

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 8

### Mismatch repair

Il sistema di riparazione da mismatch è deputato alla riparazione dei mismatch, che sono gli errori di appaiamento tra le basi. La DNA polimerasi può infatti fare errori nell'inserimento dei nucleotidi, che sono riparati specificamente da questo sistema di riparazione. Questo sistema è presente sia nei procarioti che negli eucarioti.

I difetti in questo meccanismo di riparazione causano una aumentata frequenza di mutazioni, dalle 10 alle 1000 volte superiori in caso di difetto. Difetti in questo sistema di riparazione causano un aumento del rischio di cancro al colon ed altri tumori (HNPCC).

### **Il sistema MMR nei procarioti**

Il primo problema che il sistema MMR deve affrontare è la discriminazione dei due filamenti, quello originale da quello con il mismatch. Il sistema MMR deve essere quindi in grado di discriminare il filamento stampo dal filamento neosintetizzato, e rimuovere il nucleotide dal filamento neosintetizzato. La discriminazione del filamento stampo dal filamento neosintetizzato avviene grazie alla presenza di metilazione sul filamento stampo.

In E.coli c'è un enzima che metila il DNA nelle sequenze GATC, per cui nel genoma le sequenze GATC verranno metilate normalmente, sull'adenina A presente nella sequenza.

Durante la replicazione del DNA l'elica di neosintesi non viene subito metilata, per cui c'è una fase in cui la sequenza GATC è emimetilata, quindi metilata solo sull'elica stampo. Il sistema MMR usa l'emimetilazione per distinguere l'elica stampo dall'elica di neosintesi.

Nel sistema MMR di E.coli sono coinvolte 3 proteine:

- MutS
- MutL
- MutH

Mut per mutazione, perché difetti in questo meccanismo di riparazione causano un altissimo numero di mutazioni.

La sequenza emimetilata GATC può essere localizzata sia a 3' che a 5' del mismatch. Il mismatch provoca una distorsione più o meno evidente della conformazione del DNA. Le proteine MutS e MutL interagiscono a formare un complesso che riconosce il mismatch, ed attivano MutH, che è una endonucleasi che taglia il DNA all'interno della sequenza GATC, generando un nick nel filamento non metilato.

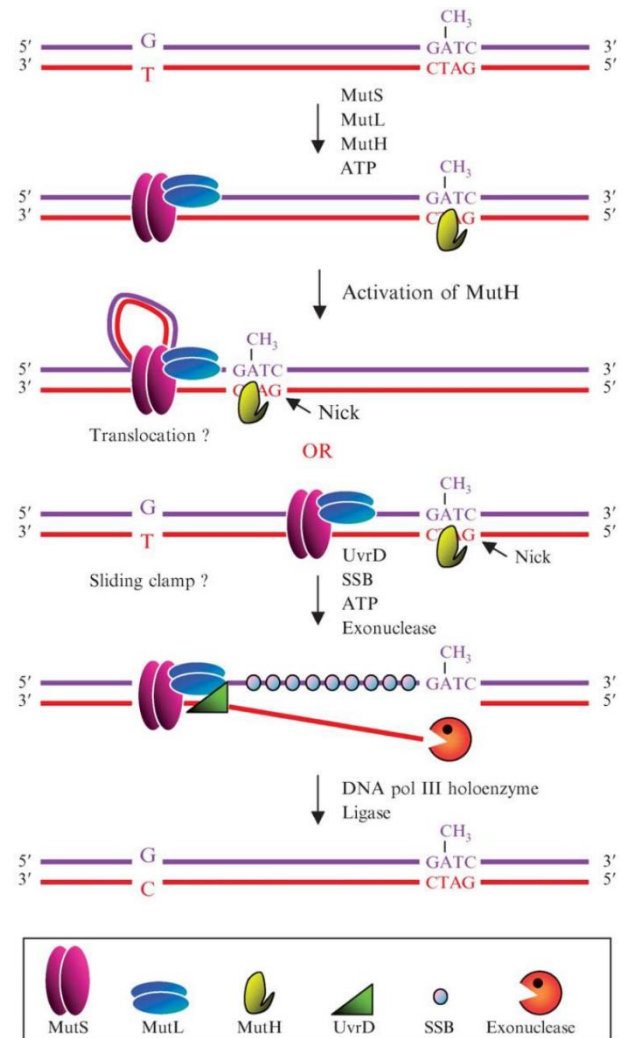
Ci sono due ipotesi sul modo in cui MutS e MutL attivano MutH. Una è che causano un ripiegamento della molecola di DNA, per cui MutS e MutL si ritrovano vicine a MutH, ed il mismatch si ritrova vicino alla sequenza GATC emimetilata.

