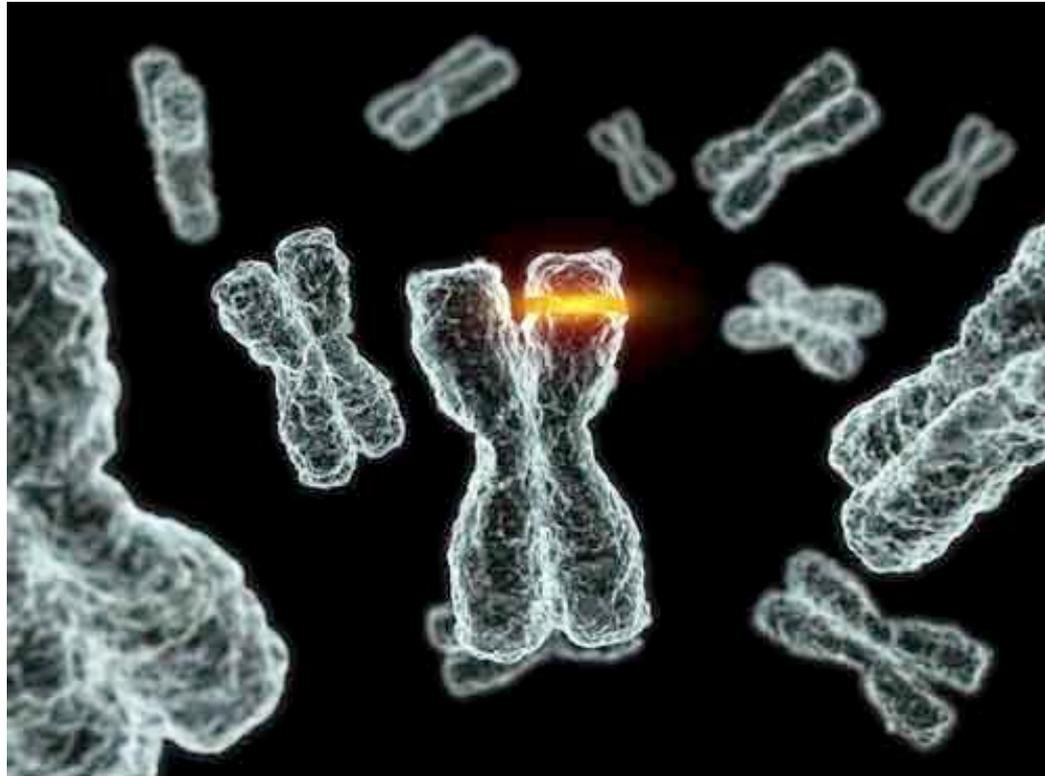


Gli eventi che modificano i genomi



Mutazioni

1) Mutazioni per delezioni estese o per duplicazioni di segmenti

2) Mutazioni puntiformi:

a) Mutazioni di sostituzione: una coppia di basi viene invertita o sostituita dall' altra:

- **Transizioni:** una purina (o una pirimidina) viene sostituita dall' altra

- **Transversioni:** una purina viene sostituita da una pirimidina (e viceversa)

b) Microdelezioni e microinserzioni: una o pochissime coppie di basi vengono perse o acquisite.

Ricombinazioni

1) Ricombinazioni omologhe: avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze altamente omologhe (cioè identiche o quasi), quali che siano.

2) Ricombinazioni sito-specifiche: avvengono per scambio di segmenti genomici a livello di sequenze ben definite.

3) Trasposizioni:

a. Trasposizioni semplici: un segmento genomico viene spostato da un sito ad un altro nel genoma

b. Trasposizioni replicative: un segmento genomico viene copiato e la copia trasposta in un nuovo sito del genoma

c. Retrotrasposizioni: un segmento di RNA viene retrotrascritto, cioè copiato in DNA a doppio filamento e questo viene inserito in un sito del genoma.

Le **mutazioni** sono in natura eventi di per sé **puramente casuali**, cioè non sono condizionate dall'effetto che eventualmente produrranno.

Le **ricombinazioni** sono in genere eventi complessi **biologicamente programmati**, cioè destinate a succedere 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 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

A. Sugli organismi **unicellulari** e sulla linea **germinale** degli organismi **pluricellulari**:

- i. Conseguenze funzionali incompatibili con la vita
(morte cellulare o mancato sviluppo dell' organismo pluricellulare)
- ii. Conseguenze funzionali peggiorative dell' **adattamento** all' ambiente
(minor successo riproduttivo di conspecifici nell' ambiente)
- iii. Assenza di conseguenze funzionalmente rilevanti (**mutazioni neutre**)
- iv. Conseguenze funzionali migliorative dell' **adattamento** all' ambiente
(maggior successo riproduttivo di conspecifici nell' ambiente)

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

B. Sulle linee cellulari **somatiche** degli organismi pluricellulari:

- i. Morte cellulare (per **apoptosi**)
- ii. Accumulo di mutazioni in geni rilevanti per il controllo del ciclo cellulare
(sviluppo di **tumori**)
- iii. **Invecchiamento** dell' organismo.

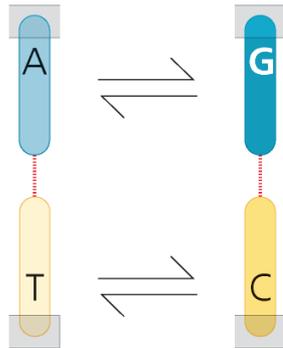
Gli errori di replicazione e la loro riparazione

Diversi tipi di mutazione (cambiamento della sequenza di DNA)

1) Mutazioni puntiformi

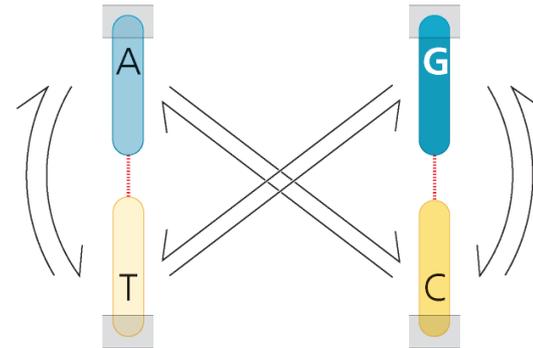
Transizioni: purina con purina e pirimidina con pirimidina

a



Transversioni: purina con pirimidina e pirimidina con purina

b



Inserimento o delezione di uno o qualche nucleotide

2) Altre **mutazioni:** (lunghe **inserzioni** o **delezioni**) riarrangiamenti della struttura cromosomica causano cambiamenti più drastici nel DNA (ad es. inserzione di un trasposone).

Gli errori di replicazione e la loro riparazione

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.

Siti “caldi” e siti sotto la media.

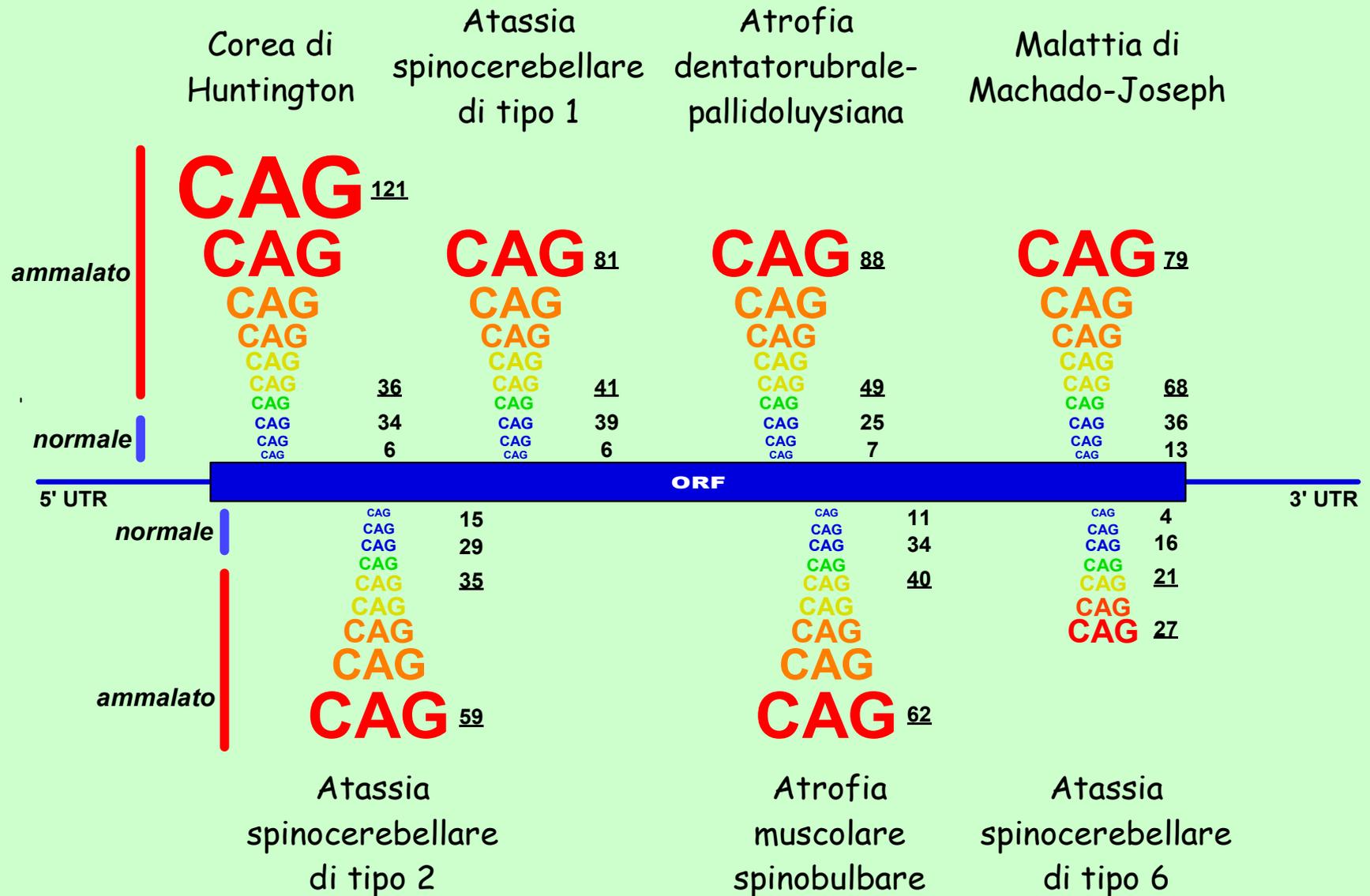
DNA microsatellite: classe di sequenze incline a mutazione, costituite da ripetizioni di brevi sequenze di 2,3 o 4 nucleotidi. Ad es. ripetizione CA. Il sistema di replicazione ha difficoltà nel copiare in maniera accurata -> scivolamento -> allungamento o riduzione della ripetizione -> polimorfismo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

Questa espansione può essere causa di malattia.

Distrofia miotonica tipo 1 (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 huntingtina -> aggiunta di Q nella seq. della proteina -> alterazione della funzione.

Malattie da triplette ripetute di poliglutammina



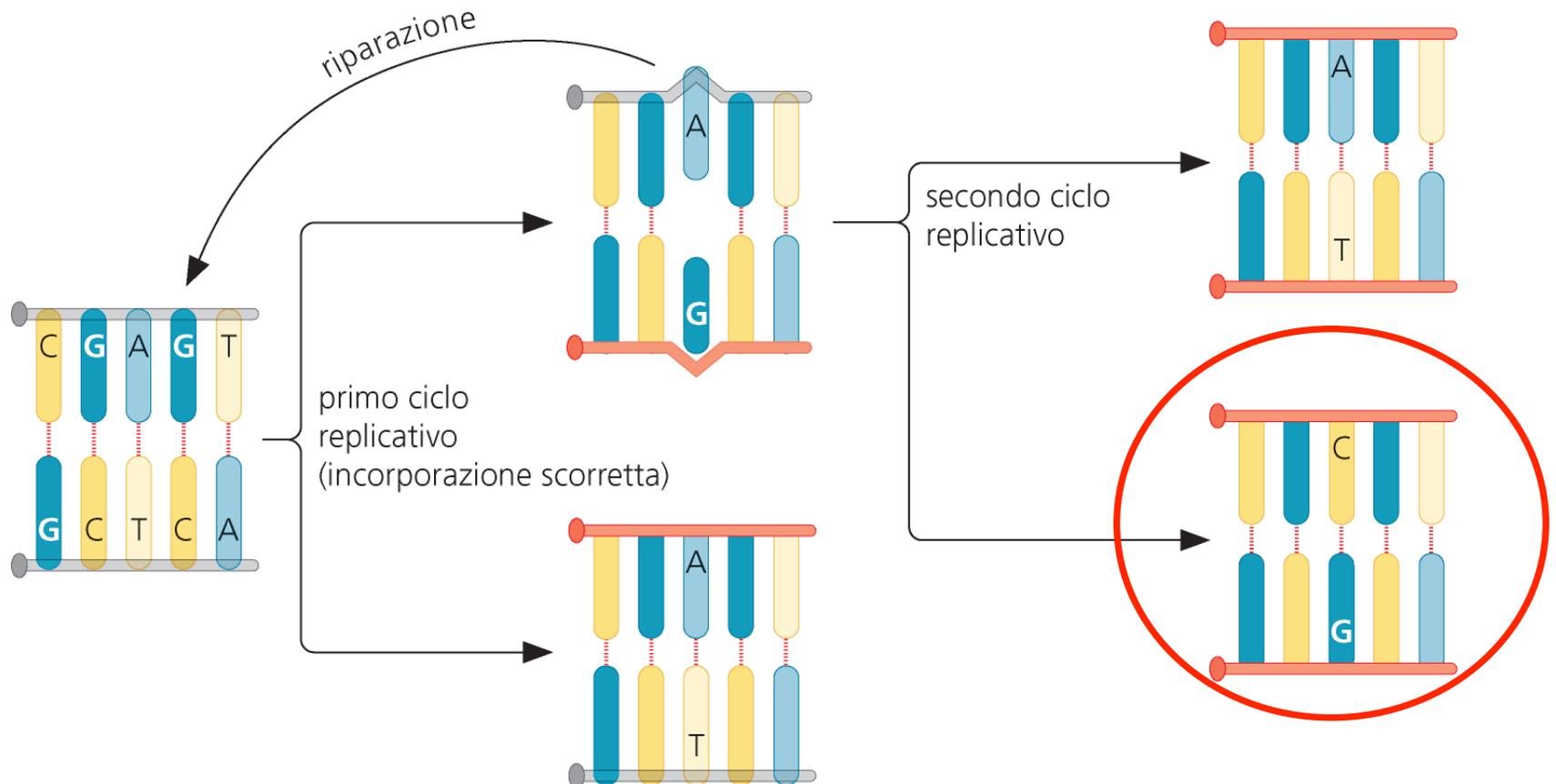
Cause più significative degli eventi mutazionali

