

Dottorato in Biologia Funzionale dei Sistemi Cellulari e Molecolari

XIX Ciclo - Settore scientifico disciplinare BIO/11

**Nuova funzione della DNA topoisomerasi I nella
regolazione della pausa trascrizionale della RNA
polimerasi II in regioni prossimali al promotore
in cellule umane.**

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa FRANCESCA FERRI

Relatore:
Chiar.mo Prof. GIOVANNI CAPRANICO

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. VINCENZO SCARLATO

Indice

Capitolo 1: INTRODUZIONE

1.1. Regolazione dell' espressione genica negli eucarioti	2
1.2. DNA topoisomerasi	3
1.2.1 Principali funzioni delle DNA topoisomerasi nella cellula	6
1.3. DNA topoisomerasi I-B	8
1.3.1 Meccanismo enzimatico della topoisomerasi I-B	9
1.3.2 CPT: un inibitore specifico della topoisomerasi I-B	11
1.3.3 Danni al DNA mediati dalla topoisomerasi I-B e risposte cellulari	14
1.3.4 DNA topoisomerasi I-B ed espressione genica	18
1.4 Elongazione della RNA polimerasi II: ruolo dei siti di pausa trascrizionali	24
1.5 SCOPO DELLA RICERCA DI TESI	30

Capitolo 2: MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari	32
2.2 Preparazione della cromatina.....	33
2.2.1 Valutazione delle dimensioni medie del DNA frammentato.....	37
2.3 Immunoprecipitazione della cromatina.....	38
2.4 PCR quantitativa real-time.....	41
2.5 Saggi di citotossicità	43

2.6	Preparazione degli istoni	44
2.7	Western blot di proteine istoniche	45
2.8	Preparazione degli estratti proteici	48
2.9	Dosaggio degli estratti proteici	49
2.10	Preparazione dei lisati cellulari	49
2.11	Western blot di proteine non istoniche	50
2.12	Saggio di immunofluorescenza	50
2.13	Clonaggi	51

Capitolo 3: RISULTATI

3.1	effetti diversi della camptotecina e della α-amanitina sul legame delle proteine Pol II, TBP e Top1 alla cromatina	68
3.2	effetti diversi della camptotecina e della α-amanitina sulla struttura della cromatina	72
3.3	La riduzione dei livelli di Pol II sui promotori è una risposta immediata e indipendente dalle rotture doppie del DNA in seguito al trattamento con camptotecina	75
3.4	Distribuzione di Pol II lungo i geni trascritti dopo inibizione di Top1.....	79
3.5	L'effetto della camptotecina sul legame di Pol II alla cromatina è soppresso dal DRB, un inibitore dell'elongazione	82

3.6 La camptotecina provoca un aumento della forma iperfosforilata di Pol II, ma non altera la distribuzione nucleare dei foci dell' enzima	84
3.7 L'effetto della camptotecina sul legame di Pol II alla cromatina è specifico per il farmaco: confronto con altri agenti che danneggiano il DNA	88
3.8 Effetto della camptotecina sui livelli di Pol II nelle regioni trascritte in cellule che esprimono basse quantità di top1.....	92
3.9 Valutazione di potenziali partner di top1 nella regolazione dei siti di pausa	95
3.10 Costruzione di un vettore per l' espressione regolabile della DNA topoisomerasi I umana in cellule HCT116	102
3.10.1 Costruzione del plasmide pFFHA T-Rex-DEST30.....	103
3.10.2 Costruzione del plasmide pEZ2T TOP1 SiRNAr	106
3.10.3 Costruzione del vettore di espressione pFFHA T-Rex-DEST30 Top1 SiRNAr	109
 Capitolo 4: DISCUSSIONE	
4.1 L'analisi in vivo degli effetti immediati dell' inibizione di Top1 sui complessi DNA-proteina nelle regioni genomiche trascritte fa ipotizzare un nuovo ruolo di Top1 come regolatore del pausing di Pol II	115
4.2 Le diverse risposte delle linee CS1AN e CS3BE agli inibitori della trascrizione confermano che i fattori CSA e CSB hanno ruoli distinti in fasi diverse della trascrizione e potrebbero indicare un coinvolgimento di CSA nella regolazione dei siti di pausa dei promotori di Pol II	118
4.3 Linee cellulari che esprimono diversi livelli di Top1 potrebbero permettere la valutazione di una eventuale correlazione tra i livelli dell' enzima nella cellula e l' effetto di CPT sul pausing, in termini di frequenza di escape di Pol II	120

4.4 Modello proposto	121
Appendice	125
Bibliografia	129

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 REGOLAZIONE DELL' ESPRESSIONE GENICA NEGLI EUCARIOTI.

