

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

Riparo del DNA

Il danno al DNA può avere due conseguenze:

- 1) **Impedire la replicazione e la trascrizione** (dimeri, nick e rotture scheletro);
- 2) **Fissare mutazioni.**
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



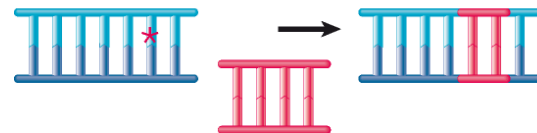
Riparazione per escissione nucleotidica: 28 geni



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

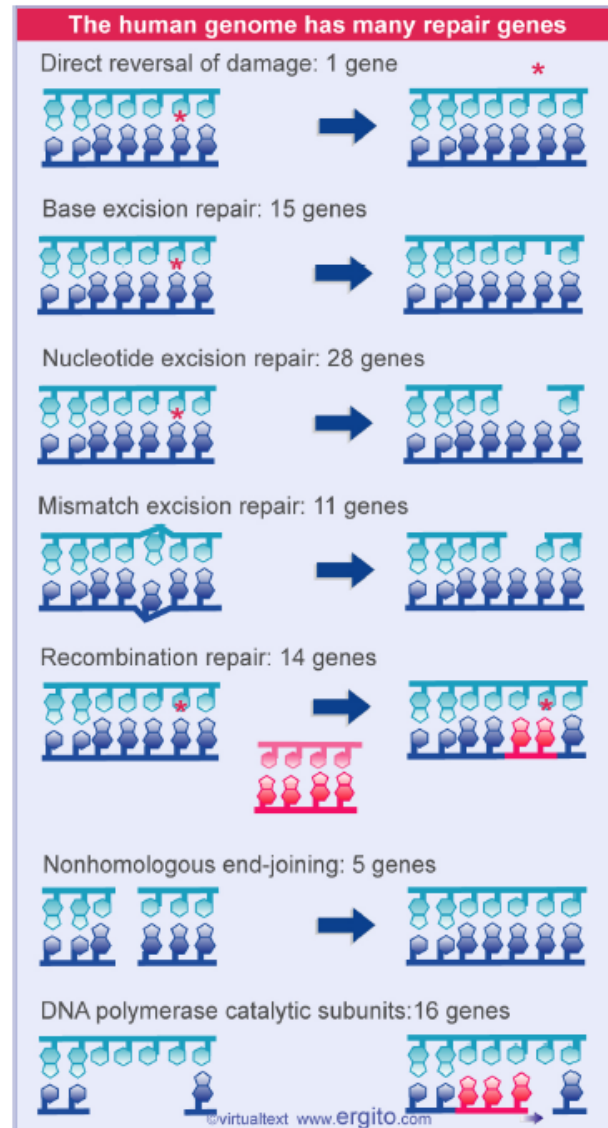
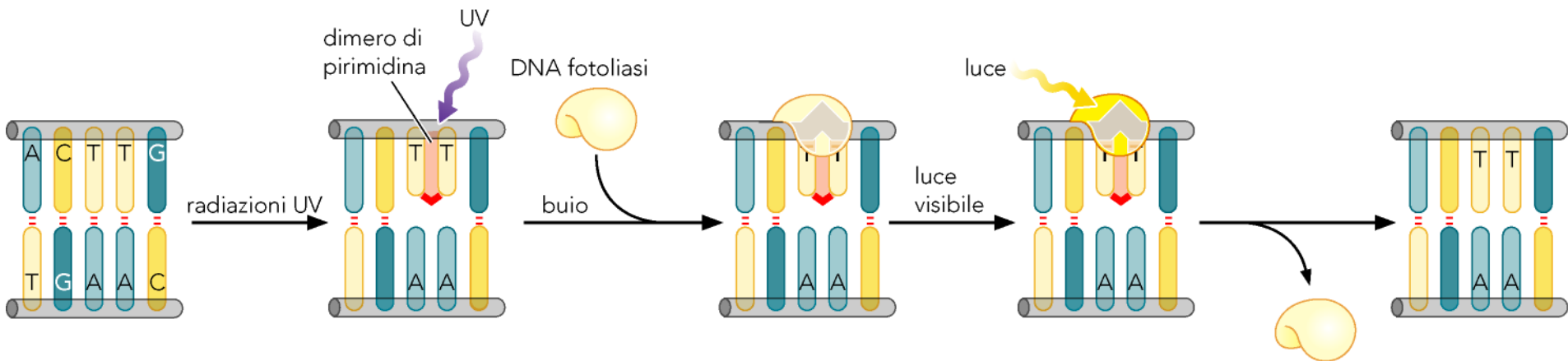


Figure 15.37 Repair genes can be classified into pathways that use different mechanisms to reverse or bypass damage to DNA.

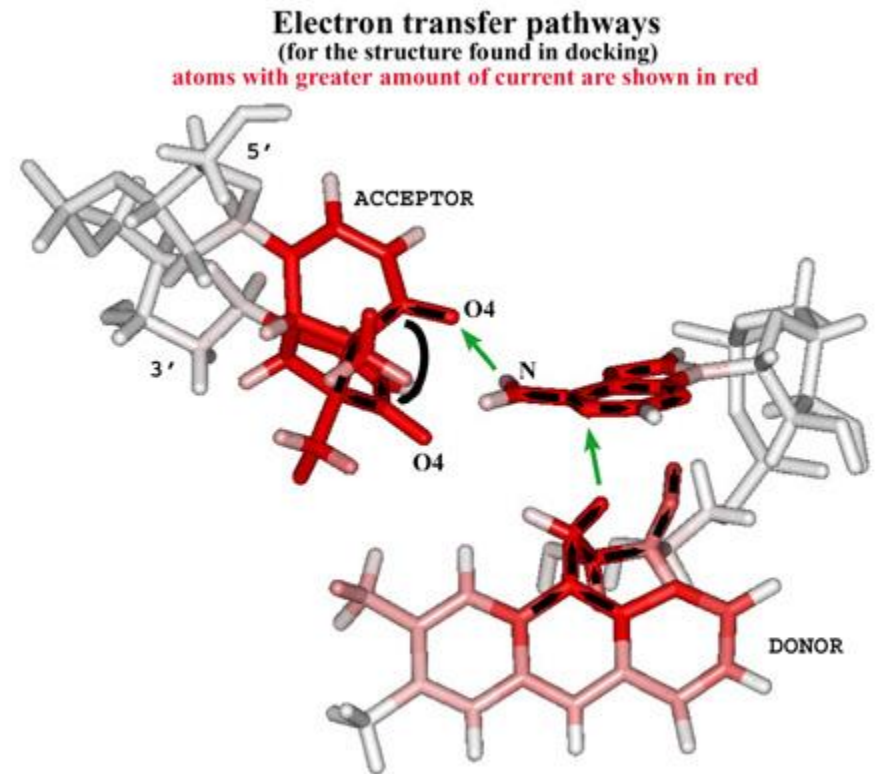
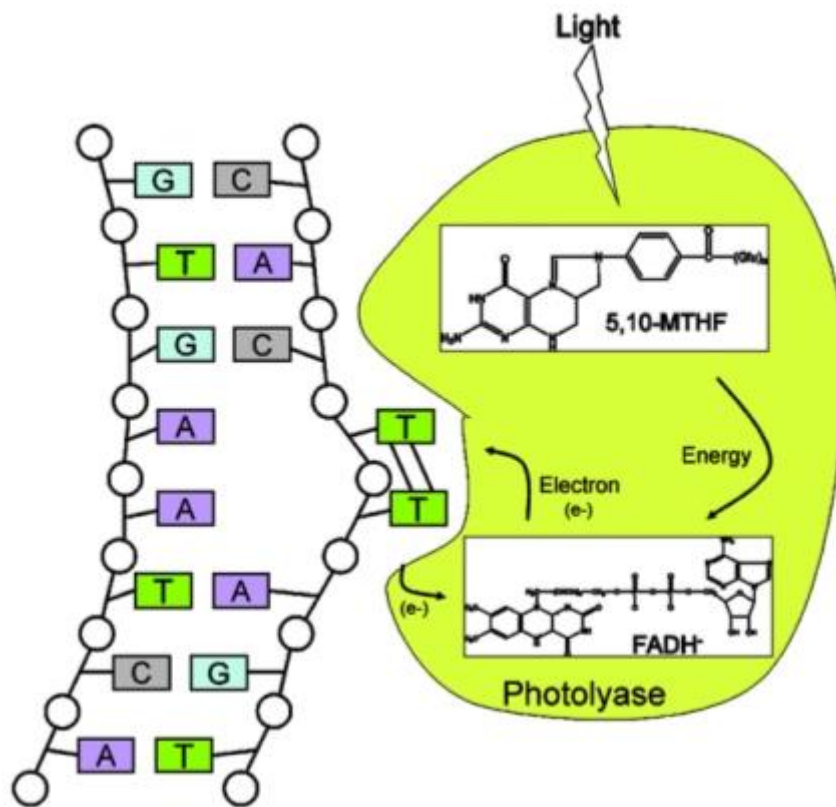
Fotoriattivazione

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

Non è presente nell'uomo!!!



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)

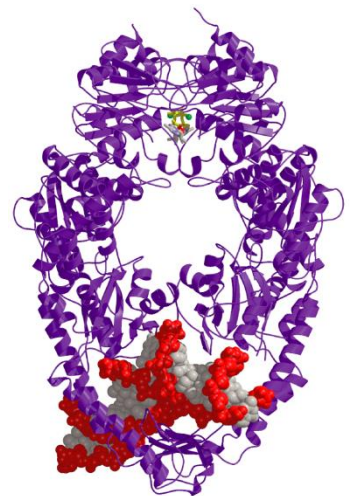
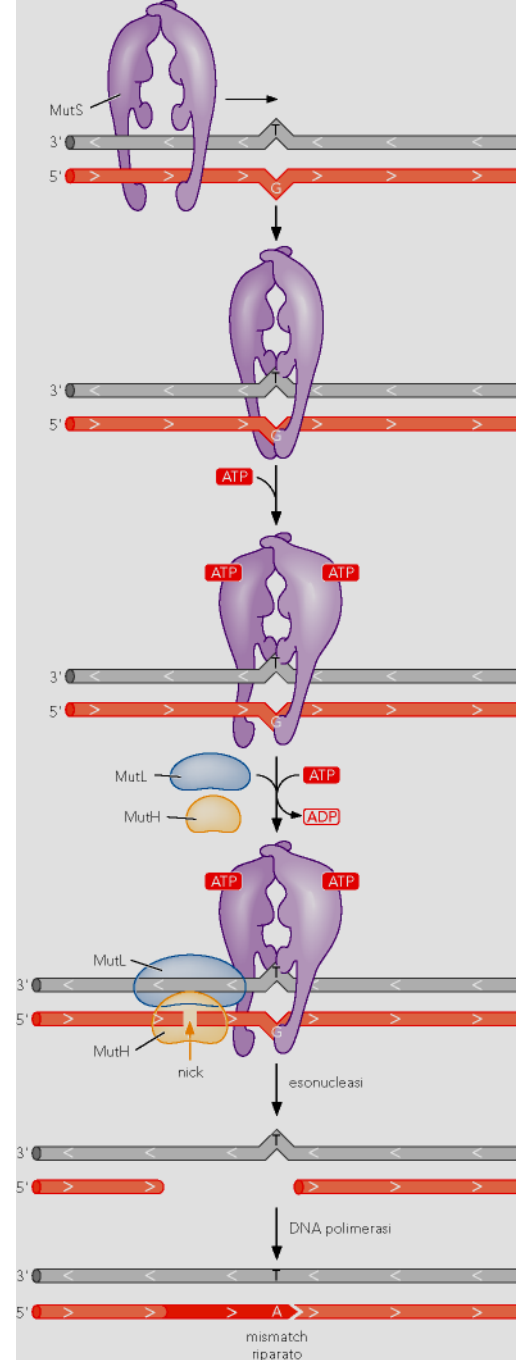
Riparazione del mismatch

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 **MutL**, che recluta **MutH** che taglia il filamento vicino al mismatch