L'altra teoria è che MutS e MutL riconoscono il mismatch e poi scorrono sul DNA fino ad arrivare a MutH.

Dopo la creazione del nick sulla sequenza GATC da parte di MutH, il nick fa da sito di accesso per una esonucleasi che rimuove nucleotidi a partire dall'estremità libera. Le esonucleasi hanno preferenza per l'attività esonucleasica in direzione 5'3' oppure 3'5', non ci sono esonucleasi con doppia specificità.

L'esonucleasi in questo caso rimuove nucleotidi dal nick sul filamento di neosintesi GATC sino ad arrivare al mismatch. Il gap formato dalla esonucleasi viene riempito dalla DNA polimerasi III. La DNA polimerasi III è quella deputata alla replicazione del DNA nei procarioti.

La DNA ligasi lega il filamento di neosintesi.



## MMR negli eucarioti

Negli eucarioti il meccanismo MMR è molto simile a quello dei procarioti.

Negli eucarioti ci sono proteine ortologhe a MutS, cioè MSH, ed ortologhi di MutL, cioè MLH. Ci sono più proteine che formano i complessi MSH ed MLH.

La differenza è che negli eucarioti non esiste MutH, perché negli eucarioti non c'è il sistema di metilazione che c'è negli eucarioti. Il problema della discriminazione dei filamenti non è ancora stato completamente risolto. Si sa che servono delle interruzioni nell'elica di neosintesi per permettere l'attacco delle esonucleasi, e queste interruzioni non sono generate da un ortologo di MutH.

Sappiamo che il sistema MMR deve agire durante la replicazione del DNA. Nella replicazione del DNA sappiamo che ci sono delle interruzioni del filamento di DNA della lagging strand, che sono intrinseche al processo di repliche con frammenti di Okazaki.

È possibile che il sistema MMR degli eucarioti, almeno sulla lagging strand, usi proprio le interruzioni tra frammenti di Okazaki. Questa ipotesi non risolve il metodo di inserimento dei nick nella leading strand.

Ci sono quindi due sistemi MMR negli eucarioti: il 5'MMR ed il 3'MMR.

## 5' MMR

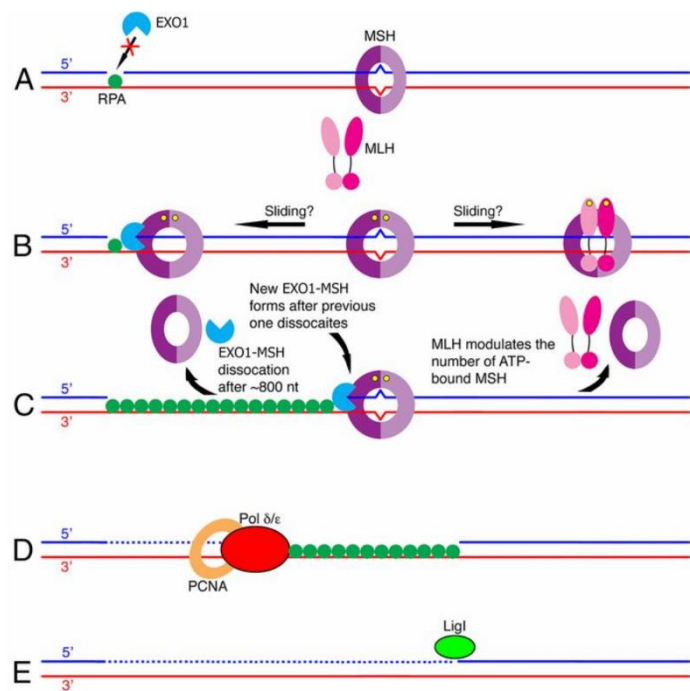
Il meccanismo 5' MMR si attiva quando l'interruzione è in 5' al mismatch.

In questa condizione c'è l'ortologo di MutS, che è il complesso MSH, il quale riconosce e lega il mismatch. All'interruzione in 5' l'esonucleasi EXO1 non riesce a degradare il DNA perché sembra che ci sia RPA sul filamento opposto.

MSH si pensa che scorra sulla doppia elica, con idrolisi di ATP, fino a raggiungere EXO1, con la quale forma un complesso. Il complesso MSH-EXO1 attiva l'attività esonucleasica di EXO1, che rimuove nucleotidi sulla catena di neosintesi fino ad arrivare al mismatch. Non è chiaro cosa faccia MLH in questo processo. Si sa che non serve per l'attività in vitro di MSH.

Si ritiene che MLH regoli la quantità di complessi MSH-EXO1 legati al DNA, regolandone la dissociazione.

