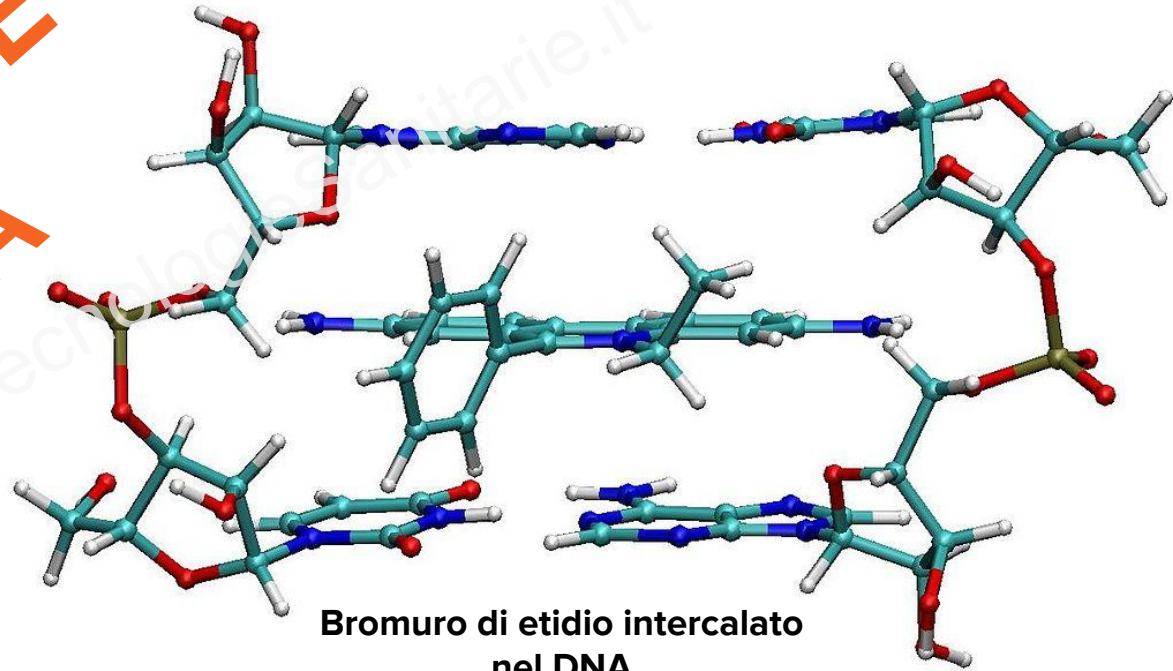




OGG1
DNA glicosilasi

RIPARAZIONE DEL DNA



**Bromuro di etidio intercalato
nel DNA**

INDICE

Immagine grande in copertina

Bromuro di etidio intercalato tra due paia di basi azotate A-T

Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=904106>

Immagine piccola in copertina

OGG1 - DNA glicosilasi responsabile della escissione dell'8-oxoguanina, base modificata dall'esposizione ai ROS

By Emw - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8820694>

[Introduzione](#)

[Fonti e tipi di danni](#)

[I premi Nobel per la ricerca sulla riparazione del DNA](#)

[I meccanismi di riparazione del DNA: danni al singolo filamento, le rotture del doppio filamento](#)

[Conclusioni](#)

[Photo credits](#)

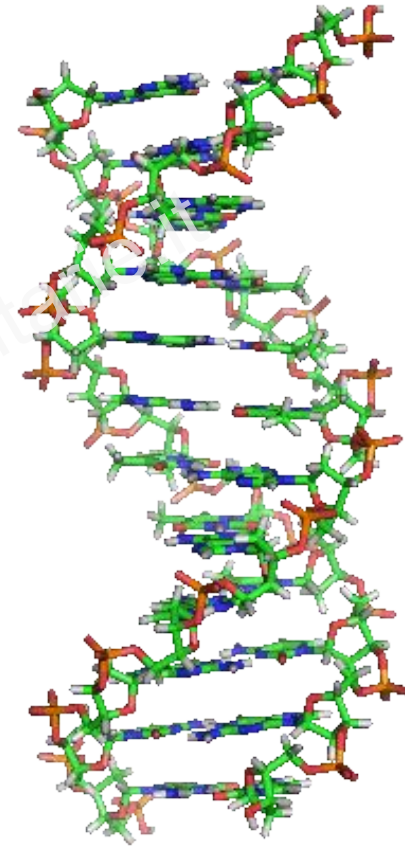


INTRODUZIONE

BioTechnologySanitarie.it

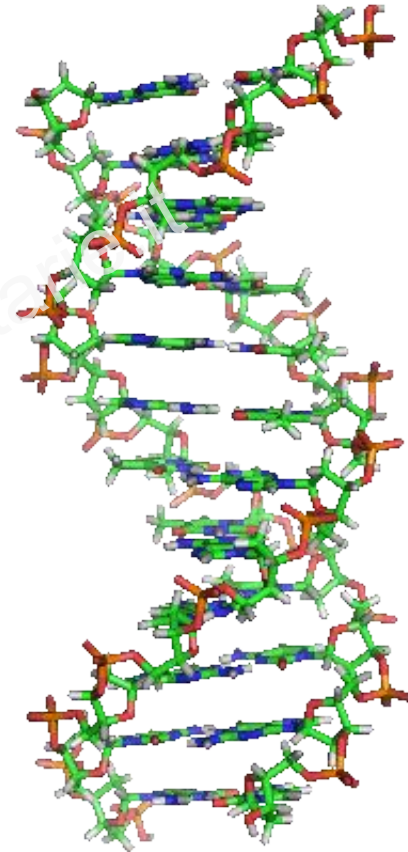
Introduzione

Ogni giorno il nostro DNA è sotto attacco: una lunga serie di agenti ambientali fisici e chimici o di molecole che derivano dal normale metabolismo cellulare provocano danni più o meno gravi.



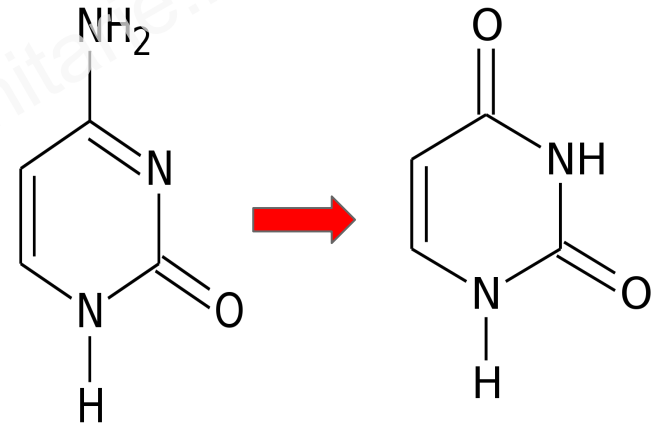
Introduzione

Per esempio a 37°C, che è la normale temperatura di esposizione per le nostre cellule, ogni cellula umana perde in media 18.000 basi azotate al giorno perché si rompe il legame glicosidico che le unisce al desossiribosio.