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

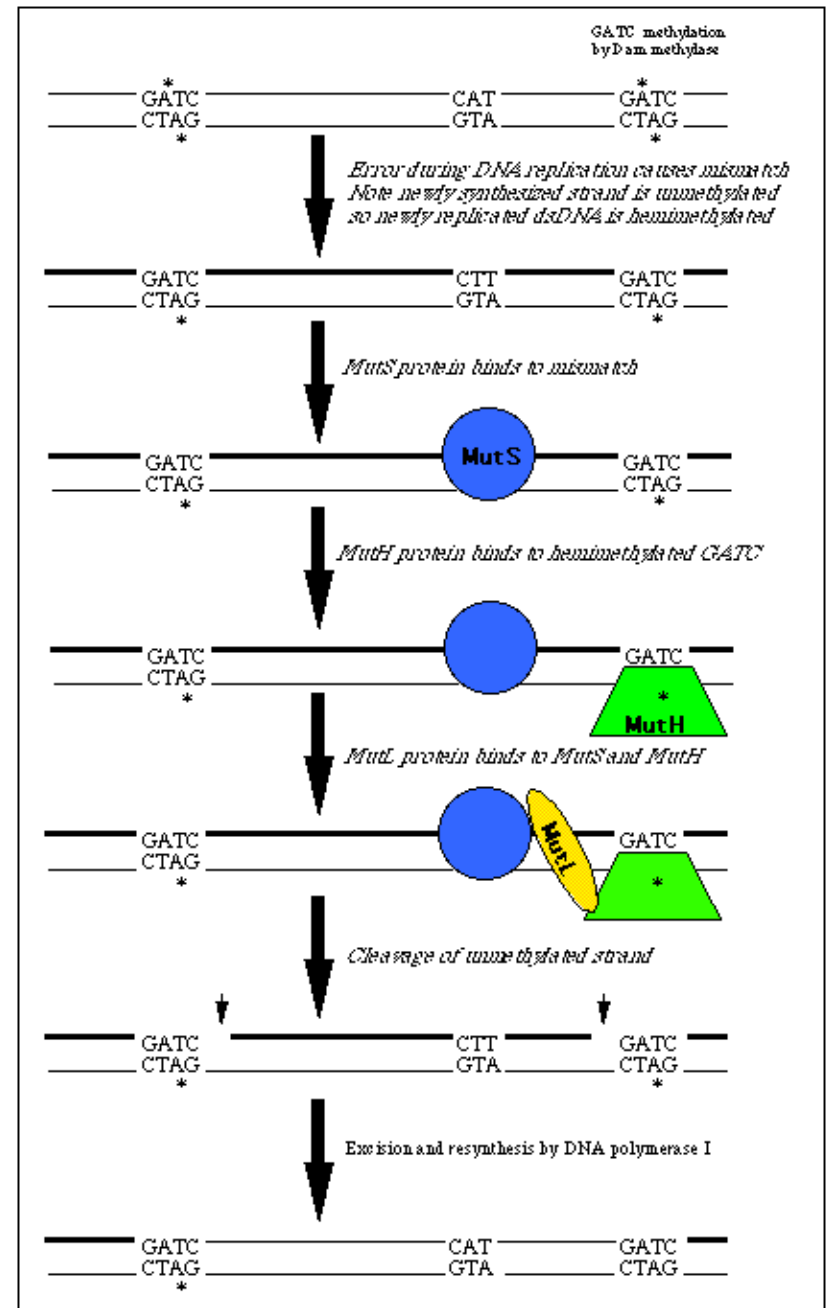
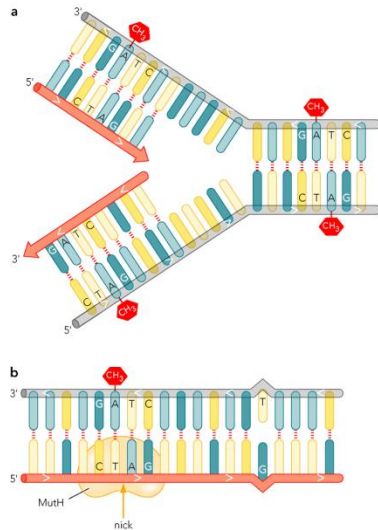


Mismatch repair in *E. coli*

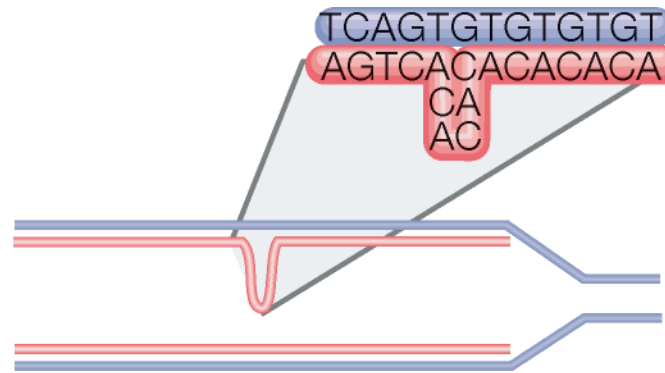
Come fa a identificare il filamento nuovo su cui operare il taglio ed escissione?

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

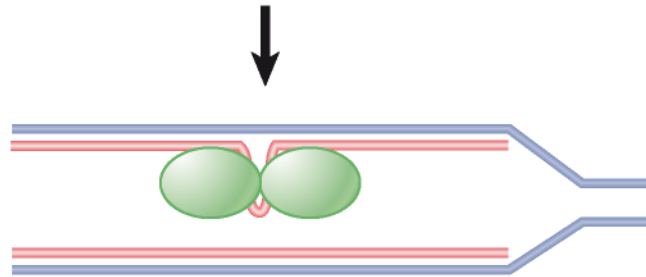
MutS si lega al filamento non metilato



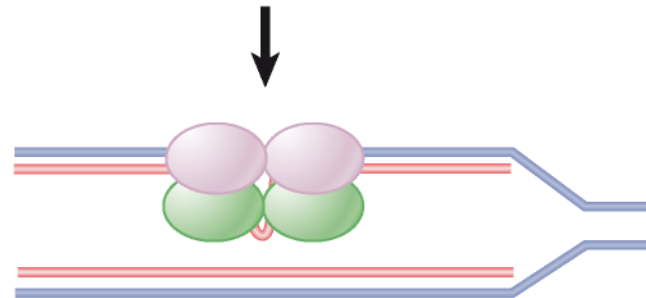
Lo slittamento replicativo
genera un'ansa
a singolo filamento



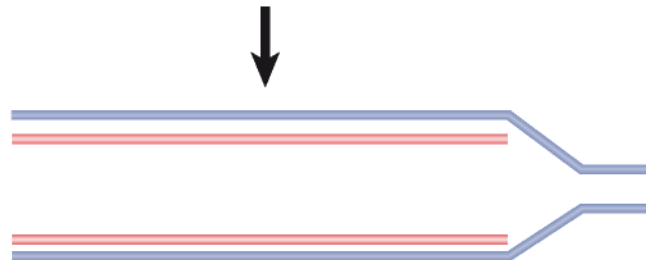
MutS si lega al sito
dell'accoppiamento
sbagliato



MutL si lega



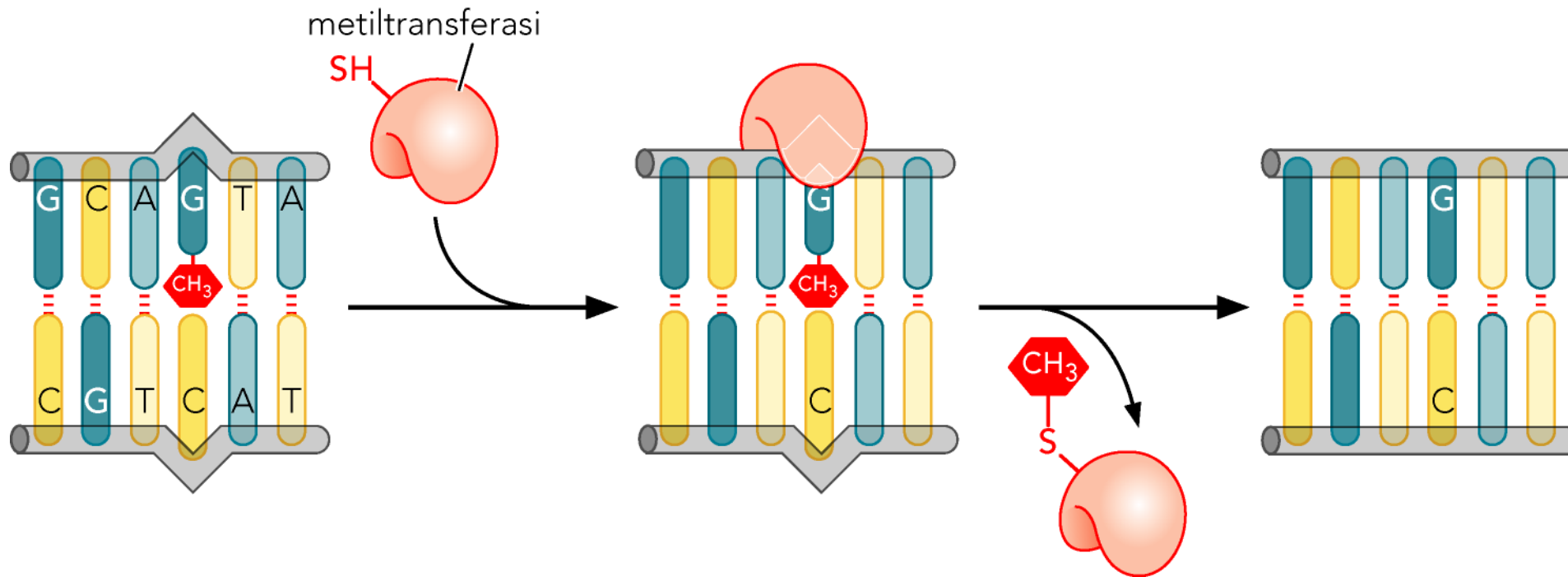
L'accoppiamento
sbagliato è corretto
attraverso l'azione
di esonucleasi, elicasi,
DNA polimerasi e ligasi



Mismatch repair in Eucarioti

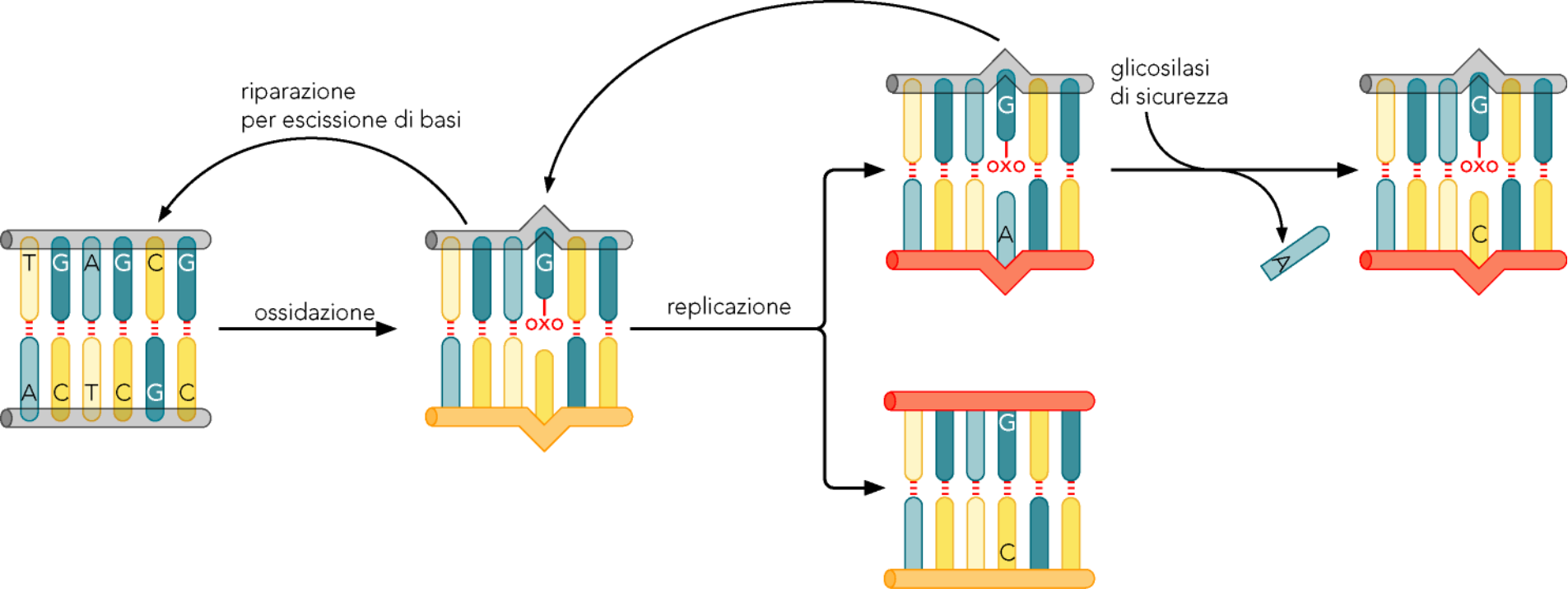
- Gli eucarioti hanno omologhi di Mut(s) con più alta specificità
- Non hanno Dam Metilasi, riconoscono il filamento stampo dalle incisioni dei frammenti di Okazaki. Sono associate al sliding clamp.
- Mutazioni in questi geni predispongono ai tumori

<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Human	Functions of Eukaryotic Proteins
MutS	MSH1	?	DNA repair in mitochondria
"	MSH2	MSH2	Single mismatch and small loop repair (with MSH6 to form MutS α); loop repair (with MSH3 to form MutS β)
"	MSH3	MSH3	Loop repair (with MSH2 to form MutS β)
"	MSH4	MSH4	Meiotic recombination (with MSH5)
"	MSH5	MSH5	Meiotic recombination (with MSH4)
"	MSH6	MSH6	Single mismatch and small loop repair (with MSH2 to form MS α)
MutL	MLH1	MLH1	Forms heterodimeric complexes with the other 3 MutL homologs
"	PMS1	PMS2	Mismatch repair, especially in S phase
"	MLH2	PMS1	Minor role in small loop and mismatch repair
"	MLH3	MLH3	Promotes recombination during meiosis; Small loop repair during mitosis
MutH	?	?	?
uvrD	?	?	?
?	Exonuclease1	Exonuclease1	Mismatch repair (5' to 3' polarity)
?	RAD27	DNase IV FEN-1	Mismatch repair (Flap Endonuclease)



Demetilazione della G

Anche questo è un sistema di riparo diretto: la rimozione del gruppo metile dall'O6 della G è catalizzato 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.

