

# DNA Repair (ROSSO e BLU)

## MUTAZIONE

La frequenza di mutazione è la frequenza con cui si verificano cambiamenti osservabili nelle sequenze di DNA

Si stima che i batteri mostrano una frequenza di mutazione di un cambiamento nucleotidico ogni  $10^9$  nucleotidi per generazione cellulare (*in vivo la replicazione sembra più precisa, negli E. Coli infatti, la frequenza risulta essere di una base errata ogni  $10^4$  nucleotidi per generazione cellulare*)

## I VARI MECCANISMO DI CORREZIONE NUCLEOTIDICA

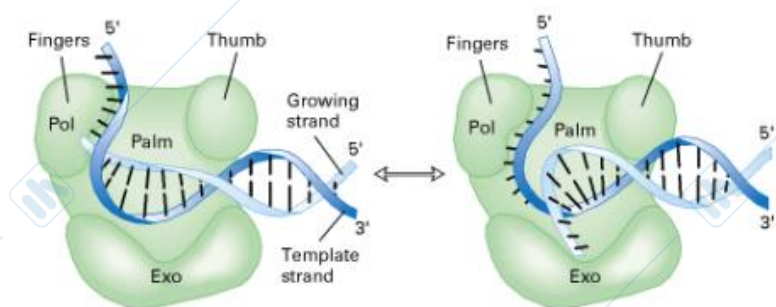
Durante la sintesi del DNA può succedere che si possono formare degli accoppiamenti sbagliati; se la DNA polimerasi non facesse niente per rimediare, il nucleotide sbagliato verrebbe incorporato nella nuova catena di DNA, producendo frequenti mutazioni. Infatti, l'alta fedeltà della replicazione del DNA dipende non solo dall'appaiamento complementare delle basi, ma anche da parecchi meccanismi di correzione che agiscono sequenzialmente per "correggere" qualunque iniziale accoppiamento sbagliato

La maggior parte di questi errori nel DNA sono temporanei perché sono immediatamente corretti da una serie di processi, noti collettivamente come **riparazione del DNA**

Il primo passaggio di correzione è eseguito dalla DNA polimerasi e avviene appena prima dell'aggiunta di un nuovo nucleotide alla catena in crescita. Il nucleotide corretto ha un'affinità maggiore per la polimerasi in movimento rispetto a un nucleotide non corretto, perché soltanto il nucleotide corretto può appaiarsi correttamente con lo stampo. Inoltre, dopo l'attacco del nucleotide, ma prima che il nucleotide venga aggiunto covalentemente alla catena in crescita, l'enzima deve subire un cambiamento conformazionale. Un nucleotide attaccato non correttamente ha maggior probabilità di dissociarsi durante questo passaggio rispetto a un nucleotide corretto. Questo passaggio permette perciò alla polimerasi **un doppio "controllo" dell'esatta geometria di appaiamento delle basi** prima di catalizzare l'aggiunta del nucleotide

(fonte libro ALBERTS pagina 257)

La prima reazione di correzione degli errori, nota come **correzione esonucleolitica**, o **correzione delle bozze** ed entra in funzione nel raro caso in cui il primo step di controllo è stato bypassato da un errore e quindi la DNA polimerasi percepisce una distorsione nella struttura del DNA causando un rallentamento nel processo; il complesso stampo-innesco si allontanerà per avvicinarsi al sito esonucleasico con funzione di **proofreading** (*sito con attività esonucleasica 3'--> 5'*) Il sito esonucleasico elimina il nucleotide errato tramite il taglio del legame fosfodiesterico utilizzando ATP, e permette alla polimerasi di riprendere la sintesi senza che il complesso ternario innesco-stampo-enzima si sia dissociato. In particolare, la DNA polimerasi procede all'indietro rimuovendo nucleotidi, anche quelli correttamente inseriti, finché non ritrova l'affinità per il filamento di DNA e ricomincia così la duplicazione.



*(Il DNA polimerasi non può iniziare una nuova catena polinucleotidica unendo insieme 2 nucleosidi trifosfati, ma hanno bisogno di un'estremità 3'-OH appaiata di un filamento primer su cui aggiungere ulteriori nucleotidi)*

Essendo il primer uno stampo poco efficace, essi vengono eliminati dal proofreading della DNA polimerasi

Una esonucleasi di correzione 3'-5', quindi, taglia via qualunque residuo non appaiato al terminale del primer, continuando finché non sono stati rimossi abbastanza nucleotidi da rigenerare un terminale 3'-OH appaiato che serve da primer per la sintesi di DNA

In particolare, questi enzimi tagliano legami fosfodiesterici tra nucleotidi adiacenti in molecole di acido nucleico con successiva riparazione del DNA (*intervengono quindi sia una ENDONUCLEASI che una ESONUCLEASI*)

### **L'attività esonucleasica può solo correggere errori appena inseriti**

*(Le RNA polimerasi coinvolte nella trascrizione dei geni non necessitano invece di una correzione esonucleolitica efficiente; gli errori nell'RNA non vengono passati alla successiva generazione e l'occasionale molecola difettosa di RNA che viene prodotta non ha significato a lungo termine. Ecco perché le RNA polimerasi sono quindi capaci di iniziare nuove catene polinucleotidiche senza un primer)*

Se l'errore riesce ad oltrepassare il controllo della DNA polimerasi, la natura ha escogitato altre vie multiple per la riparazione del DNA, che usano enzimi diversi che agiscono su tipi diversi di lesione. Possiamo ricordare il danno a singolo filamento che sono riparati da una:

1. **Mismatch Repair (MMR)**, che corregge errori di replicazione e di ricombinazione genetica che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del DNA appena avvenuto
2. **Riparazione per escissione** che elimina le basi anomale dovute a un agente chimico e le sostituisce con basi funzionali. Tra di questi possiamo ricordare
  - a. **Riparazione per escissione di base (Base Excision Repair, o BER)** che ripara il danno che coinvolge un singolo nucleotide
  - b. **Riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, o NER)**, che ripara un danno che coinvolge filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi.

