

RADIOBIOLOGIA (AA 2010-2011)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
Facoltà di Medicina e Chirurgia
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN FISICA MEDICA

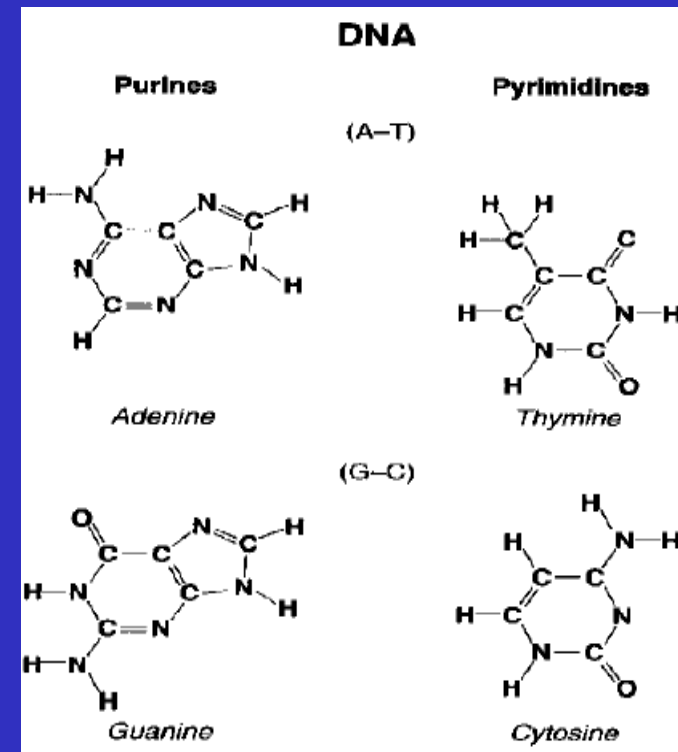
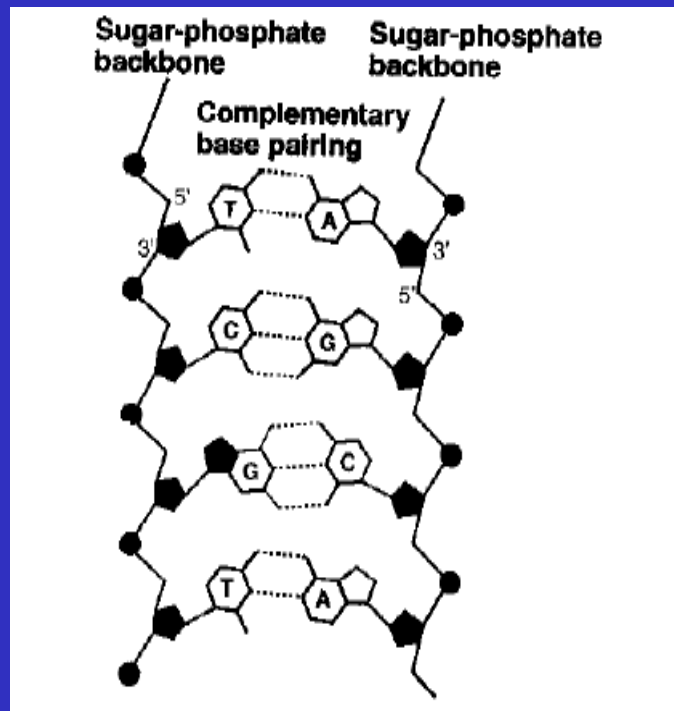
Prof. Mauro Belli

mauro.belli@iss.it mauro.belli@iss.infn.it

mau.belli1@gmail.com

Parte 6
Riparazione delle lesioni al DNA

Struttura della doppia elica del DNA

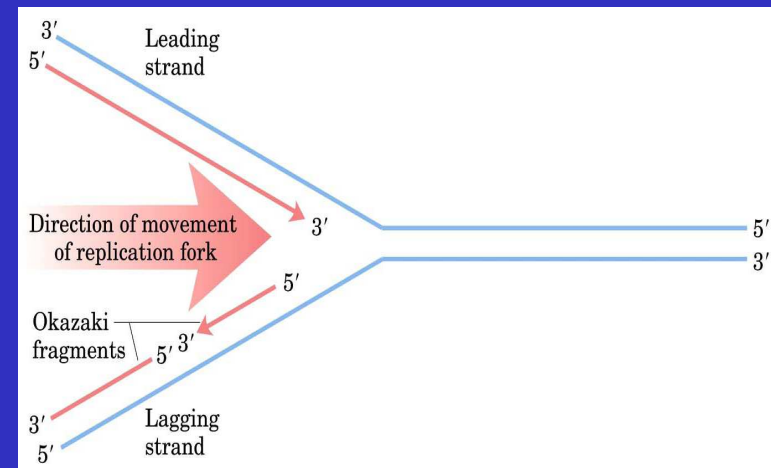
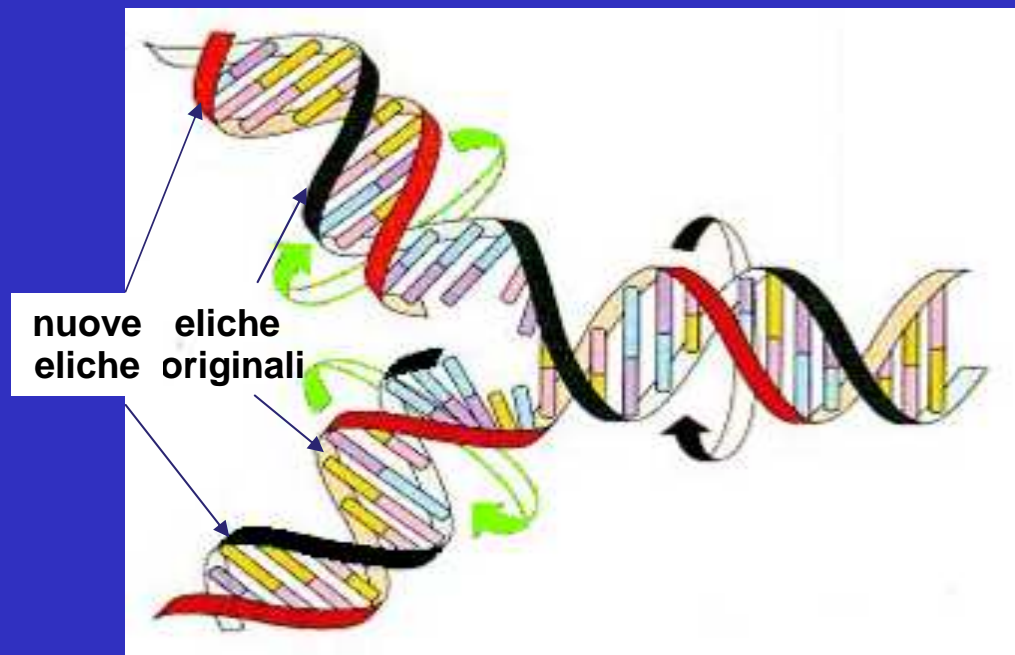


