

Daños, Mutaciones y Mecanismos de Reparación del ADN

Daños en el ADN: Alteraciones en la estructura del ADN causadas por agentes físicos o químicos. Si los daños no son reparados, algunos pueden llevar a mutaciones o muerte celular

Mecanismos de Reparación: Procariotas y Eucariotas poseen mecanismos que reparan daños en el ADN antes de la fijación de mutaciones. Genoma eucariota >130 genes de reparación

Mutaciones: Cualquier cambio permanente en la secuencia genómica del ADN en células somáticas o germinales

Daños en el ADN no reparados

- **Bloqueo de la replicación y transcripción**

- **Mutaciones**

- ***Regiones intergénicas* → Silenciosas**

Codón sinónimo → Mutación silenciosa

- ***Genes***

Codón No sinónimo →

- **Missense:** aminoácido distinto
- **Non sense:** codón de terminación
- **Read through:** codón de terminación eliminado

Mutaciones

- **Cambios en la secuencia de DNA:** Cambios puntuales (1 nt), inserciones, deleciones
 - **Espontáneas**
 - Errores en la replicación
 - Pérdida de bases
 - Desaminación de bases
- } Incrementada por agentes químicos y físicos
- **Ambientales**
 - **Mutágenos** → Cambios estructurales del DNA que afectan la capacidad de apareamiento

Transiciones: Purina por purina o pirimidina por pirimidina.

G → A A → G
C → T T → C

Transversiones: Purina por pirimidina y viceversa.

G → T T → G
G → C C → G
A → T T → A
A → C C → A

Agentes físicos o químicos que provocan daños en el ADN

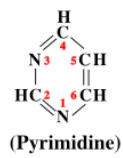
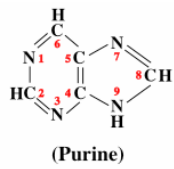
- ***Químicos***

- **Análogos de Bases**
- **Agentes alquilantes**
- **Agentes intercalantes**

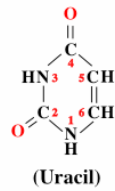
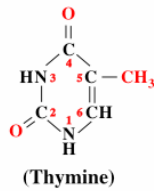
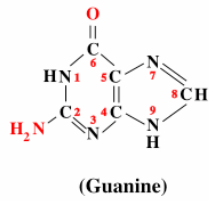
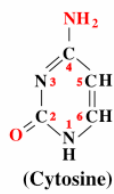
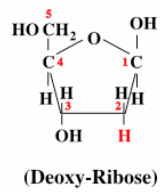
- ***Físicos***

- **Radiación UV**
- **Radiación ionizante**
- **Calor**

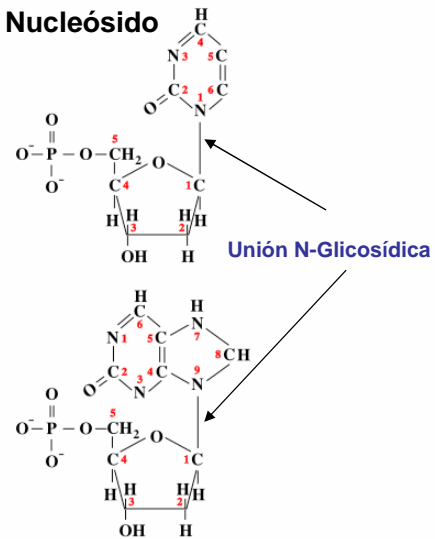
Estructuras Básicas en DNA



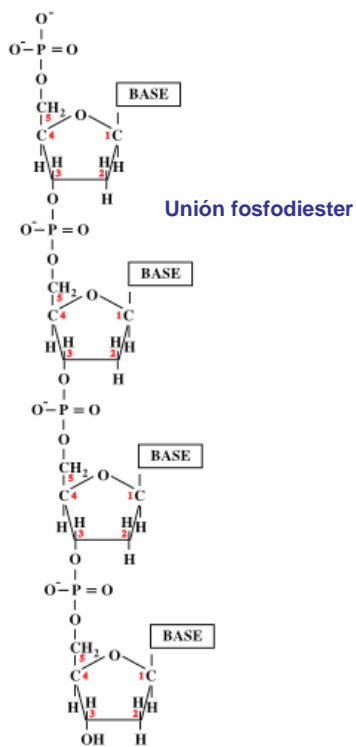
Bases



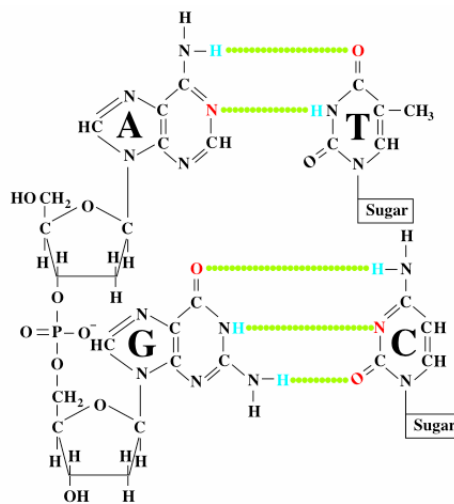
Nucleósido



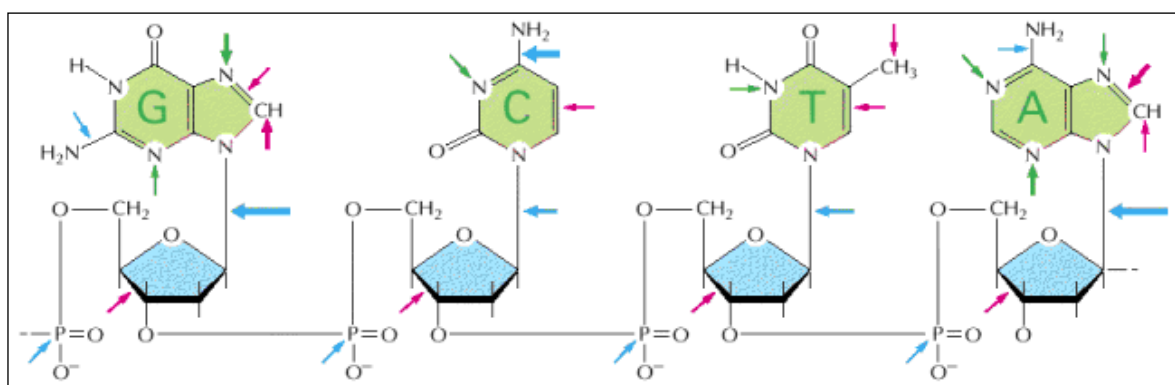
Esqueleto de DNA: moléculas de desoxirribosa unidas por grupos fosfato.



Unión H:



Sitios en los nucleótidos que pueden ser dañados



Daño oxidativo →

Ataque hidrolítico →

Metilación →

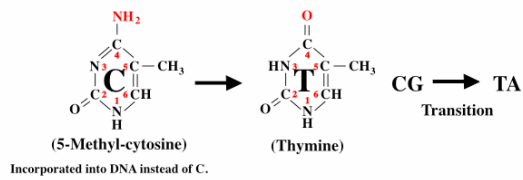
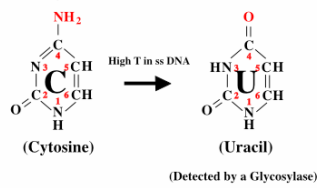
Daños que puede sufrir el DNA

- **Unión covalente entre bases de la misma cadena**
- **Unión de grupos alquilo**
- **Ruptura de simple cadena (nick)**
- **Ruptura de doble cadena**
- **Pérdida de bases**
- **Desaminación**
- **Mismatch (mal apareamiento)**

Desaminación

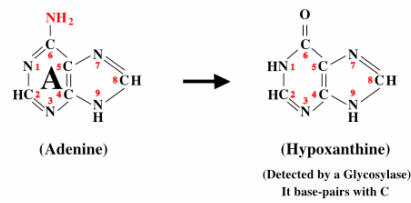
- 100 a 500 eventos/cel./dia
- Transición C → T

