

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 9

### Double strand break repair

Le cellule hanno dei meccanismi per riparare la rottura della doppia elica di DNA (double strands break, DSBs), che sono tra le lesioni più pericolose. Questo dà instabilità genetica e aumenta il rischio di oncogenesi.

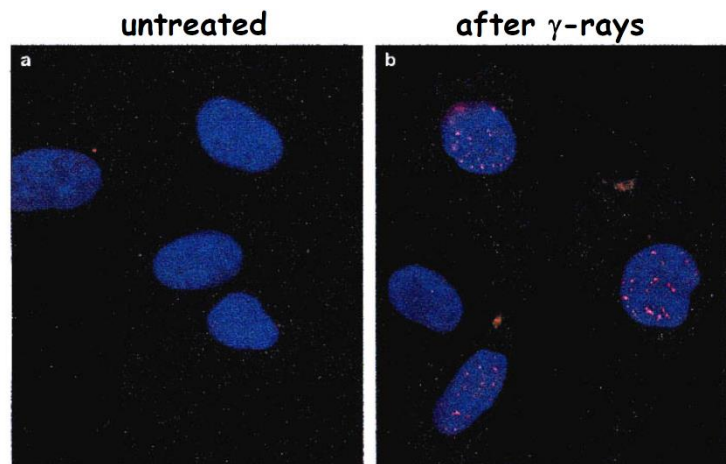
La nomenclatura che useremo sarà quella del lievito *S.cerevisiae*.

Ci sono due meccanismi che sono implicati nella riparazione di un danno alla doppia elica del DNA, che sono Homologous Recombination (HR) e Non-Homologous End Joining (NHEJ).

Alla rottura della doppia elica vengono reclutate una serie di proteine ad entrambi i lati della rottura. Gli istoni H2A nei pressi della lesione vengono fosforilati nella variante  $\gamma$ -H2AX. Questa modificazione è molto estesa e copre circa 5kb di DNA da entrambi i lati della rottura. Si pensa che questa modificazione istonica serva a facilitare l'accesso di proteine coinvolte nella riparazione della doppia elica e per facilitare il riconoscimento del sito.

Altre modificazioni istoniche vengono indotte dai DSBs.

Queste modificazioni innescano una serie di risposte cellulari alla rottura.

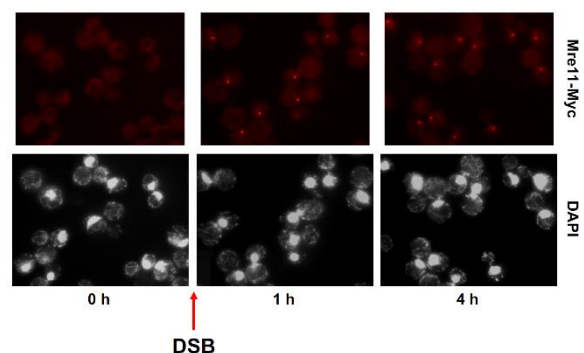


La rottura della doppia elica di DNA induce la formazione di foci, che sono strutture di diversi gigadalton, che non si sa esattamente a cosa corrispondano. Si pensa che si formano nei siti di lesione DSBs, dove sono reclutate diverse proteine impegnate nella riparazione.

I foci possono essere visualizzati con il microscopio a fluorescenza, che rileva la fluorescenza emessa dalla proteina RAD51 marcata con anticorpo fluorescente.

Con esperimenti dello stesso tipo, inducendo però una singola rottura della doppia elica in lievito mediante uno specifico enzima, è possibile rilevare che Mre11 viene reclutato al sito di danno al DNA.

Recruitment of Mre11 at a single irreparable DSB in *S. cerevisiae*



Mre11 è rilevato perché espressa come proteina di fusione con Myc, che è bersaglio di un anticorpo fluorescente.

### DNA double strands breaks

Ci sono due meccanismi per riparare le rotture della doppia elica di DNA. Uno è il Non-Homologous End Joining (NHEJ), e l'altro è la ricombinazione omologa (homologous recombination, HR).

Se si genera una rottura della doppia elica che non viene riparata prima della fine della mitosi, cioè prima della migrazione dei cromatidi ai poli opposti della cellula, si avrà la perdita di un frammento di cromosoma. Le rotture della doppia elica sono pericolose per la cellula proprio perché possono causare perdita di materiale genetico.

Il NHEJ è un meccanismo più semplice, che prevede il legame delle due estremità del sito di rottura della doppia elica. Interviene una DNA ligasi che lega i frammenti di DNA separati.