Replicazione del DNA

La replicazione semiconservativa del DNA.

Le due eliche di DNA si srotolano mentre i legami idrogeno delle basi complementari si rompono.

Ciascuna delle due eliche d'origine serve come stampo per la sintesi di due nuove eliche ad esse complementari.



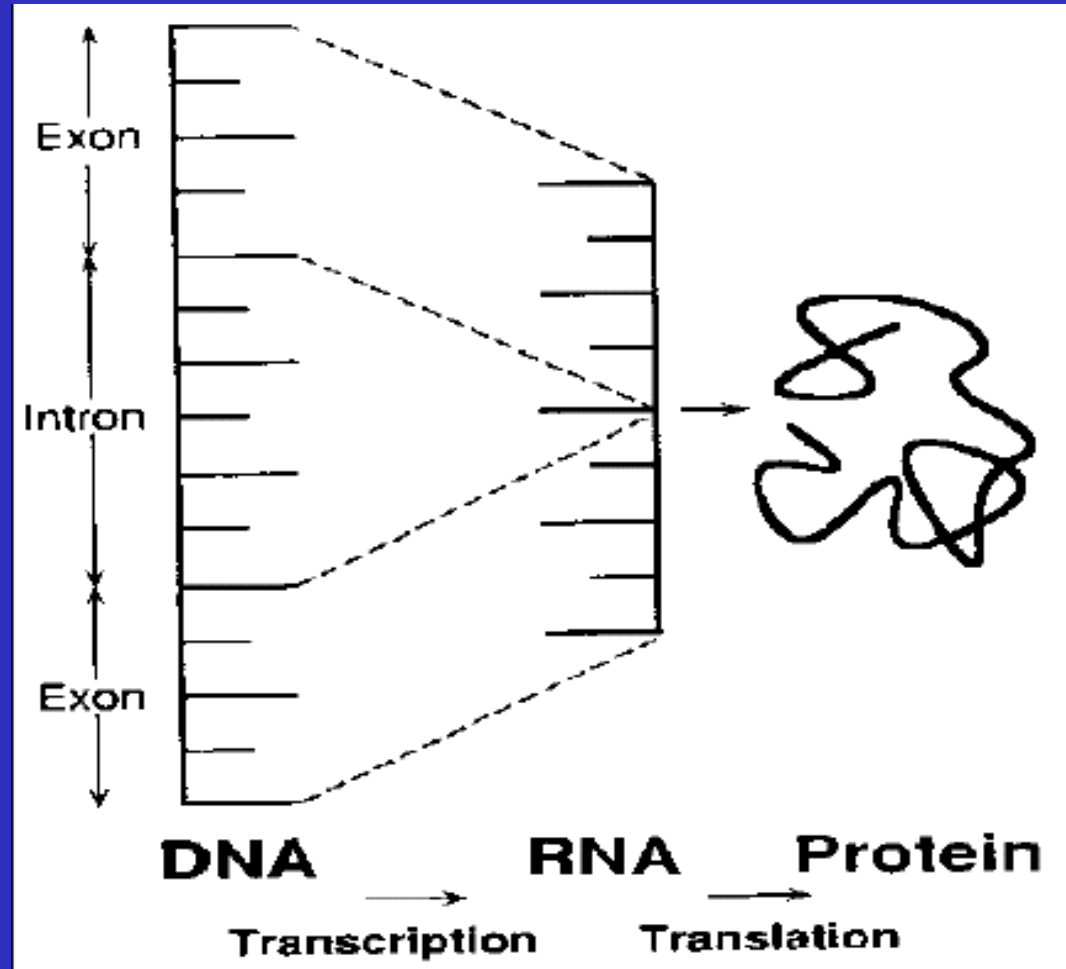
Trascrizione e Traduzione

Transcription: the process of creating a complementary copy of DNA into messenger RNA (mRNA).

Only the coded exons are transcribed, not the uncoded introns

Translation: the process of converting the genetic information of the mRNA into a protein.

The exons containing the genetic code and transcribed by mRNA are translated into the amino acids that build the protein.



La maggior parte del DNA umano non è codificante

Il DNA umano contiene circa 30 mila geni che codificano per circa 100 mila proteine.

Circa il 98.5% del genoma umano è composto di sequenze non codificanti (come quelle corrispondenti a introni e alle regioni spaziatrici tra geni contigui; tuttavia gli introni sono essenziali per il funzionamento del trascritto).

Vi sono specie animali il cui genoma ha una massa di circa un decimo di quello del genoma umano, pur avendo un numero di geni comparabile.