Dopo che l'attività di EXO1 ha generato un gap interviene la DNA polimerasi 5'3' che sintetizza il nuovo segmento di DNA. In questa fase la DNA pol è in complesso con PCNA, che aumenta la processività della polimerasi. La DNA ligasi lega il segmento neosintetizzato al filamento.

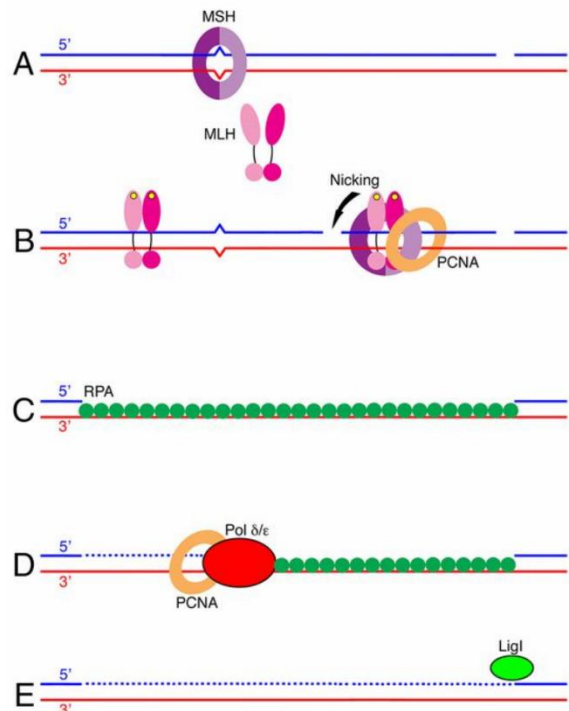


## 3' MMR

Il meccanismo 3' MMR è meno conosciuto.

C'è sempre MSH che riconosce la lesione. Sembra che MLH abbia un ruolo più importante e sia coinvolto anche PCNA. Quando si forma il complesso MSH-MLH-PCNA, MLH ha una attività di endonucleasi ed è in grado di generare nick sull'elica di neosintesi, dal quale nick ha luogo poi l'attività esonucleasica che rimuove nucleotidi fino al mismatch. Non è chiaro chi svolge l'attività esonucleasica.

La DNA pol δ sintetizza il nuovo filamento a riempire il gap, mentre la DNA ligasi I lega il filamento neosintetizzato.



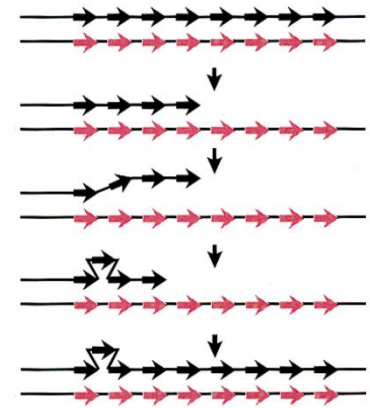
## HNPCC

La hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC) è una predisposizione dominante al cancro al colon ed altri tipi di tumore. La penetranza è molto elevata, di circa l'80%. Gli individui che manifestano il fenotipo sono eterozigoti. Il tumore non interessa solo il colon, ma si può sviluppare con maggiore frequenza anche nell'endometrio, l'ovario ed altri organi interni. Non tutti i

tumori dell'endometrio e del colon sono causati da una mutazione, ma mutazioni al sistema MMR aumentano di molto il rischio di tumore in questi distretti.

Sono state identificate diverse mutazioni che inattivano più o meno completamente il gene hMSH2 o hMLH1.

Una caratteristica dei pazienti con deficit del sistema MMR è l'instabilità delle sequenze ripetute, i microsatelliti. I microsatelliti sono ripetizioni di 1-3 nucleotidi ripetuti in tandem, il cui numero di ripetizioni varia da organismo ad organismo. I microsatelliti sono dispersi su tutto il genoma e rappresentano un modo per tipizzare il DNA nella genetica forense. Il numero di ripetizioni varia da individuo ad individuo. Nei pazienti MMR il numero di ripetizioni dei microsatelliti varia moltissimo. I microsatelliti sono instabili a causa del fatto che l'elica può dissociarsi, e poi riassociarsi in posizione sbagliata, dando luogo a degli hairpin.



Se l'elica si associa male ed il DNA viene replicato, succede che la DNA polimerasi genererà un'altra elica con un numero di ripetizioni più corta.

Questi errori di appaiamento e formazione di hairpin sono riparati dal sistema MMR. Quando questo non funziona gli errori di appaiamento non vengono riparati e si ha alterazione del numero di ripetizioni.

Il monitoraggio dei microsatelliti è quindi un test diagnostico per difetti di MMR e quindi rischio di HNPCC.

In un individuo sano le cellule hanno un numero omogeneo di ripetizioni di una sequenza microsatellite.