Le rotture del DNA a doppio filamento, invece, sono eventi comuni nelle cellule eucariotiche e ci sono due vie principali per ripararle tramite:

3. **Unione non omologa delle estremità**
4. **Unione omologa delle estremità**

Nei primi tre casi, il danno viene escisso, la sequenza originale di DNA viene ripristinata da una DNA polimerasi che usa il filamento non danneggiato come stampo e la rottura che rimane nella doppia elica viene saldata da una DNA ligasi. In particolare:

1. **Il sistema di riparazione delle basi male appaiate diretta dal filamento (MISMATCH REPAIR /MMR/)**, rivela il potenziale di distorsione nell'elica del DNA che deriva da *un cattivo appaiamento fra coppie di basi non complementari*.

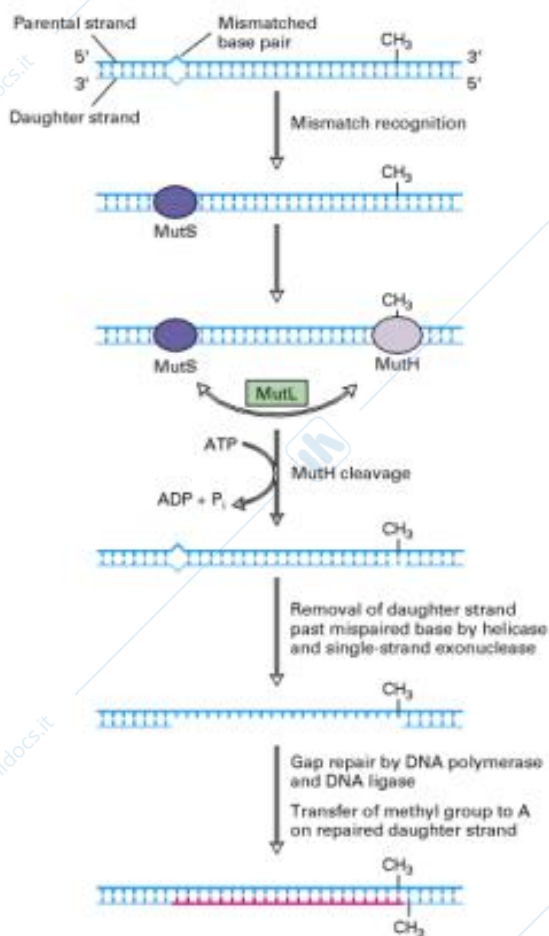
Il sistema di mismatch repair agisce durante il primo ciclo replicativo e va a rimuovere errori di replicazione fatti dalle DNA polimerasi che sfuggono all'attività di proofreading

- Sorvegliare il genoma alla ricerca di errori di appaiamento
- Trovare gli appaiamenti scoperti
- **Identificare quale filamento è da riparare**

- Sostituire il nucleotide scorretto

Ma se il sistema di correzione riconoscesse semplicemente un cattivo appaiamento nel DNA appena replicato e a caso correggesse uno dei due nucleotidi male appaiati, potrebbe "correggerebbe" in modo sbagliato il filamento stampo originale?

Il meccanismo di distinzione del filamento usato dal sistema di riparazione delle basi male appaiate in *E. Coli* (per esempio) dipende dalla metilazione di residui selezionati di A nel DNA. Gruppi metilici vengono aggiunti a tutti i residui di A nella sequenza GATC, ma soltanto un po' di tempo dopo che A è stata incorporata in una catena appena sintetizzata di DNA. Come risultato, le uniche sequenze GATC che non sono ancora state metilate sono nei nuovi filamenti. E ciò fa il modo di riconoscere i vecchi filamenti da quelli nuovi



Ma se il sistema di correzione riconoscesse un cattivo appaiamento nel DNA appena replicato e "correggesse" il filamento stampo originale? Il meccanismo di distinzione del filamento dipende dalla metilazione di residui selezionati di A nel DNA. La metilazione avviene soltanto un po' di tempo dopo che A è stata incorporata. Come risultato, le uniche sequenze di GATC che non sono state ancora metilate sono probabilmente dei nuovi filamenti appena dietro una forcella di replicazione

Nel DNA di *E. Coli* vengono metilati i filamenti figli da un enzima specifico, **DAM metiltransferasi** (in particolare l'adenina della sequenza palindromica GATC) (Una sequenza palindromica è una regione della struttura primaria del DNA costituita da due successioni di basi ripetute ed invertite. Ciò significa che, lette in direzione 5'-3' e in direzione 3'-5' mostrano una perfetta complementarità e risultano palindromo), solo dopo diversi minuti dalla loro sintesi, per riuscire quindi a distinguere chi è il filamento figlio e chi il filamento genitore

