

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 16

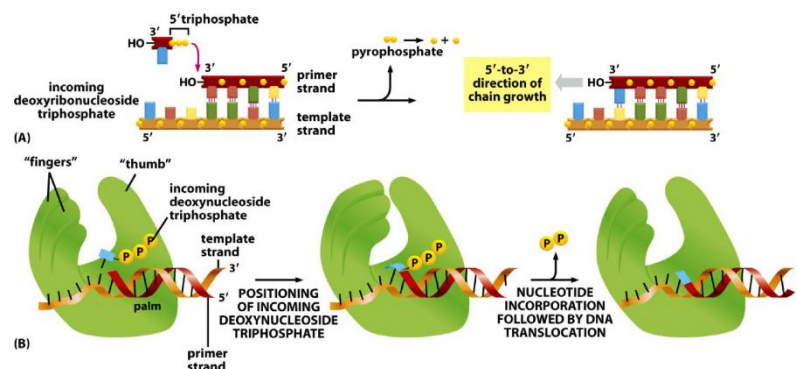
Meccanismi di tolleranza alla lesione

I meccanismi di tolleranza alla lesione permettono alla cellula di tollerare le lesioni, evitando l'apoptosi.

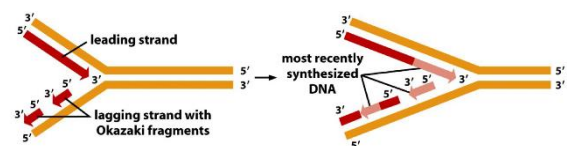
La replicazione del DNA avviene grazie alle DNA polimerasi, che hanno bisogno di un template a DNA e non sono in grado di fare sintesi *de novo*. È quindi necessaria una estremità 3' OH libera a cui aggiungere nucleotidi in senso 5'3'.

Nei procarioti la DNA polimerasi III è deputata alla replicazione del DNA genomico.

Negli eucarioti ci sono più polimerasi dedicate alla replicazione del genoma. Tra queste ci sono la DNA polimerasi α che interagisce con la DNA primasi; c'è anche la DNA polimerasi δ e la DNA polimerasi ϵ . Le DNA polimerasi che replicano il genoma hanno una struttura a palmo di mano, nel cui incavo arrivano i precursori desossinucleotidi trifosfato, e si ha l'inserimento del nucleotide con la liberazione di pirofosfato. Si ha poi la traslocazione della DNA polimerasi sul DNA e l'inserimento del nucleotide successivo.



La replicazione del DNA avviene in fase S, una sola volta per ciclo cellulare. La replicazione al livello della forca procede su entrambi i sensi con andamento 5'3', in modo continuo sulla **leading strand**, ed in modo discontinuo sulla **lagging strand**. I frammenti di Okazaki sulla lagging strand sono fatti da un primer ad RNA fatto dalla DNA primasi, e poi allungati dalla DNA polimerasi α , ed infine ricongiunti dalla DNA ligasi.



La forza replicativa va vista con la sua forma detta *a trombone*. La lagging strand si piega ad U, in modo che la direzione della polimerasi sia la stessa su entrambi i filamenti.

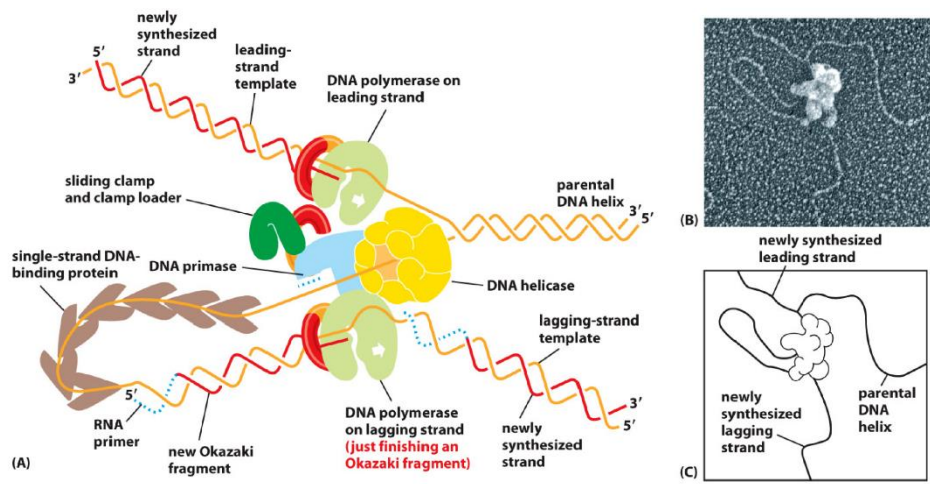


Figure 5-18 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

T4 phage replication machine

Le DNA polimerasi che replicano la lagging strand sono la DNA polimerasi α oppure la DNA polimerasi δ .

