



INVESTIGAZIONE DELL'INTERAZIONE BRCA2-RAD51

Il progetto, per cui sono stato insignito del Premio tesi di dottorato della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della Società Chimica Italiana, è stato incentrato sull'investigazione dell'interazione BRCA2-RAD51, integrando approcci computazionali e sperimentali.

Ogni giorno, molteplici fattori endogeni ed esogeni danneggiano il nostro DNA [1]. In particolare, le rotture del doppio filamento di DNA risultano essere tra le lesioni più deleterie, potendo risultare in mutazioni o traslocazioni cromosomali, prodromiche all'insorgenza e allo sviluppo di tumori [2, 3]. Fortunatamente, l'evoluzione ha consentito di sviluppare varie strategie per riparare questi danni [2, 3]. Tra di esse, la ricombinazione omologa, gioca, certamente, un ruolo fondamentale [2, 3]. Infatti, tale meccanismo consente una riparazione del DNA estremamente accurata, dato che, avvenendo nelle fasi S e G2 del ciclo cellulare, può sfruttare il DNA dei cromatidi fratelli come stampo per ricostruire le porzioni di DNA danneggiate [2, 3]. RAD51 e BRCA2 sono due proteine fondamentali per tale processo [2, 3]. RAD51 è una ricombinasi in grado di identificare il DNA omologo sul cromatide fratello, necessario alla riparazione del danno [2, 3]. BRCA2 è invece una proteina di notevoli dimensioni, più di 3000 amminoacidi, che ha il ruolo di orchestrare diversi fattori coinvolti nella ricombinazione omologa tra cui proprio RAD51 [2, 3]. BRCA2 recluta RAD51 nel citosol cellulare e ne favorisce l'accumulo nei siti dove il DNA è danneggiato [2, 3]. In particolare, si è dimostrato come BRCA2 interagisca con RAD51 attraverso una regione composta di otto sequenze ripetute di 35-40 amminoacidi denominate "BRC-repeats" [2, 3]. Curiosamente, una singola mutazione patogenica che insorga in una delle otto sequenze dei "BRC-repeats" è sufficiente a bloccare il reclutamento di RAD51 e, conseguentemente, la ricombinazione omologa [2, 3]. In tale situazione, le cellule sono quindi costrette a sfruttare sistemi di ri-

parazione del DNA più imprecisi che contribuiscono all'instabilità cromosomica favorendo così l'insorgenza di tumori ovarici nelle donne [2-4]. Considerata l'alta omologia tra le sequenze amminoacidiche dei "BRC-repeats" è sorprendente come le mutazioni che insorgano all'interno di una sola di esse non possano essere controbilanciate dalle altre sette non mutate [2, 3].

Obiettivo del progetto

Nonostante, l'interazione tra il peptide BRC4, il quarto "BRC-repeats", e il dominio C-terminale di RAD51 sia già stata caratterizzata dal punto di vista strutturale, molti dettagli dell'interazione tra i "BRC-repeats" e RAD51, non sono ancora chiari [2, 3]. Ad esempio, non è noto quale sia la struttura del complesso della RAD51, completa anche del dominio N-terminale, con BRC4, e se anche tutti gli altri "BRC-repeats" condividono simili modalità di interazione con RAD51. Il mio lavoro di dottorato nasce dall'esigenza di fare luce su questi, ed altri aspetti, non ancora chiari dell'interazione BRCA2-RAD51 integrando metodiche computazionali e sperimentali.

Depolimerizzazione di RAD51 mediata da BRC4

RAD51 possiede una tendenza intrinseca a formare strutture oligomeriche fibrillari [5]. Tale comportamento è evidente anche in esperimenti di microscopia elettronica effettuati con i campioni di proteina eterologamente espressa in *E. coli* (Fig. 1) [5]. La fase iniziale del mio progetto si è quindi focalizzata sul comprendere come BRC4 interagisse con tali strutture fibrillari [5]. Attraverso esperimenti di microscopia

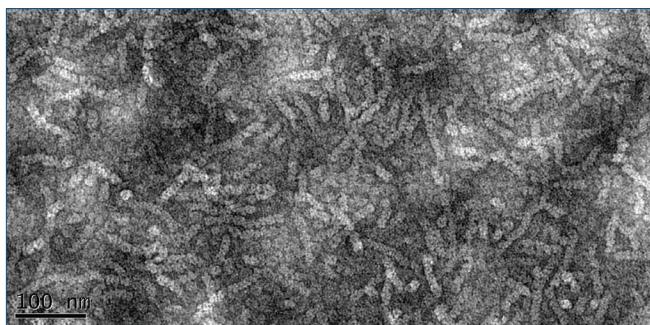


Fig. 1 - Immagine al microscopio elettronico delle fibrille di RAD51

elettronica e cromatografia di esclusione dimensionale è stato quindi possibile osservare che BRC4 depolimerizza le fibrille di RAD51 a partire da un'estremità e non con un attacco randomico sulla fibrilla (Fig. 2) [5].

