NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

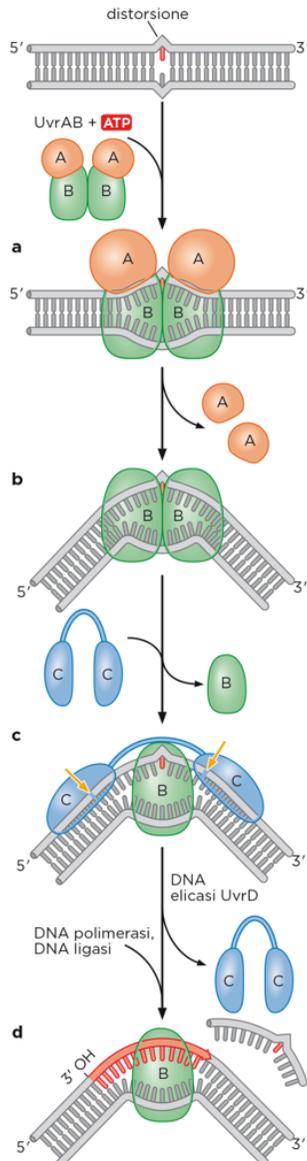
No DNA helix distortion



DNA helix distortion

Riparazione indiretta NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (conserved=

Example Bacteria-Eucaryotes: Repair after damage caused by UV (pyrimidine dimers)



UvrA-UvrB scorre lungo il DNA
Riconoscono distorsioni dell' elica

UvrA esce dal complesso

UvrB piega DNA, apertura dell'elica
intorno alla lesione

UvrB recluta UvrC che taglia 2x intorno alla
Lesione (4 or 5 nt upstream; 8 nt downstream
of damage)

12 (13) nt filamento viene rimossa (elicasi, UvrD)

DNA Pol I e ligasi

Uomo: totale: 25 proteine

XPC riconosce distorsione (UvrA)

ERCC1-XPF (5' cut), **XPG** (3'cut)

XPA, XPD helicase activity
24-32 nt ss fragment removed

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR MUTANTS XERODERMA PIGMENTOSA

Lo **xeroderma pigmentoso** è una genodermatosi ad ereditarietà **autosomica recessiva** caratterizzata da elevata **fotosensibilità**, predisposizione allo sviluppo di **neoplasie cutanee**, **premature invecchiamento** della pelle ed alterazioni nella riparazione del DNA.

Tipo	Gene	Mappatura	Nome
Type A, I, XPA	XPA	9q22.3	Xeroderma pigmentoso gruppo A
Type B, II, XPB	XPB	2q21	Xeroderma pigmentoso gruppo B
Type C, III, XPC	XPC	3p25	Xeroderma pigmentoso gruppo C
Type D, IV, XPD	XPD ERCC6	19q13.2-q13.3 , 10q11	Xeroderma pigmentoso gruppo D o sindrome di De Sanctis
Type E, V, XPE	DDB2	11p12-p11	Xeroderma pigmentoso gruppo E
Type F, VI, XPF	ERCC4	16p13.3-p13.13	Xeroderma pigmentoso gruppo F
Type G, VII, XPG	RAD2 ERCC5	13q33	Xeroderma pigmentoso gruppo G
Type V, XPV	POLH	6p21.1-p12	Xeroderma pigmentoso gruppo variant