Le DNA polimerasi che replicano la leading strand sono la DNA polimerasi δ e la DNA polimerasi ϵ .

La DNA elicasi apre la doppia elica. PCNA è una *sliding clamp*, caricato sul DNA da un *clamp loader*, che è un complesso proteico che negli eucarioti si chiama RFC, replication factor C.

La *sliding clamp* PCNA serve a mantenere associata al DNA la DNA polimerasi δ , aumentandone la processività e rendendo più efficiente la replicazione del DNA.

La replicazione nei procarioti parte da una sola origine di replicazione, mentre negli eucarioti abbiamo più origini di replicazione sul genoma.

La replicazione è bidirezionale, cioè dall'origine di replicazione si crea una bolla di replicazione, con due forche che si dirigono ai lati opposti del DNA, replicandolo.

Le origini di replicazione sono state mappate nel lievito e prendono il nome di ARS (autonomous replicating sequences). Queste sequenze hanno una consensus sequence che le caratterizza, rilevata dalle proteine ORC. Ogni origine di replicazione si attiva una sola volta durante la fase S, garantendo una singola replicazione del genoma per ciclo cellulare.

Le origini di replicazione non si accendono tutte contemporaneamente, ma hanno un pattern diverso nel funzionamento, tanto che è possibile rilevare origini di replicazione *early*, che si attivano per prime, e delle origine di replicazione *late*, che si attivano successivamente. Questo dipende da varie proteine associate al processo.

La cellula eucariotica ha più origini di replicazione perché questo rende più efficiente la replicazione del DNA, data l'ampia dimensione del materiale genetico rispetto ai procarioti. Il diverso pattern di attivazione delle origini di replicazione è bilanciato rispetto alla quantità di desossinucleotidi trifosfato dNTP presenti nel nucleo della cellula.

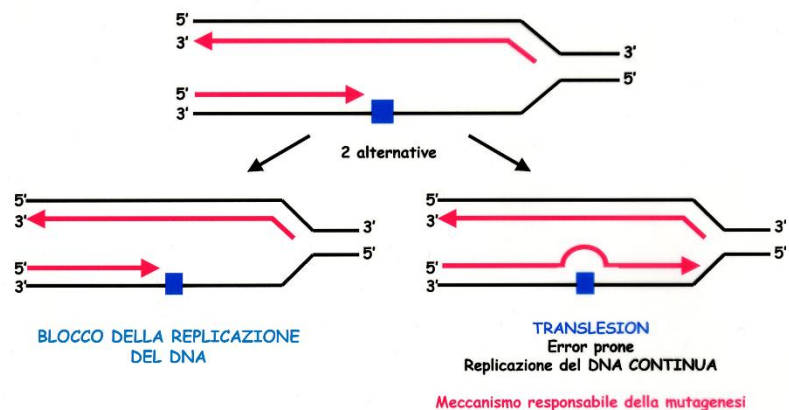
Si è evidenziato che avere più dNTP nel nucleo rispetto al valore fisiologico causa un aumento degli errori da parte della DNA polimerasi. La graduale attivazione delle origini di replicazione permette di mantenere un equilibrio nel numero di dNTP presenti nel nucleo.

Modelli di replicazione di uno stampo danneggiato

Quando la DNA polimerasi arriva ad una lesione durante la replicazione ci sono due alternative: il **blocco** della DNA polimerasi con arresto della sintesi di DNA, oppure la **sintesi translesione** di DNA, che bypassa la lesione e continua la sintesi.

La sintesi del DNA translesione fa parte dei meccanismi di tolleranza al danno.

Quando la replicazione si arresta alla lesione può venire recuperata mediante un processo di ricombinazione che permette di riparare la lesione. I meccanismi di tolleranza sono molto importanti per permettere il completamento della replicazione del genoma della cellula, perché ne permettono il recupero in caso di blocco per via della presenza di un danno.



