

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

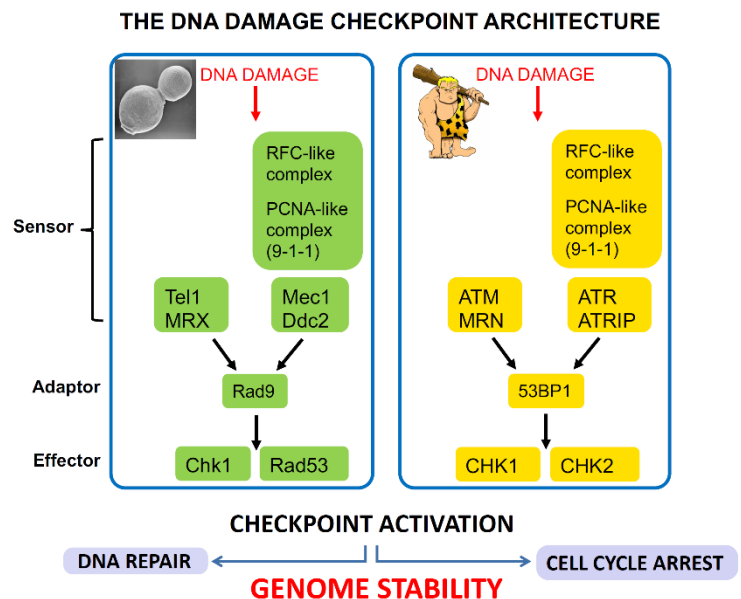
Lezione 23

Checkpoint da danno al DNA nell'uomo

Le proteine che partecipano all'attivazione del checkpoint da danno al DNA sono simili tra lievito ed uomo.

Nell'uomo le principali chinasi che attivano la risposta al danno sono ATM/Tel1 che lega MRN/MRX, ed ATR/Mec1, che lega ATRIP/Ddc2.

Le proteine fosforilate dalle chinasi ATM e ATR sono molte, coinvolte in vari processi cellulari, dal metabolismo del DNA al ciclo cellulare, a proteine coinvolte nella replicazione del DNA e nell'arrangiamento della cromatina.



ATM e ATR regolano quindi tutta una serie di processi che vanno oltre la progressione del ciclo cellulare.

Atassia Teleangectasia

L'atassia teleangectasia (AT) è una malattia genetica autosomica recessiva, caratterizzata dalla mutazione del gene ATM. Le mutazioni in genere compromettono totalmente la funzionalità di ATM. Da questo si evince che ATM non è un gene vitale nell'uomo, nonostante il malfunzionamento o assenza dia luogo alla atassia teleangectasia.

Uno dei test che si fa nei pazienti sospetti è andare a cercare con un western blot la proteina ATM, perché nella maggior parte dei casi la proteina non è bene espressa o non è rilevabile.

Il fenotipo del paziente AT è caratterizzato da neurodegenerazione, teleangectasia (dilatazione dei capillari dell'occhio), difetti immunitari, predisposizione all'insorgenza di tumore, sterilità, sensibilità a radiazioni.

I difetti immunitari sono correlati alla ricombinazione VDJ, la cui riparazione richiede NHEJ. ATM ha un ruolo nella NHEJ.

La neurodegenerazione è un fenotipo che si manifesta con lo sviluppo del paziente assieme all'atassia. ATM è una proteina da risposta al danno al DNA, quindi se non funziona bene i danni che la cellula subisce non sono riparati nella maniera corretta. In tipi cellulari come i neuroni, che hanno una sopravvivenza molto lunga, l'accumulo di danni, anche spontaneamente insorti nel tempo, porta ad alterazione della funzionalità della cellula.

La sterilità si ha perché la riparazione per ricombinazione omologa che avviene in meiosi, durante la generazione dei gameti, richiede ATM per essere efficiente. Mancando questa funzione di riparazione, i cromosomi omologhi non possono essere correttamente separati durante la meiosi, dando difetti nella generazione dei gameti.

La predisposizione al cancro è dovuta all'accumulo di danni al DNA, che da instabilità genetica.

I pazienti AT manifestano invecchiamento precoce, in quanto ATM è richiesta per l'allungamento dei telomeri. L'accorciamento dei telomeri causa invecchiamento precoce.

Sindrome di Seckel

La sindrome di Seckel è una patologia genetica autosomica recessiva causata da mutazione nel gene ATR.

Il fenotipo dei pazienti Seckel è un ritardo nello sviluppo, microcefalia con caratteristiche facciali tipiche. Non hanno aumentata insorgenza di tumore e difetti immunitari.

