

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 11

Complesso MRX

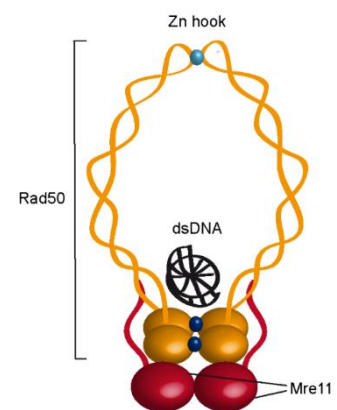
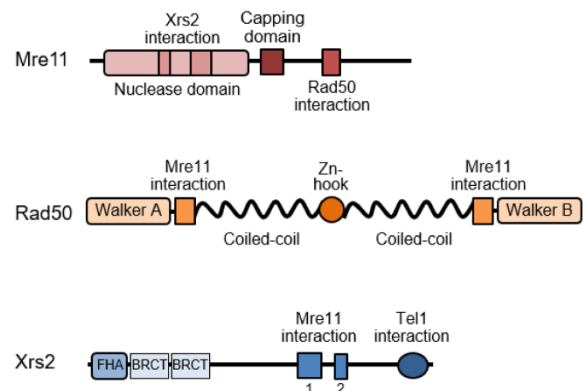
Diverse proteine sono reclutate al sito di rottura della doppia elica, allo scopo di stabilizzare le estremità e riparare la rottura.

MRX/N complex

Il complesso MRX/MRN è tra i primi ad essere reclutati al sito di rottura della doppia elica. MRX è il nome del complesso nel lievito, mentre MRN è il nome nell'uomo.

Il complesso è formato da diverse proteine:

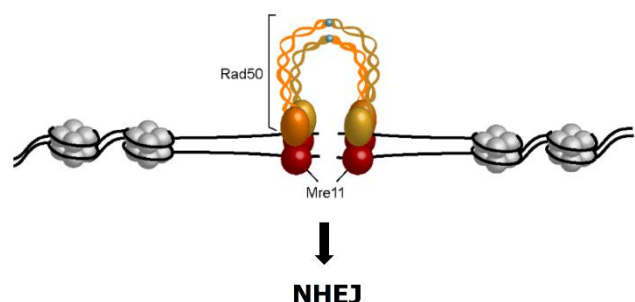
- Mre11, è una nucleasi con attività endonucleasica, ed una attività esonucleasica 3'5'. Nel complesso sono presenti due subunità Mre11.
- Rad50, ha una struttura particolare, con un dominio walker A, un dominio coiled coil che si ripiega su sé stesso e termina con un dominio walker B. Anche Rad50 è presente come dimero nel complesso. Le due porzioni coiled coil delle due proteine Rad50 del complesso interagiscono al livello di un Zn hook; questa è una sequenza di amminoacidi cisteina-X-X-cisteina che è condivisa dalle due regioni coiled coil di Rad50. Le porzioni Zn hook interagiscono tra loro e coordinano un atomo di Zinco Zn.
- Xrs2 nel lievito ed Nbs1 nell'uomo. Queste hanno una funzione strutturale e possiedono un segnale di localizzazione nucleare che permette l'ingresso del complesso nel nucleo.



MRX promuove l'end tethering

Il complesso MRX riconosce le estremità libere di DNA e le lega, mantenendo le estremità del DNA vicine. Non è chiaro quante molecole di MRX siano presenti nella struttura.

MRX functions at DSBs: 1) MRX promotes end-tethering



L'avvicinamento delle estremità generate dalla rottura rende più efficiente il sistema di NHEJ.

Il complesso MRX inoltre assicura che le due estremità siano riattaccate in maniera corretta, ognuna con quella a cui era effettivamente legata in precedenza.

La funzione di end tethering è stata dimostrata in lievito, inserendo in una determinata regione cromosomica una sequenza batterica, detta TetO, a cui si lega la proteina TetR che in questo ceppo era stata fusa a GFP.