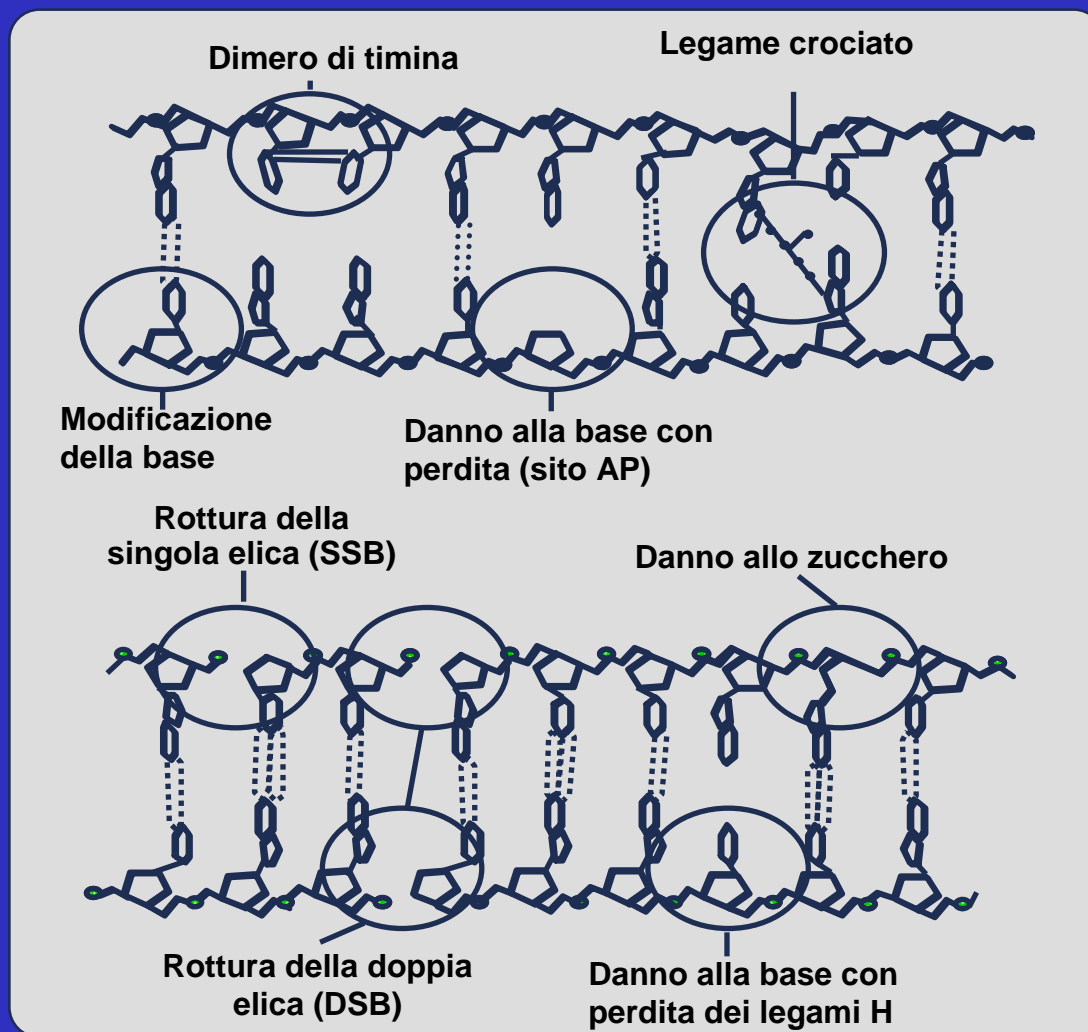
Una parte preponderante del DNA umano non codificante è costituita da elementi ripetuti (*DNA ripetitivo*). La frazione restante è talvolta riferita come *DNA spazzatura (junk DNA)*, il cui ruolo non è chiaro.

Lesioni al DNA

Alcune delle principali lesioni indotte dalle radiazioni sul DNA:

- Rotture della singola elica (SSB)
- Rotture della doppia elica (DSB)
- Danni allo zucchero (in genere producono SSB)
- Danni alle basi (BD): una base si può trasformare in un'altra, può essere incapace di formare legami H (destabilizzazione), può staccarsi dallo zucchero (sito apurinico/apirimidinico, AP)
- Formazione di dimeri di timina: Indotta da radiazioni UV, molto raramente da RI