Per studiare questa patologia è stato usato il lievito. L'attivazione del checkpoint di fase S blocca il firing delle origini di replicazioni late e mantiene il complesso di replicazione associato alla forca replicativa, pronto a ripartire nel momento in cui il danno viene riparato. La chinasi responsabile di questa risposta nel lievito è Mec1 nel lievito, che è l'ortologo di ATR nell'uomo. Mec1 ha quindi di supportare la replicazione del DNA in condizioni di stress, rappresentato da danno al DNA sul template.

Si pensa che il fenotipo Seckel rifletta il ruolo di ATR nella replicazione del DNA. Le mutazioni che causano il fenotipo Seckel sono tutte missenso, quindi ATR è un gene essenziale per la sopravvivenza cellulare, in quanto la sua assenza è incompatibile con la vita.

ATR non interviene nella normale replicazione, ma interviene nel caso in cui il complesso di replicazione incontra una lesione sul DNA durante la replicazione.

Siti fragili

I siti fragili sono siti normalmente presenti sui cromosomi che in cui è più facile che si generi una rottura del DNA, un DSB con rottura del cromosoma.

I siti fragili risultano espressi quando c'è una evidenza citologica di rottura del cromosoma. Ci sono circa 80 siti fragili comuni finora mappati sul genoma umano. Non sembrano essere correlati ad una specifica sequenza di DNA, ma si è visto che l'espressione di siti fragili sul DNA può essere aumentata da agenti che rallentano la progressione della replicazione del DNA. Questo si è visto in esperimenti con *afidicolina* che è un inibitore della DNA polimerasi.

Nel lievito è stato mappato un sito fragile sul cromosoma 3, che ha permesso di identificare l'esistenza di questi siti. Si ritiene che i siti fragili siano siti in cui la DNA polimerasi ha difficoltà a replicare. Non se ne conosce il perché della difficoltà nella replicazione di queste zone.

Il rallentamento della polimerasi in queste zone difficili da replicare aumenta la quantità di ssDNA alla forca replicativa, aumentando il rischio di rottura del DNA.

Si è visto che la caffeina è un inibitore di ATR. Il trattamento di cellule con caffeina aumenta l'espressione di siti fragili, a suggerire che ATR intervenga nel prevenire l'espressione dei siti fragili.

In topi ATR deficient si rileva una frammentazione estesa dei cromosomi anche in assenza di danno. Questi topi vivono meno dei topi WT.

Si ritiene quindi che la proteina di ATR/Mec1 prevenga l'espressione dei siti fragili, probabilmente stabilizzando il complesso di replicazione alla forca arrestata.

Checkpoint in meiosi

In meiosi si hanno delle rotture della doppia elica programmate, principalmente catalizzate da Spo11, che genera DSBs ed avvia il processo di ricombinazione omologo, che assicura la corretta segregazione dei cromosomi. In meiosi c'è un checkpoint che monitora la corretta attuazione di queste rotture.

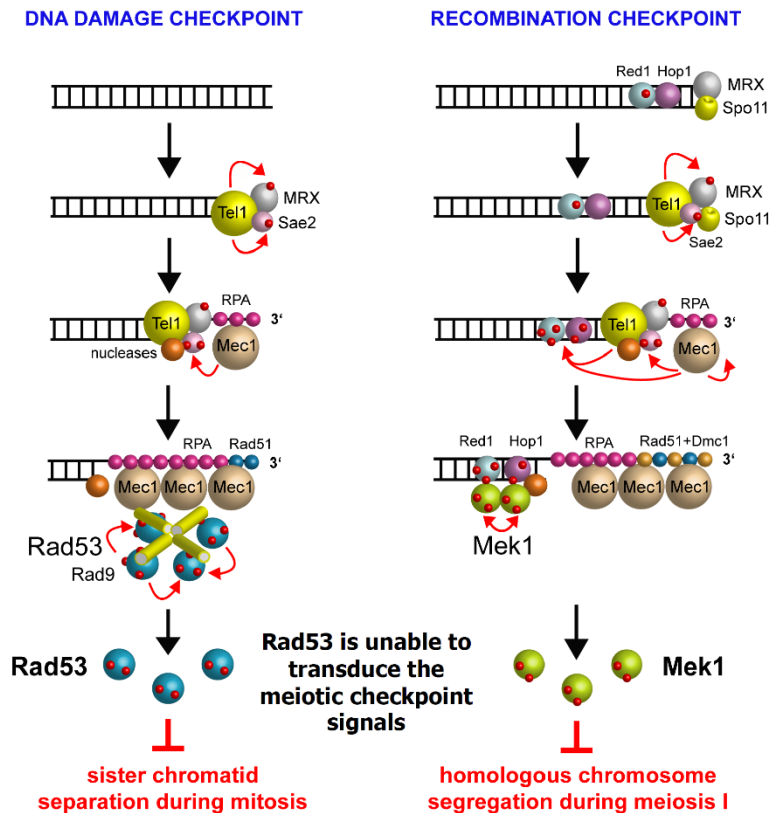
Il checkpoint di ricombinazione meiotica richiede le stesse proteine del checkpoint da danno al DNA, per cui è richiesto MRX/MRN, che si lega all'estremità del sito di rottura e permette il caricamento di Tel1/ATM, che innesca la resection. Si genera ssDNA 3' protruding ricoperto da RPA, che permette a Mec1/ATR di legarsi e di fosforilare i suoi bersagli.

