

El Premi Nobel de Química 2015: els mecanismes de reparació del DNA The Nobel Prize in Chemistry 2015: the DNA-repair mechanisms

Ramon Eritja

Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

Resum: La informació genètica es manté durant generacions en un ambient que pot malbaratar la seva integritat. El Premi Nobel de Química 2015 es va concedir als investigadors Tomas Lindahl, Paul Modrich i Aziz Sancar pel seus treballs en el descobriment dels mecanismes de reparació del DNA. En aquest article es detallen la importància i la repercussió dels descobriments realitzats pels tres investigadors guardonats.

Paraules clau: Reparació del DNA, mutagènesi, malbaratament del DNA.

Abstract: Genetic information is maintained for generations in an environment that can damage the integrity of DNA. The Nobel Prize in Chemistry 2015 has been awarded to researchers Tomas Lindahl, Paul Modrich and Aziz Sancar for their work in the discovery of the mechanisms of DNA repair. This article details the main discoveries made by the Nobel laureates.

Keywords: DNA repair, mutagenesis, DNA damage.

Introducció

El Premi Nobel de Química 2015 va ser concedit conjuntament a l'investigador suec Tomas Lindahl, a l'investigador americà Paul Modrich i a l'investigador turc Aziz Sancar en reconeixença dels seus treballs en relació amb l'estabilitat i els mecanismes de reparació del DNA [1].

Els àcids nucleics són transmissors de l'herència genètica. Per dur a terme la funció del DNA, s'han de mantenir intactes 3.000 milions de nucleòtids (segons les dades del projecte del genoma humà), en un total d'aproximadament $3,7 \times 10^{13}$ cèl·lules durant generacions. El DNA presenta una estructura helicoidal de doble cadena formada per la polimerització de quatre nucleòtids diferents: dos contenen una base púrica (adenina/guanina) i dos, una base pirimidínica (timina/citosina). Quan es va determinar l'estructura del DNA, es va postular que l'alteració de la seqüència de nucleòtids del DNA o mutacions podia ser l'origen de nombroses malalties [2]. Però, en general, s'acceptava que aquesta molècula era molt estable, pràcticament immutable, ja que no s'hi observaven canvis rellevants en períodes de temps curts. No obstant això, cal indicar que existeixen petites variacions, l'acumulació de les quals durant milions d'anys pot ser la base de la diversitat dels éssers vius i de la seva adaptació al medi ambient.

S'ha demostrat que el DNA és una molècula molt estable químicament, ja que, en condicions òptimes, es poden obtenir seqüències de DNA de mostres que s'han mantingut inalterades i sense contaminació de fins a 100.000 anys d'antiguitat [3]. Aquesta estabilitat ha permès l'obtenció de seqüències de genomes d'animals extingits recentment i ha permès també determinar la filogènia del llinatge humà des dels *Australopithecus* fins als *Homo sapiens* actuals. Però no ens permet aïllar genomes de restes d'organismes que van morir fa més d'un milió d'anys. És impossible determinar les seqüències del genoma dels dinosaures, ja que es van extingir fa més de 65 milions d'anys. Hem de tenir en compte, d'altra banda, que el metabolisme cel·lular i el medi ambient on vivim generen una quantitat important de substàncies químiques i agents físics que poden destruir parts del DNA. Finalment, s'ha de considerar que en el procés de duplicació del DNA es generen petits errors, l'acumulació dels quals podria suposar un perill per a la supervivència de les cèl·lules.

L'activitat dels científics guardonats, tal com es descriu en aquest article, ens ha aportat el coneixement sobre els mecanismes cel·lulars que actuen en la reparació del DNA i, per tant, ajuden a fer que els nostres genomes es mantinguin inalterats durant generacions, la qual cosa és vital per a la cèl·lula i els organismes. Els petits canvis acumulats que s'escapin d'aquests mecanismes poden provocar des de canvis evolutius fins a malalties.