Paziente: 8 anni

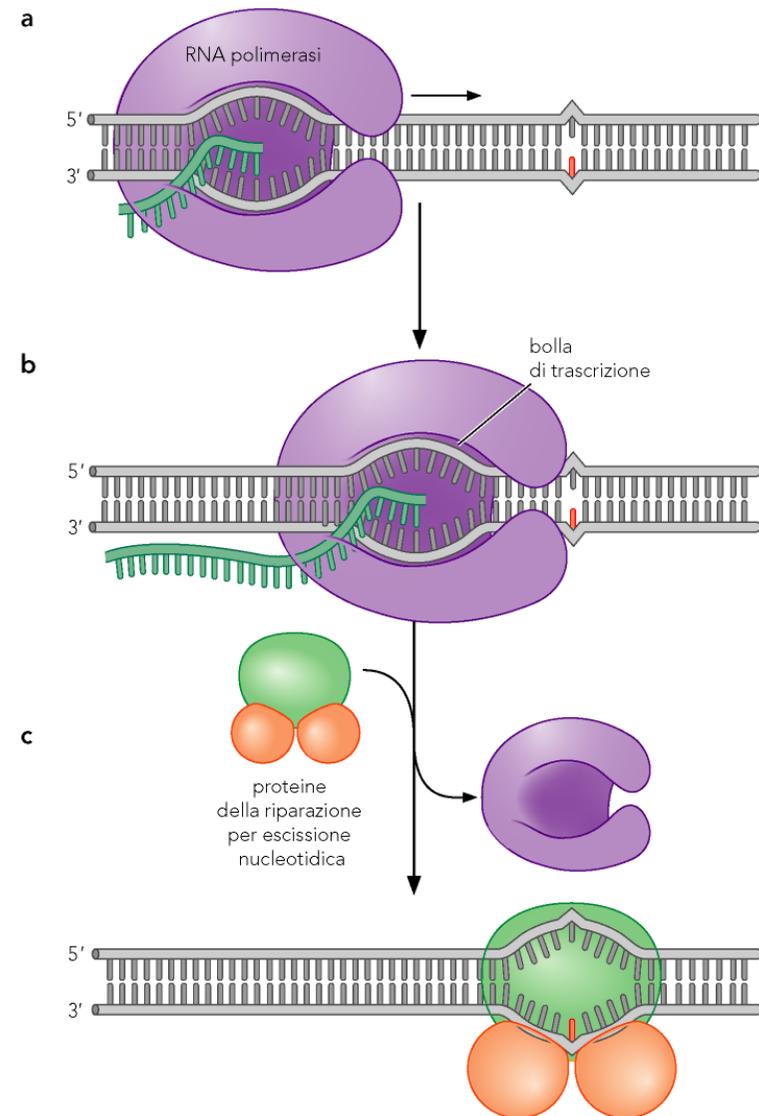


Riparazione indiretta

Riparazione accoppiata alle replicazione

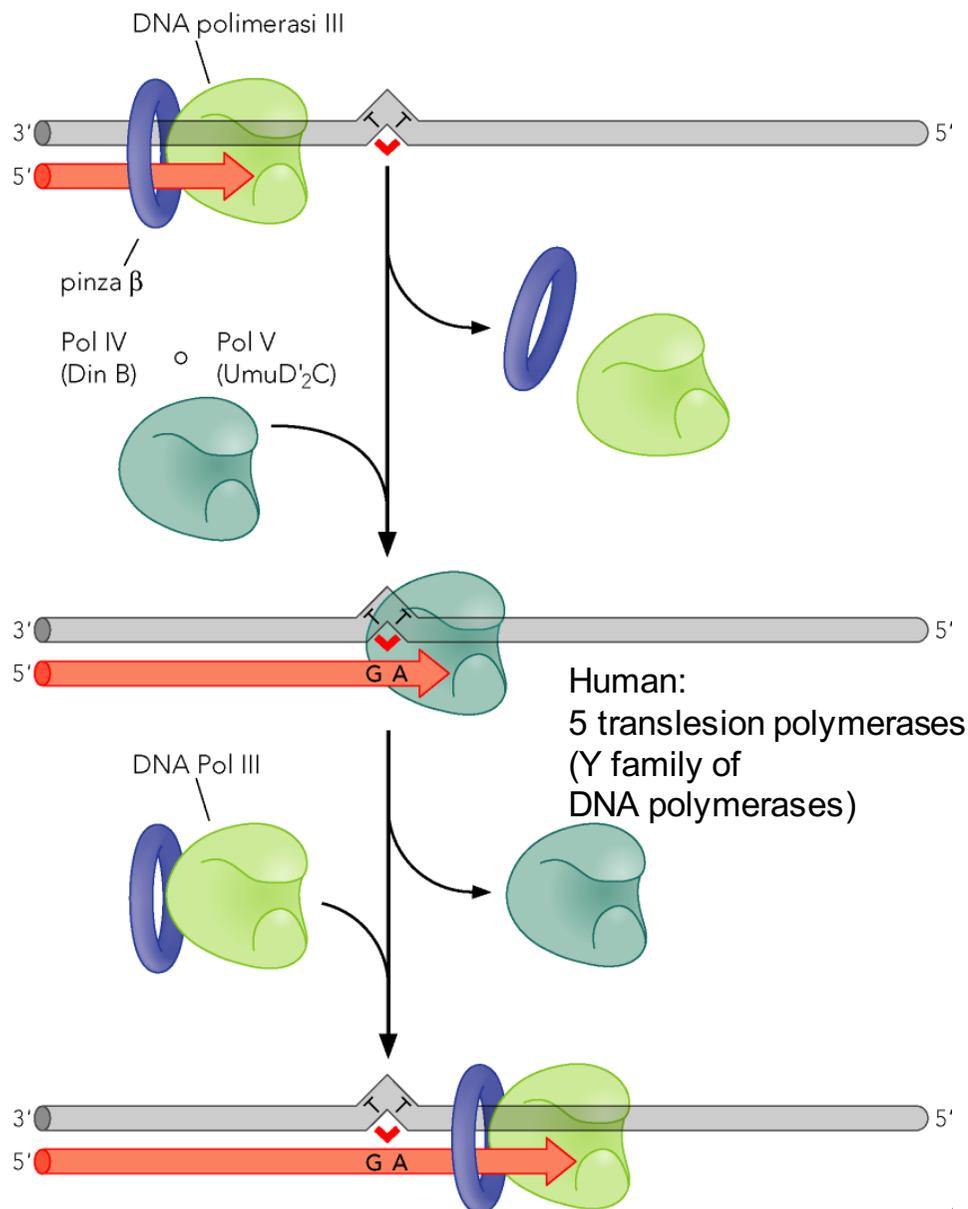
Transcription coupled DNA damage repair

- Quando la RNA polimerasi trova un mismatch, **si ferma**.
- Recluta il **sistema di riparazione per escissione nucleotidica** e si distacca.
- Al sistema partecipa TFIIH che fa parte dei fattori generali di trascrizione
- **XPG** eucariotica taglia un frammento di 24-32 nt



Sintesi del DNA translesione

Translesion synthesis (conserved)



I sistemi di riparazione non sono del tutto efficienti e talvolta una DNA pol si può trovare davanti ad una lesione e si arresta.

O riesce a superare la lesione o la sintesi viene interrotta.

Sintesi translesione: è poco fedele e può causare mutazioni (ma è sempre meglio che avere un cromosoma incompleto).

Viene svolta da una DNA pol ((famiglia Y) che può incorporare nucleotidi anche senza appaiamento. Espressione è altamente controllata per limitare l'accumulazione di mutazioni inserite a causa della attività della Famiglia Y delle DNA Polimerasi

Nei procarioti controllato dall' **sistema SOS (DNA damage)**.

Numerosi sistemi riparano il DNA