Tutto ciò è compiuta da complessi multiproteici come **MutS, MutL e il MutH**

- MutS** (enzima dimerico) riconosce i mismatch e quindi la distorsione che ne deriva; esso si attaccherà al filamento metilato ed inizierà a distorcerlo ulteriormente
- La distorsione andrà ad avvicinare **MutL** che si attiverà dal legame **MutS** – che attiva a sua volta il **MutH** che andrà a creare un nick; in particolare il taglio viene effettuato sul filamento ipometilato in corrispondenza della sequenza GATC più vicina al sito di errore non metilato (si va a legare a tale sequenza quindi, nel filamento di nuova sintesi)
- La 5'-esonucleasi degraderà il DNA in direzione 5'-3' in particolare i nucleotidi successivi fino al sito dell'errore insieme ad un DNA elicasi che aprirà il DNA permettendo anche l'azione della DNA polimerasi e la DNA ligasi
- Il DNA polimerasi riempirà la regione a singolo filamento e la DNA ligasi risalderà il nick

Negli eucarioti invece, il meccanismo per distinguere il filamento appena sintetizzato dallo stampo parentale al sito di una base male appaiata non dipende dalla metilazione del DNA ma dai Nick (*interruzioni presenti, specialmente nei frammenti di Okazaki*) che dirigono e forniscono il segnale al sistema di correzione

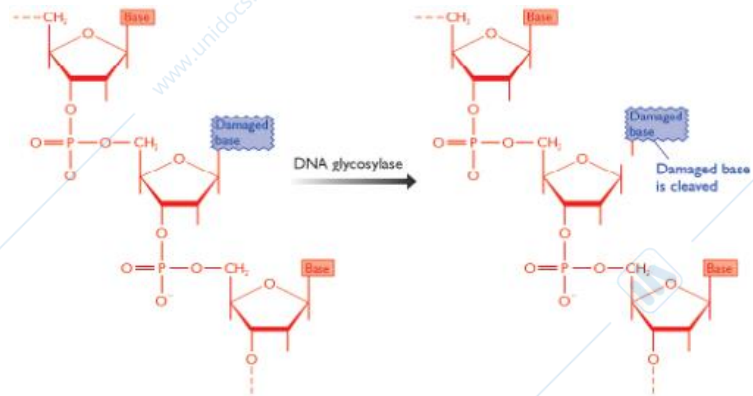
La riparazione delle basi male appaiate dipende da numerosi fattori, fra cui MutS $\alpha$  o MutS $\beta$ , MutL $\alpha$  (*omologhi del MutS e MutL*) (**NO DAM metilasi e non esiste l'omologo MutH**)

Il complesso MutS $\alpha$ - MutL $\alpha$  sul DNA con appaiamento sbagliato scatena l'attivazione del macchinario di riparazione.

Una deficienza di questa funzione può portare una predisposizione al tumore al colon

2. Quando si va a creare un danno nel DNA, ci sono più vie possibili, a seconda del tipo di danno
- La riparazione per escissione delle basi (BER)** coinvolge una batteria di enzimi chiamati **DNA glicosilasi**, che vanno a riconoscere una base alterata e ne catalizza la rimozione idrolitica (esistono molti

tipi di enzimi compresi quelli che agiscono nei confronti di basi deamminate, basi alchilate o ossidate, basi con anelli aperti e basi in cui presentano un legame singolo e non doppio)



Per esempio, in una rimozione di una C

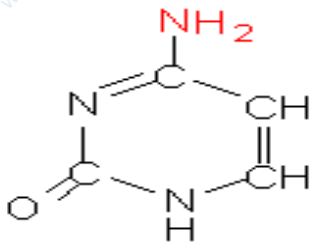
deamminata (*perdita spontanea di un gruppo amminico*), una uracil DNA glicosilasi, il quale sonda tutte le facce di un DNA. Una volta riconosciuto il danno la reazione della DNA glicosilasi crea uno zucchero deossiribosio privo della base (*tagliando quindi la citosina deamminata/uracile*). La mancanza di base è riconosciuta da un enzima chiamato **AP endonucleasi** (*insieme a una fosfodiesterasi enzima deputato alla rottura dei legami fosfodiesterici*), che taglia l'ossatura fosfodiesterica (rimuovono lo zucchero fosfato) e il danno verrà subito rimosso e riparato da una DNA polimerasi e da una DNA ligasi (*la depurinazione viene aggiustato direttamente dall'AP endonucleasi*)

La depurinazione, che è di gran lunga, il tipo più frequente di danno sofferto dal DNA

Tutti questi tipi di enzimi agiscono girando la base fuori dalla doppia elica dove può essere eliminata o modificata e riportata nella alfa elica

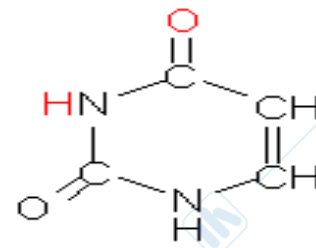
*(Perché il DNA presenta la citosina e non l'uracile? A causa di una lenta reazione detta "deaminazione", la citosina del DNA possa trasformarsi in uracile. Gli scienziati hanno stimato che questa trasformazione spontanea avvenga circa 100 volte al giorno in una cellula media di mammifero e ciò introduce una mutazione nella sequenza del DNA che, se non corretta, porterebbe a gravi conseguenze. Per fortuna, o meglio, grazie all'evoluzione e alla selezione naturale, nel nostro DNA non c'è uracile; quindi, non appena questo si forma a causa della reazione di deaminazione viene subito "riparato" il danno e viene ripristinata una citosina. Se il DNA avesse contenuto di norma l'uracile, sarebbe stato molto difficile identificare gli uracili prodotti dalla deaminazione della citosina; gli uracili non "riparati" avrebbero causato modificazioni permanenti nella sequenza di DNA in quanto, durante la replicazione, essi si appaiano con l'adenina e non con la guanina come fa invece la citosina. Il fatto quindi che nel DNA sia stata introdotta una molecola di timina al posto dell'uracile dell'RNA è stato sicuramente uno dei punti chiave della nostra evoluzione molecolare in quanto ha reso possibile la conservazione dell'informazione genetica. L'RNA invece ha potuto mantenere la molecola di uracile perché l'RNA non deve trasmettere l'informazione genetica da una generazione all'altra. È solo una molecola*

Cytosine



Deamination →

Uracil



transitoria che va incontro a produzione e degradazione anche nel giro di pochi minuti, giusto il tempo necessario a passare l'informazione dal DNA alla proteina.