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

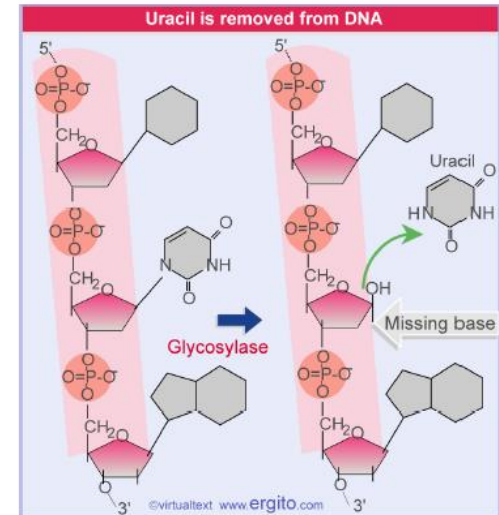


Figure 15.41 A glycosylase removes a base from DNA by cleaving the bond to the deoxyribose.

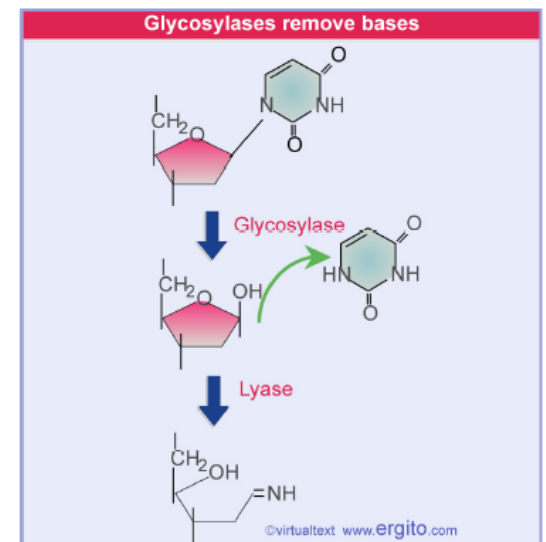
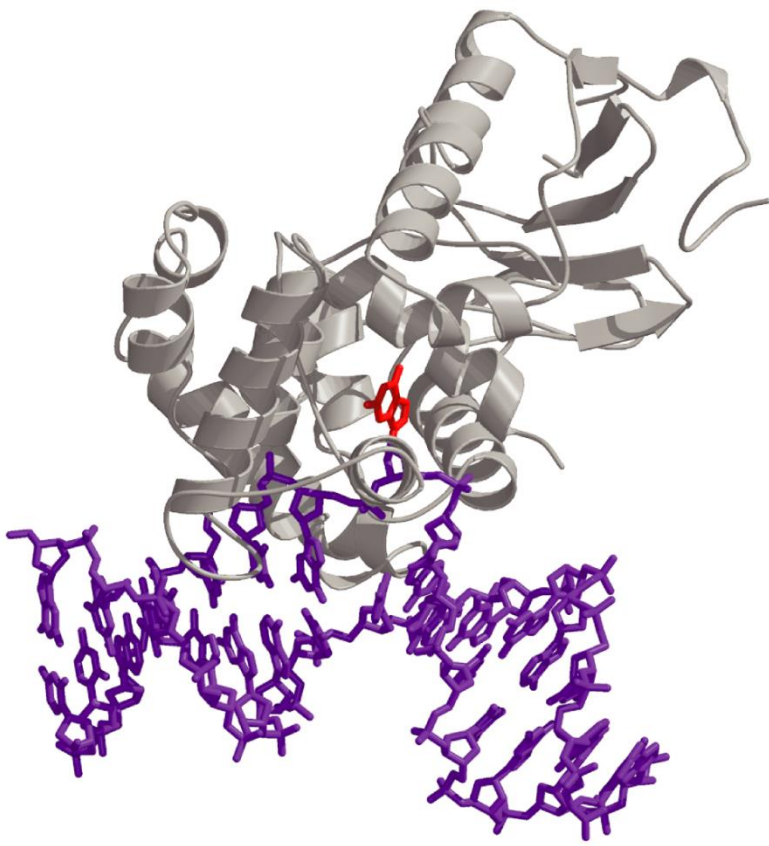


Figure 15.42 A glycosylase hydrolyzes the bond between base and deoxyribose (using H_2O), but a lyase takes the reaction further by opening the sugar ring (using NH_2).



Struttura del complesso DNA-glicosilasi

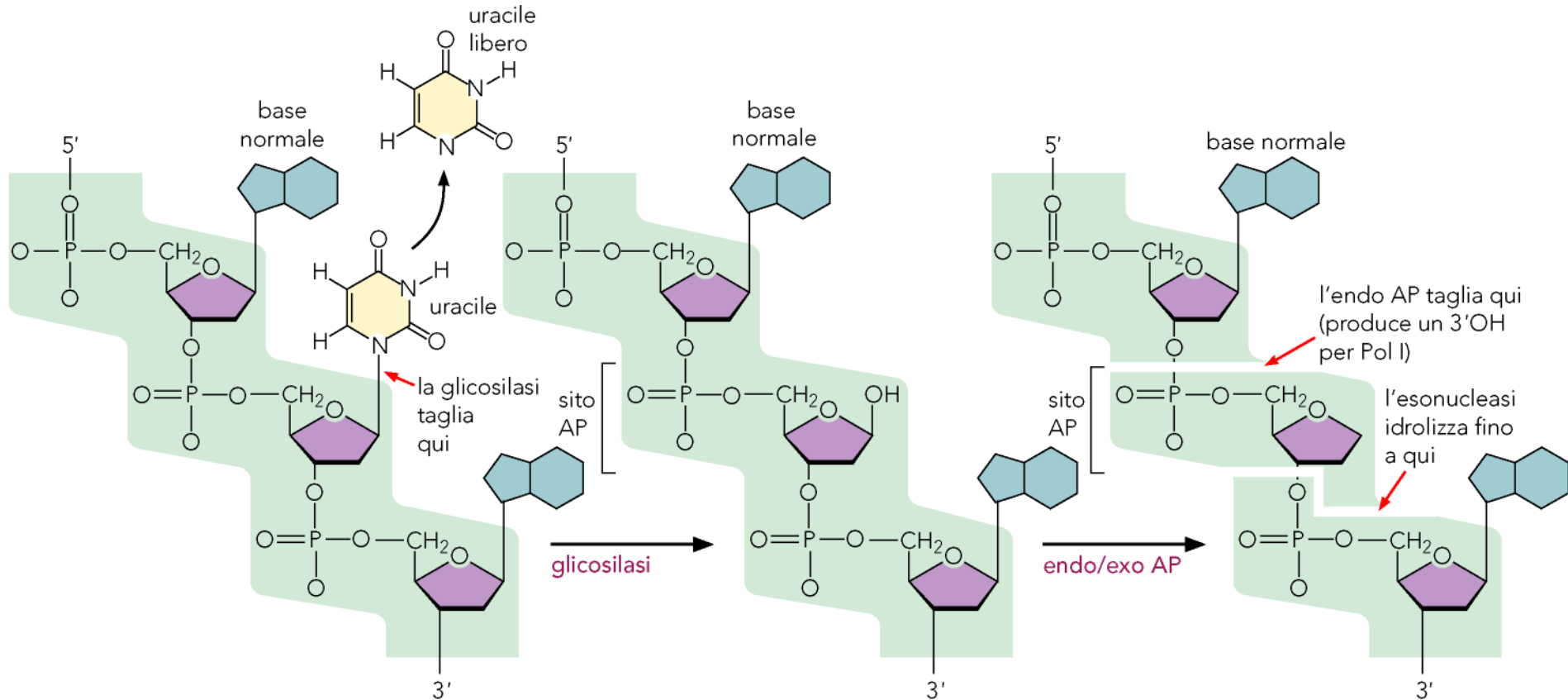
Una base lesionata viene riconosciuta grazie al fatto che può ribaltarsi all'esterno della doppia elica e quindi essere accomodata in un tasca dell'enzima.

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 α -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 formata per ossidazione di G, ecc.