L'estabilitat del DNA

Tal com hem avançat en la introducció, hi ha tres fonts d'errors en el DNA:

La inestabilitat intrínseca del DNA

Un dels primers objectius de la recerca de Tomas Lindahl als anys setanta va ser determinar la inestabilitat intrínseca del DNA a base d'aïllar els productes de degradació mitjançant el marcatge radioactiu dels nucleòtids [4, 5]. Així es va determinar que la reacció de degradació més important és la hidròlisi de l'enllaç glicosídic (figura 1a). Aquesta reacció genera llocs sense la base i és molt important en el cas de les purines, que tenen un temps de semireacció de només 730 anys, mentre que les pirimidines tenen un temps de vida mitjà de 14.700 anys [4, 6]. També s'ha estimat que es generen cada hora aproximadament uns 10.000-15.000 d'aquests llocs sense base per cèl·lula.

La segona reacció en importància és la desaminació hidrolítica (figura 1b). En aquesta reacció, els grups amino exocíclics s'hidrolitzen a grups ceto. La nucleobase (base unida al nucleòtid) més inestable és la 2'-desoxicitidina (dC), que es converteix en 2'-desoxiuridina (dU) [5]. La vida mitjana de la dC en DNA de doble cadena és de 30.000-50.000 anys, i en DNA de cadena senzilla és només de 200 anys. La 2'-desoxiadenosina (dA) i la 2'-desoxiguanosina (dG) són més estables, però també poden generar productes desaminats: la 2'-desoxiinosina (dI) i la 2'-desoxixantanosina (dX). És per aquesta raó que en el DNA hi ha timidina (T) en comptes d'uridina (U) (que només existeix en l'RNA), perquè d'aquesta manera es pot distingir el producte de desaminació de la dC (la dU) de la dC original en la seqüència dels nucleòtids dels genomes.

Finalment, la hidròlisi de l'enllaç fosfat és molt poc probable, ja que Lindahl va estimar que el temps de semireacció era d'aproximadament 30 milions d'anys. En canvi, l'RNA s'hidrolitza amb molta més facilitat a causa del seu hidroxil en posició 2'. Per això l'herència genètica s'emmagatzema en forma de DNA.

Errors en la duplicació del DNA

La duplicació del DNA comporta les etapes de desnaturalització, hibridació i polimerització. Els enzims encarregats de sintetitzar la cadena complementària són les DNA-polimerases, que utilitzen els 5'-trifosfats de nucleòsid per formar les noves cadenes. En cada etapa incorporen la base complementària seguint la direcció 3' > 5'. Una de les cadenes se sintetitza

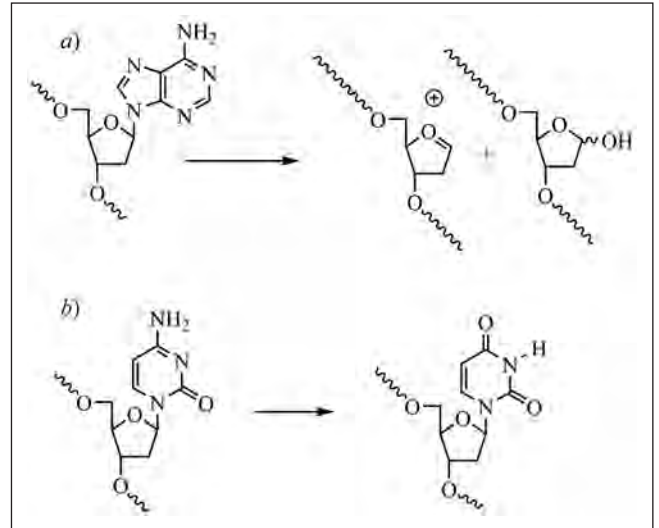


FIGURA 1. Reaccions de descomposició més freqüents en el DNA: a) hidròlisi de l'enllaç glicosídic, b) desaminació hidrolítica de la citosina per generar uracil.

d'un cop, mentre que l'altra ha de sintetitzar-se generant petits fragments contra direcció anomenats *fragments d'Oka-zaki*, que s'han de lligar posteriorment. En la duplicació del DNA es copien milers de milions de bases en minuts, i això és possible gràcies a l'acció coordinada d'un seguit de proteïnes, a més de les DNA-polimerases, incloent-hi topoisomereses, proteïnes lligadores a DNA de cadena senzilla, etc.