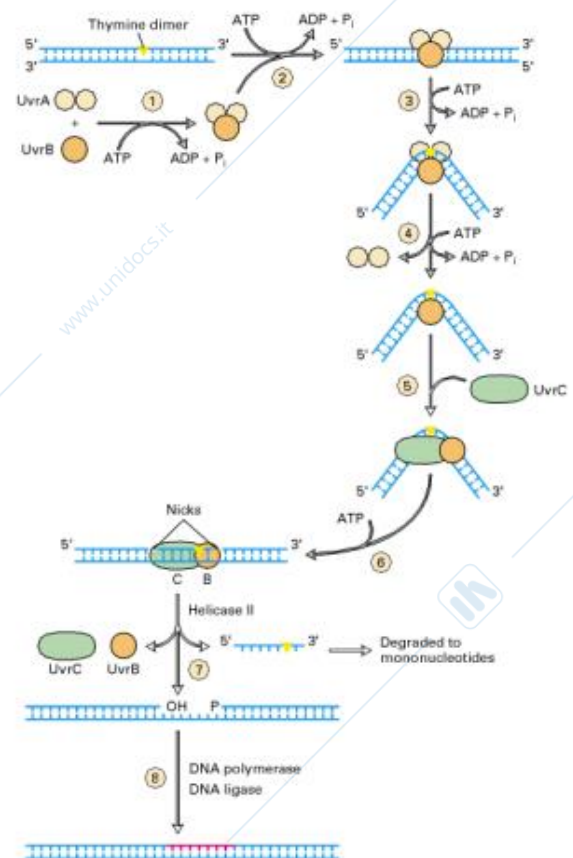
La selezione naturale, agli arbori dell'origine della vita sulla terra, ha dunque favorito una molecola di DNA con timina al posto dell'uracile proprio per evitare una frequenza di mutazione troppo elevata, dannosa per la vita stessa.)

- b. **La riparazione per escissione di nucleotidi, (nota anche come "NER", dall'inglese nucleotide excision repair)** è un altro meccanismo di riparazione del DNA (danno da lesioni voluminose date dalla reazione covalente di basi di DNA con grossi idrocarburi /come il cancerogeno benzopirene/ presenti nel fumo delle sigarette/, o danno dato proprio da formazioni di dimeri di TIMINA nel DNA)

A differenza della riparazione per escissione di basi, che è più specifico per singole basi, la NER è in grado di riparare regioni di DNA più estese. Gli enzimi di questo sistema di riparo non riconoscono le lesioni come tali, ma le conseguenti distorsioni della doppia elica, con rimozione di un corto segmento di DNA a cavallo della lesione.

A guidare l'intero processo interviene un gran complesso multienzimatico UvrABCD, il quale è costituito da tre subunità proteiche: **UvrA, UvrB, UvrC e UvrD**;

- La subunità UvrA si lega ad un'altra subunità UvrA, entrambe con attività GTP/ATPasica; il dimerio appena formato esegue una scansione del DNA cercando una distorsione nella doppia elica, piuttosto che un cambiamento specifico di una base.
- Una volta che è stata trovata una lesione voluminosa, il dimerio si lega alla subunità UvrB (formando un trimero) che viene posizionata correttamente nei pressi del sito danneggiato;
- Il dimerio UvrA lascia il complesso mentre UvrB recluta la subunità UvrC, formando un nuovo dimerio UvrBC; UvrB e UvrC sono le componenti ad attività endonucleasica. (scindono il legame fosfodiesterico all'interno di una catena polinucleotidica) La prima rompe il legame fosfodiesterico quattro nucleotidi a valle del danno, mentre UvrC scinde un legame



fosfodiesterico otto nucleotidi a monte del sito danneggiato, rimuovendo così un segmento di DNA di dodici nucleotidi, comprendente il sito danneggiato

- La riparazione è poi completata da UvrD (ha la stessa funzione di DNA elicasi) che rimuove i ponti idrogeno che legano le basi complementari e rilascia la regione danneggiata perché venga degradata, mentre UvrC si dissocia dal complesso. La DNA polimerasi I interviene ricopiando il tratto sulla base del filamento integro, ed infine una DNA ligasi risalda il segmento di DNA recuperato

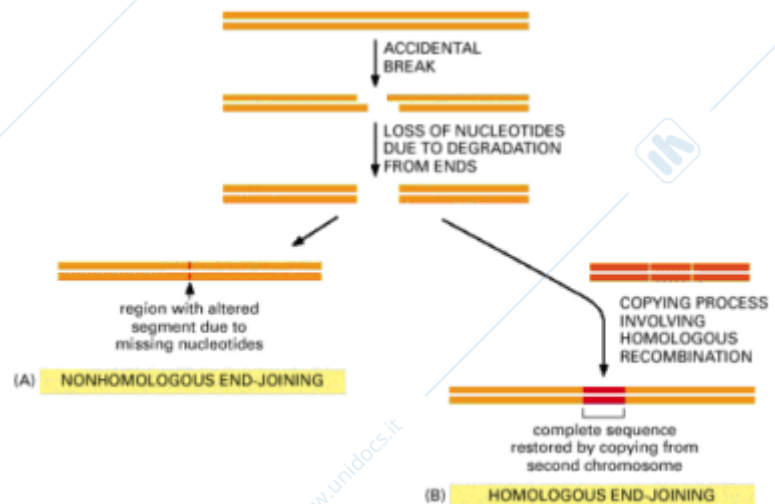
Negli eucarioti il macchinario è molto più complesso (oltre 25 proteine) ma il meccanismo è simile.