Quando la proteina TetR è libera e non legata a TetO non si ha fluorescenza evidente. Quando TetR lega TetO si ha un aumento di fluorescenza.

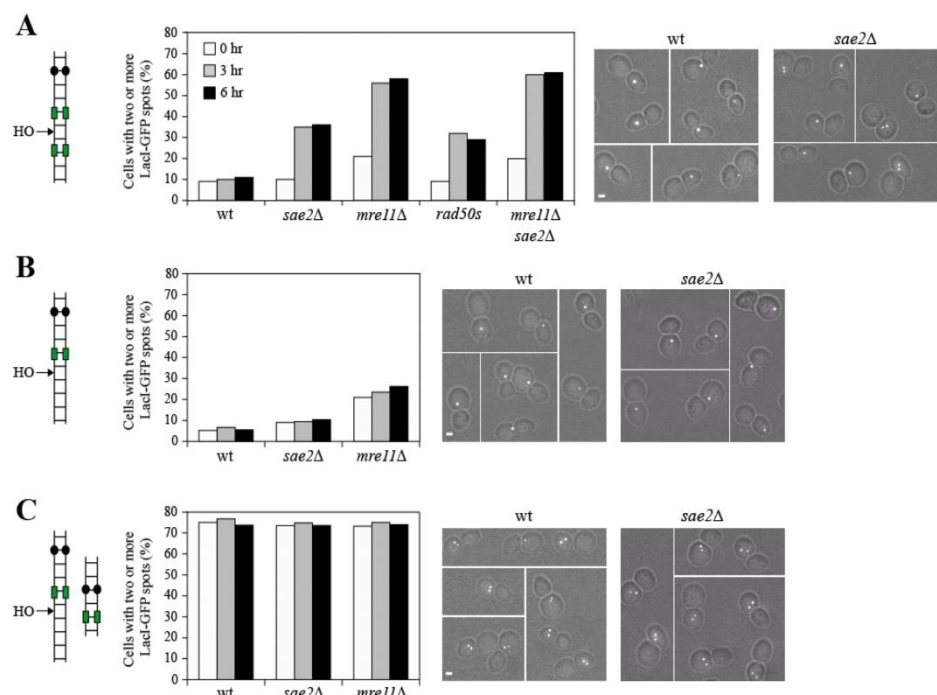
I ricercatori hanno preso un ceppo di lievito ed inserito due sequenze TetO sullo stesso cromosoma. In mezzo alle due sequenze TetO c'è un sito riconosciuto dalle endonucleasi HO. HO è una endonucleasi di lievito che taglia su una sequenza specifica e provoca lo switch di mating type.

Il ceppo ha il gene HO sotto il controllo del promotore GAL, che è indotto da galattosio e inibito da glucosio.

L'aggiunta di galattosio induce l'espressione di HO, che effettua un taglio sulla sequenza specifica, che si trova in mezzo alle due sequenze TetO.

Si valuta quindi la percentuale di cellule con due punti di fluorescenza a vari intervalli di tempo, che indicano la separazione delle due regioni dello stesso cromosoma in seguito al taglio. Nel ceppo WT si vede che la percentuale di cellule con due segnali è bassa, intorno al 10%, il che sta ad indicare che c'è un meccanismo che effettivamente permette la riparazione di rotture della doppia elica.

Si sono studiate le proteine deputate a questo controllo della riparazione, utilizzando la stessa tecnica in ceppi in cui alcuni geni avevano mutazioni null. Ad esempio la rimozione del gene *mre11* causa un aumento nella percentuale di cellule che mostrano due segnali, ad indicare che il meccanismo di riparazione della rottura della doppia elica non funziona in maniera ottimale.



MRX inizia la DSB resection

La resection è il meccanismo di rimozione di nucleotidi in direzione 5'3' che si ha al sito di rottura della doppia elica, e che lascia l'estremità 3' protruding.