Introduzione

E ancora a proposito delle cellule umane. In ognuna, ogni giorno, si possono verificare fino a 500 episodi di deaminazione che portano alla trasformazione di una citosina in uracile.



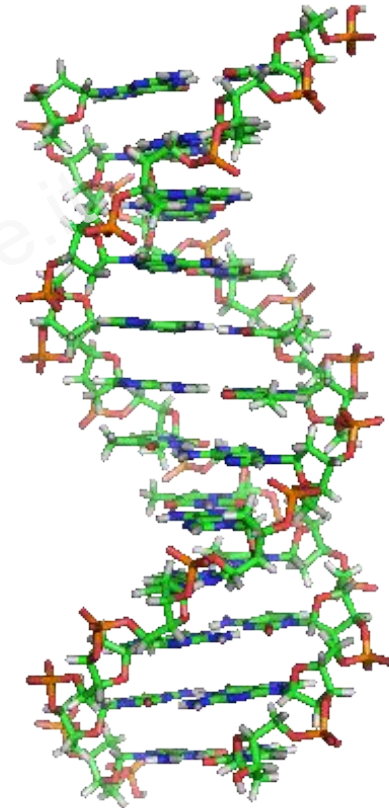
Citosina

Uracile

Introduzione

Si calcola che in media in ogni cellula si verificano da 10.000 a 1.000.000 di lesioni al DNA al giorno.

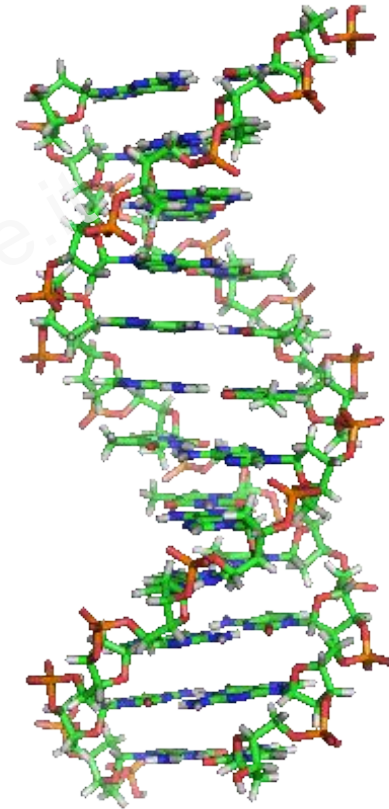
Ricordo che il DNA umano comprende 3 miliardi di paia di basi azotate e quindi le lesioni appena citate rappresentano una percentuale molto ridotta.



Introduzione

Nonostante ciò la situazione che si crea può essere seria; un esempio è il coinvolgimento dei geni oncosoppressori (diapositive dalla 16 alla 28 sul tema del cancro).

In ogni caso il DNA è depositario dell'informazione genetica da trasmettere alla progenie. Quindi deve essere stabile.



Introduzione

Per fortuna esistono molteplici meccanismi di riparazione che intervengono in seguito a ispezioni continue che **i kit di pronto soccorso del nostro genoma** (come vengono spesso chiamati) effettuano 24 ore al giorno per tutti i giorni della nostra vita. Questi meccanismi sono comparsi precocemente fin dall'inizio dell'evoluzione.

Non sempre però i meccanismi di riparazione sono ugualmente efficienti perché molto dipende dall'età e dal tipo della cellula e dall'ambiente extracellulare.

FONTI E TIPI DI DANNI

BioTechnologySanitarie.it

Fonti e tipi di danni

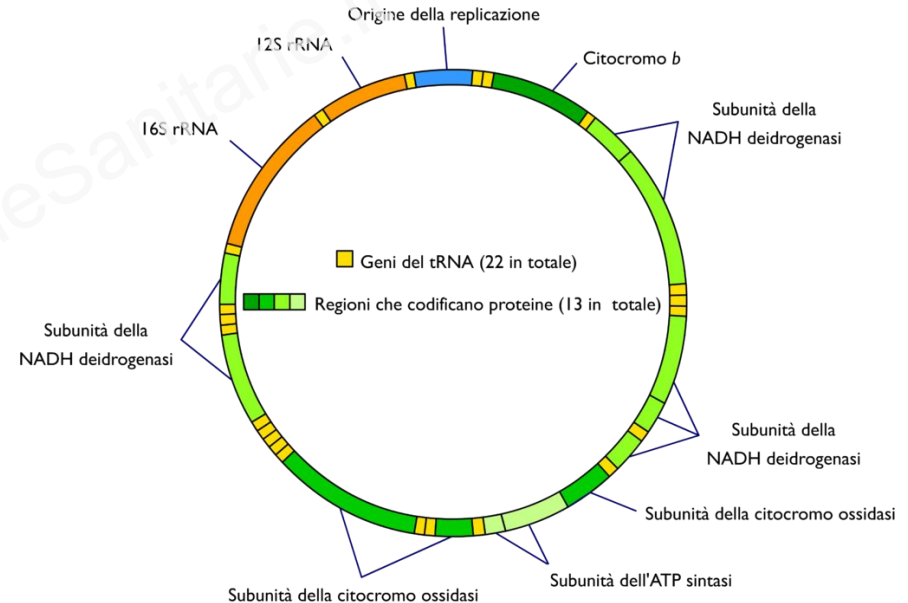
Prima di addentrarci in questo argomento sarà bene ricordare quali sono i danni e le loro cause.

La stragrande maggioranza dei danni al DNA coinvolge la sua struttura primaria, riguarda cioè una modificazione delle basi azotate. Queste modifiche possono a loro volta *interrompere la sua normale struttura elicoidale* perché vengono introdotti legami chimici non nativi o adottati ingombranti che non si adattano alla struttura standard della doppia elica.

Fonti e tipi di danni

Inoltre il DNA non è solo quello nucleare, organizzato insieme agli istoni nei cromosomi.

Esiste anche un **DNA mitocondriale** (mtDNA). 5 o 10 molecole circolari non associate a istoni, che ricordano molto da vicino i plasmidi. Ambedue sono suscettibili a danni.



Fonti e tipi di danni

I danni al DNA possono essere endogeni e esogeni.

