

RADIOBIOLOGIA (AA 2010-2011)

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

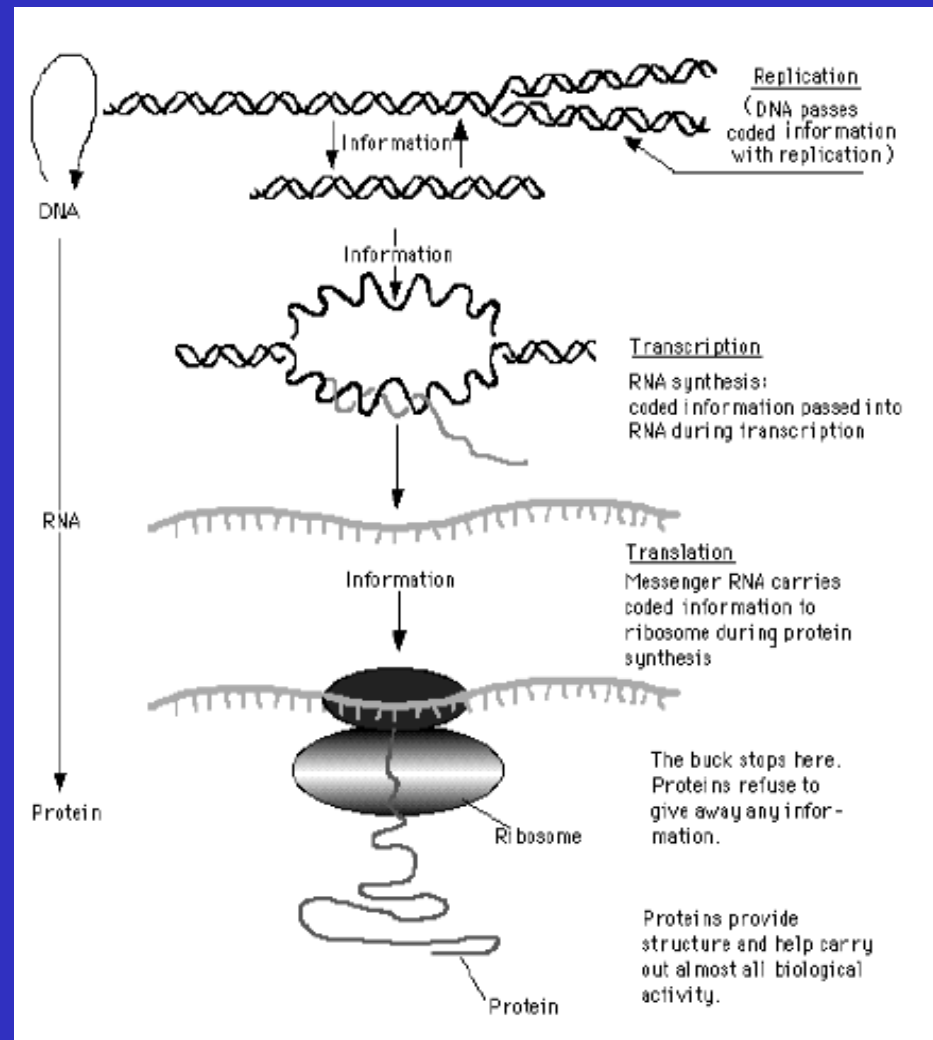
Prof. Mauro Belli

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

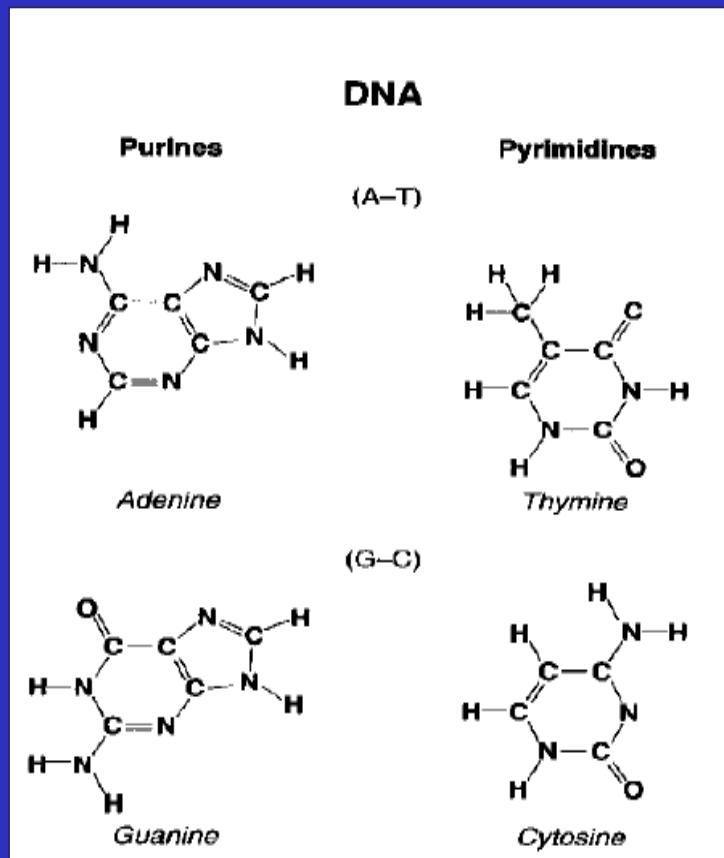
mau.belli1@gmail.com

Parte 5.
Danni al DNA

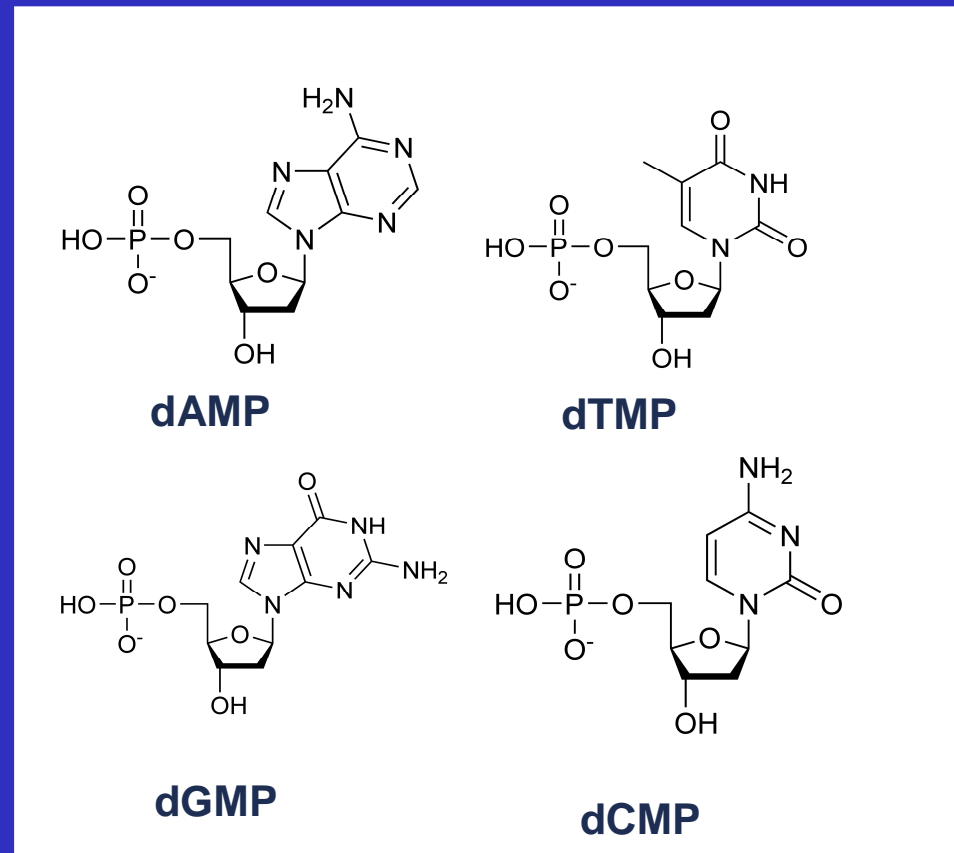
Il dogma centrale della biologia molecolare



