

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 19

Checkpoint da danno al DNA

Il meccanismo di checkpoint da danno al DNA non va confuso con i checkpoint del ciclo cellulare.

Il meccanismo di checkpoint da danno al DNA si attiva appunto in seguito di danni al DNA. Queste lesioni al DNA attivano una cascata di traduzione del segnale che si chiama checkpoint da danno al DNA.

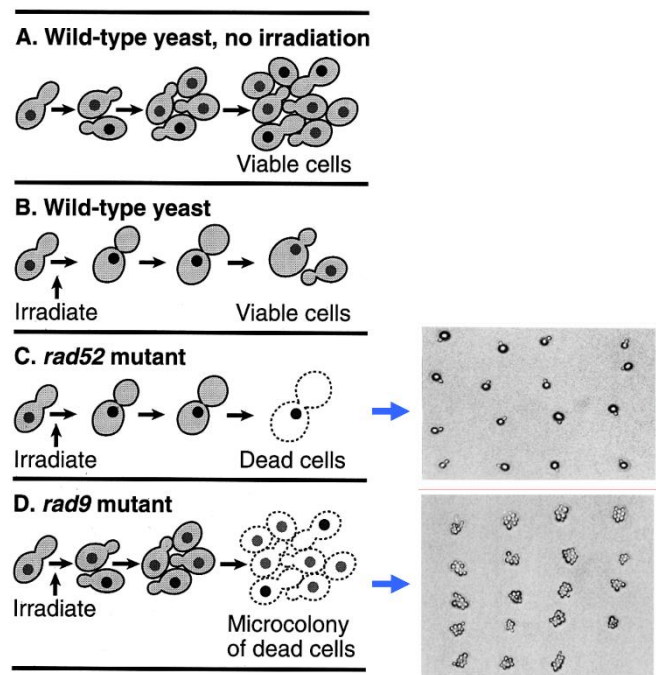
Il meccanismo di checkpoint è stato scoperto nel lievito, dove è stato isolato il mutante *rad9*, che è un gene che codifica per una proteina di checkpoint. Nel lievito i mutanti che muoiono se esposti a danno al DNA sono chiamati *rad*.

Cellule di lievito WT non irradiate e coltivate su una piastra di coltura si espandono e danno delle colonie.

Cellule di lievito WT irradiate e coltivate su piastra di coltura sono vitali ma sono più lente nel formare colonie. Si evidenzia quindi un rallentamento del ciclo cellulare in seguito al danno al DNA.

Il rallentamento si pensava fosse causato dalle lesioni, mentre solo dopo si è evidenziato che il rallentamento è dovuto al meccanismo di checkpoint. Questo è stato possibile isolando il mutante *rad9*, che anche in seguito ad irraggiamento è in grado di formare colonie senza rallentamento del ciclo cellulare. Queste colonie però non saranno mai visibili ad occhio nudo, perché il mutante perde la vitalità dopo pochi cicli cellulari, a causa dei danni accumulati al DNA. Rallentare il ciclo cellulare è importante perché il danno al DNA non riparato in una cellula in replicazione fa sì che si perda del materiale genetico.

Un mutante di riparazione come *rad52*, dove non funziona la ricombinazione omologa, che viene irraggiato e coltivato su piastra, si evidenzia un arresto nel ciclo cellulare, con formazione di una gemma che non dà luogo ad una cellula figlia. Il motivo è che il ceppo *rad52Δ* non è in grado di riparare le lesioni al DNA, ma in grado di arrestare il ciclo cellulare.



Meccanismo di checkpoint

Il meccanismo di checkpoint controlla varie fasi del ciclo cellulare, queste sono:

- Transizione G1-S. Questo checkpoint permette di rilevare danni che si sono verificati in G1 e rallenta la transizione alla fase S.
- Fase S. Questo checkpoint controlla la fase S.
- Transizione G2-M. Questo checkpoint rallenta la transizione tra metafase ed anafase, cioè la separazione dei cromatidi fratelli, per dar tempo alla cellula di riparare i danni al DNA.

Il meccanismo di checkpoint vede una cascata di trasduzione del segnale, fatta da diverse componenti, che arriva a regolare mediante fosforilazione le proteine effettrici, che comportano la progressione del ciclo cellulare.

Il checkpoint è direttamente connesso con la cancerogenesi, infatti una delle proteine di checkpoint nell'uomo è p53, mutata in oltre il 50% dei tumori umani. Il rallentamento della progressione del ciclo cellulare protegge dall'insorgenza di tumore.

Nel caso in cui il checkpoint non si attiva le cellule continuano a dividersi anche in presenza di danno al DNA, causando instabilità genetica che promuove la cancerogenesi.

Si è visto che in cellule precancerose si ha una forte attivazione del meccanismo di checkpoint, a bloccare l'avanzata del ciclo. Quando in queste cellule viene bypassato il blocco del ciclo, si passa ad uno stato di cellule tumorali.

Architettura del checkpoint

Il meccanismo di checkpoint comprende delle proteine che funzionano da sensori, adattatori come rad9 ed effettori, che sono protein chinasi Chk1 e Rad53 nel lievito, e CHK1 e CHK2 nell'uomo.

I sensori sono:

- Complesso RFC-like, che si ha sia in lievito che nell'uomo. Le proteine che lo compongono sono:
 - Rad24 in *S.cerevisiae*, Rad17 nell'uomo, che interagisce con le proteine Rfc2-5 a formare un complesso RFC-like. È un complesso simile a quello del complesso *clamp-loader*.
- Complesso PCNA-like, chiamato 9-1-1.
 - Il nome 9-1-1 viene dalle componenti del complesso nel mammifero, cioè Rad9, Rad1 ed Hus1. Queste proteine interagiscono formando una struttura ad anello che è simile a quella del complesso PCNA.
 - La nomenclatura in *S.cerevisiae* è rispettivamente Ddc1, Rad17 e Mec3.
- Ci sono poi due protein chinasi:
 - Tel1 nel lievito e ATM nell'uomo
 - Mec1 nel lievito e ATR nell'uomo

Entrambe queste proteine sono protein-chinasi ad alto peso molecolare.

Principal players of the DNA damage checkpoints

Protein function	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Mammals
ATM/ATR-kinases	Mec1	Rad3	ATR
	Tel1	Tel1	ATM
ATR-interacting proteins	Ddc2	Rad26	ATRIP
RFC-like proteins	Rad24	Rad17	Rad17
	Rfc2-5	Rfc2-5	Rfc2-5
PCNA-like proteins	Ddc1	Rad9	Rad9
	Rad17	Rad1	Rad1
	Mec3	Hus1	Hus1
Mediators	Rad9	Crab2	BRCA1
	Mrc1	Mrc1	Claspin
Effector kinases	Rad53	Cds1	Chk2
	Chk1	Chk1	Chk1

Tel1 funziona mediante il complesso MRX mentre ATM funziona con il complesso MRN.

Mec1 lega la proteina Ddc2 nel lievito, mentre ATR lega il complesso ATRIP (ATR interacting protein).

- Una proteina adattatore, Rad9 nel lievito e 53BP1 nell'uomo.
- Le proteine chinasi effettrici, che come detto prima sono Chk1 e Rad53 nel lievito, e CHK1 e CHK2 nell'uomo.