1. Intrinseci alla **natura delle basi** e della **replicazione**:
 - Eventi di **tautomerizzazione** delle basi
 - Eventi di **slittamento** durante la replicazione
 - Incorporazione **errata** di una base
2. 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**
3. Dovuti ad **agenti chimici**:
 - Da agenti **alchilanti**
 - Da agenti **idrolizzanti**
 - Da agenti **intercalanti**
 - Da agenti **ossidanti** (anche intrinseci al metabolismo)
 - Da agenti **mimetici delle basi**

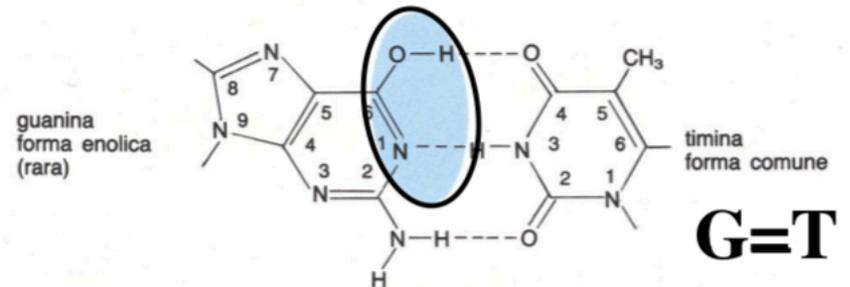
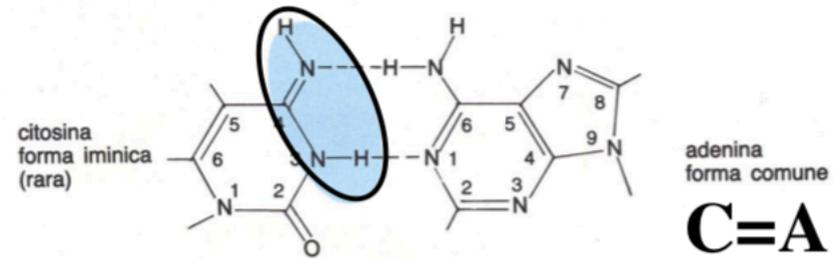
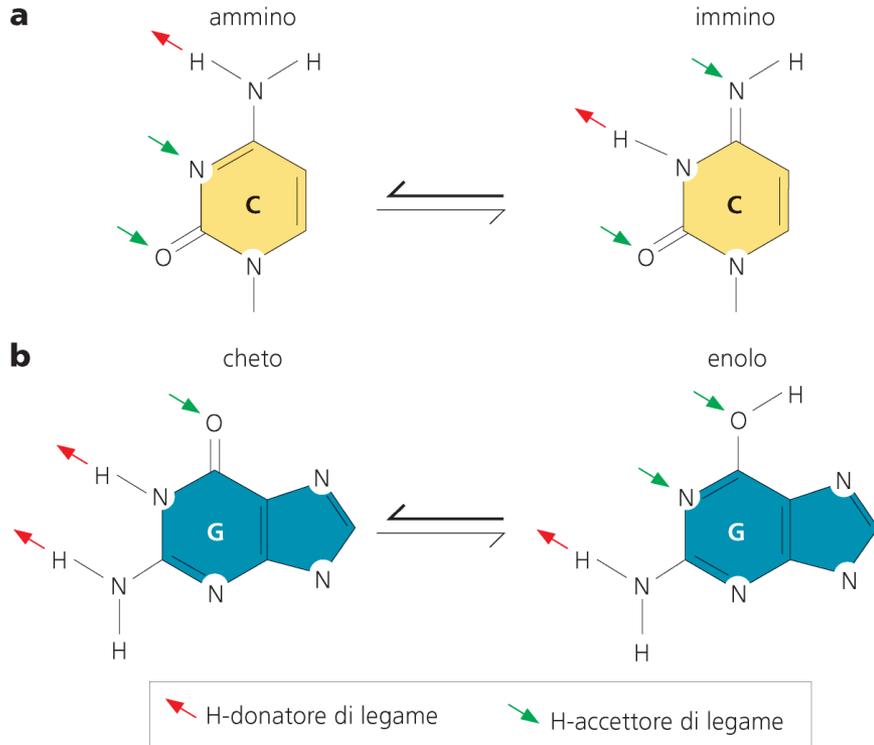
1. Natura delle basi e replicazione

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.

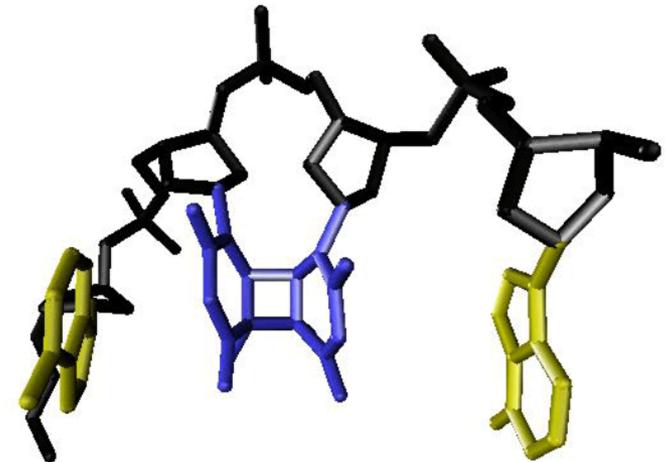
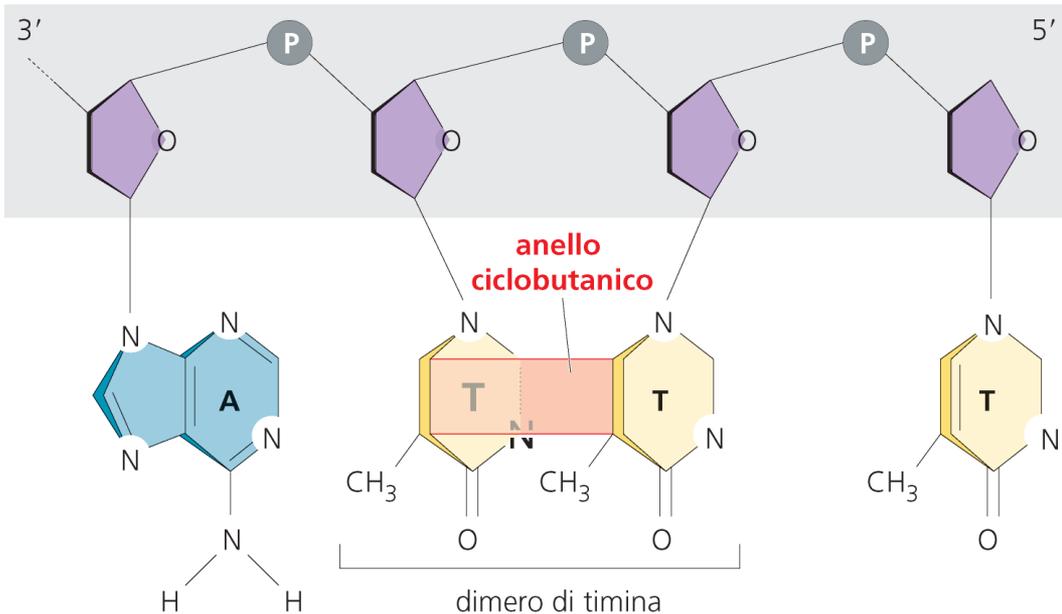


Appaiamenti errati dovuti alla tautomeria delle basi



2. Agenti fisici: danno da luce UV

Fusione fotochimiche di due pirimidine tipicamente dimeri di T ma anche T:C.
Non possono formare appaiamento con le basi complementari -> arresto DNAPol



Danni da radiazioni ionizzanti (raggi γ e raggi X)

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

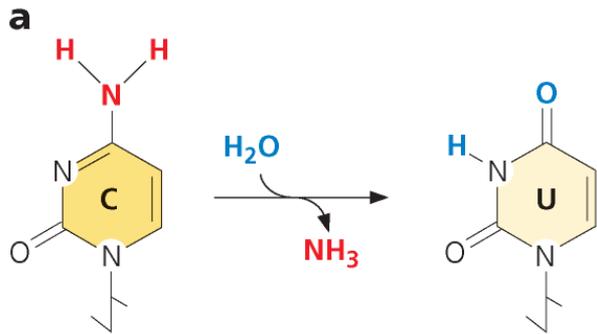
Possono agire:

- **direttamente** attaccando (ionizzando) il desossiribosio del DNA,
- **indirettamente** (specie reattive dell'ossigeno).

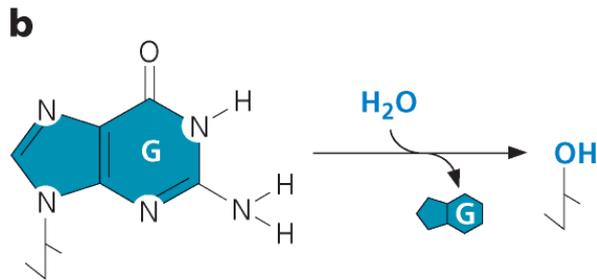
Radiazioni ionizzanti nella terapia antitumorale
Farmaco bleomicina induce rotture simili



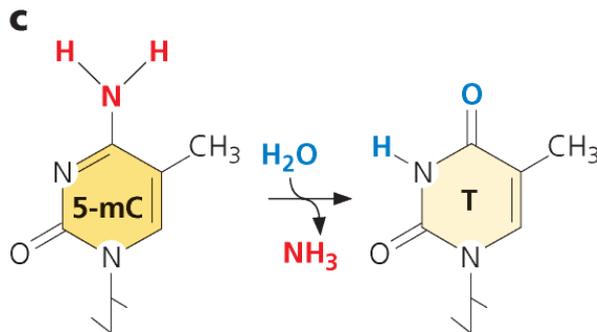
3. Agenti chimici: idrolisi

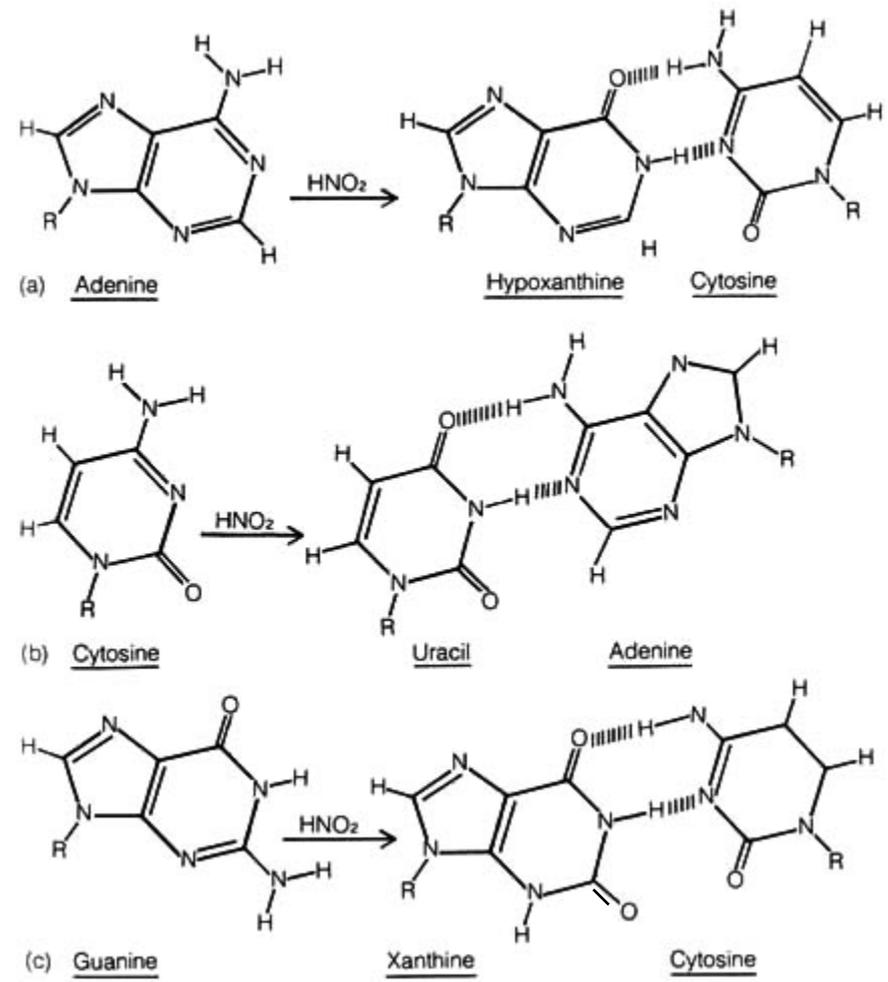
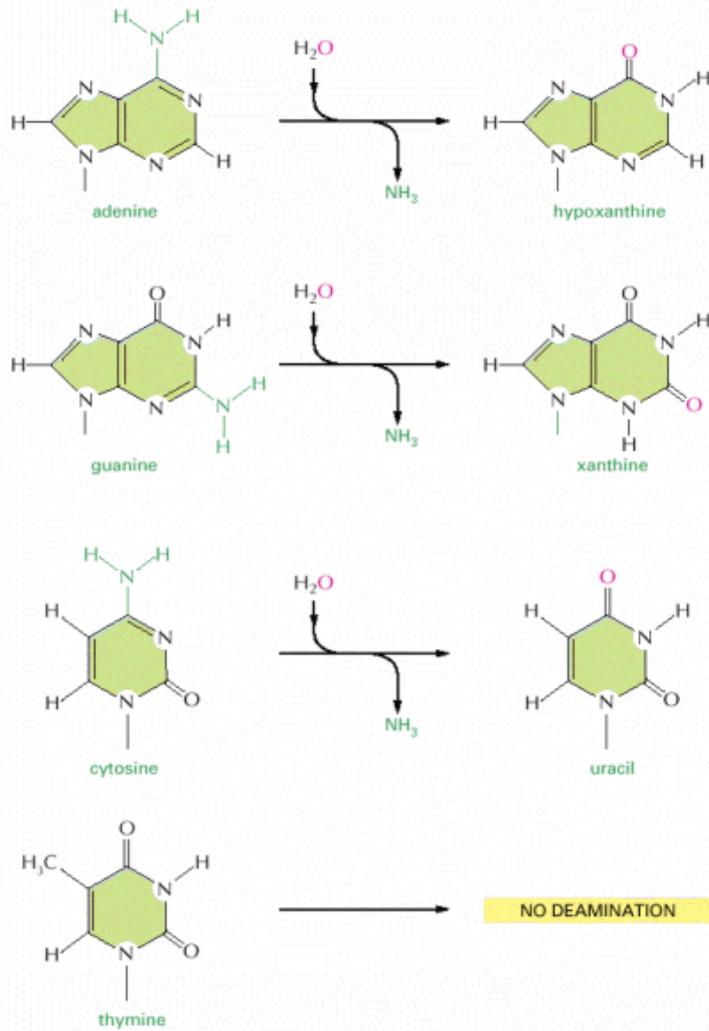