La sintesi di DNA translesione utilizza una DNA polimerasi specifica, detta DNA polimerase translesione o di bypass (error prone) che hanno una frequenza di incorporazione di nucleotidi errate dalle 100 alle 10.000 volte più alta delle DNA polimerasi canoniche che replicano il DNA.

Le polimerasi translesione non hanno attività esonucleasica 3'5' di proofreading.

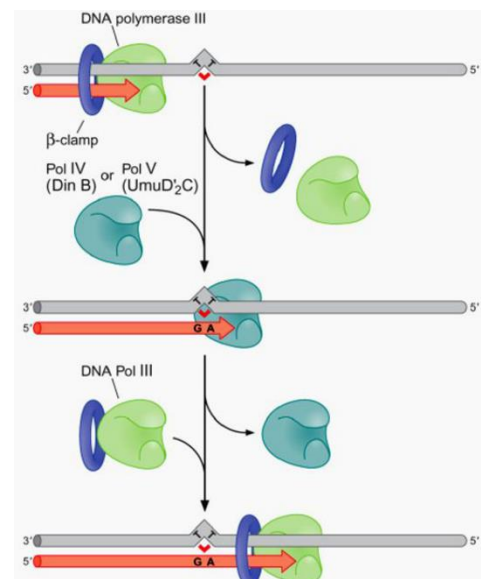
Queste polimerasi error prone hanno una polimerizzazione distributiva, con poca processività.

Le DNA error prone possono essere usate per replicare DNA *in vitro*.

Le DNA polimerasi error prone hanno una struttura con un sito catalitico più aperto rispetto alle polimerasi canoniche.

Sintesi translesione nei procarioti

Nei procarioti la DNA polimerasi III replica il genoma, assieme alla proteina β -clamp, analogo di PCNA negli eucarioti, che ne aumenta la processività. La DNA polimerasi arriva alla lesione e si blocca; a questo punto può dissociarsi dal DNA ed essere sostituita da una DNA polimerasi translesione. In E.coli ci sono due DNA polimerasi translesione che sono Pol IV (Din B) e Pol V (UmuD'2C). La DNA polimerasi inserisce nucleotidi a caso sulla lesione e si



dissocia rapidamente grazie alla poca processività; si possono reinserire a questo punto nuovamente la DNA pol III e β -clamp, che è più fedele.

Mutagenesi in E.coli

In E.coli è presente una risposta SOS al danno del DNA. Questi sono oltre 20 geni la cui trascrizione è indotta dal danno al DNA. Tra questi geni troviamo RecA e LexA.

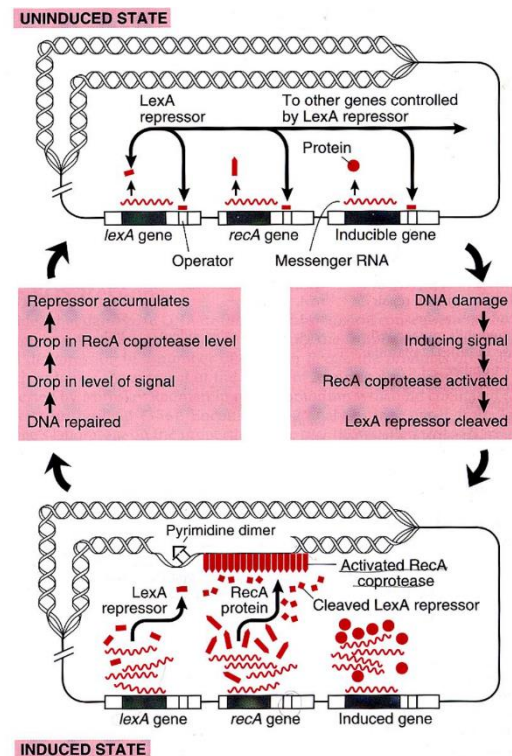
LexA è un gene che codifica per una proteina che agisce da repressore trascrizionale dei 20 geni della risposta SOS, compreso RecA. RecA è un gene che codifica per una proteina che lega il ssDNA.