MRX promuove la resection quando non avviene il NHEJ. Quando si inizia la resection il sistema si orienta verso la riparazione per ricombinazione omologa, perché la NHEJ non è in grado di rilegare protruding end.

La resection è una degradazione nucleolitica in senso 5'3', mentre il Mre11 ha una attività endonucleasica ed esonucleasica 3'5', che è opposta a quella che serve nel meccanismo di resection. Si è scoperto che l'attività che permette la resection è l'attività endonucleasica di Mre11 a permettere la resection. Quello che fa Mre11 è fare un taglio endonucleolitico sull'elica che termina con l'estremità 5' sul sito della rottura. Il nick generato permette di esercitare l'attività esonucleasica in senso 3'5', fino alla terminazione libera.

Lo stesso nick viene utilizzato come sito di accesso da altre esonucleasi, quali Exo1/Dna2, che hanno attività 5'3'. Quello che si genera alla fine è una porzione ssDNA con la estremità 3' protruding.

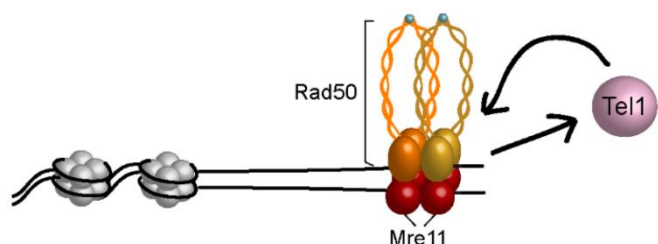
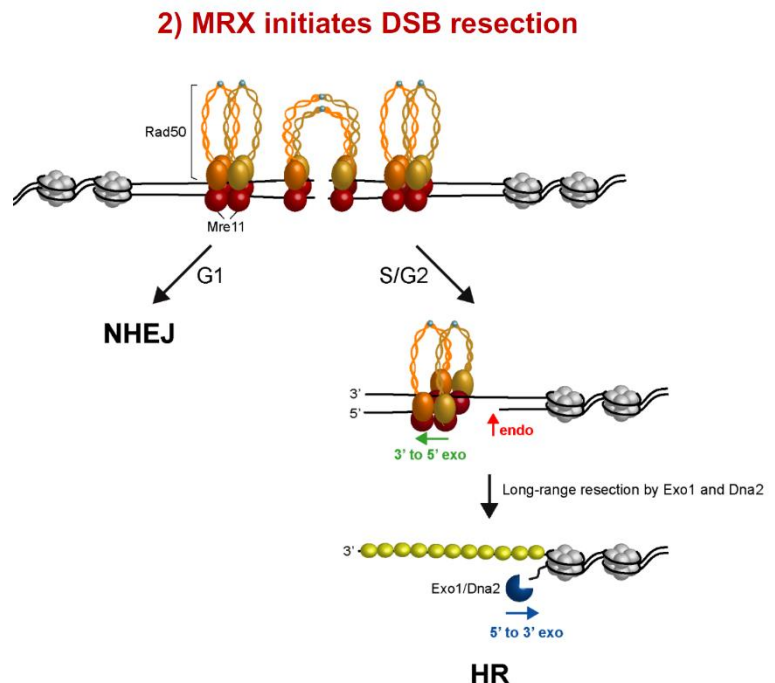
Exo1/Dna2 non attaccano direttamente l'estremità 5' al sito di rottura se questo è occupato da proteine o altre molecole legate all'estremità. Il nick effettuato da Mre11 non è quindi sempre necessario, ma il sistema si è evoluto per permettere la degradazione dell'estremità 5' anche nel caso in cui questa non sia direttamente accessibile.

Exo1 funziona da sola, è una esonucleasi 5'3'. Dna2 è una esonucleasi 5'3' che rimuove nucleotidi 2 o 3 alla volta. Dna2 interagisce con Sgs1 (nel lievito, nell'uomo è Blm), che è una elicasi che facilita la rimozione dei nucleotidi tagliati da Dna2.