L'error de les DNA-polimerases durant la duplicació és un error per cada 10⁶-10⁸ bases (o nucleòtids) adicionades. Això implica que, cada vegada que es duplica la cèl·lula, es generen uns milers d'errors. Un petit error pot ser acceptable i, fins i tot, pot ajudar a la selecció darwiniana. Així, alguns virus, com el de la grip o el de l'hepatitis C, tenen unes DNA-polimerases poc fidels. Això augmenta la possibilitat de generar virus mutants que, si són viables, poden escapar de les defenses de l'organisme atacat en presentar unes proteïnes de la càpsida diferents. Però en éssers vius complexos els errors s'han d'evitar, i per això, després de cada duplicació, hi ha d'haver un sistema de reparació dels errors generats en la duplicació.

Degradació del DNA per agents externs

L'acció de la llum ultraviolada (200-400 nm) genera una reacció química entre les pirimidines que es coneix com a *fotodimerització de les pirimidines* (figura 2a). L'acció de les radiacions ionitzants altament energètiques (raigs X, raigs γ)

també genera reaccions de destrucció directa de les nucleobases o a través de la formació de radicals que acaben induint la modificació de les bases naturals.

A més d'això, l'acció de determinats compostos químics pot generar compostos no desitjats. Per exemple, l'acció dels agents alquilants del fum del tabac, gasos de guerra, quimioteràpia i fumats en general produeix una multitud de reaccions químiques de forma especial en les nucleobases (figura 2b-2c).

D'altra banda, els compostos aromàtics policondensats poden interaccionar amb l'estructura de doble hèlix i intercalar-se entre els parells de bases, de manera que impediran l'acció de topoisomerases i altres enzims.

Finalment, l'acció dels radicals lliures que provenen de les oxidacions cel·lulars, del metabolisme, del procés d'envelliment i de la contaminació pot generar un gran nombre de productes d'oxidació del DNA (figura 2d-2e). S'ha de fer ressaltar, d'altra banda, que la degradació del DNA induïda per alguns productes químics i per les radiacions s'utilitza en la teràpia del càncer, on s'intenta aturar la duplicació de les cèl·lules tumorals, ja que tenen una taxa de divisió més elevada que la de les cèl·lules sanes.

Els errors produïts en el DNA pels processos indicats en els paràgrafs anteriors, encara que lentament, podrien comportar

l'acumulació de canvis en el DNA d'una manera incompatible amb la vida. Aquest és el fonament del fet que existeixin mecanismes cel·lulars que reparin el DNA modificat i que són els que detallem a continuació.

Els mecanismes de reparació directes

La primera evidència de l'existència dels mecanismes de reparació va ser aportada pel grup del doctor Sancar. Aquest grup va estudiar un enzim anomenat *fotoliasa*, que pot revertir els fotodímers de timidina (figura 2a) en presència de llum visible [7]. Aquesta activitat present en bacteris és poc important en humans, però té l'interès de ser un dels primers mecanismes de reparació directa caracteritzats.

Un altre enzim que és capaç de refer de forma directa l'alquilació de les nucleobases és la O⁶-alquilguanina-DNA-metiltransferasa (hAGT), que elimina directament el grup alquil de les bases modificades pels agents alquilants [8] (figura 3). Aquest enzim té una cisteïna en el centre actiu que és capaç de reaccionar amb la O⁶-alquilguanina i transferir el grup alquil a la cisteïna, la qual cosa produeix la inactivació de l'enzim, que es degrada.