Quando le proteine chinasi effettrici si attivano fosforileranno effettori a valle, attivando il checkpoint che controlla la progressione del ciclo cellulare.

Il checkpoint è stato identificato come un meccanismo che controlla la progressione del ciclo cellulare. Si è poi visto che l'attivazione di checkpoint controlla anche i meccanismi di riparazione del DNA, mediante la fosforilazione delle proteine che sono coinvolte nei meccanismi di riparazione. La sua attivazione promuove quindi la riparazione del DNA.

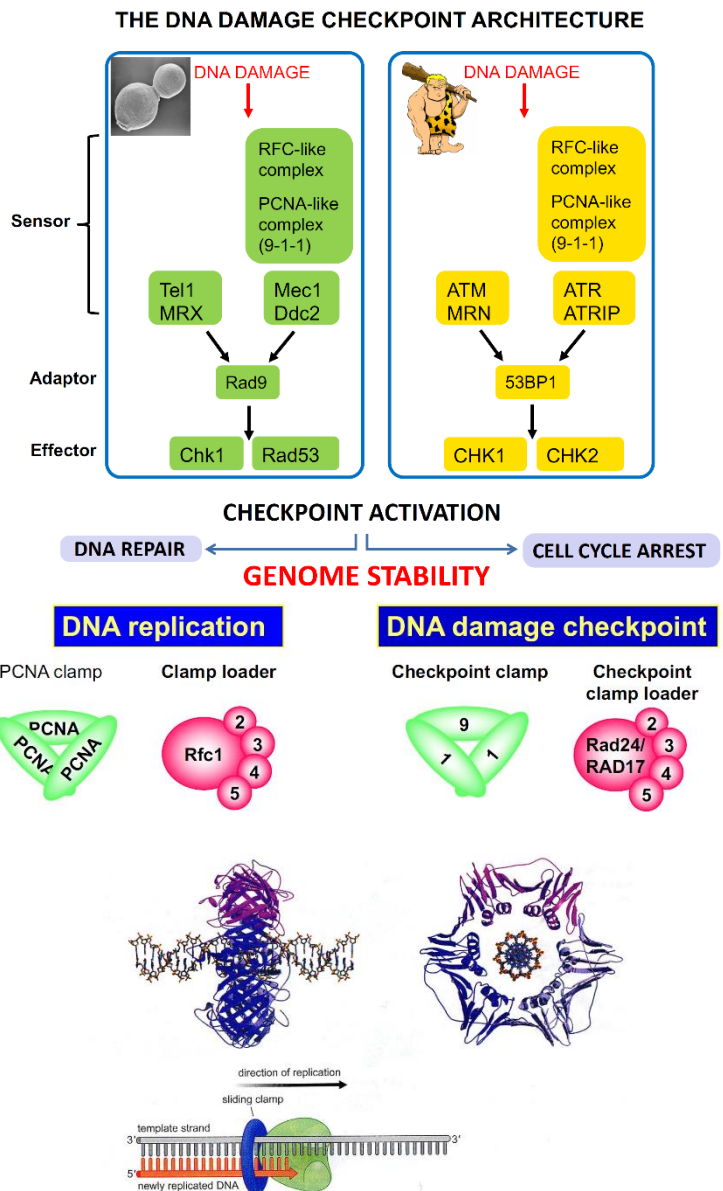
Funzionamento del checkpoint

Tel1/ATM e Mec1/ATR sono le due protein chinasi ad alto peso molecolare che sono dei sensori per il danno al DNA. Tel1/ATM funziona attraverso MRX/MRN, che monitora il danno al DNA legando la terminazione al sito di rottura del DNA, che tiene vicine le due estremità, innesca la resection e recluta Tel1/ATM.

Mec1/ATR è capace di legare il DNA, attivandosi in presenza di danno al DNA. La piena attivazione richiede il complesso PCNA-like 911 (Ddc1, Rad17, Mec3/Rad9, Rad1, Hus1) e di Ddc2/ATRIP, che ne media l'interazione con il DNA. Senza il complesso PCNA-like Mec1 è difettivo nella sua funzione.

Il complesso PCNA-like è caricato sul DNA dal complesso Rfc-like. Rfc-like fa quindi da clamp-loader, caricando PCNA che è la sliding-clamp.

Il complesso PCNA-like e Rfc-like sono molto simili ai corrispettivi complessi clamp PCNA e clamp-loader Rfc che intervengono durante la replicazione del DNA. La clamp è formata dalle proteine 911, mentre il clamp-loader vede la proteina Rad24/Rad17 al posto della Rfc1, mentre Rfc2-5 partecipano ad entrambi i complessi.

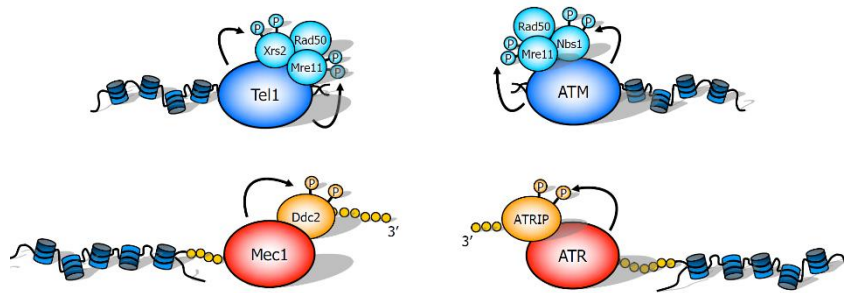


Durante la replicazione del DNA il complesso PCNA aumenta la processività della DNA polimerasi. Cosa faccia il complesso 911 PCNA-like non è ancora chiaro. Si sa che senza il complesso PCNA-like o il complesso Rfc-like la proteina chinasi Mec1 non si attiva bene.

Tel1/ATM riconoscono la rottura della doppia elica di DNA e sono caricate sul DNA da MRX/MRN.

Mec1/ATR, attraverso l'interattore Ddc2/ATRIP, riconosce il ssDNA coperto da RPA. I complessi Mec1-Ddc2 e ATR-ATRIP riconoscono quindi RPA legata a ssDNA.

Entrambi i complessi rilevano quindi la presenza del danno, in modi diversi.



È stata studiata l'attivazione di ATM (parliamo di ATM, espressa nei mammiferi, perché è stata più studiata rispetto a Tel1, espressa nel lievito). ATM esiste come complesso inattivo sotto forma di dimero con un altro complesso ATM. Dopo il danno al DNA, ATM viene caricata sul DNA attraverso il complesso MRN, che viene fosforilato e a sua volta fosforila l'altro complesso ATM su delle serine e treonine.