MRX promuove il reclutamento di Tel1/ATM al DSBs

La terza funzione del complesso MRX/MRN è quella di promuovere il reclutamento della protein chinasi Tel1 nel lievito e ATM nell'uomo.

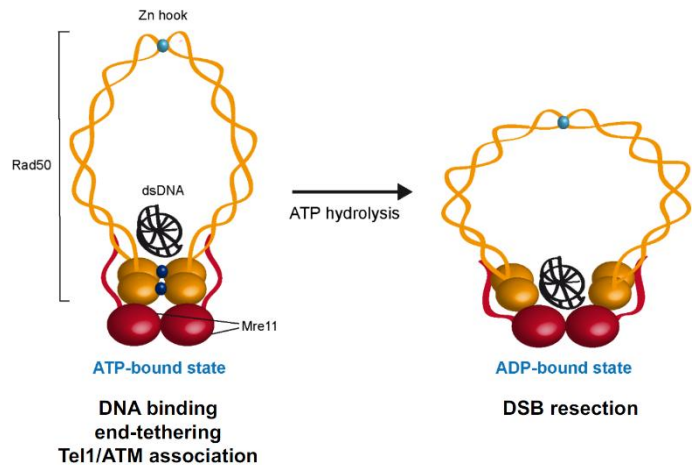
Tel1/ATM è una chinasi molto importante, coinvolta anche nei checkpoint da danno al DNA. La proteina Tel1/ATM legata al complesso MRX/MRN si attiva e fosforila delle proteine



substrato, innescando la risposta cellulare ai danni del DNA. Tel1/ATM promuove inoltre il mantenimento di MRX/MRN sul DNA.

Le attività del complesso MRX/MRN sono regolate dall'attività di idrolisi che ha Rad50. La subunità Rad50 è in grado di legare l'ATP. L'ATP si lega in una regione che si forma dall'associazione dei domini walker A e walker B di Rad50.

Rad50 lega l'ATP e lo idrolizza. Si è dimostrato che quando Rad50 lega ATP ed il complesso Mre11/Rad50 è nell'**ATP-bound state**, il complesso Mre11/Rad50 ha alta affinità per il DNA e funziona mantenendo l'associazione delle estremità del DSB e favorendo l'associazione di Tel1/ATM. In questa conformazione il DNA tocca le subunità walker di Rad50, ma non accede alle due unità Mre11.

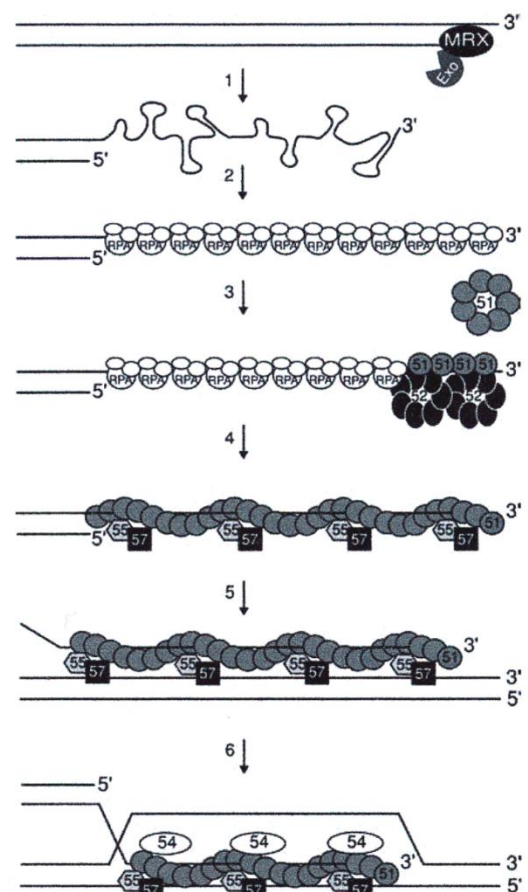


Quando Rad50 idrolizza ATP e passa all'**ADP-bound state**. Il complesso Mre11/Rad50 subisce un cambiamento conformazionale che porta alla dissociazione dei domini walker ed alla formazione di uno spazio che permette al DNA di accedere alle subunità Mre11. Il cambio conformazionale può innescare la resection, con Mre11 che può tagliare il DNA formando il nick.