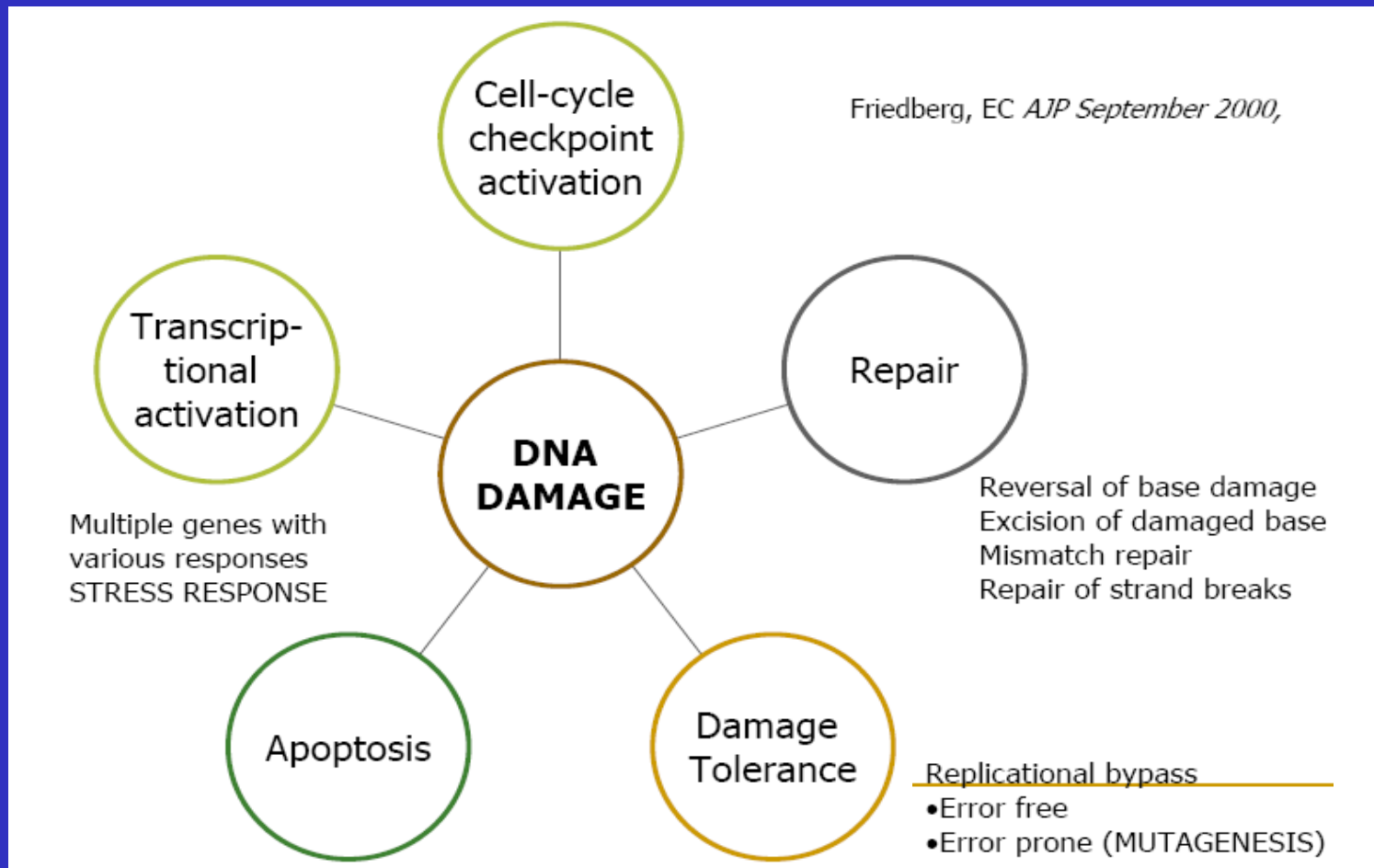
Figura adattata da: Quintiliani e Saporà, G. Ital. Med. Lav. 1981)



Rilevanza biologica delle lesioni al DNA sulla singola e sulla doppia catena

- Le lesioni sulla singola catena del DNA (quali SSB e BD) sono normalmente riparate in modo efficace dal sistema “base excision repair” e **non** sono considerate critiche nell’inattivazione delle cellule indotta da RI
- Al contrario, **rottture vicine sulle due eliche complementari del DNA (DSB)**, risultano più difficili da riparare. Il mancato ricongiungimento delle due estremità del DNA ne fa perdere la continuità. La mancata riparazione **corretta** delle **DSB** è causa in generale di mutazioni e potenzialmente di aberrazioni cromosomiche e morte cellulare. Le DSB sono considerate quindi le **lesioni critiche** del DNA

La risposta biologica alle lesioni sul DNA



Friedberg, *AJP* 2000

Riparazione delle lesioni sul DNA

- Durante la fase **transiente** delle modificazioni al DNA, il danno può essere **riparato attraverso reazioni chimiche** relativamente semplici. Ad esempio, la deidrogenazione ad opera dei radicali dell'acqua può essere “riparata” dalla restituzione dell'H ad opera di composti contenenti gruppi sulfidrilici (protezione restitutiva)
- Il danno sul DNA non riparato chimicamente dà luogo a modificazioni relativamente stabili (**lesioni**), a carico sia della singola che della doppia catena. Queste possono essere **riparate da sistemi enzimatici** cellulari (riparazione enzimatica o biochimica)

Riparazione enzimatica delle lesioni sul DNA

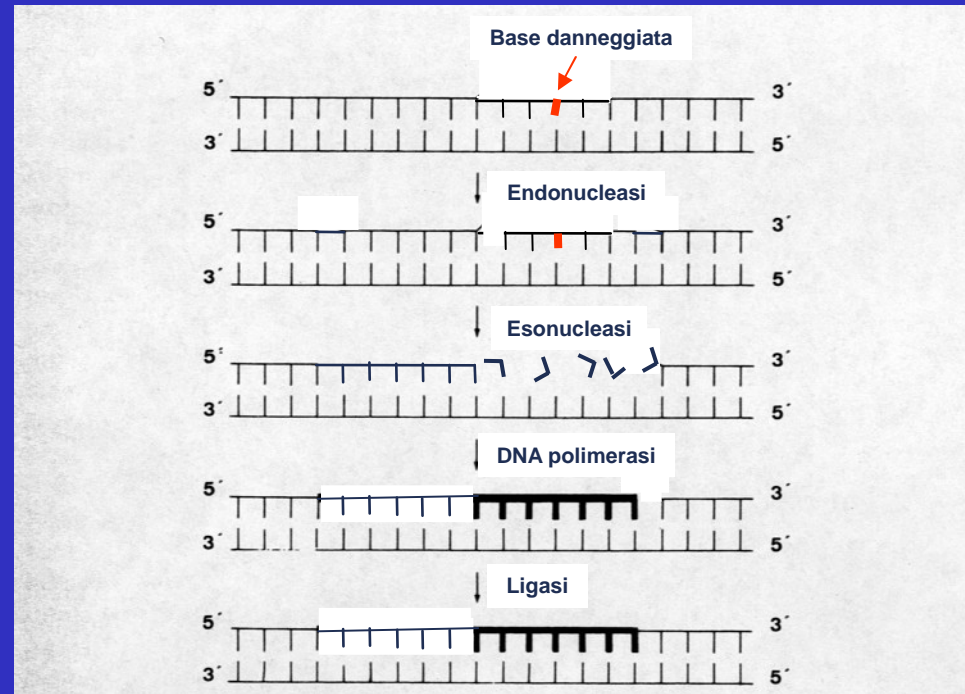
I sistemi riparativi del DNA hanno una **rilevanza generale** (le lesioni possono anche essere endogene o prodotte da agenti diversi dalle radiazioni ionizzanti)

Riparazione enzimatica delle lesioni sul DNA

- **Diversi sistemi riparativi** si occupano dei diversi tipi di lesione
- Perché la riparazione sia **corretta** essa deve **ripristinare** integralmente la **sequenza** di basi originaria e la **conformazione** della cromatina.