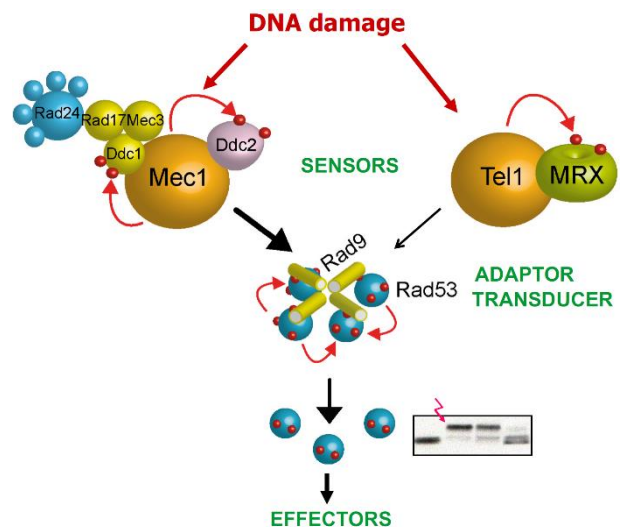
MRX/MRN non solo carica Tel1/ATM sul DNA, ma sono coinvolte anche nella attivazione di Tel1/ATM.

ATM passa quindi da un dimero inattivo ad un monomero fosforilato. Non è chiaro cosa attivi la fosforilazione reciproca del dimero ATM.

Tel1/ATM e Mec1/ATR sono chinasi ad alto peso molecolare, su cui è difficile fare esperimenti biochimici e da non semplici da purificare.

Su Tel1 sono stati fatti meno esperimenti rispetto all'omologo ATM. Per Mec1 si sa ancora meno.

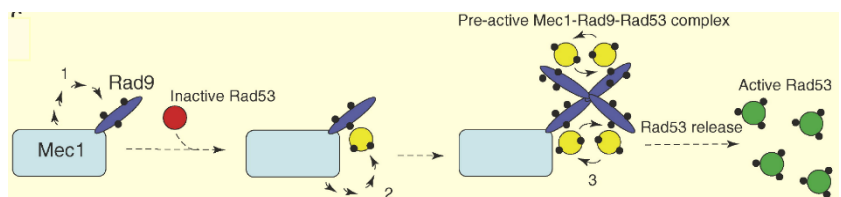
Sono stati fatti di recente i cristalli di Tel1 e Mec1.



L'attivazione di Tel1 e Mec1 promuove l'attivazione delle chinasi Chk1/CHK1 e Rad53/CHK2, che avviene attraverso un adattatore che è Rad9/53BP1.

Mec1/ATR o Tel1/ATM fosforila Rad9/53BP1, che in questo modo lega Rad53/CHK2. Mec1/ATR può fosforilare così anche Rad53/CHK2.

La fosforilazione di Mec1/ATR su Rad9 (rilevata in almeno 17 residui diversi, serine e treonine) fa sì che più proteine Rad9 fosforilate si aggregino in oligomeri. Gli oligomeri di Rad9 funzionano da scaffold su cui si legano le proteine Rad53, che a loro volta vengono fosforilate da Mec1/ATR. Rad53 fosforilato fa auto-fosforilazione intermolecolare con altre proteine Rad53 legate allo scaffold di Rad9. Questo evento di fosforilazione intermolecolare determina il rilascio di Rad53 protein chinasi in forma attiva.



Checkpoint monitoring

Il grado di fosforilazione di Rad53 è utilizzato come indicatore dell'avvenuta attivazione del checkpoint. La fosforilazione si può vedere come shift di mobilità elettroforetica, studiando un estratto proteico in cellule dopo danno al DNA e a cellule senza danno al DNA.

Usando anticorpi anti Rad53 si vede che in assenza di danno al DNA si ha solo una banda, mentre in presenza di danno c'è uno shift di mobilità elettroforetica, con un rallentamento della migrazione che è stato dimostrato sia dovuto ad eventi di fosforilazione. Col passare del tempo (3 ore) il danno viene riparato e Rad53 perde la fosforilazione, ritornando allo stato originario. Anche questo è evidenziabile da elettroforesi.

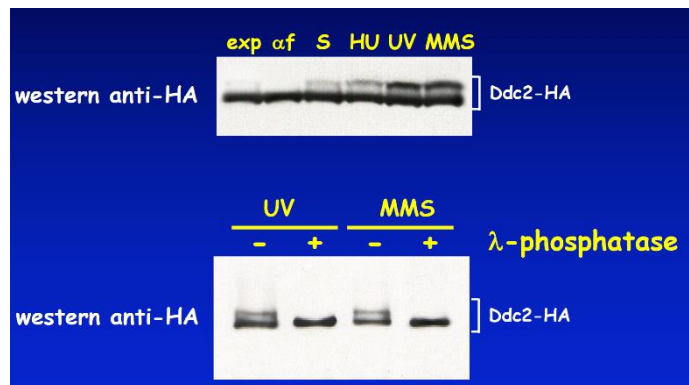
Nell'uomo non sono stati fatti studi su CHK1 e CHK2, perché si ritiene che sia un processo equivalente a quello di lievito.

L'attivazione del checkpoint è evidenziabile anche attraverso lo shift di mobilità elettroforetica di altre proteine in seguito alla somministrazione di agenti mutageni a cellule in coltura.

Un estratto proteico viene precipitato e purificato mediante un anticorpo contro la proteina che si vuole studiare, spesso espressa come proteina di fusione legata ad un epitopo conosciuto.

L'immunoprecipitato si fa su estratti provenienti da cellule esposte o meno ad agenti mutageni. Il western blot permette di identificare lo shift.

Per dimostrare eventi di fosforilazione una parte di immunoprecipitato è trattata con fosfatasi λ , che defosforila le proteine. Se c'è fosforilazione nella proteina trattata si evidenzierà una banda elettroforetica rallentata, che scompare con il trattamento mediante fosfatasi.



Segnali che inducono l'attivazione del checkpoint

I danni che inducono l'attivazione del checkpoint sono vari, come dimeri di pirimidina, single e double strand break, alterazioni alle basi azotate.

Tel1/Atm si attiva in risposta a rotture della doppia elica grazie al complesso MRX/MRN.

Le altre lesioni sono principalmente riconosciute da Mec1/ATR, e si è ipotizzato che il danno primario non agisca di per sé come attivatore del checkpoint, ma dia luogo a strutture secondarie in comune di DNA che successivamente vengono riconosciute come segnale per l'attivazione del checkpoint.

Il segnale secondario si è ipotizzato essere il ssDNA. Ad esempio nelle lesioni come il dimero di pirimidina, l'azione del NER rimuove il tratto di DNA contenente la lesione, lasciando l'ssDNA complementare coperto da RPA, che potrebbe rappresentare il segnale per la riparazione.

Nelle rotture della doppia elica di DNA che Tel1/ATM non riconosce, si sa che le estremità della rottura vanno incontro a resection, lasciando ssDNA 3' protruding, che viene coperto da RPA e dà inizio al processo di ricombinazione omologa.

La presenza di basi danneggiate causa un blocco della forza replicativa. La mancata coordinazione nella replicazione del DNA causa la progressione della forza per un certo periodo, con aumento della quantità di ssDNA che viene ricoperto da RPA, che può funzionare da segnale di attivazione del checkpoint.

È stato dimostrato che la proteina Mec1/ATR riconosce il ssDNA ricoperto da RPA che si genera dopo il processamento del danno primario.

Il ssDNA è comunque un intermedio di molti processi cellulari fisiologici, come nella forza replicativa. Si è visto che le cellule sono in grado di tollerare un livello soglia di ssDNA, che non induce l'attivazione di checkpoint. Quando la quantità di ssDNA aumenta oltre un certo livello si ha l'attivazione del checkpoint, che provoca un arresto transiente del ciclo cellulare allo scopo di riparare le lesioni.