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



Meccanismo di escissione delle basi

(A) BASE EXCISION REPAIR

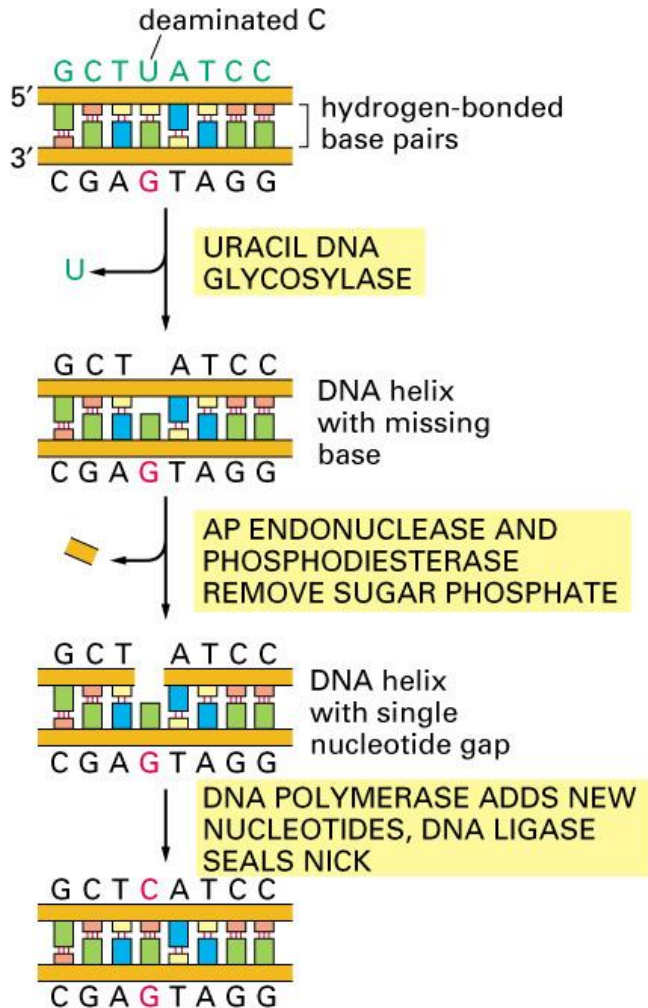


Figure 5-50 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

- Riconoscimento da base-flipping

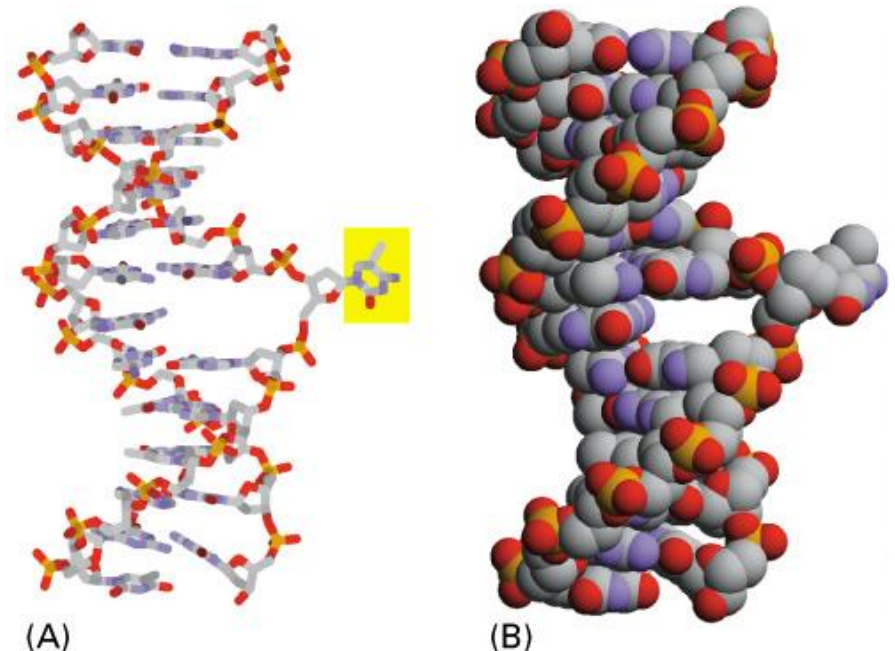
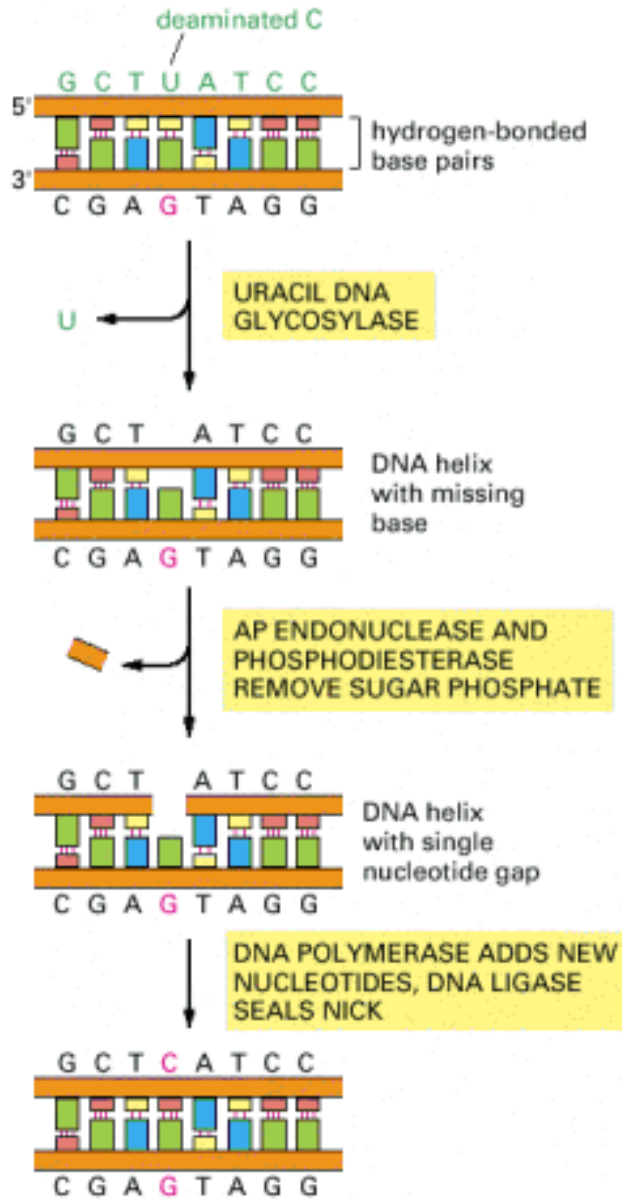
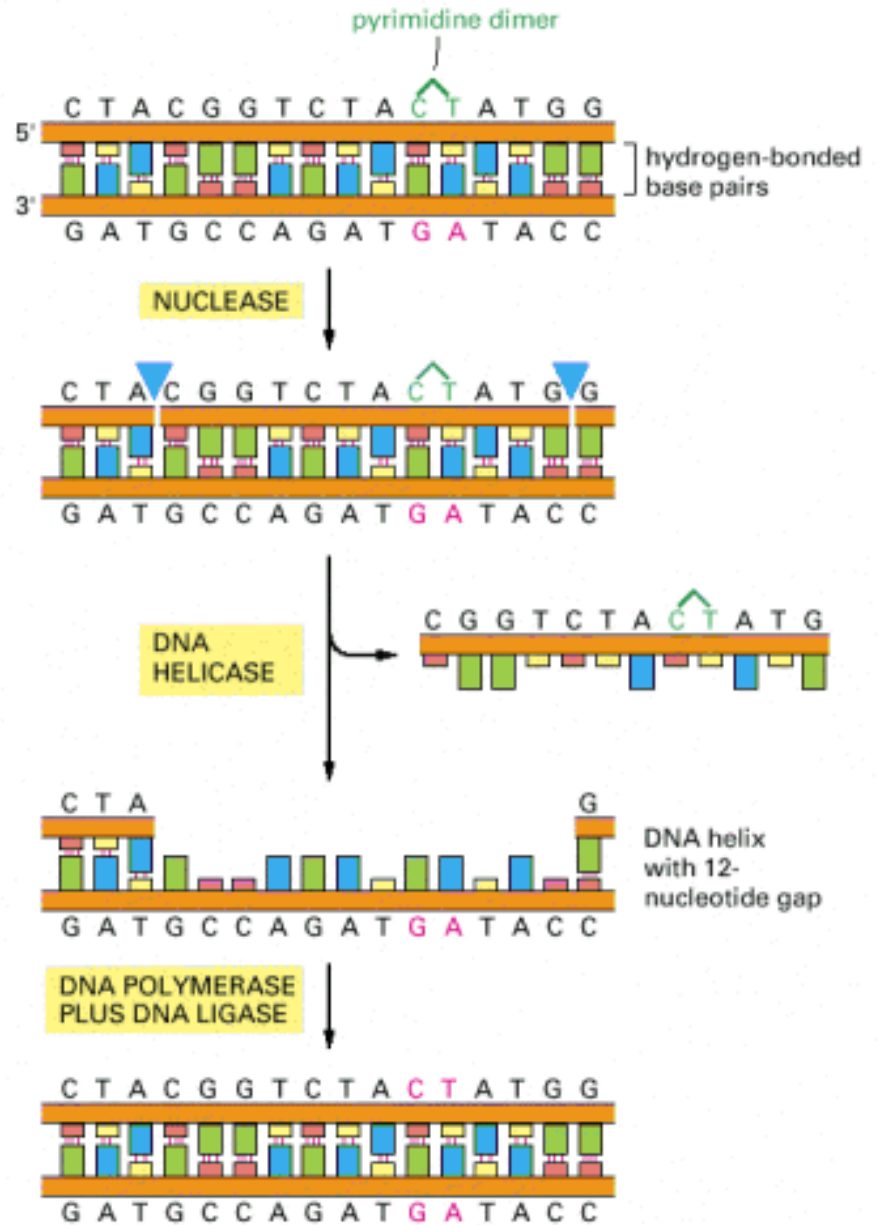


Figure 5-51. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

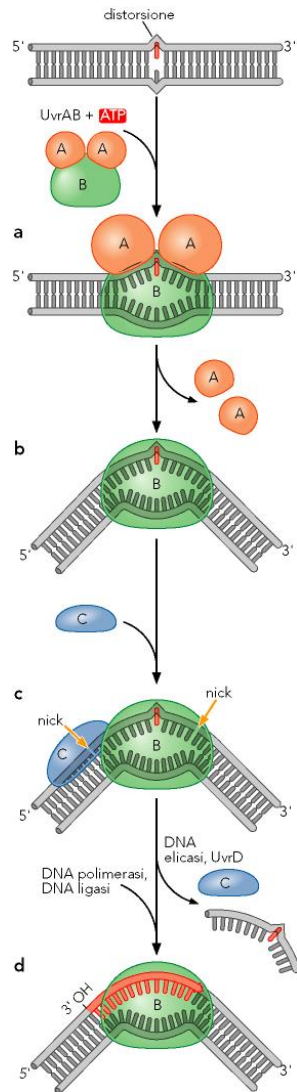
(A) BASE EXCISION REPAIR



(B) NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR

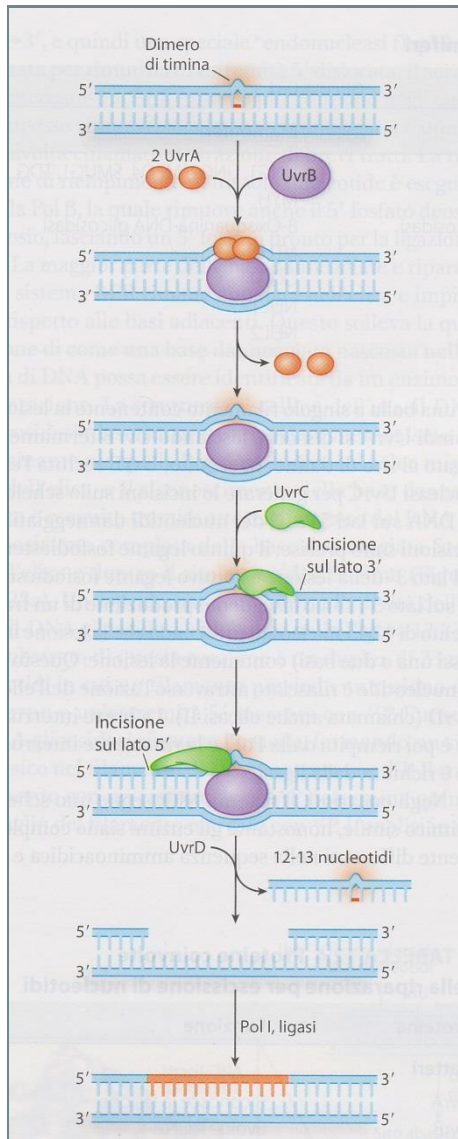


Sistema di riparo per escissione di nucleotidi

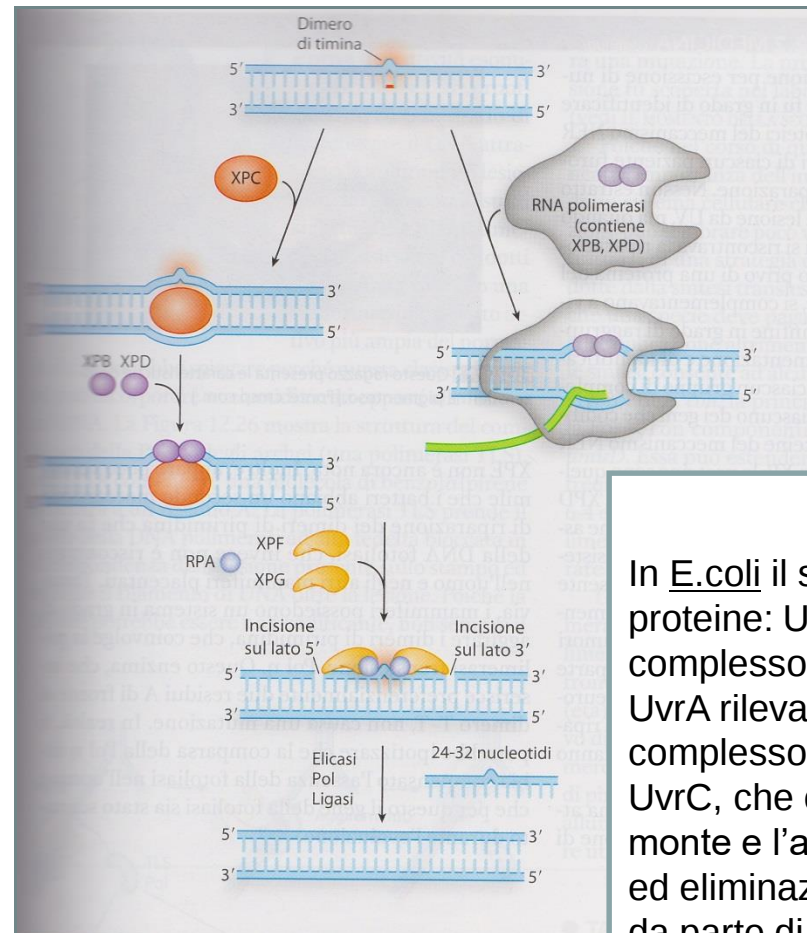


Gli enzimi di questo sistema di riparo non riconoscono le lesioni come tali, ma le conseguenti distorsioni della doppia elica, con rimozione di un corto segmento di DNA a cavallo della lesione.

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.

