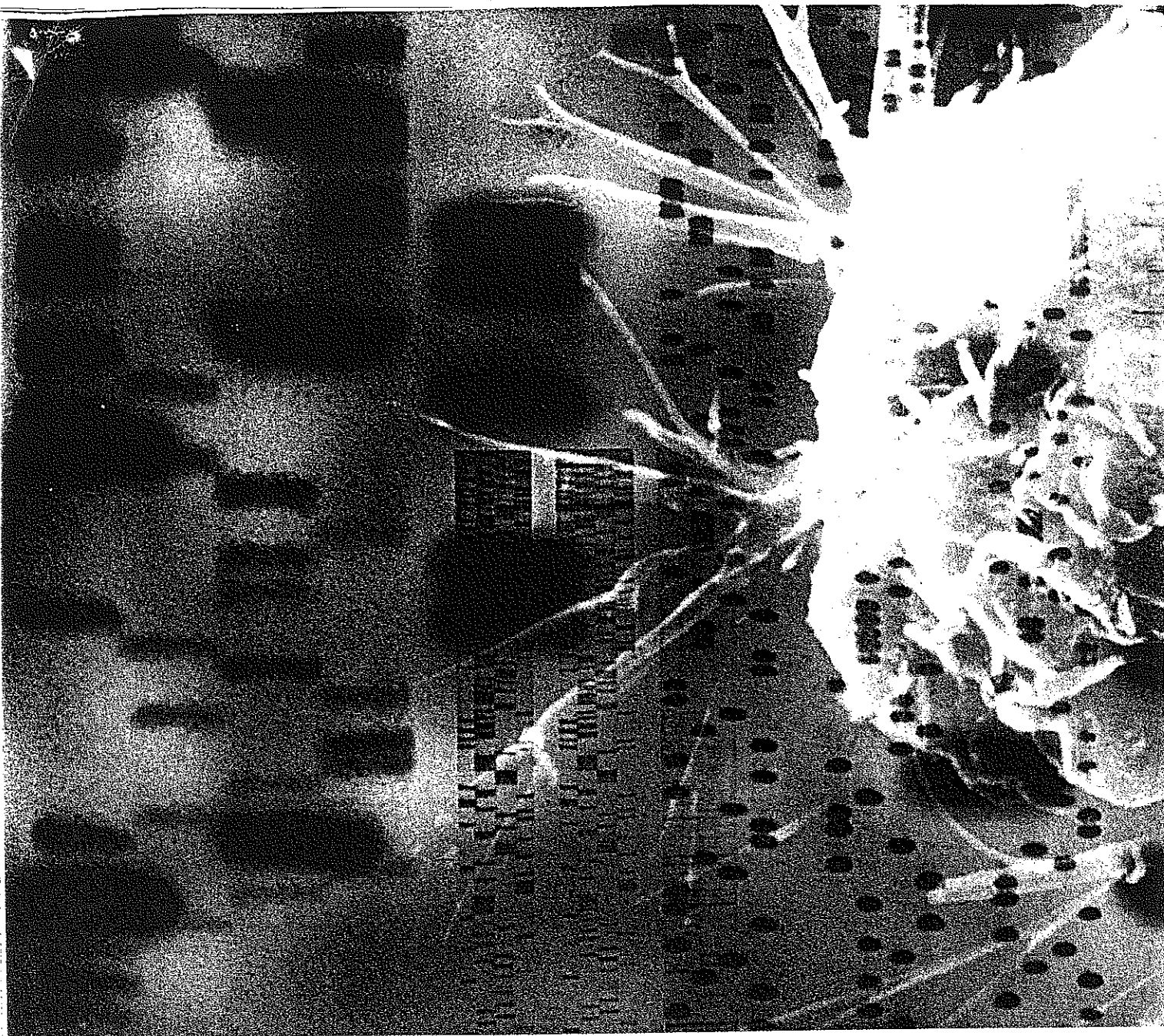
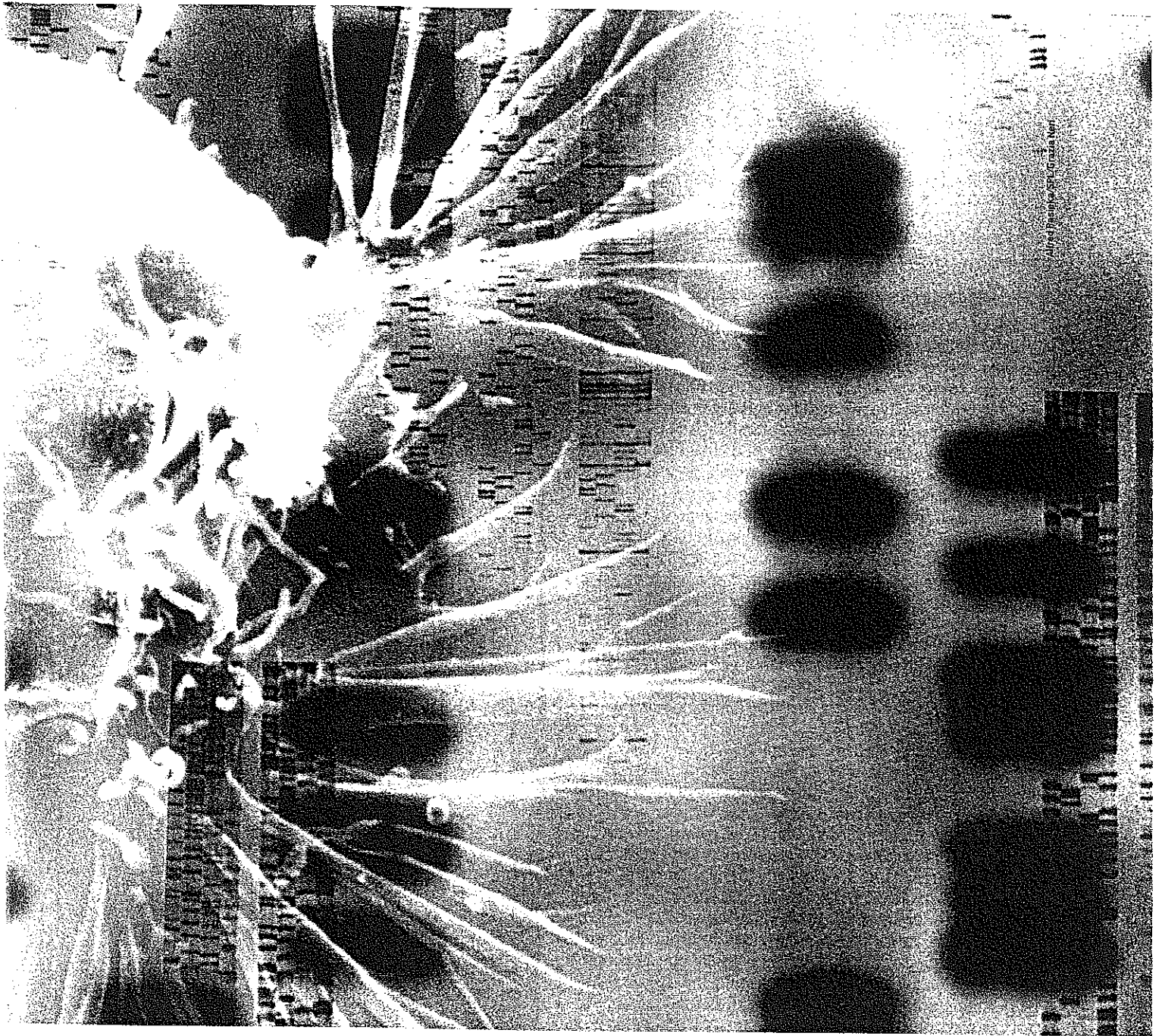