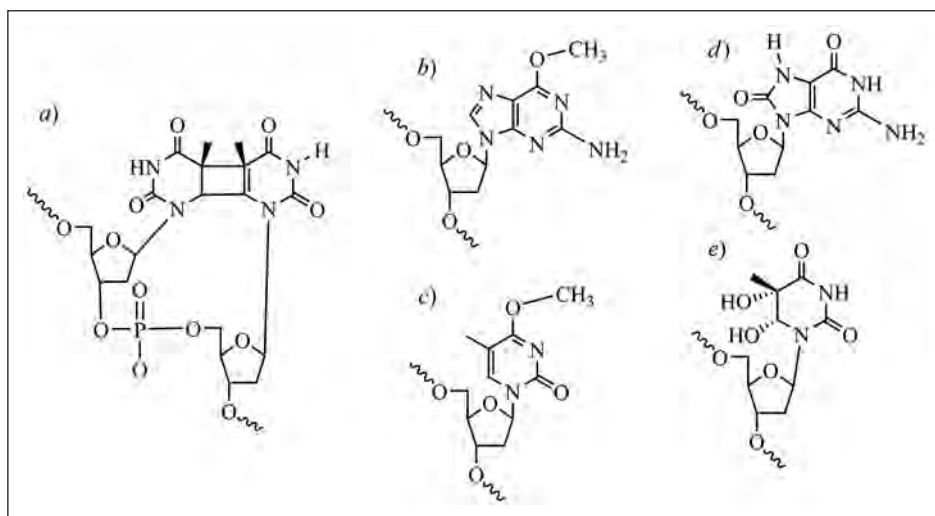


FIGURA 2. Estructures dels productes més abundants de degradació del DNA: a) un dels fotodímers de timidina produïts per acció de la llum ultraviolada. Alguns dels productes d'alquilació per agents metilants: b) la O⁶-metilguanina i c) la O⁴-metil-timidina. Alguns dels productes d'oxidació més corrents produïts per radiacions ionitzants, agents oxidants i radicals lliures: d) la 8-oxoguanina i e) el derivat glicol de la timidina.

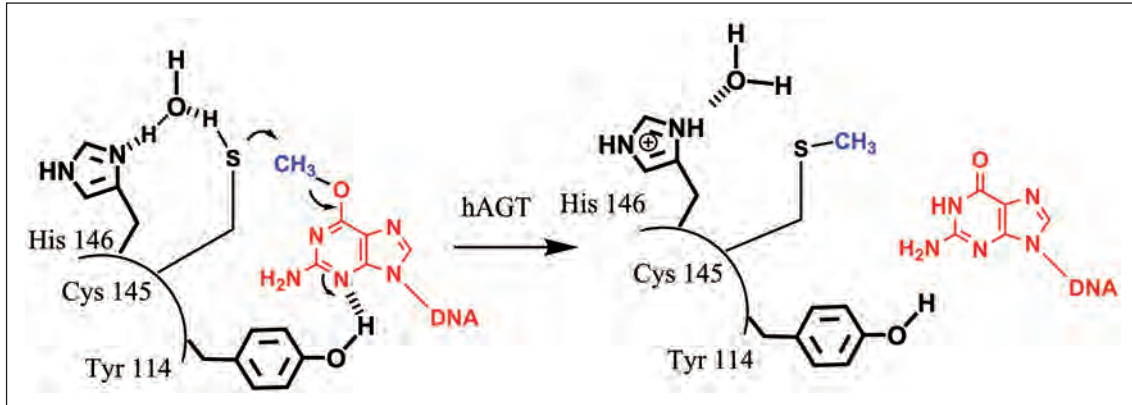


FIGURA 3. Reparació de la O⁶-metilguanina per l'alquilguanina-DNA-metiltransferasa (hAGT).

El mecanisme de reparació per eliminació de la base (*base excision repair, BER*)

A mitjan anys setanta, el grup del doctor Lindahl va descobrir un mecanisme de reparació del DNA en bacteris en el qual participen uns enzims que són capaços de diferenciar les nucleobases modificades de les bases naturals. Un cop detectades, els enzims tallen l'enllaç glicosídic entre la base modificada i la 2'-desoxiribosa. Aquests enzims, anomenats *glicosilases*, són específics per a cada lesió del DNA. El primer que es va aïllar va ser la uracilglicosilasa, que reconeix i talla

l'enllaç glicosídic del 2'-desoxiuracil. Aquest només pot venir de la desaminació hidrolítica de la 2'-desoxicitosina i ha de ser corregit [9, 10].

La ruptura de l'enllaç glicosídic genera un lloc sense base (figura 4) que és reconegut per l'endonucleasa de posicions mancades de base (*apurinic / apyrimidinic / abasic site endonuclease, APE*) [11, 12]. Aquest enzim trenca l'enllaç fosfat de l'extrem 5' del lloc abàsic. El punt defectuós acaba essent eliminat per una fosfodiesterasa i l'espai buit generat s'omple amb la base adient (que serà citosina, en el cas del lloc abàsic generat per la uracilglicosilasa) mitjançant l'acció de les DNA-polimerases i les DNA-ligases.