Riparazione dei danni alle basi (1)

Riparazione per escissione della **base** danneggiata (**Base Excision Repair, BER**).
Ripara il danno che coinvolge un singolo nucleotide



Endonucleasi – riconoscimento del danno e incisione della catena in prossimità del danno

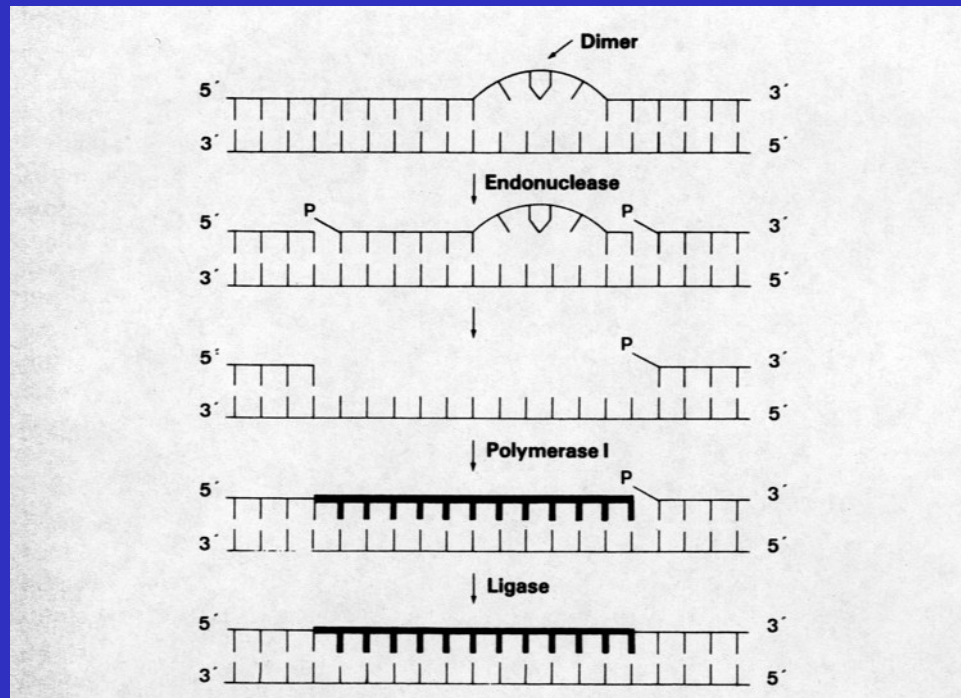
Esonucleasi – escissione del segmento danneggiato

DNA polimerasi – ricostituzione del segmento tramite elica complementare come stampo

Ligasi – ricongiungimento

Riparazione dei danni alle basi (2)

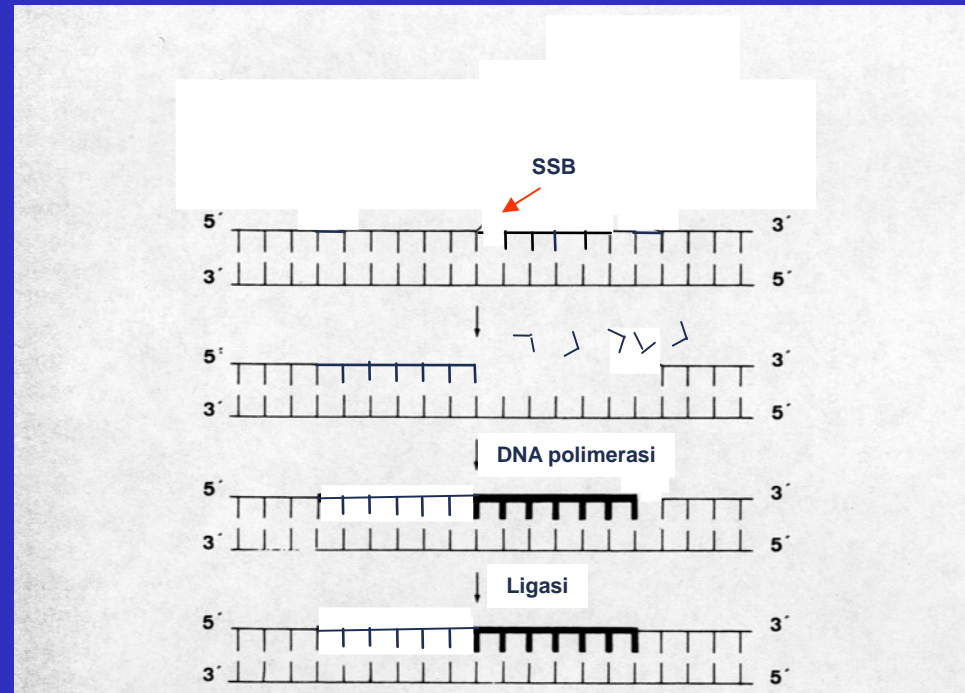
Riparazione per escissione di **nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, NER)**.
Ripara un danno che coinvolge vari nucleotidi con estesa distorsione dell'elica
(ad es. dimeri di timina indotti da UV)



Endonucleasi – riconoscimento del danno e incisione della catena ai due lati
DNA polimerasi – ricostituzione del segmento tramite elica complementare come stampo
Ligasi – ricongiungimento

Riparazione delle SSB

Riparazione per escissione



Esonucleasi – escissione del segmento danneggiato

DNA polimerasi – ricostituzione del segmento tramite elica complementare come stampo