Exo-cyclic amino group



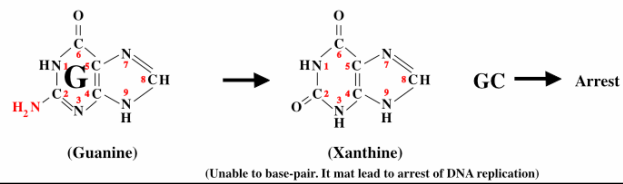
Pirimidinas

Exo-cyclic amino group



AT \rightarrow GC
Transition

Purinas

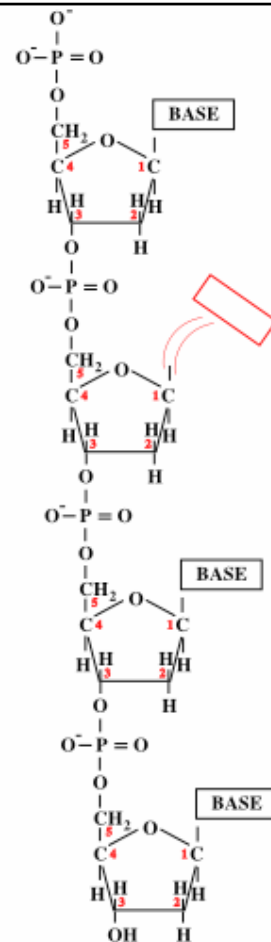


GC \rightarrow Arrest

Pérdida de Bases

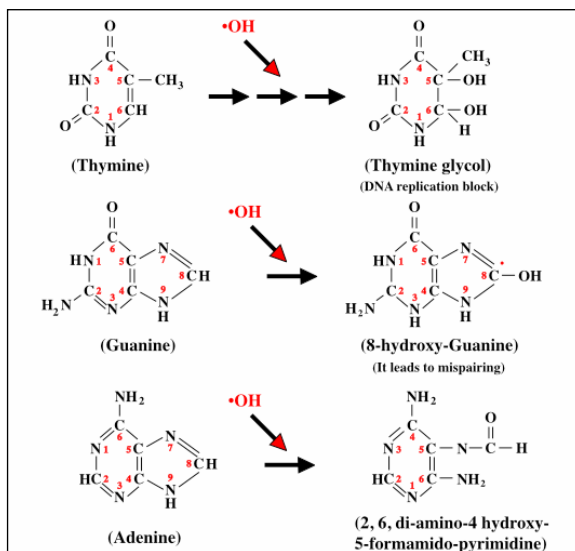
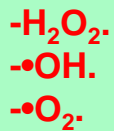
-DEPURINACION: Pérdida espontánea de purinas

- célula humana: 2000 a 10.000 purinas/célula/día.
- *E. coli*: 1 purina/genoma/generación.



Daño Oxidativo

Daño en el DNA provocado por especies reactivas de oxígeno.



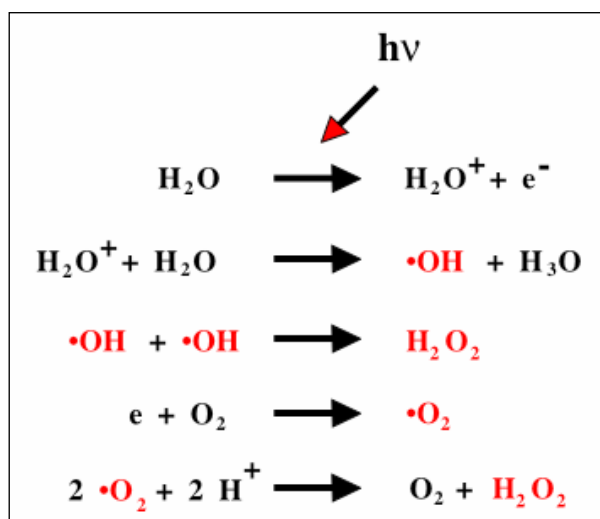
$\cdot\text{OH}$ ataque sobre azúcar \rightarrow pérdida de base y rupturas

$\cdot\text{OH}$ ataque sobre las bases

Radiación Ionizante

Formación de moléculas ionizadas y excitadas.

Las más importantes son especies formadas por radiólisis del agua, que forma productos capaces de causar daño oxidativo.



Produce:

- Daño en la base y azúcar
- Pérdida de bases
- Ruptura de la cadena

Fuente de radicales

Intracelular

- Respiración.
- Metabolismo de los Peroxisomas

Extracelular

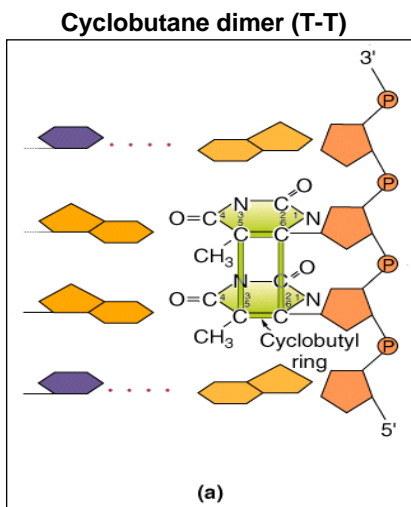
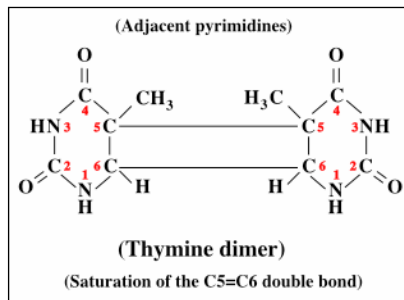
- Radiación ionizante.
- UV.
- Calor.
- Algunas drogas.

Defensas:

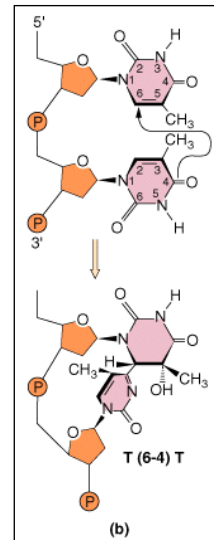
- SOD
- Glutación
- Catalasa
- Vit C, Vit E

Luz Ultra Violeta (UV)

Fotoproducto principal →
dímeros de pirimidina



6-4 photoproduct (T-T)