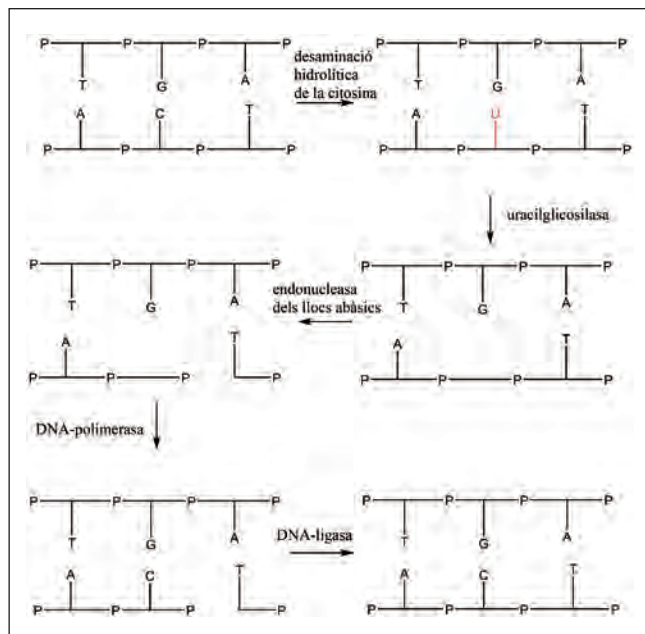


FIGURA 4. Esquema del mecanisme de reparació per eliminació de la base (BER).

Aquest és un dels mecanismes de reparació de bases modificades més important. És present en tots els éssers vius. Avui dia es coneix una multitud de glicosilases que poden arribar a reconèixer més de cent modificacions diferents de les bases.

El mecanisme de reparació per eliminació de nucleòtids (*nucleotide excision repair, NER*)

En el cas de lesions voluminoses que no poden ser processades per les glicosilases, es va descobrir un nou mecanisme de reparació que s'anomena *mecanisme de reparació per eliminació de nucleòtids* (NER) (figura 5). En aquest mecanisme, descobert en bacteris pel grup del doctor Sancar, hi participen les proteïnes UvrA, UvrB, UvrC i UvrD [13].

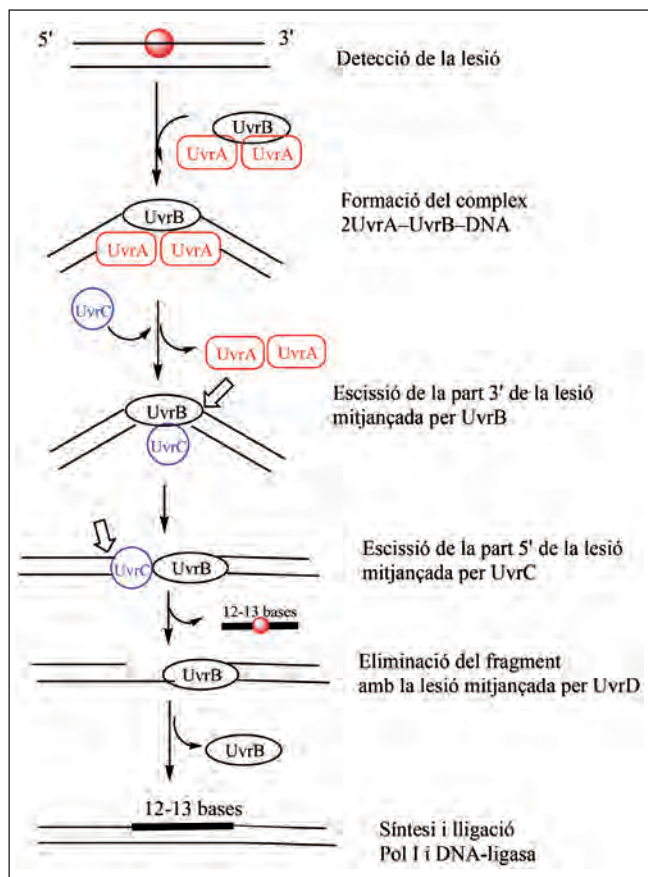


FIGURA 5. Esquema del sistema de reparació per eliminació de nucleòtids (NER) en *E. coli* descrit per Aziz Sançar (hAGT).