Un deficit di tale funzione è la base dello **xeroderma pigmentosum** (mutazione ereditaria autosomica recessiva caratterizzata da un'elevata fotosensibilità con una predisposizione al cancro della pelle)

3. Le rotture di questo tipo sono causate da *radiazioni ionizzanti, agenti ossidanti, errori di replicazione e certi prodotti metabolici nella cellula*

Questi meccanismi operano sia nei procarioti che negli eucarioti

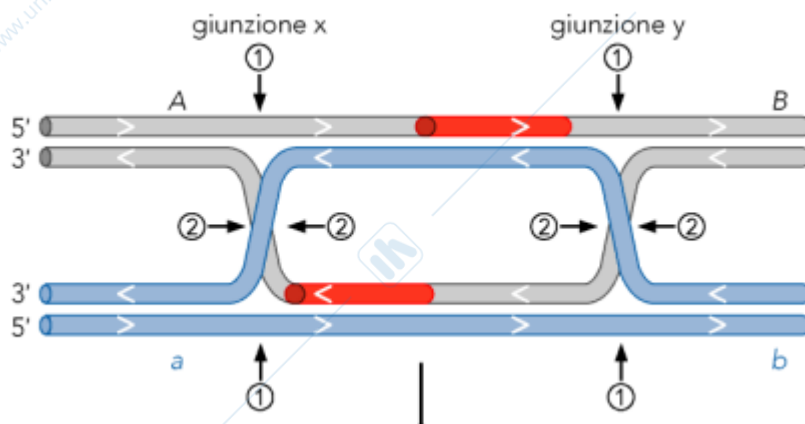
- a. Il più semplice da comprendere è l'**unione non omologa delle estremità**, in cui le estremità rotte sono giustapposte e riunite da una legatura del DNA, portando quindi una perdita di uno o più nucleotidi al sito di unione (vengono aperti da elicasi e uniti, andando a scartare regioni 5' di DNA che non sono complementari)



È il meccanismo più utilizzato per riparare il DNA perché più semplice, ma meno preciso: sfrutta la proteina ad anello Ku che si lega alle estremità rotte e che recluta una proteina **chinasi DNA dipendente**. Il complesso creatosi permette l'avvicinamento delle estremità poi unite dalla ligasi. Il riparo può essere mutagenico

- b. La seconda via di riparazione, **unione omologa delle estremità**, risulta essere un processo di replicazione del DNA che usa un cromosoma non danneggiato come stampo per trasferire l'informazione genetica al cromosoma rotto, riparandolo senza cambiamenti nella sequenza del DNA

È molto più efficace, ma più complicata: può avere luogo solo se il DNA è stato duplicato (*quindi in G2*)



Il processo inizia quando una endonucleasi fa un taglio a doppio filamento in un cromosoma, andando a creare due estremità 3' sporgenti a singolo filamento, che trovano la regione omologa di un secondo cromosoma per iniziare una sinapsi di DNA (*siti di contatto funzionale tra due neuroni*), formando quindi una molecola giuntata. Il collegamento avviene

mediante una giunzione di Holliday

In una giunzione di Holliday, le due eliche omologhe di DNA che si sono inizialmente appaiate sono tenute insieme dallo scambio reciproco di due dei quattro filamenti presenti, ciascuno dei quali origina da una delle due eliche; quindi, ciascun filamento lascia il suo partner e si appaia con il filamento complementare del cromosoma omologo, formando due filamenti che si incrociano e due filamenti che non si incrociano

Un processo di replicazione del DNA usa poi il cromosoma non danneggiato come stampo per trasferire l'informazione genetica al cromosoma rotto, riparandolo senza cambiamenti nella sequenza del DNA

A seconda degli eventi successivi, il risultato finale può essere il ripristino delle due eliche di DNA con riparazione della rottura a doppio filamento (*reazione predominante nelle cellule mitotiche, atto posto nella riparazione del DNA avvenutasi*) o un evento di crossing over che lascia giunzioni eteroduplex (*segmento ibrido di DNA*) che tengono insieme due eliche diverse di DNA (*reazione predominante nelle cellule meiotiche, atto per la formazione di gameti, per l'appunto*)

Per rigenerare due eliche separate di DNA e così terminare il processo di scambio, i filamenti che connettono le due eliche in una giunzione di Holliday devono alla fine essere tagliati, in un processo detto risoluzione

- Le cellule hanno evoluto molti meccanismi che le aiutano a sopravvivere in un mondo imprevedibilmente pericoloso (*in risposta allo shock da calore o dei raggi UV nel DNA*)

Un esempio di risposta di emergenza è la cosiddetta risposta SOS

La risposta SOS è una risposta globale al danno del DNA in cui il ciclo cellulare viene arrestato e viene indotta la riparazione del DNA (*quindi tutti i sistemi che abbiamo spiegato poc'anzi*) e la mutagenesi. Il sistema coinvolge la proteina RecA (*Rad51 negli eucarioti*)

Un blocco alla replicazione del DNA e del DNA polimerasi produce un segnale che induce un aumento della trascrizione (*che codificano per la riparazione*); tale

segnale induce infatti la formazione di **RecA** che va a reprimere la proteasi **LexA** e ad attivare il complesso **UmuCD**, se la risposta risulta essere completa. È un sistema di riparazione soggetto a errori che contribuisce in modo significativo ai cambiamenti del DNA osservati in un'ampia gamma di specie. In condizioni normali, LexA si lega a una sequenza consenso di 20 bp nella regione dell'operatore di quei geni, evitando che si attivi.

