

# Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

## Lezione 5

### NER nell'uomo

Diverse malattie genetiche possono presentarsi nell'uomo a seguito di malfunzionamento del NER.

#### ***Xeroderma pigmentosum***

Lo Xeroderma pigmentosum, o XP, è una malattia genetica autosomica recessiva, che dà una estrema sensibilità alla luce solare ed una elevata predisposizione allo sviluppo di tumori alla cute.

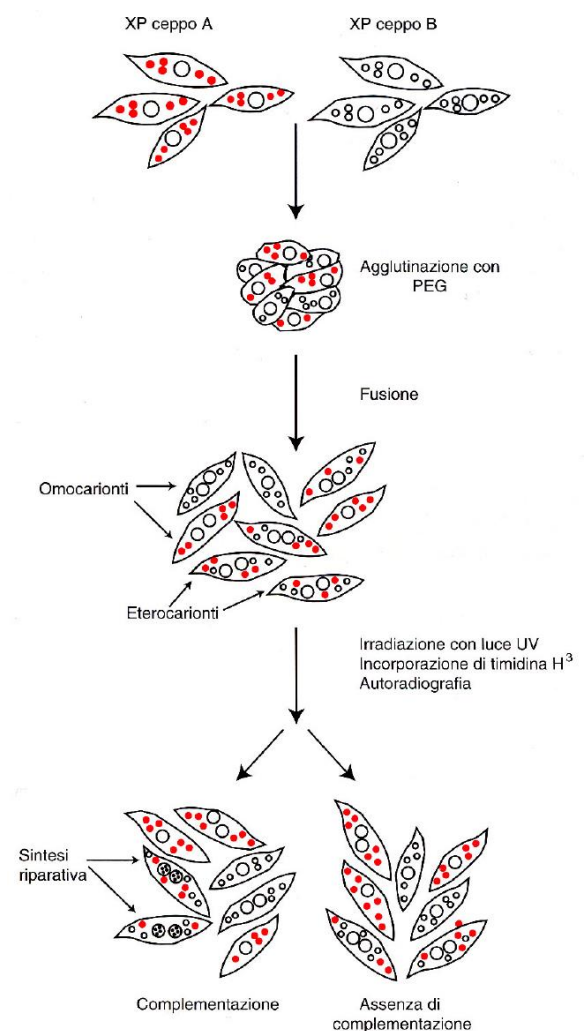
Gli individui XP devono proteggersi dai raggi UV con vestiti o schermi.

Il NER nell'uomo coinvolge oltre 30 proteine, e quindi oltre 30 geni. Individui con fenotipo XP possono avere mutazioni nello stesso gene o in geni diversi.

I geni che causano fenotipo XP sono stati identificati mediante cellule di pazienti.

Per fare ciò è necessario identificare pazienti che hanno mutazioni in geni diversi. Questo si può fare mediante un test di complementazione. A questo scopo sono stati fusi fibroblasti della cute da due pazienti differenti. Si creano così degli eterocarionti in cui sono presenti i nuclei di entrambe le cellule. Si irradiano le cellule con raggi ultravioletti in presenza di dNTP, di cui uno marcato.

L'incorporazione del nucleotide marcato nella cellula ibrida esposta ai raggi UV dà informazioni sull'attività del NER.



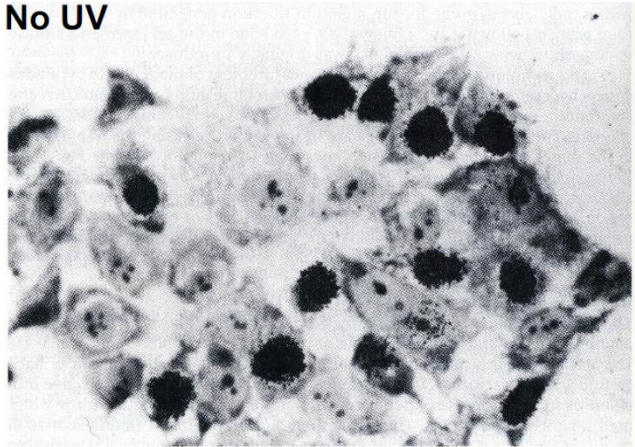
Cellule ibride che incorporano nucleotidi marcati hanno avuto complementazione ed hanno un NER funzionante. Cellule che non incorporano nucleotidi non hanno fatto complementazione, quindi portano la mutazione sullo stesso gene.