I **danni endogeni** sono da attribuire a:

- errori nella replicazione del DNA;
- attacchi di specie reattive all'ossigeno (ROS) conseguenza di normali attività metaboliche; in questo caso i danni sono legati per lo più a processi di deaminazione ossidativa.

Ma cosa sono le specie reattive all'ossigeno? quando e perché si formano? Cominciamo a ricordare cosa sono i radicali liberi.

Fonti e tipi di danni

I **radicali liberi** sono atomi o molecole molto reattivi e a vita brevissima ma tale per cui possono essere individuati comunque. Questo comportamento è legato alla presenza di un elettrone spaiato nell'orbitale più esterno che li porta ad interagire con altri radicali liberi o a sottrarre un elettrone ad altri composti vicini. In quest'ultimo caso nella cellula quindi le molecole bersaglio sono soprattutto le biomolecole che possono subire danni funzionali ed avviare reazioni a catena.

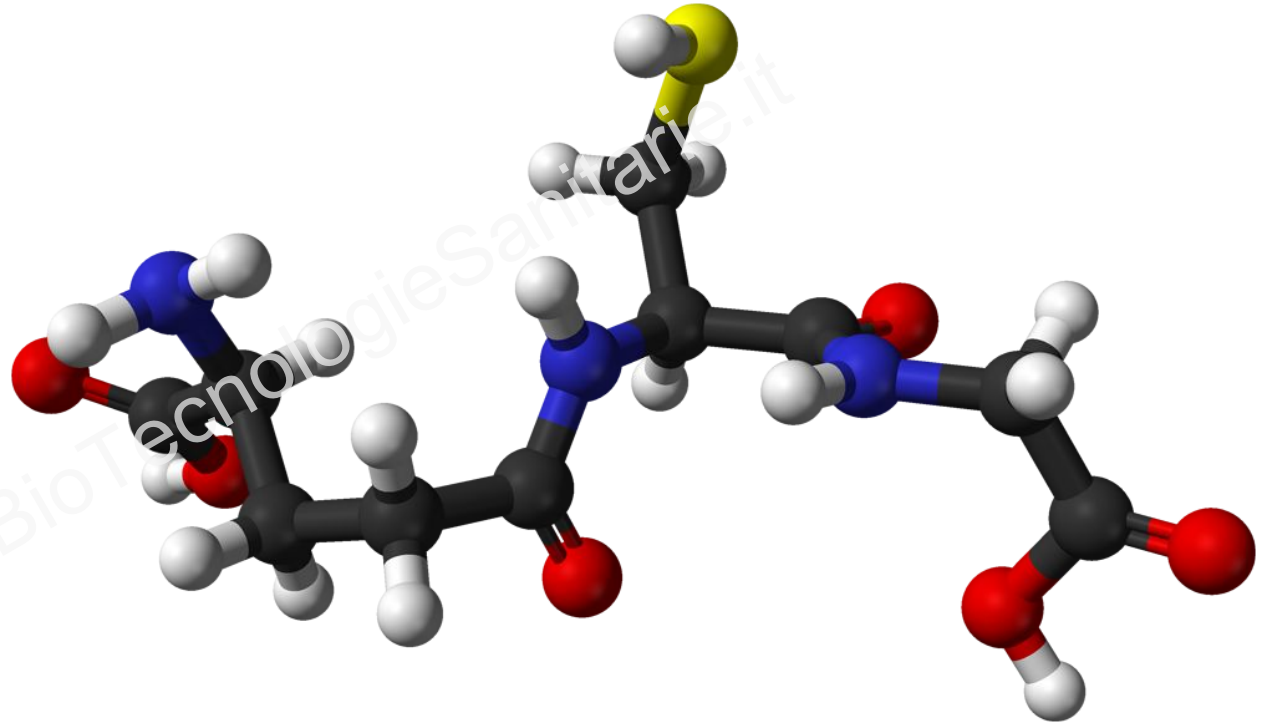
Fonti e tipi di danni

I radicali liberi si formano spontaneamente in seguito alla scissione di un legame covalente; quindi una piccola quota di queste molecole viene prodotta dalle difese immunitarie, dalla fosforilazione ossidativa e da alcune reazioni enzimatiche. Se sono in quantità limitate i radicali liberi vengono controllati da un sistema enzimatico detto **glutazione** (maggiori particolari nella slide successiva). In caso contrario si ha lo **stress ossidativo**. L'iperproduzione di radicali liberi è una delle concause probabili del cancro, delle malattie degenerative e dell'invecchiamento cellulare.

Fonti e tipi di danni

Il **glutathione**, tra i più potenti *antiossidanti* (scavenger) prodotto dall'organismo umano, è un tripeptide.

È formato da cisteina e glicina, unite da un normale legame peptidico, e da glutammato che è unito alla cisteina da un legame peptidico atipico (tra il gruppo carbossilico della catena laterale del glutammato e il gruppo amminico della cisteina).



Fonti e tipi di danni

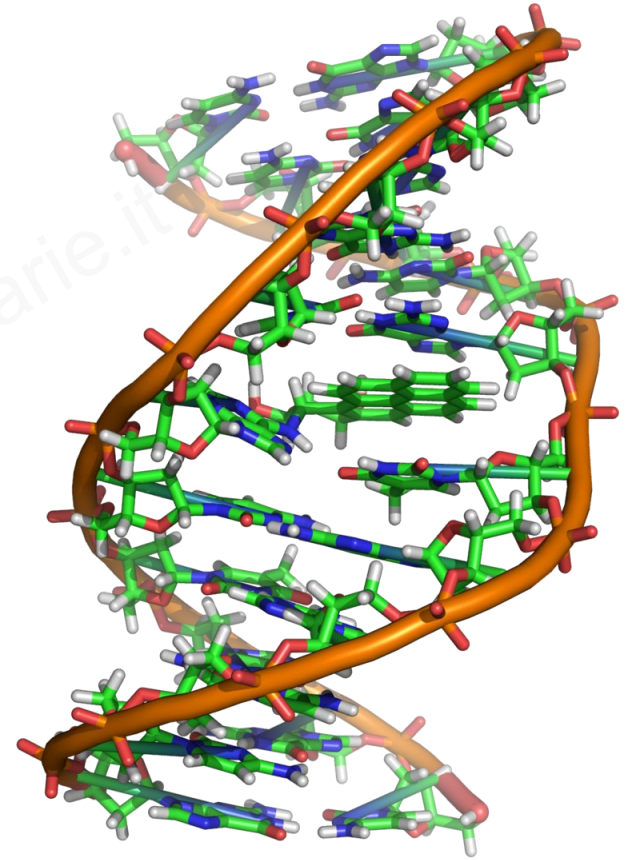
Le **specie reattive all'ossigeno (ROS)** sono tra i radicali liberi più diffusi. Tra questi sono da evidenziare:

- l'anione superossido (O_2^-), prodotto dalla riduzione incompleta di O_2 ; quando non viene disattivato produce danni ai lipidi di membrana, proteine e DNA
- il perossido d'idrogeno (H_2O_2)
- il radicale ossidrilico ($-\text{OH}$), il più attivo di tutti, viene prodotto dai leucociti a partire dal perossido d'idrogeno per distruggere i patogeni.