Struttura della doppia elica del DNA – le basi e i nucleotidi

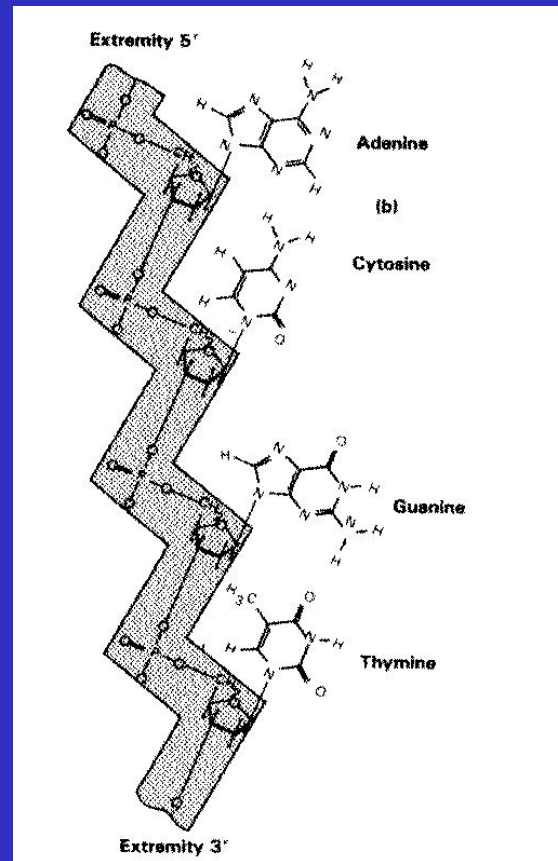


basi

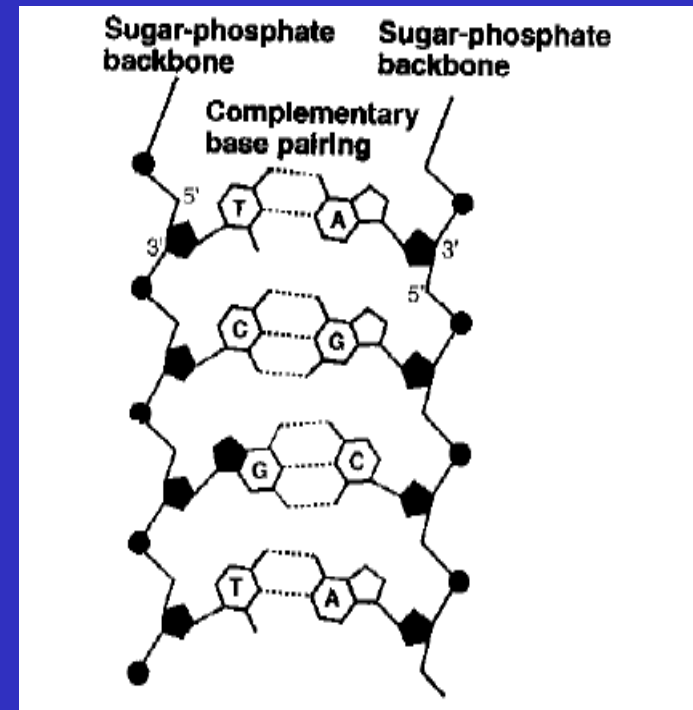


deossinucleotidi

Struttura della doppia elica del DNA



Singola elica



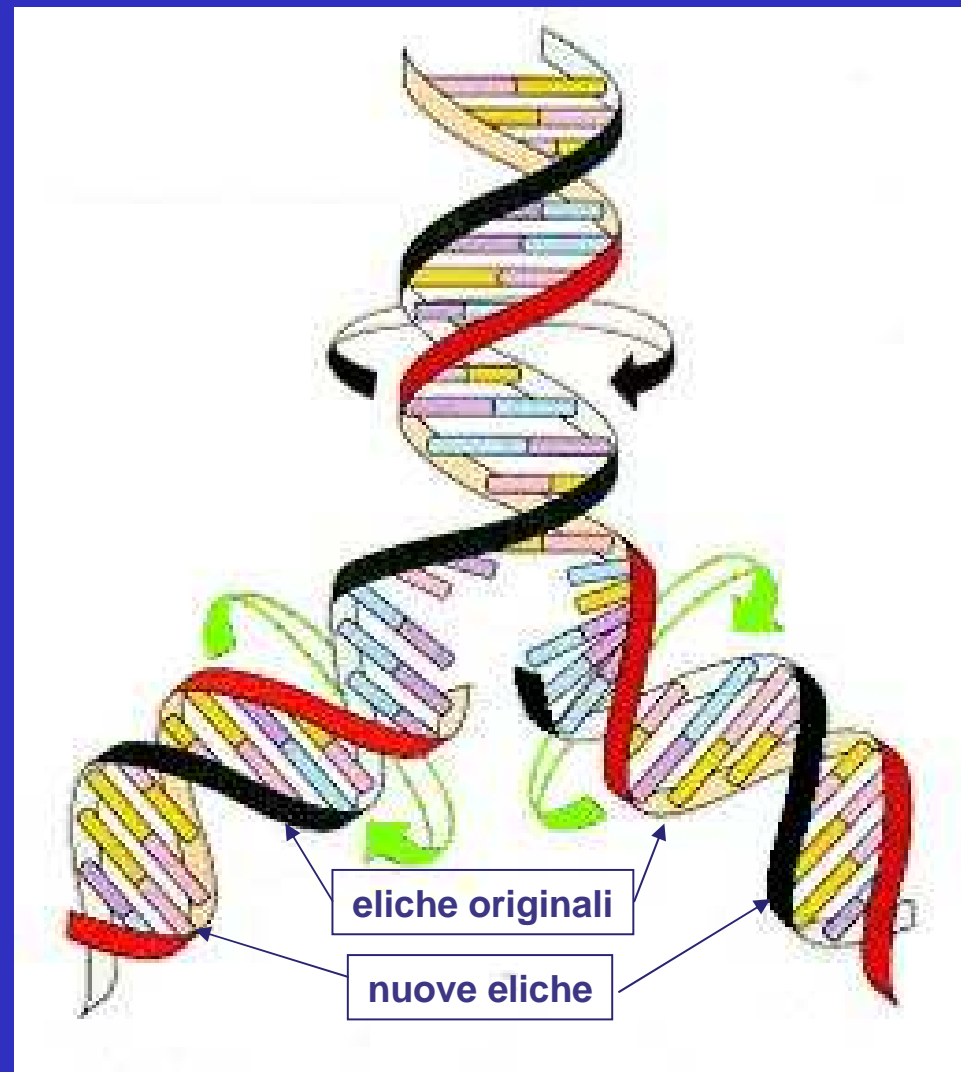
Doppia elica

Replicazione 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.

Nuove eliche



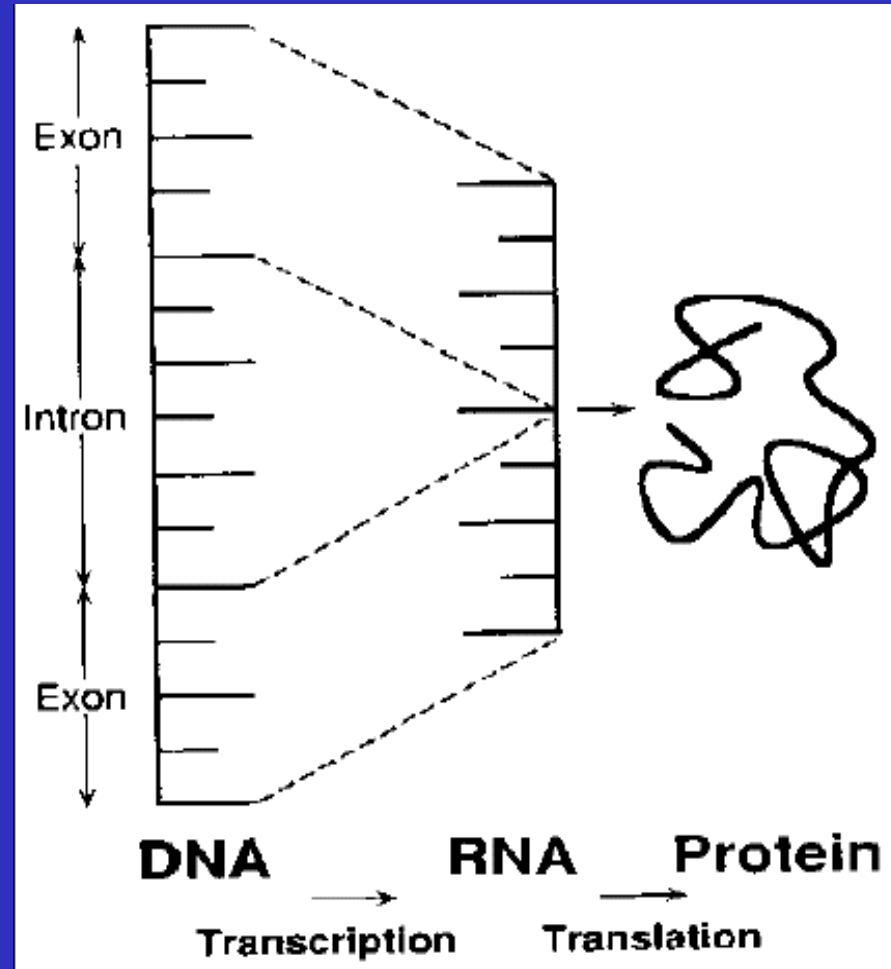
Trascrizione e Traduzione

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).