I ricercatori hanno fatto test di complementazione per identificare i gruppi di complementazione. Pazienti che appartengono allo stesso gruppo di complementazione hanno generalmente mutato lo stesso gene. Pazienti di gruppi di complementazione diversi hanno mutazioni su geni diversi.

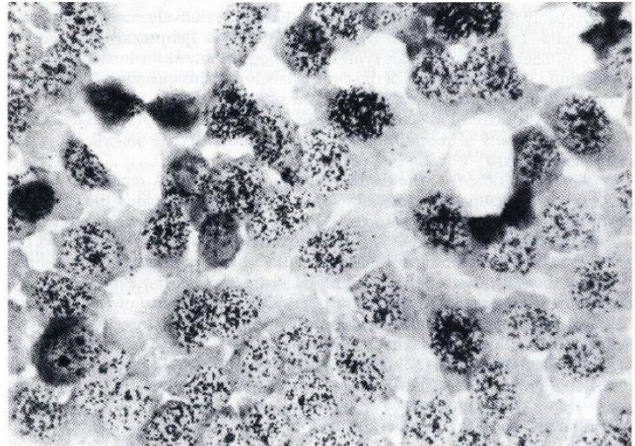
La capacità di fare sintesi riparativa si fa utilizzando timidina triziata ed irradiando le cellule. Si rileva poi l'incorporazione di timidina triziata, che può avvenire per due motivi: sintesi riparativa oppure replicazione del DNA. La replicazione del DNA si evidenzia con una forte incorporazione, e quindi un forte segnale, nel nucleo della cellula.

La riparazione si evidenzia con un segnale meno forte, puntinato.

No UV



UV irradiation



Facendo questo lavoro sui pazienti XP sono stati definiti i seguenti gruppi di complementazione:

- XPA: DNA damage recognition
- XPB: attività elicastica
- XPC: DNA damage recognition
- XPD: elicase
- XPE: DNA damage recognition
- XPF: endonuclease
- XPG: endonuclease

Questi sono i geni trovati, la cui mutazione dà fenotipo XP. Altri geni sono stati trovati con altre modalità di ricerca.

### **GG-NER e TC-NER nell'uomo**

I meccanismi di NER global genome e transcription coupled sono presenti anche nell'uomo in maniera molto simile ad E.coli. Il meccanismo molecolare è simile, ma nell'uomo troviamo più proteine.

## GG-NER

Nel GG-NER dell'uomo, le proteine che rilevano la lesione sono XPC assieme a CETN2 e RAD23B. Queste proteine formano un complesso che riconosce la lesione.

Il riconoscimento della lesione è facilitato dal complesso UV-DDB. Rilevata la lesione RAD23B si stacca.

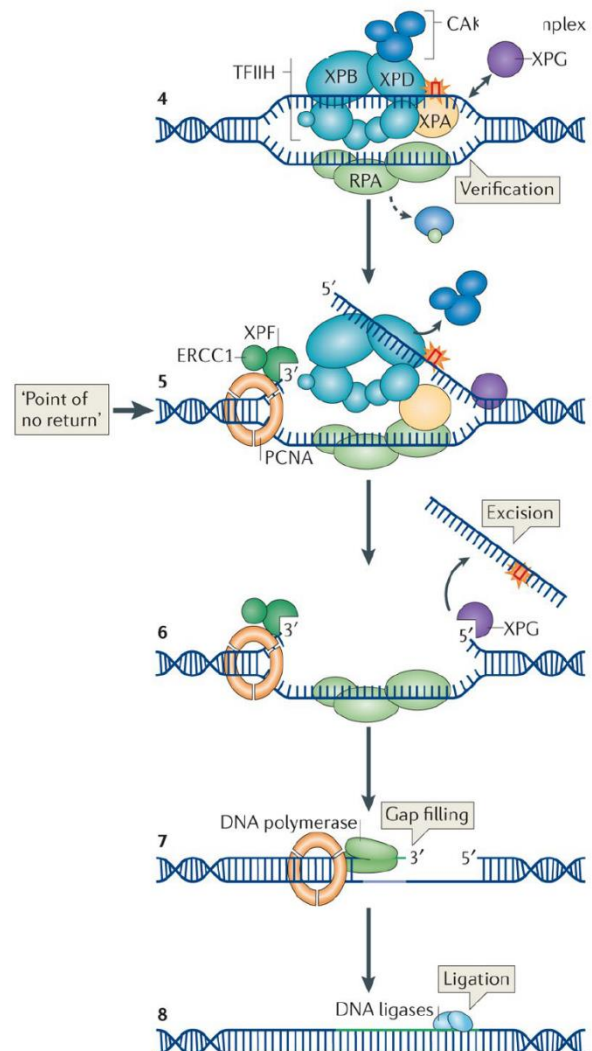
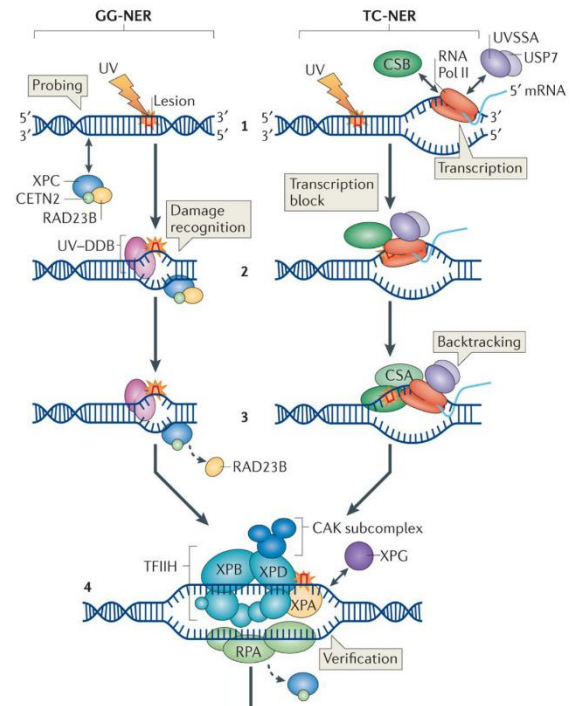
## TC-NER

Nel TC-NER c'è il blocco della RNA-pol II alla lesione. Lo stallo della RNA pol II richiama le proteine CSB e CSA. Queste proteine sono molto importanti e specifiche del TC-NER.

Avvenuto il riconoscimento della lesione, che è specifico di ognuna delle due vie di attivazione, viene reclutato il complesso TFIIH, per cui il processo è da qui comune ad entrambe le vie. Questo è un complesso di inizio della trascrizione, che comprende le proteine XPB ed XPD. Queste sono due elicasi che aprono la doppia elica di DNA. A questo punto il complesso RPA lega il ssDNA. Nel complesso TFIIH è presente anche XPA, il cui ruolo è ancora poco conosciuto.

XPA recluta l'endonucleasi XPG e la endonucleasi XPF. XPF recluta anche un'altra proteina, che è ERCC1. Queste due endonucleasi tagliano una a monte ed una a valle della lesione, liberando un oligonucleotide che contiene la lesione. Si ritiene che le endonucleasi XPG e XPF/ERCC1 taglino l'elica in corrispondenza della giunzione ssDNA/dsDNA, cioè in corrispondenza della terminazione della bolla.

Si libera l'oligonucleotide di 22-30 nucleotidi contenente la lesione e si genera un gap. Il ssDNA è stabilizzato da RPA. Una DNA polimerasi tra la Pol  $\delta$  e la Pol  $\epsilon$  rileva l'estremità 3'OH e

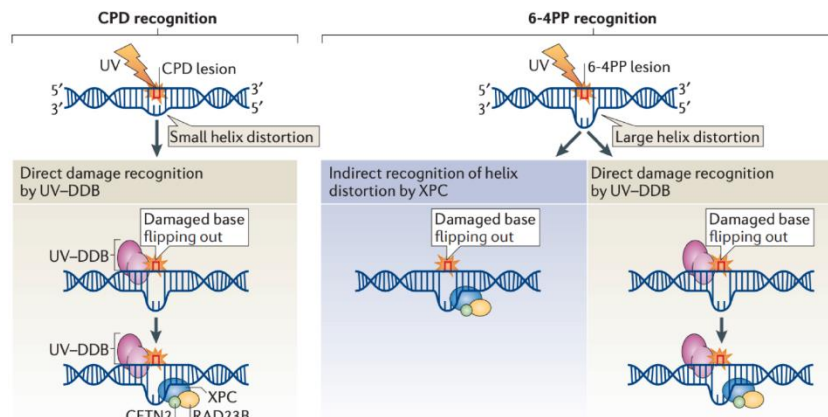


riempie il gap usando come stampo il ssDNA. La DNA ligasi chiude l'elica.