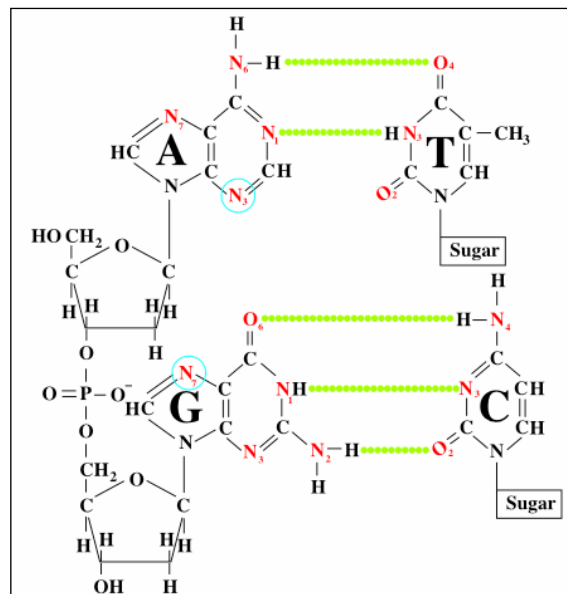


Agentes alquilantes

➤ *Debilitamiento unión N-glicosídica → Pérdida de la base*

➤ *Afecta apareamiento correcto de la base*

-Sitios de alquilación : anillos nitrogenados y algunos grupos oxígeno



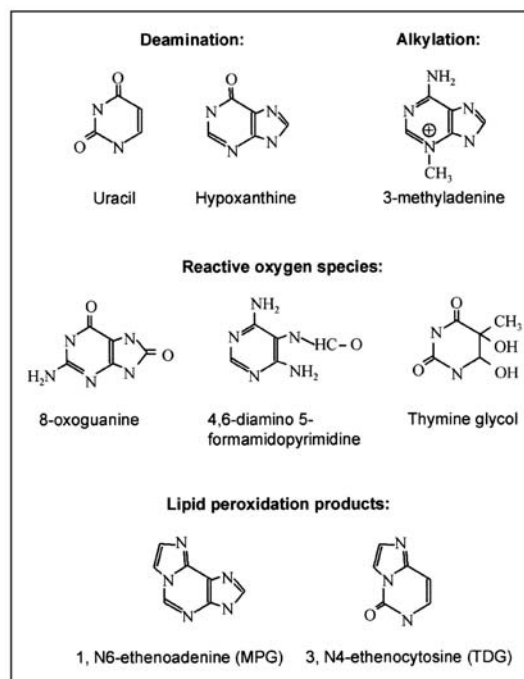
Agentes Alquilantes

- 1) **-EMS** (Ethyl methano sulfonato).
 -Nitrosamina
 -Nitrosourea

- 2) Agentes bifuncionales: pueden reaccionar con 2 centros nucleofílicos → unión inter- o intra-cadena de DNA
 -Mostaza nitrogenada
 -Mitomicina
 -Cisplatino
 -Psoralen

- 3) **-Benzopyreno**
 -Aflatoxinas

Examples of DNA bases damaged by endogenous agents



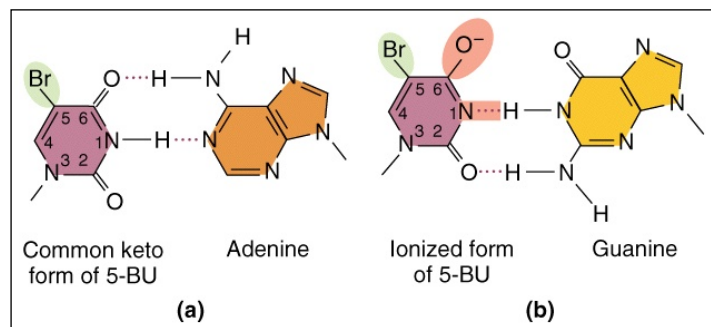
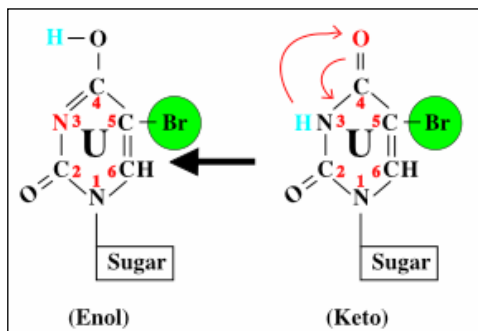
Nilsen, H. et al. *Carcinogenesis* 2001 22:987-998; doi:10.1093/carcin/22.7.987

Copyright restrictions may apply.

Análogos de Bases

1) Derivados halogenados de uracilo

5-bromo-uracilo → Análogo de timina



La presencia de bromo en el C-5 incrementa la proporción de la forma tautomérica rara (enol)

Consecuencia: Errores en la replicación → Mismatch

Mismatch: Errores en la replicación

-Replicación del DNA → 1 error en 10^7 /generación

-Mecanismos de reparación corrigen un 99%

-Frecuencia real de mutación por nucleótido es 10^{-9} - 10^{-12}

•Errores de la DNA polimerasa

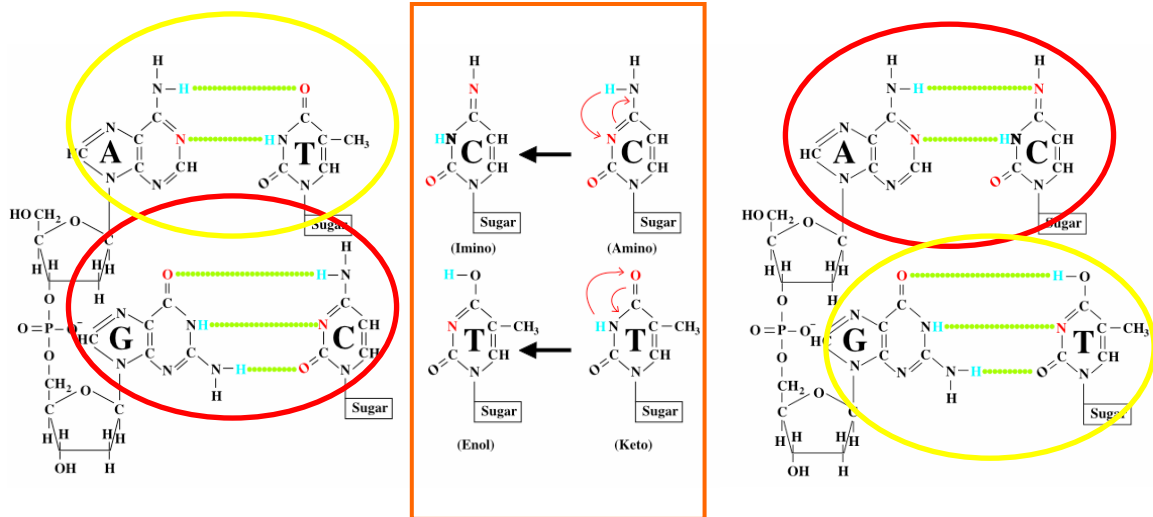
•Incorporación de base errónea

- Selección de nucleótido
 - Función correctora
 - Tautómeros de bases
- | | |
|---|--|
| { | <ul style="list-style-type: none">•U al nt•Cambio al sitio activo•U fosfodiester |
|---|--|

•Inserciones y deleciones (en regiones de secuencias cortas repetidas)

Cambios Tautoméricos

- Rearreglos transientes de las bases (1 en 10^4 a 10^5).
- Si se incorporan durante la replicación provocan un apareamiento alterado de las bases.



Mecanismos de Reparación

1. Sistemas de Reparación directos

Enzimas que revierten directamente el daño

2. Reparación por Escisión (BER , NER, MMR)

3. Sistemas de Tolerancia

Sistema SOS (E.coli)

4. Sistemas de Recuperación

Recombinación

5. Reparación de rupturas de doble cadena

Recombinación homóloga

NHEJ: unión de extremos no homólogos

1. Sistemas de Reparación Directa

No requieren síntesis ADN

- **Nick (ruptura de unión fosfodiéster en una cadena)**
 - DNA ligasas
- **Daños por alquilación**
 - Enzimas específicas que eliminan el grupo alquilo
 - **Ada (E.coli)** remueve grupos alquilo de posición 4 y 6 de T y G
 - **MGMT (humana)** remueve grupo alquilo de posición 6 de guanina
- **Dímeros de timina (Fotorreactivación)**
 - Fotoliasa (E.coli)

2. Reparación por escisión

- ***BER***
 - Remoción de la base dañada
 - Específico (especificidad dada en la etapa de remoción)
- ***NER***
 - Repara daños que distorsionan la doble hélice
 - No específico

BER

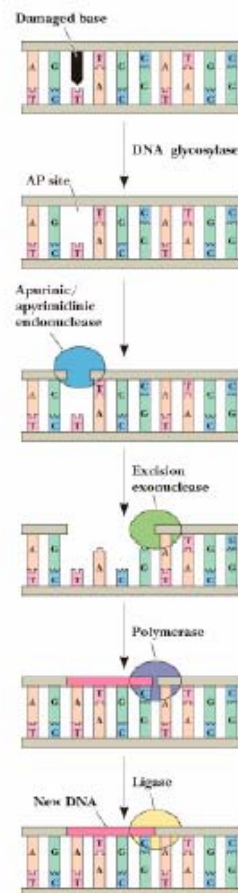
1) Iniciado por **DNA glicosilasa específica** → reconoce el daño y cliva la unión glicosídica entre base y azúcar