La HR è un processo più complesso, che coinvolge diverse proteine. Il meccanismo che innesca il processo di ricombinazione omologa è la **degradazione nucleolitica**, detta anche **resection**. All'estremità della rottura si avrà l'azione di una esonucleasi che rimuove nucleotidi dall'estremità 5', lasciando una estremità 3' protruding. La formazione di ssDNA 3' protruding innesca la ricombinazione omologa.

La differenza fondamentale tra i due sistemi di riparazione di un DSBs è che al NHEJ non si ha nessun processamento delle estremità, cioè la ligasi lega le due estremità, e funziona su estremità piatte. Sulle estremità 3' protruding il NHEJ non lega bene le estremità.

Il primo tentativo della cellula per riparare un danno alla doppia elica è il NHEJ. Quando si innesca la resection il NHEJ non può più funzionare, per cui la rottura viene riparata mediante ricombinazione omologa.

Il NHEJ lega direttamente le estremità, mentre la ricombinazione omologa HR ha bisogno di un cromatide fratello o di un cromosoma omologo per effettuare la ricombinazione e riparare la lesione. Nella HR si usa il cromosoma omologo per recuperare l'informazione genetica necessaria a riparare la rottura.

Si genereranno in questo modo le giunzioni di Holliday, che sono ponti crociati di DNA scoperte da Robin Holliday.

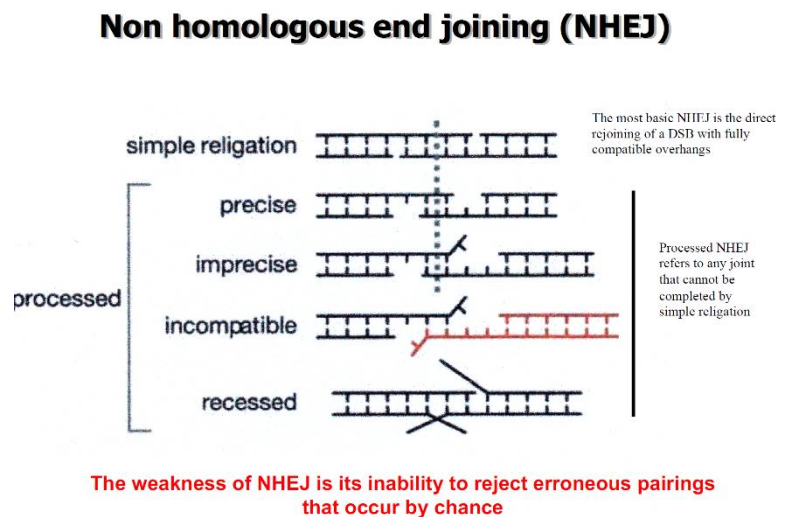
### NHEJ

Nel non-homologous end joining ci sono proteine che riconoscono la rottura della doppia elica, che sono il complesso Ku, formato da Ku70 e Ku80, che ha una forma ad anello e riconosce le estremità di DNA. Partecipa anche la DNA PK, un protein kinasi DNA dipendente.

Le estremità della rottura sono quindi identificate dal complesso Ku e da DNA-PK. Questi innescano una serie di fosforilazioni che portano al caricamento sulla rottura della DNA ligasi 4 LIG4, che rilega le estremità di DNA.

Altre proteine che partecipano sono Artemis e la DNA polimerasi.

Il meccanismo NHEJ rilega le estremità piatte, ma è possibile che nella rottura della doppia elica le estremità non siano piatte. Possono essere protruding di pochi nucleotidi, oppure imprecise, oppure incompatibili. Il problema del NHEJ è che rilega le estremità senza discriminare estremità che provengono da molecole di DNA diverse. Non è in oltre in grado di riconoscere problemi alle estremità, per cui è possibile che nel punto di ricongiungimento ci possano essere degli errori o delle mutazioni.



In cellule di mammifero, dove la maggior parte del genoma non è codificante, c'è una probabilità minore che le rotture cadranno in regioni codificanti, quindi la riparazione con NHEJ difficilmente avrà un grosso effetto sulla vitalità delle cellule.

L'evoluzione ha mantenuto questo meccanismo perché evidentemente da dei vantaggi, perché eventuali alterazioni della sequenza nel punto di ricongiungimento sono compensati dalla efficienza della riparazione.

Il malfunzionamento di LIG4 provoca la sindrome LIG4, che è una rara malattia genetica caratterizzata da immunodeficienza, predisposizioni a tumori, principalmente leucemie, alterazioni della crescita e dello sviluppo, microcefalia.

L'immunodeficienza è causata dal fatto che nella generazione di anticorpi, durante il processo di ricombinazione VDJ, si ha riarrangiamento di materiale genetico che viene riparato mediante NHEJ dalla LIG4.