

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 2

Danni al DNA

Il DNA è una molecola molto stabile, a differenza dell'RNA. Nonostante la sua stabilità, la molecola di DNA può essere danneggiata da agenti *endogeni* ed *esogeni*. Questi sono gli agenti mutageni.

Ci sono molti eventi che possono danneggiare il DNA, come la scorretta incorporazione di dNTP, la errata incorporazione di rNTP, eventi di Deaminazione e Depurinazione. Agenti alchilanti e radiazioni ionizzanti causano danni al DNA. Anche errori nella forcella di replicazione possono provocare la rottura di uno o entrambi i filamenti di DNA.

Ci sono diverse proteine che rilevano le lesioni al DNA ed attivano apposite vie di riparazione del DNA. Parleremo di meccanismi di riparazione che sfruttano i meccanismi di ricombinazione del DNA (homologous recombination e non-homologous end joining).

Danni e mutazioni

Danni e mutazioni al DNA sono eventi diversi. Il danno al DNA è una modificazione della struttura molecolare del DNA. Le mutazioni sono cambiamenti ereditabili nella sequenza del DNA. Un organismo con una o più mutazioni è detto mutante.

Quando avvengono danni al DNA, la cellula ha dei meccanismi per riparare le lesioni. Se i danni al DNA non vengono riparati questi possono trasformarsi in mutazioni. Quando si ha la mutazione nel genoma, la cellula non ha nessun meccanismo per ripararla.

DNA repair

Il meccanismo di repair comprende tutti i meccanismi cellulari che riparano le lesioni al DNA. La traduzione è **riparazione del DNA**, non *riparo!!!*

Fonti di Danno al DNA

Fonti di danno Endogene

Mismatch

Una fonte di danni endogeni al DNA è data dallo stesso meccanismo di replicazione del DNA. La sintesi del filamento complementare a partire dal filamento stampo è eseguita dalla DNA polimerasi. La DNA polimerasi può effettuare errori nell'inserimento delle basi complementari, detti errori di **mismatch**.

Queste sono lesioni al DNA.

Deaminazione delle basi

È possibile che le basi *citrosina*, *adenina* e *guanina* subiscano reazioni di deaminazione. Questa è una reazione di perdita del gruppo amminico, che avviene ad esempio nella *citrosina* che in seguito a deaminazione si trasforma in *uracile*.

La perdita del gruppo amminico può avvenire in maniera spontanea nella cellula.

Perdita di basi

Un'altra lesione che può avvenire in modo spontaneo è la perdita della base azotata, con l'idrolisi del legame N-glicosidico che lega purine o pirimidine allo scheletro di desossi ribosio del DNA, che rimane intatto.

Si genera in questo modo un sito apurinico o apirimidinico.

Danno ossidativo

Il danno ossidativo è causato dai ROS, che attaccano le basi. La guanina ad esempio è soggetta ad ossidazione da ROS, e diventa 8-oxo Guanina.

Incorporazione di analoghi delle basi

Ci sono molecole che possono essere incorporate in maniera spontanea nella sintesi della molecola di DNA in quanto analoghe alle basi azotate.

Ad esempio il 5-bromouracile è un analogo della timina, che può venire incorporato al posto di quest'ultima.

Fonti di danno esogene

Ci sono diversi agenti esogeni che danneggiano il DNA.

Agenti idrossilanti

Gli agenti idrossilanti sono molecole mutagene, perché modificano la molecola di DNA aggiungendo un gruppo OH ad una base azotata. Uno di questi è l'*idrossilammina*.

L'aggiunta di un gruppo OH alla citosina genera *idrossi-citosina*, che è in grado di appaiarsi alla adenina invece che alla guanina.

Agenti alchilanti

Agenti alchilanti sono il *metil metan sulfonato* o l'*etil metan sulfonato*. Questi determinano l'alchilazione delle basi. Ad esempio l'etil metan sulfonato è in grado di aggiungere un gruppo etilico alla guanina, che diventa O-6-etilguanina ed è in grado di appaiarsi con la timina, invece della citosina.

Agenti intercalanti

Si intercalano nella doppia elica di DNA, come la proflavina o il bromuro di etidio.

Radiazioni ionizzanti

Le radiazioni ionizzanti causano danni alla molecola di DNA, causando rotture della doppia elica del DNA. Possono anche causare gap apurinici. Queste sono tutte lesioni del DNA.

Tra le radiazioni ionizzanti troviamo raggi gamma, raggi x e raggi UV.

Raggi UV

Tra i raggi UV, quelli che arrivano sulla terra sono di UV-A (315-400nm) e gli UV-B (280-315nm). Gli UV-C (100-280nm) sono i più pericolosi, ma sono schermati dallo strato di ozono.

I raggi UV provocano la formazione di legami covalenti tra timine adiacenti (dimeri di timina).

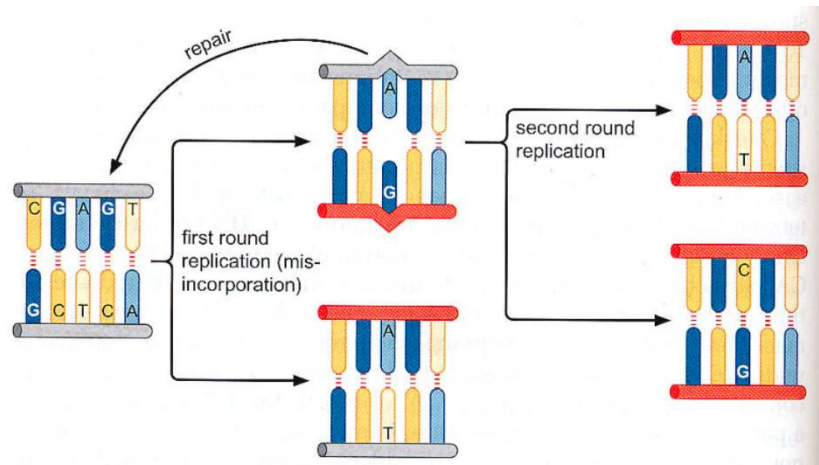
I raggi UV sono molto poco penetranti, colpiscono principalmente la pelle.

