

Fedeltà della Replicazione

Fedeltà della replicazione: 1 errore ogni 10^9 - 10^{10}

Pol III: 1 errore ogni 10^5 , che dipende in parte della presenza delle forme tautomeriche delle basi azotate



In parte riparato dalla propria attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ che la permette aggiungere poi in nucleotide corretto: **Attività Proofreading**

Arriva a frequenza d errori 10^7



Si raggiunge la frequenza di 10^9 dopo ulteriori meccanismi di riparazione

Origine del danno al DNA

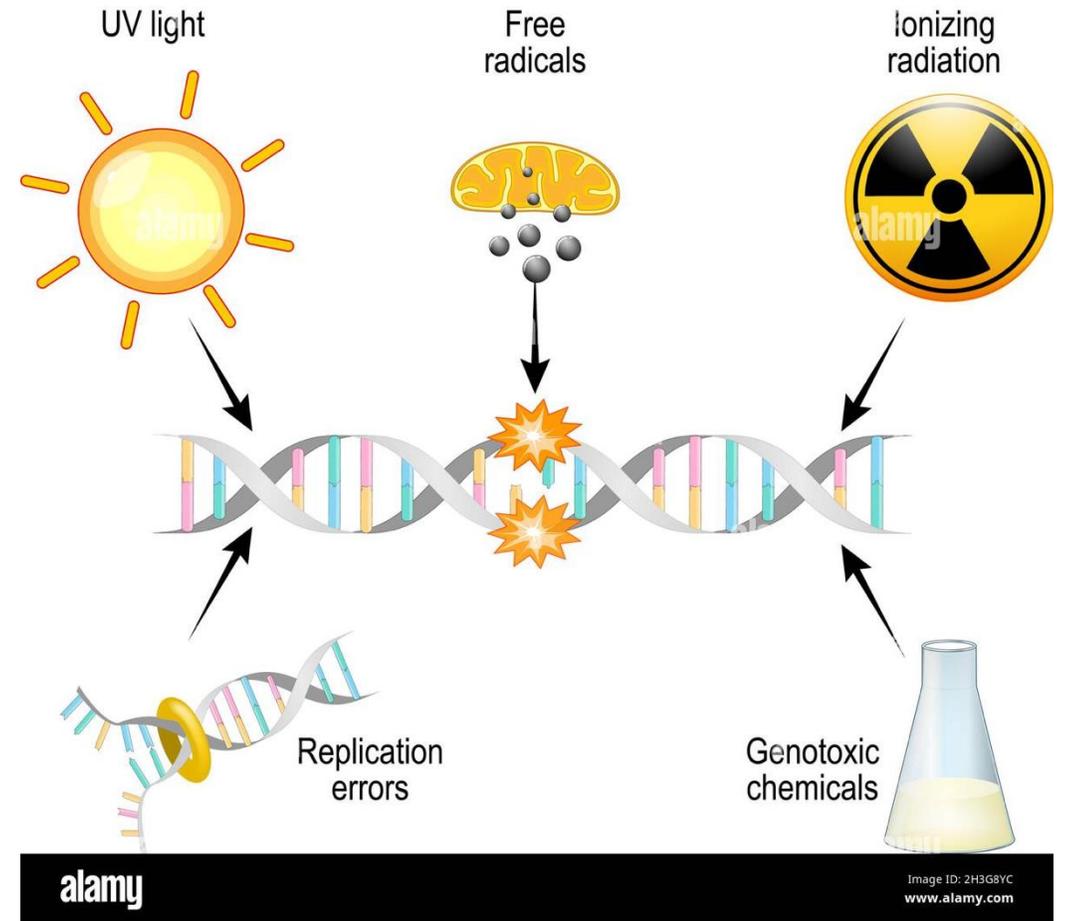
Il DNA ogni giorno soffre delle alterazioni:

Danni intrinseci

- Dovuti a **errori di replicazione**
- **Perdita** di basi azotate (depurinazione)
- **Deamminazioni** di basi azotate (Citosina->Uracile)
- Alterazioni dovute alla produzione di “**Reactive oxygen species**” (ROS)