Se c'è danno al DNA durante la fase S questo può bloccare la replicazione. Quando si blocca la replicazione aumenta il ssDNA, che viene legato da RecA. Il legame al ssDNA attiva RecA, che a sua volta lega LexA e ne induce il taglio autoproteolitico (LexA taglia se stessa solo quando legata a RecA), inattivando LexA. LexA clivata non esercita più l'attività di repressione della trascrizione, con aumento dell'espressione dei geni SOS.

Tra i geni repressi da LexA troviamo UmuD ed UmuC.

Questi geni codificano per due proteine che interagiscono. RecA attivato stimola l'autoproteolisi di UmuD, generando la variante UmuD', che a sua volta lega UmuC oppure UmuD'.

Il complesso UmuD'2C è la DNA polimerasi V.



Sintesi translesione negli eucarioti

Nelle cellule umane ci sono molte più polimerasi translesione che polimerasi canoniche. Nell'uomo il DNA codificante è molto meno di quello non codificante.

Pol η è specializzata nel superare la lesione causata da dimeri di timina, e lo fa inserendo due adenine nel filamento complementare.

La macchina replicativa legata a PCNA arriva alla lesione, si dissocia la macchina replicativa e subentra la DNA polimerasi translesione. Si pensa che subentrino due polimerasi translesione. La prima replica sulla lesione, poi subentra una proteina che sostituisce Pol1 con Pol2 (non sono i nomi veri), con un'altra polimerasi translesione che estende il tratto di DNA, per poi essere sostituita dal macchinario replicativo.

Ci sono vari studi che suggeriscono che PCNA abbia un ruolo fondamentale nell'operazione di bypass della lesione, in particolare la sua modificazione mediante ubiquitinazione.

La sintesi translesione non ripara la lesione, ma ripara il blocco replicativo causato dalla lesione.

Meccanismi di riparazione del DSB con ricombinazione

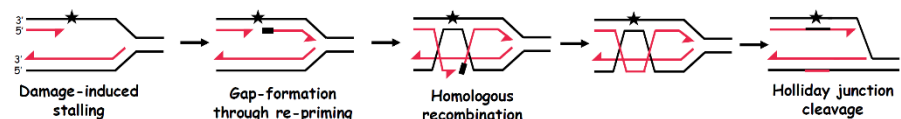
Sono stati proposti quattro modelli per la riparazione di DSBs che utilizzano la ricombinazione per superare il blocco replicativo.

Strand Exchange

Dopo il blocco replicativo si ha un repriming a valle della lesione, e dal primer ricomincia la sintesi del DNA da parte della

polimerasi. Si ha in questo modo un gap sull'elica di neosintesi nella regione complementare alla lesione, a seconda di dove viene fatto il repriming.

-Post Replicative Repair (Strand exchange):



Questo gap può essere riparato dalla ricombinazione con il filamento di DNA originale. Che si appaiava alla lesione prima della ricombinazione.

Come si vede nell'immagine, il filamento stampo complementare alla lesione si dissocia parzialmente dal filamento di neosintesi e si riassocia alla regione complementare che porta la lesione. Nello stesso modo, i filamenti alle estremità del gap si appaiano al filamento neosintetizzato complementare, quello da cui si era dissociato il filamento stampo complementare alla lesione. Il gap sul filamento di neosintesi, che si trova appaiato al filamento di neosintesi complementare senza lesione, può essere riparato usando come stampo quest'ultimo filamento di DNA. La ligasi lega i segmenti separati. Le giunzioni di Holliday che si sono formate vengono risolte, e si avrà uno scambio di materiale genetico tra il filamento di neosintesi che aveva il gap ed il filamento originale che porta la sequenza complementare alla lesione.

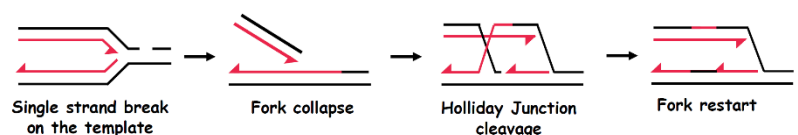
La lesione comunque rimane sul filamento originale, e può essere riparata dai meccanismi di riparazione intracellulare.

Break induced replication

Nel caso in cui la lesione sull'elica stampo sia un nick, quando la DNA polimerasi che sta replicando incontra il nick questa si ferma (probabilmente si

dissocia dal DNA). Si ha così il collasso della forca, con un pezzo di DNA che effettivamente si separa dal cromosoma. L'altro braccio della forca, che resta attaccato al DNA stampo originale, può essere legato all'estremità del sito di rottura.