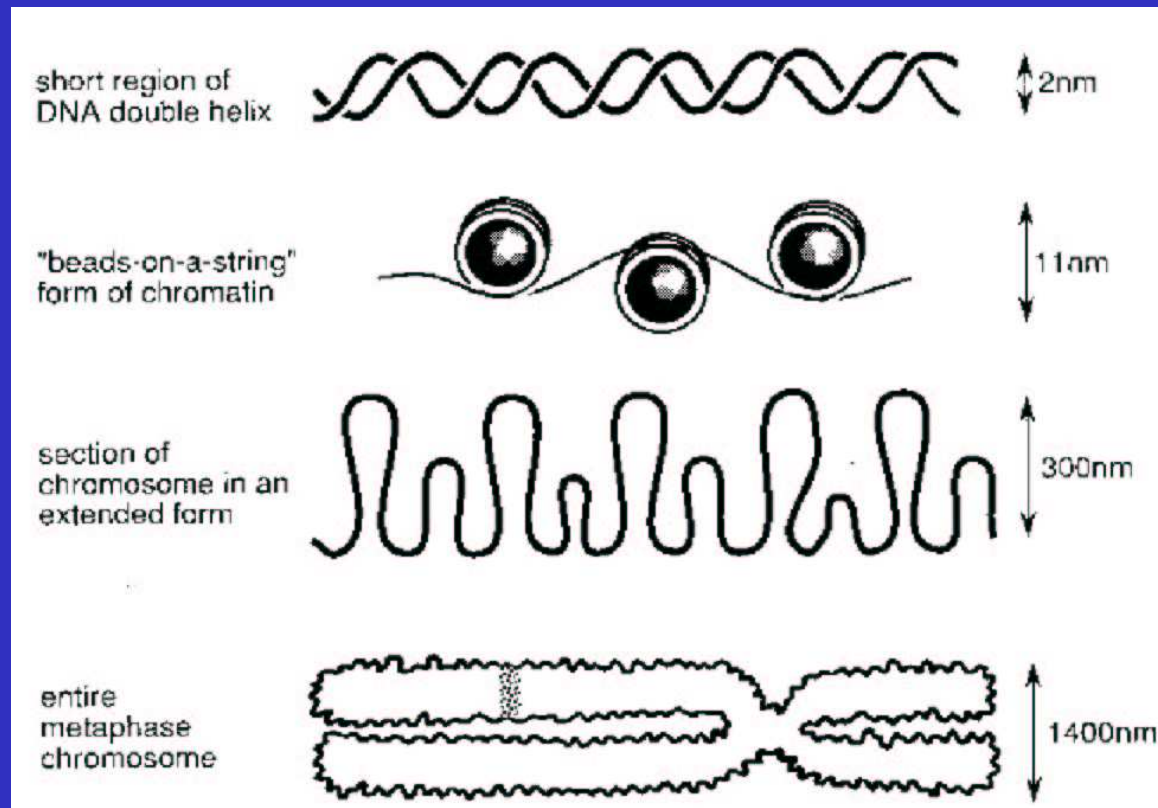
Vi sono specie animali il cui genoma ha una massa di circa un decimo di quello del genoma umano, pur avendo un numero di geni comparabile.

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.

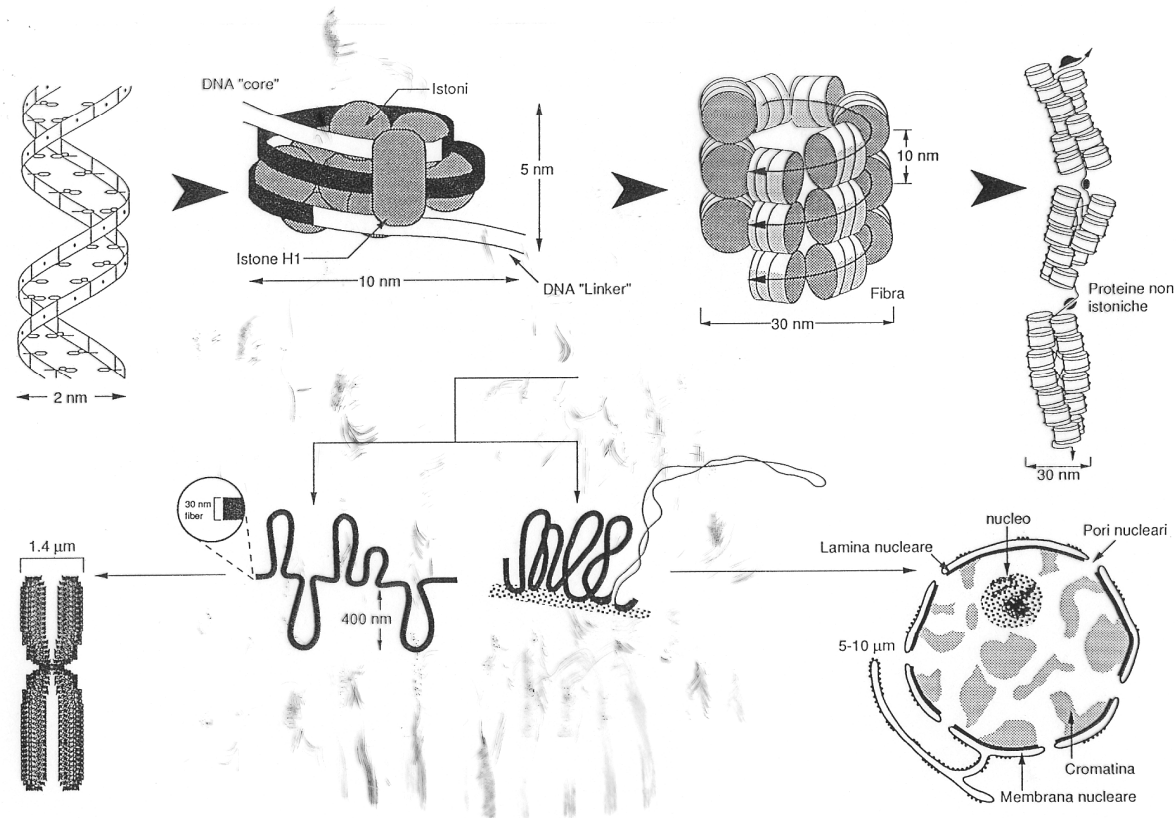
Radiosensibilità e struttura del bersaglio

- Recentemente è stata rivolta particolare attenzione non solo al DNA come molecola, ma all'intera struttura funzionale che lo contiene.
- Numerose evidenze mostrano che l'intera struttura possa influenzare sia la produzione di lesioni sia la loro riparazione. Ad esempio, il grado di compattazione della cromatina (che differisce tra cellule proliferanti e cellule differenziate) appare influenzare la radiosensibilità cellulare.
- Da ciò appare che il ripristino della corretta sequenza originaria non è l'unico requisito per una corretta riparazione, in quanto anche la corretta struttura deve essere ripristinata.

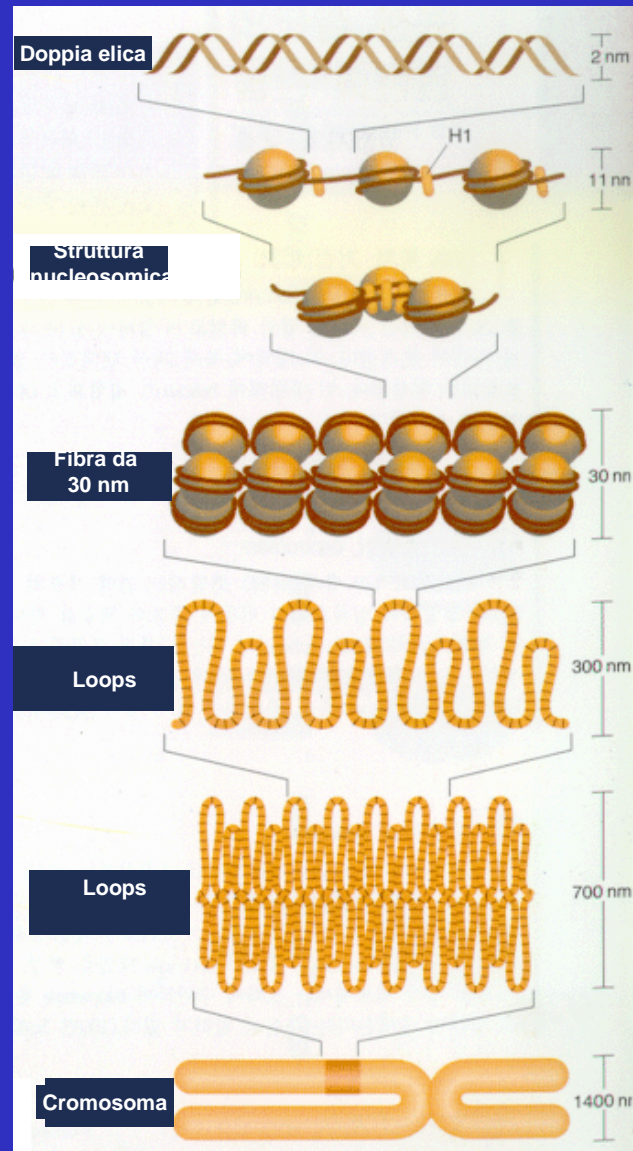
Livelli di organizzazione della cromatina



Different levels of chromatin organization



Struttura cromosomica e loops cromatinici



Nella cellula eucariota il DNA è organizzato in una struttura superavvolta che ne rende possibile la compattazione.

La matrice nucleare è la struttura che determina l'organizzazione di ordine superiore nel nucleo.

Nel nucleo eucariota, il DNA è organizzato in “loop domains”, ancorati alla matrice nucleare in modo periodico. *In vivo*, il DNA nei loop forma una struttura superavvolta negativamente.

Differenze nella densità di compattazione sono implicate nel controllo “spaziale” della replicazione e della trascrizione del DNA.