Fonti e tipi di danni

I processi metabolici cellulari arrecano diversi tipi di danni:

- ossidazione delle basi e quindi interruzioni nella struttura del DNA, dovute a specie reattive all'ossigeno
- alchilazione delle basi (in genere metilazioni)
- idrolisi delle basi (deaminazione, depurinazione, depirimidinazione)
- formazione di addotti al DNA



Metabolita del benzo[a]pirene che forma addotto al DNA

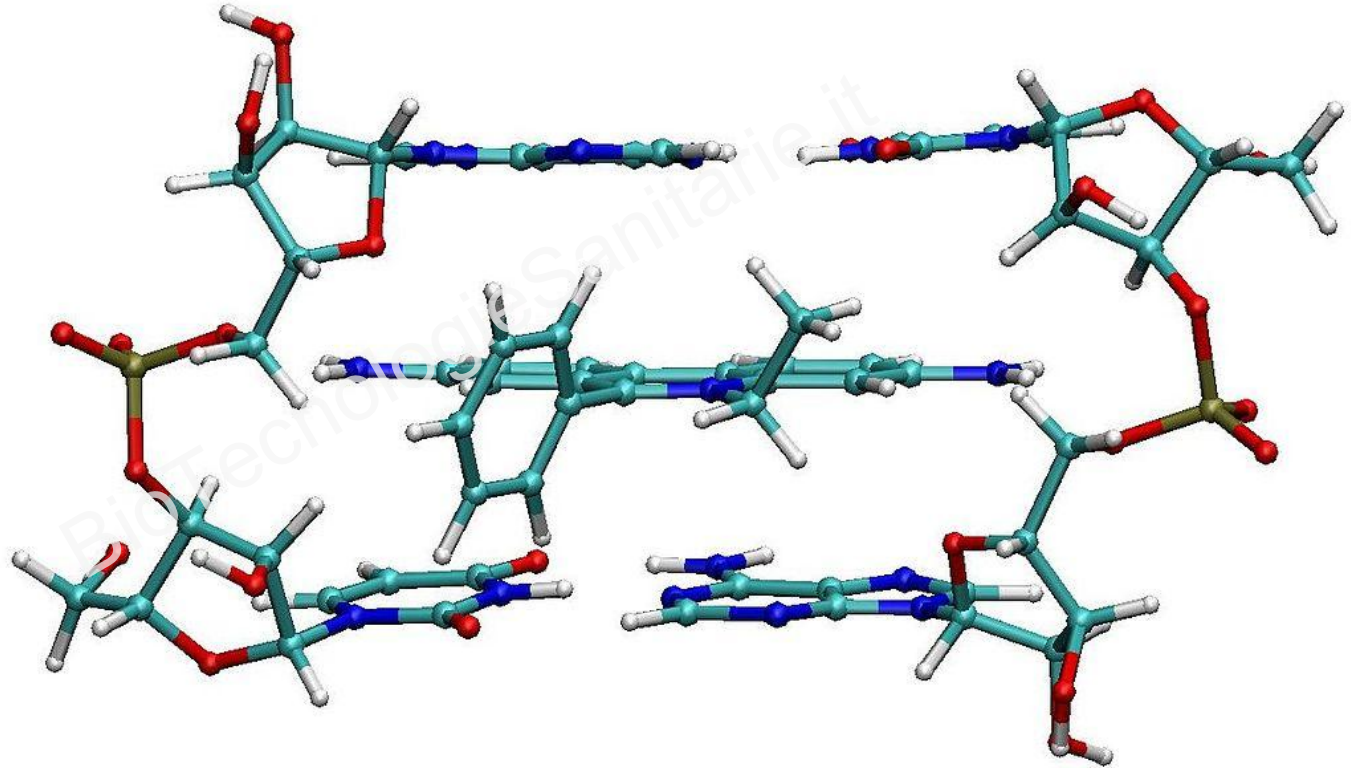
Fonti e tipi di danni

Chiariti i danni endogeni, passiamo ai **danni esogeni al DNA**.
Questi possono essere dovuti ad agenti fisici e chimici.

- Raggi ultravioletti con lunghezza d'onda compresa tra 200 e 400 nm
- Altre radiazioni come i raggi x e γ
- Idrolisi o rottura della molecola dovuta a rialzo termico
- Tossine vegetali
- Mutageni, soprattutto composti aromatici che formano intercalanti nel DNA (esempio nella slide successiva)
- virus

Fonti e tipi di danni

L'immagine mostra il bromuro di etidio intercalato tra due paia di basi azotate A-T



Fonti e tipi di danni

Vediamo ora meglio il meccanismo d'azione di alcuni degli agenti prima citati.

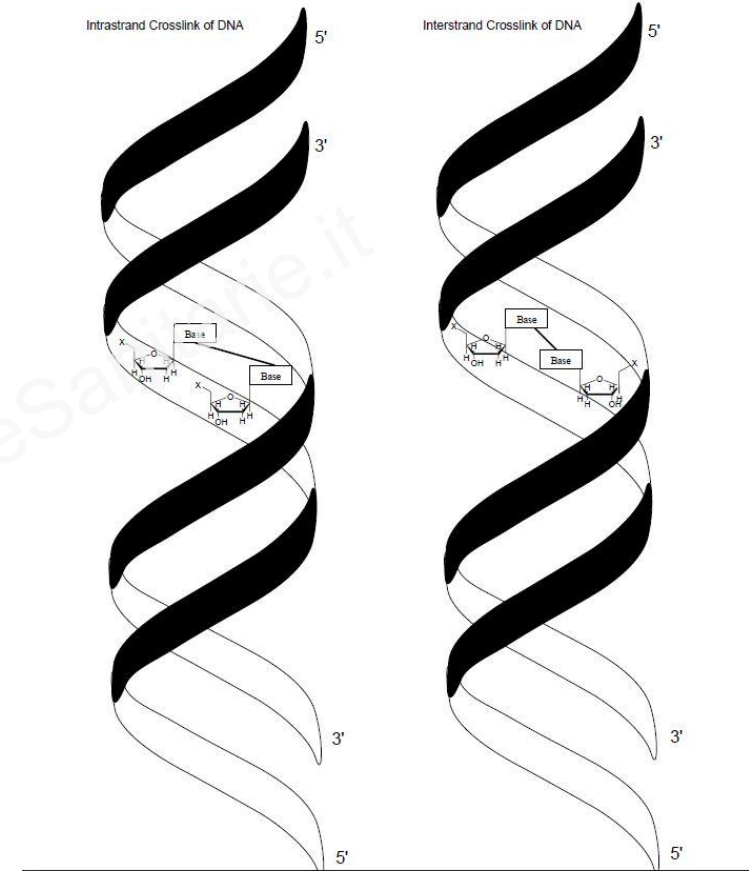
- Gli **UVA** (lunghezza d'onda: 315 - 400 nm), non assorbiti dalla fascia di ozono, creano radicali liberi (danno indiretto)
- Gli **UVB** (lunghezza d'onda: 280 - 315 nm), assorbiti per lo più dalla fascia di ozono, formano dimeri pirimidinici (danno diretto)
- Le **radiazioni ionizzanti** dovute a decadimento radioattivo creano rotture nei filamenti di DNA