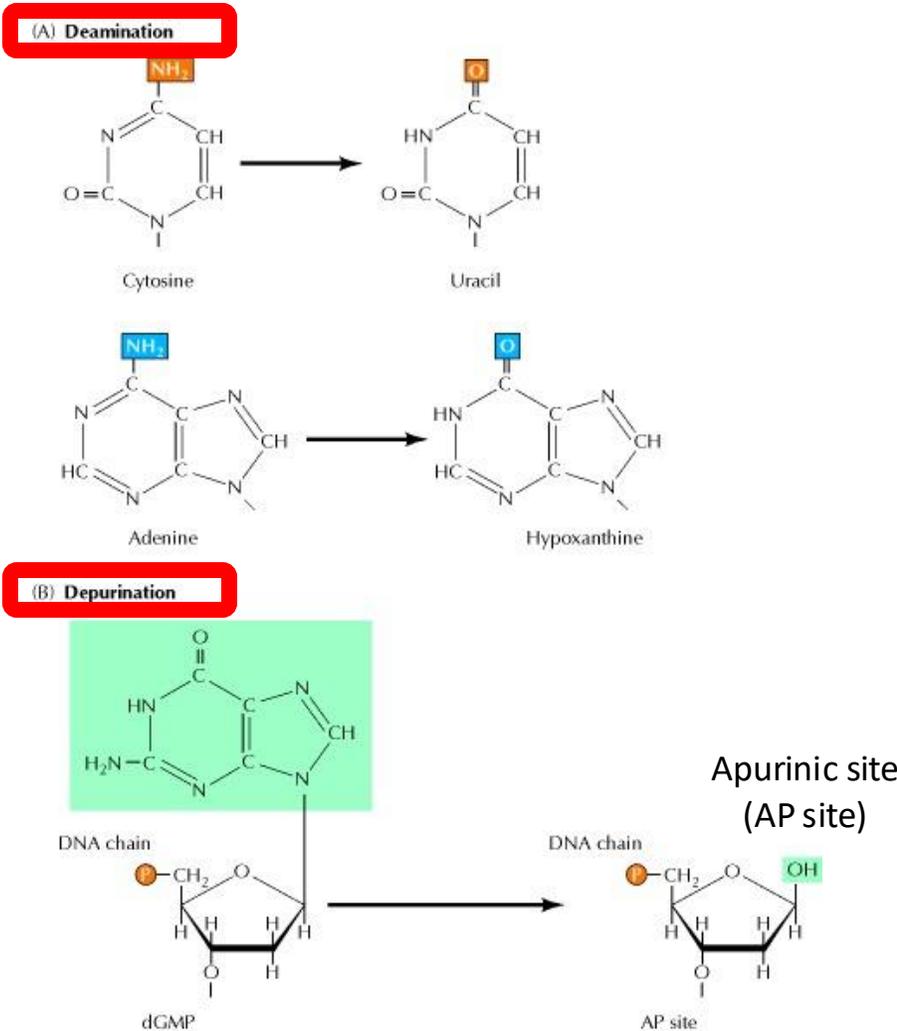
Danni estrinseci

- **Radiazioni UV**: distorsione doppia elica
- **Radiazioni ionizzanti**: rotture legame fosfodiesterico
- **Composti chimici**: lesioni varie



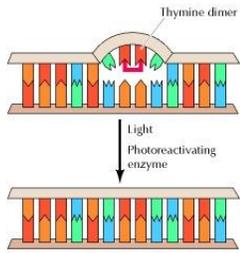
Spontaneous damage to DNA (danni intrinseci)

two major forms of spontaneous DNA damage:

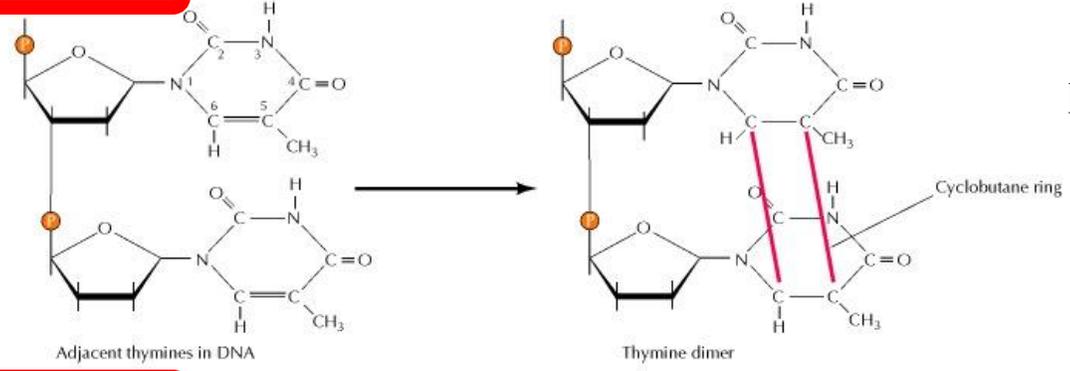


Some DNA damage induced by radiation and chemicals

Direct repair by Photoactivation with Visible light (not in human)



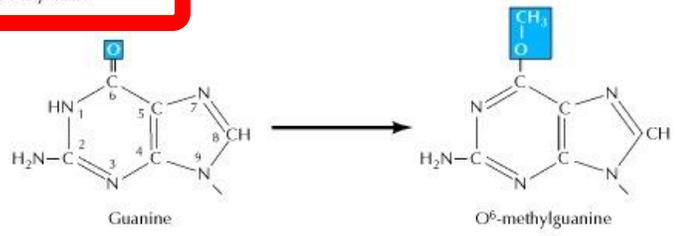
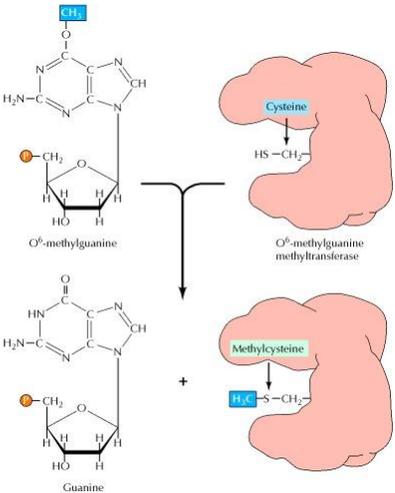
(A) Exposure to UV light