# Instabilità genomica



I meccanismi che controllano l'integrità  
del DNA sono simili in tutti gli eucarioti;  
ecco perché, studiando lieviti o batteri,  
si può capire come si sviluppa il cancro

di Paolo Plevani,  
Marco Foiani  
e Marco Muzi-Falconi

# e genesi dei tumori

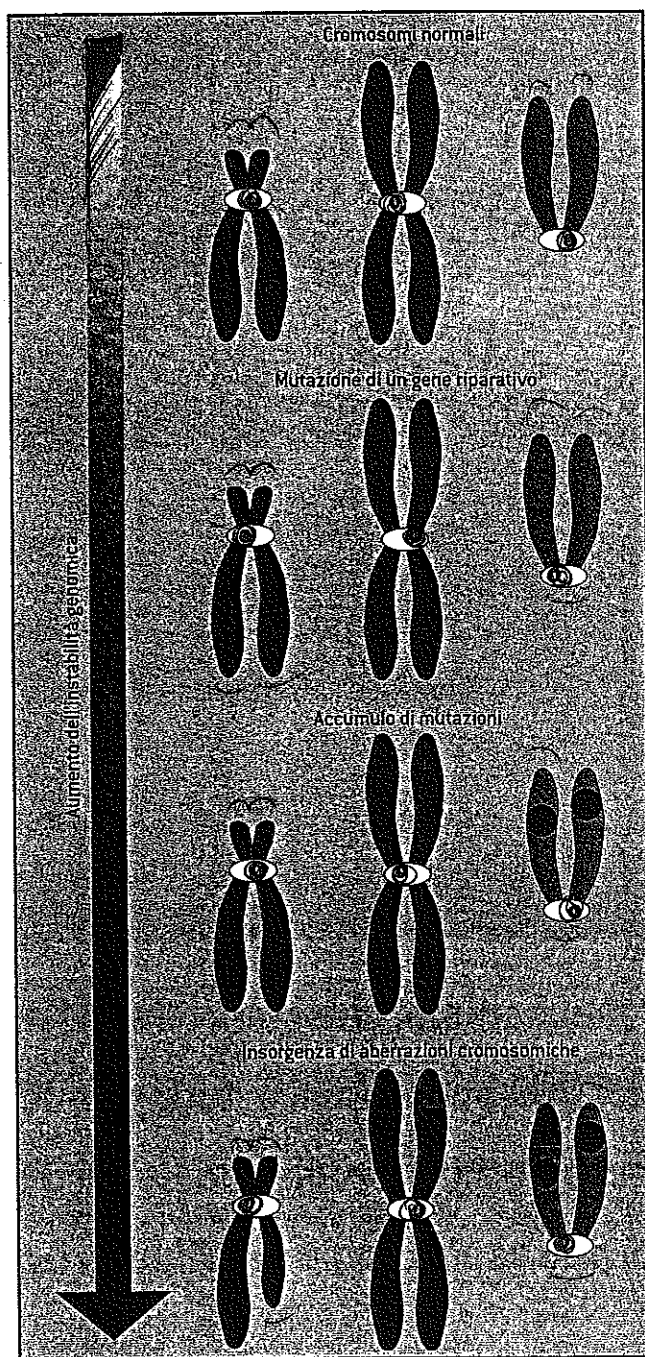
geni, che controllano tutte le proprietà strutturali e funzionali di una cellula, sono costituiti da DNA. Il DNA è a sua volta formato dall'unione di molecole più piccole chiamate nucleotidi, identificabili dal tipo di base azotata che contengono (A, adenina; T, timina; G, guanina; C, citosina), ed è proprio la sequenza dei nucleotidi a determinare le potenzialità codificanti di una molecola di DNA. Questa sequenza deve essere correttamente copiata e fedelmente trasmessa alle cellule figlie durante ogni divisione cellulare. Per avere un'idea delle dimensioni del problema, basti ricordare che una cellula del corpo umano contiene circa 6,5 miliardi di nucleotidi che, se venissero scritti come una serie di A, T, G, C con le dimensioni dei caratteri tipografici utilizzati in questo articolo, coprirebbero una distanza di circa 10.000 chilometri, più o meno la distanza tra Milano e Pechino.

La cellula ha, però, dei problemi aggiuntivi: infatti, il DNA non solo deve essere replicato e trasmesso in modo preciso a ogni generazione, ma deve anche essere costantemente riparato.

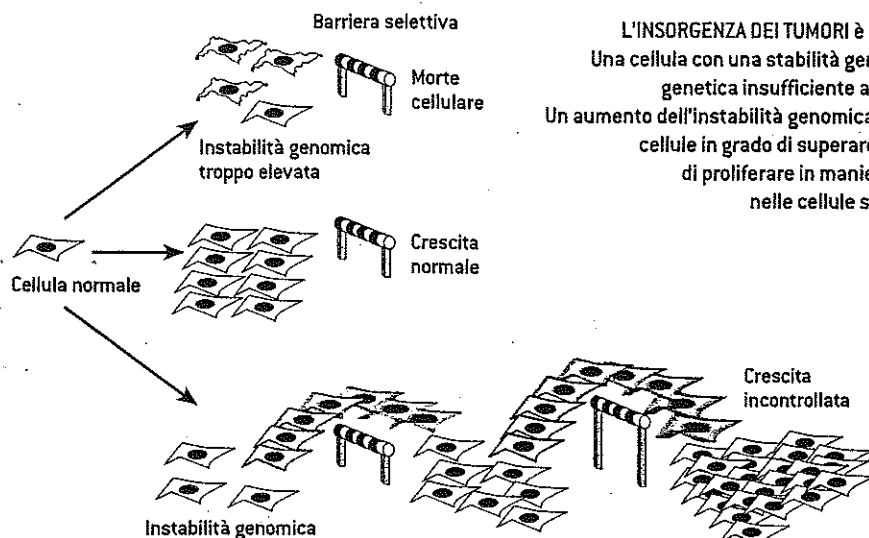
Il DNA (e quindi il genoma di tutti gli organismi) è, infatti, il bersaglio sia di una serie di agenti chimico-fisici presenti nell'ambiente, sia dei prodotti del normale metabolismo cellulare che possono indurre su di esso una varietà di lesioni. Questi danni al DNA devono essere rimossi attraverso una serie di meccanismi di riparazione specifici che dipendono sostanzialmente dal tipo di lesione e dall'attivazione di una serie di risposte cellulari, note come meccanismi di sorveglianza o *checkpoint*, che hanno il compito di controbilanciare il potenziale mutageno e citotossico delle lesioni. La loro mancata riparazione - o il cattivo funzionamento dei *checkpoint* - causa un aumento nel numero di mutazioni e provoca alterazioni vistose nei cromosomi. L'insieme di questi fenomeni aumenta l'instabilità del genoma, la quale, a sua volta, può aggravare la predisposizione all'insorgenza di tumori, a specifiche malattie genetiche e alla degenerazione legata all'invecchiamento.