I vari livelli dell'organizzazione della cromatina

(dimensioni caratteristiche)

	dimensione	Lunghezza del DNA (bp)
doppia elica	≈ 2 nm (diametro)	10
nucleosoma	5.5 - 11 nm	165 - 245
fibra	25-30 nm (diametro)	990 - 1715
"loops"	85 - 1700 nm	10 000 - 200 000

Interazione tra struttura della cromatina e struttura di traccia

La probabilità di lesioni al DNA e la loro distribuzione spaziale è determinata dall'interazione tra la struttura di traccia delle RI e la struttura della cromatina

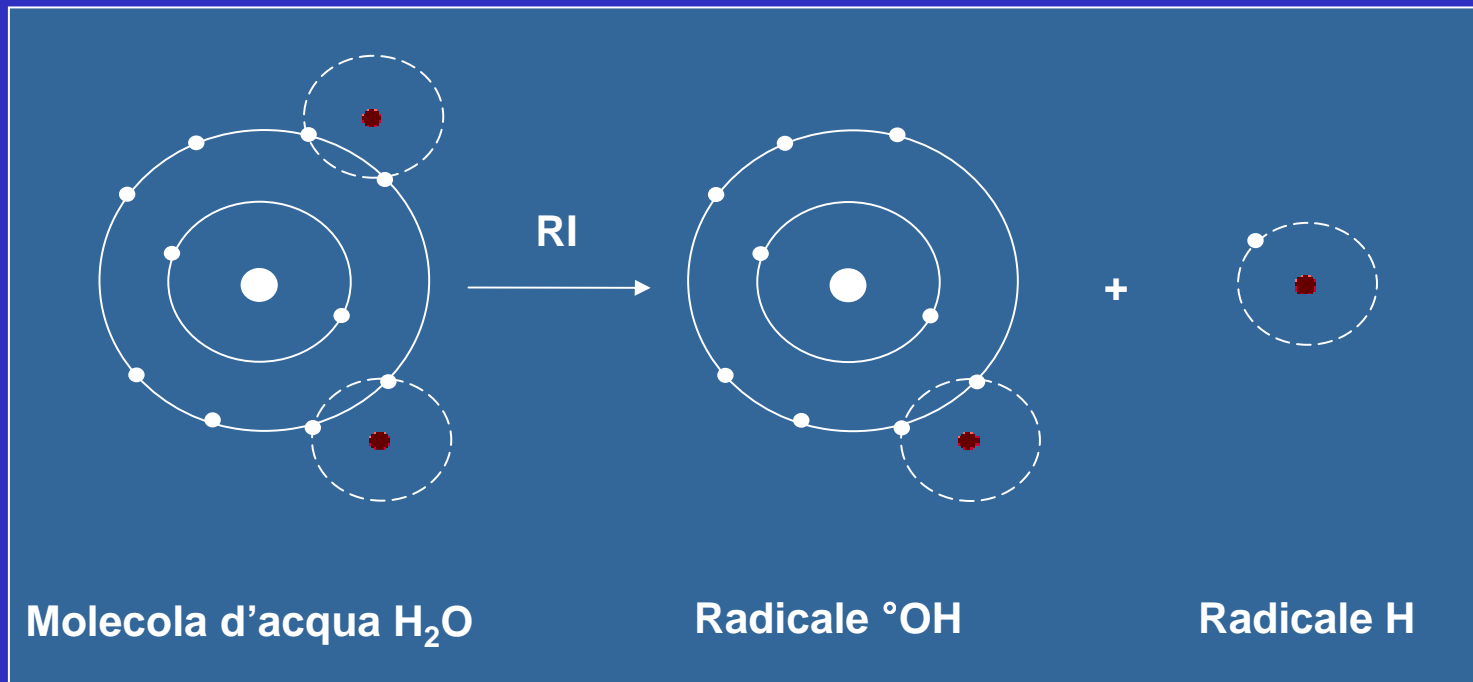
Azione diretta ed indiretta

A seguito delle eccitazioni e ionizzazioni prodotte negli atomi e nelle molecole della materia biologica attraversata, le RI producono modificazioni nel DNA attraverso due meccanismi:

- per **azione diretta** (modificazione dei legami chimici direttamente nella molecola di DNA)
- per **azione indiretta** (attacco dei radicali liberi prodotti nella radiolisi dell'acqua); importanti specie chimiche prodotte per azione indiretta sono le ROS (Reactive Oxygen Species)

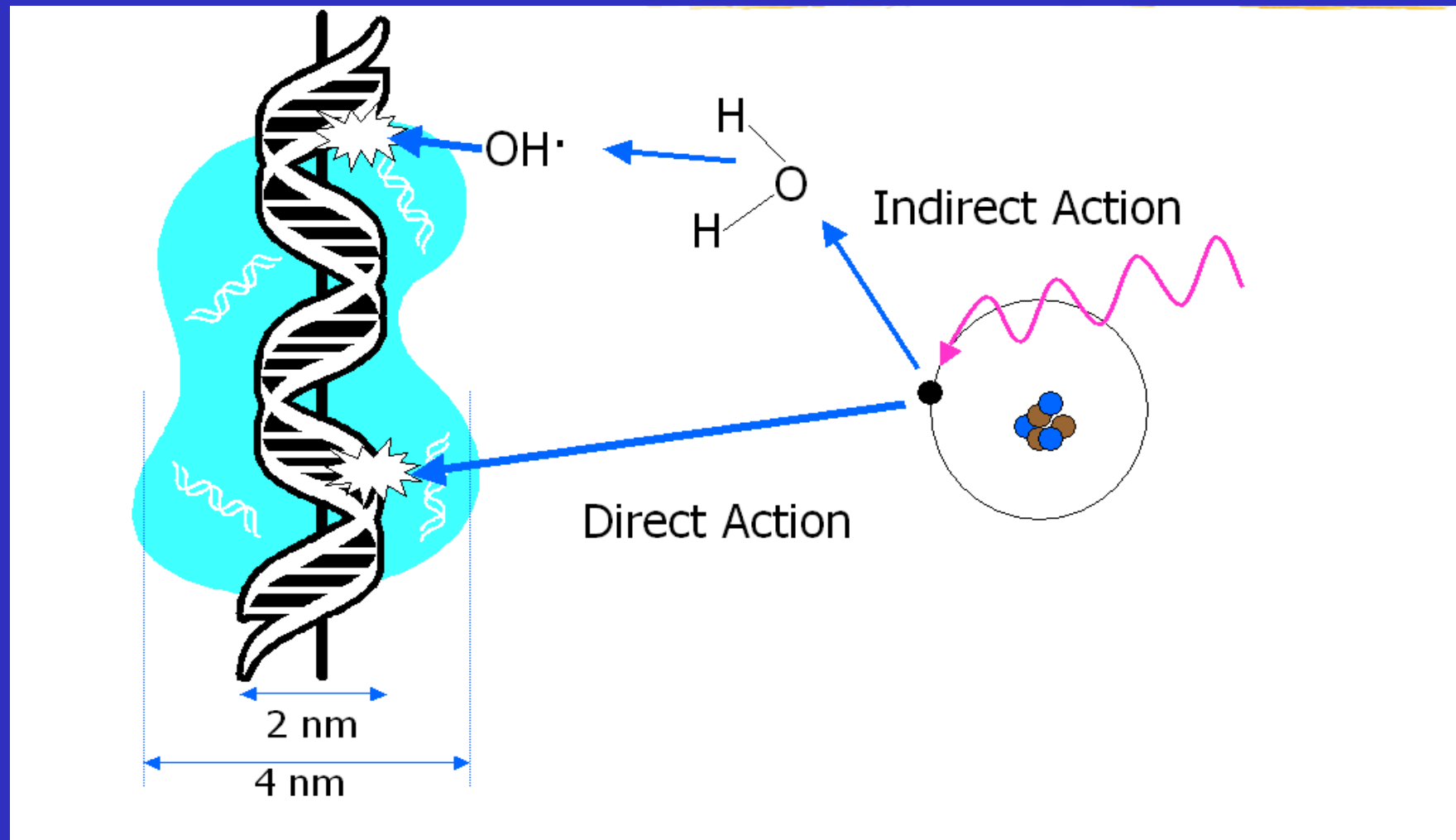
Attraverso una catena di reazioni chimiche le modificazioni chimiche transienti a carico del DNA possono essere trasformate in modificazioni chimicamente stabili (“lesioni”)

Radiolisi dell'acqua (1)