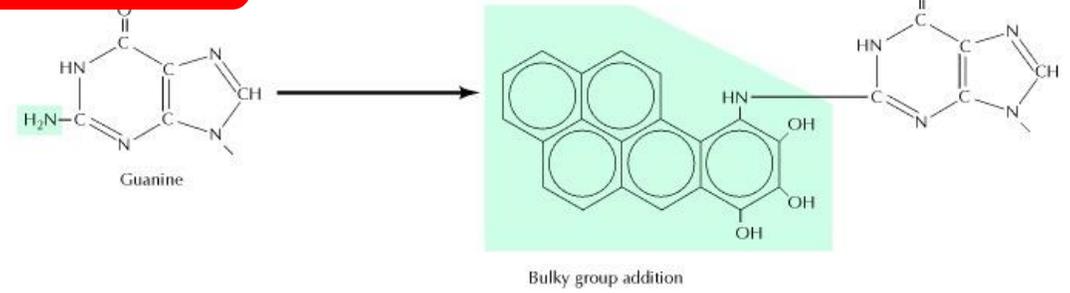
pyrimidine dimers

Direct repair by Photoactivation with specific enzymes

(B) Alkylation



(C) Reaction with carcinogen



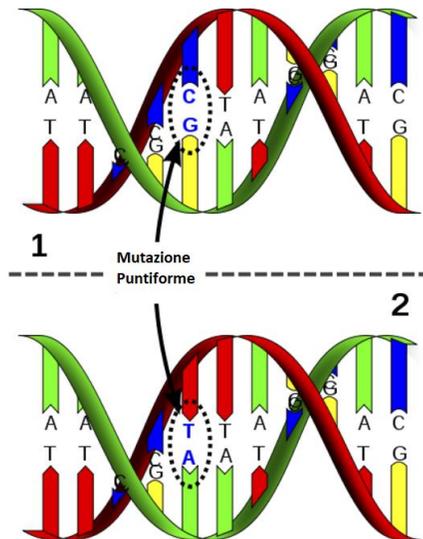
Possibili conseguenze del danno al DNA

1. Mutazioni puntiformi

(cambiamento di un singolo nucleotide)

Transizioni: Purina-> Purina

Trasversioni: Purina-> Pirimidina
Pirimidina-> Purina



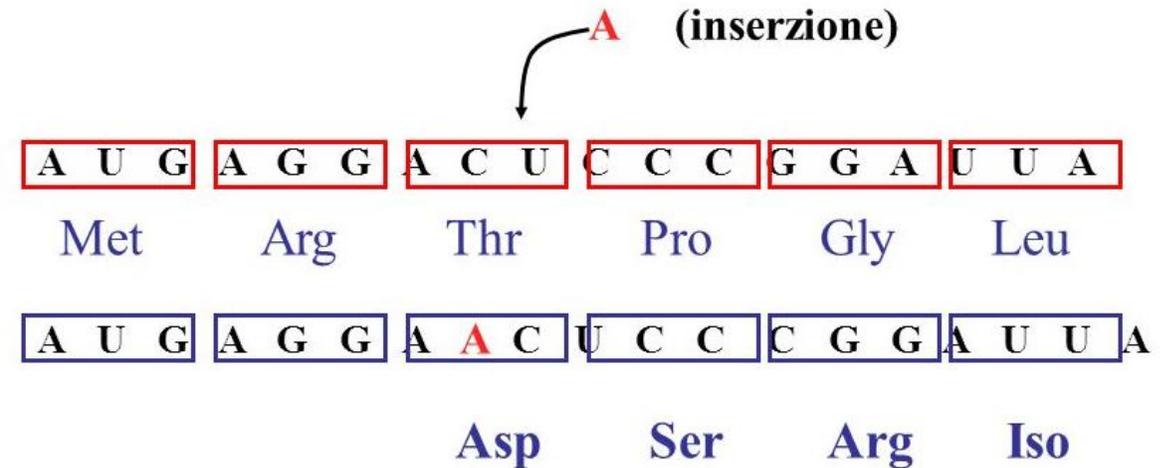
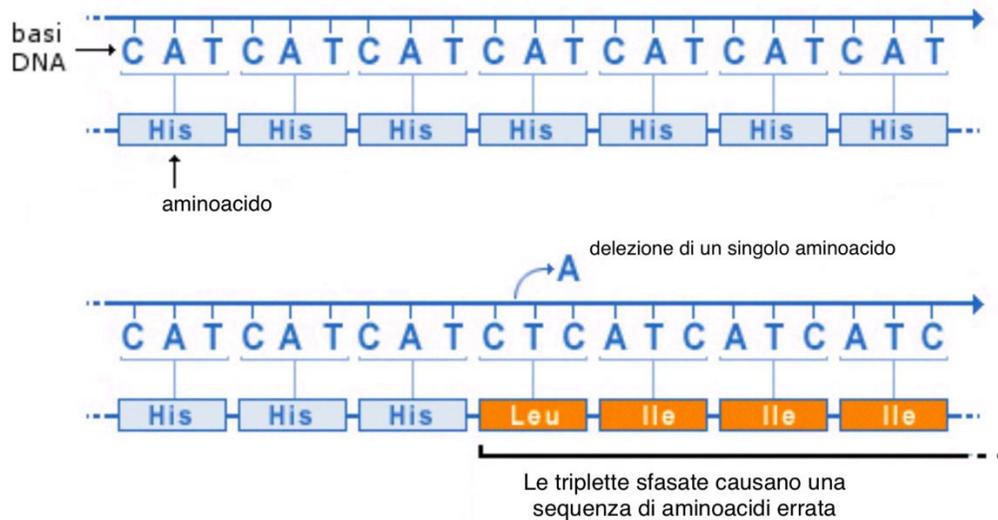
Conseguenze a livello di regioni codificanti?