Alcuni possono essere definiti di **riparazione diretta**: un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall'evento anomalo.

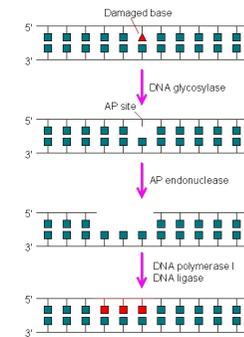
Altri richiedono l'**azione coordinata di più enzimi**: i due sistemi più noti sono:

-riparazione per escissione della base, in cui l'evento iniziale è la rimozione della base chimicamente alterata da parte di una N-glicosilasi, a cui segue la rimozione del resto del nucleotide e il suo rimpiazzo ad opera di una DNA-polimerasi di riparo (ad es. la DNA polimerasi I di *E.coli*).

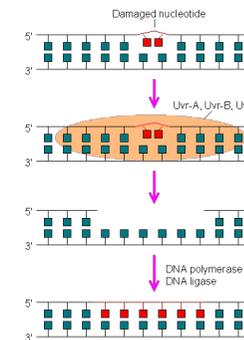
-riparazione per escissione di nucleotidi, in cui vengono idrolizzati enzimaticamente legami fosfoesterei alcune unità a monte e a valle del sito di danno e un segmento di alcuni nucleotidi comprendente il danno viene rimosso, quindi la ricostruzione avviene come nel caso precedente.

NB. La rottura spontanea del legame N-glicosidico tra base e zucchero non è un evento rarissimo nel caso delle purine e il sito apurinicico può dare adito al riparo.

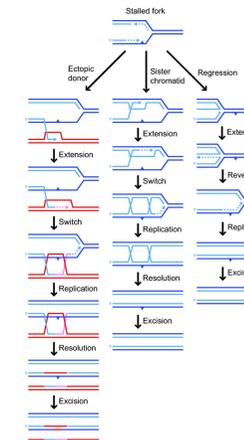
La **riparazione** di una lesione al DNA può anche essere coordinata con eventi di tipo **ricombinativo**, in particolare durante la replicazione del DNA.