Danno da **idrolisi** del DNA:
a) **Deamminazione** della C, ma anche di altre basi
b) **Depurinazione** della G

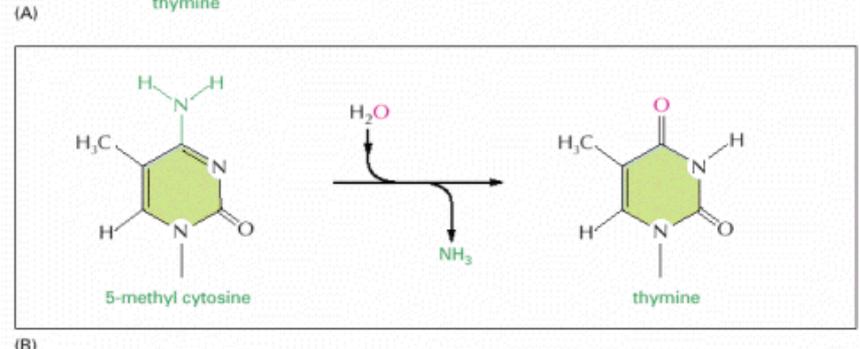


Portano tutte (quasi) alla formazione di basi non naturali per il DNA.





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



Alkylation-induced mispairing



The alkylation (in this case, EMS-generated ethylation) of the **O-6** position of **guanine**, as well as the **O-4** position of **thymine**, can lead to direct mispairing with **thymine** and **guanine**, respectively, as shown here.

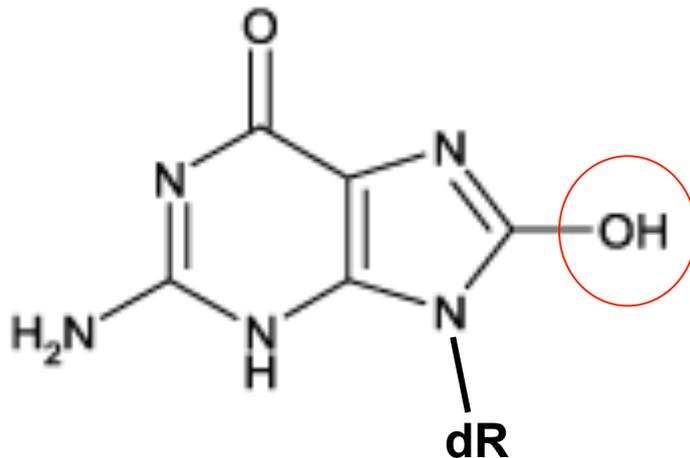


In bacteria, where mutations have been analyzed in great detail, the principal mutations detected are G·C to A·T transitions, indicating that the **O-6 alkylation** of guanine is **most relevant to mutagenesis**.

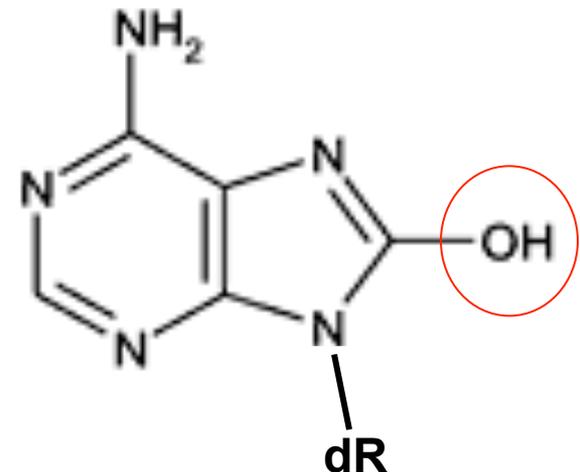
Il DNA viene anche attaccato da forme di ossigeno reattive

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.

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[•]**. Un esempio dei tanti eventi ossidativi è dato dalla **ossidazione in posizione 8 delle purine**.



8-idrossiguanina

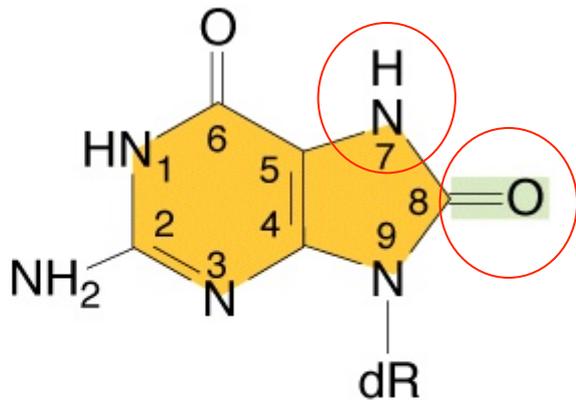
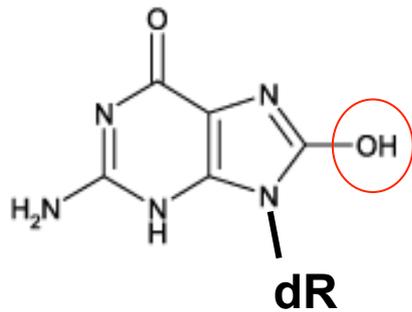


8-idrossiadenina

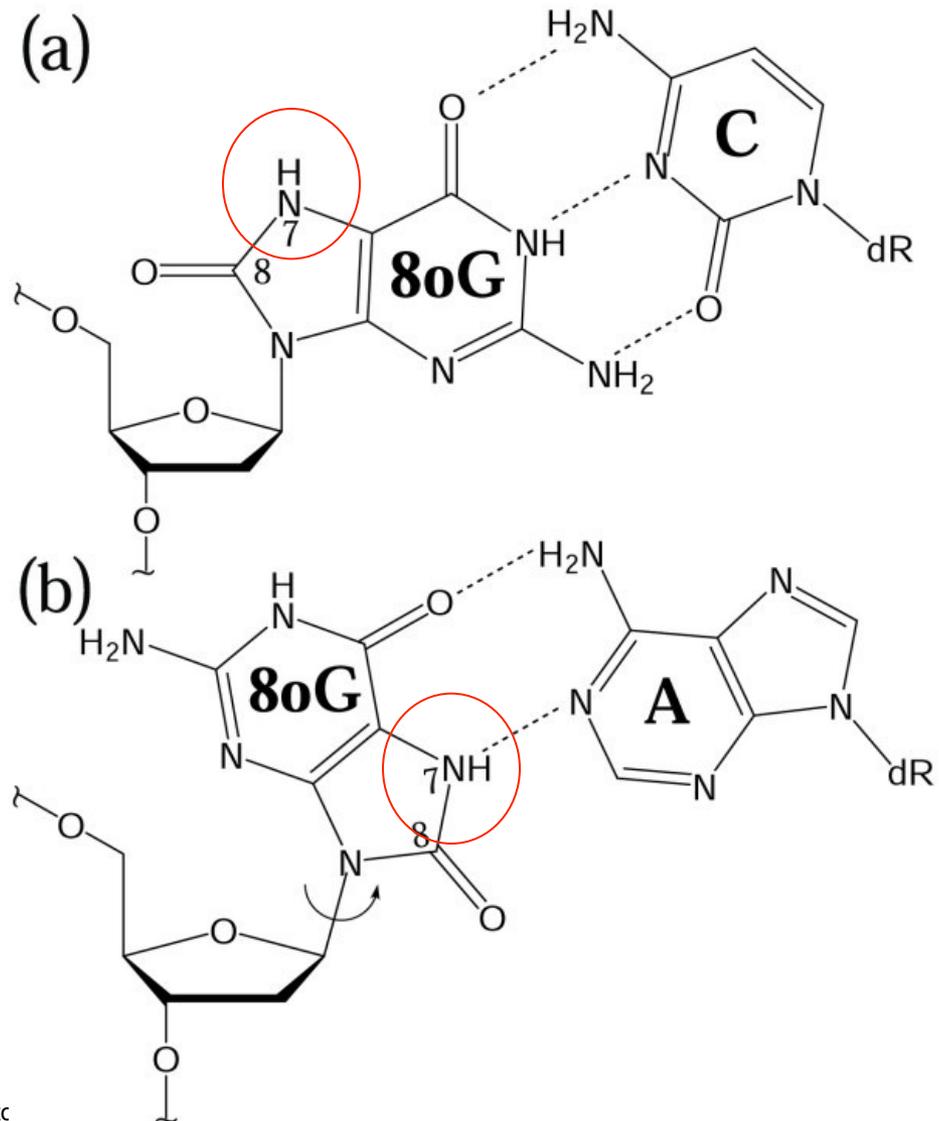
Le formule mostrano uno dei possibili tautomeri

La 8-oxoguanina può indurre una transversion appaiandosi con un'adenina

La forma idrossi può tautomerizzare alla forma oxo.

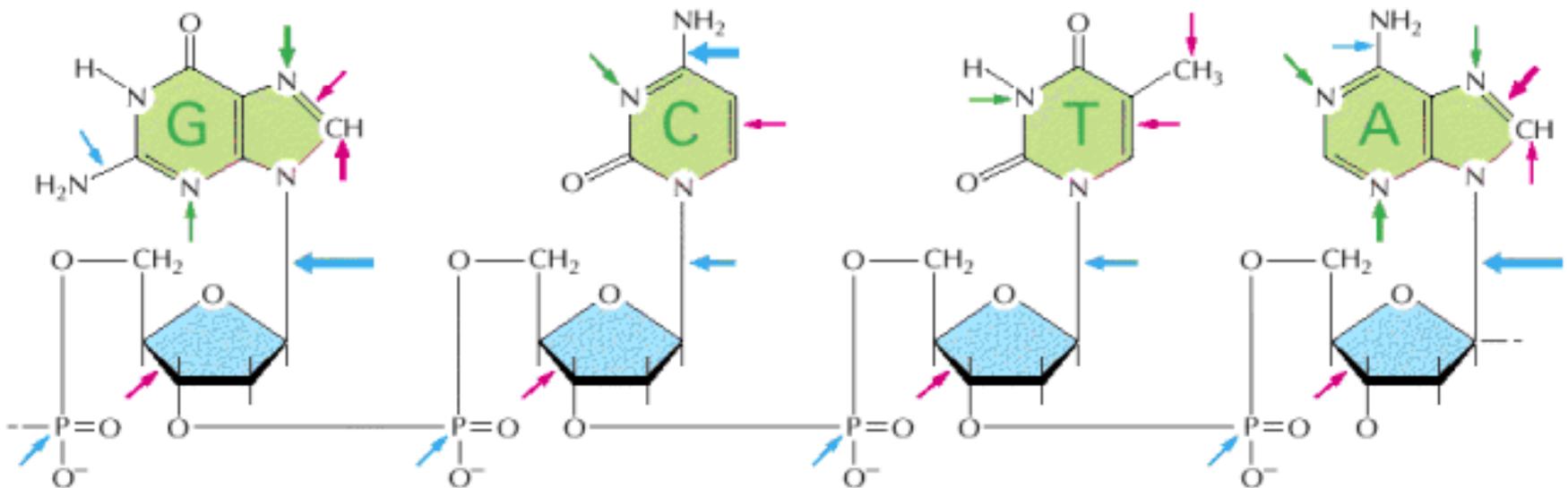


8-Oxo-7-hydrodeoxyguanosine (8-oxodG)