Monitoraggio dell'attivazione del checkpoint

È possibile monitorare il ciclo cellulare e l'attivazione dei checkpoint nel lievito, perché in questo microorganismo è possibile sincronizzare le cellule di lievito nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Checkpoint G1/S

Questo checkpoint si attiva in presenza di un danno in G1, e rallenta la transizione da fase G1 a fase S.

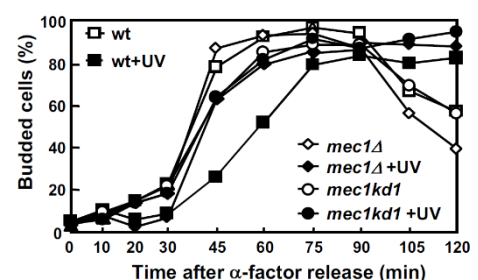
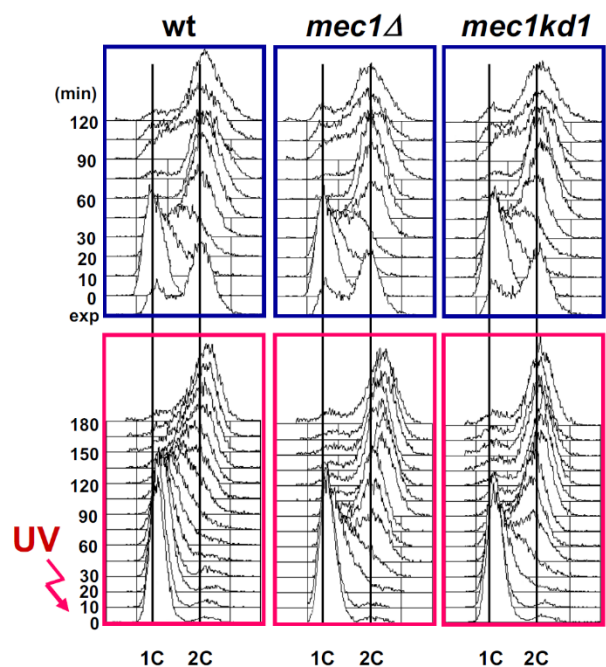
Il ceppo di lievito WT viene arrestato nella fase G1 del ciclo cellulare attraverso α -factor, che è un feromone che lega i recettori sulla parete cellulare e che blocca le cellule nella fase G1. Fisiologicamente α -factor consente la coniugazione delle cellule di lievito. È un peptide che si aggiunge al terreno di coltura, ed in circa 2 ore le cellule si troveranno arrestate in fase G1 del ciclo cellulare.

L'arresto delle cellule in G1 si può evidenziare mediante una analisi FACS del contenuto di DNA di cellule trattate con *ioduro di propidio*, che si intercala nel DNA ed emette fluorescenza (da Wikipedia: si intercala anche su RNA e richiede trattamento con nucleasi per avere una rilevazione specifica di una delle due molecole).

Il profilo di crescita esponenziale del DNA evidenzia due picchi, il primo indica il contenuto aploide di DNA (1C), mentre il secondo picco indica le cellule che hanno duplicato il DNA ma che non si sono ancora divise, con un contenuto di DNA diploide (2C).

Le cellule che si trovano tra i due picchi sono cellule in fase S, che stanno ancora replicando il DNA.

Quando il ceppo WT viene trattato con α -factor, si vede un solo picco alla FACS che indica il contenuto di DNA aploide (1C), di cellule arrestate in G1. Per essere certi dell'arresto in G1 si può verificare il *profilo di gemmazione*, guardando le cellule al microscopio ottico per vedere se hanno emesso la gemma,



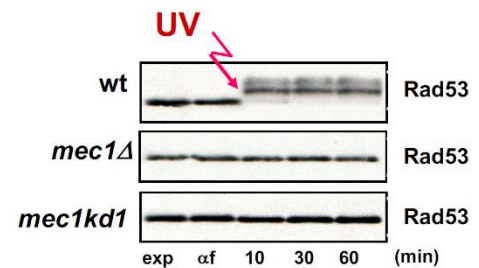
ricavando la percentuale di cellule con gemma. Le cellule arrestate in G1 non hanno la gemma; la comparsa della gema nel lievito segna la transizione G1-S.

Con le cellule arrestate in fase G1, si toglie il feromone α -factor (cambio terreno di coltura?), e si assiste dopo circa 10 minuti, all'ingresso delle cellule in sincrono nel ciclo cellulare. La sincronia si mantiene per circa 2 cicli di divisione cellulare.

In cellule arrestate in fase G1 a cui viene fatto un danno al DNA si ha l'attivazione del checkpoint, ed è possibile evidenziare alla FACS un ingresso estremamente rallentato delle cellule in fase S.

Anche valutando il profilo di gemmazione nelle cellule con arresto in G1, si vede che le cellule WT che hanno subito un danno al DNA hanno un ingresso ritardato in fase S. Più la dose di UV somministrata è elevata e maggiore sarà il ritardo dell'ingresso in fase S.

È possibile monitorare lo stato di fosforilazione di Rad53 sulle stesse cellule, dove con prelievi distanziati nel tempo è possibile evidenziare, su analisi elettroforetica, lo shift nella banda di Rad53, che è indice di fosforilazione della proteina.



Mec1 nel checkpoint G1-S

Per verificare se Mec1 è implicato nell'attivazione del checkpoint G1-S è possibile eseguire gli stessi esperimenti visti col WT sul ceppo *mec1Δ*.

Quello che si evidenzia è che il ceppo arrestato in G1 ha un profilo di ingresso nel ciclo cellulare che è sovrapponibile a quello del ceppo WT.

Dopo irraggiamento con UV del ceppo *mec1Δ*, si evidenzia un profilo di gemmazione quasi sovrapponibile a quello di *mec1Δ* non irraggiato. Il ceppo *mec1Δ* è quindi più veloce rispetto al ceppo WT nell'entrare in fase S, e questo è evidenziabile sia alla FACS che il profilo di gemmazione.

Il ciclo cellulare, quindi, non è arrestato in un ceppo *mec1Δ*. All'analisi elettroforetica si evidenzia che la proteina Rad53 non è fosforilata.

C'è un difetto nell'attivazione del checkpoint G1-S in *mec1Δ*.

Siccome *mec1* è una chinasi, ci si può chiedere se l'attivazione del checkpoint dipendente da *mec1* si dipendente dalla sua attività chinastica. Si usa quindi un mutante chiamato *mec1kd1*, dove kd1 sta per *kinase dead*. Questo mutante ha il gene *mec1* con una mutazione nel dominio chinastico, che quindi rende difettiva l'attività chinastica della proteina.

Si fa lo stesso esperimento di arresto in fase G1 con cellule *mec1kd1*, sottoposte o meno a danno da UV. All'analisi FACS si vede che anche questo ceppo ha un problema nell'attivazione del checkpoint, identificato dal fatto che non si ha un rallentamento evidente nell'ingresso in fase S. Il profilo di gemmazione dopo danno al DNA è anticipato rispetto al WT con irraggiamento, e sovrapponibile al ceppo *mec1Δ* +UV.

Rad53 non risulta fosforilato in seguito ad irraggiamento su cellule *mec1kd1*, il che indica una mancata attivazione del checkpoint a causa della mancata attività chinastica di *mec1*.

Monitoraggio checkpoint G2/M

Per monitorare la transizione dalla fase G2 alla fase M dobbiamo arrestare le cellule di lievito in fase G2. Le cellule vengono trattate con *nocodazolo*, che è un agente che depolimerizza i microtubuli. Il fenotipo risultante mostra la generazione di una gemma, che non è in grado di staccarsi dalla cellula madre per via della depolimerizzazione dei microtubuli e la scomparsa del fuso mitotico. Il nucleo rimane nella cellula madre indiviso.

Cellule bloccate in fase G2 vengono spostate su un terreno di coltura senza nocodazolo, dove riprendono la transizione G2/M. Si misura la comparsa di cellule binucleate, che indica la transizione metafase-anafase.

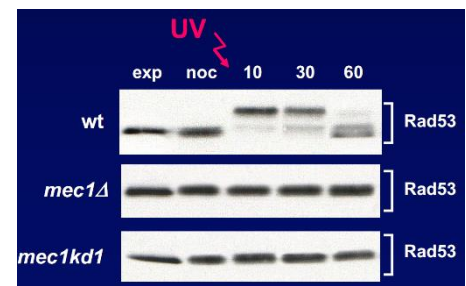
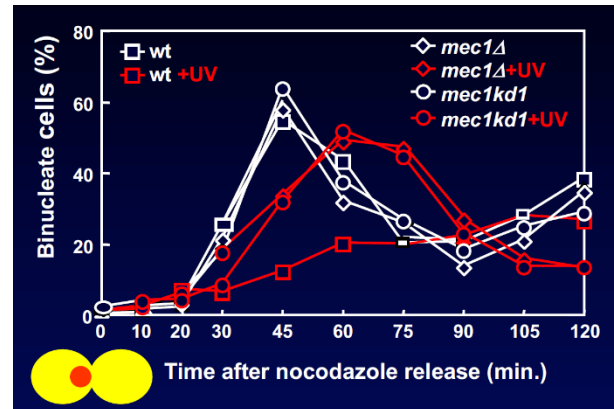
Nel ceppo WT senza irraggiamento iniziano dopo poco tempo a comparire cellule binucleate, che poi diminuiscono man mano che si completa la divisione.

Il ceppo WT irraggiato mostra un forte rallentamento nella transizione G2-M, per via dell'attivazione del checkpoint dovuta al danno al DNA. La fosforilazione di

Rad53 nel ceppo WT irraggiato è fosforilato, come evidenziabile mediante elettroforesi; la fosforilazione scompare dopo circa 60 minuti.

Il checkpoint inibisce la separazione dei cromatidi fratelli, che restano vicini permettendo la ricombinazione omologa in caso di danno al DNA.

Il checkpoint in G2-M dipende sempre dalla attività chinasi di Mec1, come si può evidenziare in esperimenti con ceppi *mec1Δ* e *mec1Δkd1*.



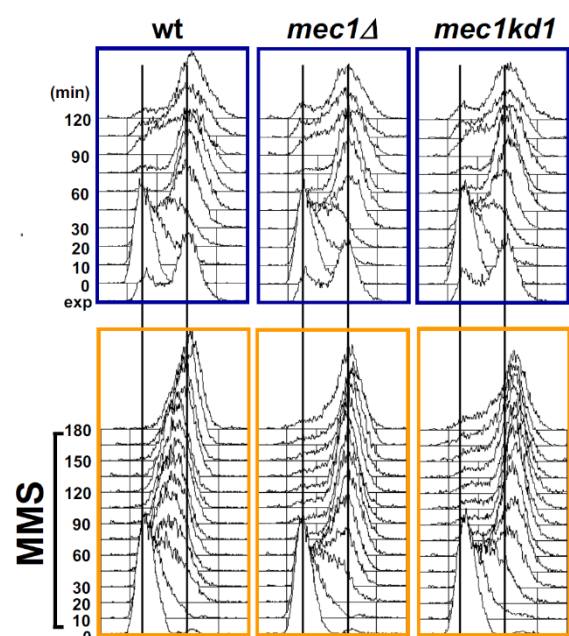
Checkpoint intra-S

Il checkpoint che si attiva durante la fase S, le cellule devono essere arrestate in fase G1. Le cellule vengono trattate con Metil-metan-sulfonato MMS. Il MMS metila le basi azotate, e la metilazione della guanina blocca la replicazione del DNA, per motivi non ben compresi.

Il trattamento con MMS non attiva il checkpoint G1-S ma attiva il checkpoint intra-S.

Un ceppo arrestato in fase G1 viene posto in un terreno di coltura senza agente bloccante il ciclo. Le cellule vengono trattate con MMS e si vede che il budding non è dilazionato. Mediante analisi FACS si evince che le cellule si accumulano nella fase S del ciclo cellulare, con un contenuto di DNA intermedio tra 1C e 2C.

Raggi UV e MMS creano danni diversi al DNA. Gli UV creano spesso dimeri di timina, che deformano grossolanamente l'elica di DNA, vengono rilevati dal



NER che rimuove la regione danneggiata lasciando ssDNA, che viene ricoperto da RPA e promuove l'attivazione del checkpoint in fase G1.

La metilazione delle basi da parte del MMS dà lesioni più piccole nel DNA che vengono riconosciute dalla DNA polimerasi nel contesto della replicazione del DNA in fase S, quando causano il blocco della forza replicativa con accumulo di ssDNA al livello della forca.

Sono state fatte due ipotesi per spiegare l'attivazione del checkpoint ed il rallentamento della fase S:

- Il checkpoint controlla il firing delle origini di replicazione. La cellula necessita di più tempo per superare la fase S perché meno origini di replicazione vengono accese contemporaneamente.
- Il checkpoint controlla la progressione della forza replicativa.

Si sono fatti esperimenti per distinguere tra le due possibilità, e si è rilevato che il checkpoint non sembra controllare la velocità della forza replicativa, che sembra procedere senza rallentamenti anche in cellule che hanno subito danno al DNA.

Il checkpoint sembra controllare il firing delle origini di replicazione. Il checkpoint inibisce l'accensione delle origini di replicazione *late*.

2D elettroforesi

Queste cellule trattate con MMS hanno attivato le origini di replicazione precoci, ma non le origini di repliche tardive, il che spiegherebbe il rallentamento nella replicazione del DNA.

Il rallentamento è stato studiato su gel bidimensionale, che permette di separare molecole di DNA su due dimensioni e di identificare l'apertura dell'origine di replicazione. In questo esperimento si parte da un dsDNA in cui è presente un'origine di replicazione, che si attiva formando una bolla. Studiando lo stesso segmento di DNA ad intervalli di tempo e con l'uso di enzimi di restrizione che tagliano a distanze conosciute dall'origine, è possibile identificare la bolla.

L'elettroforesi bidimensionale su DNA si esegue su gel di agarosio, in cui viene caricato il DNA estratto dalle cellule in fase S (ottenute dopo sincronizzazione in G1) e tagliato con enzimi di restrizione.