Escissione della base



Escissione di nucleotide



Riparazione tipo ricombinativo

Sistema di riparazione delle rotture a doppio filamento

Double-strand break (DSB)

HOMOLOGOUS RECOMBINATION

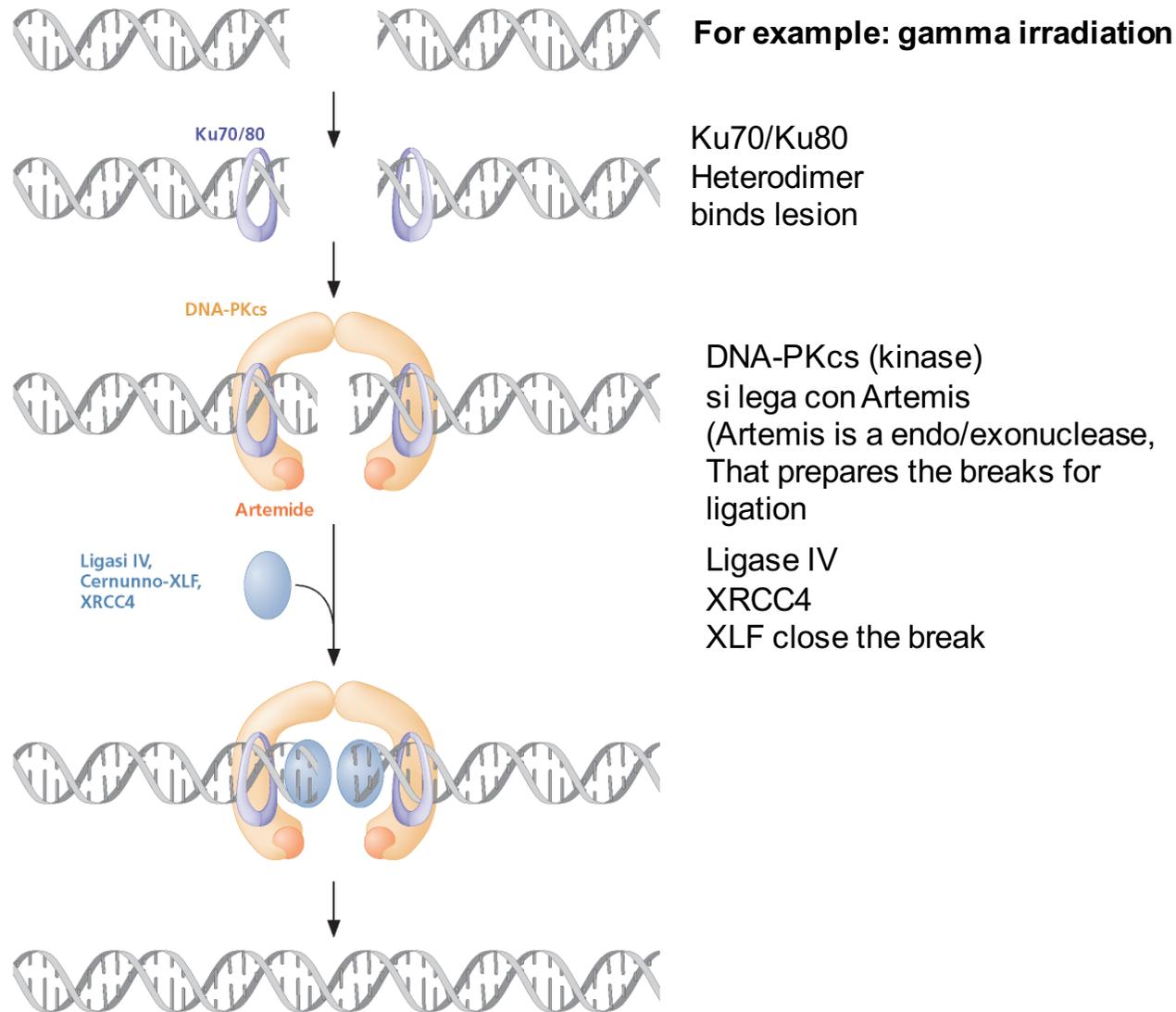
Come fanno le cellule a riparare le rotture a doppio filamento?