Un complex format per dues unitats d'UvrA i UvrB recorre el DNA i reconeix la lesió. En unir-se a la lesió, les dues unitats d'UvrA s'alliberen i es produeix el primer tall a unes 6-7 bases per sobre de la lesió. UvrC s'uneix a UvrB i, amb l'ajut de la DNA-helicasa II (UvrD), fan el segon tall i alliberen la cadena de DNA defectuosa. La DNA-polimerasa I (Pol I) i les DNA-ligases refan la seqüència eliminada. El treball de Sançar es va fer en el període 1973-1983. El que en bacteris necessita tres proteïnes, necessita setze proteïnes en humans (*Xeroderma pigmentosum*).

El mecanisme de reparació dels aparellaments erronis (*mismatch repair*, MR)

Fins ara, els mecanismes de reparació del DNA que hem explicat tenien una primera fase de localització de la modificació química que iniciava una sèrie de reaccions químiques que

acabaven amb l'eliminació de la base modificada i la introducció de la base o les bases correctes. Hem dit que, durant la duplicació del DNA, es produeix un seguit d'errors que generen aparellaments erronis. La reparació dels aparellaments erronis té una dificultat afegida. Un cop reconegut l'error, el sistema de reparació ha de detectar quina és la cadena defectuosa que ha de reparar, perquè en aquest cas totes les bases són naturals. Per això es necessita un sistema de reconeixement de la cadena que ha actuat de motllo i de la cadena que s'ha sintetitzat *de novo*, que és la que es repararà.

El mecanisme de reparació dels aparellaments erronis en bacteris va ser determinat pel grup del doctor Modrich en un treball arquetípic pel que fa a la preparació dels plasmidis model que havien de contenir els aparellaments erronis i els senyals de metilació [14]. Aquest mecanisme necessita l'acció combinada de les proteïnes MutH, MutL, MutS i UvrD, i la metilació del DNA és el senyal que indica quina és la cadena que s'ha utilitzat com a motllo en la duplicació. Les proteïnes MutS i MutL detecten la presència d'aparellaments erronis, i la proteïna MutH comunica al complex format per MutS i MutL quina és la cadena metilada (motllo) i quina és la sintetitzada *de novo* que s'ha d'eliminar (figura 6).

L'any 2004, Modrich va demostrar que hi havia un mecanisme similar al descrit per als bacteris en humans, però, en aquest cas, no és la metilació del DNA que dirigeix la reparació [15]. Probablement la formació de *nicks* durant la duplicació o la presència de ribonucleòtids formats transitòriament en el procés de duplicació podria dirigir la reparació selectiva d'una de les cadenes [16]. D'altra banda, s'han trobat factors similars als MutS i MutL en humans. Les mutacions en les seqüències que codifiquen per aquests factors causen càncer hereditari [17], fet que confirma l'existència d'un sistema de reparació d'aparellament erroni similar al bacterià.

Conclusions

Tal com s'ha indicat al principi, fins a la publicació dels treballs exposats en els paràgrafs anteriors, es creia que el DNA era immutable. En realitat, no és així, ja que la longitud de la doble cadena helicoidal, la reactivitat dels components dels nucleòtids que formen el DNA i el procés de la duplicació ho fan estadísticament impossible. De fet, el DNA pateix un atac constant d'una llarga llista d'agents físics i químics que posen