Queste informazioni sono derivate da studi cristallografici, che hanno evidenziato le diverse strutture del complesso, che hanno permesso di ipotizzarne il funzionamento.

Il laboratorio della prof ha isolato un mutante Rad50 a78t, in cui l'alanina in posizione 78 è sostituita da una treonina, che mostra un difetto nell'attivazione della protein kinasi Tel1/ATM, pur mantenendo la funzionalità del complesso MRX nella resection. Con dinamiche molecolari hanno simulato la conformazione più stabile del complesso Mre11/Rad50 legato ad ATP o ADP. Si è visto che il complesso legato ad ATP è più stabile, mentre il complesso legato ad ADP tende ad aprirsi di più.

Il complesso MRX/MRN fa il taglio endonucleolitico ed inizia la resection, con MRX/MRN che rimuove nucleotidi in direzione 3'5', ed Exo1/Dna2 in direzione 5'3' a partire dal nick. Questo genera ssDNA con estremità 3' libera.

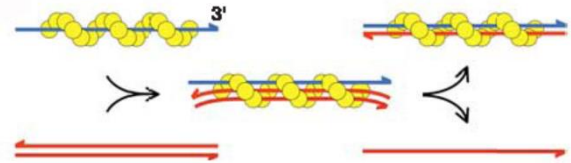


Questo ssDNA viene rivestito da complessi RPA. RPA è un complesso fatto da 3 subunità, RPA1-3, che lega e stabilizza il ssDNA e ne impedisce la degradazione da parte di nucleasi.

La proteina Rad51 lega il ssDNA e si sostituisce alla proteina RPA. Il complesso Rad51-ssDNA è detto nucleofilamento. Il nucleofilamento è quello che poi dà strand invasion sulla doppia elica omologa. La strand invasion è un processo regolato a cui partecipano anche altre proteine, come Rad52, Rad55, Rad57 e Rad54, che permettono la ricerca dell'omologo e l'invasione. L'eliminazione di anche una delle proteine Rad compromette la ricombinazione omologa.

Non si sa bene come avvenga la ricerca del DNA omologo.

Si ritiene che il nucleofilamento grazie alla proteina Rad51 permetta l'avvicinamento delle sequenze omologhe complementari formando un'elica attorno ai filamenti.



Generazione di DSBs

La generazione di DSBs per lo studio dei meccanismi riparativi e di ricombinazione è possibile in lievito *S.cerevisiae*. Il lievito ha una sua endonucleasi che è HO. Questa endonucleasi catalizza un taglio al livello del locus MAT.

Questo taglio viene riparato per ricombinazione omologa con cambio di tipo sessuale da parte del lievito. HO è stato utilizzato per generare una rottura della doppia elica in un locus preciso, che è una sequenza che si trova nel locus MAT.

Si è costruito un ceppo in cui HO è sotto il controllo del promotore GAL. Il sito riconosciuto da HO è quello sul locus MAT. In questo ceppo sono state rimosse le sequenze *hmlα* ed *hmla*, che sono quelle che permettono di riparare la rottura e fare lo switch di mating type.

In presenza di galattosio il gene che codifica per HO viene trascritto e tradotto, ed il suo prodotto HO effettua il taglio nella sua sequenza bersaglio, dando luogo alla rottura della doppia elica, che non viene riparata perché le sequenze che ne permettono la riparazione sono state rimosse.

Si ha quindi una rottura della doppia elica di DNA, che è stata usata per fare una southern blot modificata per studiare il processo di resection e trovare ed identificare le proteine che sono coinvolte.