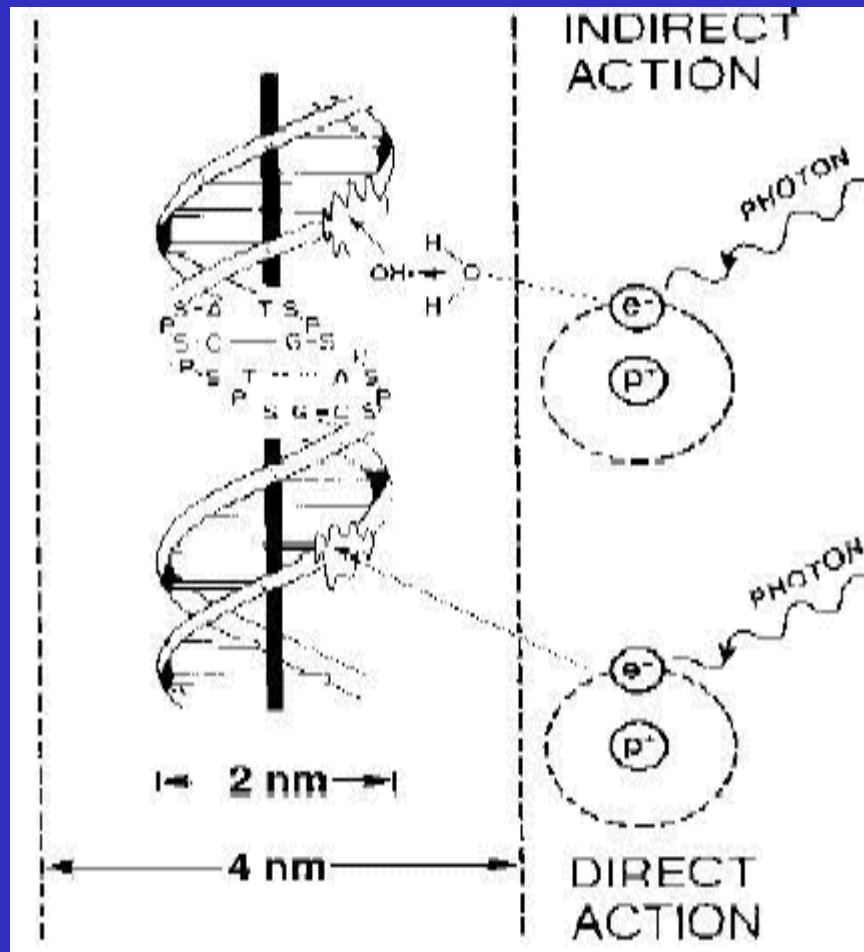


Schema semplificato della produzione di radicali liberi per effetto della radiolisi di una molecola d'acqua

Azione diretta e indiretta della radiazione sulle biomolecole



Direct and indirect actions of radiation



Direct action is completed in about 10^{-15} s

OH·, the hydroxyl free radical, is highly reactive and diffuses in tissue within a cylinder about 4 nm in diameter (about double the diameter of a DNA double helix)

It causes about 50-75% of all biological damage induced by sparsely ionising radiation
Indirect action is usually completed in 10^{-12} to 10^{-9} s

Radiolisi dell'acqua (2)

Radiolisi: complesso delle trasformazioni che una sostanza subisce per effetto delle radiazioni.

Le principali reazioni sono:



L'elettrone perde progressivamente energia cinetica sino ad essere catturato da molecole d'acqua (fortemente polari). Prende allora il nome di elettrone "acquoso" o "solvatato", e^-_{aq} , ed è un potente **riducente**.

Altre importanti reazioni sono:



L'acqua ossigenata H_2O_2 è un potente **ossidante**.

Oltre alla ionizzazione, si può verificare l'eccitazione delle molecole d'acqua, le quali possono in parte dissociarsi:



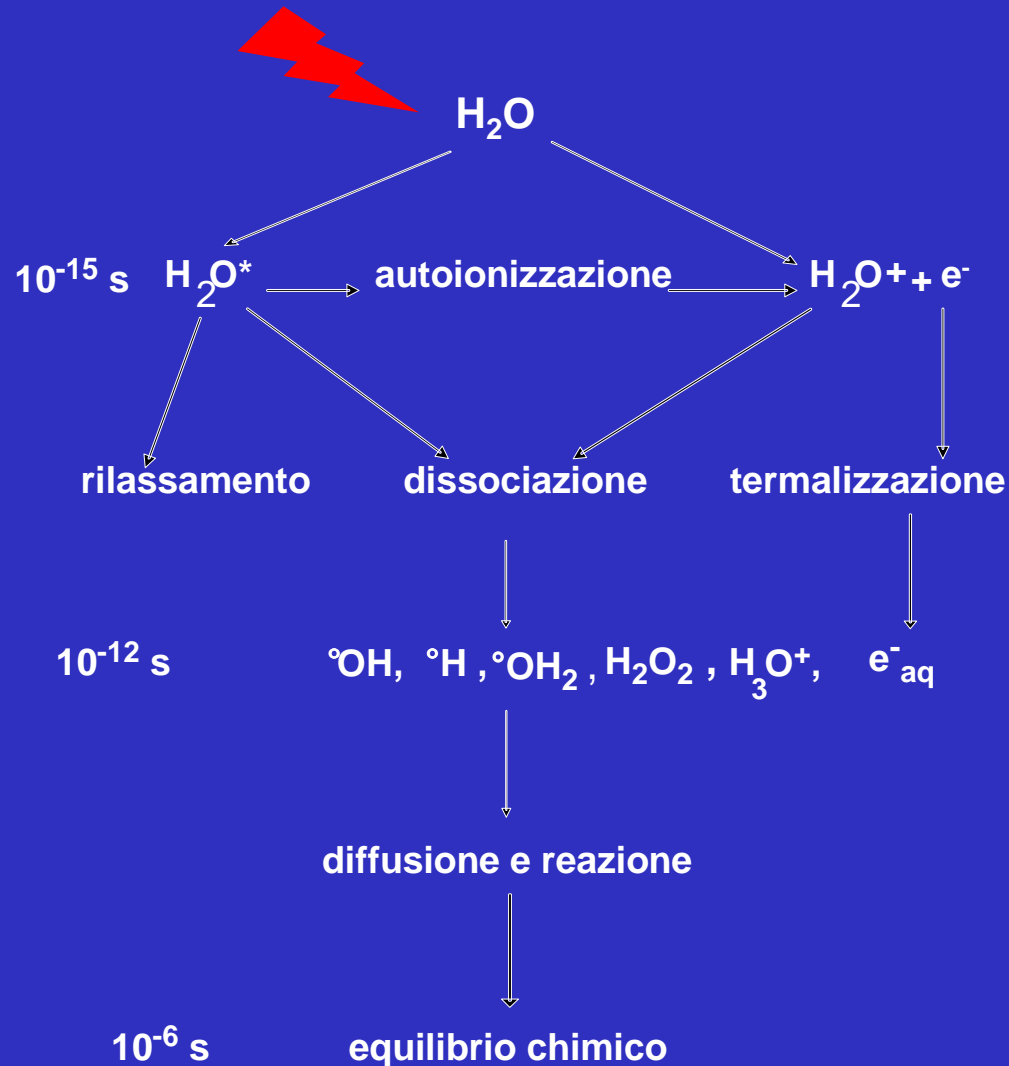
Radiolisi dell'acqua (3)

Resa radiochimica (o rendimento radiochimico) G per le principali specie formate nella radiolisi dell'acqua da parte di radiazioni sparsamente e densamente ionizzanti. G è definito come numero di moli formato per effetto dell'assorbimento di 100 eV.

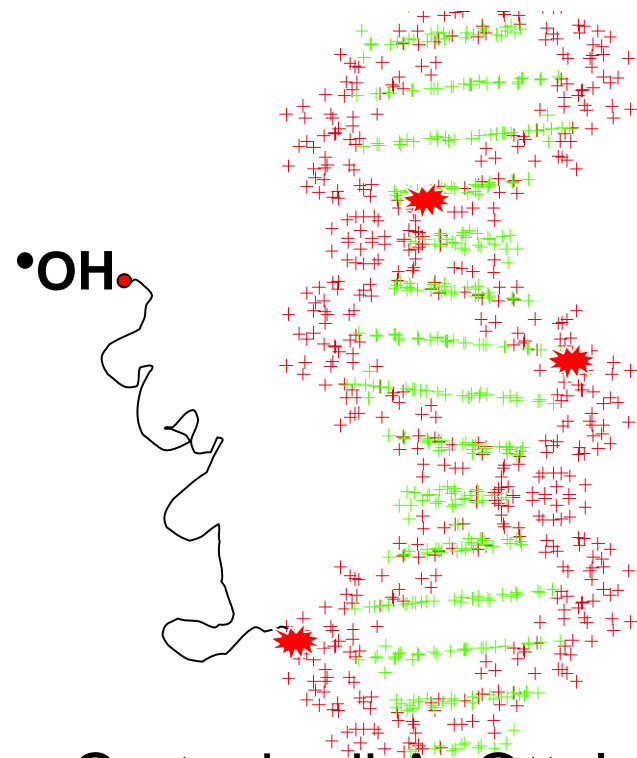
Radiazione	e^-_{aq}	$^{\circ}OH$	H°	H_2	H_2O_2
Raggi γ	2.63	2.72	0.55	0.45	0.68
Particelle α ($L=108 \text{ keV}/\mu\text{m}$)	0.42	0.54	0.27	1.11	1.08

La ricombinazione dei radicali dipende dalla loro densità

Ad alto LET diminuisce l'importanza dell'effetto indiretto (via radicali dell'acqua)



La “clusterizzazione” delle ionizzazioni ed eccitazioni aumenta la probabilità di ricombinazione



Cortesia di A. Ottolenghi

Reazioni dei radicali acquosi con bersagli biologici

- Deidrogenazione e idrossilazione dovute al radicale $^{\circ}\text{OH}$



- Deidrogenazione dovuta al radicale H° e formazione di nuovi composti



- Addizioni radicaliche



Reazioni dei radicali radioindotti in presenza di O₂

- radicali acquosi



Costituiscono le cosiddette ROS (Reactive Oxygen Species)

- radicali organici



etc.