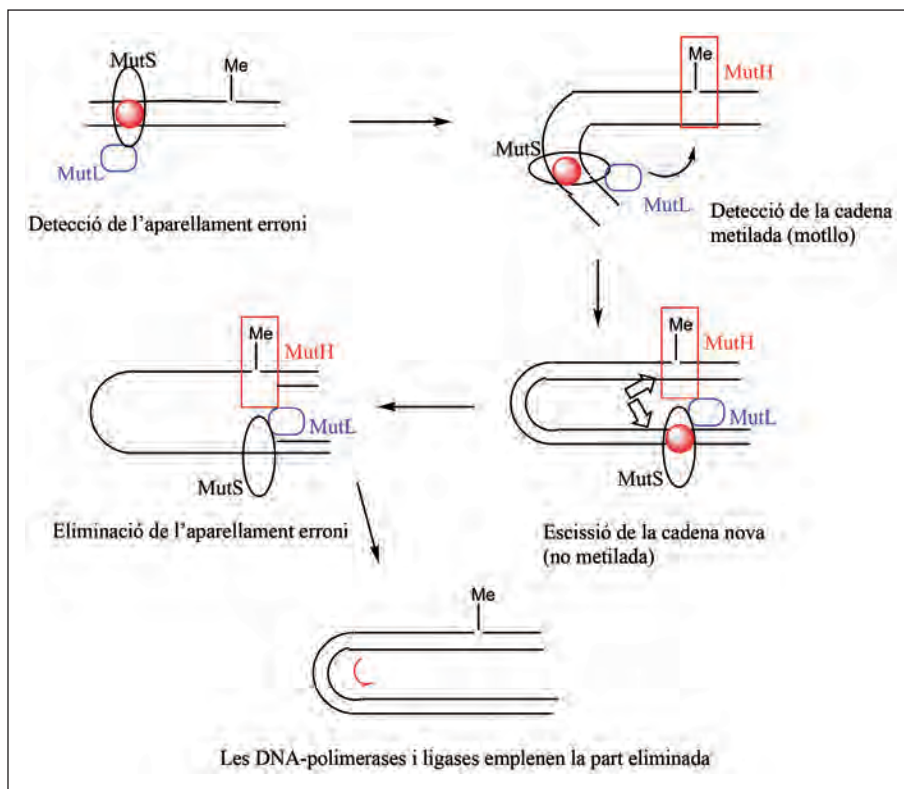


FIGURA 6. Esquema del mecanisme de reparació dels aparellaments erronis (MR).

en perill la seva funció de transmissió de la informació genètica. Per aquesta raó, els éssers vius han desenvolupat una sèrie de mecanismes de reparació del DNA que són absolutament necessaris per a la supervivència.

El coneixement dels mecanismes de destrucció i de reparació del material genètic ens ajuda a entendre la fragilitat del genoma, la importància dels mecanismes que el reparen, l'equilibri entre un cert grau de mutacions i el manteniment íntegre del genoma. A més a més, ens pot ajudar a determinar quins hàbits són més saludables i a dissenyar medicaments que tinguin el DNA com a diana terapèutica, per exemple, en el tractament del càncer.

Els coneixements aportats per Tomas Lindahl, Paul Modrich i Aziz Sancar també ens ajuden a classificar i entendre malalties hereditàries generades per mutacions en els gens de reparació tals com, per exemple, el *Xeroderma pigmentosum*, detectat en pacients que tenen el sistema de reparació per eliminació de nucleòtids (NER) defectuós, i en alguns càncers hereditaris detectats en pacients amb el mecanisme de reparació dels aparellaments erronis (MR) defectuós.

Finalment, una de les conseqüències dels tractaments del càncer és la selecció de cèl·lules tumorals resistents a la quimioteràpia a causa d'una sobreexpressió dels enzims implicats en la reparació del DNA. Aquesta sobreexpressió és una de les raons de les aparicions de resistències als medicaments anti-tumorals. El coneixement de l'estructura de les proteïnes implicades en la reparació del DNA permet el disseny d'inhibidors que poden ser utilitzats com a coadjuvants en la quimioteràpia. El primer exemple d'un fàrmac basat en la inhibició d'una proteïna implicada en la reparació del DNA és l'Olaparib, que és un inhibidor de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Aquest descobriment ha despertat l'interès dels investigadors per la recerca d'inhibidors de les proteïnes implicades en la reparació del DNA [18].

Agraïments

Vull agrair a Carme Fàbrega i a Elisenda Olivella l'ajut en la preparació d'aquest manuscrit, així com al Ministeri d'Economia i Competitivitat els ajuts a la recerca (projectes CTQ2010-20541-C03 i CTQ2014-52588-R).