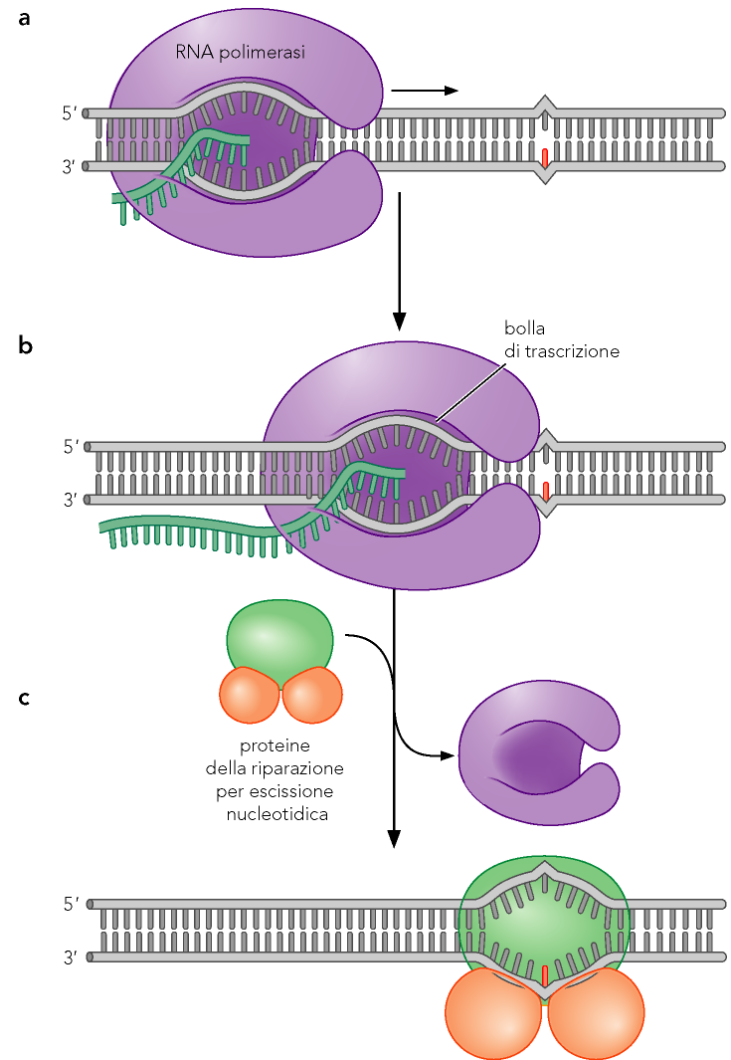
Meccanismi di tolleranza al danno

Sintesi translesione

Riparo per ricombinazione omologa o non omologa

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 FTHH che fa parte del fattore generale di trascrizione
- **XPG** eucariotica taglia un frammento di 24-32 nt



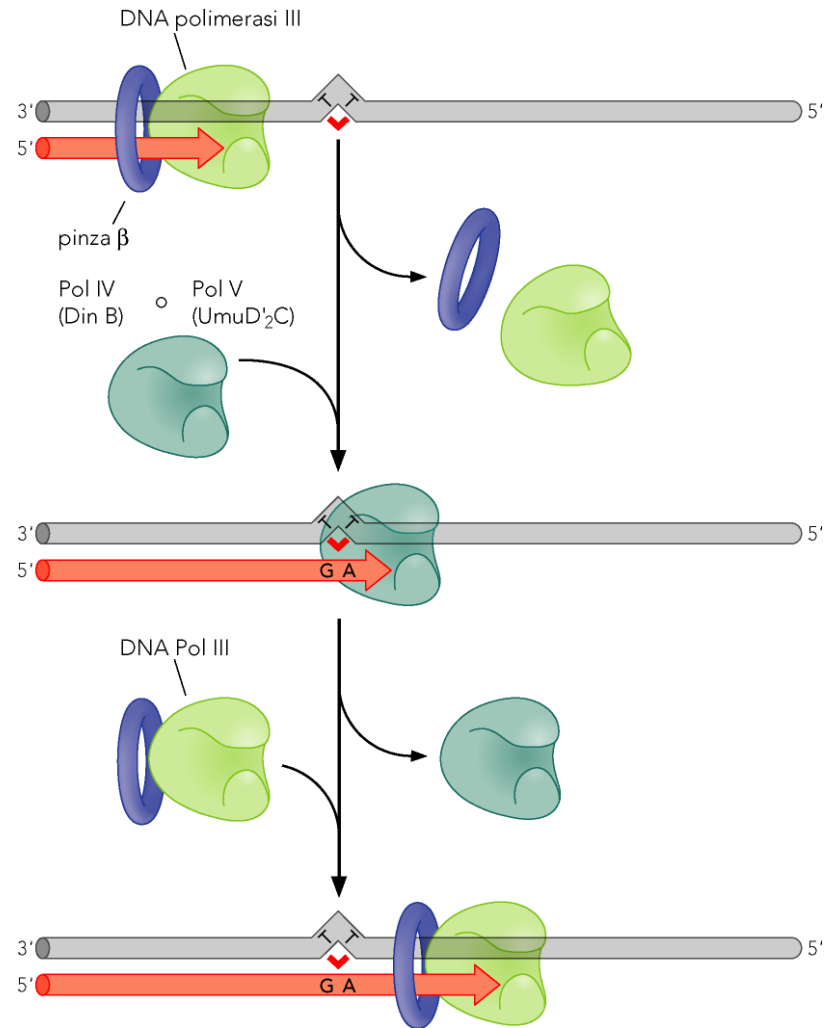
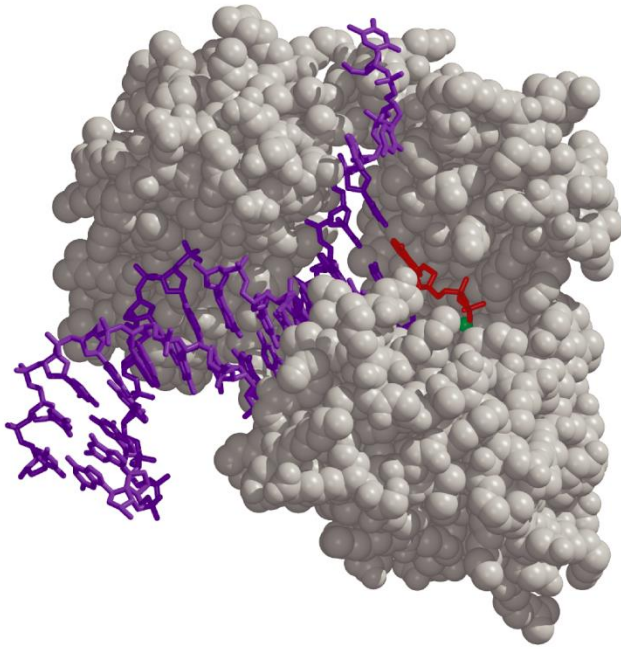
Sintesi translesione

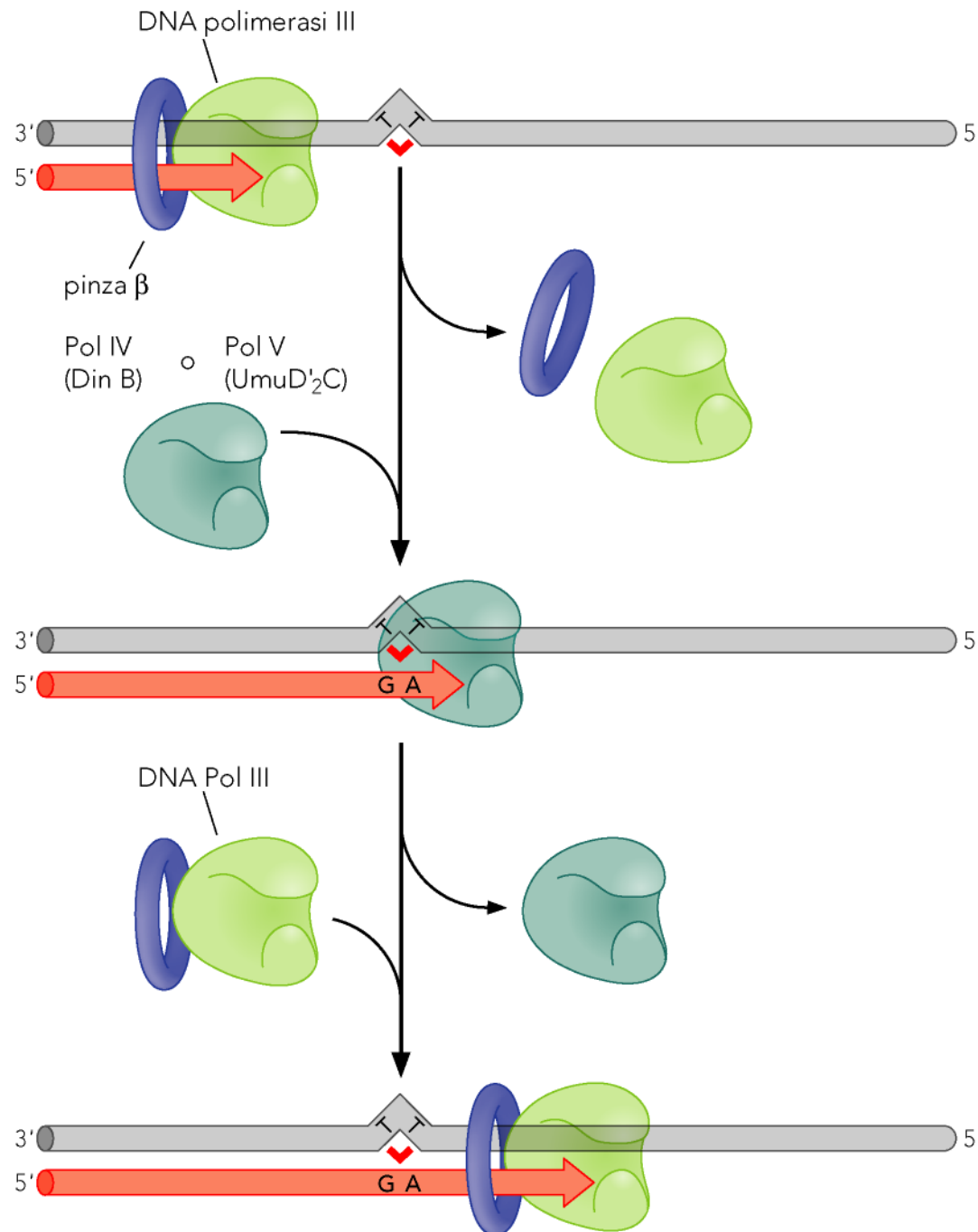
La replicazione del DNA si blocca se trova una lesione. La Pol III si distacca e al suo posto entra:

- La DNA pol translesione (**Pol IV o Pol V**):
Copia il DNA con poca fedeltà.
- Poi si stacca per far posto alla Pol III.

In E. coli queste polimerasi sono indotte dalla risposta SOS

Sintesi del DNA translesione



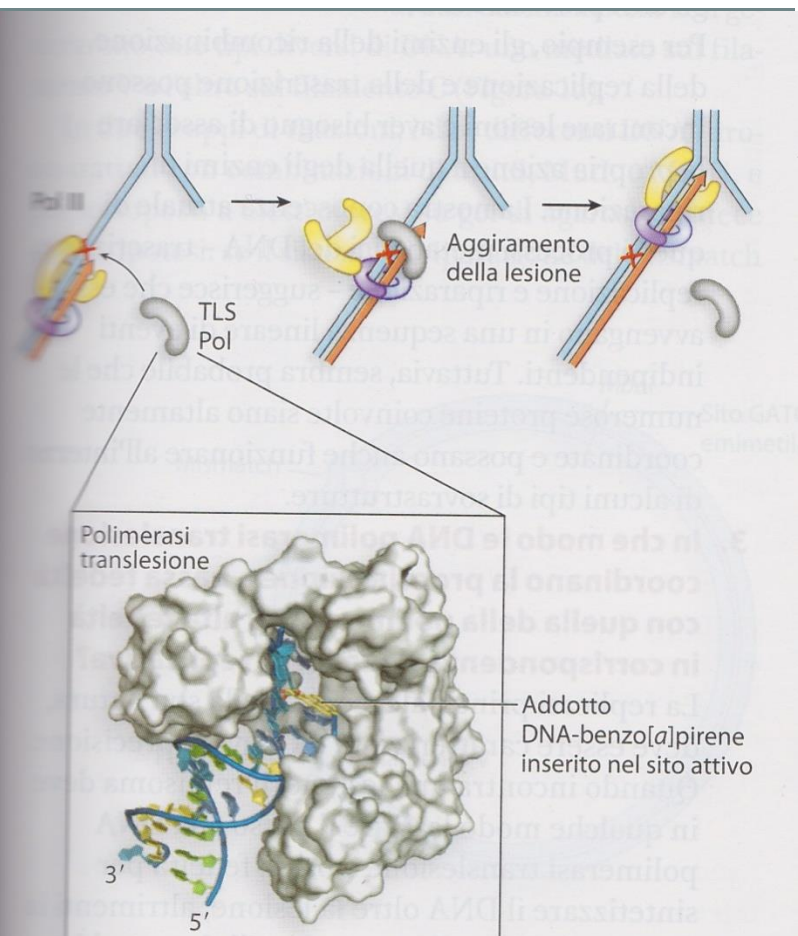


Sintesi translesione del DNA

E' 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. E' 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 risposta SOS, che insorge quando la cellula risulta fortemente danneggiata.