Il concetto che l'instabilità genomica è alla base della cancerogenesi è diventato uno dei paradigmi centrali della biologia moderna, e riceve continue conferme sperimentali. Per cercare di esemplificare il problema, basti pensare che il malfunzionamento di un gene che controlla un processo essenziale per l'integrità del DNA, per esempio di un gene necessario per la sua riparazione, determina un fenotipo «mutatore». Ciò significa che, come mostra lo schema qui a fianco, un difetto riparativo causerà l'accumulo di mutazioni in altri geni. Se questi geni regolano, a loro volta, funzioni importanti per il controllo della proliferazione cellulare, il risultato potrebbe essere una cellula che si divide in modo incontrollato. In altri termini, un'elevata instabilità genomica aumenta la velocità con cui si accumulano mutazioni: la successiva selezione di cellule con una più rapida proliferazione, e magari un'aumentata capacità di invadere i tessuti circostanti, può portare alla formazione di cellule tumorali dotate di proprietà metastatizzanti. Il ruolo svolto dall'instabilità genomica nella generazione di tumori è del resto dimostrato dall'eterogeneità istologica, cariotipica, biochimica e molecolare che si osserva all'interno delle cellule di uno stesso tumore o tra tumori dello stesso tipo.

Bisogna, però, anche domandarsi come sia possibile che durante l'insorgenza dei tumori vengano positivamente selezionate mutazioni nei geni che controllano l'integrità del genoma. Una serie di studi genetici di base condotti su popolazioni molto ampie di organismi semplici, quali i batteri o i lieviti, possono aiutarci a capire questo apparente paradosso. Le popolazioni microbiche sono caratterizzate da un alto grado di eterogeneità dovuto a un elevato tasso di variabilità genetica. Quando una popolazione è soggetta a uno stress ambientale, certe sottopopolazioni sono favorite e possono prendere il sopravvento sulle altre, cambiando così le loro proporzioni relative. Un successivo cambiamento ambientale potrebbe favorire ulteriormente una delle sottopopolazioni diventate maggioritarie e questo secondo cambiamento finirebbe per portare a una sua quasi completa prevalenza sul totale degli individui. Questi principi di base sugli effetti delle forze selettive all'interno di una popolazione sono



L'ALTERAZIONE DI UN GENE RIPARATIVO, che codifica per una proteina in grado di svolgere una funzione indispensabile per riparare il DNA, causa un aumento dell'instabilità dell'intero genoma. Nello schema il genoma è rappresentato da tre cromosomi di diverso colore: la mutazione (in rosso) di un gene riparativo causa l'accumulo di mutazioni in molti altri geni e, a volte, l'insorgenza di aberrazioni cromosomiche (in questo caso una delezione sul cromosoma 1 e una traslocazione tra i cromosomi 2 e 3).

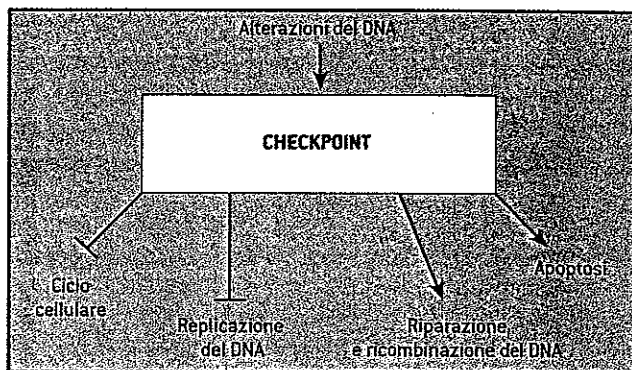


**L'INSORGENZA DEI TUMORI** è determinata dal superamento di barriere selettive. Una cellula con una stabilità genomica normale produce cellule con una variabilità genetica insufficiente a renderle capaci di superare una barriera selettiva. Un aumento dell'instabilità genomica collegato a un fenotipo «mutatore» può generare cellule in grado di superare una serie di barriere selettive ed, eventualmente, di proliferare in maniera incontrollata. Se però tale aumento è eccessivo nelle cellule si avvia il processo di morte cellulare programmata.

**LA RISPOSTA CELLULARE AI DANNI AL DNA** passa attraverso l'attivazione di meccanismi di sorveglianza geneticamente controllati i checkpoint, che regolano diversi aspetti del metabolismo cellulare. Per esempio, la progressione del ciclo cellulare e la replicazione del DNA vengono inibite (*linee barrate*), mentre si ha una stimolazione dei processi di riparazione e ricombinazione del DNA ed, eventualmente, un'induzione del meccanismo di apoptosi (*freccie*).

## IN SINTESI

- Il DNA, il materiale costitutivo dei geni, deve essere replicato e trasmesso in maniera corretta: ma non sempre ciò avviene, in quanto esso può essere danneggiato – e quindi divenire instabile – a causa dell'attività di numerosi agenti presenti nell'ambiente o prodotti dall'organismo stesso.
- Per riparare le lesioni subite dal DNA, la cellula possiede vari meccanismi il cui studio è di fondamentale importanza, perché da essi dipende la protezione nei confronti di gravi malattie degenerative e soprattutto del cancro.



importanti per capire come cellule con un più alto tasso di mutazione possono venire amplificate in una popolazione. Infatti, cellule con un livello più alto del normale d'instabilità genomica potrebbero prevalere all'interno di una popolazione, se questa è soggetta a condizioni ambientali selettive che favoriscono lo sviluppo di cellule con nuove caratteristiche. Cellule con un fenotipo «mutatore» potrebbero quindi trovarsi in una situazione vantaggiosa e, in un ambiente che varia rapidamente o è soggetto a stress ambientali, potrebbero finire per diventare la popolazione prevalente. Va però considerato che, se il livello d'instabilità genomica è troppo elevato, il numero di mutazioni diventerebbe così alto da essere incompatibile con la sopravvivenza cellulare. Le considerazioni sopra esposte sulla dinamica selettiva di una popolazione cellulare possono aiutarci a capire come mutazioni nei geni che controllano l'integrità del genoma possano venire selezionate nelle particolari condizioni ambientali che si creano durante lo sviluppo di un tumore.

