



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Nella patogenesi dell'atassia spinocerebellare di tipo III, la scarsa efficienza della via di riparazione del DNA per giunzione non omologa delle estremità è collegata alla riparazione dei geni trascritti

Deficiency in classical nonhomologous end-joining-mediated repair of transcribed genes is linked to SCA3 pathogenesis

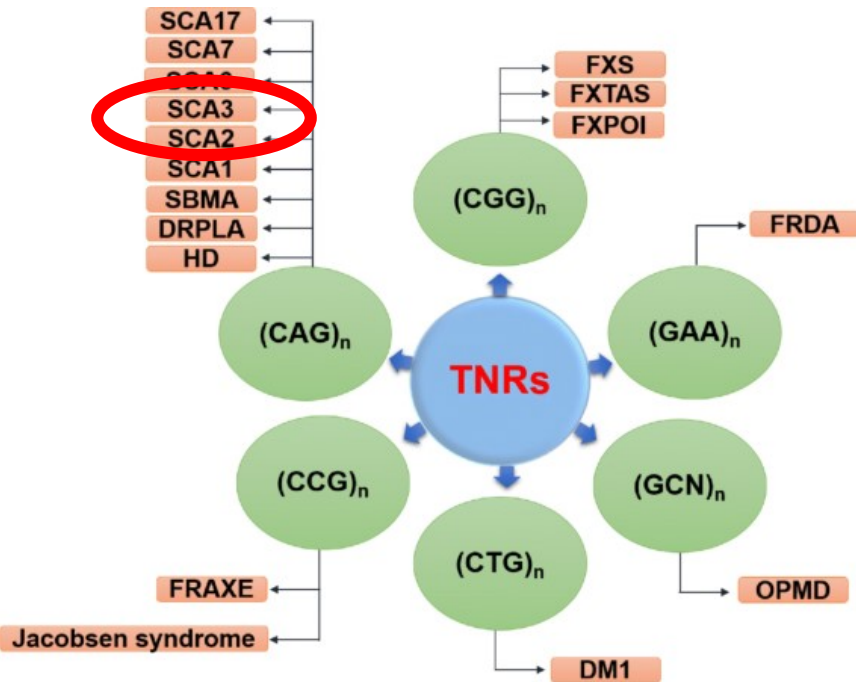
Tesi di Laurea di:
Camilla Sbrighi

Docente Referente:
Prof.ssa Tiziana Cacciamani

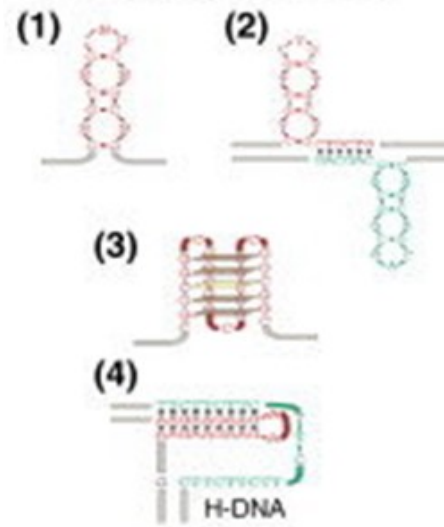
Sessione autunnale
Anno Accademico A.A. 2019/2020

Introduzione

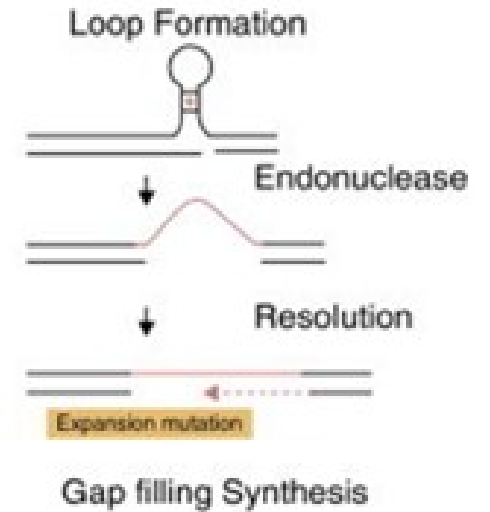
Malattie da ripetizione di triplette → causate da espansioni di trinucleotidi oltre ad un certo valore soglia



Heteroduplex loops



1. A forcina
2. Cruciformi
3. Quadruplessi
4. H-DNA a tripla elica



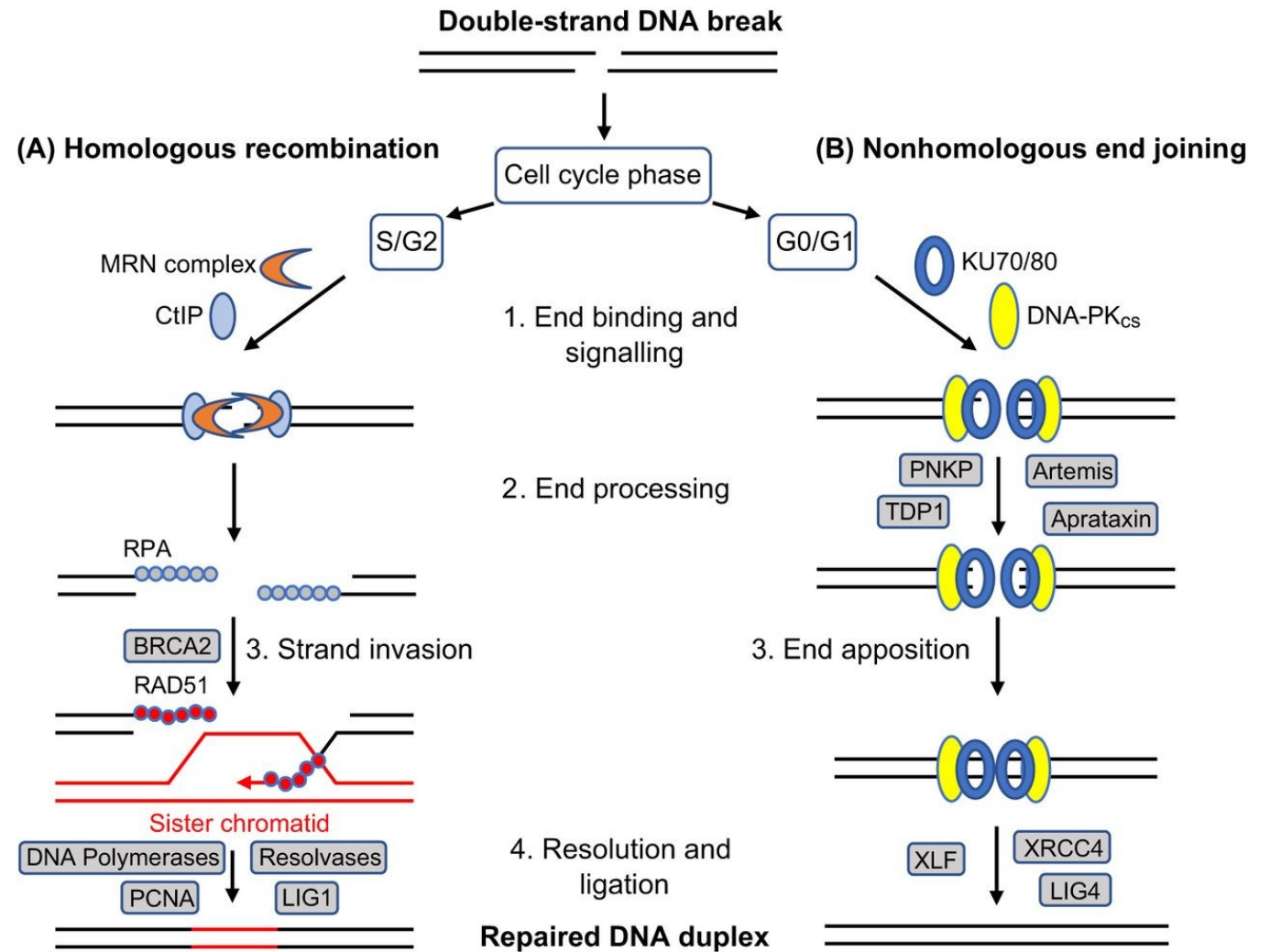
DNA continuamente DANNEGGIATO e RIPARATO

MA

una mancata o errata riparazione determina mutazioni e minaccia l'integrità genomica

Come si ripara il DNA?

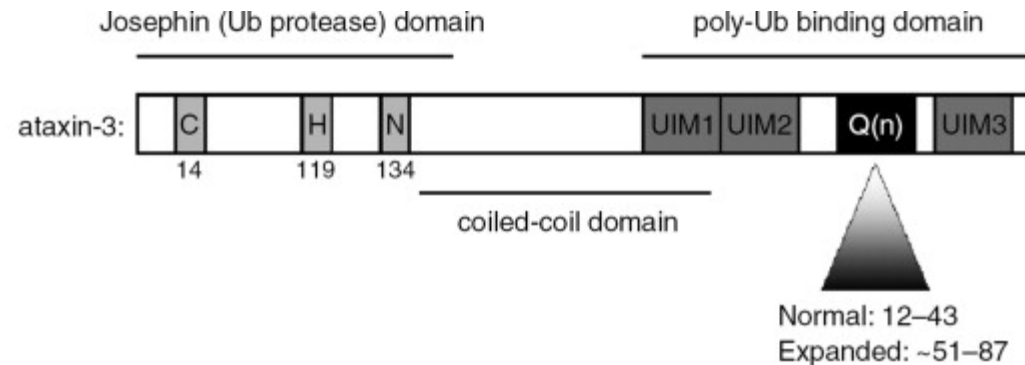
- Gli SSBs tramite i DNA single-strand break repair
- I DSBs tramite:
 - **HR**, homologous recombination
 - **C-NHEJ**, non-homologous end joining



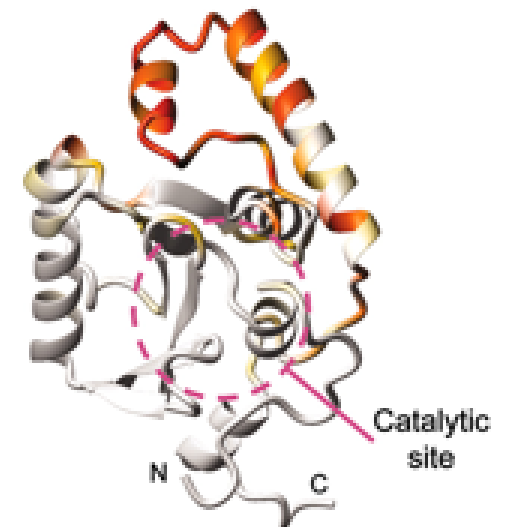
SCA3 e ATXN3

SCA3 → disordine autosomico dominante neurodegenerativo, del gene ATXN3, legato alla codificazione di un enzima (non funzionante) contenente un tratto di PolyQ al C-terminale, locus 14q32.1

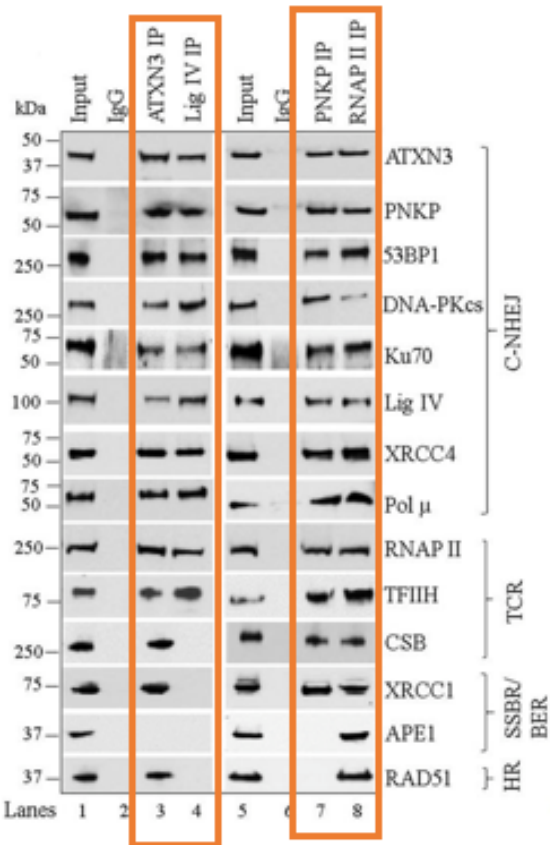
ATXN3 normale codifica per **Atassina-3** avente una funzione di **deubiquitinasi**.



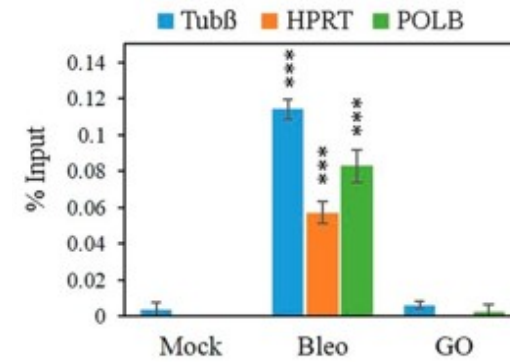
ATXN3 è coinvolto nella riparazione del danno nel DNA, grazie all'associazione di PNKP, anche nei neuroni



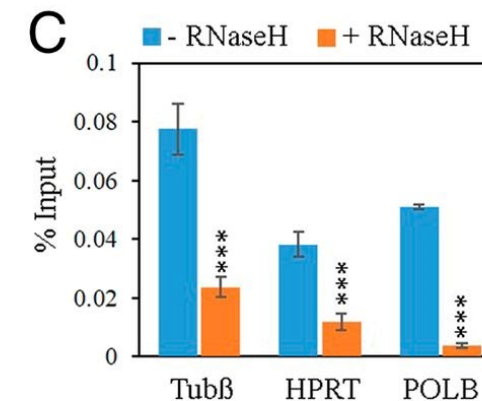
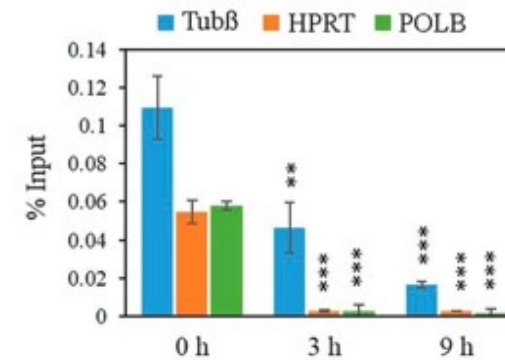
ATXN3 si associa all'RNAP II, alle componenti di C-NHEJ e al TRASCRITTO NASCENTE



COIMMUNOPRECIPITAZIONE
 da estratti nucleari di cervelletto di topo trattato con nucleasi usando anticorpi anti ATXN3 (line 3), anti LIG IV, anti PNKP, anti RNAP II (line 4, 7 e 8).
 Poi l'immunocomplesso analizzato con gli stessi anticorpi e anticorpi contro altre proteine



RNA-ChIP con anticorpo anti **ATXN3** in cellule in mock, in bleo e in GO

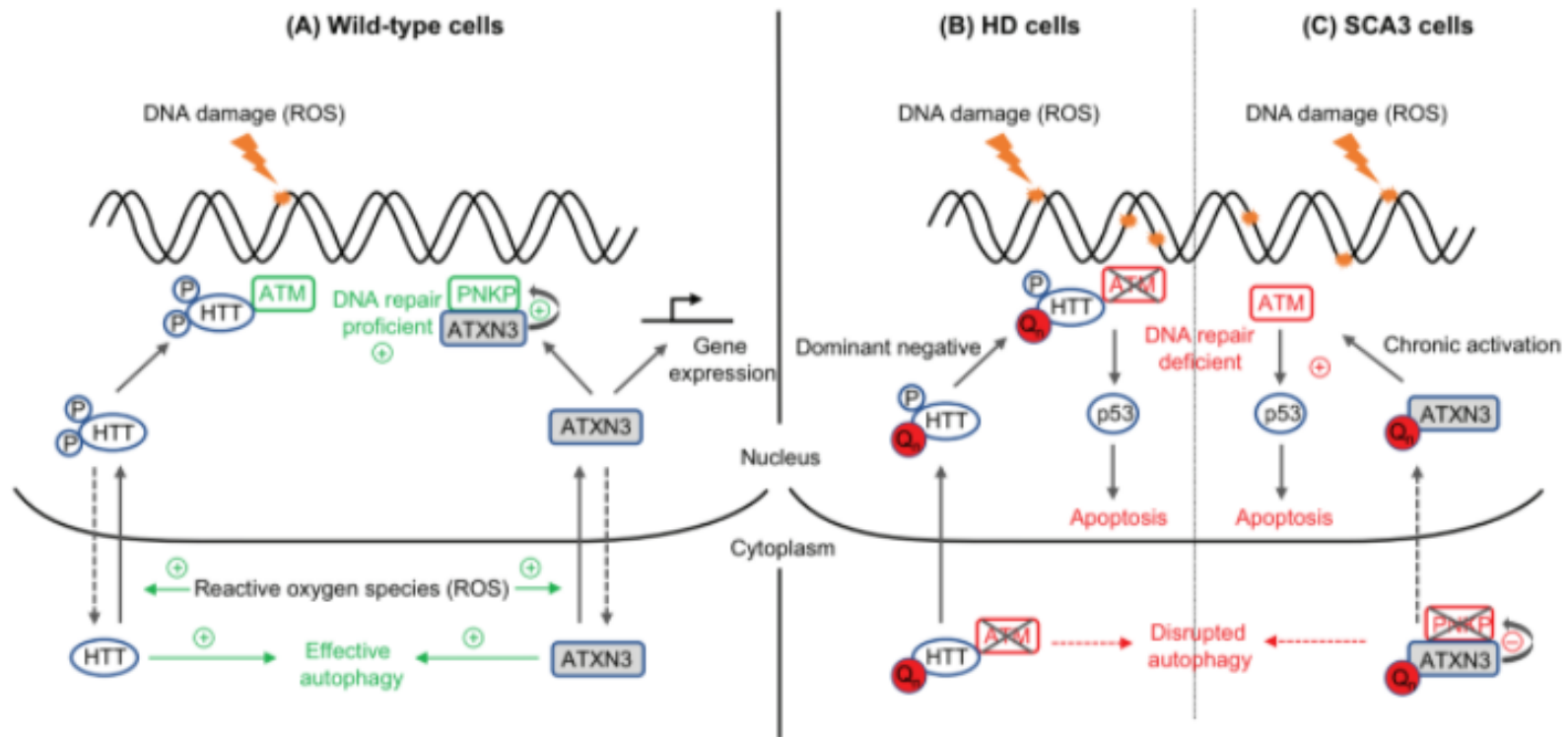


C. Nei siti di danno si formano ibridi di DNA-RNA

Ruolo di ATXN3 nella riparazione dei danni in geni trascritti

In **CONDIZIONI PATOLOGICHE:**

Si va incontro ad apoptosi: in HD tramite HTT mutante ipofosforilato, in SCA3 tramite attivazione cronica di ATM

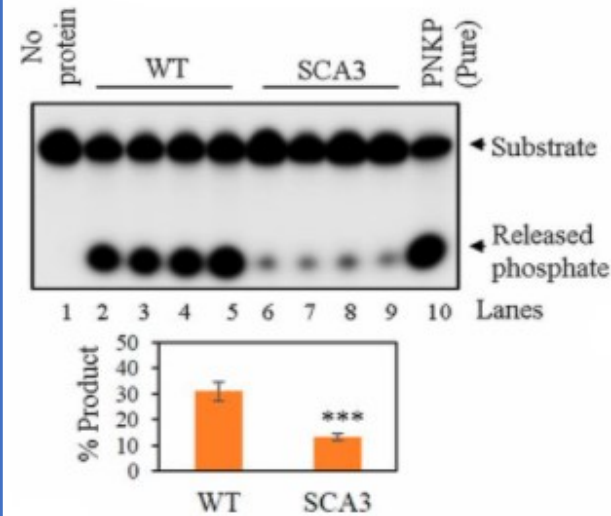


In **CONDIZIONI NORMALI:**

ATXN3 lega PNKP, mentre HTT viene reclutato nel sito di danno da ATM

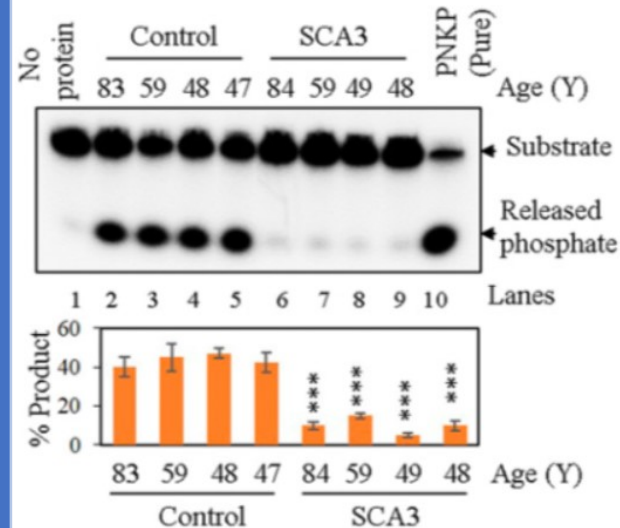
Attività di PNKP

osservata nel tronco cerebrale di topi WT e SCA3



Attività di PNKP

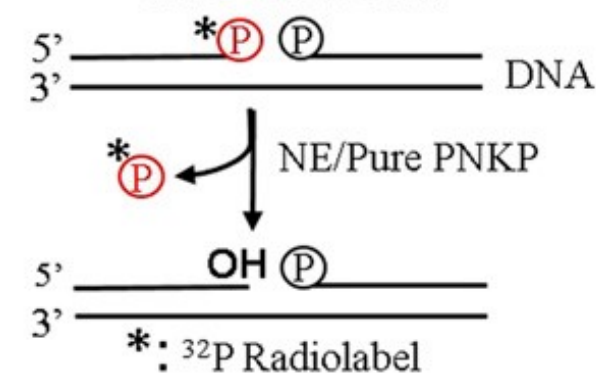
osservata nel cervelletto umano (post-mortem)



Attività di PNKP

Funzione di PNKP: polinucleotide chinasi 3'-fosfatasi, rimuove P dal 3' e fosforila i terminali 3'-OH

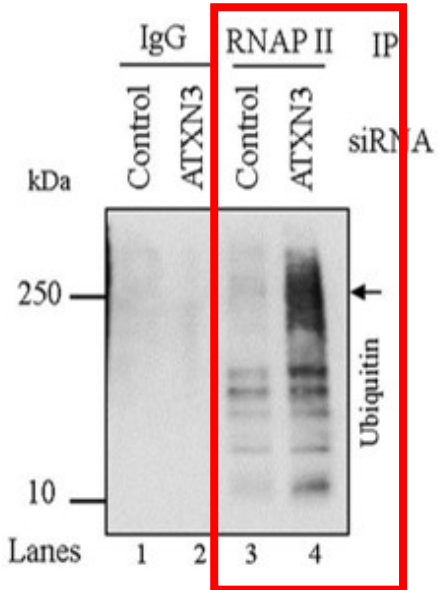
ATXN3 mutante **BLOCCA** direttamente **PNKP** in pazienti SCA3 a livello dei geni trascritti, determinando un **ACCUMULO** di **DSB**



Schema di marcatura del DNA

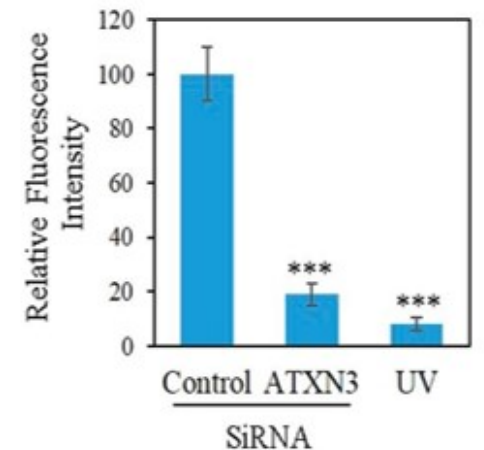
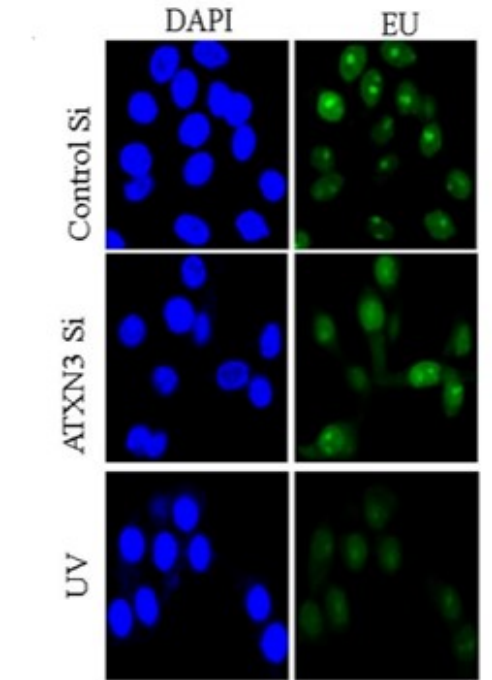
Arresto dell'RNAP II nel sito di DSB e successiva degradazione

La persistenza del 3'-P porta allo **stallo dell'RNAP II** nei siti DSB e una maggior **ubiquitinazione e degradazione** della sua subunità maggiore RPB1, riducendo così la trascrizione



IP con anticorpo anti RNAP II in cellule impoverite di ATXN3

Sintesi RNA valutata in cellule carenti di ATXN3 misurando l'incorporazione di EU

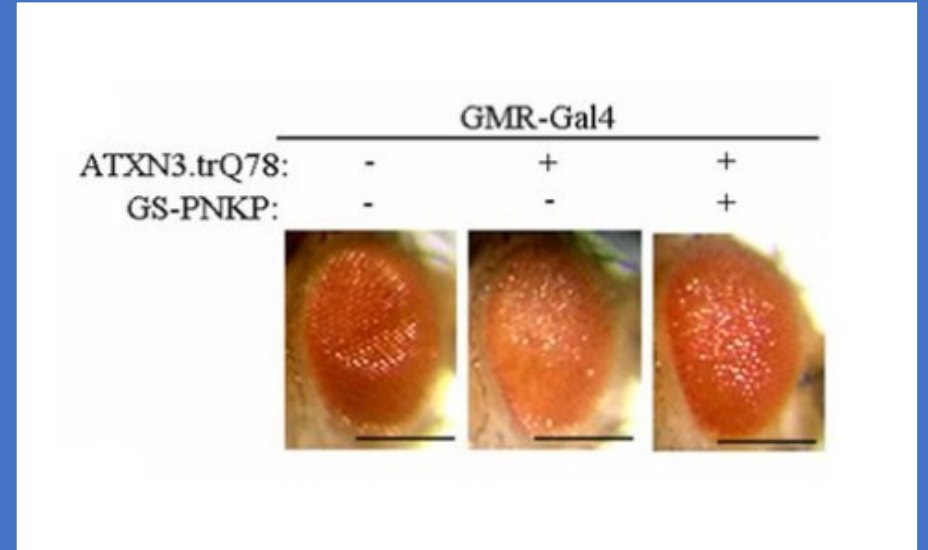


Complementazione di PNKP

La **sovra-espressione di PNKP** in cellule aventi ATXN3 mutato permette di aggirare l'abrogazione della riparazione dei DSB e il blocco della trascrizione