Dal cromatidio fratello! → **vedi lezioni ricombinazione omologa**

NON HOMOLOGOUS END JOINING

Giunzione delle estremità non omologhe (nonhomologous end joining **NHEJ**). Negli eucarioti superiori questo è il principale meccanismo per la riparazione di questo danno.

NON HOMOLOGOUS END JOINING



Se non c'è il cromatidio fratello
allora → NHEJ

**Prevalentemente in G1
BEFORE DNA REPLICATION**

**Dal momento che
l'informazione è persa dalla
rottura il processo è
mutagenico ma è sempre
meglio risaldare il DNA con
NHEJ che lasciare le estremità
rotte.**

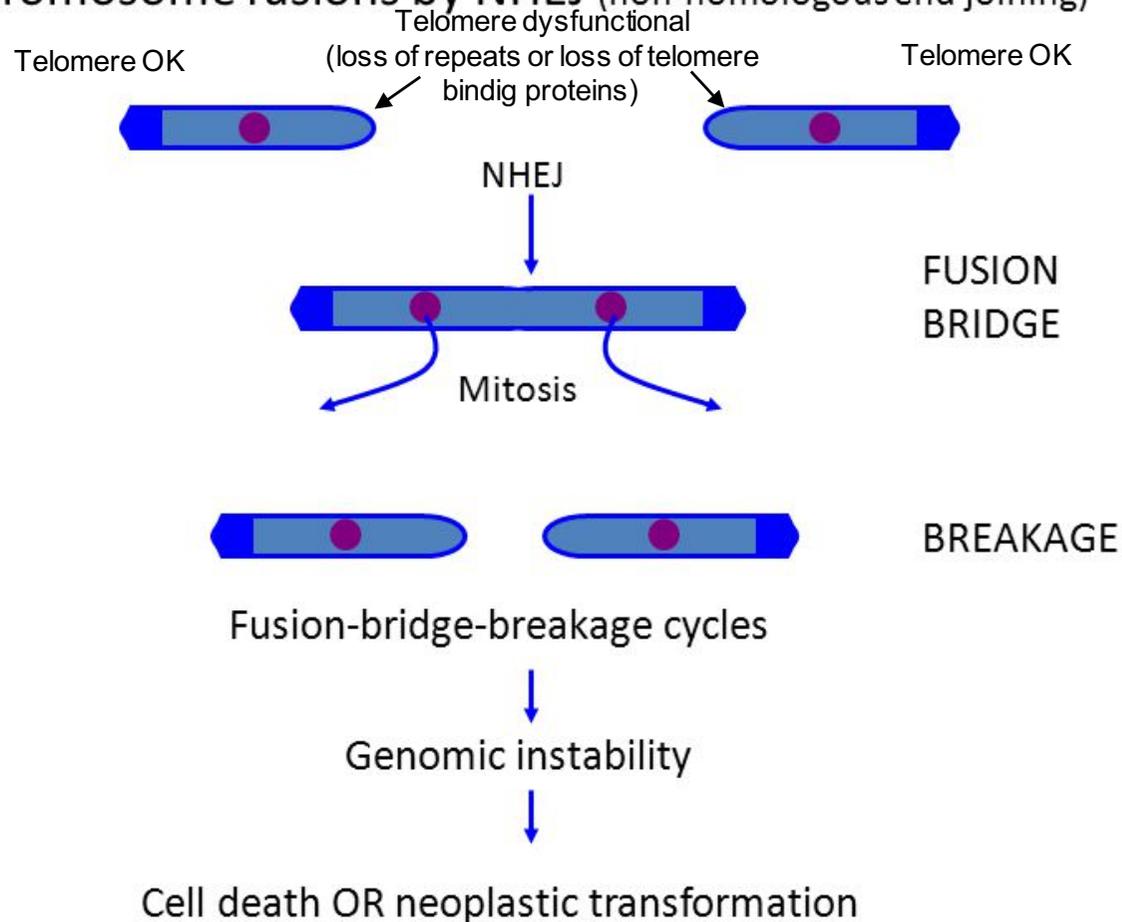
Un eterodimero Ku70 e Ku80 si
lega alle estremità,
successivamente vengono
reclutati altri fattori con diverse
attività che portano alla saldatura
dei due filamenti (con perdita del
materiale genetico).

NHEJ typically utilizes short homologous DNA sequences called microhomologies to guide repair. These microhomologies are often present in single-stranded overhangs on the ends of double-strand breaks. When the overhangs are perfectly compatible, NHEJ usually repairs the break accurately. Imprecise repair leading to loss of nucleotides can also occur, but is much more common when the overhangs are not compatible. Inappropriate NHEJ can lead to translocations and telomere fusion, hallmarks of tumor cells.