Lo sviluppo e la crescita delle cellule eucariotiche sono regolati da segnali extracellulari e intracellulari che convergono sulle attività nucleari modificando il programma di espressione genica. Ormoni e fattori di crescita possono interagire con recettori superficiali o intracellulari e dare inizio a cascate di trasduzione del segnale che si propagano nel citoplasma fino al nucleo, dove influenzano le funzioni fondamentali del DNA, quali la trascrizione, la replicazione e la ricombinazione. I mediatori proteici di queste regolazioni sono generalmente controllati, a loro volta, da ligandi o da modifiche post-traduzionali (per es.: fosforilazione).

La regolazione dell'espressione genica richiede l'azione concertata di una vasta gamma di proteine che legano il DNA e interagiscono con il macchinario trascrizionale promuovendo una repressione o un'attivazione della trascrizione. Nella regolazione genica dei procarioti la trascrizione generalmente viene modulata da una singola proteina che lega il DNA come omodimero. Negli eucarioti l'espressione dei geni è solitamente mediata da complessi multiproteici che legano il DNA in maniera sequenza specifica generando un vasto network di interazioni. La complessità che caratterizza gli eucarioti superiori rispetto ai sistemi procariotici è, inoltre, imputabile alla presenza della cromatina. In generale, oltre ai fattori trascrizionali, l'espressione dei geni negli eucarioti è modulata dalla struttura della cromatina, le cui componenti sono suscettibili a un ampio spettro di modificazioni, e dalla topologia del DNA.

Il cambiamento della struttura cromatinica e, in particolare, il suo rimodellamento locale comporta stress torsionali e, quindi, problemi topologici, che la cellula deve risolvere. E', quindi, verosimile che enzimi che modulano la topologia del DNA, le DNA topoisomerasi, siano coinvolte in questi processi.

Le DNA topoisomerasi sono enzimi di importanza cruciale per il mantenimento dell'integrità genomica e per la regolazione delle strutture topologiche del DNA. Molti aspetti della loro attività nelle cellule sono ancora poco noti, a partire dalle interazioni di questi enzimi con altre proteine nucleari, che potrebbero anche svolgere una funzione di reclutamento delle topoisomerasi sulle regioni genomiche dove è richiesta la loro attività.

1.2 DNA TOPOISOMERASI.

La topologia del DNA può influenzare l'espressione dei geni in diversi modi. Si possono avere cambiamenti nell'avvolgimento dei due filamenti di DNA uno intorno all'altro (ΔT_W) e/o cambiamenti nel superavvolgimento della doppia elica intorno al proprio asse (ΔW_R). Il primo caso comprende alterazioni del twist dell'elica in un DNA di forma B, e/o transizioni locali a strutture secondarie caratterizzate da un T_W diverso da quello della stessa forma del DNA. Il secondo caso implica, invece, delle deformazioni nella struttura terziaria. Tutti questi eventi possono influenzare l'espressione dei geni. Per esempio, i superavvolgimenti negativi destabilizzano la doppia elica del DNA e questo fa diminuire l'energia richiesta per la formazione del complesso aperto delle RNA polimerasi e, quindi, l'attività trascrizionale è favorita. Lo stesso fenomeno può influenzare l'affinità di legame di proteine che si legano in modo specifico al DNA a singolo filamento (1-3).

Qualsiasi alterazione della topologia del DNA necessita della rottura di almeno un filamento dei due, in modo che essi possano poi ruotare uno intorno all'altro o aprire un varco attraverso il quale vi è il trasporto di un DNA. Questi processi molecolari convertono un isomero topologico di DNA in un altro e sono catalizzati dalle DNA topoisomerasi.

Le DNA topoisomerasi sono enzimi ubiquitari essenziali per risolvere i complessi problemi topologici del DNA durante processi fondamentali quali la replicazione, la trascrizione e la riparazione del DNA, e anche

l'assemblaggio nucleosomale e la segregazione cromosomica (4, 5). Tutte le DNA topoisomerasi presentano due caratteristiche fondamentali:

- la prima è la capacità di rompere e, poi, risaldare lo scheletro fosfodiesterico del DNA in due successive reazioni di transesterificazione. Durante lo stadio transiente di rottura del DNA si forma un intermedio covalente DNA–proteina tra il gruppo idrossilico di una tirosina dell'enzima e un gruppo fosfato del DNA nel punto di rottura (Fig. 1). Dal momento che l'energia di legame viene conservata nell'intermedio DNA-proteina, nessun cofattore energetico è necessario per questa attività di rottura e riunione del DNA.

- la seconda caratteristica delle DNA topoisomerasi è che, una volta formatosi l'intermedio DNA–proteina, l'enzima permette alle estremità dei filamenti spezzati di venire separate, aprendo così un passaggio per un altro segmento di DNA a doppio o a singolo filamento. Questo passaggio di un segmento di DNA attraverso la rottura di un altro segmento provoca un cambiamento topologico del DNA, come ad esempio una variazione del numero di legame (Fig. 2A), oppure la decatenazione di due anelli di DNA catenati (Fig. 2B).

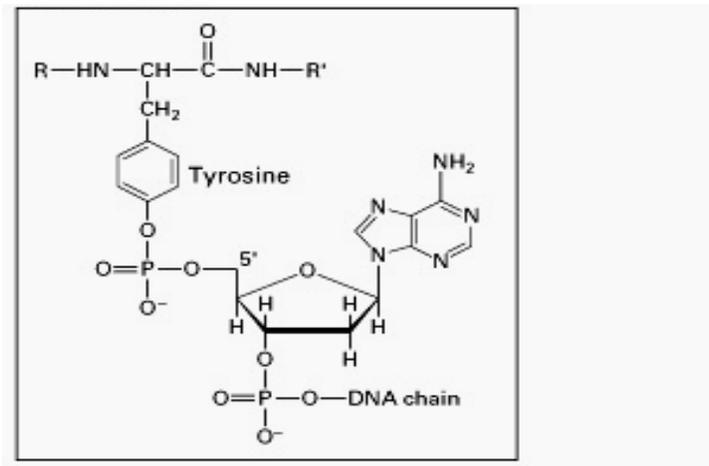


Figura 1. Intermedio covalente del ciclo catalitico della DNA topoisomerasi I-A. Il gruppo idrossilico della tirosina catalitica è legata covalentemente con il gruppo fosfato in 5' del DNA nel punto di rottura.

Dalla scoperta della prima DNA topoisomerasi I in *E. coli* nel 1971 (6, 7), questi enzimi sono stati trovati in tutte le cellule eucariote e procariote, in numerosi fagi e virus. Sulla base della capacità di tagliare un singolo o un doppio filamento di DNA, questi enzimi sono classificati in DNA topoisomerasi di tipo I e II, rispettivamente. Sulla base di proprietà enzimatiche comuni (8), di omologia di sequenza primaria e strutturale, le DNA topoisomerasi sono ulteriormente raggruppate in quattro sotto-famiglie evolutivamente correlate: DNA topoisomerasi di tipo I-A, I-B, II-A e II-B (Tabella 1).

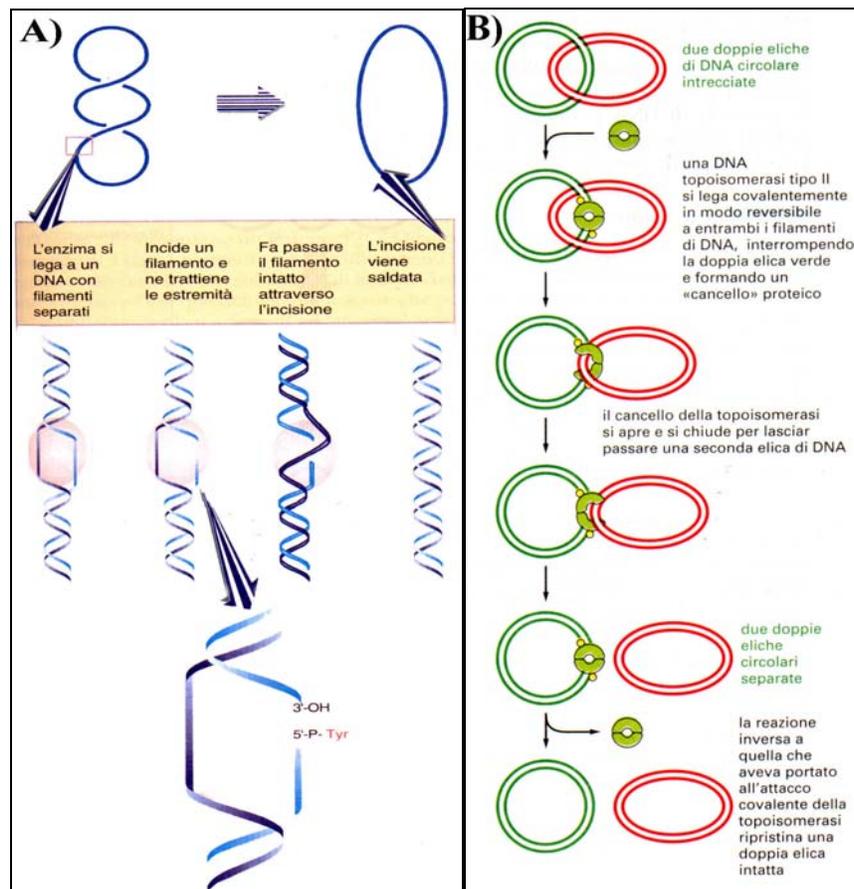


Figura 2. Meccanismo d'azione delle DNA topoisomerasi I-A e II-A. A) Meccanismo di rilassamento della topoisomerasi I A. B) Meccanismo di decatenazione della DNA topoisomerasi II. (Figure da Lewin B., 1999 e da Alberts B., 1998).

Tabella 1. Classificazione delle DNA-topoisomerasi di tipo I e II.

TIPO IA	TIPO IB	TIPO IIA	TIPO IIB	ORGANISMO	GENE
Top I				<i>E. coli</i>	Top A
Top III					Top C
		DNA girasi			GyrA/GyrB
		Top IV			ParC/ParE
Top III				<i>S. cerevisiae</i>	TOP III
	Top I				TOP 1
		Top II			TOP 2
Girasi inversa				Archibatteri	
	Top V		Top VI		
Top III α				Mammiferi	TOP 3 α
Top III β					TOP 3 β
	Top I Top I mit				TOP 1 TOP 1m
		Top II α			TOP 2 α
		Top II β			TOP 2 β

1.2.1 Principali funzioni delle DNA topoisomerasi nella cellula.

Una delle principali funzioni delle topoisomerasi è quella di prevenire un eccesso di superavvolgimenti, sia positivi che negativi, nel DNA nella cellula. I superavvolgimenti che richiedono l'intervento delle topoisomerasi sono generati soprattutto dai numerosi processi che implicano il movimento di grossi complessi macromolecolari lungo il DNA (Fig.5a):

la replicazione - durante la replicazione semiconservativa superavvolgimenti positivi si generano davanti alla forca replicativa, mentre i filamenti parentali vengono separati dietro. In lievito la topoisomerasi I (Top1) è la principale responsabile del controllo del superavvolgimento durante questi eventi;

la trascrizione - la trascrizione può generare superavvolgimenti positivi del DNA davanti alla polimerasi e negativi dietro; le

topoisomerasi rilassano i superavvolgimenti negativi portando ad un accumulo di quelli positivi.

Per controllare il grado di superavvolgimento del DNA le topoisomerasi possono agire in modo diverso: le topoisomerasi I e II eucariotiche e la topoisomerasi IV batterica possono rimuovere efficientemente superavvolgimenti sia positivi che negativi; le topoisomerasi I e III batteriche e la topoisomerasi III eucariotica possono rimuovere i superavvolgimenti negativi, ma non quelli positivi, a meno che non sia presente una regione di DNA a singolo filamento; la girasi batterica e la girasi inversa sono uniche nella loro capacità di convertire i superavvolgimenti positivi in negativi.

Inoltre, l'attività delle topoisomerasi è necessaria per il verificarsi di altri eventi, quali:

segregazione dei cromosomi e condensazione/decondensazione cromosomica - studi condotti in vari sistemi (lieviti, *Drosophila*) hanno dimostrato il coinvolgimento della topoisomerasi II anche in tutti questi eventi;

l'organizzazione della cromatina - la topoisomerasi II è stata identificata come la principale componente dello "scaffold"/matrice nucleare (9), quindi, in questo caso avrebbe un ruolo piuttosto strutturale;

il mantenimento della stabilità genomica.