Fonti e tipi di danni

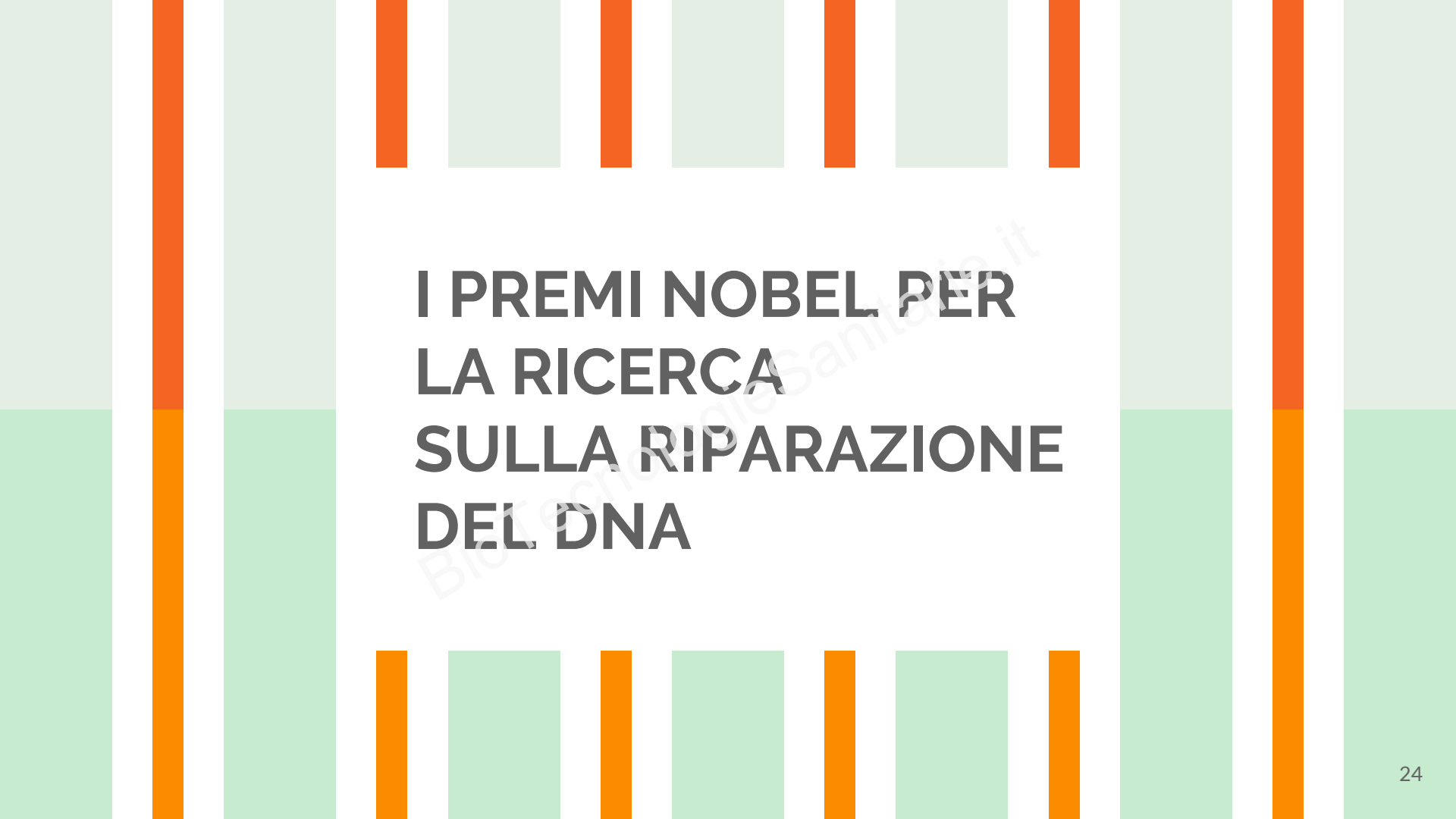
- Le **alte temperature** possono produrre rotture nel singolo filamento o aumentare la quota di depurinazioni cioè la perdita di basi puriniche dalla struttura del DNA
- I **composti chimici** come il cloruro di vinile o l'acqua ossigenata e le sostanze chimiche presenti nell'ambiente come gli IPA creano un'enorme diversità di addotti al DNA, come basi ossidate, fosfotriesteri alchilati e reticolazione del DNA. La reticolazione del DNA, documentata da un'immagine nella slide successiva, è dovuta all'azione di agenti endogeni ed esogeni.

Fonti e tipi di danni

Tra gli agenti esogeni ricordo gli psoraleni e la mitomicina già trattati in [xenobiotici e mutageni](#); tra quelli endogeni le aldeidi che si ottengono dalla perossidasi dei lipidi e molti radicali liberi soprattutto ROS. Tali agenti reagiscono con due nucleotidi creando un legame covalente. I due nucleotidi possono essere sullo stesso filamento o sui due filamenti opposti.



Legami incrociati intra- ed interfilamento nel DNA



**I PREMI NOBEL PER
LA RICERCA
SULLA RIPARAZIONE
DEL DNA**

I premi Nobel

Nel 2015 il premio Nobel per la Chimica è stato assegnato a tre scienziati che hanno contribuito in modo determinante alle scoperte di base in questo settore.

Cominciamo con **T. Lindahl**. Svedese, il suo contributo è relativo alla scoperta di numerosi enzimi implicati nei meccanismi di riparazione sia a livello di cellule batteriche che dei mammiferi.