L'attivazione di quei geni SOS si verifica dopo il danno al DNA dall'accumulo di regioni a filamento singolo (ssDNA) generate alle forcelle di replicazione, dove la DNA polimerasi è bloccata.

La proteina RecA forma un filamento attorno a questo DNA ad elica semplice, ssDNA, portando prima una riparazione dei nucleotidi tagliati (NER) (*geni che sono espressi con debole affinità e che vanno a percepire anche solo un debole stimolo*) ma quando e se la riparazione risulta essere stata non utile vengono coinvolte altre cellule con affinità maggiore, reclutate grazie ad un'ulteriore repressione della LexA.

A seconda dell'entità del problema, quindi, la proteina LexA viene più o meno repressa.

Ciò induce un aumento della sopravvivenza aumentando però la frequenza di mutazioni (*e quindi mutagenesi, cioè un insieme di processi chimico – fisici che danno origine ad una modifica della sequenza nucleotidica del genoma di un individuo ovvero ad una mutazione; indirettamente si può creare cellule mutanti più adatte a sopravvivere, fenomeno che avviene spesso nei batteri per esempio*).

Una volta che il danno sia riparato, RecA non catalizza più la demolizione di LexA, che così si accumula e blocca di nuovo i geni SOS.

### MUTAZIONI PUNTIFORMI

Le mutazioni puntiformi interessano poche coppie di basi. Se viene alterata anche la sequenza dei geni sono dette mutazioni geniche:

- **Sostituzione:** una coppia di basi è sostituita da un'altra coppia (*più frequente*)
- **Inserzione:** vengono inserite una o più coppie di basi in più
- **Delezione:** vengono meno una o più coppie di basi che vanno ad eliminare o un amminoacido completo (*delezione di 3 nucleotidi*) o vanno a trasformare tutta la proteina con eliminazione di un singolo nucleotide.

(*ultime due meno frequenti*)

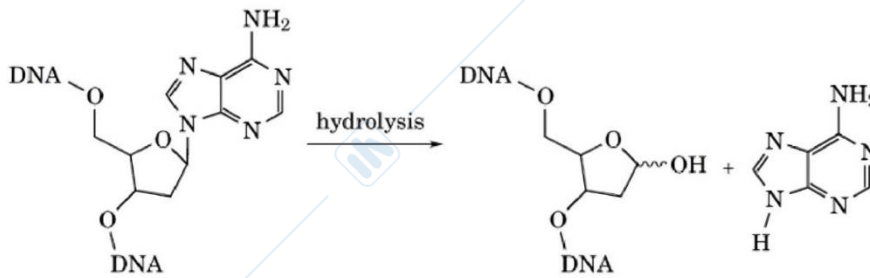
(*ESEMPIO DI INSERZIONE o DELEZIONE: Vengono dette mutazioni dinamiche, la mutazione che si origina nel corso della replicazione del DNA provoca una variazione nel numero di queste sequenze ripetute; potrà quindi presentarle in difetto o in eccesso – Replication Slippage – ed è dovuto al cattivo appaiamento dei due filamenti complementari*)

La depurazione e la deaminazione sono le reazioni spontanee più note e che portano gravi danni al DNA nelle cellule.

- La **depurinazione** rilascia guanina o adenina dal DNA, portando la sostituzione di una base con un'altra quando il DNA viene replicato (*perdita di una base azotata purinica (adenina o guanina) da*

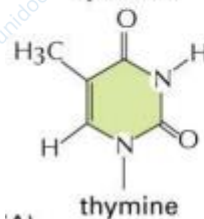
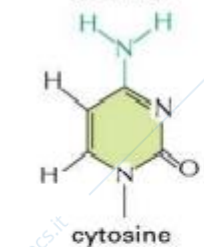
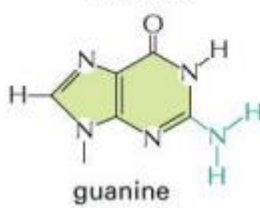
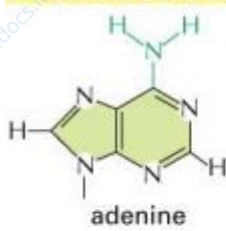
un nucleotide per rottura di un legame glicosidico) rimanendo quindi con un gruppo ossidrilico al posto della base eliminata

Tutto ciò può andare a portare una delezione di una base

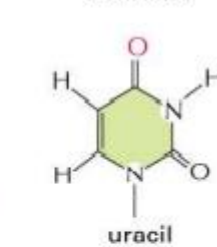
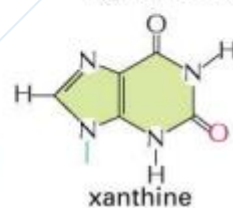
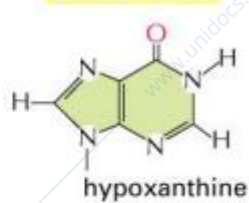