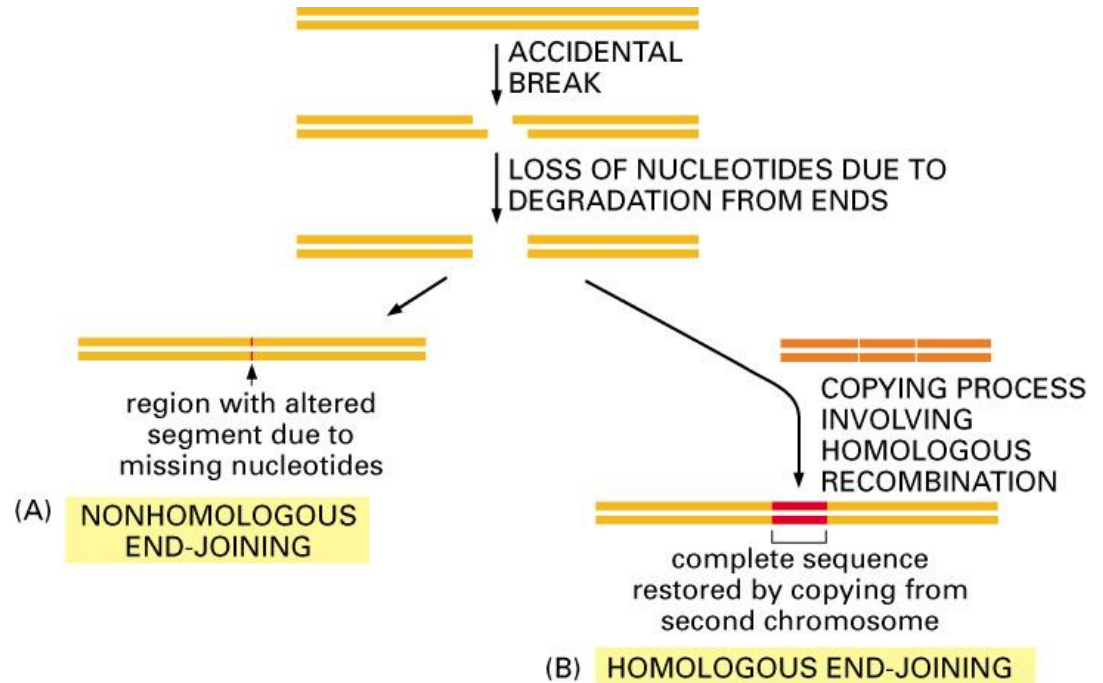
● **TABELLA 12.5** DNA polimerasi specializzate coinvolte nella sintesi translesione

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.

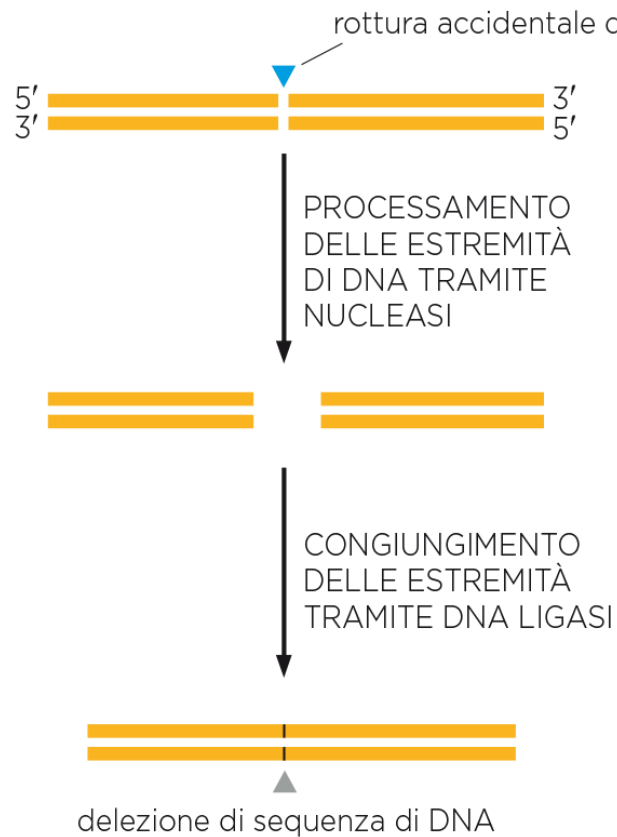
Questo processo è iniziato da una singola protein chinasi, ATM.

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

Il riparo viene effettuato da due diversi meccanismi:

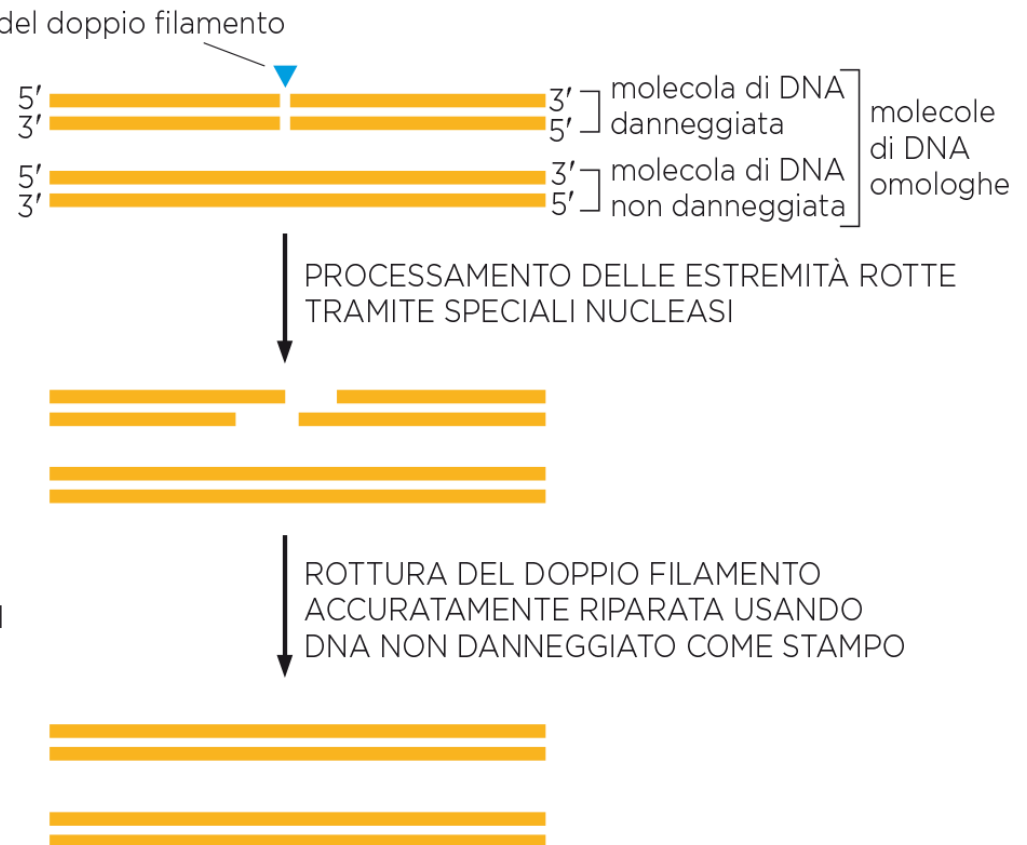
- NHEJ, non homologous end joining (ripara prevalentemente in G1)
- HR, riparo basato sulla ricombinazione omologa (ripara in S, G2 e M)

(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

Modello della Rottura del double strand (DSB)

- Lo scambio genetico solitamente inizia con un taglio del doppio filamento (**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, si appaia al DNA ricevente e viene ricopiato.
- Ci sono due regioni unite.
- Il DNA del donatore ha sostituito quello dell'accettore.

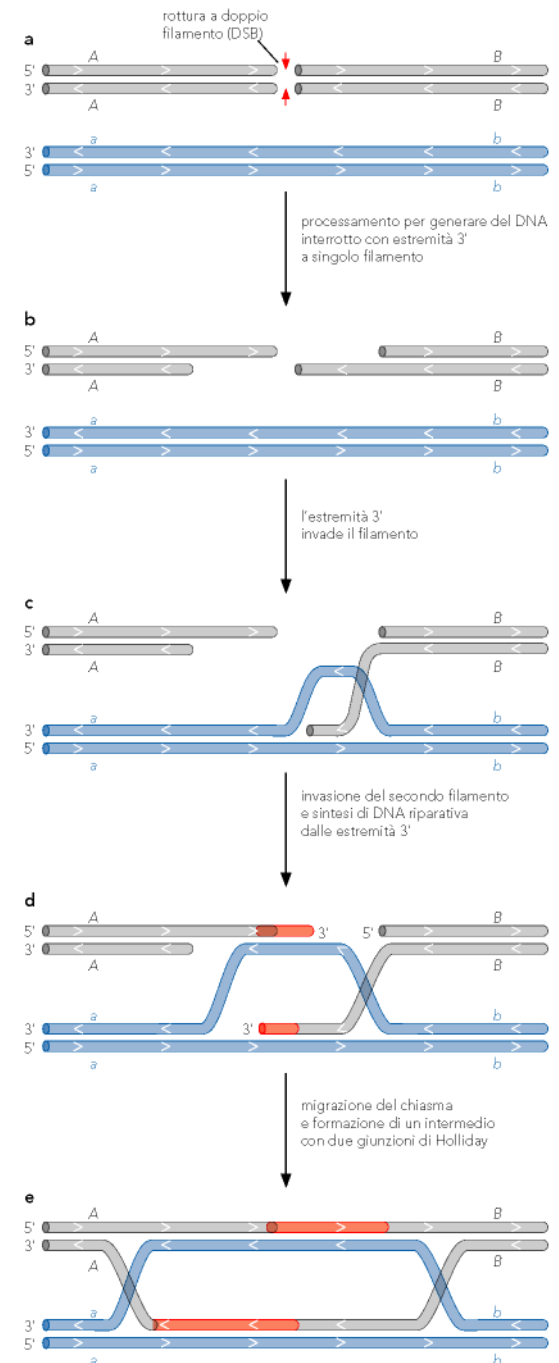
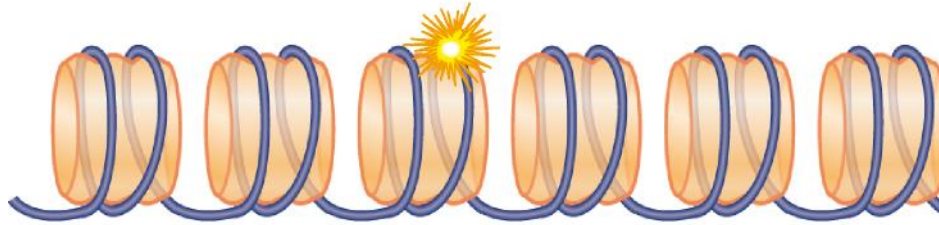


TABLE 5-2 Inherited Syndromes with Defects in DNA Repair

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

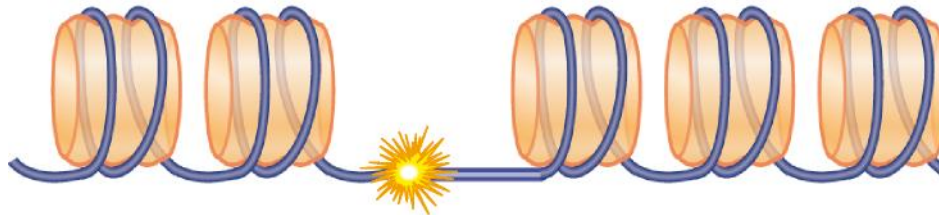
In una regione cromatinica
avviene un danno



Rimodellamento



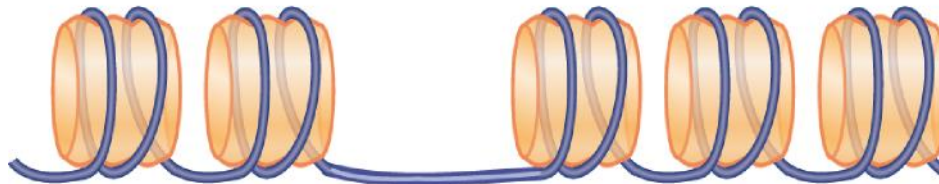
Il rimodellamento permette
l'accesso alla lesione



Riparazione



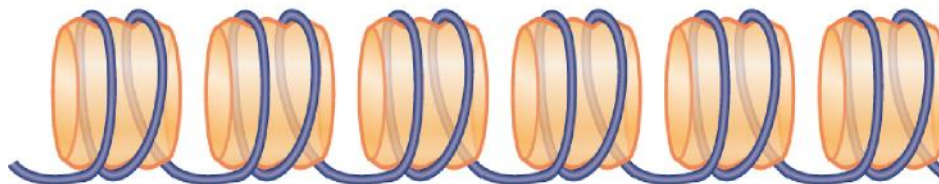
La lesione è riparata



Ricostituzione



L'assemblaggio della cromatina
ricostruisce la struttura originale



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 cancro 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 colorettali 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

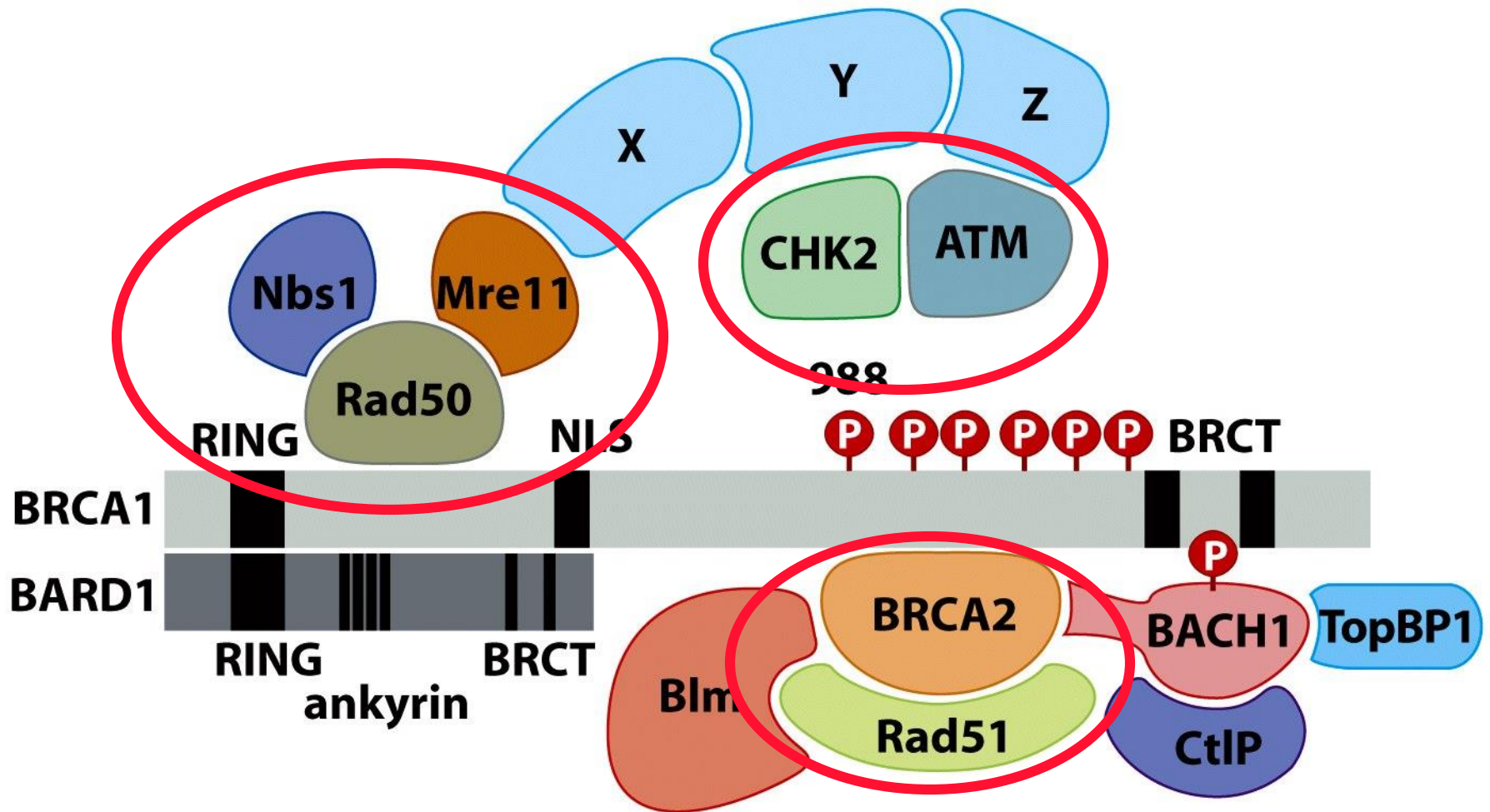
Lo **Xeroderma pigmentoso** è una malattia ereditaria dovuta a mutazioni di geni preposti alla riparazione del DNA. I pazienti affetti da tale patologia non sono in grado di riparare i danni che le radiazioni ultraviolette inducono nel DNA, e sono predisposti all'insorgenza di tumori maligni della pelle



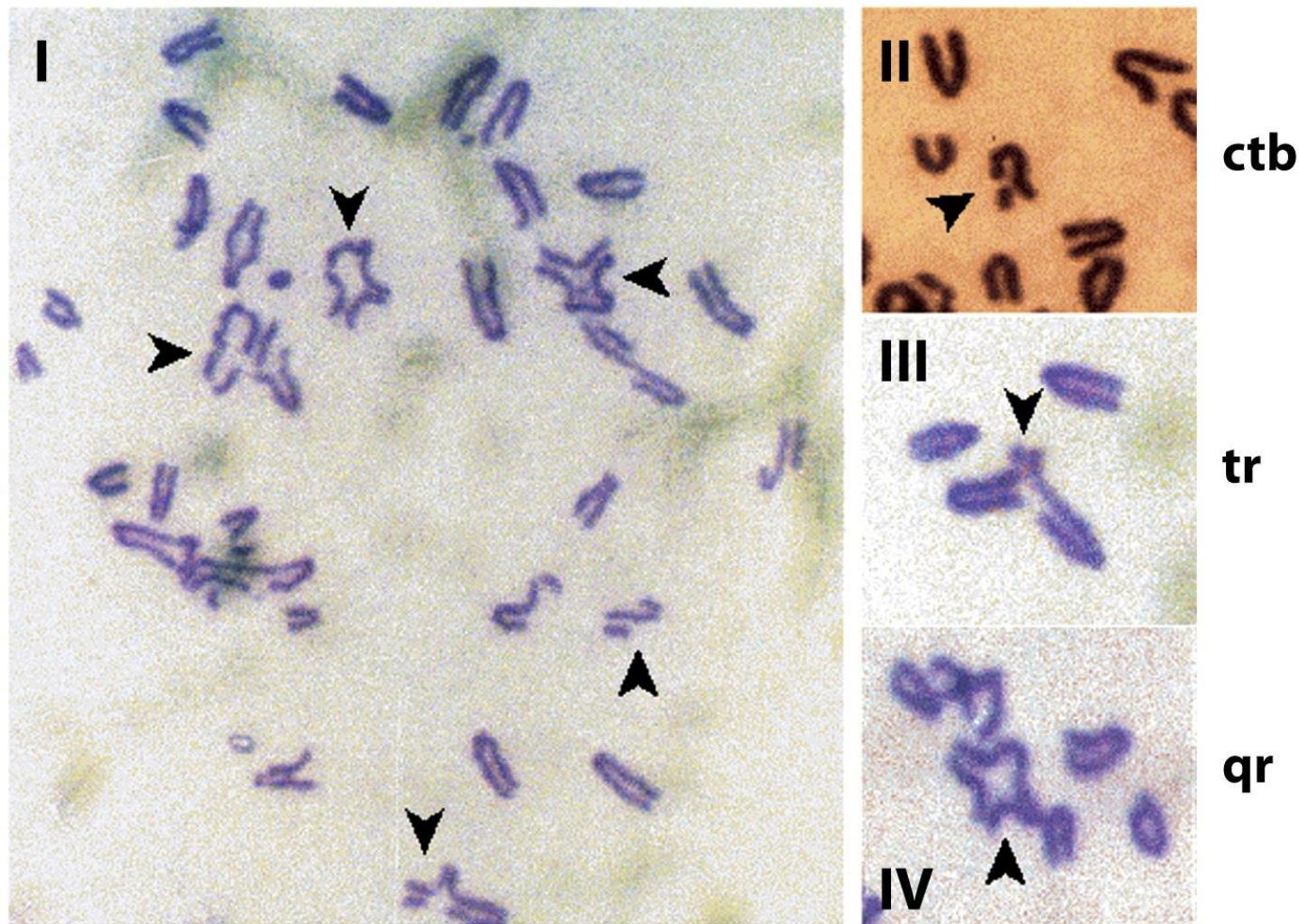
Tabella 17.6 Malattie genetiche associate a difetti nei sistemi di riparazione del DNA

<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



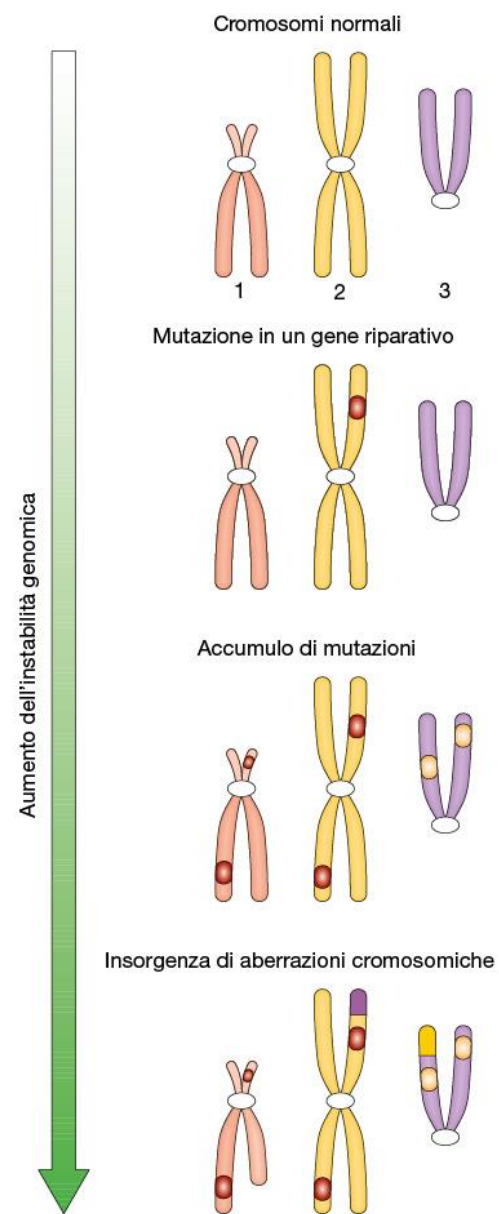


Figura 7.15A Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

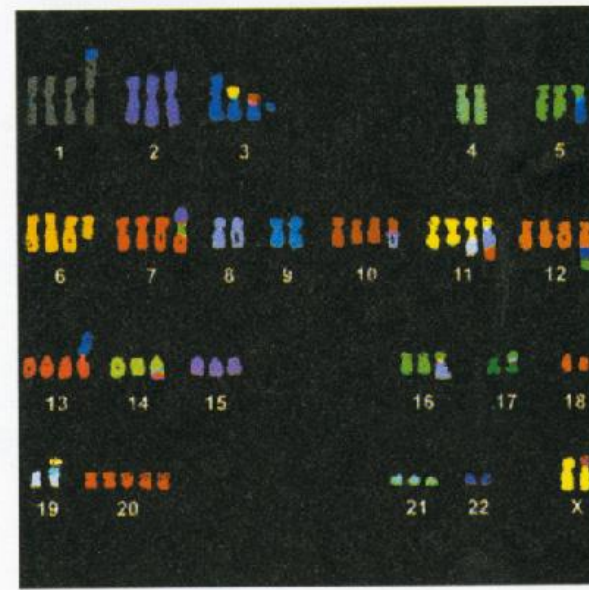
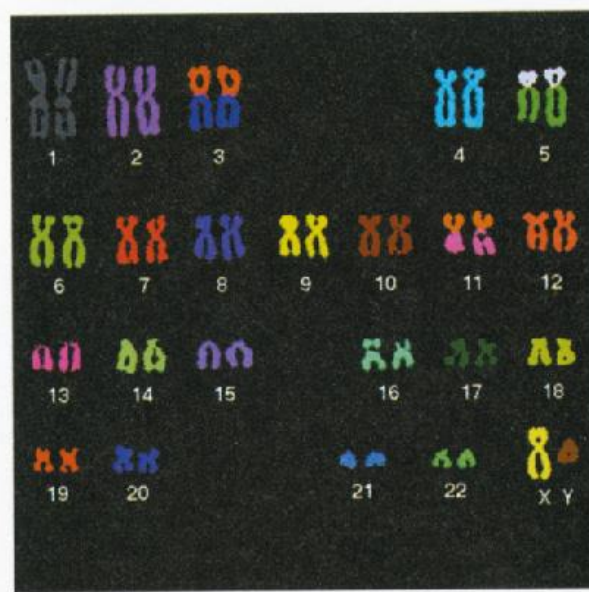


Figura 7.15B Mutazioni in un gene coinvolto nella riparazione del DNA aumentano l'instabilità dell'intero genoma.

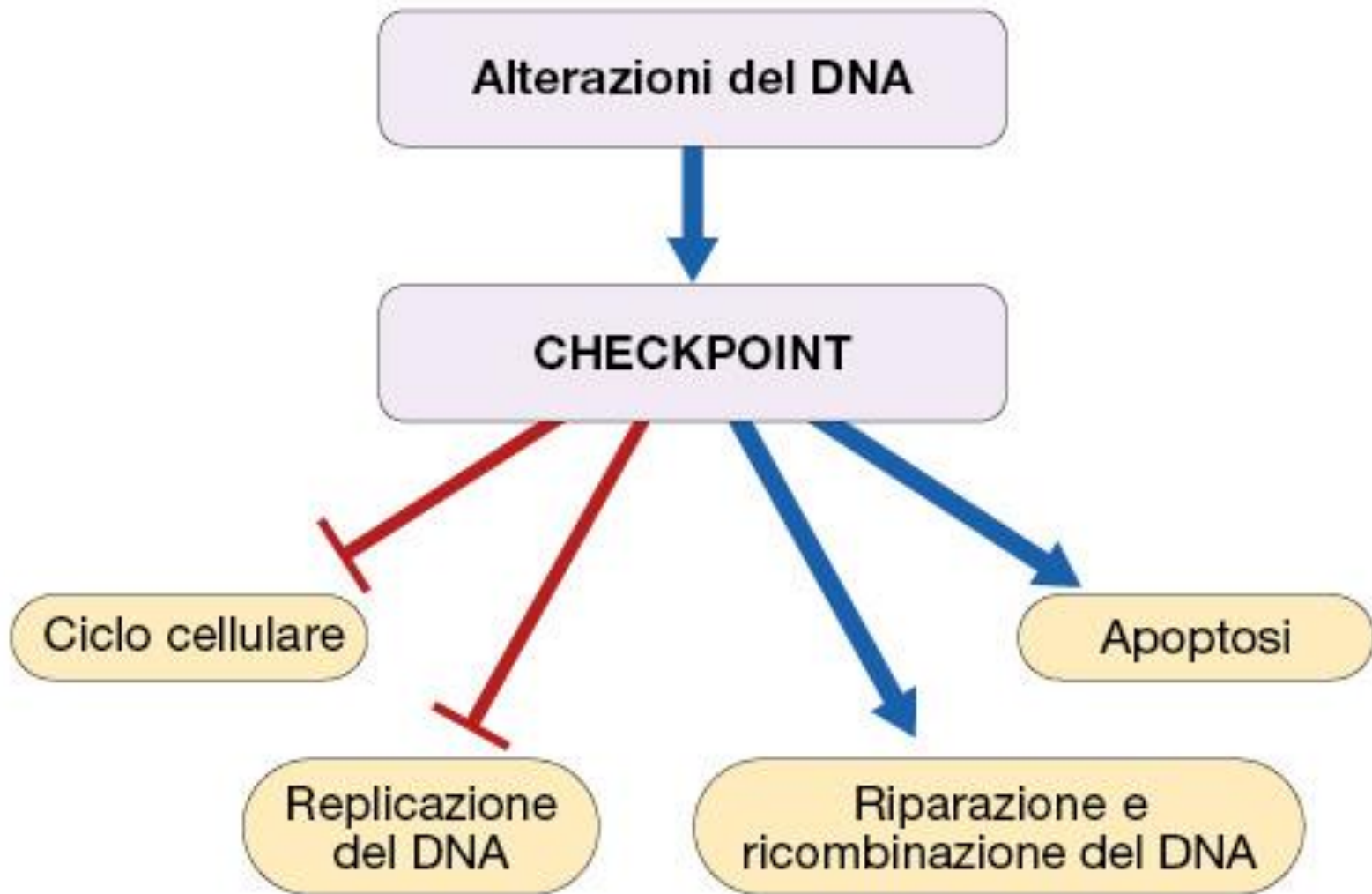


Figura 7.11 La risposta cellulare a danni al DNA attiva il checkpoint.

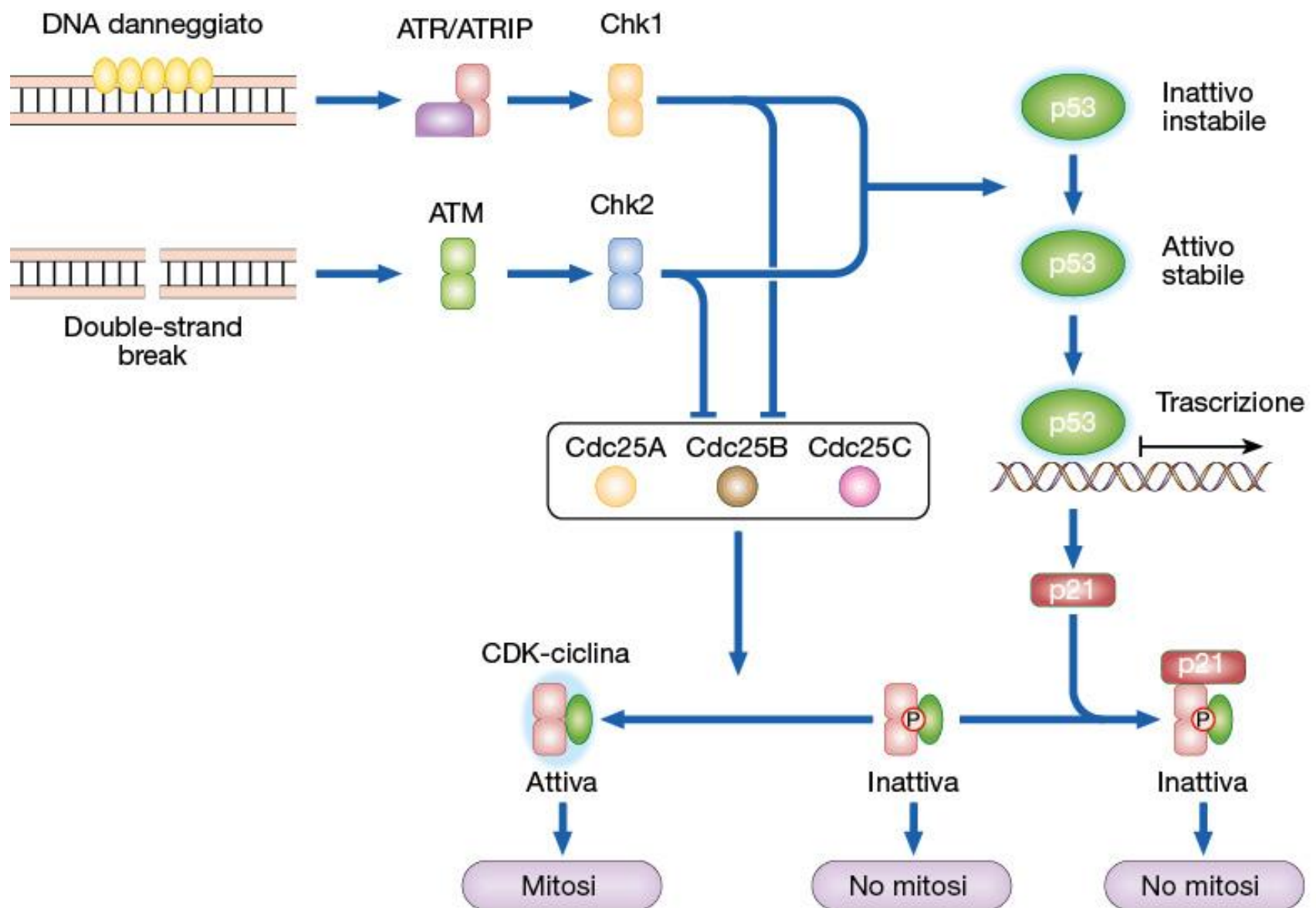


Figura 7.14 Il checkpoint da danno al DNA agisce su p53 e Cdc25 bloccando l'entrata in mitosi.

Diversi tipi di danno al DNA e diversi meccanismi di riparo

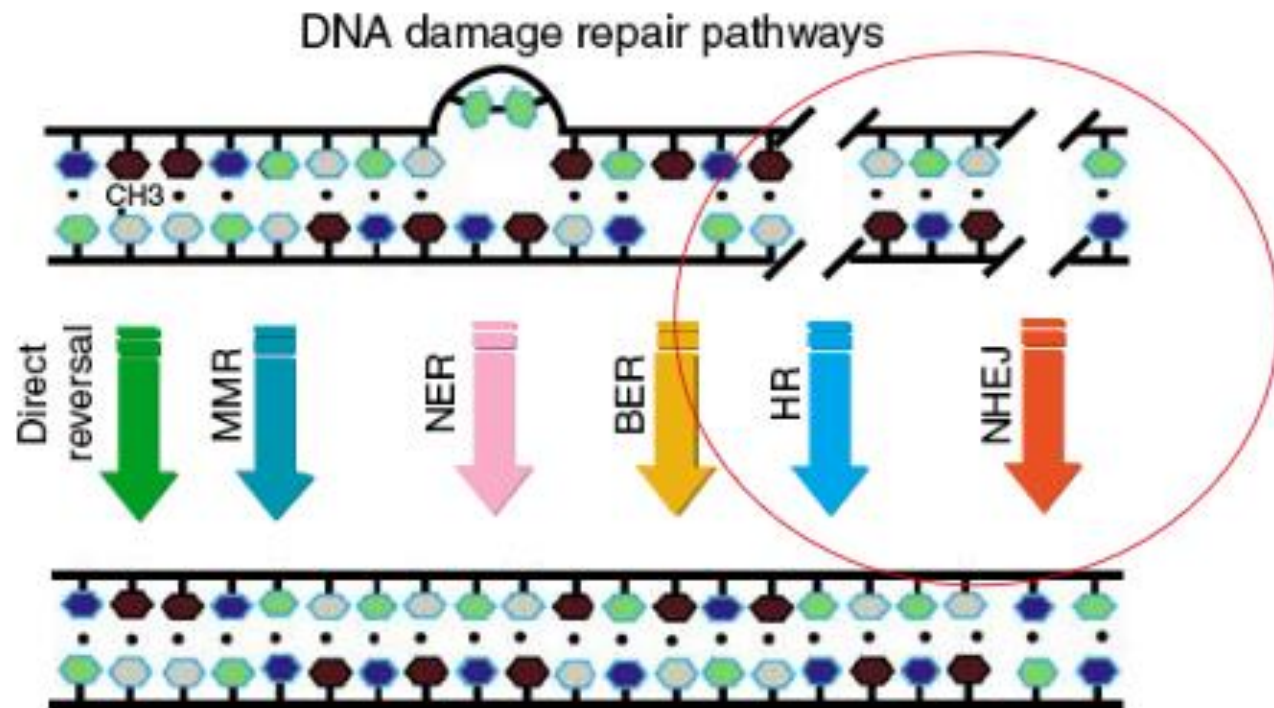


Figure 1 DNA-repair pathways. Several DNA-repair pathways exist and deal with various types of DNA insults. These pathways include (1) the direct reversal pathway, (2) the MMR pathway, (3) the NER pathway, (4) the BER pathway, (5) the HR pathway, and (6) the NHEJ pathway.

From R. Hakem, 2008, EMBO J

Direct reversal: a differenza delle altre risposte non richiede l'attivazione di complessi multiproteici. Un esempio: O⁶-alkylguanina. L'alchilazione impedisce l'appaiamento con la citosina. Viene rimossa grazie all'azione di un singolo enzima, Ada in *E. coli* corrispondente a O⁶-methyltransferase, MGMT in cellule di mammifero.

MMR pathway: Mismatch Repair, presente in eucarioti e procarioti viene utilizzata per il riparo di mismatches, ossia piccole inserzioni o delezioni.

NER pathway: Nucleotide Excision Repair, presente in eucarioti e procarioti viene utilizzata per il riparo di diverse lesioni tra cui lesioni causate da UV, mutageni chimici e chemioterapici che inducano la formazione di dimeri di pirimidina e addotti sproporzionati. 3 proteine (UvrA, UvrB, UvrC) in procarioti, più di 30 in mammifero.

BER pathway: Base Excision Repair, viene utilizzata in procarioti ed eucarioti per rimuovere basi danneggiate.

Danno al DNA su entrambi i filamenti: Double Strand Breaks (DSBs)

HR pathway: Homologous Recombination, viene utilizzata in procarioti ed eucarioti per risolvere rotture a doppio filamento (DSB).

Viene utilizzata in circa il 90% dei casi di DSBs nei batteri ed in lievito, e solo nel 10% dei casi di DSBs in cellule di mammifero, in cui si preferisce l'attivazione della NHEJ. Richiede l'attivazione di una serie di complessi proteici e di una cascata di eventi di trasduzione del segnale. E' molto accurata.

NHEJ: Non Homologous End Joining, viene utilizzata in procarioti ed eucarioti per risolvere rotture a doppio filamento (DSB).

Viene utilizzata solo in circa il 10% dei casi di DSBs nei batteri ed in lievito, e nel 90% dei casi di DSBs in cellule di mammifero.

Richiede l'attivazione di una serie di complessi proteici e di una cascata di eventi di trasduzione del segnale. Non e' molto accurata bensì error prone.