Le mutazioni

Le mutazioni sono conseguenti al danno al DNA. Nel caso di un mismatch ad esempio si ha l'inserimento di una base non complementare durante la sintesi del filamento complementare. Questa lesione può essere riparata dalla cellula.

Se il mismatch non viene riparato, nella replicazione successiva la cellula darà luogo ad una mutazione su una delle due catene di neosintesi, quella complementare al sito del mismatch.

La cellula a questo punto non ha nessun meccanismo per riconoscere la sostituzione della coppia di basi.



Complessità del genoma umano

Il genoma umano è formato da circa 3,2 miliardi di basi, di cui circa 48 milioni codificano per geni e circa 1,2 miliardi per sequenze correlate ai geni, mentre il resto è DNA intergenomico. Questo ad indicare che le mutazioni al DNA non è detto che cadano sempre in DNA codificante per geni, anzi nella maggior parte dei casi colpiranno materiale intergenico.

Danno da idrossilammina

Ipotizziamo che l'idrossilammina abbia idrossilato una citosina. Il danno da idrossilazione non viene riparato ed a questo punto avviene la replicazione. La citosina normalmente si appia alla guanina, ma la citosina

idrossilata si appaia bene alla adenina. Viene quindi inserita l'adenina come base complementare della citosina idrossilata.

Alla replicazione successiva la polimerasi appaierà la adenina precedentemente inserita in maniera errorea ad una timina, dando luogo ad una doppia elica che porta la coppia di basi timina-adenina T:A rispetto all'originale citosina-guanina C:G.

Danno da etilmetan sulfonato

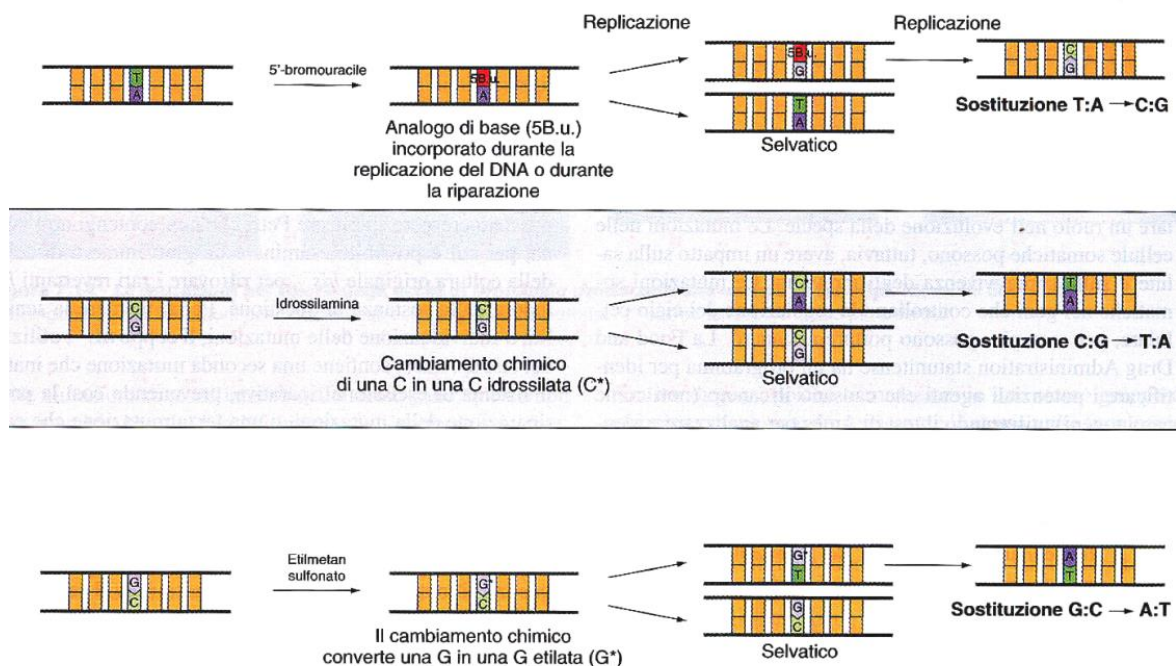
L'etil metan sulfonato può legare un gruppo etilico sulla guanina. La guanina etilata può essere subito riparata da un meccanismo apposito che rimuove il gruppo etilico.

Se non si ha la riparazione, alla replicazione successiva la guanina etilata, che è complementare alla timina, viene appunto accoppiata alla timina dalla DNA polimerasi. Alla replicazione successiva la timina inserita in modo erraneo verrà accoppiata alla adenina, portando da una coppia di basi originali G:C ad una coppia di basi mutata A:T.

Danno da 5 bromouracile

Il 5-bromouracile può venire incorporato al posto della timina. Il 5 bromouracile può essere rimosso da appositi meccanismi di riparazione. Se questo non viene rimosso la DNA polimerasi inserisce la guanina come base complementare al 5 bromouracile.

A questo punto anche se il 5 bromouracile viene rimosso resterà la guanina erroneamente inserita come complementare. Alla successiva replicazione questo dà luogo ad una mutazione sul DNA, con sostituzione di una coppia T:A con una coppia C:G.



Acido nitroso

L'acido nitroso modifica la citosina in uracile, e l'adenina in ipoxantina.