2) Sitio AP reconocido por **AP endonucleasa** (cliva 5' de AP)

3) **Fosfodiesterasa** (cliva 3')

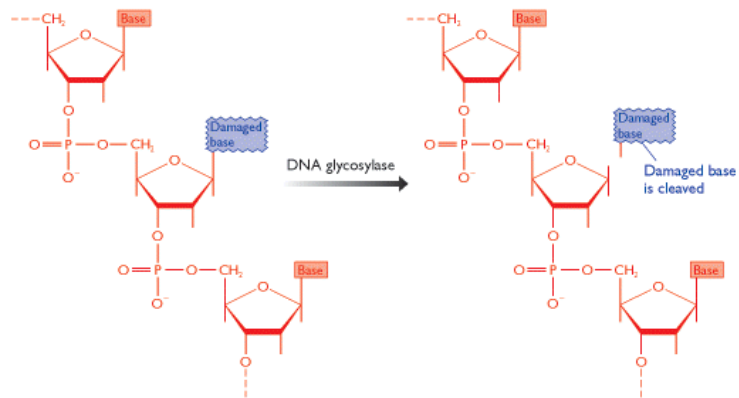
4) **DNA polimerasa** rellena el gap
DNApol I (E.coli)
DNA pol β (mamíferos)

5) **DNA ligasa**



BER

(A) Removal of a damaged base by DNA glycosylase



(B) Outline of the pathway

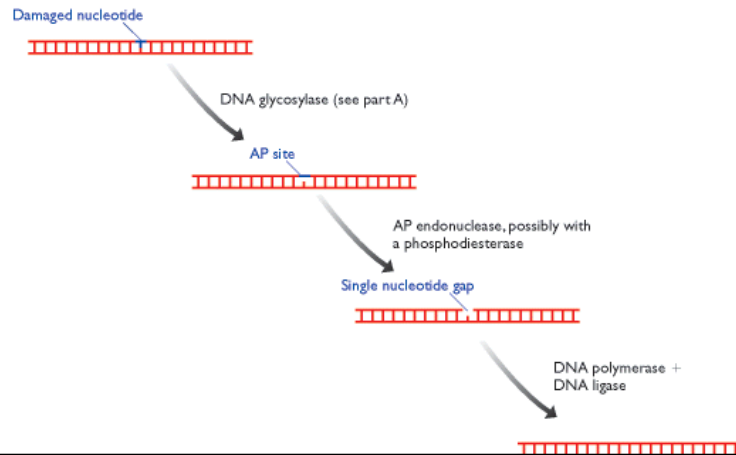


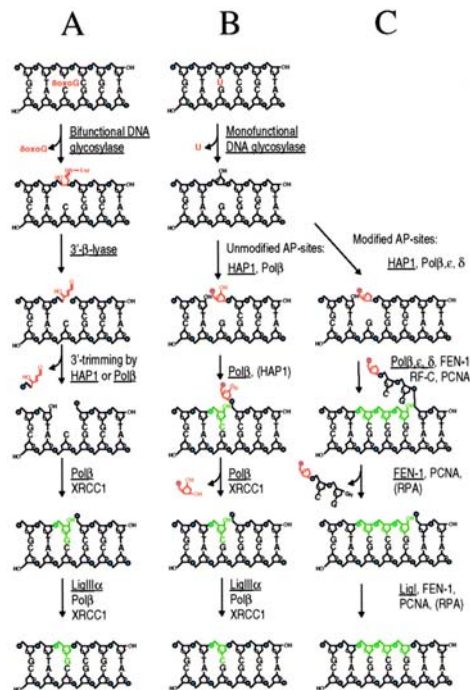
Table 14.3. Examples of human DNA glycosylases

DNA glycosylase Specific for

MBD4	Uracil
MPG	Ethenoadenine, hypoxanthine, 3-methyladenine
NTH1	Cytosine glycol, dihydrouracil, formamidopyrimidine, thymine glycol
OGG1	Formamidopyrimidine, 8-oxoguanine
SMUG1	Uracil
TDG	Ethenocytosine, uracil
UNG	Uracil, 5-hydroxyuracil

Based on Lindahl and Wood (1999) and Wood *et al.* (2001).

The BER pathway is initiated by DNA glycosylases and may follow a short-patch (A and B) or a long-patch (C) route, in part depending on the type of initiating DNA glycosylase



Nilsen, H. et al. Carcinogenesis 2001 22:987-998; doi:10.1093/carcin/22.7.987

Copyright restrictions may apply.

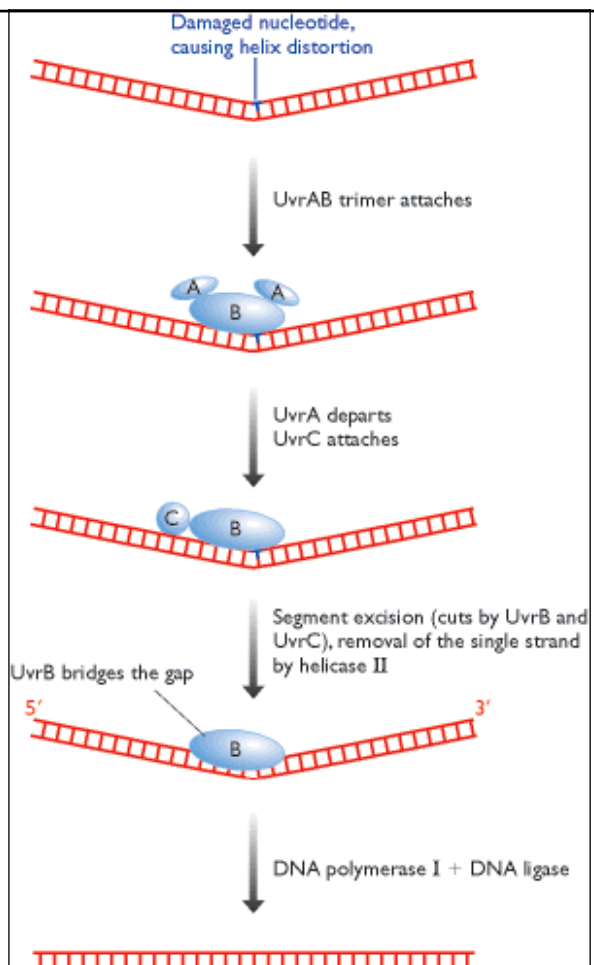
NER

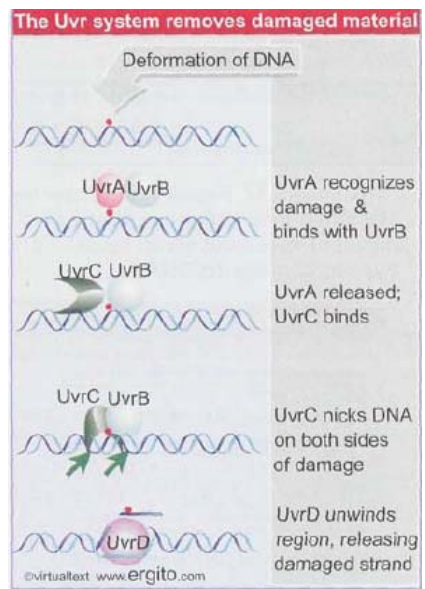
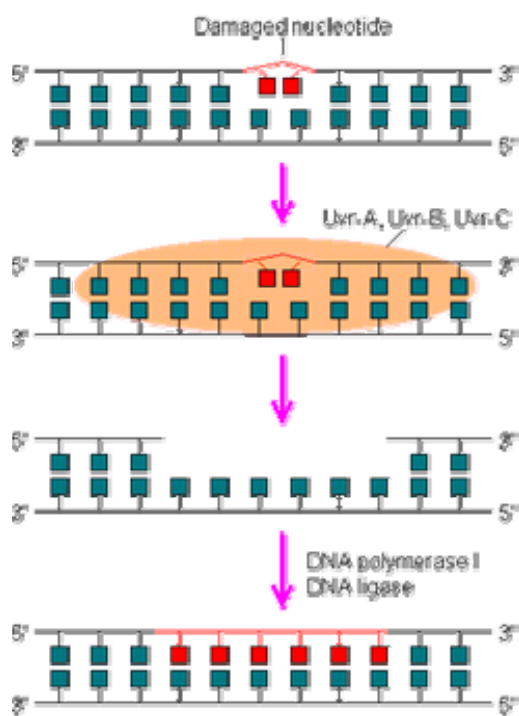
E.coli → Sistema Uvr ABC
↓
Remoción de 12nt

Eucariotas → Remoción de 24-29 nt

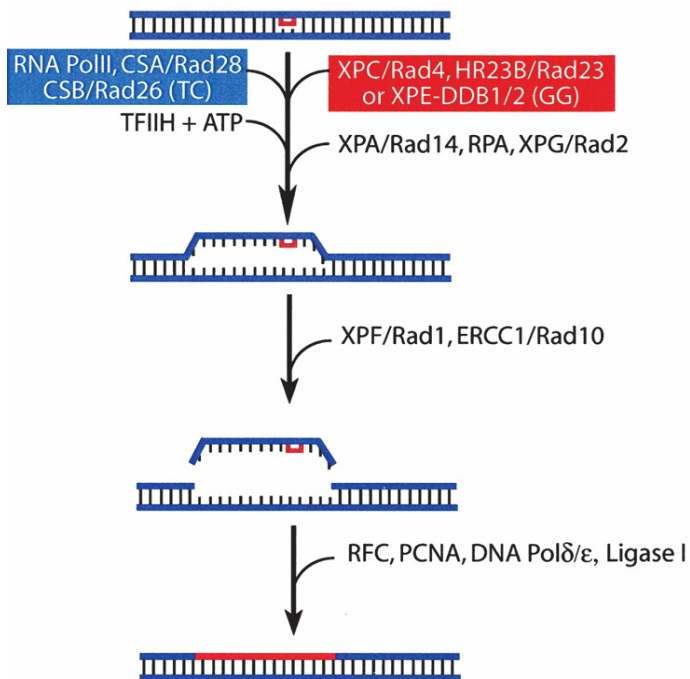
Humanos al menos 16 proteínas involucradas

- XP (Xeroderma pigmentosum)
- XPA reconocimiento del daño
- XPB y XPD helicasas (subu TF II H)
- XPG y XPF endonucleasas

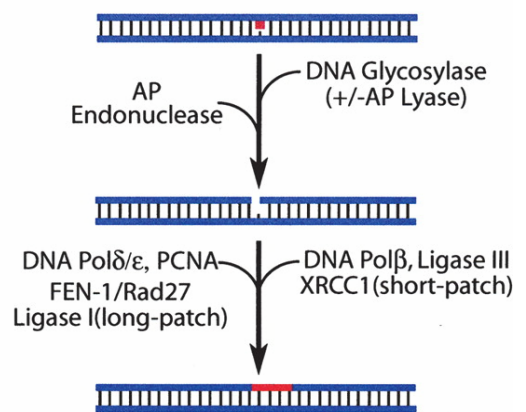




C NER



D BER



3. Reparación de Mismatch (MMR)

Errores post-replicación → No apareamiento (mismatch)

• **No mutagénico** → requiere corregir la cadena nueva

- **Distinción entre cadena parental e hija:**

- En *E.coli* metilación del DNA (dam, dcm) → retardo en metilación pos-replicación
- En otros organismos pueden ser otras señales

Reduce los errores de replicación de
 10^{-7} a 10^{-10} / pb / replicación

MMR

E. coli → genes mut S, L, H

Reemplaza hasta 1kb

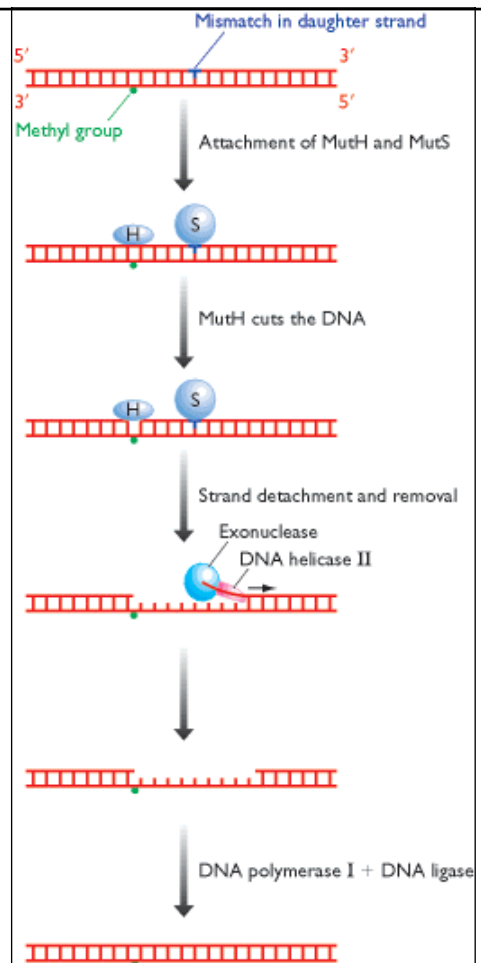
Metilación diferencial (dam, dcm)

MutS → reconoce el mismatch

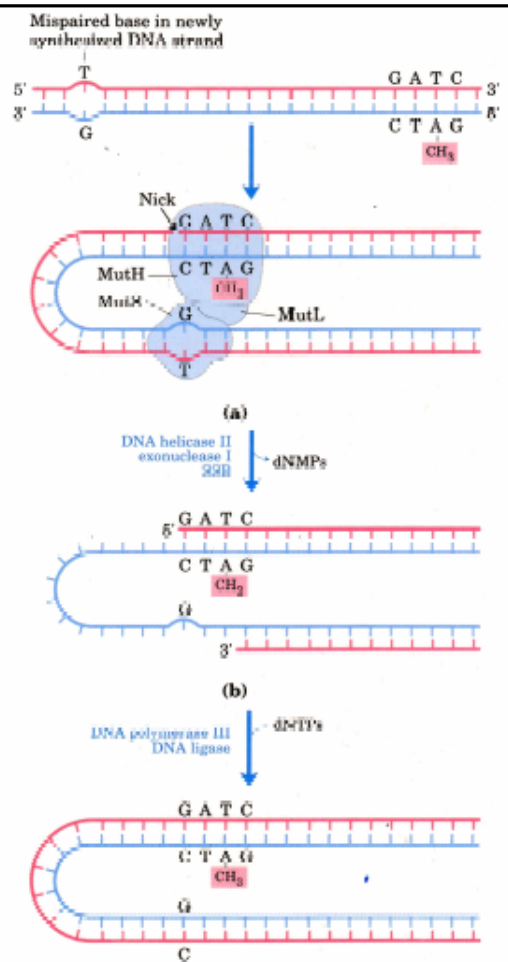
MutH → distingue ambas cadenas
clivaje en GATC

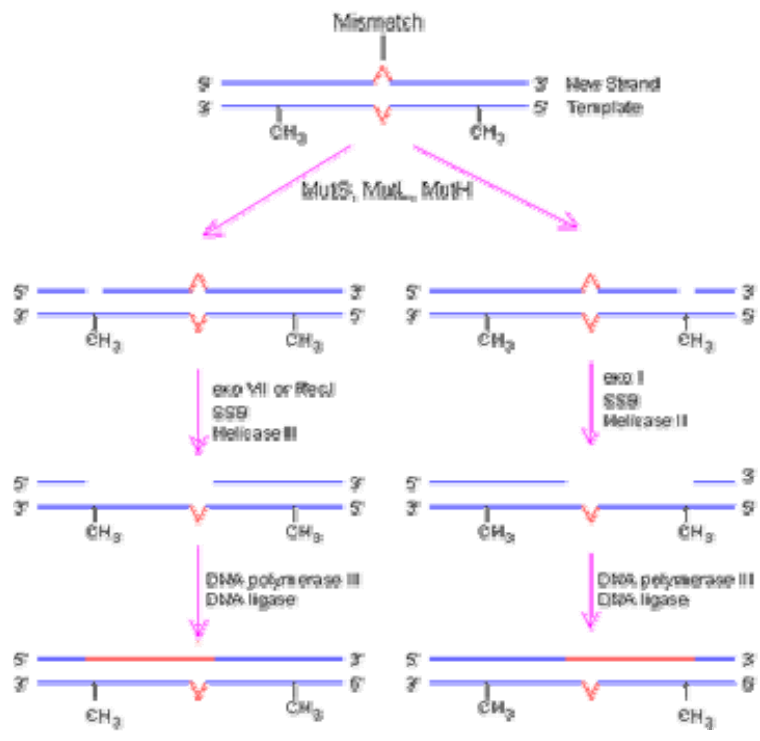
Mut L → coordina actividad de Mut S y H

En eucariotas homólogos de
proteínas Mut

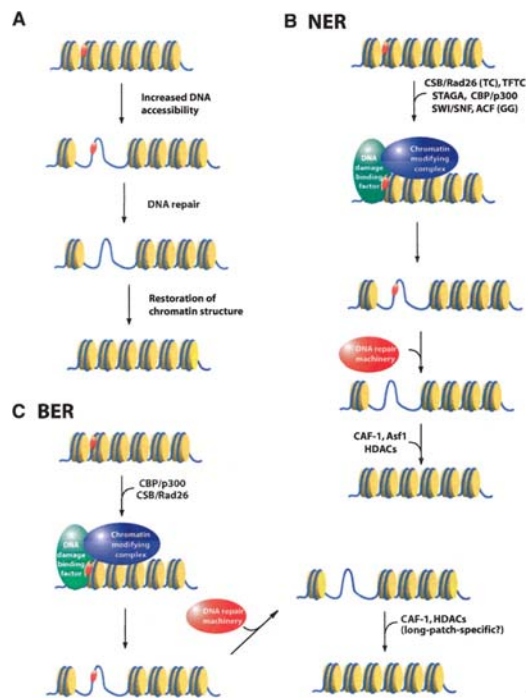


MMR





Nucleotide and base excision repair in the context of chromatin



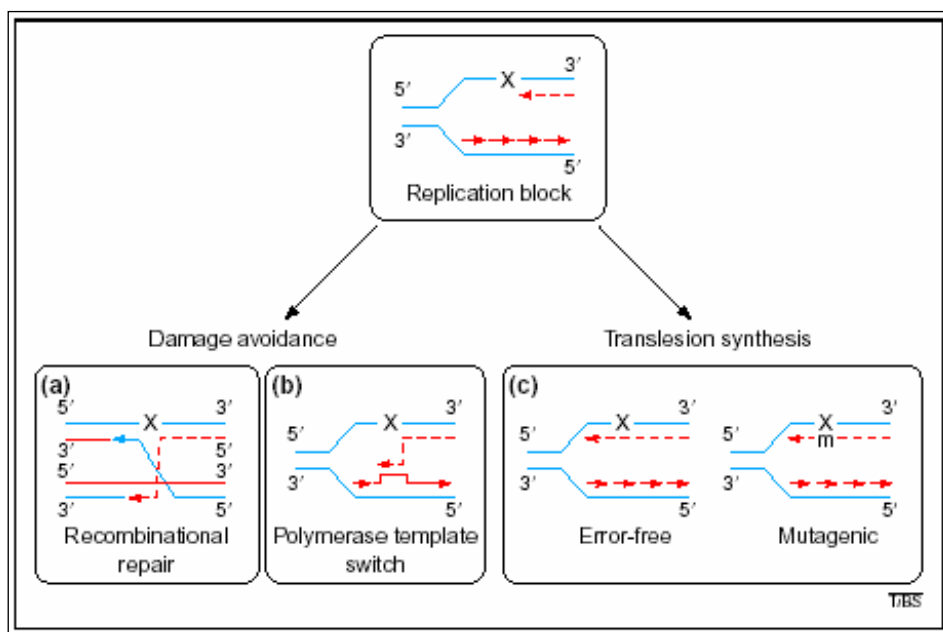
Peterson C. L., Côté J. *Genes Dev.* 2004;18:602-616



4. Sistema de Tolerancia

- ***Daños no reparados bloquean la replicación***
- ***Los sistemas de tolerancia permite pasar sobre el daño de DNA durante la replicación (bypass) con el costo de introducir mutaciones***
 - **Respuesta SOS en *E.coli***
 - **DNA Polimerasas EP en otros organismos**

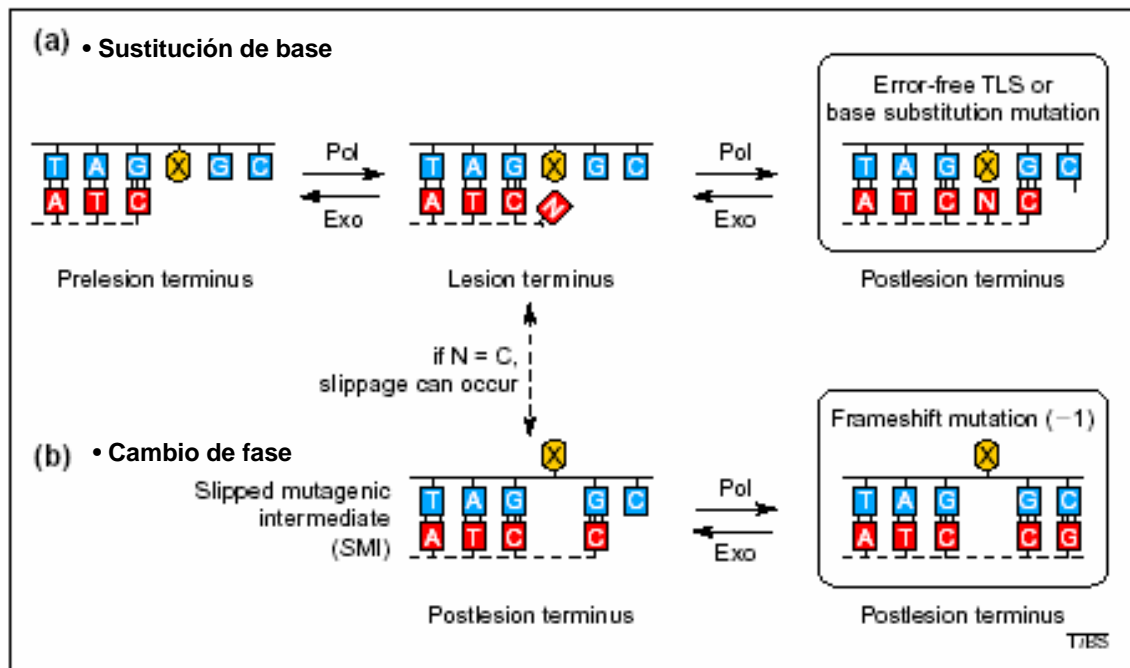
Estrategias de tolerancia al daño



Hacen uso de la información provista en la cadena complementaria → Libre de error

Síntesis a través de la lesión (TLS) → Mutagénico

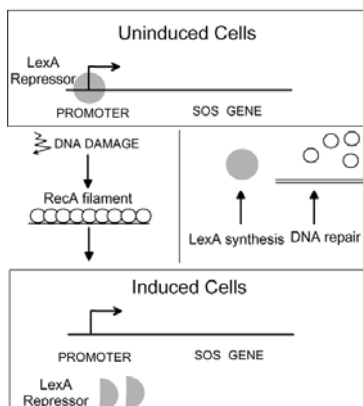
De acuerdo al tipo de daño y el entorno predominan distintos tipos de mutaciones



Sistema SOS (*E.coli*)

Activado por el frenado del complejo replicativo por daño en el DNA no reparado
→ **Desacoplamiento de replicación de cadena líder y retrasada**

The SOS response



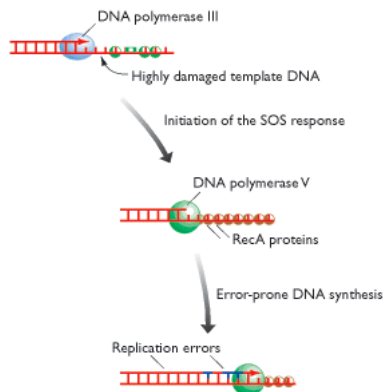
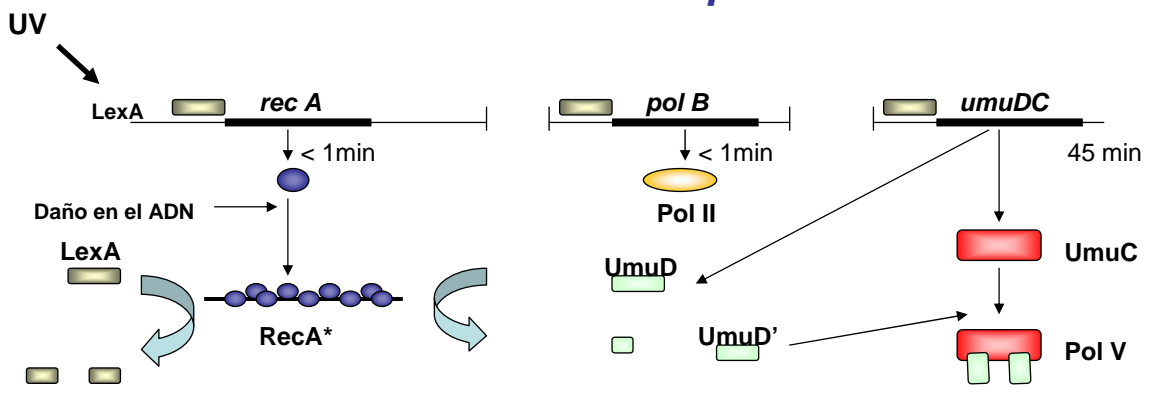
•Activación de proteína Rec A por unión a DNA sc

•Rec A * (coproteasa) → Degradación de Lex A (repressor transcripcional)

•Activación de transcripción de alrededor de 40 genes

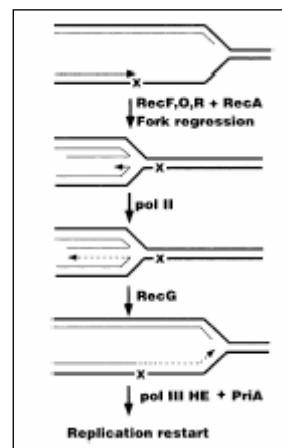
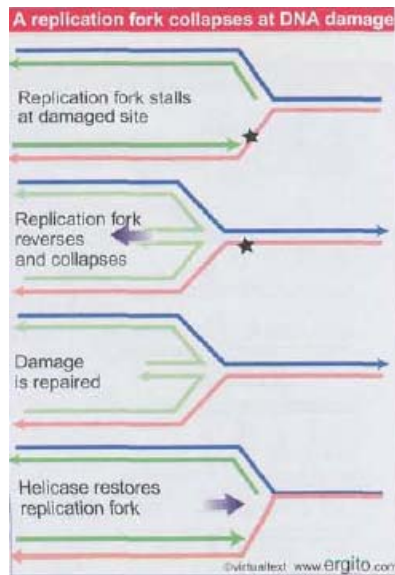
- Reparación
- Recombinación
- DNA polimerasas (DNA pol II, DNA pol V y DNA pol IV)

Inducción del sistema SOS por UV en *E. coli*



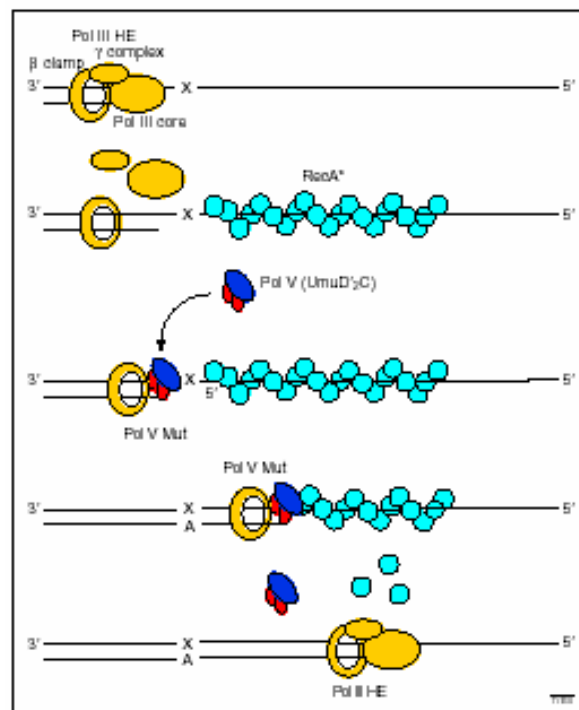
DNA pol II → libre de error

Modelo de reinicio de replicación



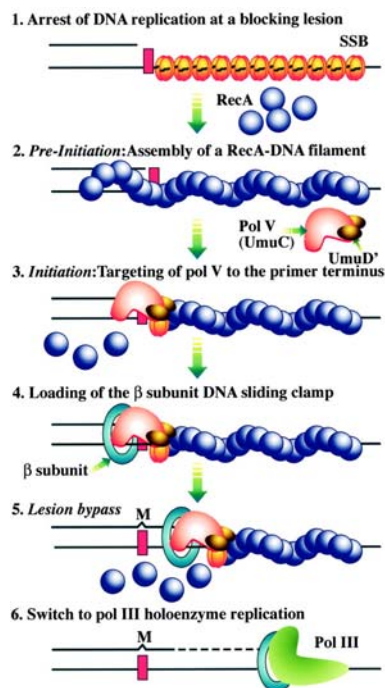
DNA polimerasa V

Síntesis de DNA a través de la lesión



Model of SOS translesion replication by DNA polymerase V. The two DNA strands are shown as green lines, and the replication-blocking lesion is represented by the red rectangle

Síntesis a través de la lesión



Livneh, Z. J. Biol. Chem. 2001;276:25639-25642

EP Polimerasas Eucariotas

- Replicación de moldes de ADN imperfectos (daños en el ADN)
- Hipermutación Somática

EP polimerasas eucariotas: aprox. 14 polimerasas distintas

6. NHEJ

Unión de extremos no homólogos

- **Mecanismo de reparación de rupturas de doble cadena (DSB)**
- **Unión de extremos con poca o ninguna homología (sin apareamiento)**
- **En eucariotas principal mecanismo de reparación de DSB**
- **Presente en eucariotas y procariotas**

Mecanismo de NHEJ

1- Reconocimiento de extremos y sinápsis

Ku: Heterodímero: Ku70 y Ku80 → forma una estructura en anillo

Sinápsis: acercamiento de los 2 extremos. Requiere Ku y DNA-PK completa (DNA-PKsc + Ku)