Referències i altres fonts

- [1] Nobelprize.org. The official web site of the Nobel Prize: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/ [Consulta: 5 març 2016].
- [2] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. «A structure for deoxyribose nucleic acid». *Nature*, núm. 171 (1953), p. 737-738.
- [3] HOFREITER, M.; SERRE, D.; POINAR, H. N.; KUCH, M.; PÄÄBO, S. «Ancient DNA». *Nat. Rev. Genet.*, núm. 2 (2001), p. 353-359.
- [4] LINDAHL, T.; NYBERG, B. «Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid». *Biochemistry*, núm. 11 (1972), p. 3610-3618.
- [5] LINDAHL, T.; NYBERG, B. «Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid». *Biochemistry*, núm. 13 (1974), p. 3405-3410.
- [6] LINDAHL, T. «Instability and decay of the primary structure of DNA». *Nature*, núm. 362 (1993), p. 709-715.
- [7] SANCAR, G. B.; SMITH, F. W.; REID, R.; PAYNE, G.; LEVY, M.; SANCAR, A. «Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex». *J. Biol. Chem.*, núm. 262 (1987), p. 492-498.
- [8] GRAVES, R. J.; LI, B. F.; SWANN, P. F. «Repair of O⁶-methylguanine, O⁶-ethylguanine, O⁶-isopropylguanine and O⁴-methylthymine in synthetic oligodeoxynucleotides by *Escherichia coli* ada gene O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase». *Carcinogenesis*, núm. 10 (1989), p. 661-666.
- [9] LINDAHL, T. «An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 71 (1974), p. 3649-3653.
- [10] LINDAHL, T. «New class of enzymes acting on damage DNA». *Nature*, núm. 259 (1976), p. 64-66.
- [11] VERLY, W. G.; PAQUETTE, Y. «An endonuclease for depurinated DNA in *Escherichia coli* B». *Can. J. Biochem.*, núm. 50 (1972), p. 217-224.
- [12] VERLY, W. G.; PAQUETTE, Y.; THIBODEAU, L. «Nuclease for DNA apurinic sites may be involved in the maintenance of DNA in normal cells». *Nat. New Biol.*, núm. 244 (1973), p. 67-69.
- [13] PETIT, C.; SANCAR, A. «Nucleotide excision repair: from *E. Coli* to man». *Biochimie*, núm. 81 (1999), p. 15-25.
- [14] LAHUE, R. S.; AU, K. G.; MODRICH, P. «DNA mismatch correction in a defined system». *Science*, núm. 245 (1989), p. 160-164.
- [15] DZANTIEV, L.; CONSTANTIN, N.; GENSCHEL, J.; IYER, R. R.; BURGERS, P. M.; MODRICH, P. «A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision». *Mol. Cell.*, núm. 15 (2004), p. 31-41.
- [16] LUJAN, S. A.; WILLIAMS, J. S.; CLAUSEN, A. R.; CLARK, A. B.; KUNKEL, T. A. «Ribonucleotides are signals for mismatch repair of leading-strand replication errors». *Mol. Cell.*, núm. 50 (2013), p. 437-443.
- [17] FISHEL, R.; LESCOE, M. K.; RAO, M. R.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; GARBER, J.; KANE, M.; KOLODNER, R. «The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer». *Cell*, núm. 75 (1993), p. 1227-1236.
- [18] O'CONNOR, M. J. «Targeting the damage response in cancer». *Mol. Cell.*, núm. 60 (2015), p. 547-560.



R. Eritja

Ramon Eritja és llicenciat en química (1977) i en farmàcia (1983) per la Universitat de Barcelona, i va realitzar la tesi doctoral en l'àrea de la síntesi de pèptids sota la direcció del doctor Ernest Giralt (1983). Després de diverses estades postdoctorals al Beckman Research Institute of City of Hope (Duarte, CA, EUA) i a les universitats de Colorado (Boulder, CO, EUA) i de Barcelona, es va incorporar al Centre d'Investigació i Desenvolupament (CID-CSIC) a Barcelona (1989). L'any 1994 va dirigir un grup de recerca al European Molecular Biology Laboratory (EMBL) (Heidelberg, Alemanya), i va tornar al CSIC l'any 1999. Va formar part de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB) de Barcelona fins al 2012. Actualment, la seva activitat de recerca se centra en la química dels àcids nucleics i és director de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC).