

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 4

Meccanismi di mantenimento della stabilità del genoma.

Il DNA è soggetto ad essere danneggiato sia da agenti endogeni che da agenti esogeni. I danni non riparati si trasformano in mutazioni, che possono portare ad instabilità genetica.

Le cellule hanno un sistema di risposta cellulare chiamato DDR o DNA Damage Response Network, che si attiva in presenza di danni al DNA.

L'attivazione della risposta DDR assicura la stabilità del genoma. Quando la risposta DDR non si attiva, magari per mutazioni in proteine che mediano questa risposta, allora il danno al DNA diventa mutazione, con conseguente aumento del rischio oncologico. La risposta DDR si attiva in presenza di danni al DNA, ma non può esercitare la sua funzione quando il danno è diventato mutazione.

Varie malattie genetiche sono correlate all'inattivazione della risposta DDR.

I meccanismi di riparazione del danno cellulare si dividono in due pathway:

- Reversione diretta delle lesioni
 - Fotoriattivazione
 - Riparazione delle basi alchilate o metilate
- Escissione delle lesioni
 - Escissione di basi (BER)
 - Escissione di nucleotidi (NER)
 - Riparazione degli errori di appaiamento tra le basi (MMR)

Fotoriattivazione

La fotoriattivazione è un meccanismo di riparazione diretta che la cellula usa per riparare i danni provocati dai raggi ultravioletti. I raggi UV provocano il legame covalente tra due pirimidine adiacenti, l'anello ciclobutano pirimidina. Ci sono due tipi di prodotto: il *dimero ciclobutano pirimidina* ed il *fotoprodotto pirimidina (6-4) pirimidone*.

La fotoriattivazione usa l'enzima DNA fotoliasi che catalizza direttamente la rottura del legame covalente.

La fotoliasi ha due gruppi cromofori, MTHF e FADH. Si ha l'assorbimento del fotone da parte di MTHF, che comincia un trasferimento di elettroni sul secondo gruppo

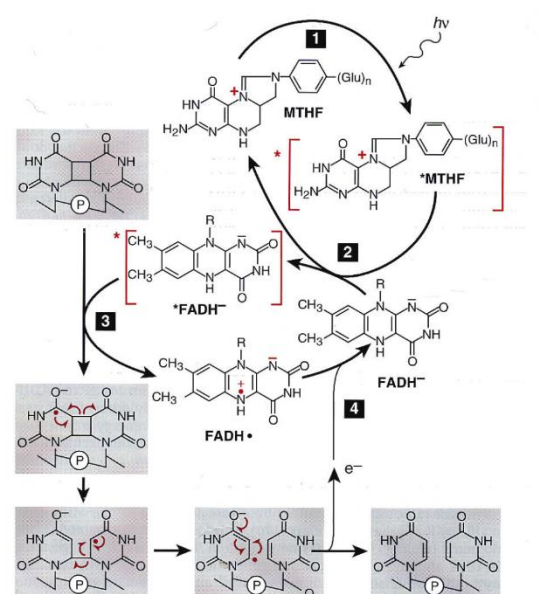


Figure 3-8 Reaction mechanism of DNA photolyase. Absorption of a photon by the chromophore MTHF (step 1) yields the excited state (*MTHF), which transfers the excitation energy to the catalytic cofactor FADH⁻ (step 2). (The folate [MTHF] class of enzymes transfer energy less efficiently than the deazaflavin [HDF] class and has an overall lower quantum yield.) The FADH⁻ excited singlet state (*FADH⁻) initiates monomerization of the pyrimidine dimer by electron transfer (cycloreversion) (step 3), regenerating the catalytically active flavin (step 4). Back electron transfer from the dimer radical pair to the donor (step 4) is slowed by the apolar environment of the flavin. Hence, the back transfer is very slow relative to dimer monomerization. (Adapted from Sancar [200] with permission.)

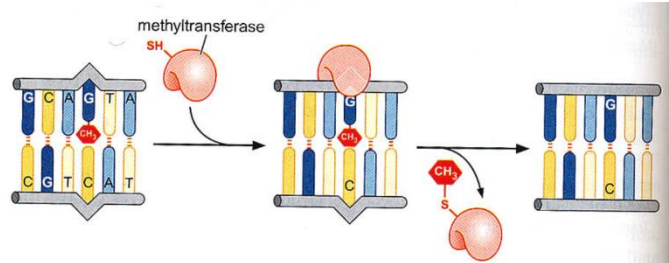
cromoforo, FADH, che destabilizza il legame tra le pirimidine attraverso un trasferimento di elettroni. Si ha la rottura del legame covalente tra le timine ed il DNA ritorna alla sua conformazione precedente.

La DNA fotoliasi è attivata dalla luce e ripara danni causati dalla luce. Questo sistema è stato scoperto in E.coli.

Rimozione gruppi metilici

La guanina è una delle basi azotate in cui si riscontra più spesso metilazione. La guanina metilata provoca l'arresto della DNA polimerasi.

L'enzima metil transferasi catalizza il trasferimento del gruppo metilico dalla base metilata a sé stesso, su un residuo di cisteina.



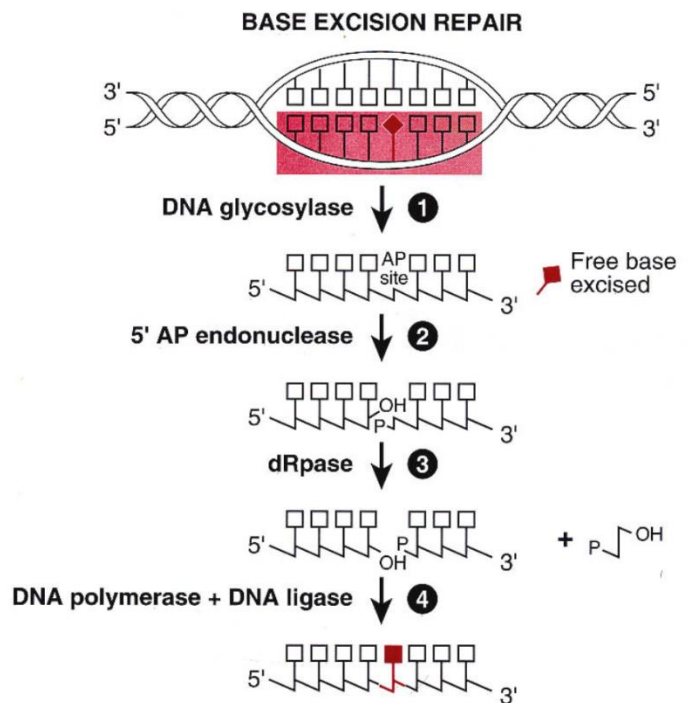
BER

Il meccanismo BER, base excision repair, è in grado di riparare basi modificate e la presenza di uracile nel DNA. Il sistema BER usa varie DNA glicosilasi per rilevare e rimuovere basi al legame glicosidico e produrre un sito abasico, apurinico o apirimidinico.

La molecola di DNA da riparare presenta una base modificata. Ci sono varie DNA glicosilasi specializzate che riconoscono ciascuna una specifica base azotata modificata.

La DNA glicosilasi catalizza l'eliminazione della base, perché rompe il legame glicosidico base-zucchero liberando la base. Il BER agisce solo sul filamento che porta il danno, il filamento complementare rimane inalterato.

La base viene excisa dalla DNA glicosilasi che genera un sito apurinico o apirimidinico. Questo sito è bersaglio di una 5' ap endonucleasi che catalizza la rottura dell'elica che porta il sito apurinico, lasciando una terminazione 3' OH ed una terminazione 5' P. La terminazione 5' P viene eliminata grazie ad una desossiribofosfo diesterasi. Viene in questo modo eliminato un nucleotide.



La DNA polimerasi rileva l'estremità 3' OH e reinserisce il nucleotide mancante su stampo del filamento complementare. Una DNA ligasi chiude la catena.

NER

Il NER, nucleotide excision repair, riconosce anche lesioni al DNA che sono bulky, ingombranti, cioè alterano molto la struttura tridimensionale del DNA. I sistemi di riparazione devono riconoscere una lesione al DNA. Più la lesione è grossolana e più facilmente il sistema di riparazione può identificarla e ripararla.

Il NER è specializzato nel riparare lesioni come i dimeri di pirimidina. Comprende proteine che riconoscono la lesione, possiede anche delle endonucleasi che tagliano ad entrambi i lati della lesione generando un gap. NER è un sistema conservato, da E.coli all'uomo.

In E.coli le proteine coinvolte sono UvrABCD. Negli eucarioti il meccanismo di base è lo stesso, ma vede coinvolte oltre 30 proteine. Il NER può essere accoppiato alla trascrizione.

Si può avere un saggio in vitro per misurare l'attività di NER. Si usano due plasmidi diversi in dimensioni (per essere riconoscibili all'elettroforesi), di cui uno danneggiato con acetil-2-aminofluorene, che causa lesioni al DNA che sono rilevate dal NER. I due plasmidi si incubano in presenza di dNTP, di cui uno è marcato, e Mg^{2+} . Si lascia avvenire la riparazione eventuale, poi si estrae il DNA, si linearizza e si analizza mediante elettroforesi.

Per valutare la riparazione da parte di NER si va a rilevare la presenza di nucleotide marcato. Se viene rilevato vuol dire che si è avuta riparazione del DNA.

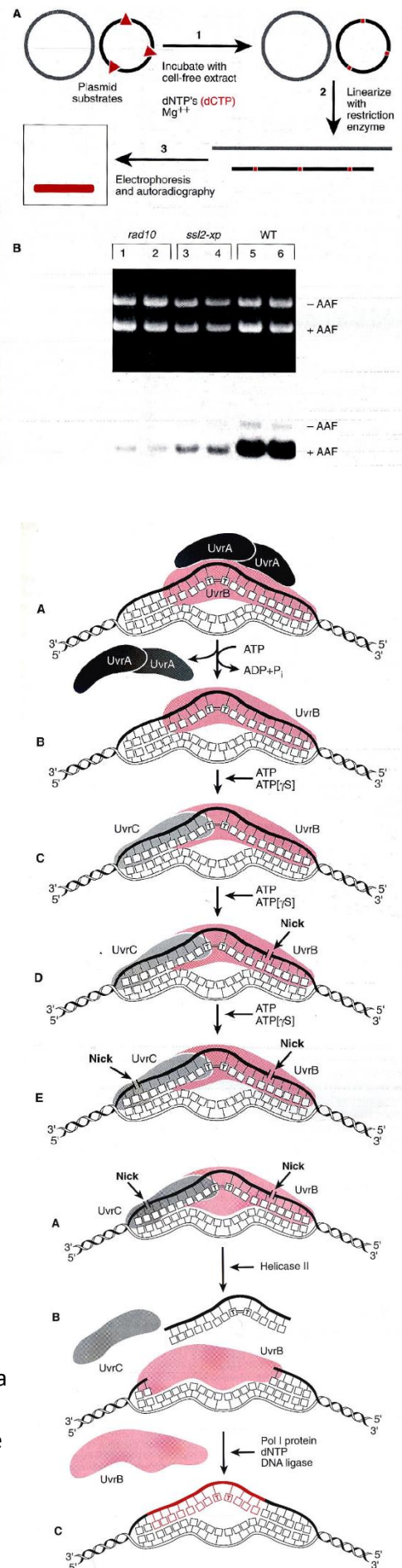
Il meccanismo di base del funzionamento di NER vede una prima fase di riconoscimento della lesione da parte di una proteina specifica per la lesione. La proteina che riconosce la lesione richiama due endonucleasi, che tagliano il DNA una a monte ed una a valle della lesione. Il taglio avviene in posizioni precise, di un numero fisso di nucleotidi a monte e a valle della lesione.

Si genera un oligonucleotide che contiene la lesione, che viene rimosso. Sull'elica si genera un gap, con alle estremità un 3'OH ed un 5'P. Una DNA polimerasi riempie il gap usando il filamento complementare come stampo. Una DNA ligasi chiude il gap.

NER in E.coli

Le proteine coinvolte sono le proteine Uvr A, B e C.

Due proteine UvrA si legano ad una proteina UvrB a formare un trimero, che scansiona il DNA per rilevare la presenza di lesioni. Questo complesso ha una attività elicasica. Quando il complesso UvrAB trova una lesione si ha il distacco delle proteine UvrA e rimane la proteina UvrB nei pressi della lesione. UvrB è una endonucleasi che taglia a 4 nucleotidi a 3' della lesione (a valle). Interviene anche UvrC, che è una seconda endonucleasi che taglia a 7 nucleotidi a 5' della lesione (a monte). Solo l'elica che contiene la lesione viene rimossa. Una elicasi UvrD stacca l'oligonucleotide che contiene la lesione. Il gap così creato viene riempito dalla DNA polimerasi, che è DNA pol I in E.coli. La ligasi chiude l'elica.



Questo è il meccanismo *global genome*, o GG-NER, in E.coli, che funziona in qualsiasi regione del genoma.

A questo si associa il meccanismo detto TC-NER, o *transcription coupled*.

Ci si è accorti che le regioni in cui le cellule facevano NER in maniera più efficiente erano le regioni trascritte, ed in particolare sull'elica trascritta.

Il motivo è che quando la RNA polimerasi durante la trascrizione incontra una lesione, si potrebbe bloccare. Se si blocca la macchina trascrizionale, questa richiama le proteine del NER. Quello che risulta più efficiente è quindi il riconoscimento della lesione, che in questo caso non è riconosciuta dal NER ma dalla RNA polimerasi bloccata.

Per il resto il meccanismo è uguale al precedente.

In *S.cerevisiae* le proteine prendono il nome di Rad, perché trovati in mutanti *radiation sensitive*.