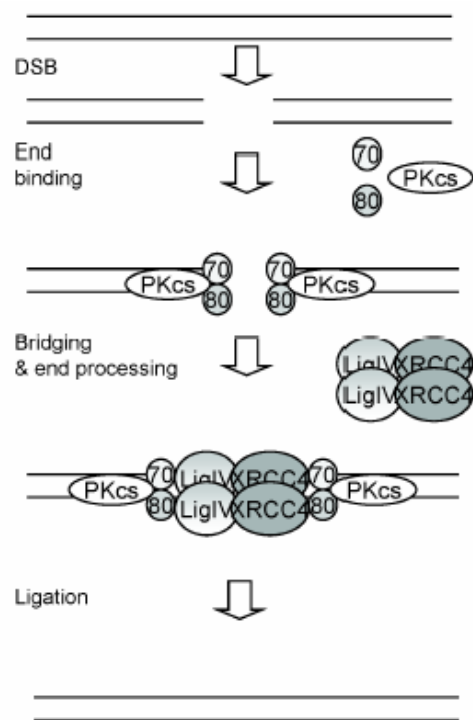
2- Procesamiento Terminal

RAD50, Mre11, Nbs1 → actividad endo y exonucleasa

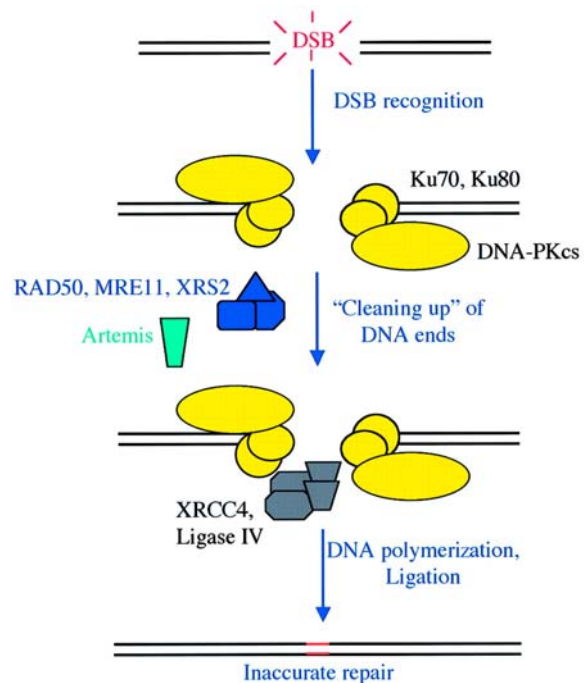
Helicasas, DNA polimerasas

3- Ligación de extremos

DNA ligasa asociada a XRCC4



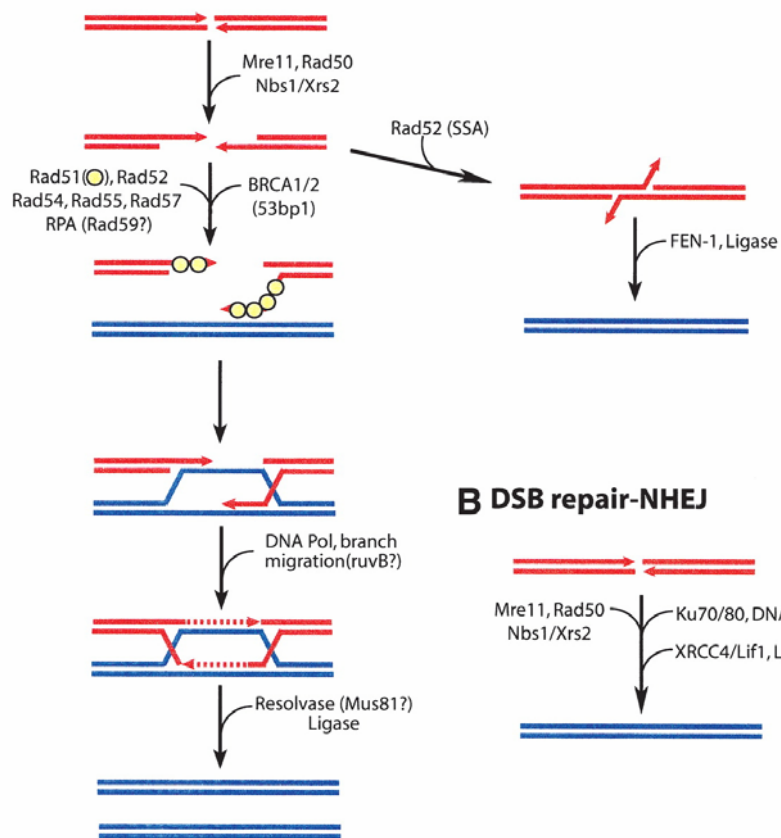
Schematic representation of the pathway of DNA NHEJ, indicating the known players in this pathway in vertebrates



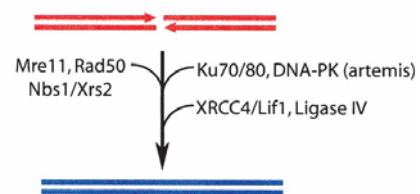
Jackson, S. P. *Carcinogenesis* 2002 23:687-696; doi:10.1093/carcin/23.5.687

Copyright restrictions may apply.

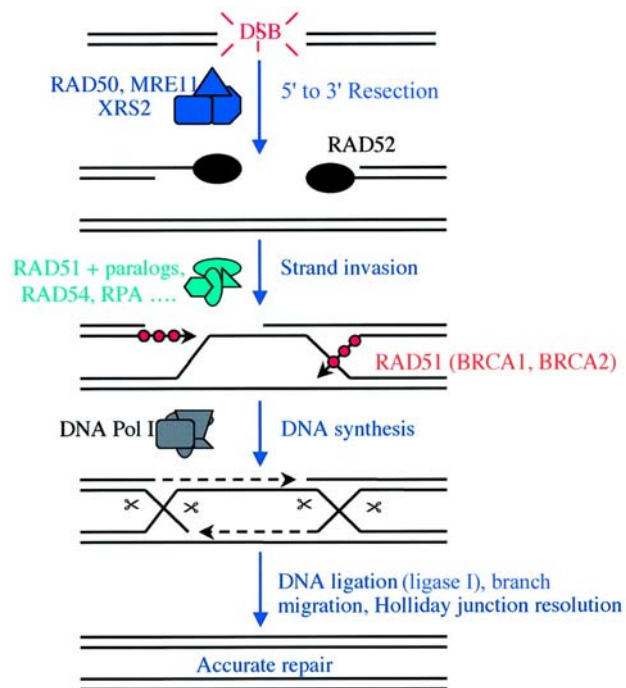
A DSB repair-HR



B DSB repair-NHEJ



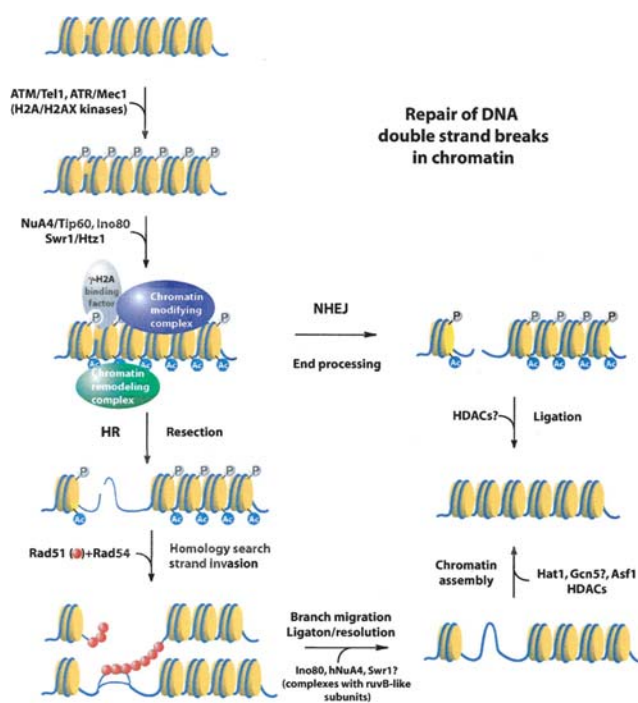
Overview of the main steps and factor requirements of the DNA DSB repair pathway of HR



Jackson, S. P. *Carcinogenesis* 2002 23:687-696; doi:10.1093/carcin/23.5.687

Copyright restrictions may apply.

Repair of DNA DSBs in chromatin



Peterson C. L., Côté J. *Genes Dev.* 2004;18:602-616