- Mutazione cambia nucleotide della tripletta ma non comporta cambio amminoacidico (codice degenerato)- **Mutazione silente o sinonima: senza conseguenze**
- Mutazione determina un cambio amminoacidico- **Mutazione missenso: può indurre cambiamenti con effetto nel fenotipo**
- Mutazione porta alla comparsa di un codone di STOP- **Mutazione non senso: comparsa di proteina tronca con funzione compromessa e fenotipo alterato**

Possibili conseguenze del danno al DNA

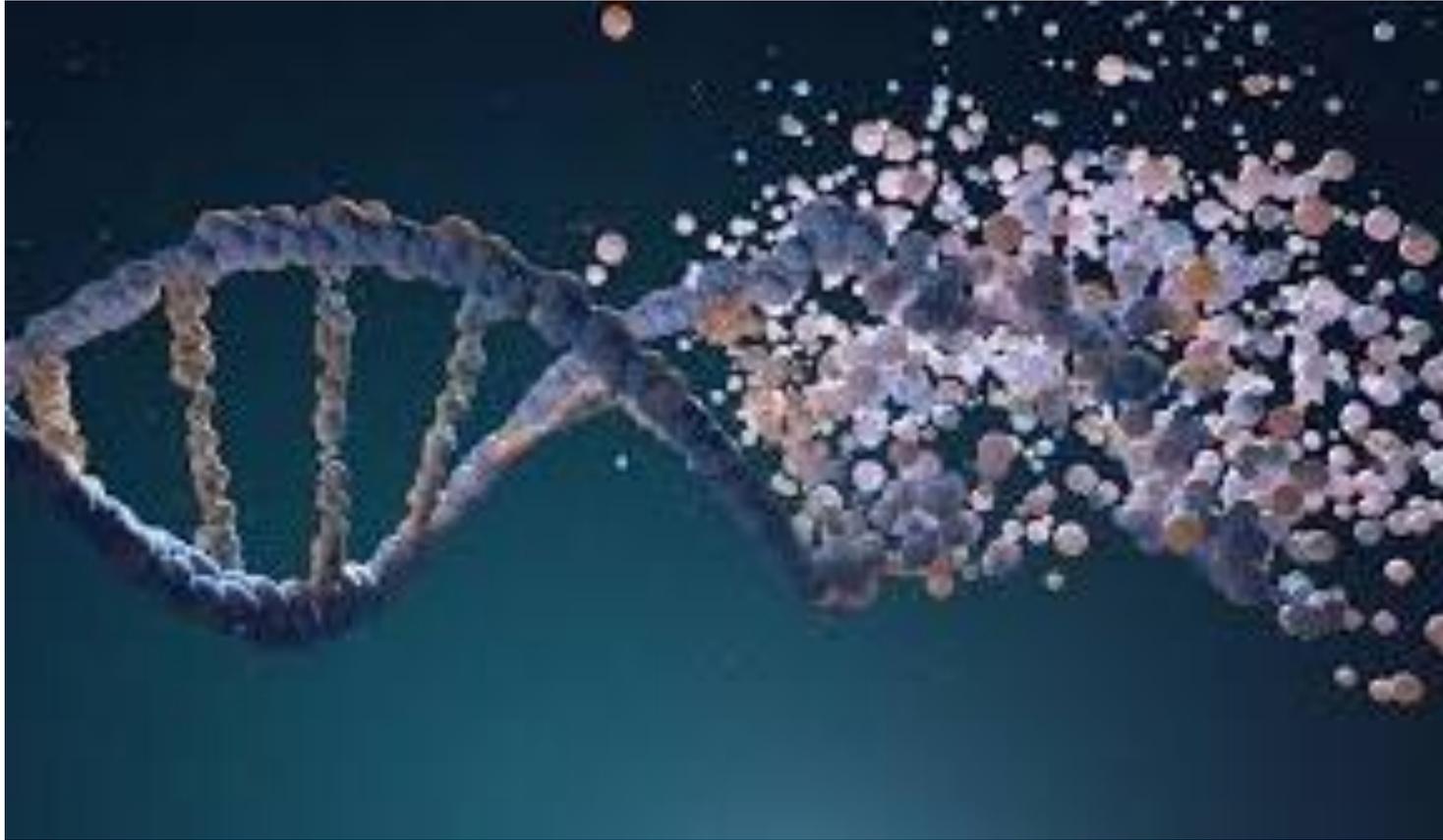
2. Delezioni o Inserzioni

di un singolo nucleotide



Sfasamento del codice di lettura o frameshift,

Cambiando la sequenza amminoacidica a valle della inserzione o delezione e generando un fenotipo mutante



SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

- I **tipi di danno** generati a livello del DNA possono essere **molto diversi**, ed è per questo che tanto procarioti come eucarioti hanno sviluppato **diversi tipi di meccanismi di riparazione**.
- I meccanismi di riparazione sono **abbastanza conservati in procarioti ed eucarioti**
- **Alterazioni nel processo di riparazione** porta ad una maggiore **predisposizione alla comparsa di tumori**

Mechanisms of DNA repair

The mechanisms of DNA repair can be divided into two general classes:

- (1) direct reversal of the chemical reaction responsible for DNA damage, and
- (2) removal of the damaged bases followed by their replacement with newly synthesized DNA. Where DNA repair fails, additional mechanisms have evolved to enable cells to cope with the damage.

SISTEMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

- Riparazione per **escissione delle basi (BER)**
- Riparazione per **escissione di nucleotidi (NER)**
- Riparazione per **errori replicativi (MMR)**
- Meccanismi di **tolleranza al danno (PRR)**
- Riparazione di **rottture su entrambi i filamenti**

Riparazione per escissione delle basi (BER)