Isolamento di una forma monomerica umana di RAD51

Data l'eterogeneità della forma fibrillare di RAD51, essa non è una forma idonea per studi biofisici dell'interazione tra "BRC-repeats" e RAD51 [6]. Pertanto, il secondo obiettivo del mio progetto di dottorato è stato esprimere e purificare una forma monomerica della RAD51 umana [6]. La proteina monomerica isolata è stata, quindi, validata valutandone l'interazione con BRC4 e con un nuovo inibitore dell'interazione BRCA2-RAD51, CAM833 (Fig. 2) [6]. Per otte-

nere informazioni strutturali sulla RAD51 completa in complesso con BRC4, non avendo ottenuto cristalli del complesso peptide-proteina adatti a successivi studi di diffrazione ai raggi X, si sono quindi effettuati esperimenti "Small Angle X-Ray Scattering" (SAXS) [6]. I dati sperimentali ottenuti sono stati integrati con studi computazionali su predizioni di AlphaFold2, evidenziando un'elevata flessibilità del dominio N-terminale di RAD51 [6]. Ciò suggerisce che il legame con BRC4 determini una transizione del dominio N-terminale ad uno stato più disordinato, fornendoci quindi una spiegazione meccanicistica di come avvenga la depolimerizzazione delle fibrille di RAD51, descritta in precedenza [6].

Approcci strutturali integrativi per lo studio di complessi RAD51 - "BRC-repeats"

Avendo validato il monomero umano di RAD51 per studi biofisici lo si è quindi sfruttato per valutarne l'interazione con gli altri "BRC-repeats" [7]. Questi esperimenti hanno evidenziato come i primi quattro "BRC-repeats" (BRC1-4) possiedano un'elevata affinità per RAD51, mentre gli ultimi quattro (BRC5-8) mostrino un'affinità di legame scarsa o nulla [7]. Inoltre, si è osservato che solo BRC1-4, aventi l'affinità più alta per la proteina monomerica, siano in grado di disassemblare la forma fibrillare di RAD51 [7]. Per

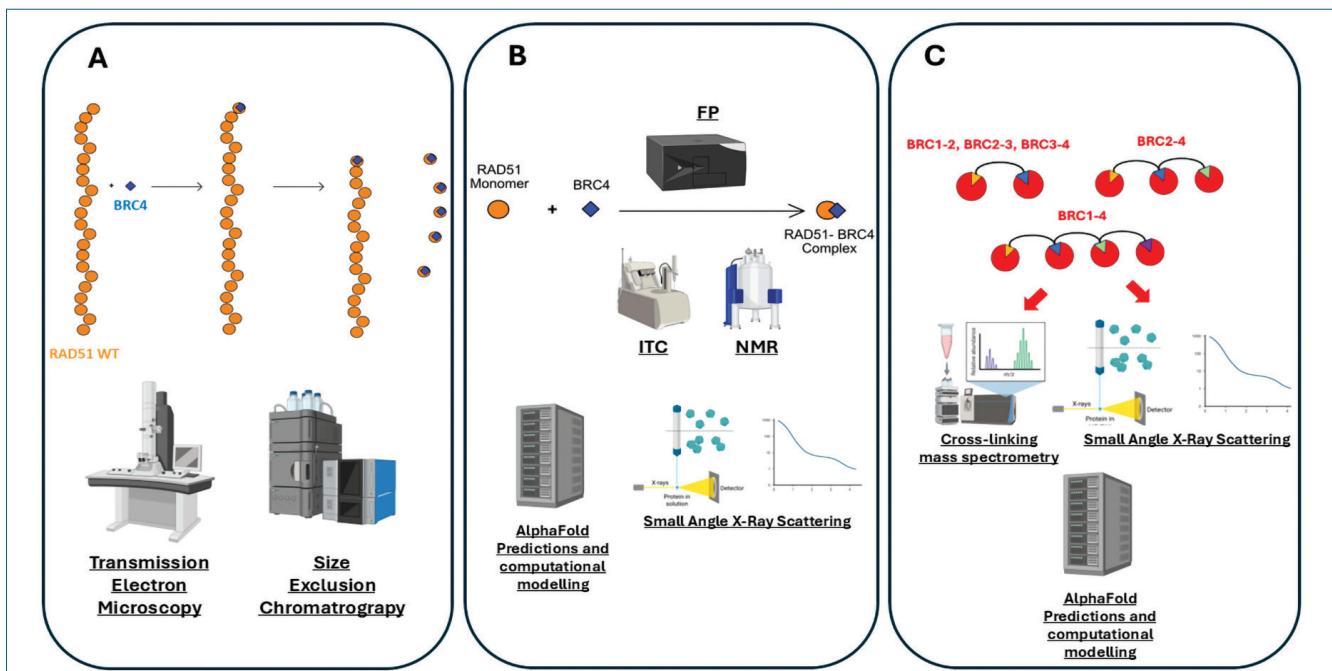
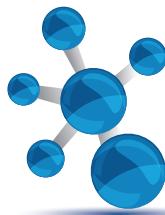