T. Lindahl

I premi Nobel

P. Modrich, biochimico americano, ha lavorato soprattutto sul meccanismo del “mismatch repair” individuando alcune proteine indispensabili. Il mismatch repair è un meccanismo di correzione di bozze chiave che le cellule usano per eliminare gli errori rari di DNA che si verificano durante la replicazione dei cromosomi.



P. Modrich

I premi Nobel

Aziz Sancar. Scienziato turco naturalizzato americano, è un esperto di riparazioni del DNA e dei controlli sul ciclo cellulare. Ha lavorato sulla riparazione del dimero della timina. Ma il suo merito principale è aver scoperto i due geni (Periodo e Cryptochrome) che tengono gli orologi circadiani di tutte le cellule umane in corretto ritmo sincronizzandoli alle 24 ore del giorno e alle stagioni



Aziz Sancar



I MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

BioTecnologie Sanitarie.it

Riparazione del DNA

I meccanismi di riparazione del DNA sono numerosi perché numerosi sono i danni inflitti all'acido desossiribonucleico come abbiamo appena visto. Poi ci sono da considerare altri fattori che incidono sulla scelta della molecola o delle molecole riparatrici da far intervenire; per esempio la fase del ciclo in cui si trova la cellula e se la cellula è entrata o meno in uno stadio di senescenza. A scopo didattico dividiamo tali meccanismi in due gruppi principali:

- i danni al singolo filamento
- le rotture del doppio filamento



Danni al singolo filamento

BioTechnologieSanitarie.it

Danni al singolo filamento

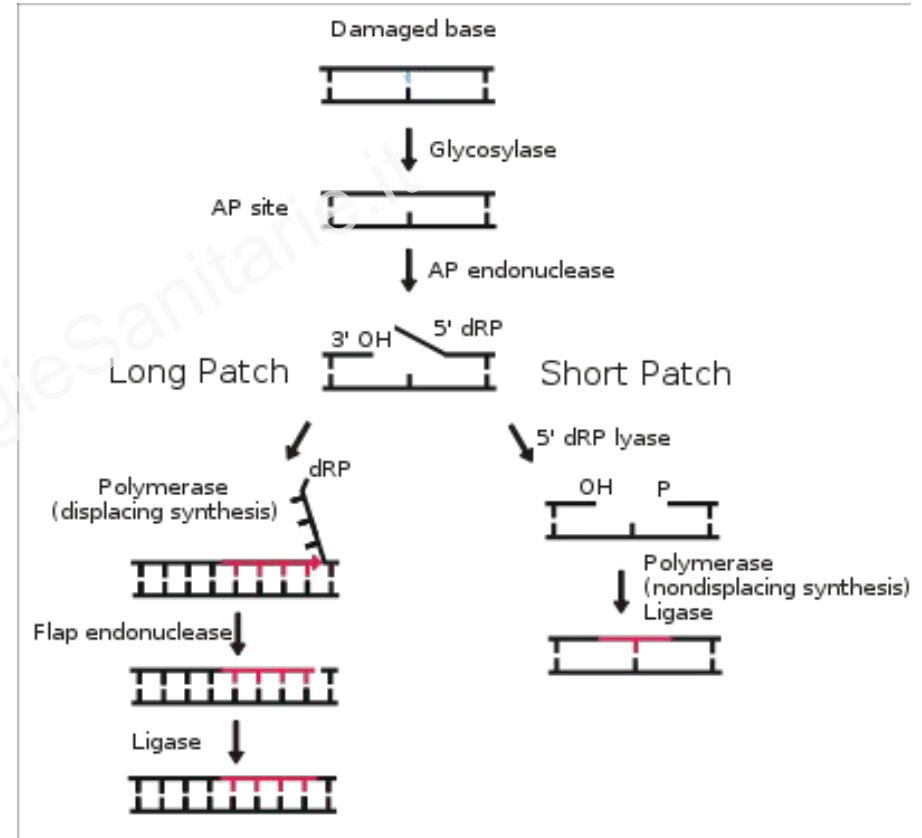
Reversione diretta del danno o riparazione sul posto.

Questo meccanismo non usa l'altro filamento come stampo perché i danni sono relativi a una sola delle quattro basi azotate, vale a dire la guanina. Ad esempio viene usata la **metil-guanina-metil-transferasi** (MGMT) per rimuovere la metilazione dalla guanina. Si tratta di un processo costoso per la cellula perché ognuna di queste molecole può essere usata una sola volta.

Danni al singolo filamento

Escissione di basi, detta anche **BER** (Base Excision Repair). Richiede l'intervento di diversi enzimi.

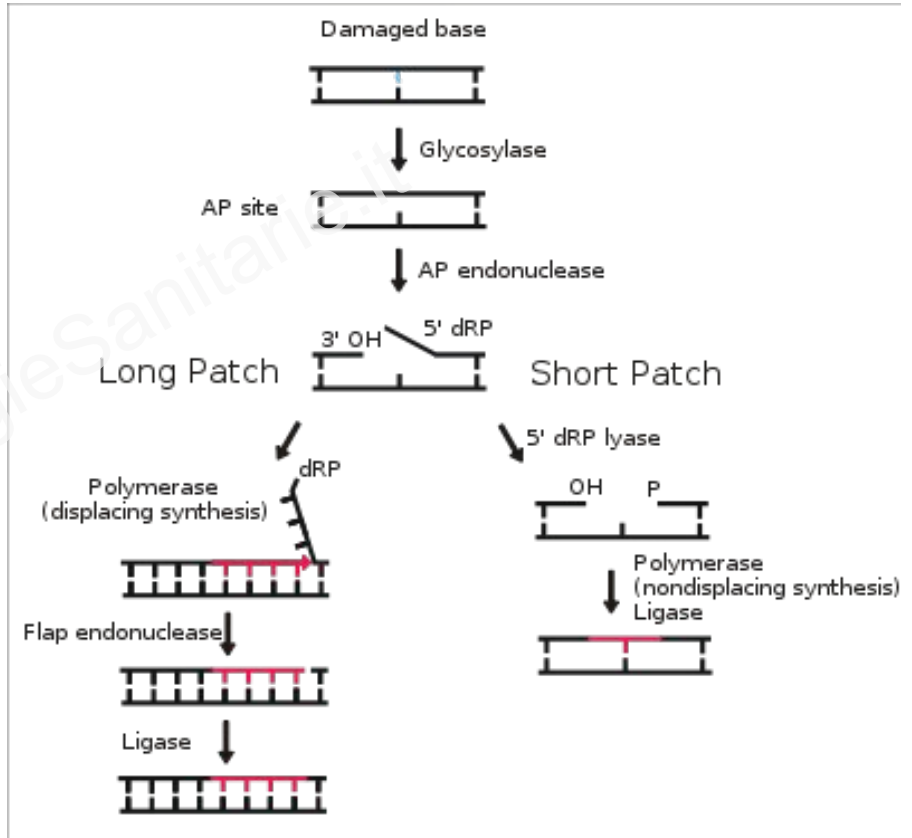
- La *Dna glicosilasi* (una per ogni base) riconosce facilmente la sede del danno e rompe il legame tra la base e lo zucchero desossiribosio.
- La *endonucleasi AP* tagliano il gruppo zucchero-fosfato alle due estremità.