-Replication by recombination or break-induced replication:

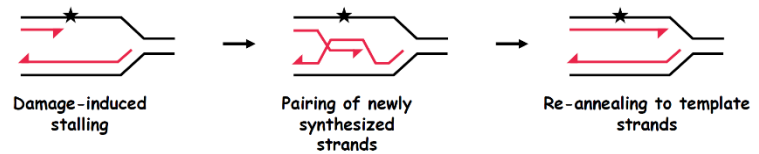


Il frammento di DNA che si è separato può invadere il braccio della forca rimasto intatto, appaiandosi e formando una giunzione di Holliday che viene risolta e permette il ripristino della forca di replicazione.

Switch di templatato

Lo switch di templatato può presentarsi quando una lesione blocca l'avanzata della DNA polimerasi. Il filamento neosintetizzato sul filamento lesionato si dissocia e si appaia al filamento neosintetizzato sull'altro braccio della forca replicativa, usandolo come stampo per un breve tratto. I due filamenti neosintetizzati poi si dissociano, ed il filamento sul braccio con la lesione si riassocia al suo stampo, ma essendo stato allungato si riassocia anche sul punto di lesione e per un tratto successivo. A questo punto la replicazione riprende normalmente.

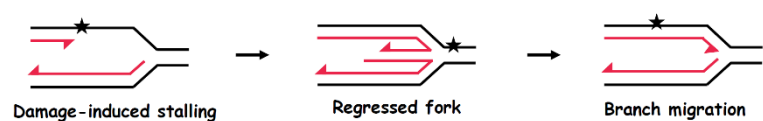
-Template switching:



Fork reversal

Il meccanismo di reversione della forca si presenta in presenza di un danno al DNA durante la replicazione. Quando la DNA polimerasi si blocca ad una lesione, da parte di una elicasi

-Fork reversal:



si ha la rottura dei ponti ad idrogeno tra filamenti stampo e di neosintesi. I due filamenti di neosintesi si appaiano, ed il filamento di cui la sintesi si era arrestata alla lesione può utilizzare come stampo il filamento di neosintesi sull'altro braccio della forca per essere allungato dalla DNA polimerasi. Un breve allungamento permette di bypassare la lesione, per cui i due filamenti di neosintesi si dissociano e si riassociano con i filamenti stampo.

Non è chiaro cosa regoli la scelta del metodo con cui superare un blocco replicativo tra ricombinazione e sintesi translesione. Ci sono comunque prove sperimentali che danno evidenza di questi meccanismi di tolleranza.

Alla domanda sui meccanismi di tolleranza al danno sono da dire sia i metodi di sintesi translesione (SOS) che quelli di ripresa della forca replicativa.

RecQ elicasi

Sulla forca replicativa in arresto intervengono spesso DNA elicasi che hanno la funzione di far dissociare i due filamenti complementari per permetterne l'associazione con i complementari sul braccio opposto. Queste DNA elicasi sono diverse da quelle canoniche, ed appartengono alla famiglia delle RecQ elicase.

In E.coli si trova la proteina RecQ, che dà il nome alla famiglia di proteine con funzione di elicasi nei vari organismi. Tra queste troviamo **Sgs1** in *S.cerevisiae* (che lavora assieme alla esonucleasi Dna2 nella resection), **WRN** e **BLM** nell'uomo.

Queste elicasi hanno tra loro dei domini conservati, tra cui il dominio elicastico, il dominio RQC che media interazioni proteina-proteina, un dominio HRDC.

L'inattivazione del gene BLM nell'uomo causa la sindrome di Bloom, l'inattivazione del gene WRN causa la sindrome di Werner, l'inattivazione di RECQ4 causa la sindrome di Rothmund-Thomson.

Sindrome di Bloom

La sindrome di Bloom è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da difetti di crescita, nanismo, immunodeficienza, infertilità, sensibilità al sole, diabete, orecchie prominenti, aumento della frequenza di vari tipi di tumore. La diagnosi viene fatta in età giovanile ed i pazienti muoiono generalmente per l'insorgenza di tumori, prima dei 30 anni.

Sindrome di Werner

La sindrome di Werner è una malattia autosomica recessiva che causa un invecchiamento precoce e un aumentato rischio di insorgenza di tumore. La morte dei pazienti è frequente prima dei 50 anni, per tumore o malattie cardiovascolari.