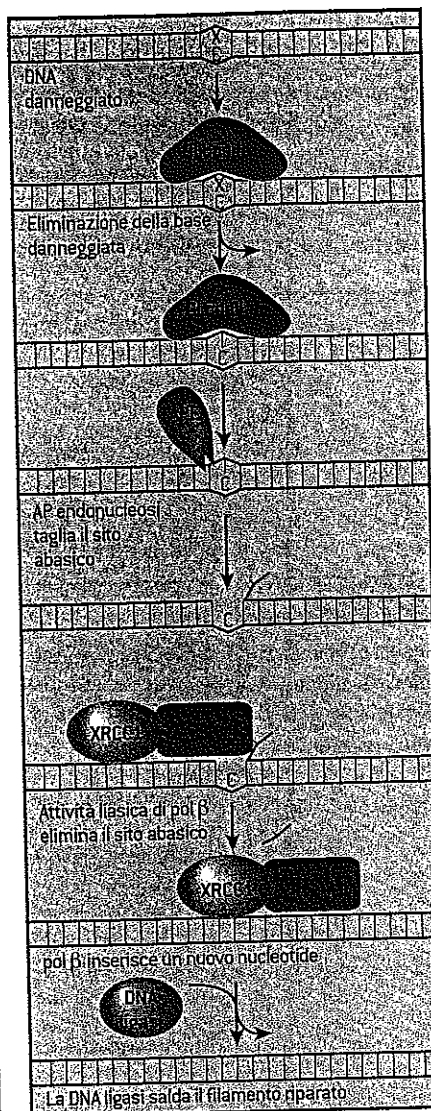
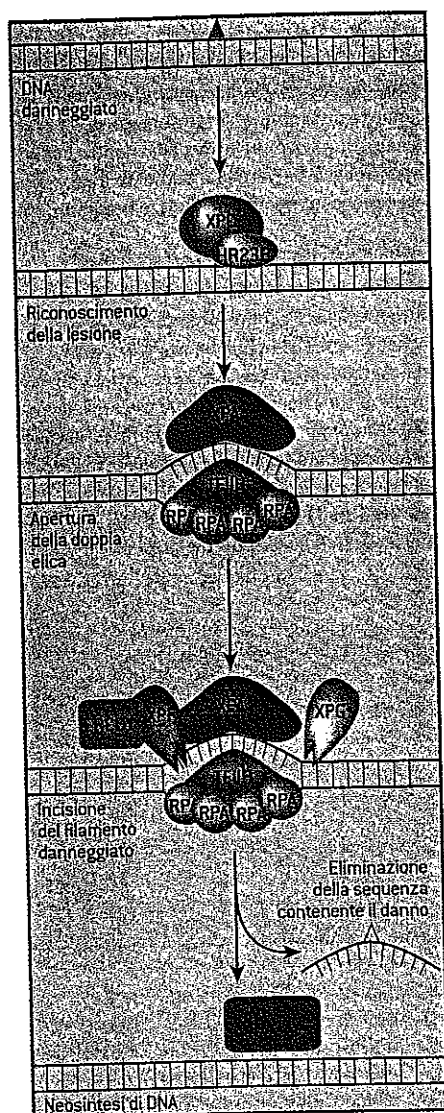
## Danni al DNA, chi è il responsabile?

Abbiamo visto come l'insorgenza di tumori sia collegabile a un aumento dell'instabilità genomica determinata da alterazioni nei meccanismi che controllano l'integrità del DNA. Se però vogliamo cominciare a capire come tutto ciò possa realizzarsi a livello molecolare dobbiamo porci una serie di domande. Come si generano danni sul DNA? Quali sono i sistemi deputati alla riparazione delle varie lesioni sul DNA? Come il malfunzionamento di tali sistemi si tramuta a livello molecolare nelle alterazioni osservabili nelle cellule tumorali? Sarebbe troppo lungo e complesso fornire una descrizione dettagliata di tutte le lesioni che possono prodursi sul DNA. È però opportuno ricordare che

queste lesioni sono causate da un numero enorme di agenti chimico-fisici presenti nell'ambiente. Tra questi, basti ricordare le radiazioni ultraviolette (UV) presenti nella normale luce del sole, le radiazioni ionizzanti, il fumo di sigaretta, una serie di sostanze chimiche presenti nella dieta o prodotte da lavorazioni industriali molto comuni.

Non c'è alcun modo per difenderci da tutti questi pericoli. Basti pensare che è stato calcolato che in ciascuna cellula della pelle esposta alla luce solare a una quota di 600 metri vengono prodotti circa 200.000 dimeri di pirimidina, che devono essere riparati perché estremamente pericolosi. Le radiazioni ionizzanti possono provocare rotture su uno o entrambi i filamenti del DNA, e questo tipo di danno è molto pericoloso perché, come vedremo più avanti, può portare a perdita di pezzi di cromosoma o a riarrangiamenti di notevoli estensioni. Non solo l'ambiente esterno rappresenta una continua sfida all'integrità del genoma, ma le nostre stesse cellule attaccano il DNA dall'interno. Infatti, il normale metabolismo cellulare – soprattutto durante la sintesi di ATP, che è la principale fonte di energia per le cellule – produce una serie di intermedi reattivi dell'ossigeno (i cosiddetti radicali liberi) che possono causare fino a un centinaio di diverse modificazioni ossidative sul DNA corrispondenti a circa 200 lesioni al giorno.

Per difendersi da questi continui danni, le cellule hanno sviluppato sia processi di riparazione specifici con la funzione di rimuovere fisicamente le lesioni dal DNA, sia i checkpoint, meccanismi molecolari che hanno lo scopo di coordinare la risposta globale ai danni con altri aspetti del metabolismo del DNA e con il controllo della divisione cellulare. Entrambi sono così importanti per la sopravvivenza della cellula che la struttura e la funzione delle proteine che agiscono in tali processi sono state fortemente conservate nel corso dell'evoluzione. La maggior parte



**IL SISTEMA DI RIPARAZIONE NER.** Come mostra lo schema a sinistra, alcune lesioni sul DNA (per esempio, quelle provocate dalle radiazioni UV) provocano una distorsione della doppia elica (qui rappresentata con un triangolo), che è riconosciuta da due proteine chiamate, nell'uomo, XPC e HR23B. Il danno specifico è individuato dalla proteina XPA e l'azione del complesso proteico TFIIE, in grado di scindere il filamento del DNA, porta all'apertura localizzata della doppia elica del DNA che è, a sua volta, stabilizzata dall'azione della proteina RPA. Successivamente, due endonucleasi (XPG e il complesso XPF-ERCC1) incidono il filamento danneggiato a destra e a sinistra della lesione. In seguito all'azione del complesso TFIIE, il frammento contenente la lesione è eliminato e, attraverso l'azione di enzimi coinvolti nella sintesi del DNA (indicati come DNA pol) avviene la sostituzione (*in rosso*) del frammento di DNA eliminato.