Mantenendo i **livelli di RNAP II** ad uno **stato stazionario** in modo da svolgere le sue funzioni



A sinistra: controllo
Al centro: ATXN3 mutato
A destra: sovra-espressione di PNKP

Conclusioni

In **individui sani**: WT-ATXN3 attiva PNKP, che rimuove il P dal 3' generando il 3'-OH riconosciuto dalla polimerasi, capace di ripristinare la sequenza mancante utilizzando l'RNA nascente. Infine RNAP II viene deubiquitinato da ATXN3 e la trascrizione prosegue.

In **individui malati**: ATXN3 mutante blocca PNKP, il 3'-P persiste bloccando l'RNAP II che viene poliubiquitinato e degradato, bloccando la trascrizione

Strategie terapeutiche



Il salvataggio dell'attività di PNKP e la sua sovra-espressione potrebbe essere una possibile strategia terapeutica

Referenze

- [1] Anirban Chakraborty, Nisha Tapryal, Tatiana Venkova, Joy Mitra, Velmarini Vasquez, Altaf H Sarker, Sara Duarte-Silva, Weihan Huai, Tetsuo Ashizawa, Gourisankar Ghosh, Patricia Maciel, Partha S Sarkar, Muralidhar L Hegde, Xu Chen, Tapas K Hazra (2020). *Deficiency in classical nonhomologous end-joining-mediated repair of transcribed genes is linked to SCA pathogenesis*. National Academy of Sciences, pp 8154-8165
- [2] Thomas H. Massey and Lesley Jones (2018). *The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases*. The Company of Biologists Ltd | Disease Models & Mechanisms.
- [3] Ellerby, L.M. *Repeat Expansion Disorders: Mechanisms and Therapeutics*. Neurotherapeutics 16, 924–927 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00823-3>
- [4] Lee and McMurray. *Trinucleotide expansion in disease*. Current Opinion in Genetics & Development 2014, 26:131–140

Abstract

L'ataxia spinocerebellare di tipo 3 (SCA3) è una malattia neurodegenerativa ereditaria dominante causata dall'espansione ripetuta CAG nel gene ATXN3.

ATXN3 è un gene avente funzione di deubiquitinasi e tramite topi knockout ATXN3 si è osservata l'abbondante presenza di proteine ubiquitinate, inoltre è coinvolto nel meccanismo di riparazione C-NHEJ privo di errori mediato da PNKP.

Le cellule aventi ATXN3 mutante o assente bloccano l'attività del polinucleotide chinasi 3'-fosfatasi (PNKP), riducendo così la trascrizione e la riparazione nei geni trascritti. Questo venne dimostrato osservando l'attività di PNKP in estratti nucleari nel cervelletto umano e nel tronco cerebrale.

In condizioni fisiologiche ATXN3 si associa con l'RNA polimerasi II (RNAP II), le proteine del meccanismo di riparazione C-NHEJ, tra cui PNKP, dimostrato tramite una coimmunoprecipitazione, e tramite l'immunoprecipitazione della cromatina si provò anche l'associazione con l'RNA nascente.

ATXN3 mutante determina un aumento di rotture nel filamento, successivamente uno stallo di RNAP II nei siti di danno e una ubiquitinazione seguita da degradazione della subunità maggiore RPB1, dimostrato anche in questo caso tramite l'immunoprecipitazione.

I trattamenti terapeutici per le malattie da ripetizione CAG, sono al giorno d'oggi assenti, ma la sovra-espressione in *Drosophila* di PNKP può aggirare il blocco della trascrizione e della riparazione, infatti viene visto come una possibile strategia terapeutica.