Nelle mutazioni mappate su pazienti Bloom e pazienti Werner troviamo che nei pazienti Bloom abbiamo tutti i tipi di mutazione, mentre nei pazienti Werner mancano le mutazioni missenso. Nei pazienti Werner le mutazioni provocano generalmente grossi cambiamenti nella sequenza del gene ma non rimuovono il gene, che è quindi necessario per la sopravvivenza.

Ruolo delle elicasi RecQ

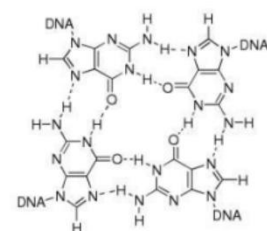
Durante la replicazione del DNA è possibile che si formino strutture ad hairpin o G-quadruplex, o altri tipi di lesioni che causano il blocco della forza replicativa. Le RecQ elicasi rompono i ponti idrogeno tra basi azotate di hairpin e G-quadruplex, e di quelle degli intermedi di riparazione.

I G-quadruplex sono appaiamenti tra guanine che si formano in regioni di DNA ricche di guanina.

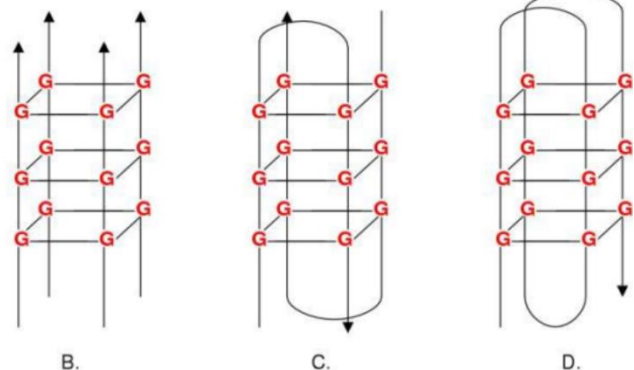
Si possono formare varie strutture G-quadruplex:

- Arrangiamento parallelo di quattro filamenti di DNA
- G-quadruplex intermolecolare
- G-quadruplex antiparallelo intramolecolare

Si sa che mutazioni alle RecQ elicasi nell'uomo danno malattie diverse con fenotipo diverso, come le sindromi di Bloom e Werner; questo



A. G-tetrad structure



indica che anche le RecQ elicasi hanno probabilmente funzioni diverse, e siano quindi specializzate.

Nella sindrome di Bloom il fenotipo principale è il difetto di crescita nei pazienti, e la maggiore suscettibilità ai tumori dovuta all'instabilità genetica. Il blocco della crescita può essere dato da un difetto replicativo, causato dal mancato recupero della forza di replicazione a causa della mancanza della elicasi, che non dissocia hairpin e g-quadruplex.

I pazienti Bloom hanno un problema di crescita provocato dal mancato superamento dei blocchi replicativi.

La sindrome di Werner è caratterizzata da invecchiamento precoce. L'invecchiamento cellulare è un processo connesso con la lunghezza dei telomeri, che regola la capacità proliferativa della cellula.

Il DNA telomerico è dsDNA con una coda di ssDNA 3' protruding ricche di guanina, che forma i G-quadruplex. I telomeri sono allungati dall'enzima telomerasi, che però viene bloccato nella sua azione dai g-quadruplex terminali. I g-quadruplex terminali sono utili perché limitano il taglio del ssDNA da parte delle nucleasi.

Si pensa che la proteina WRN risolva le strutture g-quadruplex ai telomeri, facendo in modo che la telomerasi possa allungare i telomeri. Se WRN non funziona l'estremità telomerica non è accessibile alla telomerasi, che quindi non allunga il telomero. Il telomero quindi si accorcia naturalmente con le repliche cellulari, che causa un invecchiamento precoce delle cellule con mutazione WRN.

La diversa specializzazione ipotizzata per BLM e WRN potrebbe spiegare la diversa sintomatologia riscontrata nella mutazione di queste proteine. Entrambe inoltre hanno un effetto sull'aumento della comparsa di tumori, per via dell'instabilità genomica causata dalla disfunzione delle elicasi della famiglia RecQ nei normali processi di tolleranza.