I radicali perossido non sono reversibili

Reazioni dei radicali radioindotti in presenza di composti tiolici

Composti contenenti

- il gruppo sulfidrilico RSH
- il ponte disolfuro RS-SR₁

sono radioprotettori, **attraverso** due diversi meccanismi:
competizione **o** restituzione

- Protezione competitiva



- Protezione restitutiva



SOMMARIO (1)

(take home message)

- **Le RI producono modificazioni dei legami chimici nella materia attraversata per effetto di eccitazioni e ionizzazioni negli atomi e nelle molecole**
- **Il DNA è il bersaglio cellulare più importante delle radiazioni ionizzanti**
- **Le RI producono modificazioni nel DNA per azione diretta e per azione indiretta (attacco dei radicali liberi prodotti nella radiolisi dell'acqua); importanti specie chimiche prodotte per azione indiretta sono le ROS (Reactive Oxygen Species)**
- **Attraverso una catena di reazioni chimiche le modificazioni chimiche transienti a carico del DNA possono essere trasformate in modificazioni chimicamente stabili (lesioni)**

SOMMARIO (2)

(take home message)

- La presenza di certi composti (ad es. composti tiolici) durante questo processo può riparare chimicamente il danno
- La presenza di ossigeno favorisce invece la fissazione del danno:

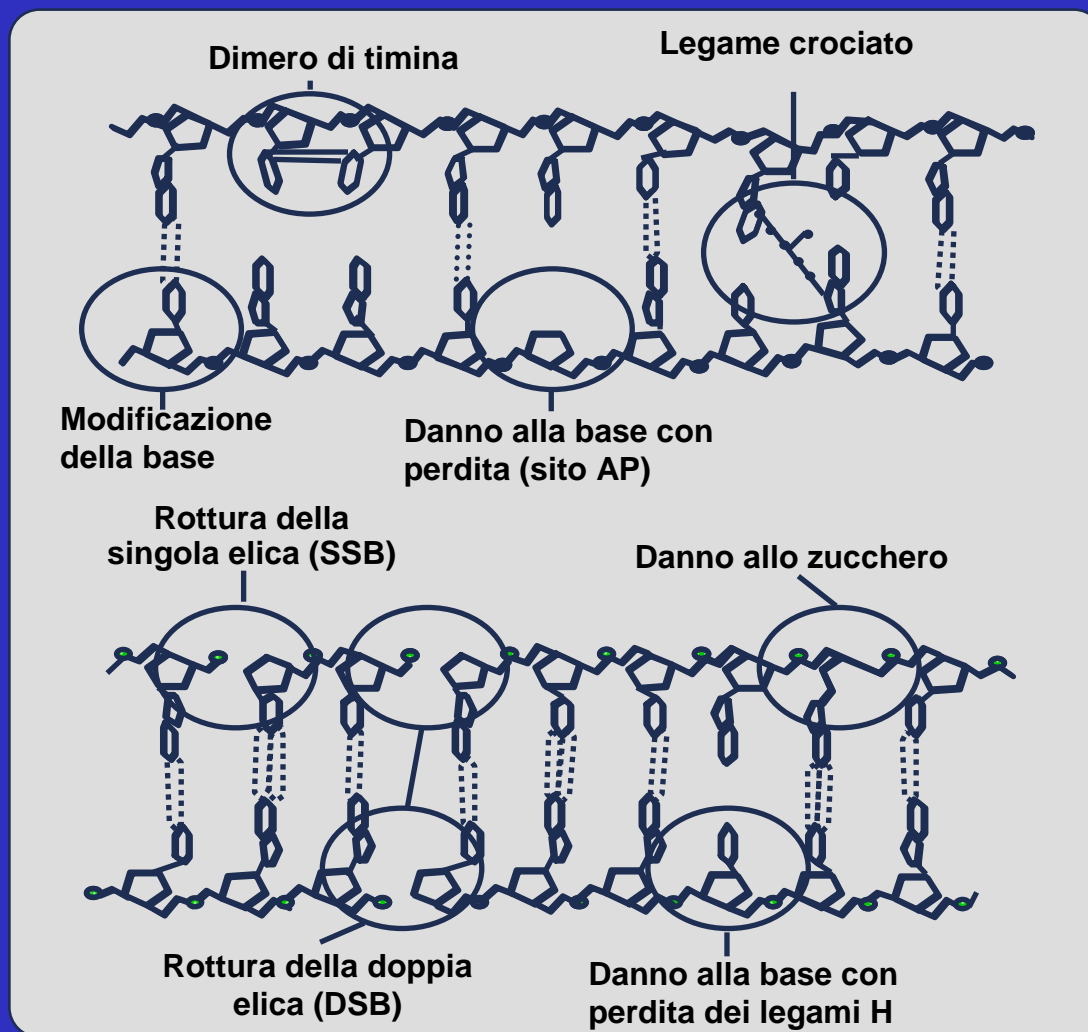


Lesioni al DNA

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 Sapor, 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

Induzione di lesioni sul DNA

Attualmente (2005) vi sono convincenti evidenze che l'induzione di DSB e SSB in sistemi cellulari sia lineare con la dose, anche a dosi elevate (alcune centinaia di Gy)

Valore tipico del numero di lesioni per Gy per unità di massa di DNA per radiazione sparsamente ionizzante in cellule di mammifero:

Resa in DSB: $y_{\text{DSB}} \cong 5 / 10^9 \text{bp.Gy}$ (*Prise et al Int. J. Radiat. Biol. 1998*)

n DSB/cellula: $\cong 40$

n SSB/cellula: $\cong 1000$

$(y_{\text{DSB}} / y_{\text{SSB}} \cong 1/25)$

Considerando che il valore tipico della frazione di cellule sopravvivenenti a 1 Gy è $\cong 0.5$ si deduce che le cellule possono sopravvivere all'induzione di un numero relativamente elevato di lesioni.

SSB e DSB non sono necessariamente tutte letali.

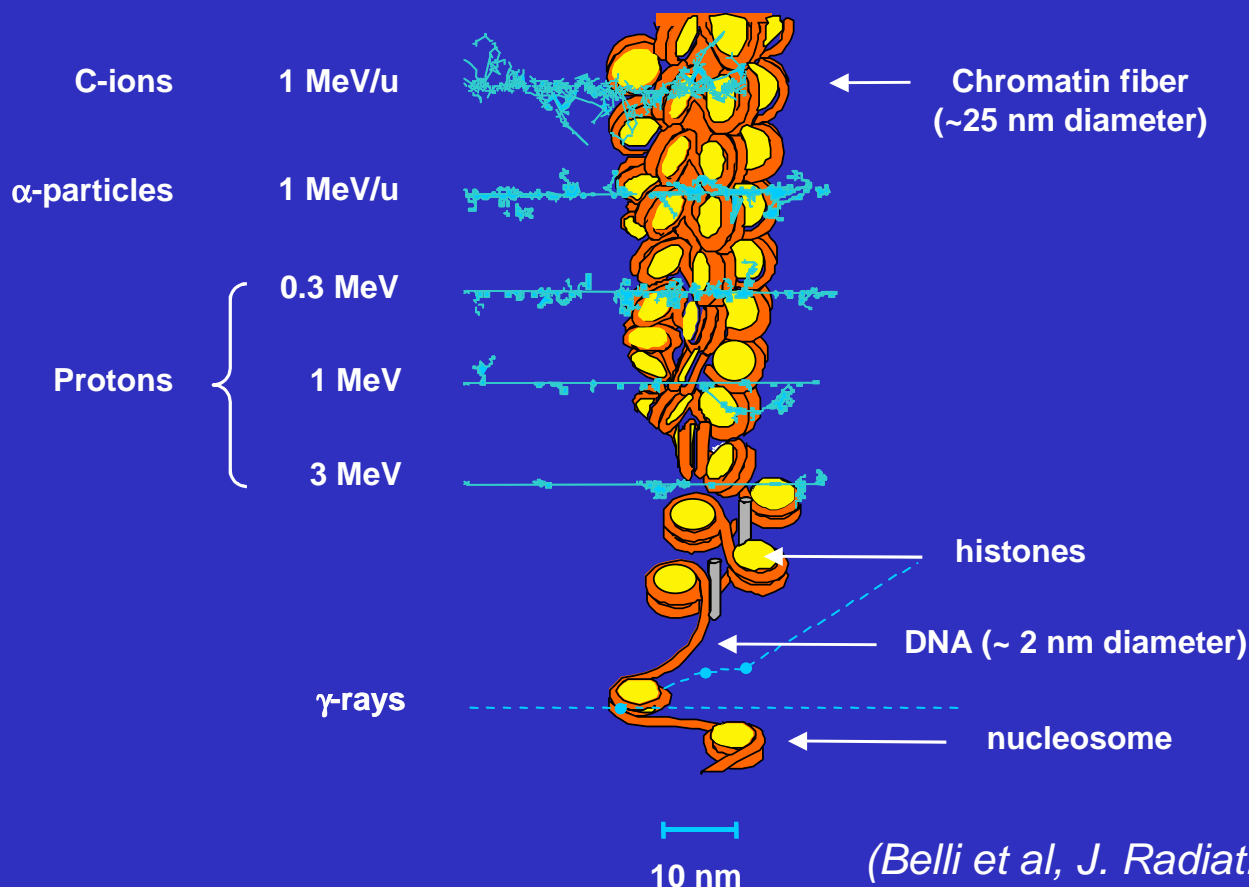
Esse possono essere riparate, in tutto o in parte, dai sistemi riparativi cellulari (sistemi enzimatici)

Induzione di lesioni sul DNA

- Il rapporto tra y_{DSB} e y_{SSB} dipende dal tipo di radiazione.
- Per radiazioni densamente ionizzanti (alto LET) tende ad essere più elevato del valore 1/25

Distribuzione microscopica dell'energia: cluster di ionizzazioni nel bersaglio

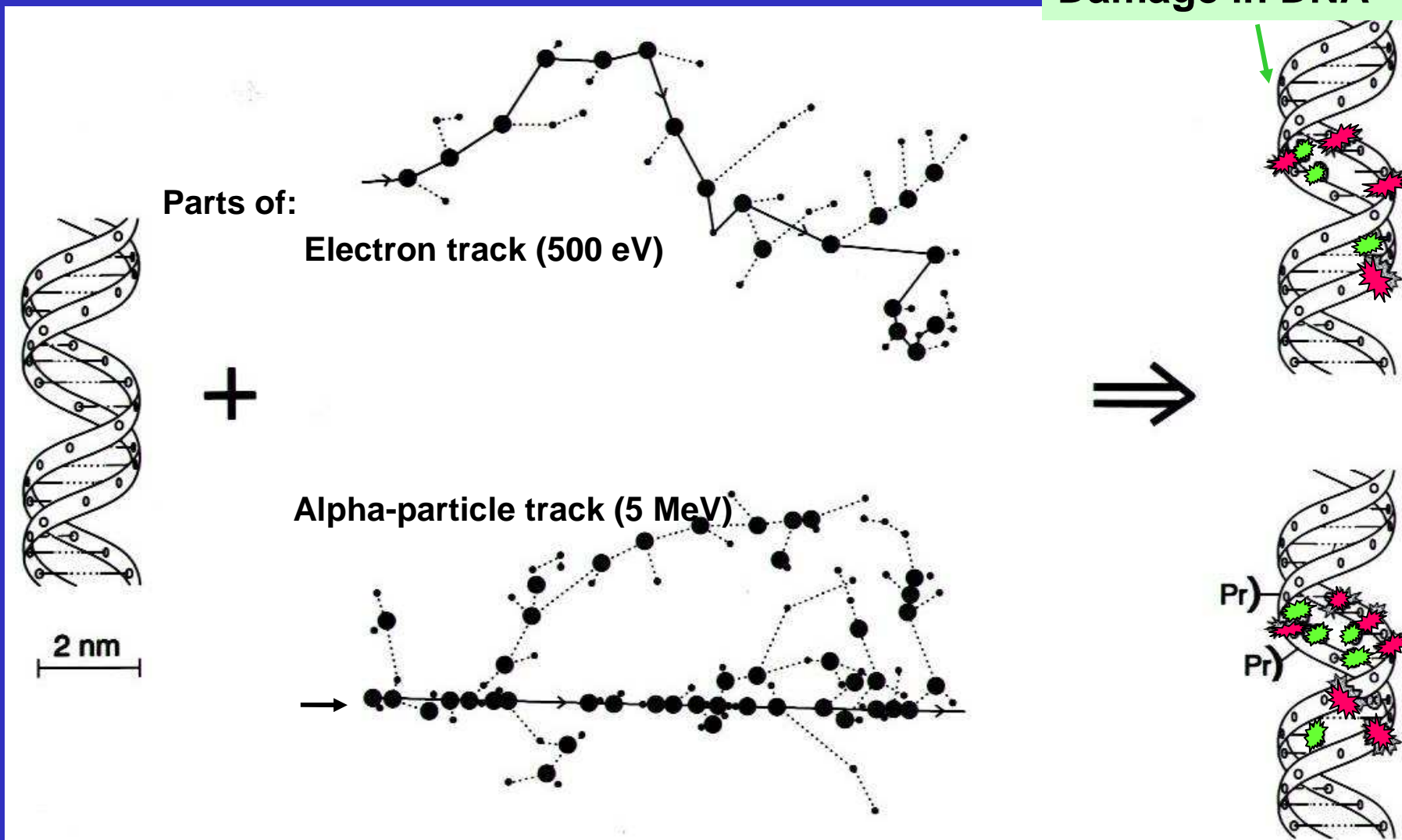
INTERPLAY TRACK - CHROMATIN (at the nucleosome/fiber levels)
Clustered DNA damage - Reparability of DNA lesions



(Belli et al, J. Radiat. Res, 2002)

Single tracks of 'low'- LET or high- LET radiation can produce Complex Clustered Damage in DNA

Two examples of Complex Clustered Damage in DNA



[Goodhead, IJRB 65, 7 (1994)]

Lesioni raggruppate e DSB complesse

**Lesioni raggruppate sul DNA (clustered DNA
lesions/damage)**

=

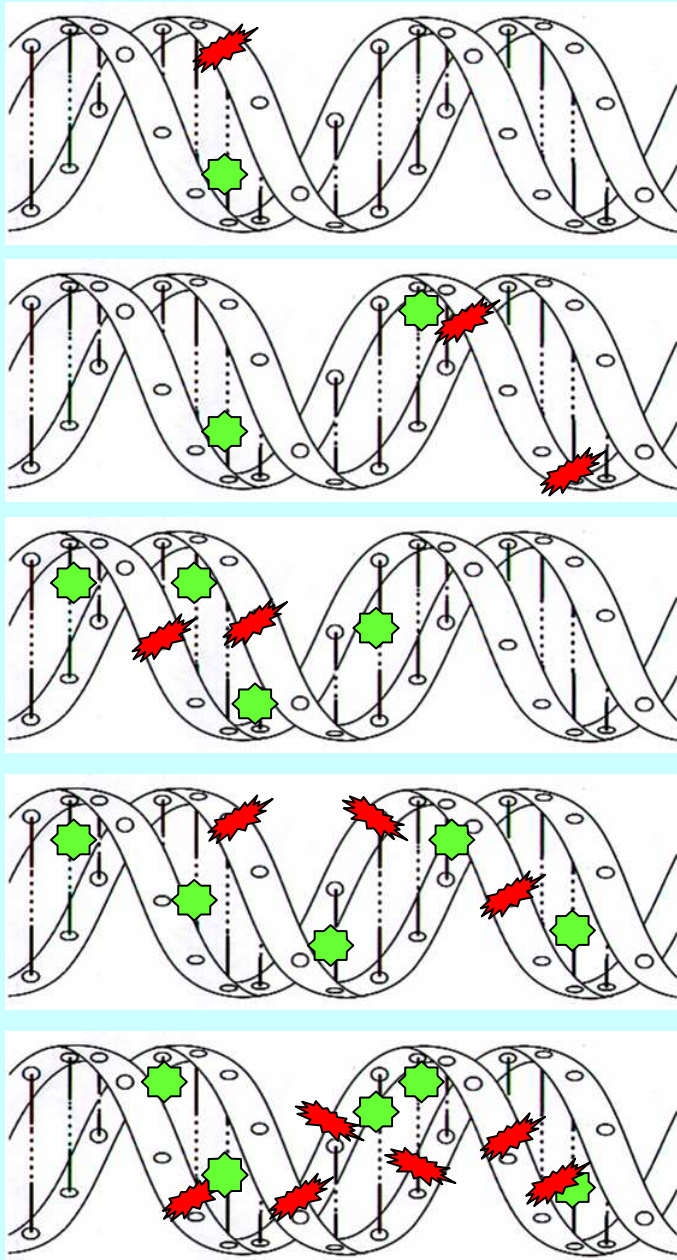
**lesioni di varia natura (DSB e/o SSB e/o BD,...) in una
regione limitata di DNA**

DSB complesse (complex DSB)

=

DSB affiancate da altre DSB e/o SSB e/o BD,...

Clustered DNA damage

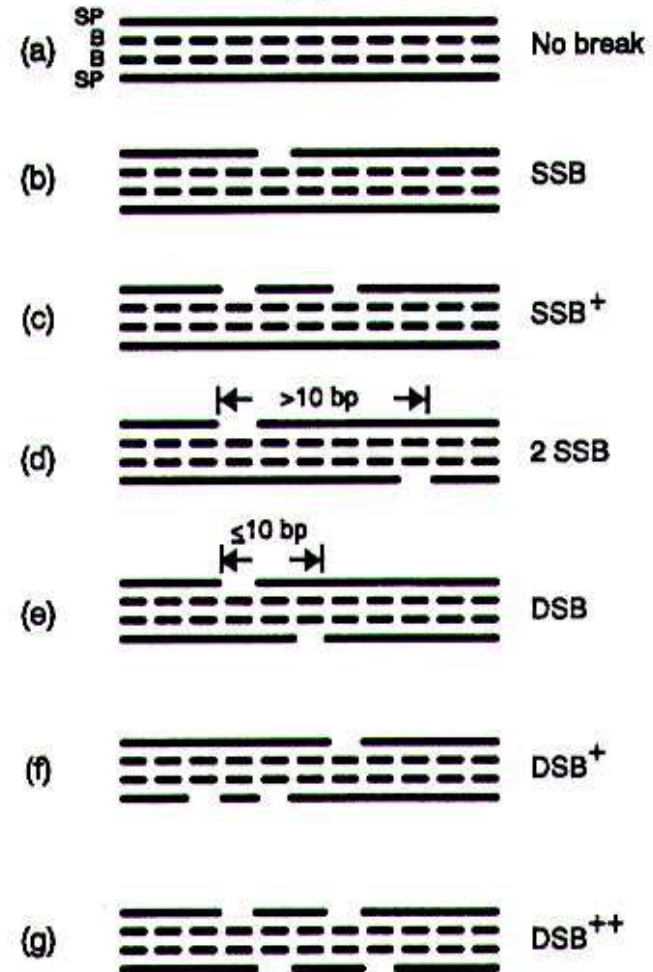


Breakage Classification scheme

(Charlton & Humm, IJRB 53, 353 (1988),
Nikjoo et al, IJRB 71, 467 (1997))

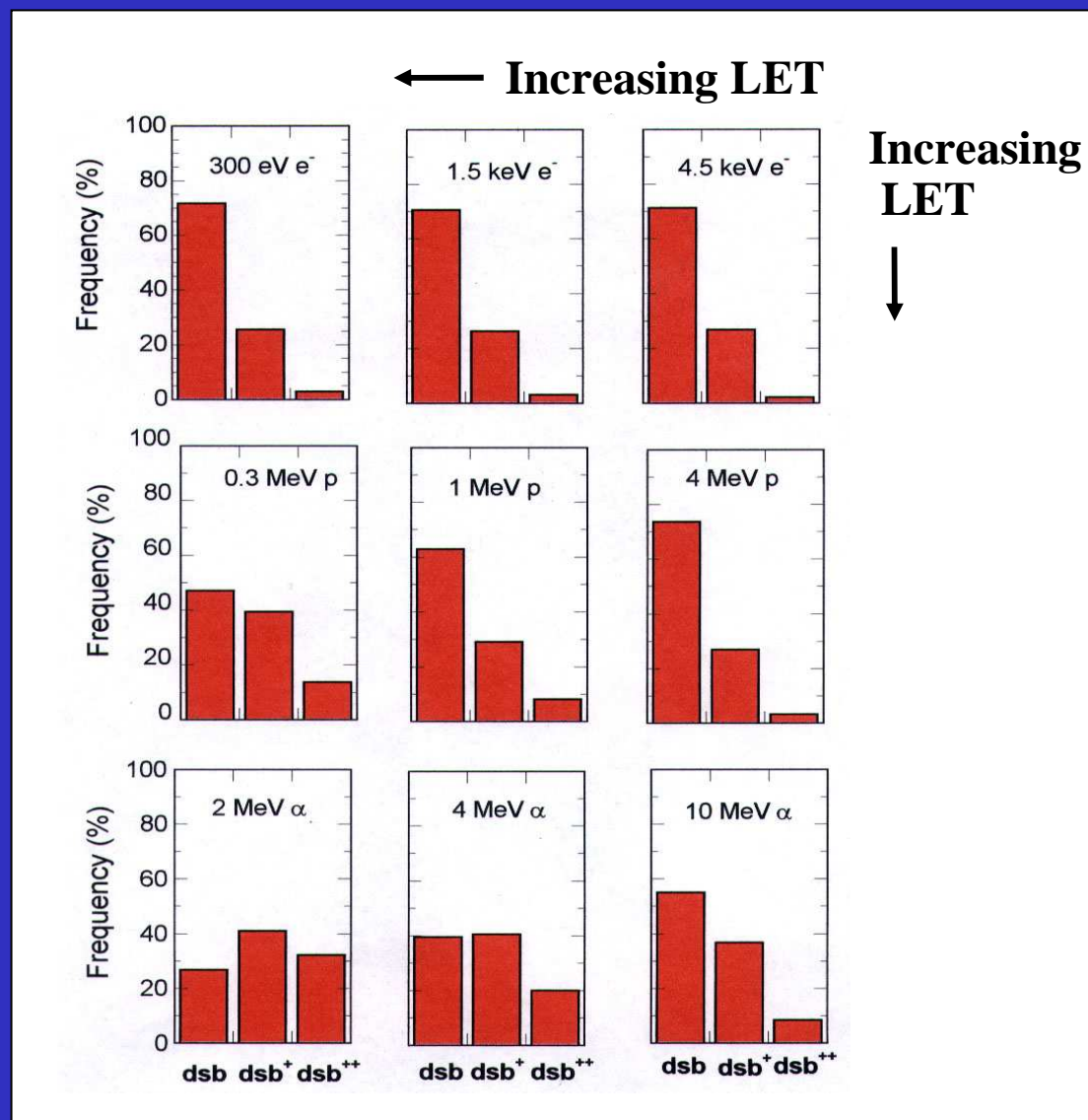
Classification of breaks by complexity

(A)



Note: Base damage is not included in this scheme

Complexity of DSB

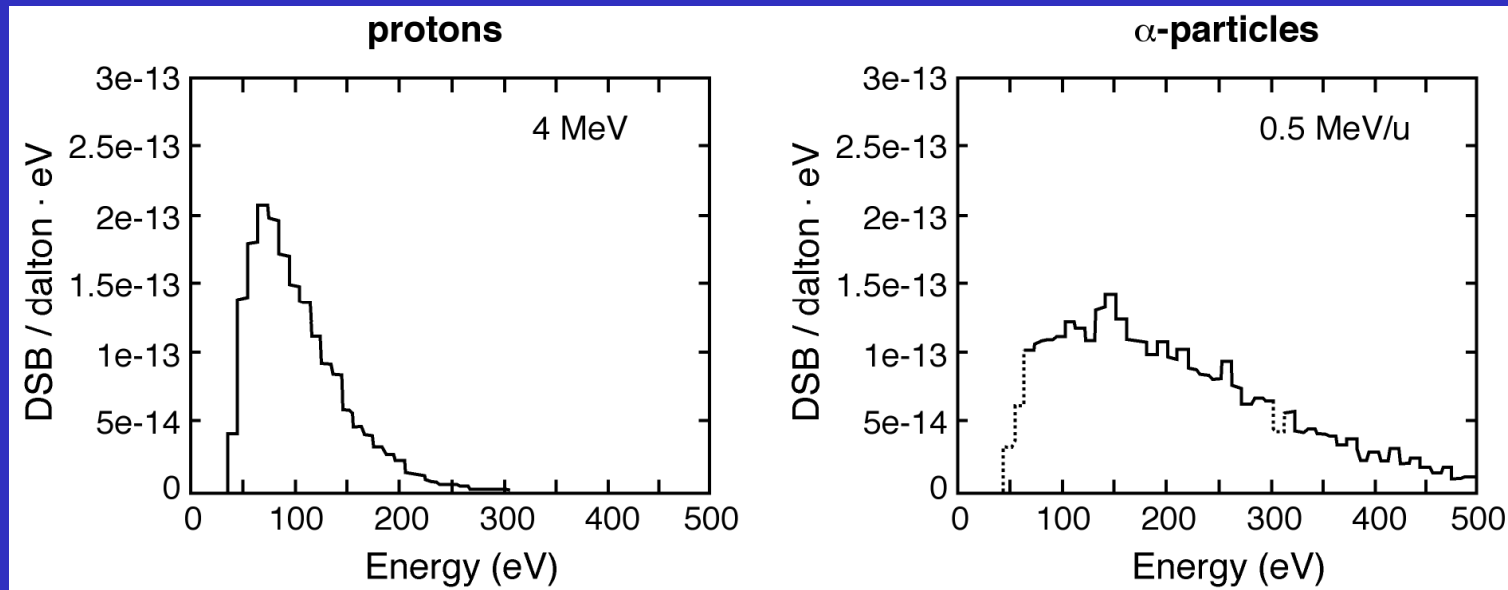


The proportion of Complex* DSB increases with increasing LET; and the degree of complexity increases.

*Only strand breaks are considered in these diagrams, not base damages

Nikjoo, O'Neill, Wilson and Goodhead, IJRB 156, 577 (2001)

Complexity of DSB



Monte Carlo calculated distribution of energy deposited in DNA segments (30 bp) where a DSB has occurred. The energy locally deposited in a DNA region where a DSB has occurred increases with LET, implying an increase in lesion complexity (adapted from Ottolenghi and Merzagora 1997).

DSB vs effetti cellulari

La produzione di DSB non riflette gli effetti cellulari

- diverso andamento della risposta con la dose (lineare per l'induzione di DSB, generalmente curvilineo per gli effetti cellulari)
- diversa dipendenza dalla qualità della radiazione (LET) (l'induzione di DSB è molto meno dipendente dal LET rispetto agli effetti cellulari)

In particolare **RBE_{DSB} vs LET** (RBE per la produzione di DSB data dal rapporto $y_{DSB}(\text{radiazione considerata}) / y_{DSB}(X, \text{gamma})$) non riproduce l'andamento dell'RBE per l'inattivazione (o per l'induzione di mutazioni):

RBE_{in} (o RBE_{mut}) vs LET

DSB vs effetti cellulari

Il rapporto
 $y_{\text{DSB}} / y_{\text{DSB}}(X, \text{gamma}) = \text{RBE}_{\text{dsb}}$ vs LET
non riproduce l'andamento di
 RBE_{in} (o RBE_{mut}) vs LET

Possibili motivi:

- ♦ N_{dsb} non valutato correttamente dalle tecniche usate (Loebrich et al 1996, Loebrich 1997)
- ♣ presenza di diverse classi di DSB caratterizzate da diversa riparabilità, la cui proporzione dipende dalla qualità della radiazione (Goodhead et al 1985, Ward 1988, Goodhead 1994)
- ♦ metodi più accurati
(conteggio dei frammenti dai profili di frammentazione,)
- ♣ valutazione della riparabilità mediante cinetiche di riparazione

Fine