Fig. 2 - Le tre principali direttive del progetto di dottorato: A) studio della depolimerizzazione di RAD51 mediata da BRC4; B) studi biofisici con forma monomerica umana di RAD51; C) approcci strutturali integrativi per lo studio di complessi RAD51-“BRC-repeats”



razionalizzare questi risultati sono stati effettuati studi computazionali che hanno mostrato come le differenti affinità misurate siano attribuibili a specifiche variazioni amminoacidiche all'interno dei "BRC-repeats" [7]. I risultati computazionali e sperimentali ottenuti hanno, infine, guidato l'ultima parte del progetto, che si è concentrata su espressione e purificazione di RAD51 in complesso con troncature di BRCA2 contenenti alcuni o tutti i BRC1-4, assieme alle loro regioni di connessioni native presenti in BRCA2 [7]. Tali complessi sono stati studiati mediante un approccio strutturale che integrasse metodiche computazionali, studi di spettrometria di massa "cross-linking" (XL-MS) e SAXS (Fig. 2) [7]. I risultati ottenuti non solo hanno fatto luce sul ruolo cruciale dell'interazione dei primi quattro "BRC-repeats" con i domini N-terminali di RAD51, ma anche sul comportamento dinamico e flessibile delle regioni che li collegano [7].

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la SCI per il riconoscimento ricevuto e AIRC per aver sostenuto questo progetto attraverso la borsa di studio Id. 25239. Sono, inoltre, riconoscente ai miei mentori Prof. Andrea Cavalli e Prof. Dario Neri per avermi sempre supportato e motivato nel mio percorso scientifico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Stok *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2021, **49**(9), 4239.
- [2] F. Rinaldi, S. Girotto *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2024, **88**, 102895.
- [3] F. Rinaldi, S. Girotto *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2025, **95**, 103164.
- [4] K.B. Kuchenbaecker *et al.*, *JAMA*, 2017, **317**(23), 2402.
- [5] F. Schipani *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**(15), 8338.
- [6] F. Rinaldi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2023, **62**(51), e202312517.
- [7] F. Rinaldi *et al.*, *bioRxiv*, 2025, **11**, 13.688182.

A BRCA2-RAD51 Interaction Investigation

This research project aimed at elucidating the BRCA2-RAD51 interaction integrating computational and experimental approaches. Obtained results offer new mechanistic insights into how BRCA2 recruits RAD51 in the cytosol.

Istruzioni per gli Autori

La Chimica e l'Industria è una rivista di scienza e tecnologia e di informazione per i chimici.

Nella rubrica "Attualità" ospita articoli o comunicati brevi su argomenti di interesse rilevante per tutti coloro che operano nella chimica, richiesti dalla redazione o ricevuti come lettere al direttore.

Nella sezione "Chimica e..." ospita articoli in italiano o in inglese di carattere applicativo, tecnologico e informativo per tutti i settori rilevanti della chimica.

Tutti gli articoli saranno sottoposti al giudizio di almeno un referee.

Testi

I testi possono essere trasmessi via e-mail con chiara indicazione dei nomi degli autori, scrivendo per esteso anche il nome di battesimo, gli Istituti o Enti presso i quali svolgono la loro attività e relativo indirizzo.

I testi dovranno rispettare le seguenti norme editoriali:

- l'articolo, da inviare in formato word, dovrà essere preferibilmente in italiano; non è necessaria alcuna particolare formattazione;
- lunghezza totale (compresi riassunto, abstract, riferimenti bibliografici e didascalie delle figure): 16.000 caratteri spazi inclusi (corrispondenti a circa 5 pagine di rivista).

In particolare:

- il titolo non dovrà essere lungo più di 40 caratteri;
- l'articolo dovrà essere corredata di un riassunto di 400 caratteri e di un abstract in inglese (con traduzione anche del titolo) della medesima lunghezza;
- immagini, schemi, figure: gradite almeno 1 per pagina. Le immagini vanno inviate in formato jpg, tiff o gif in file separati. Si raccomanda di uniformare la lingua delle immagini a quella del testo. Si consiglia di inserire anche un'immagine esplicativa da utilizzare in apertura dell'articolo;
- gli eventuali riferimenti bibliografici (max 30) vanno inseriti in ordine numerico all'interno del testo entro parentesi quadre, posti alla fine del testo e redatti secondo i seguenti esempi:
 - [1] D.W. Breck, *Zeolite Molecular Sieves*, J. Wiley, New York, 1974, 320.
 - [2] R.D. Shannon, T. Finningan, *Acta Crystallogr.*, 1976, **32**, 751.
 - [3] R.P. Mason, S.M. Macdonald *et al.*, *Water Air and Soil Pollution*, 1992, **64**, 617.

Si ricorda che "La Chimica e l'Industria" viene pubblicata esclusivamente online: si consiglia di inserire link a collegamenti esterni da cui poter scaricare eventuale materiale integrativo (immagini, testi, ecc.) a completamento dell'articolo.

Tutto il materiale deve essere inviato per e-mail a:
dott. Anna Simonini, anna.simonini@soc.chim.it