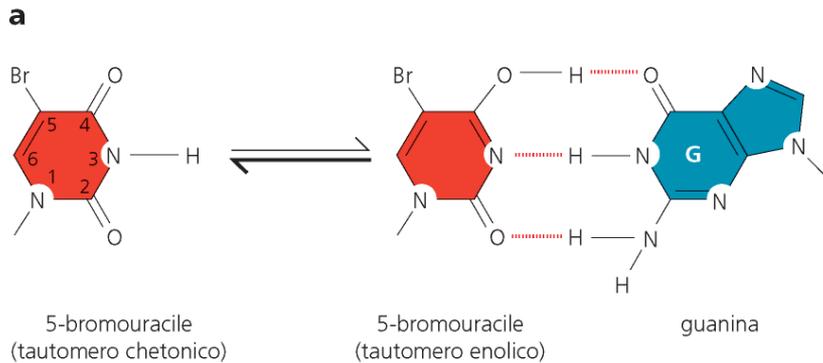


A summary of spontaneous alterations likely to require DNA repair

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

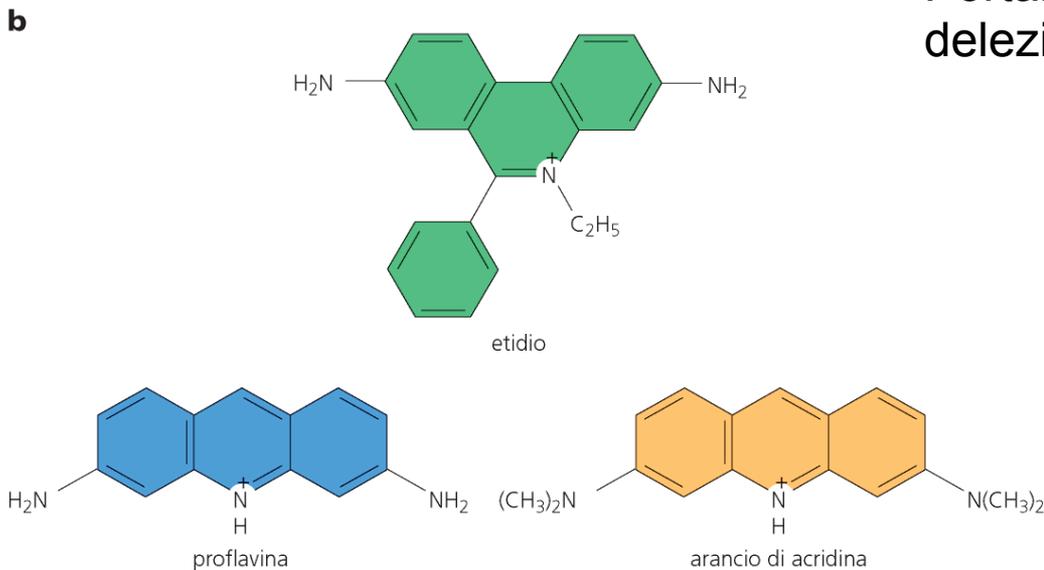


Analoghi delle basi e agenti intercalanti

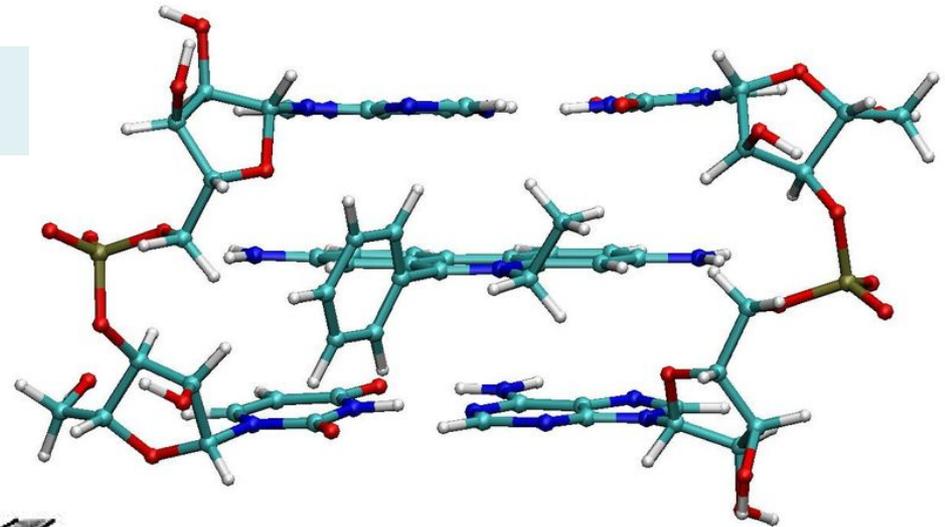


5-bromouracile: analogo della **timina** può appaiarsi alla **guanina**.

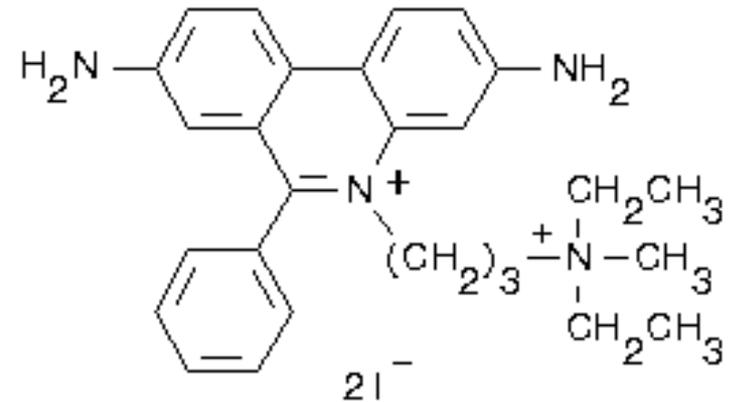
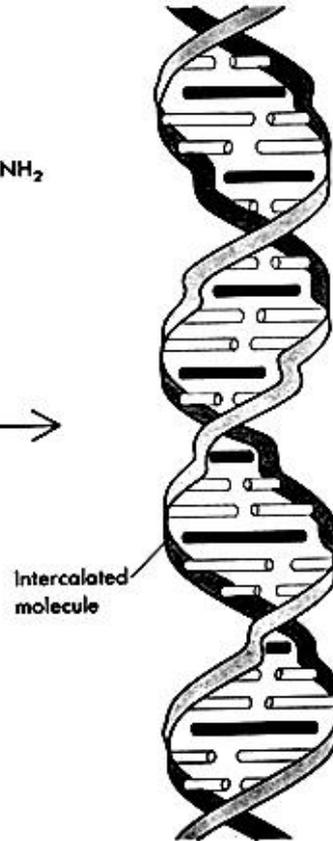
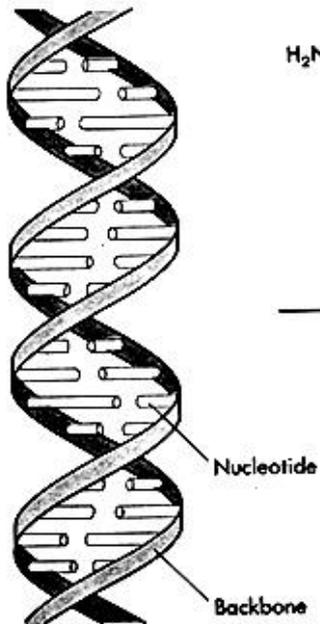
Agenti intercalanti: molecole piatte con anelli policiclici che possono legarsi alla struttura ugualmente piatta delle basi puriniche o pirimidiniche. Portano a mutazioni per inserzione o delezione.



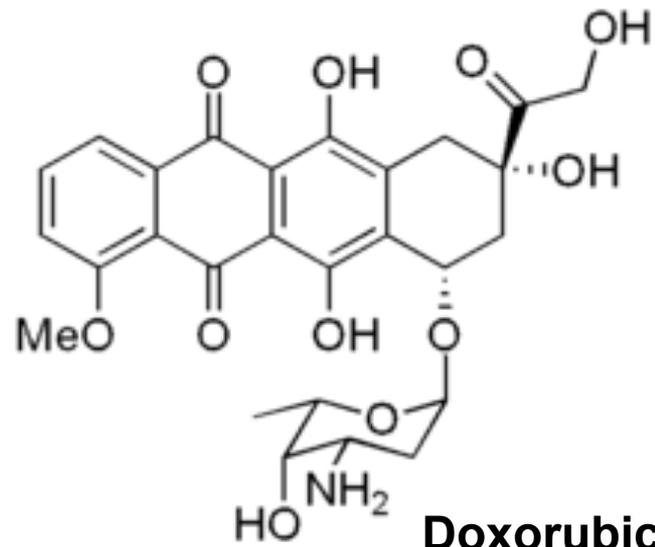
DNA intercalating agents



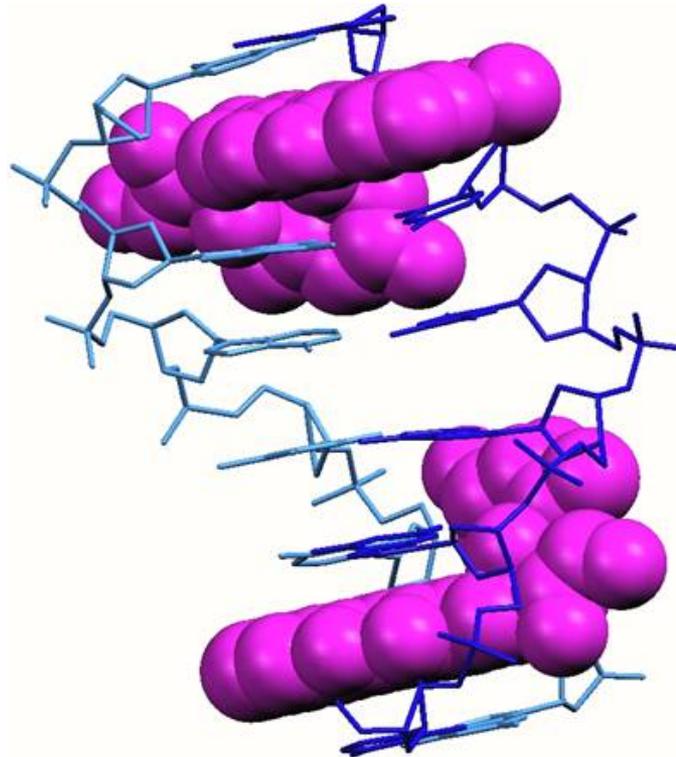
Intercalated ethidium



Propidium

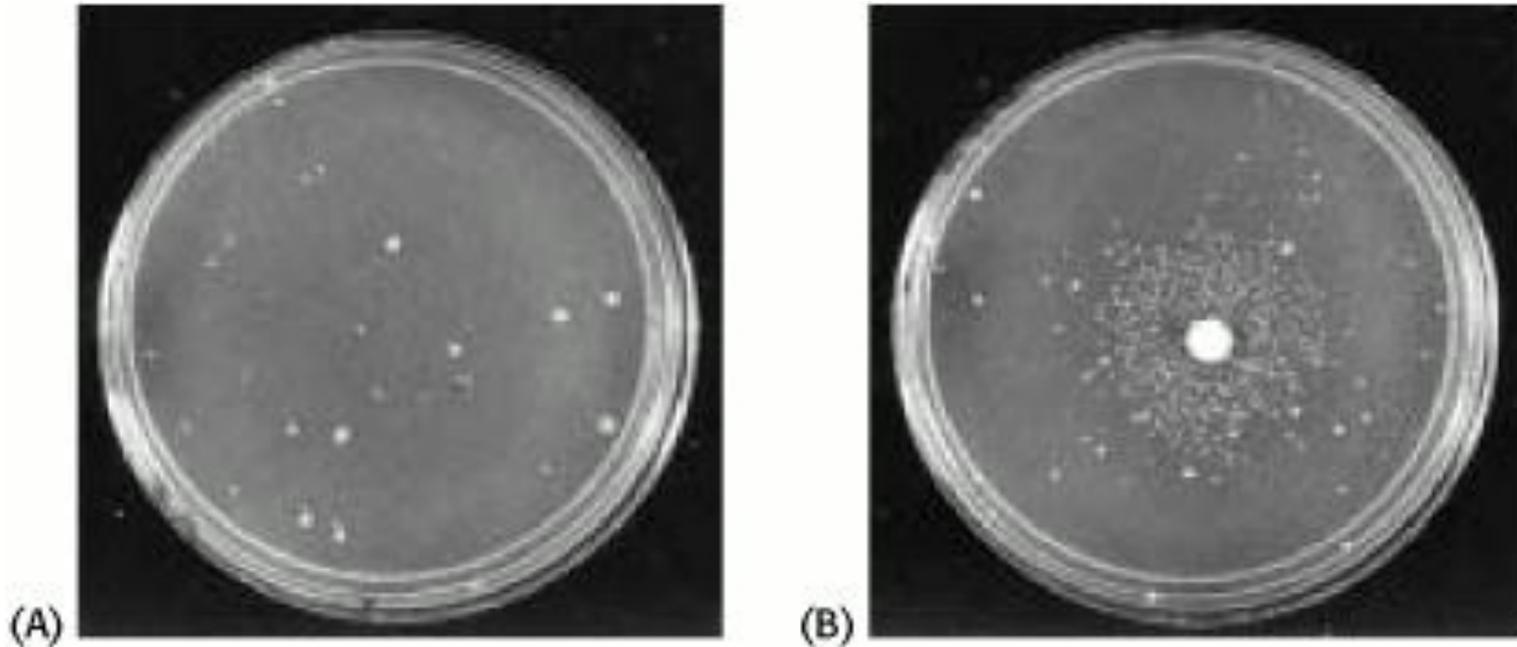


Doxorubicin



Doxorubicin: chemioterapico utilizzato per il trattamento di diversi tipi di cancro.

Test di Ames



Test di mutagenicità:

A) **controllo**: sporadici cloni retromutanti “spontanei” di un ceppo di *Salmonella* che richiede istidina per crescere.