**E IL SISTEMA DI RIPARAZIONE BER.** Di questo sistema esistono diversi tipi, ma nella sequenza a destra è schematizzato il più frequente. Le lesioni alle basi azotate del DNA (qui ne è rappresentata una con la X) sono riconosciute da enzimi specifici, le glicosilasi, che eliminano la base danneggiata. Il sito privo di base che così si ottiene è tagliato dalla APE endonucleasi. In seguito viene eliminato il residuo di zucchero privo della base e la cavità così formata viene riempita per opera delle attività lissica e polimerasica caratteristiche della DNA polimerasi β. La proteina XRCC1 funge da «adattatore» e aiuta anche la DNA ligasi a ripristinare la continuità fisica del filamento riparato.

dei geni richiesti per i meccanismi di riparazione e i checkpoint negli eucarioti sono stati identificati nei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Successivamente, sono stati identificati gli omologhi umani, perché talvolta i geni dell'uomo erano così simili a quelli di lievito da essere in grado di sostituire la funzione alterata del gene di lievito una volta che il gene umano veniva introdotto all'interno delle cellule di lievito mutate. Questa tecnica si chiama «clonaggio per complementazione» ed è stata molto utile per individuare geni umani che svolgono funzioni evolutivamente conservate dai lieviti all'uomo, in quanto i geni umani sono in grado di complementare il difetto di mutanti di lievito. È proprio la conservazione evolutiva dei sistemi di riparazione e dei checkpoint che consente di utilizzare organismi modello, a cui sono applicabili una varietà di metodologie genetiche e molecolari molto sofisticate, per comprendere fenomeni biologici complessi d'estrema rilevanza per la salute dell'uomo.

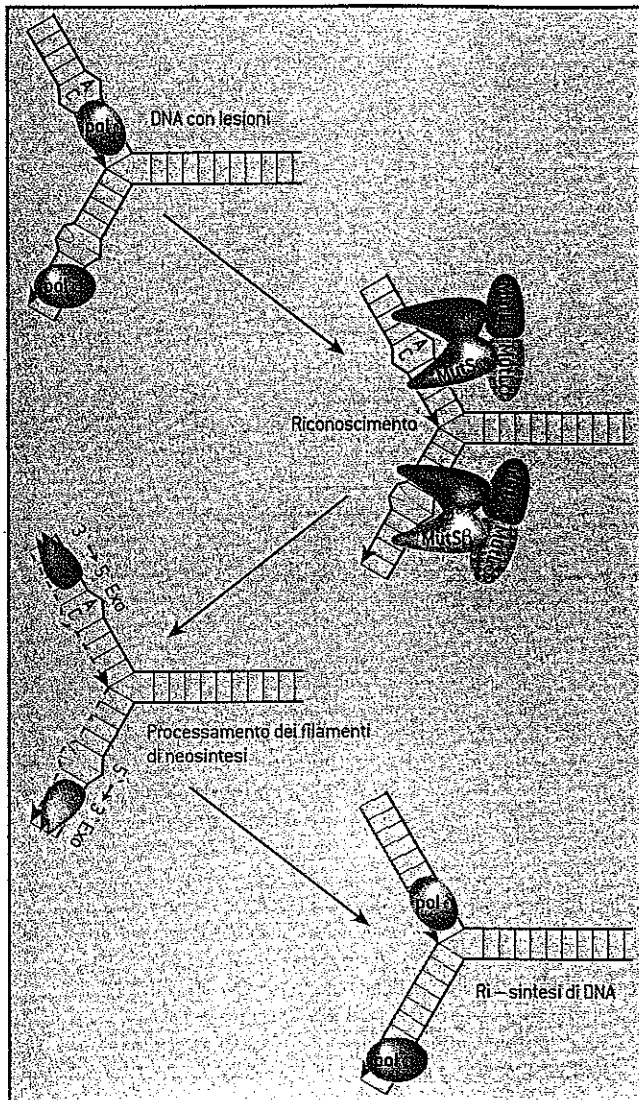
## I sistemi di riparazione del DNA

Si avvalgono di strategie che possono differire non solo in risposta al tipo di danno, ma anche in relazione al momento in cui il danno viene prodotto. Le cellule, infatti, si dividono seguendo un programma genetico, il ciclo cellulare, che è composto da quattro fasi. La fase S e la fase M sono, rispettivamente, le fasi in cui avviene la replicazione del DNA e la sua ripartizione

nelle cellule figlie (mitosi). Oltre a queste, vi sono le fasi G1 e G2: la prima precede la fase S e la seconda la mitosi. La scelta di utilizzare uno o l'altro dei diversi sistemi di riparazione è influenzata non solo dal tipo di danno, ma anche dalla fase del ciclo cellulare.

Il sistema di riparazione forse più caratterizzato prende il nome di NER (da *Nucleotide Excision Repair*). Tale sistema è efficace in un'ampia varietà di lesioni che provocano una distorsione della doppia elica del DNA e che sono causate da agenti chimici e fisici. In particolare, il NER - che funziona principalmente nelle fasi G1 e G2 - è richiesto per la riparazione dei frequenti danni causati dalle radiazioni UV. Mutazioni nei geni umani codificanti per proteine del NER sono associate ad almeno tre malattie genetiche, note come xeroderma pigmentoso (XP), sindrome di Cockayne e tricotiodistrofia (TTD); oltre a una serie di sintomi particolari, tutte e tre queste malattie hanno in comune una estrema sensibilità dei pazienti alla luce solare. Gli individui affetti da XP sviluppano tumori della pelle con una incidenza oltre 1000 volte superiore a quella dei soggetti normali, mentre gli individui affetti sia dalla sindrome di Cockayne sia da TTD presentano gravi segni d'invecchiamento precoce.

I danni al DNA di origine endogena causati da specie reattive dell'ossigeno, ma anche l'idrolisi delle basi azotate del DNA, la perdita spontanea di gruppi amminici da alcune di esse (C, A, G), e rotture di uno solo dei due filamenti della doppia elica del DNA, sono riparati attraverso il sistema denominato BER (da



DURANTE LA REPLICAZIONE DEL DNA eseguita mediante l'azione coordinata di numerose proteine – qui sono indicate solo le due DNA polimerasi più note (pol  $\alpha$  e pol  $\delta$ ) – possono avvenire alcuni errori. Per esempio, sul filamento di DNA neosintetizzato può venire inserita una base sbagliata, generando l'appaiamento non complementare A-C indicato, o si possono formare delle piccole bolle dovute alla presenza di corte sequenze nucleotidiche ripetute. In questi casi interviene il sistema di riparazione MMR. Le strutture anomale sono dapprima riconosciute dai complessi chiamati MutS $\alpha$  e MutS $\beta$  che successivamente reclutano i complessi MutL $\alpha$  e MutL $\beta$ . Il filamento di DNA neosintetizzato contenente gli errori è riconosciuto e processato da esonucleasi (Exo) che lo degradano in direzione 3'-5' o 5'-3'. In seguito, attraverso interazioni con tutto l'apparato di replicazione, viene ri-sintetizzato il filamento di DNA corretto (in rosso).

ne l'errore e deve, quindi, essere riparato) da quello utilizzato come stampo. Tale segnale, nei batteri, dipende dallo stato di metilazione del DNA: alcune basi del DNA sono metilate, ma durante la replicazione il filamento neosintetizzato rimane non metilato per un certo tempo, permettendo così il riconoscimento del filamento di neosintesi e la sua eventuale riparazione in caso di errori replicativi. Negli eucarioti non è ancora stato chiarito il ruolo della metilazione del DNA; dati molto recenti suggeriscono che la discontinuità fisica connessa ai meccanismi di neosintesi del DNA giochi un ruolo rilevante nella scelta del filamento che deve essere riparato dall' MMR. È stato osservato che più del 60 per cento dei pazienti che soffrono di tumore ereditario del colon (HNPCC) presenta mutazioni nei geni (*hMLH1* e *hMSH2*) che codificano per le proteine che formano il complesso chiamato MutL $\alpha$ , e mutazioni nei geni dell'MMR sono anche presenti in tumori dell'endometrio e dell'ovaio. Il motivo di questa specificità di tessuto non è chiaro, ma la correlazione tra difetti dell'MMR e insorgenza di tumori è evidente. Ciò è anche comprovato dai modelli murini: l'inattivazione di geni dell'MMR non preclude il processo di embriogenesi e permette la nascita di topini vitali, anche se predisposti all'insorgenza di tumori. Questi animali sono generalmente sterili, indicando un ruolo delle proteine dell'MMR nel processo meiotico e suggerendo che la meiosi, cioè il processo di formazione dei gameti, possa essere considerato un processo più sensibile della divisione cellulare classica.

L'ultimo tipo di danno che prendiamo in considerazione sono le rotture su entrambi i filamenti del DNA (DSB, da *Double Strand Breaks*). I DSB sono causati principalmente da radiazioni ionizzanti, quali i raggi X o i raggi  $\gamma$ , ma anche da radicali liberi e da alcuni agenti chimici; possono, infine, originarsi se la macchina replicativa incontra una rottura a singolo filamento durante la sintesi del DNA. La risposta cellulare ai DSB è estremamente complessa e collegata ai meccanismi di checkpoint che descriveremo fra poco. La riparazione fisica dei DSB avviene principalmente mediante meccanismi ricombinativi o mediante giunzione diretta delle estremità rotte (si veda la figura nella pagina successiva). Il primo sistema è chiamato HR (da *Homologous Recombination*) e coinvolge l'azione di numerose proteine ricombinative. Per attuare la riparazione con il sistema HR è necessaria la presenza di una copia di DNA identica a quella contenente la rottura da usare come stampo per riparare la copia di DNA danneggiata. La giunzione diretta delle estremità di un DSB avviene tramite un meccanismo di riparazione noto come NHEJ (*Non Homologous End Joining*). Le estremità rotte sono riconosciute da KU70 e KU80, due proteine che, insieme alla proteina chinasi DNA-PK e alla proteina XRCC4, portano al reclutamento della DNA ligasi IV, un enzima in grado di saldare estremità libere di DNA. Mutazioni nei geni coinvolti nella riparazione dei DSB causano predisposizione a una varietà di tumori e, spesso, riarrangiamenti cro-

Base Excision Repair). A seconda del danno subito, esistono tipi diversi di BER, ma il sistema più frequentemente usato è schematizzato nella pagina a fronte. Finora non sono state individuate sindromi umane direttamente associate a difetti nel sistema BER, anche se mutazioni nei geni che codificano per le proteine coinvolte in tale processo rappresentano un fattore di rischio per l'insorgenza dell'adenocarcinoma del polmone. L'importanza del BER è dimostrata da esperimenti eseguiti sui topi, nei quali si inattiva la funzionalità del gene in esame in cellule staminali embrionali. Si ottengono così modelli murini (i cosiddetti topi knock-out) che permettono di valutare l'importanza e, talvolta, la possibile funzione del gene inattivato. Se un gene del BER viene spento in tali modelli animali, l'embrione di topo non riesce a svilupparsi, indicando l'essenzialità dell'intero processo per la vitalità cellulare.

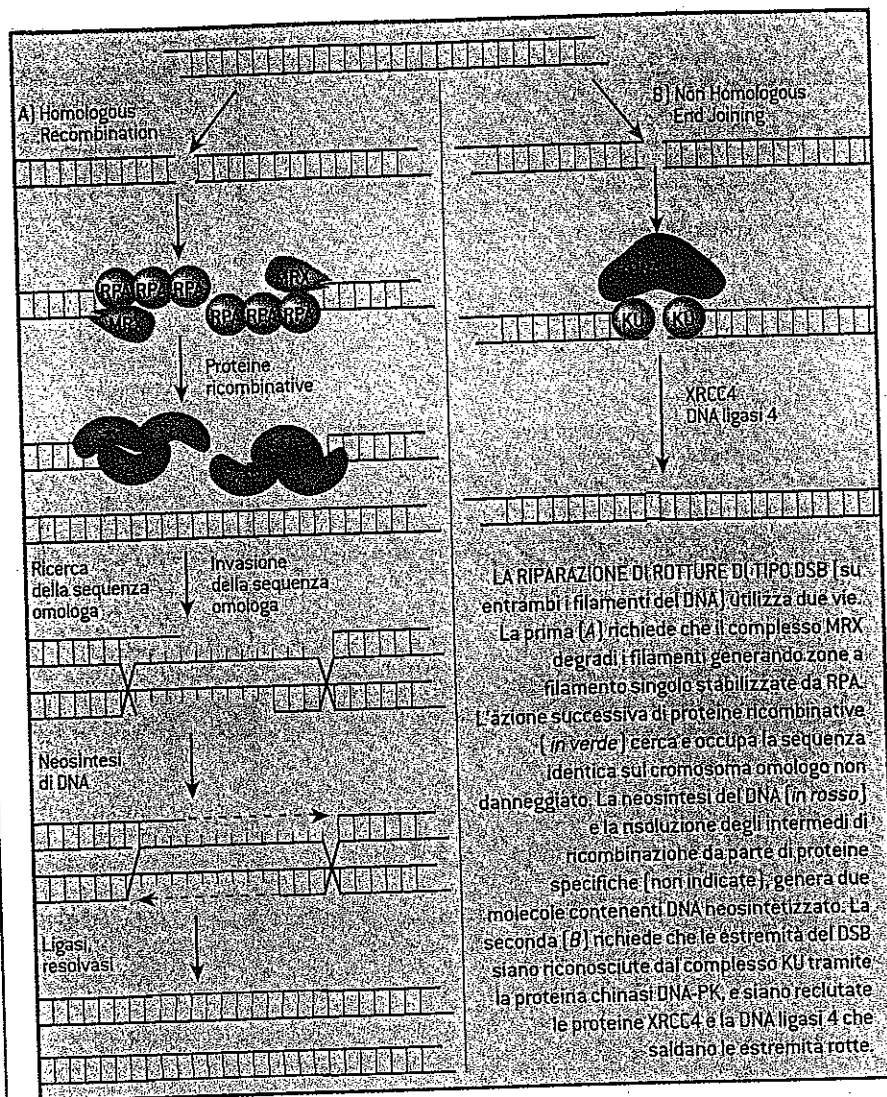
Durante la replicazione del DNA, possono verificarsi errori dovuti a inserzione di nucleotidi che non rispettano la complementarità delle basi o provocano delezioni/inserzioni di nucleotidi in corrispondenza di particolari sequenze ripetute molte volte sul DNA. Tali errori replicativi sono riparati da un sistema noto come MMR (da *MisMatch Repair*). Il processo MMR è alquanto complesso e richiede, oltre all'azione di proteine specifiche (MutS  $\alpha$  e  $\beta$ , MutL  $\alpha$  e  $\beta$ ), anche la funzione di proteine normalmente coinvolte nei meccanismi di replicazione del DNA. È inoltre necessario che sia riconosciuto un segnale che permetta di discriminare il filamento di DNA neosintetizzato (che contie-