Danni al singolo filamento

Escissione di basi

- Le nucleasi liberano completamente il sito danneggiato rimuovendo il gruppo zucchero-fosfato.
- La DNA polimerasi è ora in grado di posizionare il nucleotide esatto facendo riferimento al filamento complementare.

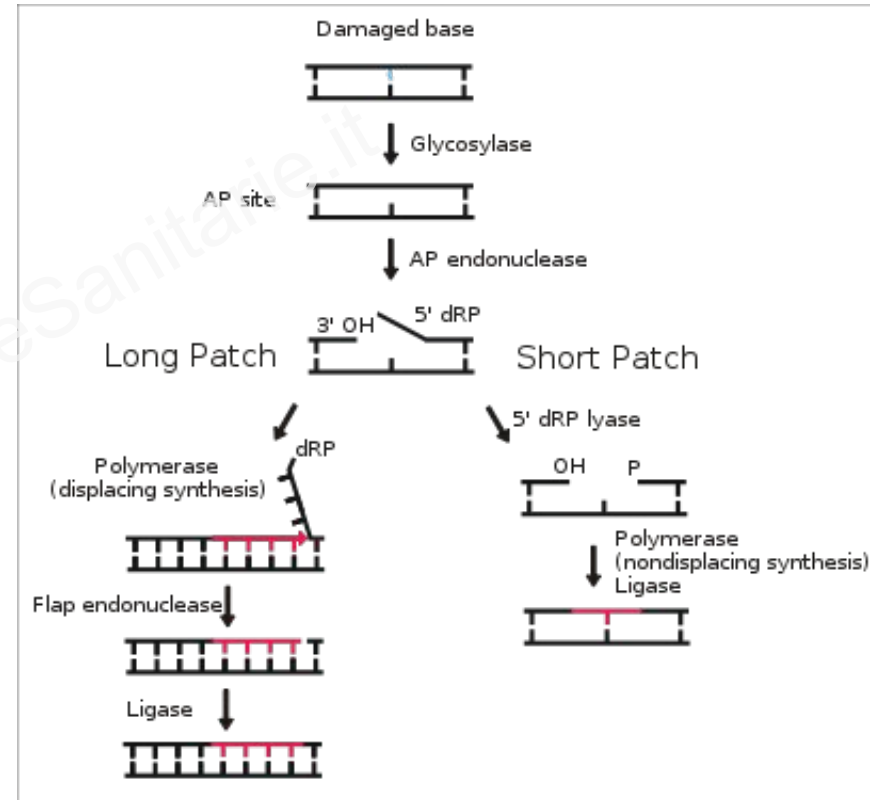


Danni al singolo filamento

Escissione di basi

- A questo punto subentra una *ligasi* che lega il nucleotide rispettivamente al nucleotide precedente e successivo.

Il meccanismo di riparazione può coinvolgere un nucleotide alla volta (Short Patch della figura) o fino a 10 nucleotidi alla volta (Long Patch della figura). In questo modo può essere *riparato il danno della conversione della citosina in uracile* in seguito a deaminazione.



Danni al singolo filamento

Escissione di nucleotidi, nota anche come **NER** (Nucleotide Excision Repair). Il sistema è privo di errori perché la fedeltà della riparazione è garantita dal filamento complementare come nella precedente riparazione. In questo caso il tratto di DNA coinvolto comprende da 2 a 30 nucleotidi.

In genere il sistema, formato da ben 9 proteine, *si attiva quando il danno è stato causato da radiazioni (UV), agenti intercalanti e altri tipi di mutageni.*

Un deficit di questo sistema di riparazione a carico di una sola proteina porta ad una patologia precisa; tutte derivano dallo Xeroderma pigmentoso.

Danni al singolo filamento

Mismatch Repair, noto come **MMR**.

Questo tipo di meccanismo di riparazione è presente in tutte le cellule per sistemare gli errori che non sono corretti dalla “**correzione delle bozze**”. Questo meccanismo di riparazione interviene soprattutto per risolvere i *danni derivati dalla riproduzione del DNA oppure durante la sua ricombinazione (nella meiosi) o ancora per effetto di mutageni.*

Danni al singolo filamento

Mismatch Repair

Le proteine coinvolte sono almeno due. Una rileva la mancata corrispondenza e l'altro recluta un'endonucleasi che scinde il filamento di DNA appena sintetizzato vicino alla regione del danno. In *E. coli*, le proteine coinvolte appartengono alla classe Mut. In seguito si assiste alla rimozione della regione danneggiata da parte di una esonucleasi, alla risintesi mediante DNA polimerasi e alla chiusura mediante DNA ligasi.

Danni al singolo filamento

Nella slide precedente è stato citato il sistema della “**correzione delle bozze**” (**proofreading**). Questo meccanismo è proprio della DNA polimerasi mentre lavora sulla replicazione del DNA. Infatti la DNA polimerasi è in grado, mentre avanza per formare il neofilamento, di capire se il nucleotide appena inserito è appaiato correttamente. Se non lo è lo rimuove e procede ad un nuovo tentativo. In questa attività è aiutata da altri enzimi coinvolti nel processo di duplicazione. La presenza della “correzione delle bozze” fa sì che il margine di errore durante la duplicazione del DNA sia di una base errata ogni 10^9 basi duplicate.

Danni al singolo filamento

Ma non è finita qui. Eventuali altri errori sfuggiti al controllo della “correzione delle bozze” possono essere risolti ancora prima degli interventi di escissione.

Un'altra serie di proteine, infatti, controlla la neo molecola di DNA e si accorge di eventuali **anomalie di appaiamento**. È facilmente spiegabile il meccanismo d'azione: appena formata una molecola di DNA è soggetta a cambiamenti chimici come la metilazione di adenina. Se il gruppo metile non viene individuato è ovvio che su quella adenina qualcosa non va.



Le rotture del doppio filamento

ppp.TecnologieSanitarie.it

Rotture del doppio filamento

Il DNA può essere coinvolto in danni ben maggiori quando si assiste alla rottura di uno o di entrambi i filamenti.