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

Risposta cellulare al danno al DNA

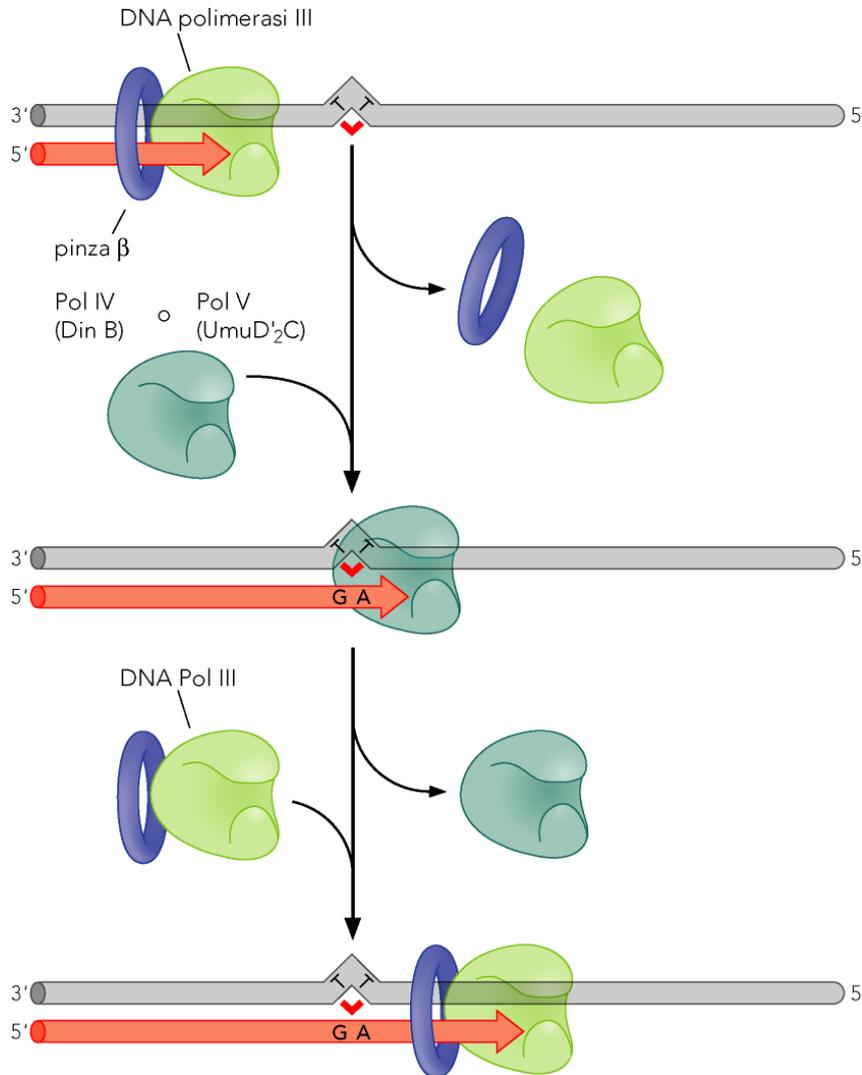
- 1 Aggiramento del danno
- 2 Inversione del danno
- 3 Rimozione del danno

Numerosi sistemi riparano il DNA

- 1) Ci sono meccanismi che bypassano il danno (**aggiramento del danno**);
- 2) altri possono essere definiti di riparazione diretta (**inversione del danno**): un enzima ripristina la forma normale della base o delle basi chimicamente alterate dall' evento anomalo.
- 3) Altri ancora (**rimozione del danno**) richiedono l' azione coordinata di più enzimi:
 - **Riparazione del mismatch**;
 - **Riparazione per escissione della base (BER)**, 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.
 - **Riparazione per escissione di nucleotidi (NER)**, 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.
 - La **riparazione** di una rottura al doppio filamento del DNA (**DSB**).

1. Aggiramento del danno

Sintesi del DNA translesione



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.

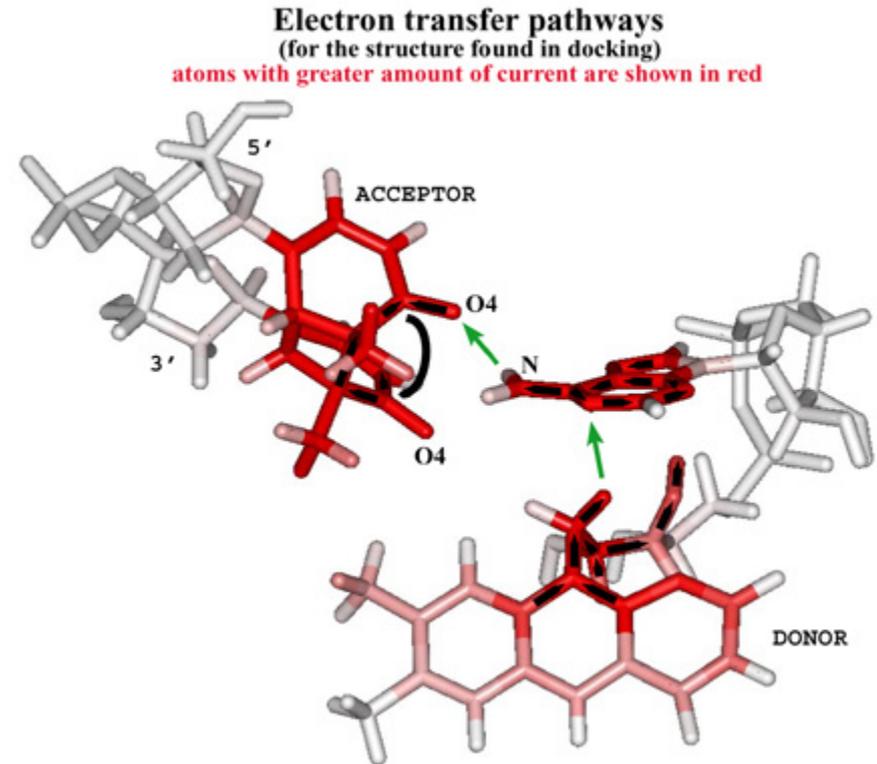
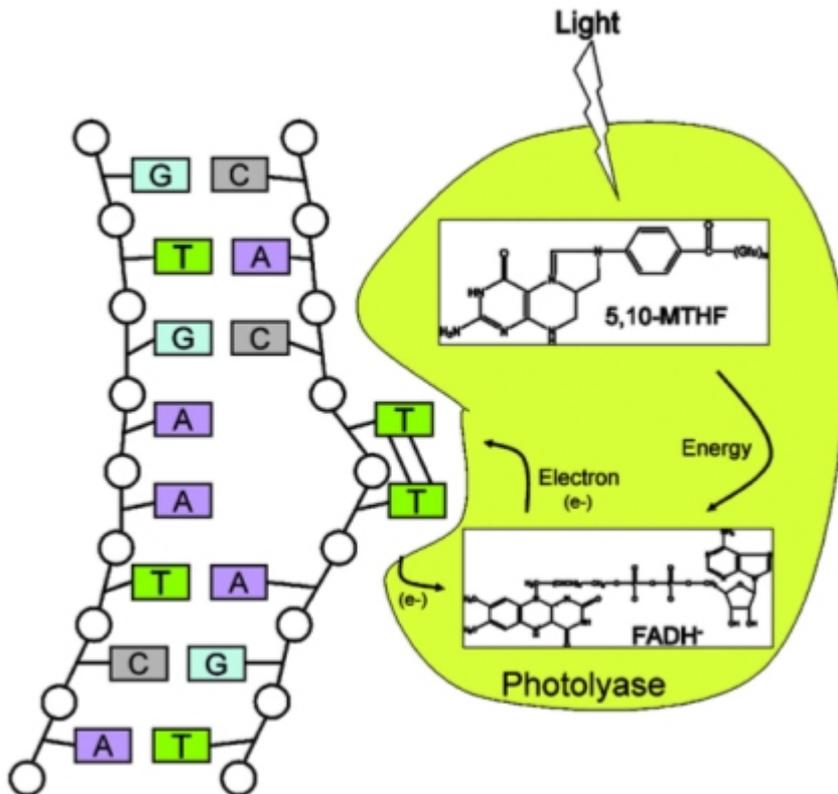
Sintesi translesione: è poco fedele e può causare mutazioni (ma è sempre meglio che avere un cromosoma incompleto).

Viene svolta da una DNA pol che può incorporare nucleotidi anche senza appaiamento.

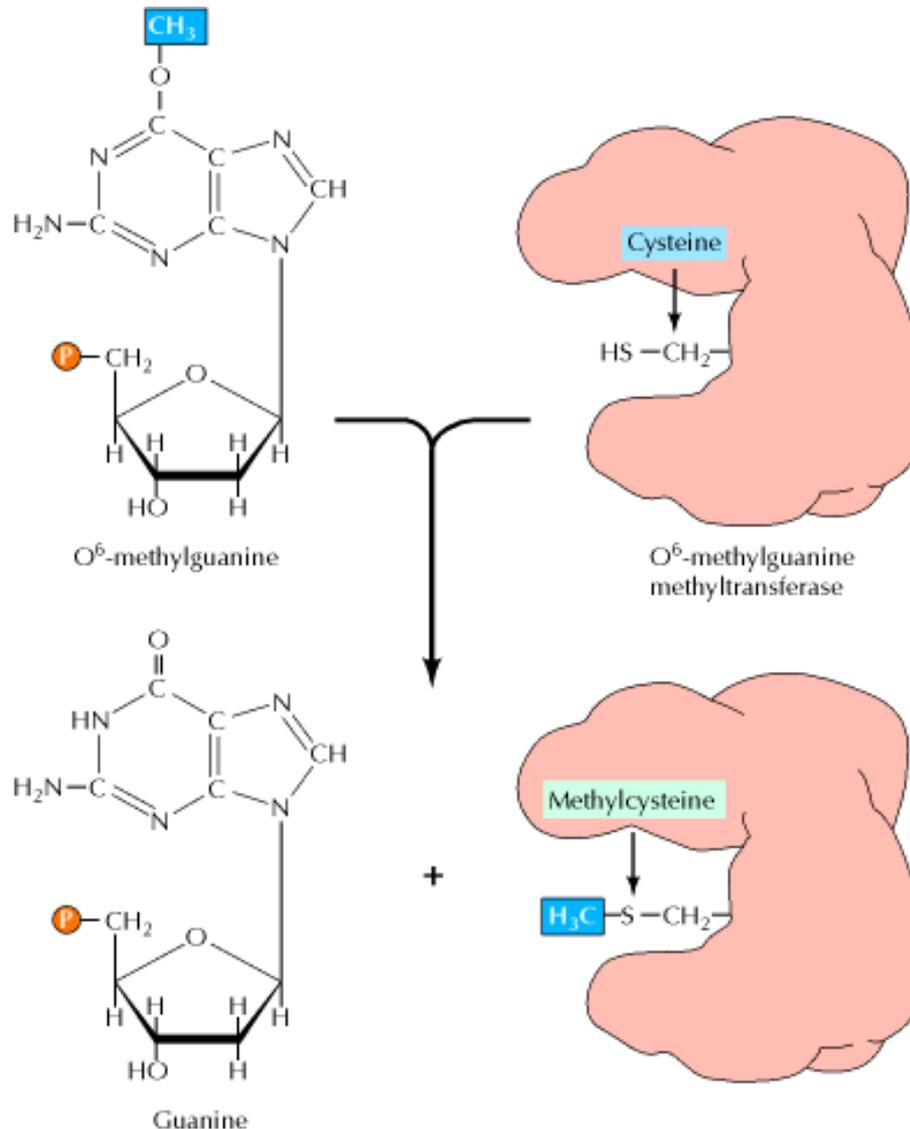
2. Riparazione diretta

La fotoriattivazione

Un esempio di **riparazione diretta**: 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**. Questo sistema è presente nei procarioti ed in alcuni eucarioti inferiori.



Rimozione di un gruppo metilico



Un altro esempio di **riparazione diretta** è la riparazione della **O⁶-metilguanina** da parte della **O⁶-metilguanina metiltransferasi** presente sia in cellule procariotiche che eucariotiche.

It transfers the methyl group from O⁶-methylguanine to a cysteine residue in the enzyme's active site.

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

3. Rimozione del danno

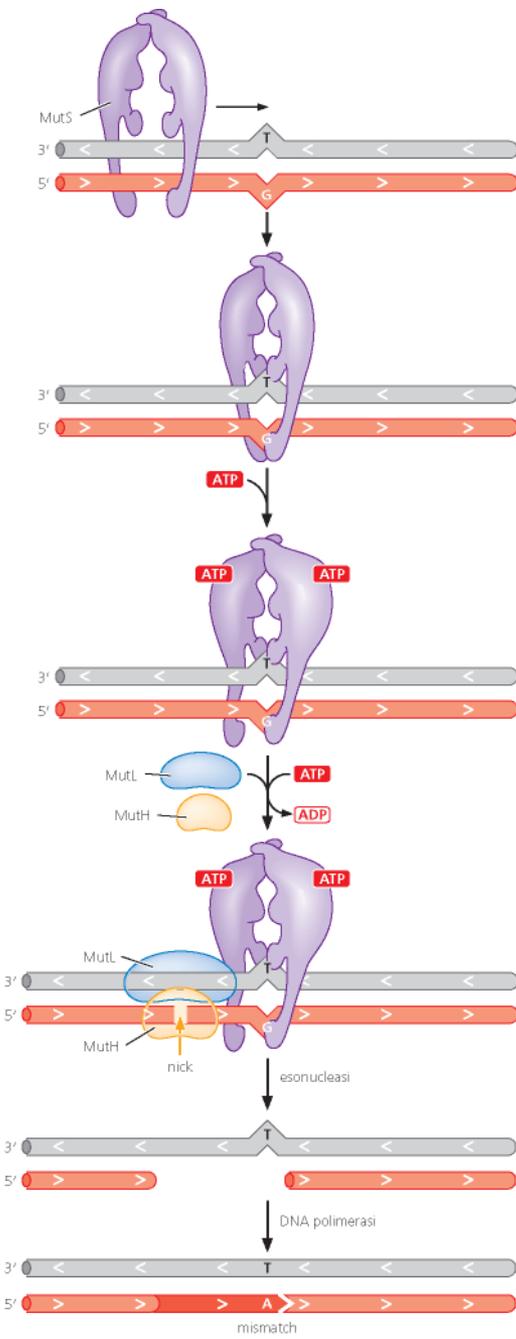
La riparazione del mismatch rimuove gli errori che sfuggono al sistema di correzione di bozze

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.



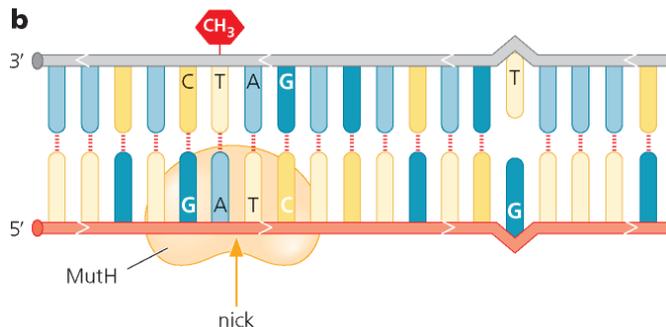
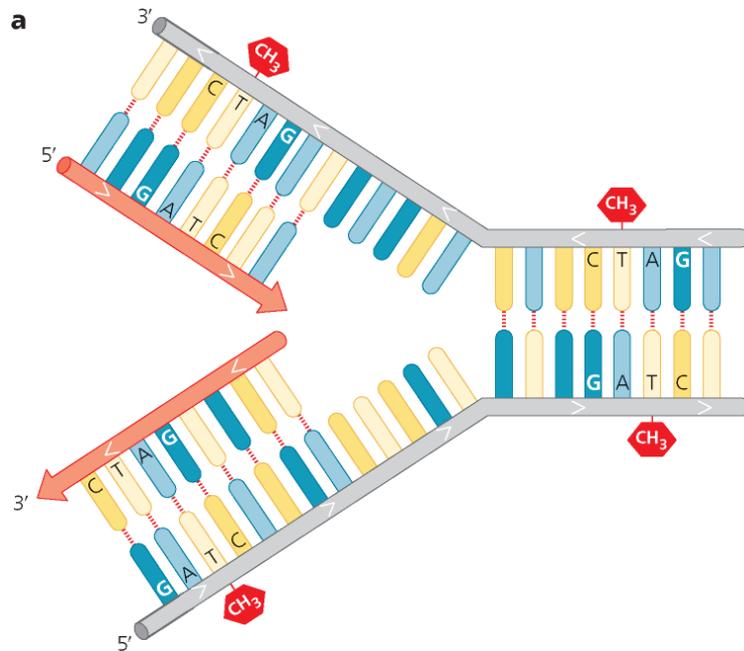
Come viene riconosciuto il filamento parentale?

Dam metilasi metila la A in seq. 5' -GATC-3' GATC presente 1 x ogni 256 pb (4^4).

Quando passa la forza replicativa i due filamenti risultano emimetilati per qualche minuto fintantochè non vengono metilati nuovamente.

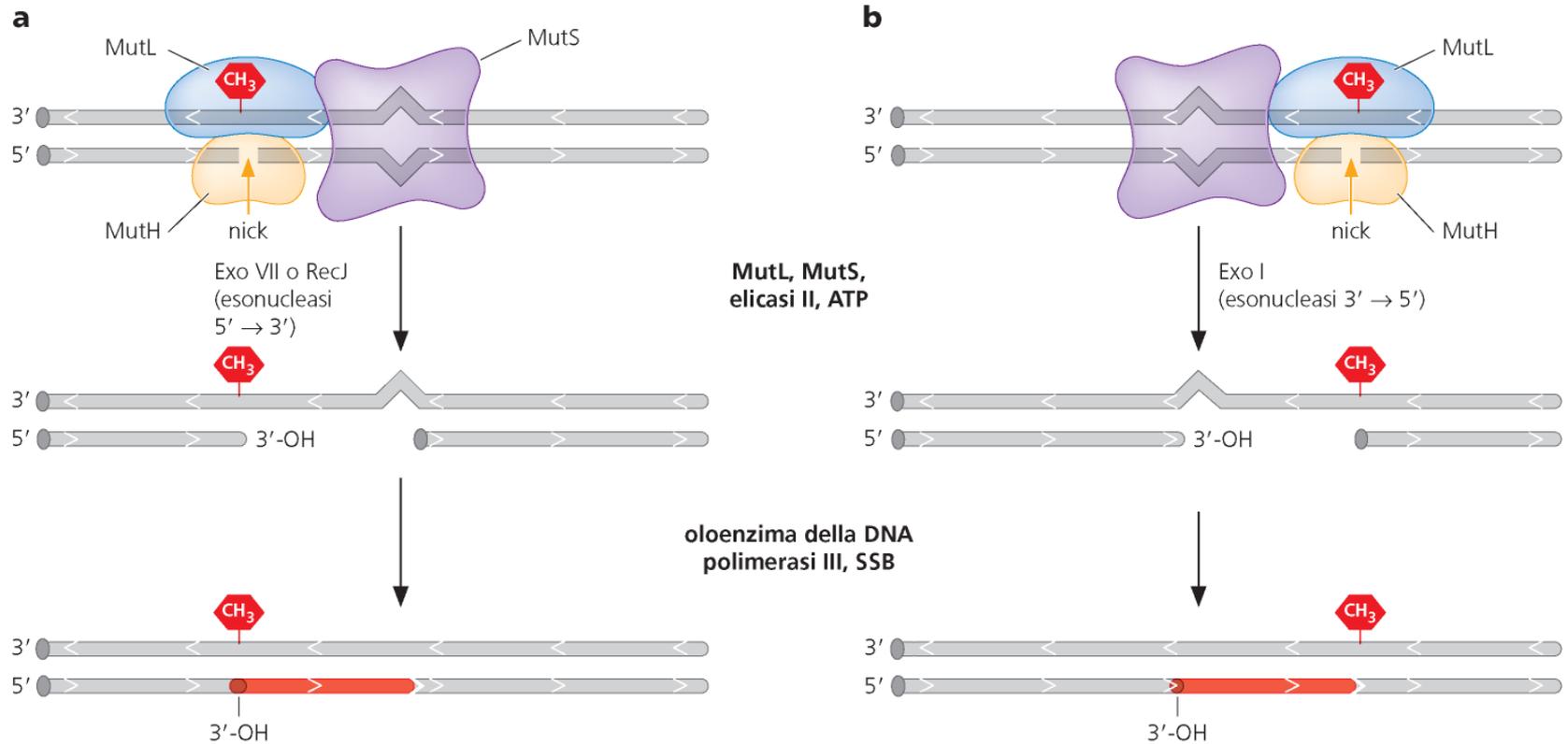
MutH si lega a siti emimetilati ma diventa attiva solo se interagisce con **MutL** e **MutS**. Una volta attivata MutH introduce nick.

Metilazione come strumento di “memoria”.



Direzionalità del sistema di riparazione

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



Riparazione del mismatch

Anche le cellule eucariotiche riparano il mismatch con proteine omologhe a **MutS** (**MSH** MutS homologs) e a **MutL** (**MLH** e **PMS**).

La predisposizione genetica al **tumore del colon** è dovuta a mutazioni dei geni umani omologhi di MutS e MutL.

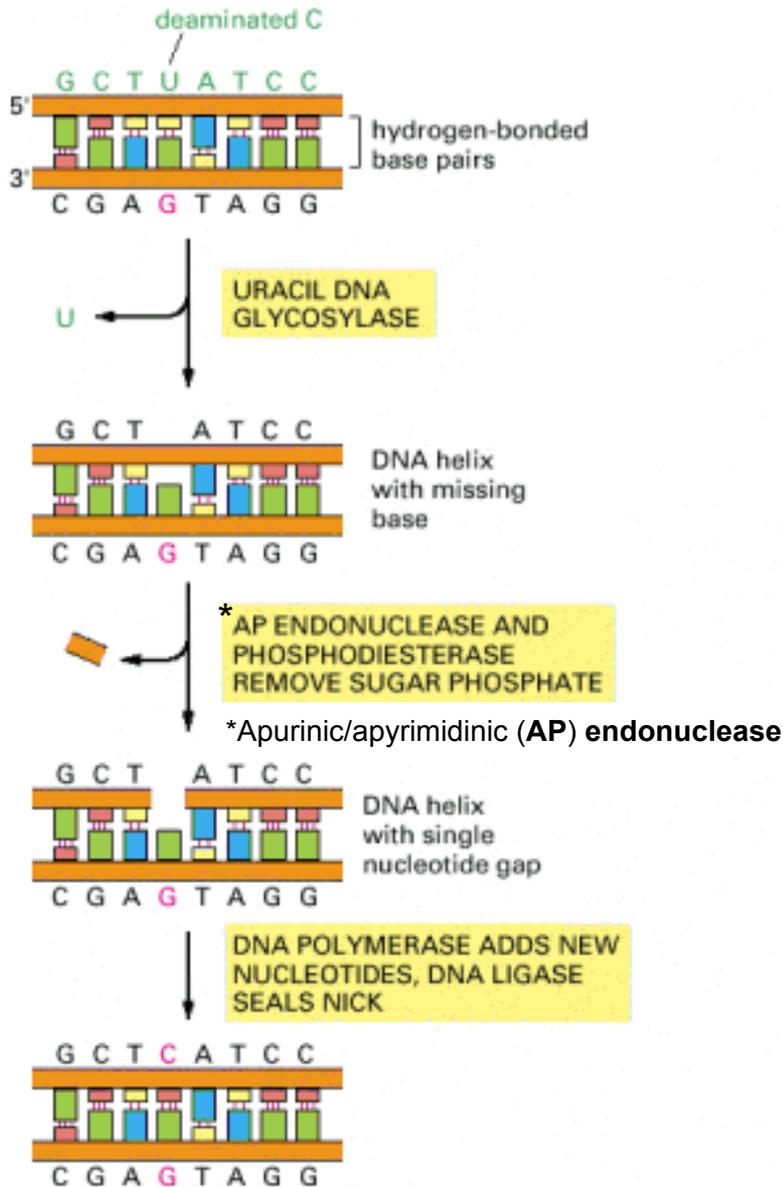
Gli eucarioti (e anche molti altri procarioti) sono privi della dam metilasi.

Come fanno a distinguere i filamenti???

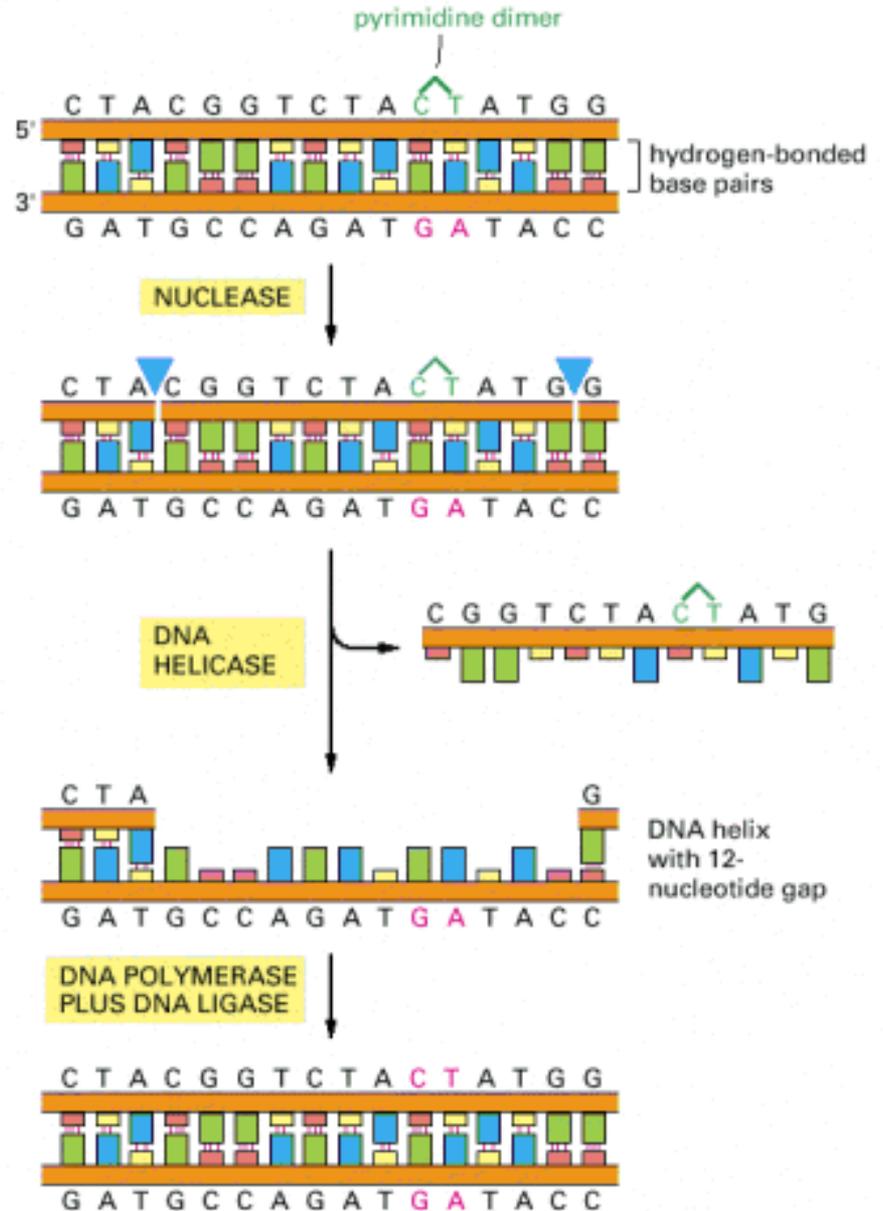
-> frammenti di Okazaki, vengono riconosciuti i nick sul DNA

Meccanismi di rimozione del danno

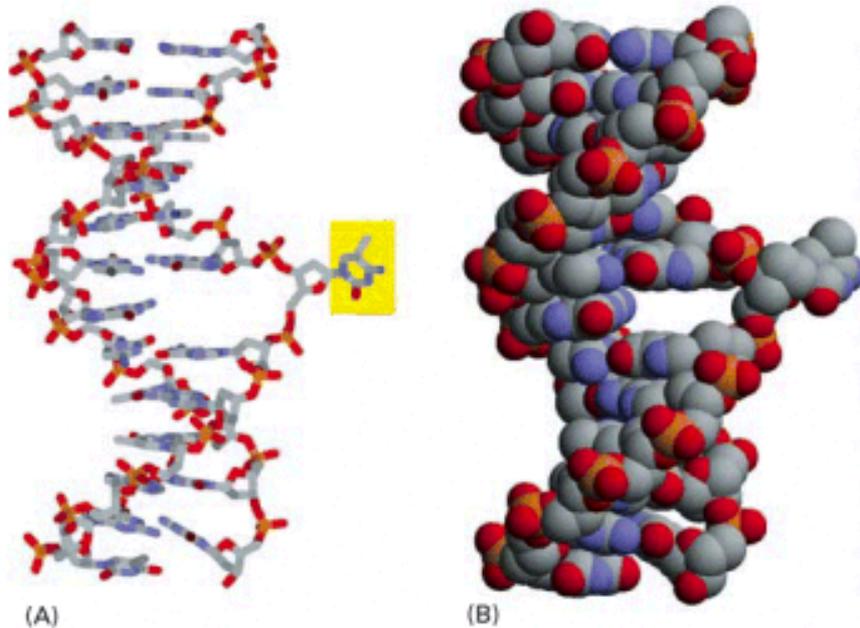
(A) BASE EXCISION REPAIR (BER)



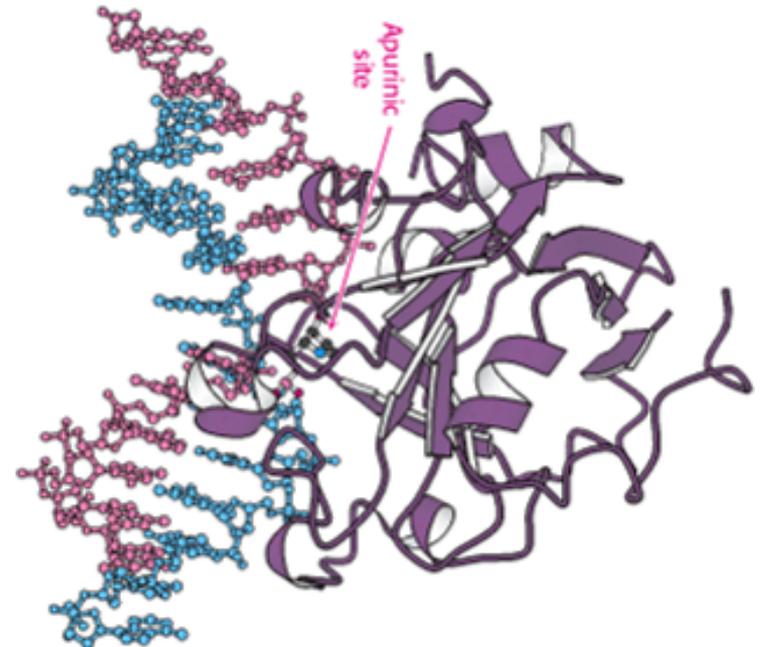
(B) NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR (NER)



Meccanismo della glicosilasi (BER)

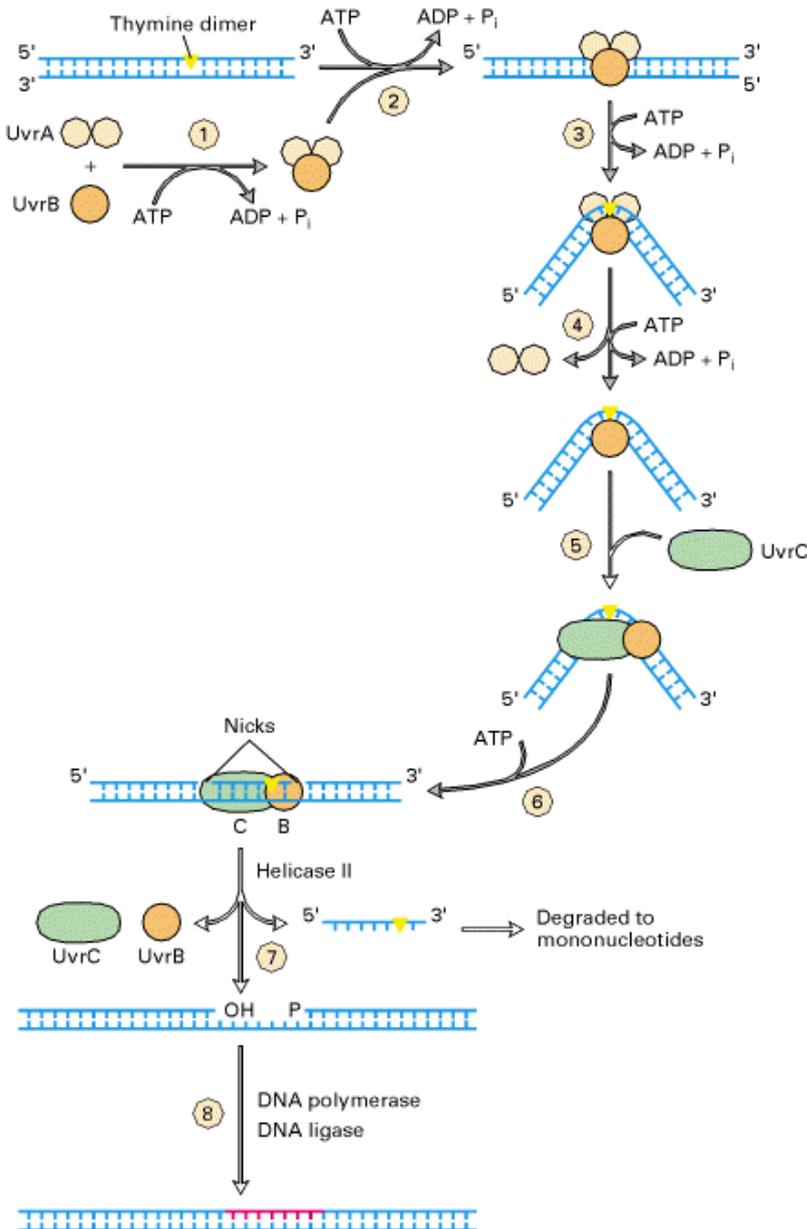


The recognition of an unusual nucleotide in DNA by base-flipping. The DNA glycosylase family of enzymes recognizes specific bases in the conformation shown. Each of these enzymes cleaves the glycosyl bond that connects a particular recognized base (*yellow*) to the backbone sugar, removing it from the DNA. (A) Stick model; (B) space-filling model.



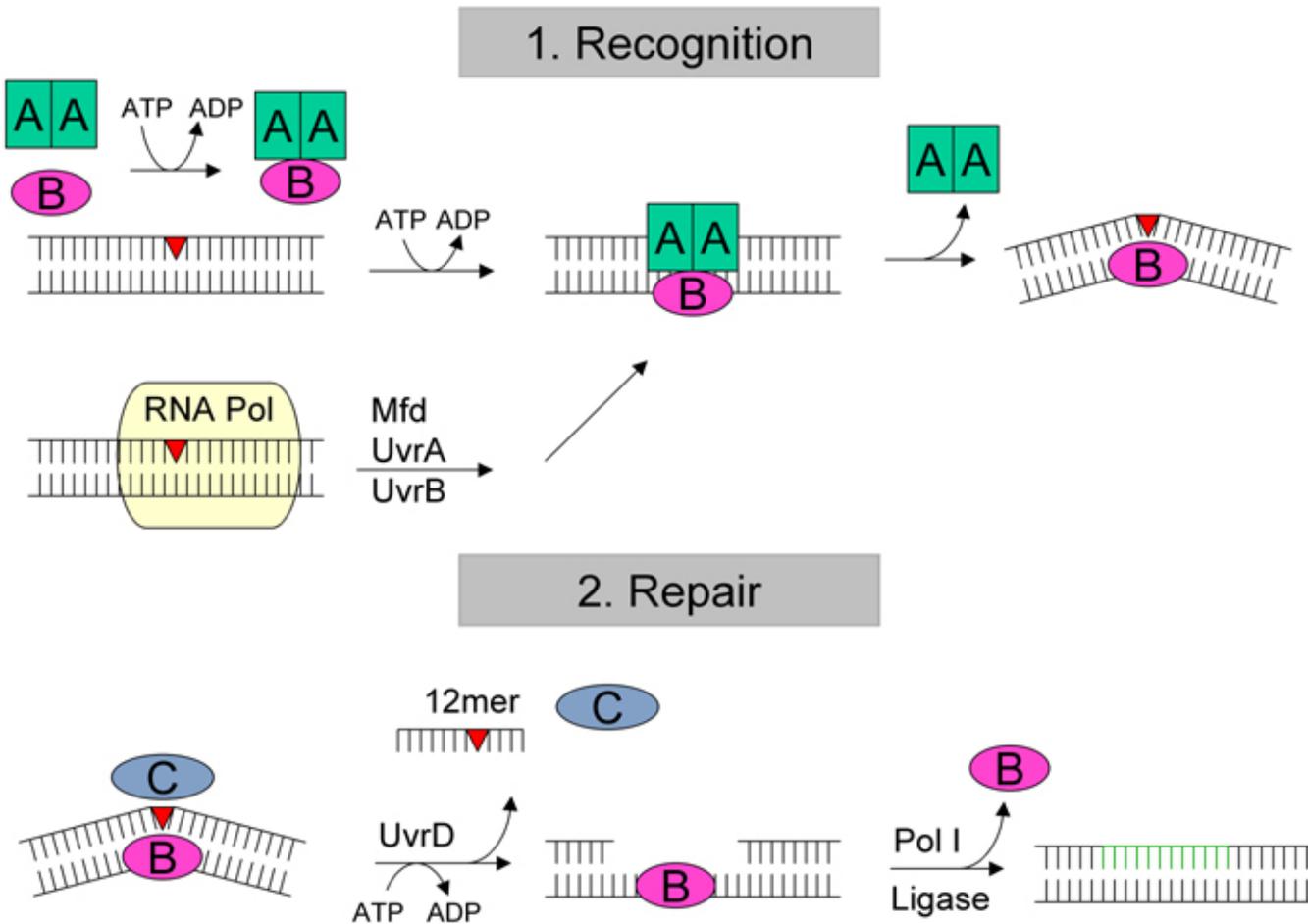
Structure of DNA-Repair Enzyme. A complex between the DNA-repair enzyme AlkA and an analog of an apurinic site. Note that the damaged base is flipped out of the DNA double helix into the active site of the enzyme for excision.

Excision repair of DNA by *E. coli* UvrABC mechanism (NER)



Two molecules of **UvrA** and one of **UvrB** form a complex that moves randomly along DNA (steps **1** and **2**). Once the complex encounters a lesion, conformational changes in DNA, powered by ATP hydrolysis, cause the helix to become locally denatured and kinked by 130° (step **3**). After the UvrA dimer dissociates (step **4**), the **UvrC endonuclease** binds and cuts the damaged strand at two sites separated by 12 or 13 bases (steps **5** and **6**). UvrB and UvrC then dissociate, and **helicase II** unwinds the damaged region (step **7**), releasing the single-stranded fragment with the lesion, which is degraded to mononucleotides. The gap is filled by **DNA pol I**, and the remaining nick is sealed by **DNA ligase** (step **8**).

Schematic representation of events following incision by **UvrABC** exonuclease in *E. coli*.



- La subunità **UvrA** recluta la subunità **UvrB** nel sito di danno prima della dissociazione.
- La **DNA elicasi II** media il rilascio di un segmento del DNA delimitato da due nick nello stesso filamento di DNA. Anche la proteina **UvrC** viene spostata a questo punto.
- La successiva sintesi di riparazione spiazza **UvrB**.
- Trascrizione accoppiata alla riparazione.

Riparazione per escissione di nucleotidi (NER) negli eucarioti

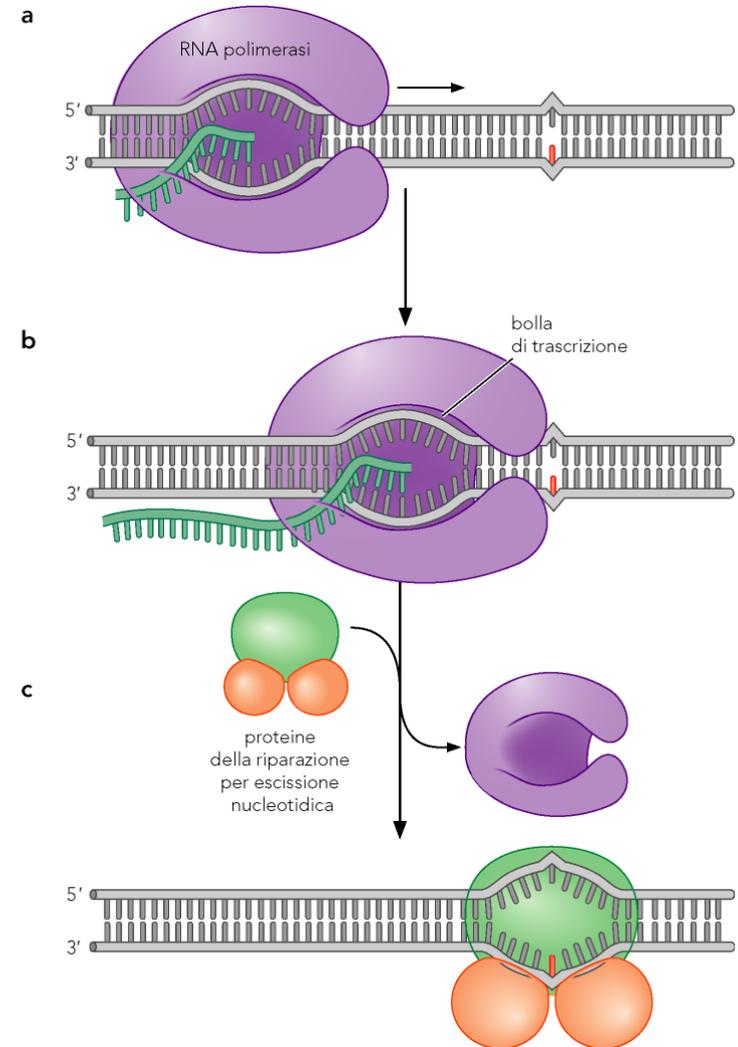
La riparazione per escissione nucleotidica (**NER**) nelle cellule degli eucarioti superiori avviene secondo lo stesso principio ma sono coinvolti più fattori: **XP A-G**.

Nell'uomo mutazioni su un gene XP causa lo **Xeroderma pigmentoso**. Gli individui colpiti sono altamente sensibili alla luce del sole ed hanno gravi lesioni alla pelle (inclusi tumori).

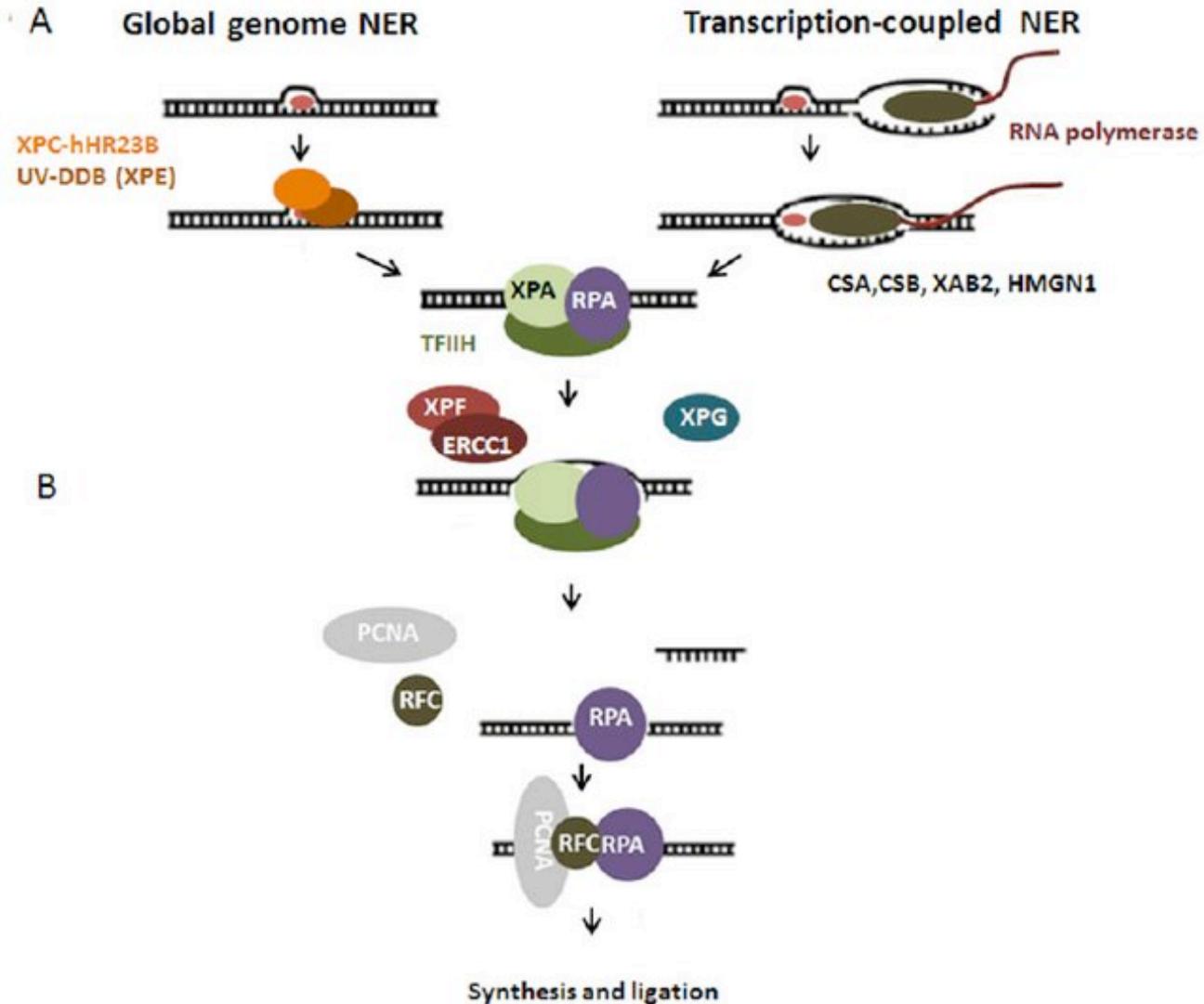
Questo sistema non solo elimina le lesioni del genoma ma recupera anche quelle molecole di RNA pol che sono state bloccate da una lesione presente sul DNA.

Trascrizione accoppiata alla riparazione del DNA

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



Riparazione per escissione di nucleotidi Gg NER e Tc NER



Sistema di riparazione delle rotture a doppio filamento

Double-strand break (DSB)

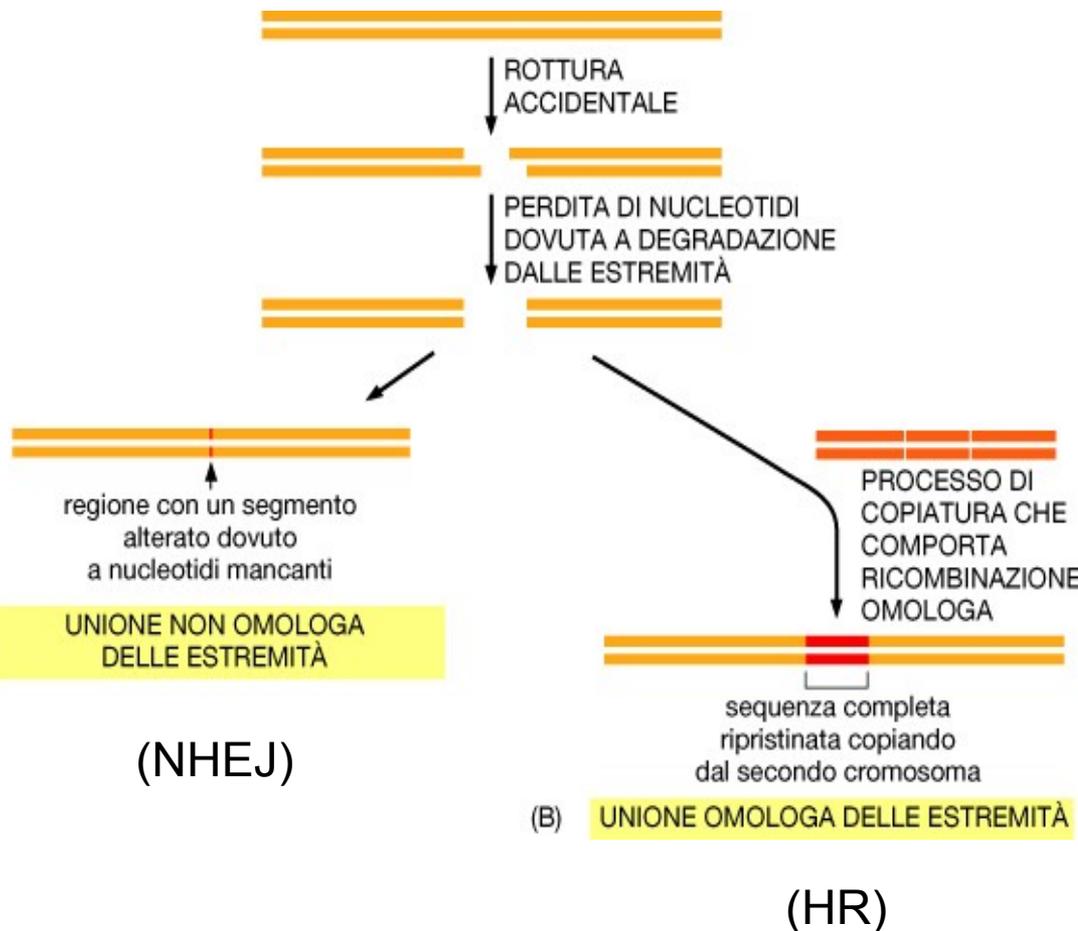
(meccanismi di rimozione del danno)

E' potenzialmente un danno molto grave -> più sistemi di riparazione.

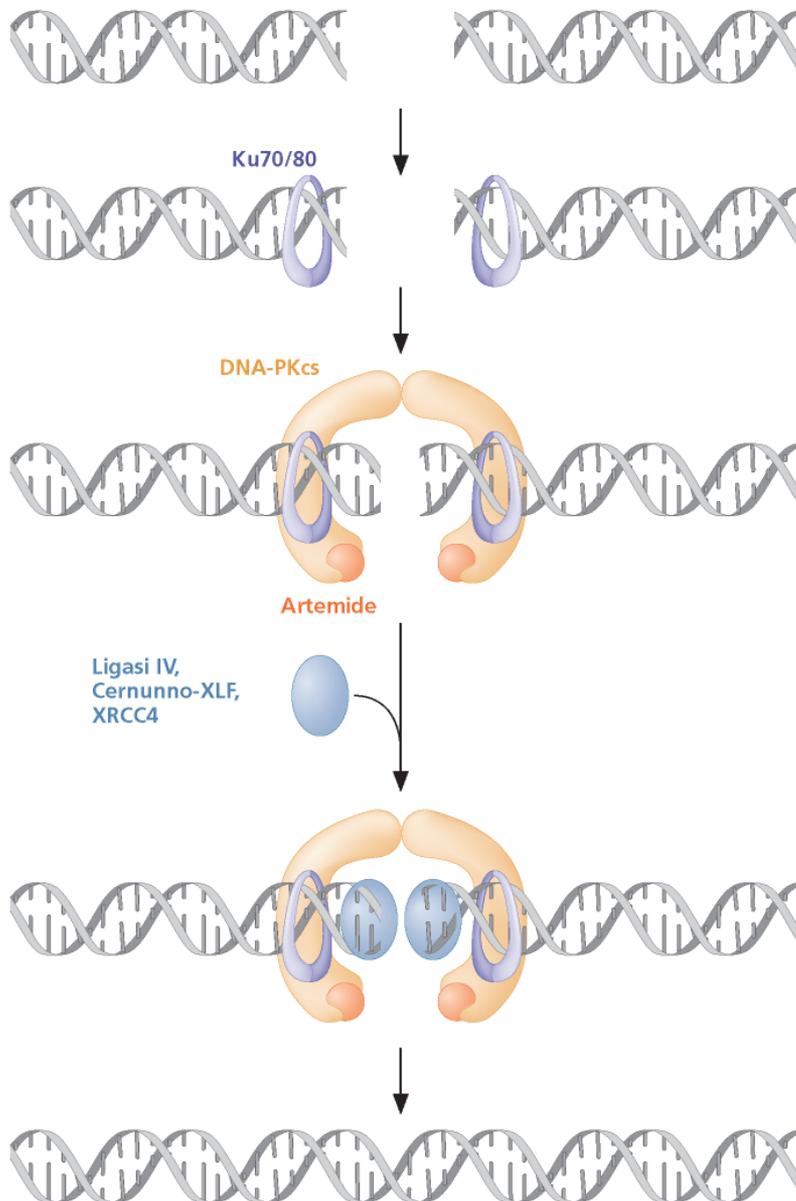
Giunzione delle estremità non omologhe (**nonhomologous end joining NHEJ**). Attivo durante tutto il ciclo cellulare.

Dal cromatidio fratello -> **ricombinazione omologa (HR)**. Attivo durante o subito dopo la duplicazione del cromosoma.

Entrambi i meccanismi operano sia nei procarioti che negli eucarioti ma negli eucarioti superiori NHEJ è il principale meccanismo.



Il sistema NHEJ



Se non c'è il cromatidio fratello allora -> NHEJ. **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).

(La figura si riferisce agli Eucarioti)

I sistemi di riparazione del DNA

Tabella riassuntiva

TABELLA 10.1 I sistemi di riparazione del DNA

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

<i>Tipo</i>	<i>Danno</i>	<i>Proteine di riparazione</i>
<i>Aggiramento del danno</i>		
Sintesi translesione del DNA	Dimero di pirimidina o sito apurinicco	DNA pol. IV e V in <i>E. coli</i> Pol.ζ, η, κ, ι e λ negli esseri umani
<i>Inversione del danno</i>		
Fotoriattivazione	Dimeri di pirimidina	DNA fotoliasi
Rimozione di gruppi metilici	O ⁶ -Metilguanina	Metiltransferasi
<i>Rimozione del danno</i>		
Riparazione per escissione delle basi	Base danneggiata	DNA glicosilasi
Riparazione delle basi male appaiate	Errori di replicazione	MutS, MutL, e MutH in <i>E. coli</i> MutSα, MutLα e EXO1 negli esseri umani
Riparazione per escissione dei nucleotidi	Dimeri di pirimidina Grandi addotti sulle basi	UvrA, UvrB, UvrC e UvrD in <i>E. coli</i> XPA, XPB, XPC, XPD, ERCC1/XPF e XPG negli esseri umani
Riparazione per rottura a doppio filamento	Rotture a doppio filamento	RecA e REcBCD in <i>E. coli</i> Complesso MRN, Rad51, BRCA1, BRCA2, XRCC3, ecc. negli esseri umani per la ricombinazione omologa Proteine Ku, Artemis/DNA-PKCS, XRCC4 negli esseri umani per l'unione non omologa delle estremità

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

Mismatch repair

<https://www.youtube.com/watch?v=p3MXIKWAI2w>

<https://www.youtube.com/watch?v=AgdMnMMbc8Q>

NER

<https://www.youtube.com/watch?v=94ou07-qMSg>

Biology animation (animazioni di differenti processi biologici)

<https://www.youtube.com/channel/UCCixjRONBE4aaEuTLsH8a2A>

Zanichelli

Riparazione del DNA – I meccanismi di riparazione del DNA