Sul DNA caricato su gel si esegue una prima elettroforesi, che dà la prima dimensione. Questa prima corsa è effettuata su un gel con una percentuale relativamente bassa di agarosio, circa 0,4%, che permette di separare il DNA in base alla sua massa.

Si taglia quindi la lane ottenuta dalla prima elettroforesi e si inserisce in una seconda piastra per elettroforesi, ruotata di 90°, che viene poi riempita di gel di agarosio fino ad inglobare la lane. La seconda elettroforesi si fa con gel di agarosio al 1 o 1,2%, in presenza del bromuro di etidio. Si è visto che in questo modo la migrazione delle

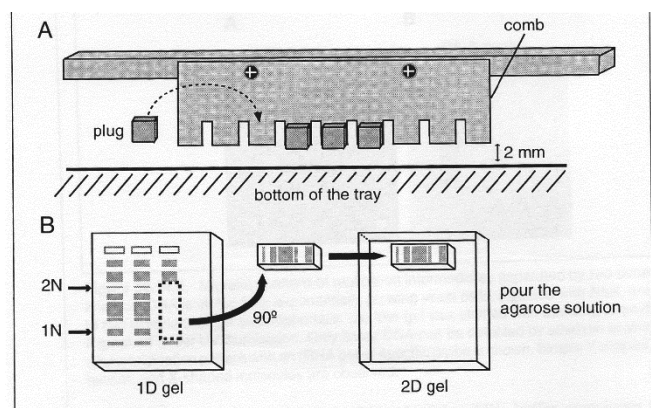
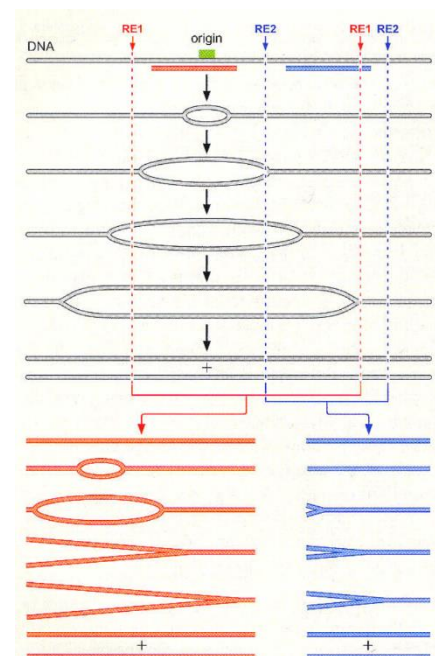


Figure 22.14.1 Tips for two-dimensional gel electrophoresis. (A) Embedding agarose plugs in agarose gel. (B) How to transfer a gel run in the first dimension for electrophoresis in the second dimension. Excise the portion of the gel containing DNA molecules ranging from 1N to 2N. Turn the excised gel piece 90° and re-position it at the top of the second gel. The agarose solution for the second dimension gel has been poured in the tray.



molecole di DNA è molto influenzata dalla loro forma, per cui frammenti di DNA non lineari saranno più lenti a muoversi nel gel e saranno quindi in ritardo.

Dopo aver subito i due passaggi di elettroforesi, il DNA è trasferito su filtro ed ibridato con una sonda che riconosce l'origine di replicazione che si vuole studiare.

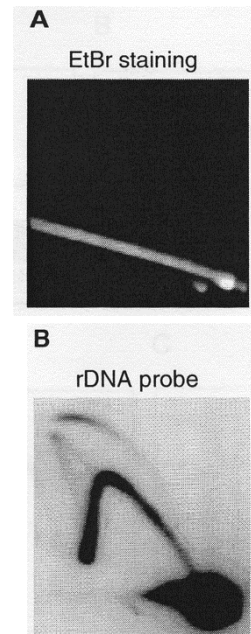
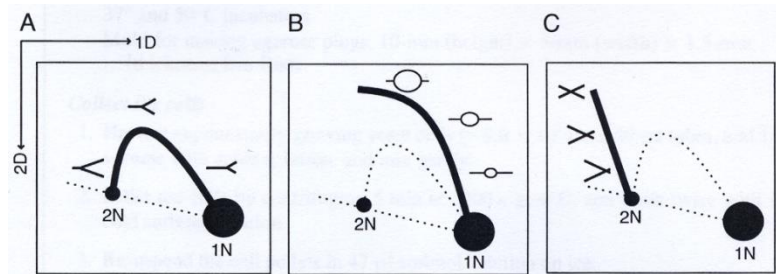
Dopo aver fatto l'elettroforesi nella seconda dimensione il campione marcato con bromuro di etidio si presenta come una linea obliqua che va da sinistra a destra e rappresenta molecole di DNA lineari di diverse dimensioni.

Quando lo stesso campione è ibridato con una sonda specifica, è possibile evidenziare delle forme diverse.

- Più a destra si ha un segnale molto forte che corrisponde a DNA 1N (non replicato).

La zona centrale del campione ibridato mostra una particolare separazione del DNA, che contiene delle strutture di DNA che sono rallentate nella loro corsa elettroforetica.

- L'arco che si genera contiene delle strutture ad Y, che a seconda della conformazione si dispongono in zone diverse.
- L'arco più in alto corrisponde alla bolla di replicazione.
- Il cono più a sinistra contiene le strutture ad X. La forma della traccia dipende dalla struttura ad X più rappresentata.

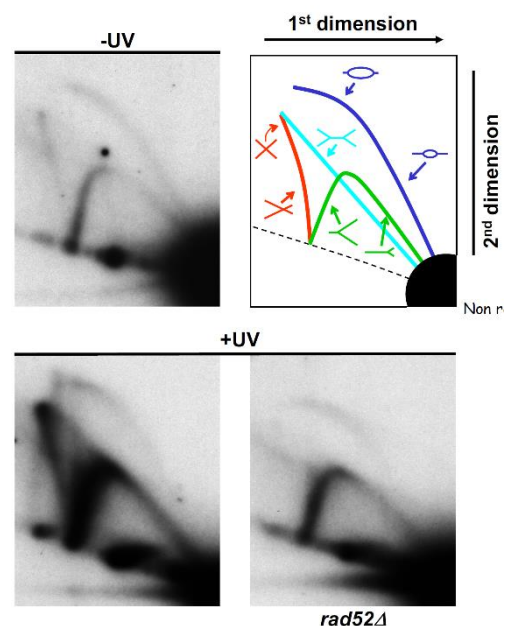


Analisi degli intermedi di replicazione mediante 2D elettroforesi

Un ceppo WT non irraggiato che si trova in fase S. Si evidenziano alla elettroforesi 2D l'arco delle bolle, l'arco delle Y e l'arco degli intermedi ad X.

Dopo irraggiamento si vede l'arco delle bolle, aumenta drasticamente la presenza di strutture ad Y per via delle forche bloccate, ed aumenta la presenza di strutture ad X, per via dell'innesco della ricombinazione omologa.

In un ceppo *rad52Δ* si assiste ad una scomparsa della traccia delle strutture ad X. Rad52 è una proteina che interviene nella ricombinazione, e la sua scomparsa inibisce questo processo e gli intermedi correlati.



Mec1 e l'attivazione delle origini di replicazione

Per verificare se Mec1 interviene nel rallentamento dell'attivazione delle origini di replicazione si possono fare degli esperimenti.