La differenza è nella chinasi downstream perché Rad53, che si attiva nel checkpoint da danno al DNA, viene sostituita da un'altra chinasi che è Mek1 (che è il paralogo di Rad53 in meiosi).

Anche Rad9, che fa da scaffold adattatore a Rad53 nel checkpoint da danno al DNA, è sostituita in meiosi da due proteine, che sono Red1 e Hop1, che funzionano da adattatori nei confronti di Mek1.

Si sa che Mek1 va incontro ad autofosforilazione intermolecolare, che lo attiva.

Mek1 è trascritta solo in meiosi e sostituisce Rad53. Rad53 e Rad9 continuano ad essere espresse in meiosi, ma non è stato chiarito il motivo per cui non partecipano al meccanismo di riparazione in meiosi.



Una possibilità è che Rad53 e Rad9 durante la meiosi non abbiano accesso alla rottura della doppia elica, perché questo è coperto da una serie di proteine meiosi specifiche, che magari fanno parte del processo sinaptonemico. Al contrario Tel1, Mec1, Mek1, Red1 ed Hop1 sono invece localizzate dentro il complesso sinaptonemico. Il complesso sinaptonemico potrebbe quindi avere una funzione di caratterizzazione dei cromosomi meiotici, impedendo l'accesso a proteine la cui funzione non sia richiesta al sito di lesione.

Si è visto che la formazione dei DSBs in meiosi, con riparazione mediante ricombinazione omologa, assicura l'appaiamento tra cromosomi omologhi.

La rimozione di Mek1 si è visto che porta la cellula ad avere una uguale percentuale di ricombinazione tra cromosomi omologhi e tra cromatidi fratelli, rispetto alla normale preferenza verso la ricombinazione omologa tra cromosomi omologhi.

Esperimento attivazione Mek1

L'attivazione del checkpoint da danno al DNA in G2 blocca la transizione metafase-anafase.

L'attivazione del checkpoint di ricombinazione meiotica blocca la divisione dei cromosomi omologhi in meiosi 1.

Si può fare un esperimento con cellule di lievito che vengono indotte alla meiosi mediante incubazione in terreni di sporificazione.

Mediante microscopio a fluorescenza è possibile monitorare la prima e la seconda divisione meiotica, trattando le cellule con ioduro di propidio, che si lega al DNA ed emette fluorescenza rilevabile al FACS.

Facendo un western blot ad intervalli di tempo, valutando la presenza di Mek1 con un anticorpo marcato, si osserva che le cellule prima di entrare in meiosi non esprimono la proteina Mek1. Dopo 60 minuti dall'induzione della meiosi si osserva la comparsa di Mek1, che poi cambia mobilità elettroforetica perché viene fosforilata, in corrispondenza della generazione del DSBs meiotico.

Il DSB meiotico attiva il checkpoint da danno al DNA, che è rilevabile dall'espressione di Mek1.

Se si usa il mutante *dmc1Δ*, in questo mutante i DSBs meiotici vengono generati, il DNA subisce resection, ma non può avvenire la strand invasion, e quindi la ricombinazione omologa.

Se si fa lo stesso esperimento precedente usando il ceppo *dmc1Δ*, si osserva che il DSBs non viene riparato e che Mek1 resta in forma fosforilata; il checkpoint non viene superato perché il ceppo mutato non è in grado di riparare i DSBs, quindi le cellule non superano la meiosi 1.

Il checkpoint da ricombinazione della meiosi si attiva ad ogni ciclo cellulare nei ceppi WT, perché la formazione di DSBs è intrinseco al processo di meiosi.