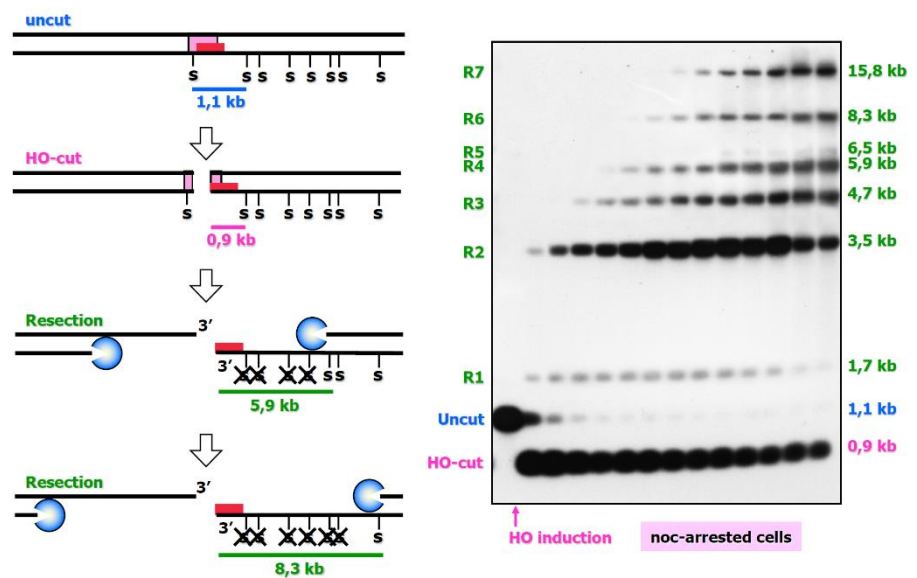
A questo punto si avrà la resection che procederà dall'estremità 5' a rimuovere nucleotidi e generare ssDNA. Questo processo si può visualizzare mediante un esperimento di southern blot in condizioni denaturanti, prelevando campioni di cellule ad intervalli di tempo.

Ogni campione sia di controllo che prelevato ad intervalli di tempo viene trattato con l'enzima di restrizione *Ssp1*, ed il prodotto viene studiato mediante elettroforesi in condizioni denaturanti. La dimensione può essere così studiata mediante l'ibridazione con una sonda a singolo filamento che si appaia sull'elica che non è rimossa dalla resection.

Ssp1 taglia nei siti s della figura, per cui nel DNA non tagliato si avrà un frammento di 1,1kb, mentre se si avrà resection si avranno frammenti di diversa dimensione, a seconda di dove è arrivata la resection.

Si identificano segmenti di varie dimensioni in ogni linea di elettroforesi perché si analizza una popolazione di cellule, in cui il processo di resection parte in maniera asincrona.

Monitoring resection of the HO-induced DSB



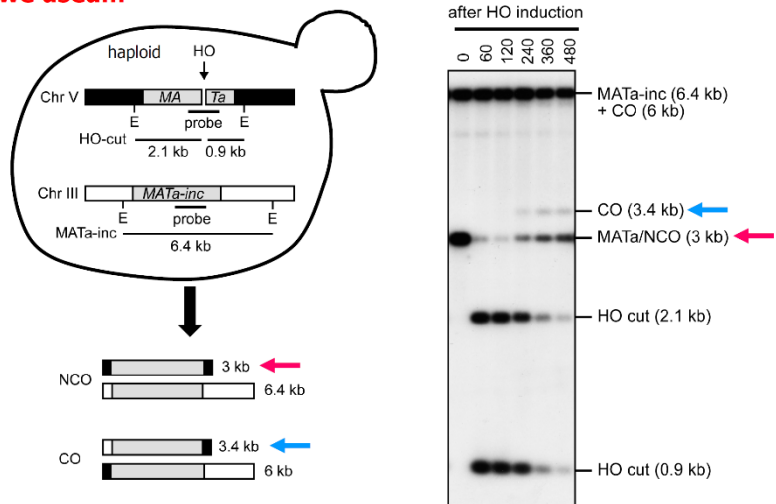
Rilevare crossover e non-crossover

La formazione dei prodotti di crossover e di non-crossover in seguito a rottura della doppia elica può essere visualizzata mediante southern blot.

Si parte da un ceppo di lievito aploide in cui si studia la ricombinazione che avviene tra molecole di DNA duplicate. Il locus MAT si trova normalmente sul cromosoma 3, ma questo ceppo è stato ingegnerizzato per averlo anche al cromosoma 5, per cui MAT è duplicato. Questo consente alle due sequenze di ricombinare.

Nel gene MAT sul cromosoma 3 è stato eliminato il sito di riconoscimento di HO, che è invece mantenuto sul gene MAT del cromosoma 5.

To detect crossovers and noncrossovers at the molecular level, we used...



Quando il ceppo è cresciuto su galattosio HO è indotto e genera una rottura sul gene MAT del cromosoma 5. Il taglio viene riparato per ricombinazione omologa utilizzando il gene MAT sul cromosoma 3, che non ha il taglio. Il processo di ricombinazione omologa genererà prodotti di crossover e di non-crossover.

Si prelevano campioni di cellule ad intervalli di tempo dalla induzione di HO. Il DNA viene estratto, tagliato con EcoRI e si separa su gel di agarosio. Il materiale così separato viene marcato da una

sonda a DNA che si appaia al livello della sequenza di taglio di HO sul cromosoma 5 ed al locus MAT sul cromosoma 3.

I prodotti di non-crossover non hanno scambiato porzioni esterne di cromosoma, mentre nei prodotti di crossover c'è stato scambio di materiale genetico tra i due cromosomi. Questa differenza è evidenziabile all'elettroforesi perché i siti di taglio di EcoRI sono a distanze diverse tra loro nei due cromosomi.

Nel caso dell'esperimento in questione sappiamo che i prodotti di non-crossover si trovano ad una distanza di 3kb e 6.4kb, mentre i prodotti di crossover si trovano a 3.4kb e 6kb.

L'abbondanza di prodotti di non-crossover è dovuto al fatto che la cellula in mitosi ripara principalmente per mezzo di SDSA, che non prevede crossingover.

HR mediante Single Strand Annealing

Il meccanismo di Single Strand Annealing si ha quando la rottura della doppia elica di DNA avviene tra due sequenze ripetute in tandem in modo diretto.

Quando la rottura avviene tra queste due sequenze di DNA questa può essere riparata mediante NHEJ. Se questo non avviene si innesca il meccanismo SSA per cui si ha la resection, che genera estremità 3' protruding.

Queste ssDNA con estremità 3' libera si possono appaiare al livello delle sequenze complementari ripetute in tandem. In questo caso si formano dei flap, che vengono rimossi, ed infine si ha l'azione della ligasi. Questo meccanismo SSA non richiede Rad52, in quanto non è necessaria la formazione del nucleofilamento, in quanto è l'appaiamento delle due estremità libere alla lesione che ne permette la riparazione.

Il meccanismo SSA causa la perdita del DNA che si trova tra le sequenze ripetute che si appaiano.

Anche in questo caso si può fare un test molecolare per evidenziare l'attività del meccanismo SSA.

Il ceppo utilizzato è un ceppo aploide che ha due ripetizioni dirette del gene leu2 sullo stesso cromosoma, ad una distanza di 0.7kb. Vicino alla seconda ripetizione di leu2 si trova il sito di taglio di HO.

Le cellule si fanno crescere in raffinosisio, poi con galattosio si induce il taglio da parte di HO e poi si analizzano in Southern blot i risultati della riparazione. Si ibridizza il DNA separato in elettroforesi con una sonda che riconosce leu2.