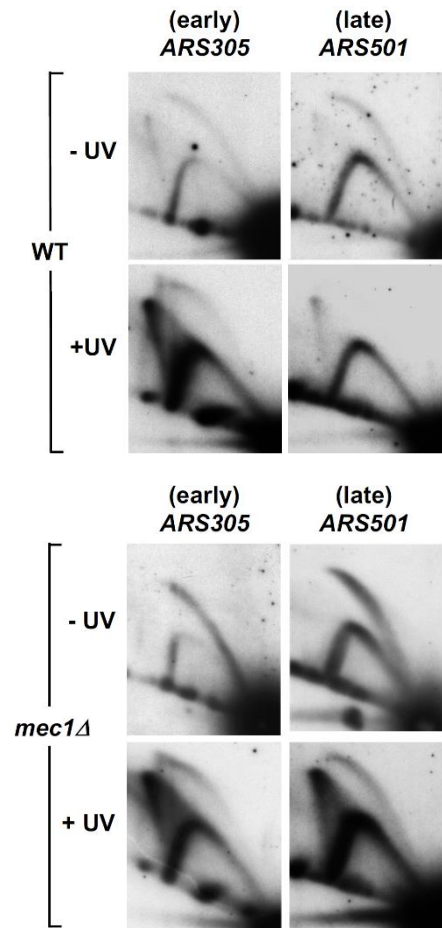
Un ceppo WT viene diviso in due gruppi, uno irradiato con UV ed uno no. Dopo elettroforesi 2D il campione viene ibridato con una sonda marcata verso una origine early (ARS305) e un altro campione viene marcato con una sonda diretta verso una origine late (ARS501).

Nel campione WT senza irraggiamento si ottiene un gel 2d molto simile tra origine early ed origine late, non si ha quindi una differenza di attivazione tra i due tipi di origine. Questo si evince dall'arco delle bolle di replicazione, che se presente indica che l'origine di replicazione marcata dalla sonda si è effettivamente attivata. Le strutture ad Y non sono utili ad identificare l'attivazione di una origine di replicazione specifica, perché la loro presenza può indicare anche la replicazione è partita da un'altra origine di replicazione e che è giunta fino alla regione ibridata dalla sonda.

Nel campione dopo irraggiamento con UV si vede che l'origine early si attiva, perché all'elettroforesi 2D compare l'arco delle bolle di replicazione, mentre il campione marcato per la regione late non mostra la presenza dell'arco delle bolle di replicazione.

Si vuole capire se la mancata attivazione dell'origine di replicazione late derivi dall'attivazione del checkpoint. Si fa quindi lo stesso esperimento usando un mutante *mec1Δ*, con due popolazioni di cui una esposta a radiazione UV e l'altra no. Si vede così che l'arco delle bolle di replicazione dell'origine late è presente nel mutante *mec1Δ* irradiato con danno UV, dimostrando la mancata attivazione del checkpoint in seguito alla delezione di *mec1*.

Il checkpoint intra-S si attiva anche con raggi UV, a dosi minori.



Il danno al DNA in cellule in fase S causa l'attivazione del checkpoint di danno al DNA, che inibisce l'attivazione delle origini di replicazione late. Questa inibizione spiega perché la progressione delle cellule con danno al DNA in fase S è rallentata, dovuta al fatto che meno origini di replicazione si attivano.

La rimozione del gene *mec1* rimuove il controllo del checkpoint, per cui non si assiste all'inibizione dell'attivazione delle origini di replicazione late, e non si ha ritardo nella progressione della fase S.

Stabilizzazione della forza di replicazione

Quando il macchinario di replicazione del DNA incontra una lesione si può avere arresto della replicazione. In questo caso il checkpoint fa in modo che il macchinario di replicazione resti comunque attaccato al DNA, in modo tale che quando la lesione viene riparata la replicazione possa riprendere. Si dice che la forza arrestata è mantenuta in uno stato competente per la replicazione.

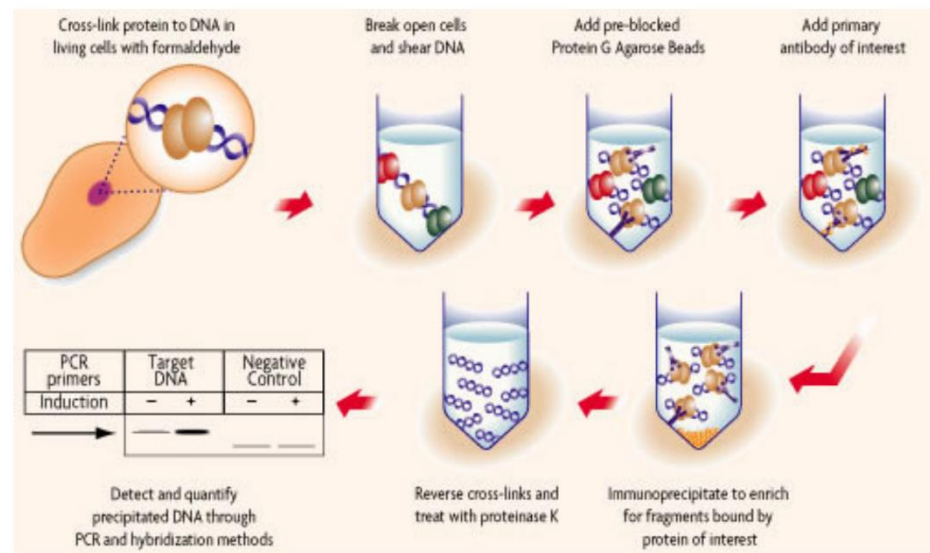
Sono stati fatti diversi esperimenti per valutare questo fenomeno, soprattutto mediante analisi ChIP (chromatine immunoprecipitation).

Nell'analisi ChIP si vuole capire se una determinata proteina legni un frammento di DNA. Per l'esperimento si estrae DNA dalle cellule, si frammenta e si aggiunge un anticorpo che riconosce la proteina che si vuole identificare. L'anticorpo precipita la proteina, e se questa lega del DNA sarà precipitato anche questo.

La presenza di DNA si fa con PCR quantitativa. In questo modo è possibile misurare la quantità di DNA legato alla proteina presente nel precipitato.

Questo sistema serve a misurare il binding della proteina di interesse sul DNA.

In questo modo si è visto che l'attivazione del checkpoint mantiene il replisoma attaccato al DNA, in uno stato competente alla replicazione.



Il checkpoint ha quindi un importante controllo sulla fase S, mantenendo la forza replicativa alla lesione facilitando il recupero della replicazione del DNA quando la lesione è riparata. Il checkpoint rallenta anche la fase S, inibendo l'accensione delle origini di replicazione tardive.

Checkpoint da double strand break

La rottura della doppia elica di DNA questa può essere monitorata di per se e poi essere riparata mediante NHEJ oppure attraverso ricombinazione omologa.

Le rotture della doppia elica di DNA attivano la cascata di checkpoint, che si può monitorare col sistema MAT nel lievito.

Si usa un ceppo che utilizza la endonucleasi HO sotto il controllo del promotore GAL. Questo ceppo ha mutazioni *hmlaΔ* e *hmraΔ* ed un sito di taglio per HO sul cromosoma 3. L'aggiunta di galattosio causa l'attivazione di HO che effettua un taglio sulla sua sequenza bersaglio sul gene MAT.