Il fenomeno più grave è quello della doppia rottura (**Double Strand Breaks** o **DBS**) a cui la cellula risponde in modo completo. Tenta la correzione ma contemporaneamente si assicura di non poter continuare il suo ciclo vitale in caso di mancata riparazione.

Rotture del doppio filamento

Ricombinazione omologa (HR).

Il sistema di riparazione deve avere uno stampo su cui lavorare e per questo sfrutta il cromosoma omologo o il cromatidio fratello. Per questo motivo il processo si può avviare solo prima della mitosi quando i cromosomi si sono duplicati.

Rotture del doppio filamento

Giunzione non omologa delle estremità (NHEJ)

Si verifica quando la cellula non è vicina alla fase della mitosi e non si è ancora verificata la fase S. Il meccanismo di riparazione non si può basare come nel caso precedente su uno stampo. Quindi, il sistema di enzimi procede a collegare i frammenti secondo eventuali corte sequenze di basi complementari. Si può intuire facilmente che il rischio di ricostruzioni con gravi conseguenze è molto alto.



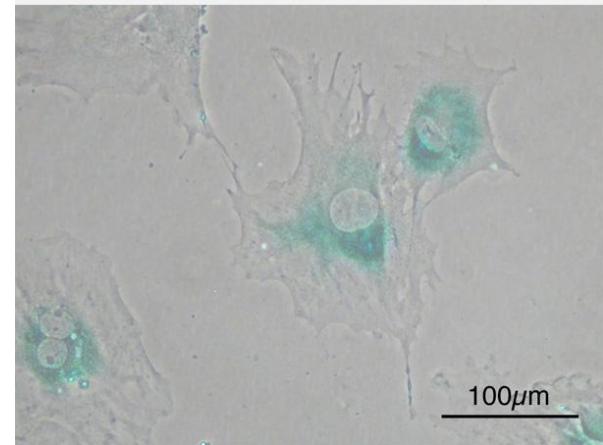
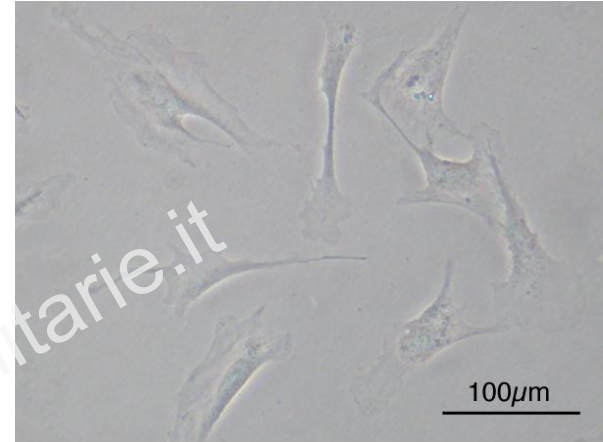
CONCLUSIONI

BioTechnology Sanitarie.it

Conclusioni

Una cellula che abbia subito un gran numero di danni al suo DNA o una cellula che non sia più in grado di riparare i danni al DNA può avere diverse conseguenze.

- Entrare in uno **stato di senescenza**, ovvero non riuscire più a dividersi. Nella foto a lato si possono vedere fibroblasti embrionali di topo (in alto) e dopo diversi passaggi colturali le cellule in senescenza che sono più larghe, appiattite e mostrano la presenza del marker tipico (β -galattosidasi - aree blu)



Conclusioni

- Avviare il processo di **morte cellulare o apoptosi** come è evidenziato nell'immagine di lato che mostra una sezione di fegato di topo colorata con una tecnica particolare per far risaltare la cellula in apoptosi (arancione)
- Moltiplicarsi senza regole dando origine ad una neoplasia

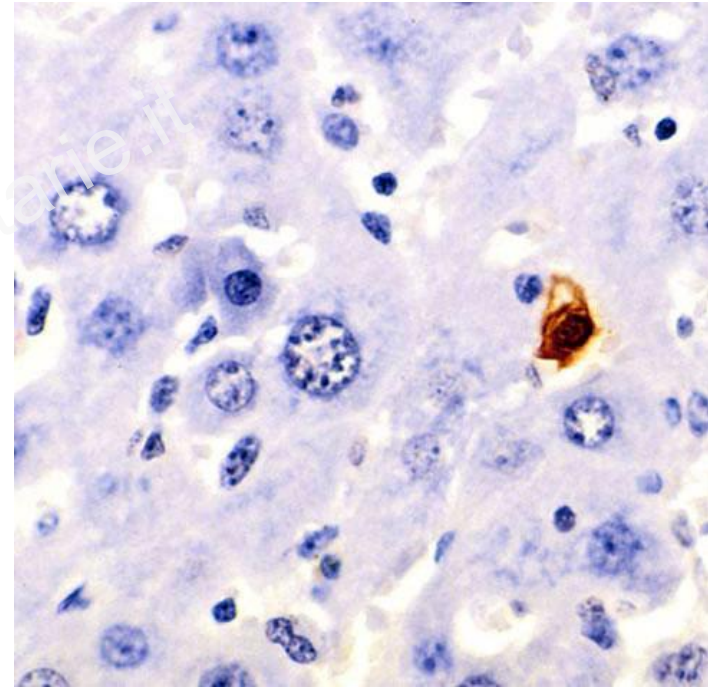


Photo credits

Il DNA - Von Zephyris aus der englischsprachigen Wikipedia, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2118354>

Citosina - Di Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=55486800>

Uracile - Di Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=56088049>

Organizzazione del DNA mitocondriale - Di jhc - Sono io l'autore, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=976840>

Glutazione - Di Ben Mills - Opera propria, Pubblico dominio,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4718944>

Addotto al DNA - By Zephyris at the English language Wikipedia, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2268968>

Legami incrociati intra- ed interfilamento nel DNA - By Smithtyl - Own work, CC BY-SA 4.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=64222055>

Photo credits

Thomas Lindahl - By Holger Motzkau - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45496698>

Paul Modrich - By Holger Motzkau - Own work, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45496686>

Aziz Sancar - By Holger Motzkau - Treball propi, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=45496679>

Escissione delle basi - By Amazinglarry (talk) at en.wikipedia - Created by author, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7280674> **Cellule in senescenza** - By Y tambe - Y tambe's

file, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1887056>

Cellula in apoptosi colorata in arancio in una sezione di fegato di topo - By Laboratory of Experimental

Pathology, Division of Intramural Research, NIEHS (NIH) -

<http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/liverpath/necrotic/apoptosis5.htm>, Public Domain,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1898256>