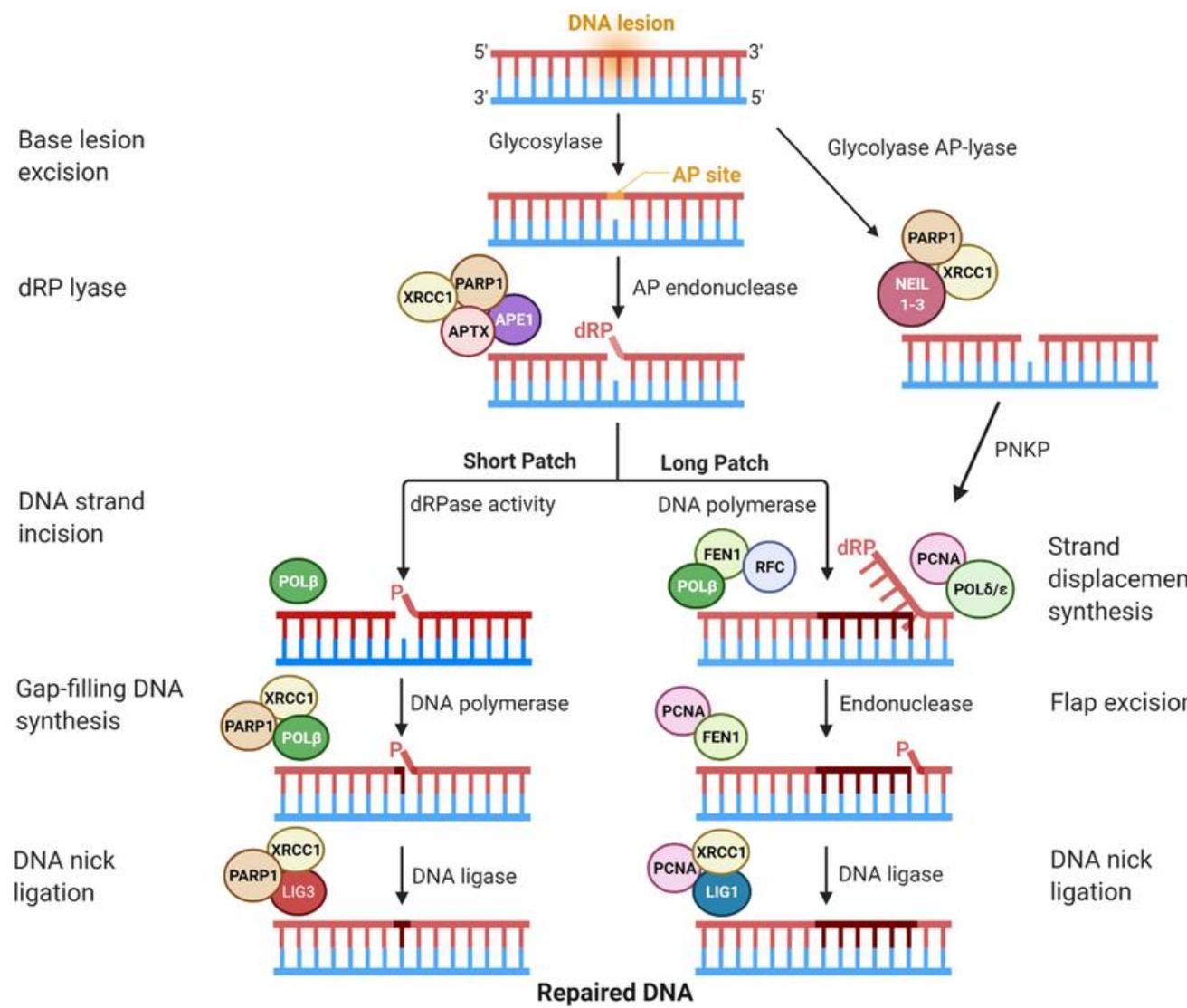
Fino a 20000 lesioni al giorno **causate dal normale metabolismo cellulare (ROS-> metilazioni o deaminazioni a livello basi azotate)**

Dopo il **riconoscimento del danno** da riparare da parte da **DNA glicosilasi**, queste rompono il legame glicosidico fra zucchero e base azotata danneggiata, eliminandola.

Rimane un **sito abasico** sul quale agisce una endonucleasi chiamata **APE1** incidendo il legame fosfodiesterico.

Da qui possono procedere 2 vie diverse:

- **Short-patch BER:** viene rimosso il nucleotide abasico e aggiunto il nucleotide corretto
- **Long-patch BER:** si agisce riparando una regione più lunga di una decina di nucleotidi.



Riparazione per escissione di nucleotidi (NER)

Causate da **agenti chimico-fisici (radiazioni, composti chimici)**

Provocano una **distorsione della molecola DNA**

Due vie diverse che differiscono nella fase di riconoscimento del danno ma convergono nelle fasi finali della riparazione:

1 Global Genome NER (GG-NER):

Proteine specifiche identificano regioni della elica di DNA alterate a causa di appaiamenti irregolari.

2 Transcription-coupled repair NER (TCR-NER):

Proteine specifiche identificano regioni della elica di DNA la cui distorsione causa uno stallo della RNA polimerasi.

Si apre la regione del danno (TFIIH: elicasi)