- La **deaminazione**, se non corretta, porta alla sostituzione di una base con l'altra quando il DNA viene replicato (*perdita di un gruppo amminico*) (non avviene nella TIMINA)

#### NATURAL DNA BASES



#### UNNATURAL DNA BASES



NO DEAMINATION

- Sporadicamente le basi del DNA possono assumere una o più **forme alternative tautomere** (in cui un atomo di idrogeno risulta essere spostato in una posizione diversa, portando proprietà di accoppiamenti diversa)

(la citosina se deaminata può portare alla formazione di uracile, nucleotide che va a legarsi con la adenina e non con la guanina andando a portare una mutazione)

La definizione del termine *mutagene* è un agente chimico o fisico che causa un aumento di probabilità di mutazioni (portando quindi a mutazioni indotte)

Tra le mutazioni chimiche possiamo ricordare:

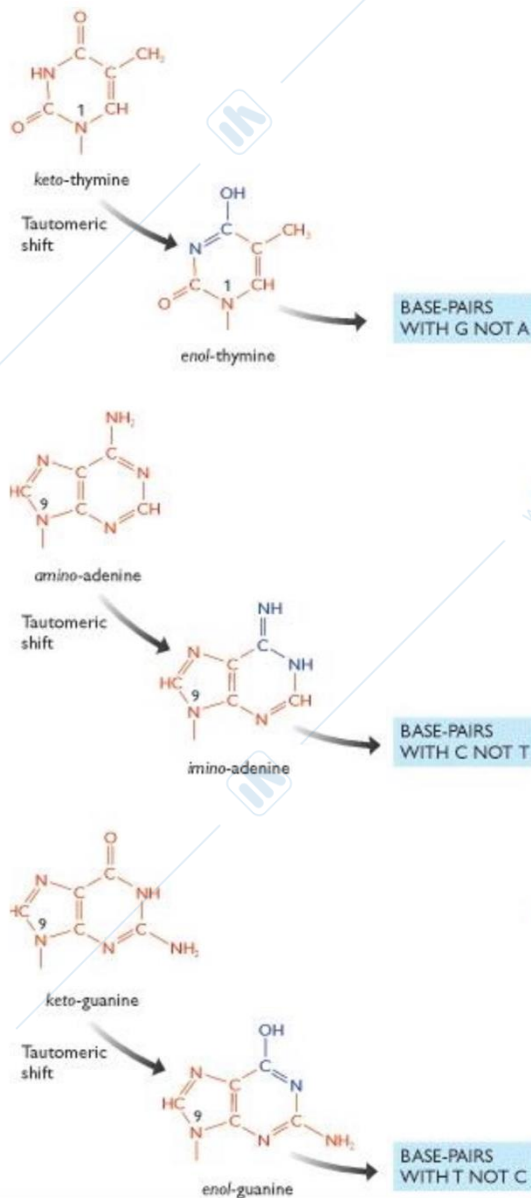
1. alcuni agiscono come analoghi di base

Vengono erroneamente utilizzati come substrati quando nuovo DNA viene sintetizzato alla forcella di replicazione

(ESEMPIO la **5-bromouracile** sostituisce la timina, facendo sì che si vada a creare una variazione

nella sequenza, quindi una **mutazione**)

(esso infatti forma due legami idrogeno con l'adenina nella sua forma chetonica, ma quando passa nella sua forma enolica esso è in grado di formare 3 legami idrogeno con la guanina) (**Tautomere**)



2. alcuni agiscono direttamente con il DNA, causando cambiamenti strutturali

Gli agenti cancerogeni ad azione diretta sono elettrofili reattivi (*composti che cercano e reagiscono con centri caricati negativamente in altri composti*) che reagendo con l'ossigeno o con l'azoto del DNA vanno a modificare il normale accoppiamento delle basi

i. agenti deamminanti

Hanno la capacità di modificare la struttura chimica e la proprietà delle basi, in questo caso di *rimuovere un gruppo amminico* (**DEAMMINAZIONE**) (ESEMPIO **acido nitroso** ( $\text{HNO}_2$ ) porta alla perdita di  $\text{NH}_2$  (gruppi amminici) nelle **adenine/citosine**, andando quindi a formare rispettivamente **ipoxantina/uracile**, la **citosina metilata** si trasforma invece in **timina** e la **guanina** in **xantina** (LA TIMINA NON SI DEAMMINIZZA poiché non vi ha un gruppo amminico)) /O attraverso un **ATTACCO idrolitico** in cui l'acqua viene aggiunta a discapito di  $\text{NH}_3$ /

ii. agenti alchilanti

produttori di addotti (*gruppi alchilici che vengono inseriti in macromolecole come proteine o DNA*)

(ESEMPIO **etilmetano solfonato** (**EMS**))

1. si va a legare all'ossigeno della Guanina in posizione 6 dell'anello purinico, formando **O6-ellitguanina** (**ET-G**)
2. Et-G ha più affinità con la timina piuttosto che con la citosina. Provocando una mutazione dopo due cicli di replicazione di DNA)

iii. agenti intercalanti

Sono sostanze chimiche capaci di inserirsi, più o meno stabilmente, tra due coppie di basi in una o entrambe le eliche del DNA

(ESEMPIO **bromuro di etidio**)

3. alcuni mutageni agiscono indirettamente sul DNA

Gli agenti cancerogeni ad azione indiretta sono generalmente composti non reattivi e insolubili in acqua. Possono agire come potenti induttori del cancro solo dopo la conversione agli agenti cancerogeni finali mediante attività metabolica

*(ESEMPIO la **Benzo[a]pirene** nella maggior parte dei casi risulta essere NON TOSSICO ma se ossidato può interferire con il DNA, legandosi covalentemente con la guanina, interrompendo il legame idrogeno e producendo quindi distorsioni dell'elica)*

*(ESEMPIO **Aflatossina** è una microtossina prodotta da una specie fungina dell'*Aspergillus*, anch'esso va a formare legami covalenti) (porta alla **DEPURAZIONE**)*

Tra le mutazioni fisici possiamo ricordare invece:

1. UV radiazioni, che possono causare formazioni di legami tra le basi del DNA (*attaccamento covalente dei residui di timina /ESEMPIO dimeri di Timina*)
2. Calore il tutto induce idrolisi con il taglio consecutivo della base nel nucleotide producendo un GAP nel DNA
3. Radiazione ionizzanti (raggi x, gamma, beta...), riescono a liberare elettroni dagli atomi che lo attraversano (portano alla rottura del doppio filamento)

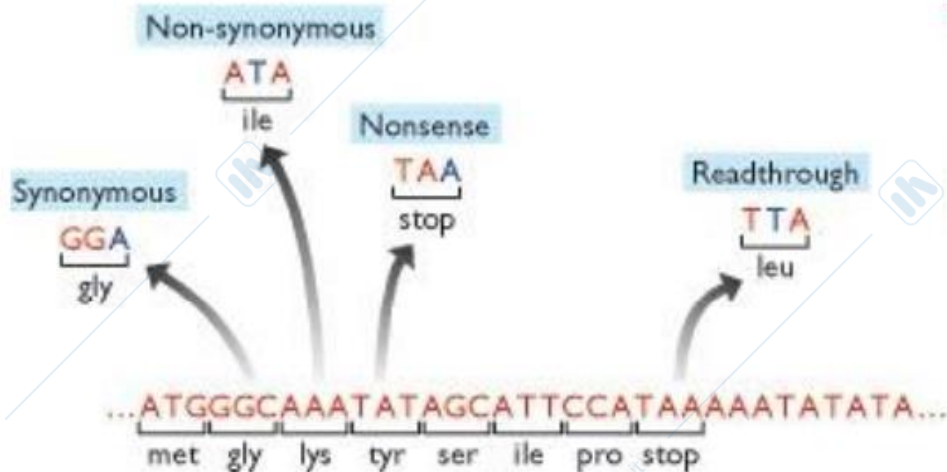
Le mutazioni possono portare a più effetti:

- **Mutazioni silenti o sinonime**, sono in prevalenza neutre poiché l'amminoacido non cambia e di conseguenza non cambia la funzionalità della proteina codificata (TTT → TTC = *fenilalanina*)
- **Mutazioni non sinonime**, prevede un cambiamento di una base azotata, portando un cambio nella funzionalità della proteina codificata (cambio di una sua tripletta), soggetto a selezione naturale quindi
  - **Le mutazioni missenso** sono sostituzioni non sinonimi che derivano da mutazioni puntiformi, mutazioni in un singolo nucleotide che provocano la sostituzione di un amminoacido diverso, con conseguente modifica della proteina codificata
  - **Le mutazioni senza senso** sono sostituzioni non sinonimi che si verificano quando una mutazione nella sequenza del DNA provoca la terminazione prematura di una proteina cambiando l'amminoacido originale in un codone di stop
  - Un altro tipo di mutazione che si occupa dei codoni di stop è noto come **mutazione non stop o mutazione readthrough**, che si verifica quando un codone di stop viene scambiato con un codone di amminoacidi, causando un allungamento della proteina rispetto a quanto specificato
- **Mutazione neutra**, l'amminoacido specificato dal nuovo codone è simile chimicamente o ha una scarsa rilevanza per la funzionalità proteica

L'attività enzimatiche che sono coinvolte nella riparazione del DNA

- i. **DNA esonucleasi** (idrolizzano legami fosfodiesterici)
- ii. **DNA polimerasi** (genera un filamento di DNA usando un altro filamento come stampo)
- iii. **DNA ligasi** (lega 2 filamenti che hanno subito una rottura)
- iv. **DNA elicasi** (rompe legami idrogeno separando 2 filamenti)

## The effects of mutations



<b>MMR</b>	
Cattivo appaiamento	Analoghi di base e/o forme Tautemere esempio <b>5-bromouracile</b>
<b>BER</b>	
Basi deamminate	Mutageni che agiscono direttamente al DNA esempio <b>acido nitroso</b> che porta alla deaminazione e quindi ad una possibile cambio di base
Basi Alchilate o Ossidate	Mutageni che agiscono direttamente al DNA esempio <b>etilmetano solfonato</b>
Basi con anelli aperti e o legami singoli di DNA	Mutazioni fisiche, in particolar modo le <b>radiazioni</b>
<b>NER</b>	
Legami covalenti	Mutageni che agiscono indirettamente al DNA come <b>Benzo[a]pirene</b> o nelle mutazioni fisiche come i <b>raggi UV</b>
Presenza idrocarburi	Mutageni che agiscono indirettamente al DNA come <b>Benzo[a]pirene</b>
Formazioni Dimeri	Mutazioni FISICHE con i <b>raggi UV</b>
<b>UNIONE OMOLOGA E NON</b>	
Radiazioni ionizzanti	Mutazioni FISICHE
Agenti ossidanti	Mutageni che agiscono indirettamente al DNA
Prodotti metabolici	Mutageni che agiscono indirettamente al DNA, esempio <b>Benzo[a]pirene</b> o l' <b>aflatossina</b>