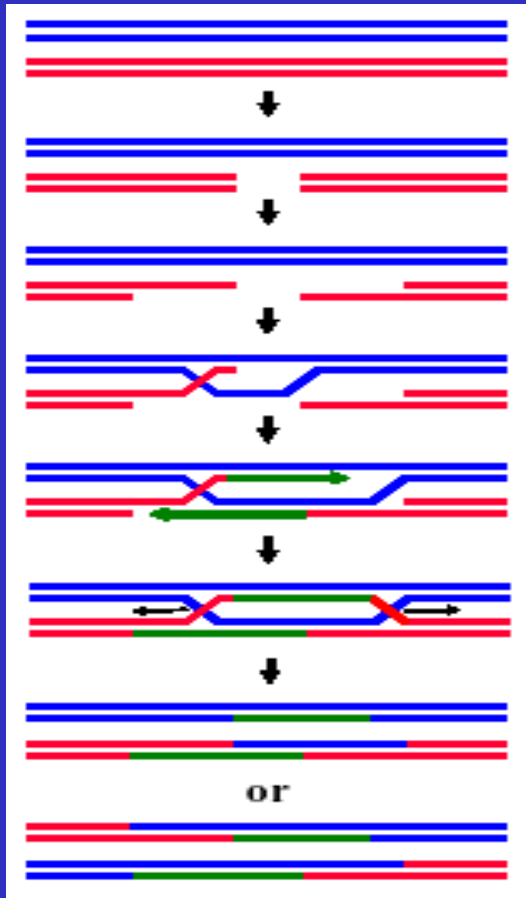
Ligasi – ricongiungimento

La riparazione delle DSB negli eucarioti

Nelle cellule eucariote sono state evidenziate due vie di riparazione fondamentali per le doppie rotture:

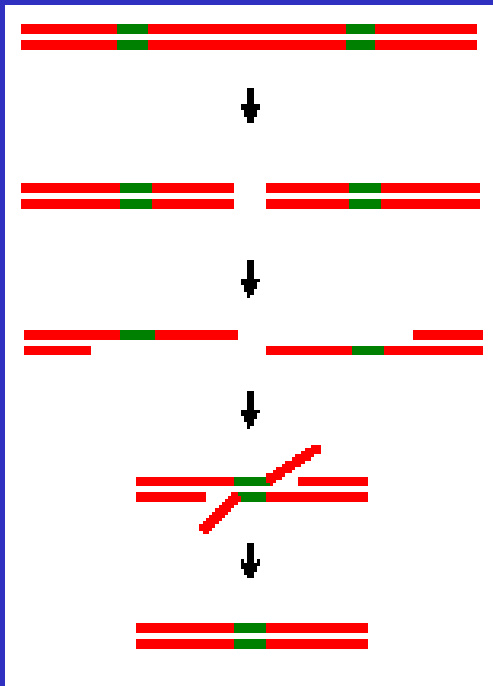
- la riparazione per ricongiungimento non omologo (**Non Homologous End Joining, NHEJ**), che sembra essere predominante nella fase G1 e nella fase S precoce del ciclo cellulare.
- la riparazione per ricombinazione omologa (**Homologous Recombination Repair, HR**), che sembra essere predominante nella fase S e nella tarda fase G2.

Homologous Recombination, HR: a schematic model



In this model, red and blue dsDNA represent homologous sequence. At the DSB site, dsDNA (shown in red) is exonucleolytically processed to form 3 ssDNA tails, which invade homologous intact sequences (shown in blue). DNA strand exchange follows and generates a joint molecule between damaged and undamaged duplex DNAs. Sequence information that is missing at the DSB site is restored by DNA synthesis (resynthesized DNA is shown in green). The interlinked molecules are then processed by branch migration (indicated by right and left arrows), Holliday junction resolution and DNA ligation.

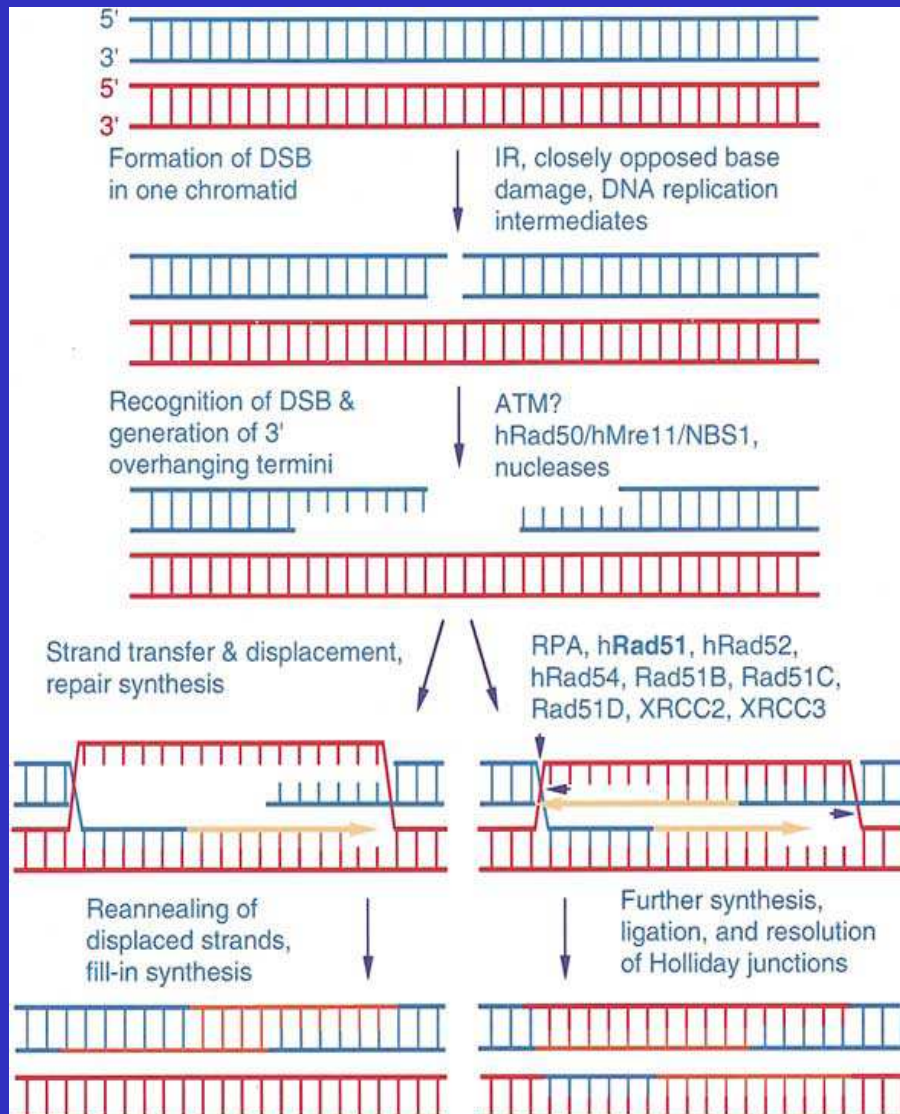
Single Strand Annealing, SSA: a schematic model