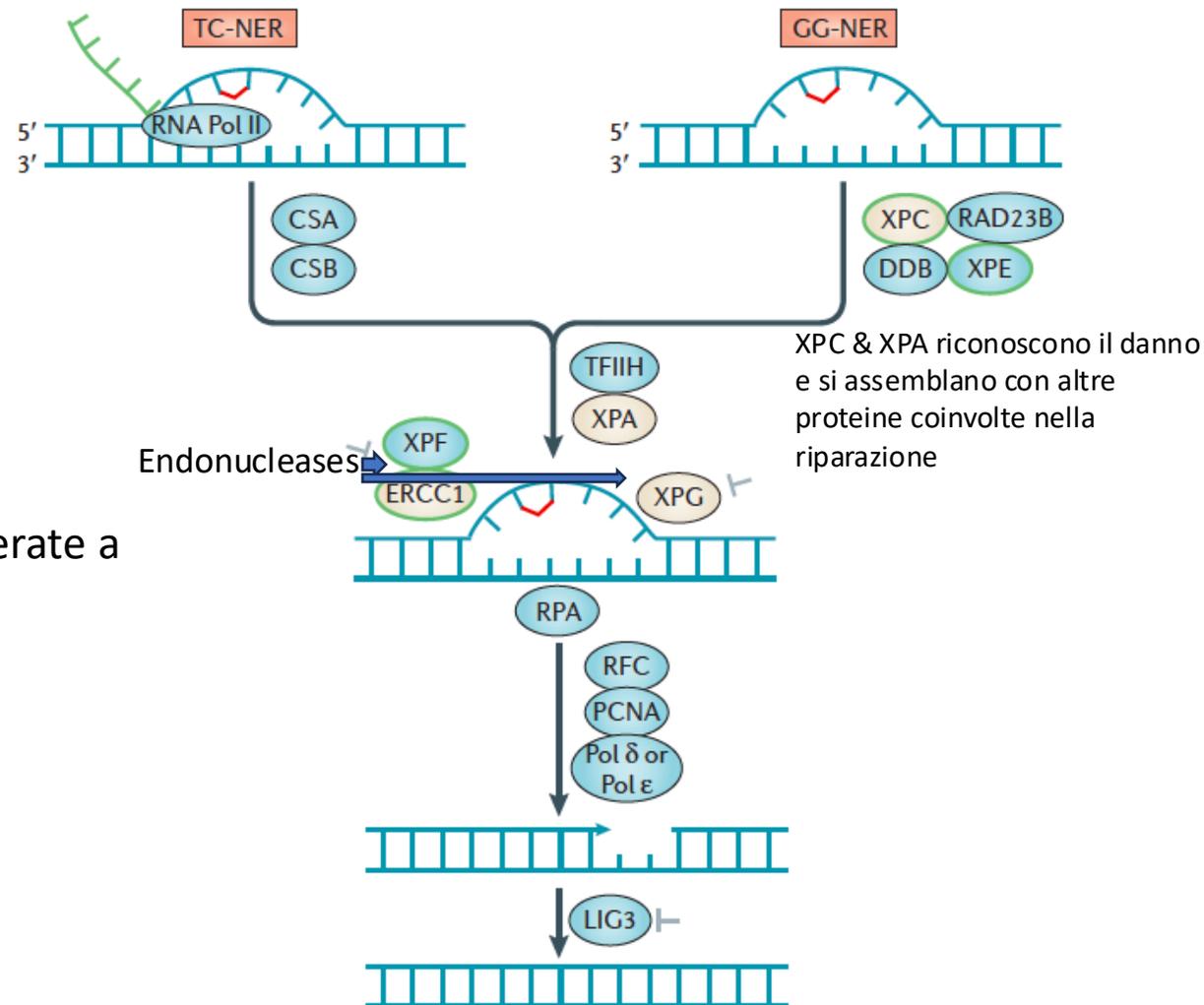
Si conferma la presenza del danno, dove si lega XPA

Regione aperta stabilizzata dal legame con RPA

XPF-ERCC1-XPG sono endonucleasi che tagliano il filamento aperto danneggiato, eliminandolo

Viene generato un nuovo frammento usando gli enzimi coinvolti nella replicazione

LA ligase ricrea il legame fosfodiesterico.



Riparazione per errori replicativi (MMR)

Durante la replicazione possono essere generati diversi tipi di errori:

1. **inserire nucleotide** che non rispetta la complementarità
2. Indurre **inserzioni o delezioni di più di un nucleotide** in regioni di sequenze ripetute (scivolamento)

Questo meccanismo identifica ed elimina «mismatched bases» nel nuovo DNA.

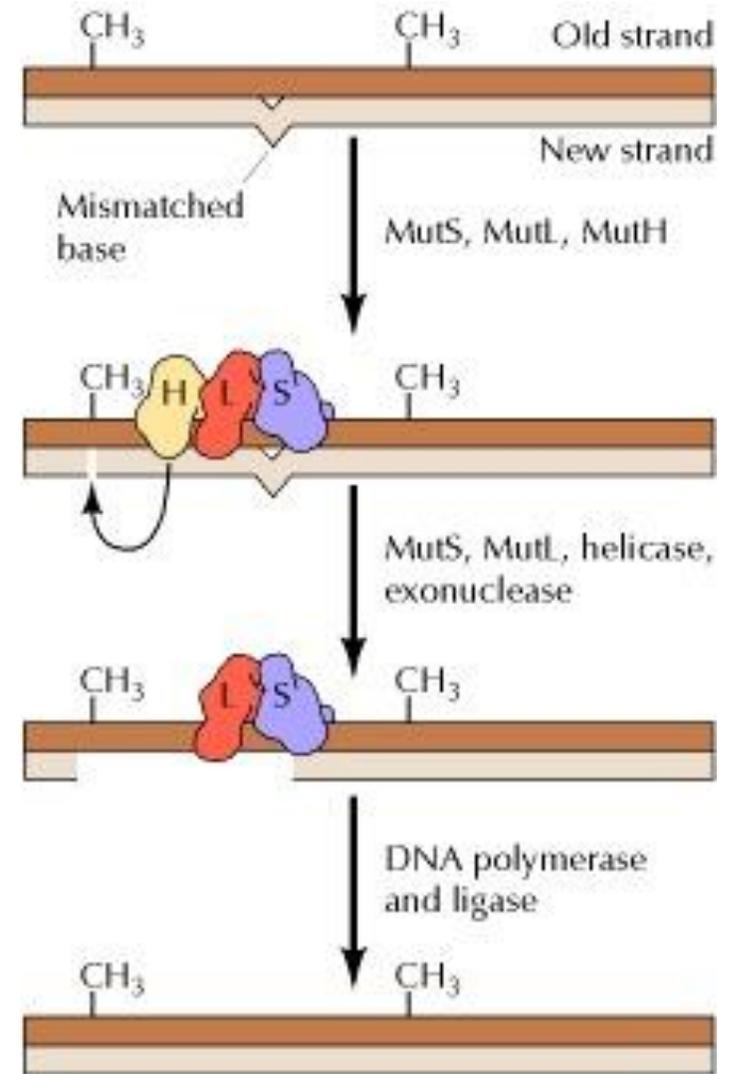
Il macchinario è composto da proteine specifiche che riconoscono il danno e proteine normalmente implicate nella replicazione.