## GLI AUTORI

PAOLO PLEVANI, MARCO FOIANI e MARCO MUZI-FALCONI sono docenti di biologia molecolare presso la Facoltà di scienze matematiche, fisiche e naturali dell'Università degli Studi di Milano. Plevani e Muzi-Falconi svolgono la loro attività di ricerca presso il Dipartimento di scienze biomolecolari e biotecnologie dell'Università di Milano, Foiani presso l'Istituto FIRC di oncologia molecolare. In particolare, si occupano dello studio dei meccanismi molecolari che controllano la stabilità del genoma e della definizione delle interconnessioni fra checkpoint e diversi aspetti del metabolismo del DNA e del ciclo cellulare.

## BIBLIOGRAFIA

- LENGAUER C., KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., *Genetic Instabilities in Human Cancers*, in «Nature», 396, 643-649, 1998.  
 LONGHESE M. P., FOIANI M., MUZI-FALCONI M., LUCCHINI G. e PLEVANI P., *DNA Damage Checkpoint in Budding Yeast*, in «EMBO J.», 17, pp. 5525-5528, 1998.  
 LINDAHL T. e WOOD R. D., *Quality Control by DNA Repair*, in «Science», 286, pp. 1897-1905, 1999.  
 ROUSE J. e JACKSON S. P., *Interfaces between the Detection, Signaling and Repair of DNA Damage*, in «Science», 297, pp. 547-551, 2002.



mosomici vistosi; la perdita della funzione di tali geni nei modelli murini causa quasi sempre la morte degli embrioni, a conferma dell'estrema importanza della riparazione delle lesioni di tipo DSB.

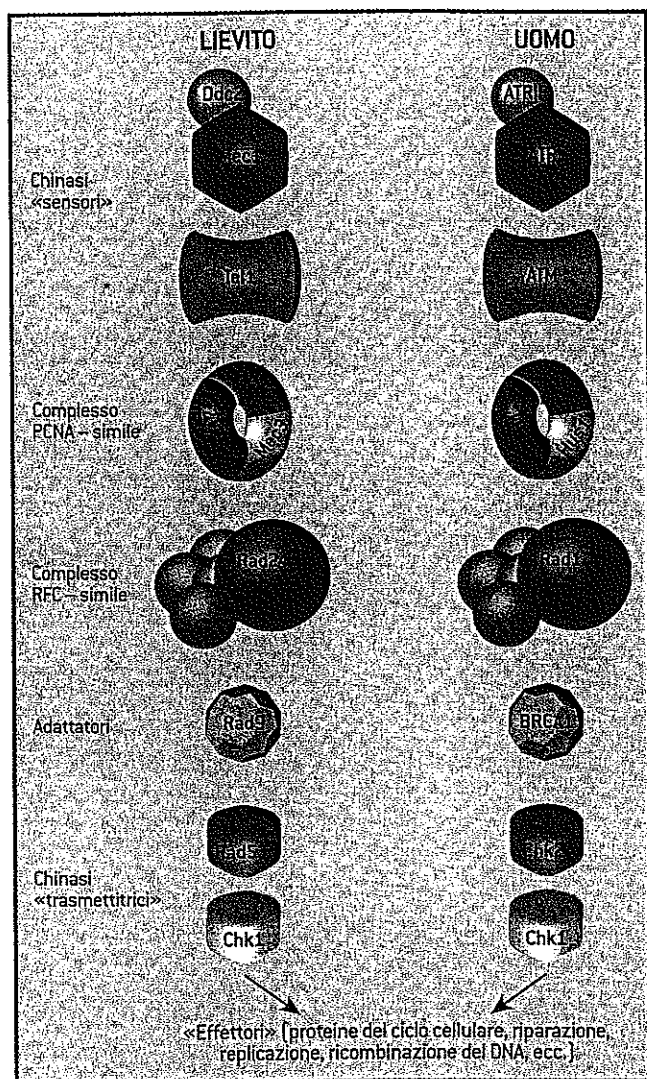
## Il ruolo dei checkpoint

Abbiamo prima accennato al fatto che, in risposta a danni al DNA, la cellula attiva un meccanismo di sorveglianza o checkpoint che, oltre a regolare i meccanismi di riparazione specifici richiesti per la rimozione delle lesioni sul DNA, ha conseguenze più generali sul controllo della proliferazione cellulare.

Che cosa sono i checkpoint? Sono meccanismi molecolari geneticamente controllati che sorvegliano la progressione del ciclo cellulare in condizioni sia fisiologiche sia patologiche. I primi sono chiamati «checkpoint intrinseci» e il loro scopo è quello di assicurare la corretta successione degli eventi durante un normale ciclo cellulare. Per esempio, la ripartizione del materiale ereditario nelle cellule figlie durante la mitosi deve avvenire solo dopo che tale materiale è stato correttamente duplicato durante la fase S. I «checkpoint estrinseci», invece, modulano la risposta della cellula in condizioni patologiche. Se, per esempio, il DNA è danneggiato da agenti chimico-fisici, la progressione del ciclo cellulare viene rallentata o bloccata, almeno transitoriamente. Questo effetto ha importanti conseguenze, tra cui quella di offrire alla cellula un po' di tempo in più per cercare di riparare i danni, dato che la mancata riparazione delle lesioni provo-

cherebbe la trasmissione di molecole di DNA alterate alle generazioni successive. Come si è detto, l'attivazione del checkpoint da danno al DNA provoca una serie di risposte cellulari complesse che non riguardano solo la progressione del ciclo cellulare, ma anche una rete di interconnessioni tra diversi aspetti del metabolismo del DNA e l'eventuale attivazione di un meccanismo di sorveglianza estremo, noto come morte cellulare programmata o apoptosi. Se, infatti, la quantità di danni al DNA è tale da essere considerata non più riparabile, è meglio per la cellula «suicidarsi» piuttosto che correre il rischio di trasmettere alle generazioni successive un'informazione genetica aberrante. Il meccanismo dell'apoptosi richiede un'accurata regolazione: un suicidio indiscriminato può infatti portare a malattie degenerative, mentre un difetto nell'apoptosi può determinare l'insorgenza di tumori.