Single-strand annealing.

At the DSB site, 3' ssDNA tails, consisting of direct repeats (shown in green), are generated. They are aligned and the intervening sequences as well as protruding 3' ends are removed.

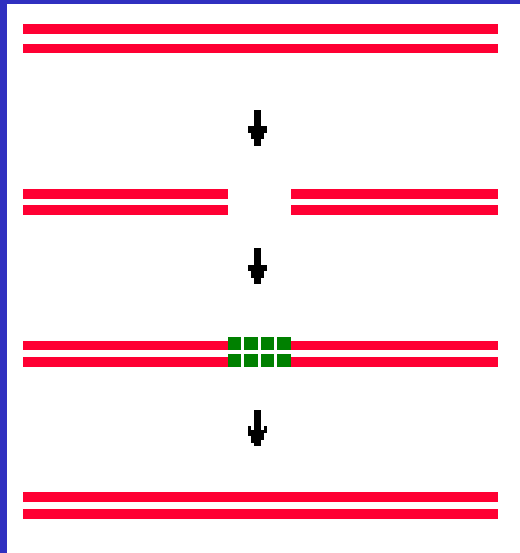
Homologous Recombination, HR



*Larry H. Thompsona, David Schild.
Homologous recombinational repair of DNA
ensures mammalian chromosome stability.
Mutation Research 477 (2001) 131–153*

Fig. 1. Sequence of events during homologous recombination repair of a DSB. The proteins that initially recognize DSBs and recruit the recombination proteins have not been defined, nor have the particular polymerases, ligases, and nucleases. The right-hand pathway at the bottom depicts classical reciprocal exchange involving the resolution of Holliday junctions to produce repair patches in both chromatids (shown by horizontal arrows). Resolving a Holliday junction in the opposite orientation (vertical arrowhead) to that shown will yield a crossover product, which will result in a cytologically-visible sister-chromatid exchange. However, reciprocal-exchange products were not observed during gene conversion between sister chromatids [39], suggesting that the major pathway of DSB repair in mammalian cells involves synthesis-dependent strand annealing [15,171] as shown on the left. In this case, all newly synthesized DNA resides in the initially damaged chromatid.

Non-homologous end-joining, NHEJ: a schematic model



Following DSB formation, broken DNA ends are processed to yield appropriate substrates for direct ligation. No homology is necessary for DSB repair by non-homologous end-joining. Breaks can be joined accurately, but more often, small insertions or deletions are created.

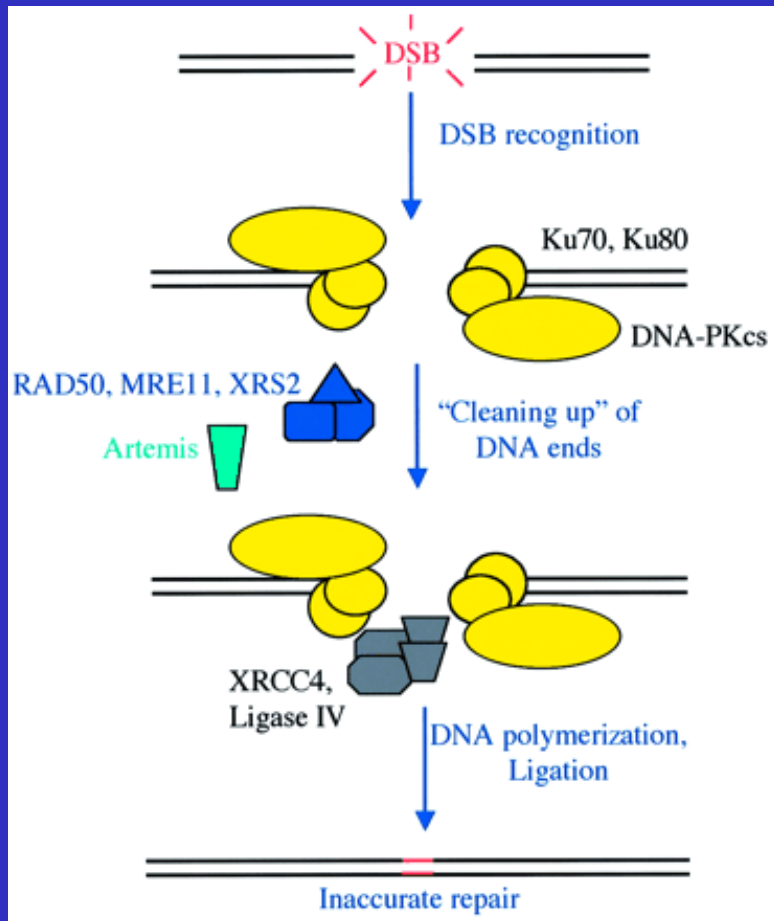
Riparazione NHEJ

Model for mammalian NHEJ.