Telomeres are hotspots for NON HOMOLOGOUS END JOINING

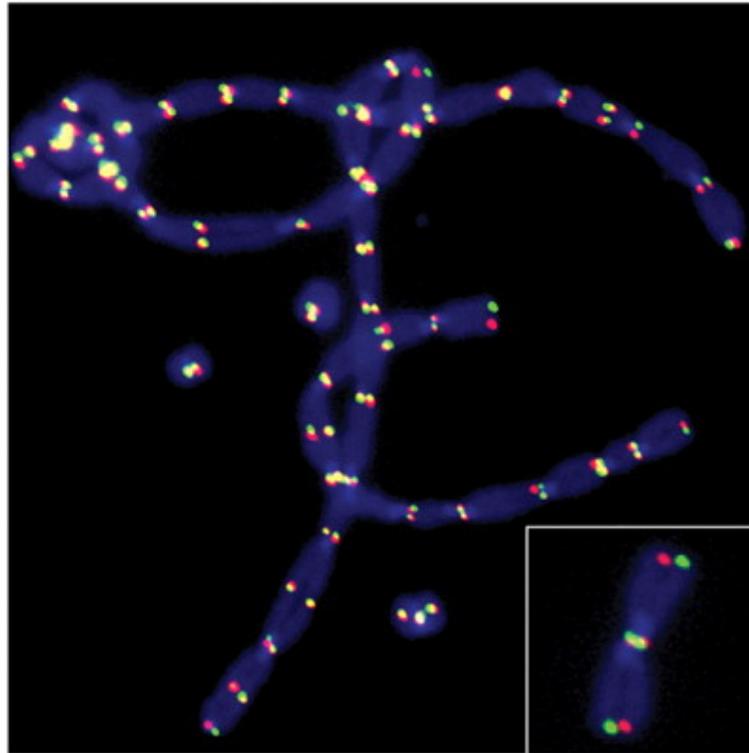
Why are telomeres important?

Prevent chromosome fusions by NHEJ (non-homologous end joining)

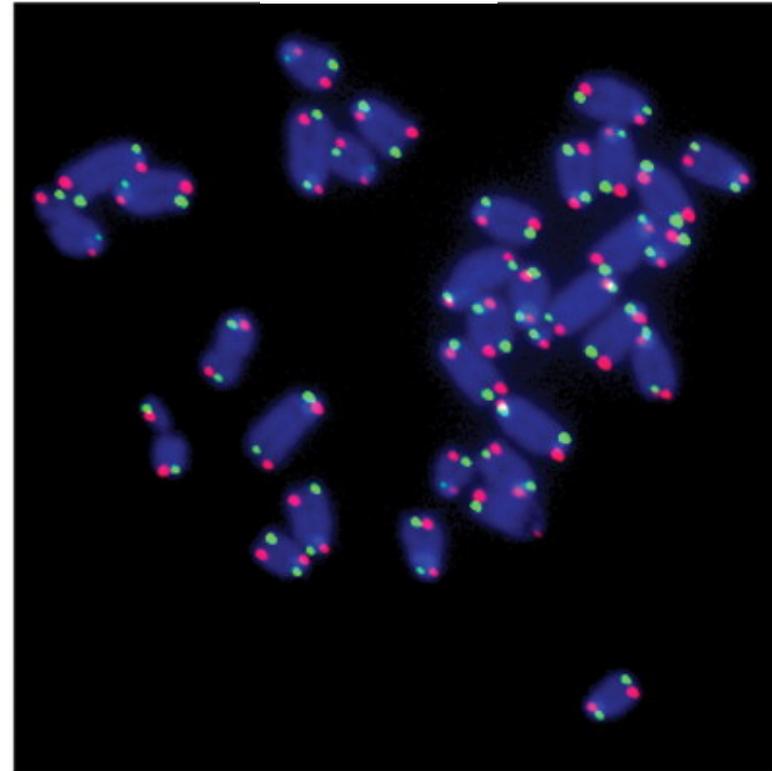


Telomeres are hotspots for NON HOMOLOGOUS END JOINING

Telomere dysfunctional
(loss of telomere
binding proteins)



Telomere OK



Danni ai sistemi di riparazione causano tumori

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