Mut S & Mut L: legano la base non appaiata

MutL attiva **MutH** che taglia e degrada il filamento non modificato opposto al sito di metilazione, e che contiene il mismatch (con aiuto di elicasi e endonucleasi).

Il gap è riparato per una DNA polimerasi e ligasi.

Il filamento da riparare (neosintetizzato) viene riconosciuto per l'assenza iniziale di modificazioni (metilazioni). Su questo filamento agisce il macchinario di riparazione.

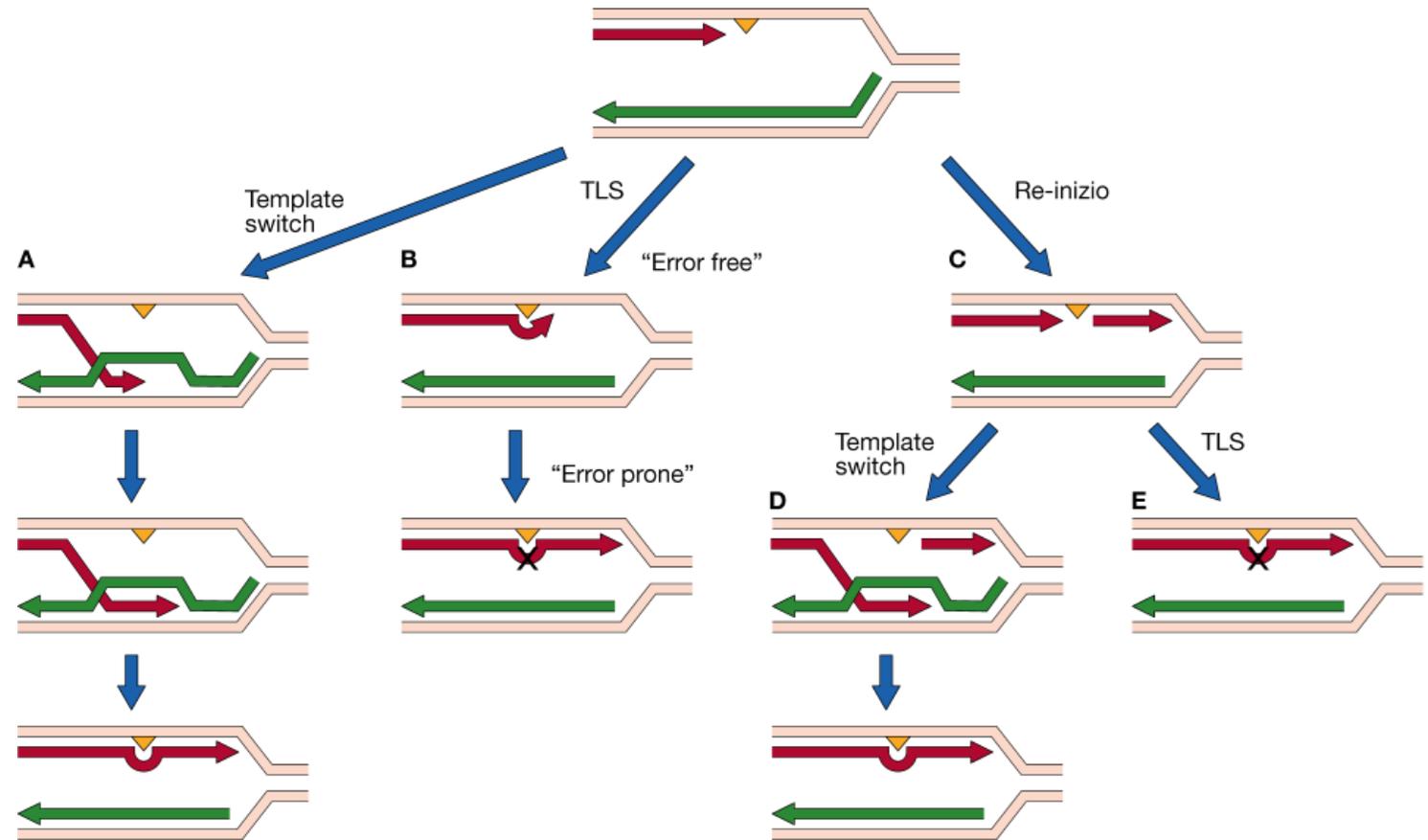


Meccanismi di tolleranza al danno (PRR)

Agisce quando il danno non è stato riparato prima che il filamento venisse replicato.

Se durante la replicazione il danno bloccasse la replicazione sarebbe letale per la cellula, per questo sono stati creati meccanismi che permettono bypassare possibili blocchi

- 1. Template switch:** aggira la lesione copiando il filamento corretto sul cromatide fratello
- 2. Sintesi di translesione:** agiscono delle DNA polimerasi che inseriscono dei nucleotidi alternativi a quelli presente nella lesione che può essere il corretto («error free»), o non corretto («error prone»)
- 3. Re-inizio:** rimane una regione non replicata che potrà successivamente essere replicata per il meccanismo 1 o 2.