In mammalian cells, induction of a double-strand break (DSB) results in the recruitment of the Ku heterodimer to the lesion site to bind the free DNA ends.

This is followed by the recruitment of the catalytic subunit of DNA protein kinase (DNA-PKcs) and Artemis, and the phosphorylation of Artemis by DNA-PK. Protein-protein interactions between the DNA-PKcs molecules bridges the DNA ends. Assembly of DNA-PK results in the recruitment of DNA Ligase IV and its associated factor, XRCC4.

Polynucleotide kinase (PNK) physically interacts with XRCC4 and is also localized to break sites. Processing by Artemis and probably other factors, together with gap-filling by an X family DNA polymerase, allows DNA Ligase IV to seal the nick and repair the break.



Ricongiungimento delle DSB e riparazione fedele

Perché la riparazione sia **corretta** essa deve **ripristinare** integralmente

- la **sequenza** di basi originaria e
- la **conformazione** della cromatina.

La riparazione fedele delle DSB negli eucarioti: il sistema HR

Il meccanismo di riparazione per ricombinazione omologa (HR) è usato in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA si sta replicando o ha completato la duplicazione. Ciò permette ad un cromosoma danneggiato di essere riparato con l'impiego, come stampo, di un cromatide fratello, come una copia identica che è, per di più, ordinatamente appaiata alla regione danneggiata.

La riparazione per ricombinazione richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo per la riparazione di una rottura. Il macchinario enzimatico responsabile per questo processo è praticamente identico al macchinario responsabile del “crossingover” nelle cellule germinali durante la meiosi.

Tuttavia, poiché molti geni nel genoma umano sono presenti in copie multiple fornendo diverse possibili fonti di sequenze identiche, la riparazione per ricombinazione che si basa su queste copie come stampi reciproci potrebbe portare a riarrangiamenti cromosomici, tipicamente traslocazioni cromosomiche.

La riparazione fedele delle DSB negli eucarioti: il sistema NHEJ

Il ricongiungimento non omologo (Non-Homologous End-Joining, NHEJ) può verificarsi a tutti gli stadi del ciclo cellulare, ma nelle cellule di mammifero è il principale meccanismo fino a quando la replicazione del DNA non rende possibile la riparazione per ricombinazione con impiego del cromatide fratello come stampo.

Il NHEJ riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo. Tuttavia frequentemente esso produce piccole delezioni oppure inserzioni a causa delle perdite di sequenza e quindi tale riparo è in genere mutagenico.

Poichè la grande maggioranza del genoma negli umani e negli altri organismi pluricellulari è fatta di DNA che non contiene geni, il cosiddetto "DNA spazzatura" (junk DNA), la riparazione NHEJ potrebbe non avere importanti conseguenze mutageniche.

Il macchinario enzimatico usato per il NHEJ è anche utilizzato nei linfociti B per riunire rotture generate durante la ricombinazione V(D)J, passo cruciale nella produzione della diversità degli anticorpi da parte del sistema immunitario.

I sistemi di riparazione del DNA hanno un significato generale

Il DNA è il principale bersaglio delle radiazioni ionizzanti di altri agenti fisici (ad es. radiazioni UV) e chimici (ad es. mutageni ambientali, farmaci). Inoltre, si è calcolato che in una singola cellula vengono prodotti quotidianamente circa 1000 lesioni generati dal metabolismo ossidativo della cellula (fattori endogeni) e dall'azione di agenti fisici e chimici esogeni.

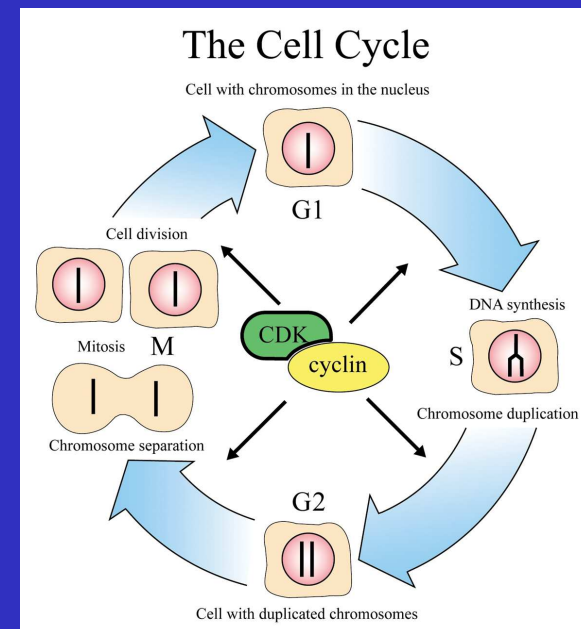
Ciononostante in generale le cellule mostrano una elevata stabilità genomica. Al mantenimento dell'integrità genomica provvede un certo numero di sistemi enzimatici in grado di riconoscere e riparare diversi tipi di modificazioni chimiche. Questi sistemi comprendono enzimi antiossidanti (ad es. la superossido dismutasi e la catalasi), ed enzimi deputati alla riparazione delle lesioni sul DNA.

L'importanza della riparazione del DNA è evidenziata dall'esistenza di patologie umane collegate alla mancanza di alcune di queste vie di riparazione.

Riparazione e ciclo cellulare

La cellula deve coordinare la riparazione con gli altri processi che avvengono durante il ciclo cellulare, in particolare con la replicazione e la trascrizione. Sia la replicazione del DNA che la segregazione cromosomica devono essere ultimate prima della divisione cellulare.

Nella cellula vi sono sistemi di controllo che possono rilevare errori ed arrestare il ciclo cellulare all'inizio della fase S o della fase M. In tal modo i sistemi riparativi cellulari possono agire per tentare di riparare il danno e consentire alla cellula di continuare a replicarsi. In presenza di livelli critici di danno del DNA, invece, si innesca in genere il meccanismo di morte programmata e le cellule vanno incontro ad apoptosi.



The conventional paradigm of radiobiology (take home message)