Il meccanismo di riconoscimento della lesione dipende dalla lesione presente. I dimeri ciclobutano pirimidina CPD provocano una distorsione dell'elica meno evidente rispetto ai 6,4PP fotoprodotto.

I dimeri ciclobutano pirimidina CPD sono riconosciuti da UV-DDB, che sembra riconoscere la distorsione della doppia elica di DNA con una buona affinità. UV-DDB recluta il complesso XPC-CETN2-RAD23B alla lesione. Questo secondo complesso dopo aver riconosciuto la lesione rimane attaccato all'elica che non porta la lesione, mentre UV-DDB riconosce direttamente la lesione.

Per quanto riguarda il 6,4 fotoprodotto, questo causa una deformazione rilevante della doppia elica di DNA, e viene riconosciuto direttamente da XPC.



### Tricotiodistrofia (TTD) e Sindrome di Cockayne (CS)

Altre malattie genetiche oltre ad XP possono essere causate da mutazioni in geni impegnati nella riparazione di danni al DNA.

#### *Sindrome di Cockayne*

La sindrome di Cockayne (CS) è una malattia caratterizzata da arresto della crescita e dello sviluppo, con anomalie scheletriche, neurologiche e caratteristiche facciali tipiche. La cosa fondamentale è che i pazienti Cockayne non mostrano cancro alla pelle, che invece è una caratteristica principale dei pazienti XP. I sintomi non compaiono alla nascita, ma si aggravano progressivamente e sono evidenti già a 4 anni.

I geni mutati dei pazienti Cockayne sono CSA e CSB. Queste sono proteine coinvolte nel TC-NER, dove sono reclutate alla lesione dal blocco della RNA Polimerasi ed innescano il processo di riparazione.

Il fatto che i pazienti con fenotipo Cockayne non mostrino cancro alla pelle è spiegabile dal fatto che il GG-NER funziona comunque, per cui pazienti Cockayne sono in grado di riparare i danni da UV e anche gli altri danni normalmente riparati dal NER.

Il problema di crescita e di sviluppo dei pazienti Cockayne è dovuto ai problemi trascrizionali. Quello che si pensa è che l'inattivazione delle proteine CSA e CSB non permetta alla cellula di superare il blocco trascrizionale causato dalla lesione, quindi questi pazienti non riescono a recuperare la trascrizione bloccata ad un particolare gene.

Le nostre cellule subiscono molti danni al DNA che sono riparati dal NER, e un difetto nel superare il blocco della polimerasi causa i difetti nello sviluppo dei pazienti Cockayne.

### *Tricotiodistrofia*

La tricotiodistrofia (TTD) è caratterizzata da fragilità dei capelli, a causa della riduzione di proteine ricche di zolfo. Si hanno anche ritardo mentale, anomalie neurologiche, microcefalia, bassa statura e ittiosi (pelle a scaglie). Anche in questi pazienti non si ha aumento dell'incidenza del tumore della pelle. Questo indica che il GG-NER funziona.

Le proteine mutate nei pazienti con TTD sono XPB ed XPD, che sono proteine che possono ritrovarsi mutate anche in Xeroderma pigmentosum.

Le proteine XPB ed XPD sono due componenti del complesso di inizio della trascrizione TFIIH. Sono due elicasi che provocano la parziale denaturazione della doppia elica di DNA. Il complesso TFIIH non è solo implicato nel NER, ma anche nell'inizio della trascrizione. L'idea è che mutazioni nei geni che codificano per XPB ed XPD che alterano la funzione di TFIIH nel NER diano Xeroderma pigmentosum, mentre mutazioni che alterano la funzione del complesso TFIIH nella trascrizione diano un fenotipo TTD. Si possono anche avere pazienti XP/TTD quando ci sono mutazioni che affliggono la funzione di TFIIH in entrambi i processi.

La malattia TTD è quindi causata da un difetto trascrizionale causata da un difetto nella funzione di TFIIH.