Riparazione di rotture su entrambi i filamenti (DSB: double strand breaks)

Causate da **radiazioni ionizzanti** o durante la replicazione se ci sono delle interruzioni.

Danno complesso da riparare che può realizzarsi tramite **2 meccanismi**:

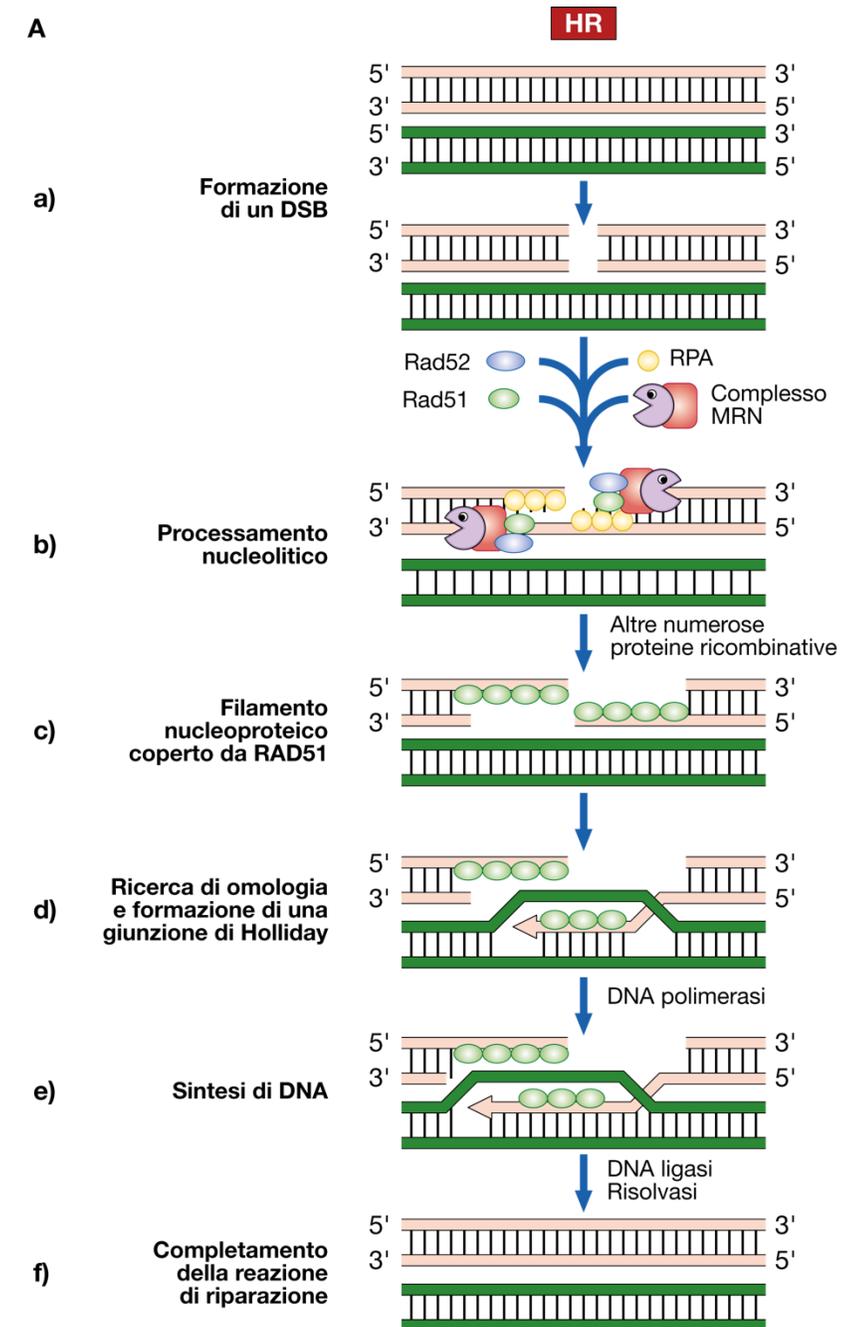
1. Ricombinazione omologa (HR)

Necessita di **proteine specifiche** ed una **molecola di DNA identica** a quella contenente la rottura che servirà da stampo per la riparazione.

Prima si **degradano le estremità 5'** a livello della rottura (**complesso MRN**). Le regioni a **singolo filamento vengono protette** con RPA (eucarioti).

Questa verrà poi sostituita da Rad51 sul singolo filamento, il quale potrà poi **appaiarsi con sequenze omologhe sul cromosoma omologo** formando una **giunzione di Holliday**.

Si procede con la **sintesi del DNA** dopo eliminazione di Rad51, una **risolvasi** elimina gli intermedi di repliche, e una **DNA ligasi** unifica la sequenza.



Riparazione di rotture su entrambi i filamenti (DSB: double strand breaks)

Causate da **radiazioni ionizzanti** o durante la replicazione se ci sono delle interruzioni.

Danno complesso da riparare che può realizzarsi tramite **2 meccanismi**:

2. Non Homologous End Joining (NHEJ)

Richiede meno fattori che la HR e non necessita la presenza di un'altra molecola di DNA contenente la stessa sequenza

Si assemblano una serie di fattori sull'estremità tagliate, dove si assemblerà una kinasi. Dopo di che si procede sempre con la degradazione parziale delle estremità, sintesi e saldatura delle estremità