Negli ultimi anni sono state ottenute numerose dimostrazioni sperimentali che collegano la funzione del checkpoint da danno al DNA con il mantenimento della stabilità del genoma, ed è provato che mutazioni nei geni responsabili del processo aumentano la predisposizione all'insorgenza di tumori. Molti dei geni coinvolti nella risposta cellulare a danni al DNA sono stati isolati nei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* e sono conservati, sia strutturalmente che funzionalmente, dal lievito all'uomo. Una volta di più, questo risultato avvalorava l'utilizzo di organismi modello facilmente manipolabili per la comprensione di fenomeni biologici complessi, le cui alterazioni sono alla base di gravi patologie nell'uomo.



Il checkpoint da danno al DNA può essere considerato come una via di trasduzione del segnale: alcune proteine agiscono come «sensori», riconoscendo verosimilmente particolari strutture sul DNA danneggiato e, attraverso l'azione di uno o più «trasmettitori», amplificano e trasmettono il segnale a «effettori», la cui funzione è richiesta per controllare la progressione del ciclo cellulare. Il primo passo da attuare nella risposta cellulare ai danni subiti dal DNA è, ovviamente, il riconoscimento del danno stesso; tuttavia, la definizione del segnale che attiva il checkpoint rimane a tutt'oggi un problema cruciale e irrisolto. Inoltre, una varietà di agenti chimico-fisici causano una pletera di lesioni primarie sul DNA, che possono essere convertite in lesioni secondarie, per esempio, durante la replicazione del DNA stesso. Ne consegue che le cellule hanno evoluto una rete di meccanismi per rispondere a una miriade di possibili alterazioni sul DNA. Queste alterazioni possono essere riconosciute direttamente da proteine di checkpoint singole e da loro specifiche combinazioni, oppure possono essere processate così da generare intermedi comuni che innescano l'attivazione del checkpoint. In tale scenario, è inevitabile una connessione tra i checkpoint e i meccanismi classici di riparazione descritti precedentemente. È possibile che le proteine di checkpoint riconoscano il danno e poi interagiscano con proteine riparative o ricombinative per rimuovere fisicamente la lesione sul DNA, anche se la successione opposta di eventi è altrettanto verosimile; la definizione dei dettagli molecolari di tale processo sarà un'area di ricerca di primaria importanza nei prossimi anni.

IL MECCANISMO DEL CHECKPOINT è così importante che si è conservato nel corso dell'evoluzione dal lievito all'uomo. Sono indicate le principali proteine coinvolte nel checkpoint attivato da lesioni al DNA nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* e nell'uomo. Gli elementi utilizzati per rappresentare le diverse proteine sono gli stessi usati per sottolineare il mantenimento della loro struttura e funzione. Come si vede, cambia la nomenclatura delle proteine nei due organismi, mentre la loro azione nella cascata di trasduzione del segnale è analoga e avviene, essenzialmente, dall'alto verso il basso.

Riconosciuto il danno sul DNA, la successione di eventi più probabile nella cascata di trasduzione del segnale del checkpoint è quella schematizzata nella figura a fianco. La descrizione del processo è complicata dal fatto che la nomenclatura dei geni e delle proteine di lievito e umane è diversa, nonostante le funzioni siano del tutto simili, per cui ci limiteremo a descrivere brevemente i fattori più importanti. Due proteine chinasi (proteine che fosforilano altre proteine) giocano un ruolo essenziale come probabili sensori: prendono il nome di Mec1 e Tel1 nel lievito, mentre i loro omologhi umani sono chiamati, rispettivamente, ATR e ATM. Nell'uomo, il gene dell'ATM causa, in caso di mutazione, una grave malattia genetica nota come atassia telangiectasia caratterizzata da sintomi diversi quali degenerazione del cervelletto, ritardo mentale, sensibilità a radiazioni, instabilità cromosomica e predisposizione ai tumori. Il gene dell'ATR appare anche più importante, dato che l'inattivazione del gene omologo nei topi non permette il completamento dello sviluppo embrionale. Sappiamo che almeno Mec1 e ATR sono associate ad altre due proteine chiamate, rispettivamente, Ddc2 e ATRIP che sembrano necessarie per localizzare le due chinasi sul DNA. Altre proteine che funzionano a stadi molto iniziali della cascata di trasduzione del segnale sono formate da più subunità che hanno nomi complicati, ma che assomigliano strutturalmente a due proteine, PCNA e RFC, richieste per la replicazione del DNA. È stato dimostrato, mediante cristallografia ai raggi X, che la proteina PCNA ha una struttura simile a una ciambella che, per essere aperta e caricata sul DNA, richiede la compresenza della proteina RFC. PCNA serve alle DNA polimerasi per replicare il DNA in modo rapido e continuo, e si suppone - ma non è ancora dimostrato - che il complesso PCNA-simile del checkpoint serva come piattaforma per il reclutamento e la funzione di proteine riparative. Esistono poi due proteine, Rad9 in *S. cerevisiae* e forse BRCA1 nell'uomo, che, funzionando da adattatori, portano al reclutamento delle chinasi adibite al ruolo di trasmettitori del segnale. Tali chinasi fosforilano una serie di proteine, la maggior parte delle quali è ancora sconosciuta, che agiscono come effettori. Già sappiamo che alcune di esse sono regolatori della progressione del ciclo cellulare e sono coinvolte nella replicazione, riparazione e ricombinazione del DNA; quest'ultima osservazione avvalorò il concetto che il checkpoint regoli una serie di interconnessioni tra diversi aspetti del metabolismo del DNA.

Poiché un aumento dell'instabilità genomica è correlato all'insorgenza di tumori è chiaro che una più approfondita conoscenza dei meccanismi alla base di questo fenomeno rappresenta un passaggio obbligato per lo sviluppo di nuove strategie di prevenzione e di trattamento dei tumori. Già oggi il monitoraggio del checkpoint e della riparazione è considerato un fattore essenziale per la prevenzione e la diagnosi dei tumori, ed è prevedibile che possa giocare un ruolo rilevante per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative nel prossimo futuro. Poiché sia i sistemi di riparazione che i checkpoint sono estremamente simili nell'uomo e nel lievito, è certo che la versatilità di quest'ultimo, come sistema sperimentale per la comprensione degli aspetti genetico-molecolari di tali processi e per la ricerca di sostanze che possano essere utili in terapia, si rivelerà essenziale per migliorare la salute dell'uomo.