La generazione della rottura può essere utile per valutare l'attivazione del checkpoint, in quanto nella cellula basta una sola rottura della doppia elica per attivare il checkpoint.

L'attivazione del checkpoint si misura misurando lo stato di fosforilazione della chinasi Rad53.

L'attivazione del checkpoint causa un rallentamento del ciclo cellulare, che si osserva nella transizione metafase-anafase. Si osserva la cellula che produce una gemma priva di nucleo; il nucleo resta nella cellula madre, con contenuto di DNA 2C.

Si può monitorare l'attivazione di checkpoint attraverso la FACS, dopo aver aggiunto galattosio su un terreno di coltura contenente raffiniosio ed il ceppo di lievito mutante prima descritto.

Il terreno con raffiniosio è meno ricco di quello contenente glucosio, quindi al tempo 0 alla FACS si osserva una prevalenza di cellule con contenuto di DNA aploide. L'aggiunta di galattosio causa l'induzione di HO, che taglia il DNA causando la rottura della doppia elica. L'attivazione del checkpoint causa il blocco della

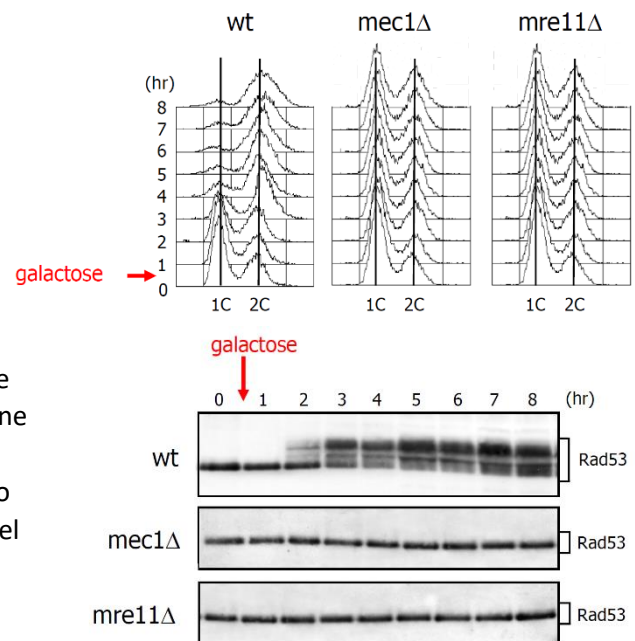
transizione G2-M, con l'accumulo di cellule con gemma priva di nucleo, e cellula madre con un nucleo e contenuto di DNA 2C.

La rottura della doppia elica non viene rilevata prima della fase G2 perché la chinasi principale che si attiva in risposta ai DSBs è Mec1/ATR, che riconosce il ssDNA 3' protruding ricoperto da RPA. Il processamento di un DSBs avviene solo in fase G2 del ciclo cellulare, e non in G1, perché serve l'attività dei complessi (??CLIB??) CDK, che fosforilano le proteine coinvolte nella resection, fosforilando Dna2 e Sae2.

Un DSBs indotto in G1 comunque attiverà il checkpoint G2-M, perché la chinasi che attiva il checkpoint dopo un DSBs è Mec1/ATR, che riconosce il ssDNA generato dalla resection. La resection si ha solo in fase G2 del ciclo cellulare perché richiede i complessi chinasi CDK, che fosforilano ed attivano le proteine coinvolte nella resection.

Il checkpoint dipende da Mec1, e questo è evidente facendo gli stessi esperimenti in un ceppo *mec1Δ*, dove non c'è nessun arresto di ciclo cellulare, e la proporzione tra cellule con DNA 1C e 2C in seguito all'aggiunta di galattosio non cambia quando analizzata alla FACS. Allo stesso modo non si evidenzia fosforilazione di Rad53 nel ceppo *mec1Δ* dopo il DSB.

Il checkpoint dipende quindi dal processamento delle estremità del DSB, infatti l'eliminazione di *mre11*, che è parte del complesso MRX/MRN, dà gli stessi risultati di un ceppo *mec1Δ*.

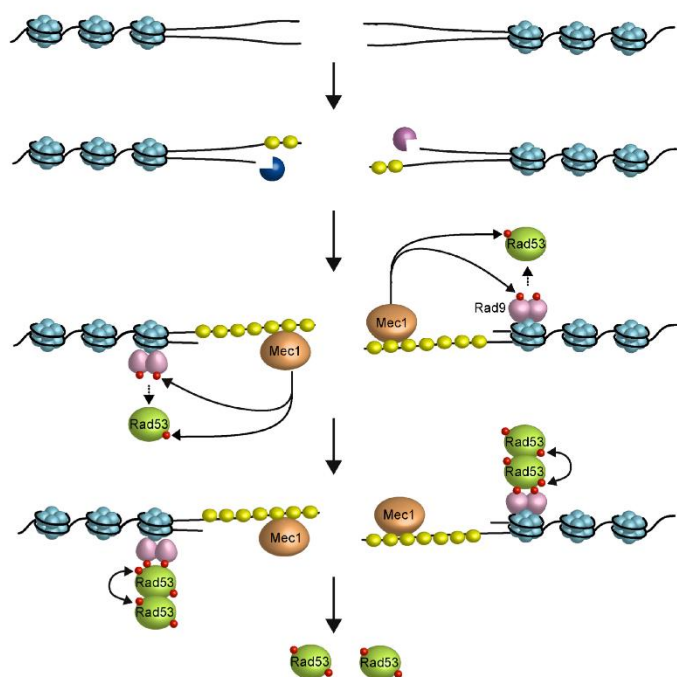


Non esiste solo Mec1/ATR, ma anche la chinasi Tel1/ATM è coinvolta nella riparazione dei DSBs. Nel lievito però la chinasi principale che risponde ai DSBs è Mec1, mentre Tel1 ha un ruolo minoritario.

Nelle cellule di mammifero quando si genera un DSBs si attiva invece ATM, che è il corrispettivo di Tel1.

Questa è una differenza nei meccanismi cellulari tra lievito ed uomo. Questa differenza potrebbe derivare dalle differenze tra le proteine, che nonostante siano ortologhe non sono identiche. Un'altra ragione potrebbe essere che nell'uomo una rottura della doppia elica è riparata principalmente mediante NHEJ, e non la ricombinazione omologa come nel lievito. Nell'uomo il processamento nucleolitico è poco efficiente, ed il ricongiungimento non omologo, NHEJ, che avviene in assenza di resection è il metodo di riparazione favorito dei DSBs.

Checkpoint response to a DNA double-strand break



Nel lievito il DSB viene subito processata e Tel1 non ha il tempo di attivarsi.

Il fatto che il DSB nel lievito viene riconosciuto solo in fase G2 è importante, perché dato che il lievito usa la ricombinazione omologa per riparare il danno, in un ceppo aploide ci deve essere la certezza di avere un templato omologo con cui ricombinare, che si ottiene quando la fase S è completata.

La chiave di questa regolazione è che l'avvio del processo di resection richiede i complessi CDK e delle Cicline B, che sono presenti solo a partire dalla transizione S-G2.