1.3 DNA TOPOISOMERASI I-B.

La DNA topoisomerasi I-B (Top1) è un enzima che funziona con un meccanismo ATP-indipendente e apparentemente come monomero. Il dominio centrale (core domain) e il dominio C-terminale, comprendente la tirosina catalitica 723, sono altamente conservati. A differenza della topoisomerasi I-A, la topoisomerasi I-B si lega preferenzialmente al DNA a doppio filamento e taglia uno dei due filamenti della doppia elica formando un intermedio tra un residuo tirosinico (Y723, nell'enzima umano) e il gruppo fosfato in 3' del filamento rotto di DNA. Il prototipo di questa famiglia è la DNA topoisomerasi I trovata in tutte le cellule eucariote, e i membri di tale famiglia sono monomeri di peso variabile tra 95 e 135 kDa. Per la DNA topoisomerasi I umana è stata risolta la struttura cristallografica (10) fornendo importanti informazioni sulla struttura tridimensionale della proteina (Fig. 3). La topoisomerasi I-B era in complessi con un oligonucleotide di 22 bp, nei quali l'enzima è sia covalentemente che non covalentemente legato al DNA. Questo studio ha mostrato che l'enzima forma un anello avvolgendo un DNA essenzialmente in conformazione B. La topoisomerasi I umana è di 765 residui e strutturalmente presenta 4 domini (Fig. 3): il dominio N-terminale (non presente nel cristallo e in Fig. 4); il dominio centrale; un dominio "linker" (le due alfa eliche che formano un dominio coiled-coil che protrude dall'anello proteico) e il dominio C-terminale.

Di questi sono fondamentali per l'attività catalitica il dominio core e quello C-terminale, mentre gli altri due non sono indispensabili (11). Il dominio NH₂-terminale, composto da ~200 residui, notevolmente carico e ricco di residui idrofobici disorganizzati, ha la funzione di localizzare l'enzima nel nucleo, avendo almeno quattro motivi di localizzazione nucleare. Lo stesso dominio pare anche implicato nella localizzazione nucleolare, attraverso interazioni con proteine specifiche del nucleolo (12, 13).

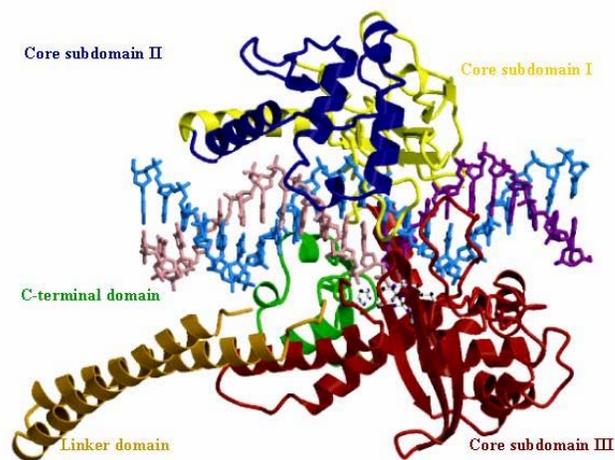


Figura 3. Struttura 3-D della Top1 umana.

1.3.1 Meccanismo enzimatico della topoisomerasi I-B.

L'ipotesi avanzata per il meccanismo di catalisi operato dalla topoisomerasi I eucariotica sulla base degli studi cristallografici è nota come modello della “**rotazione controllata**” del DNA (Fig. 4).

Il modello predice che il terminale 5' del filamento tagliato ruoti intorno al filamento non tagliato, in modo non completamente libero, ma, per così dire, frenato dall'interazione con la proteina stessa. In effetti, è possibile che il DNA interagisca mediante legami ionici con residui amminoacidici delle eliche 5 e 6 del dominio core e delle due lunghe α -eliche del “linker”. Quindi, l'enzima prima si lega al DNA in una conformazione in cui l'anello costituito dal dominio centrale è aperto. Il legame al DNA è guidato in larga parte dalla complementarità di cariche e culmina nella chiusura della topoisomerasi intorno all'acido nucleico, in modo tale che i sottodomini I e III si tocchino.

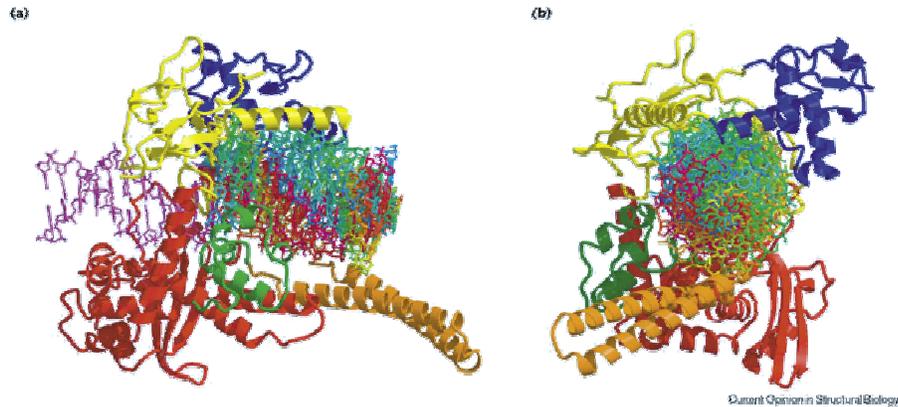
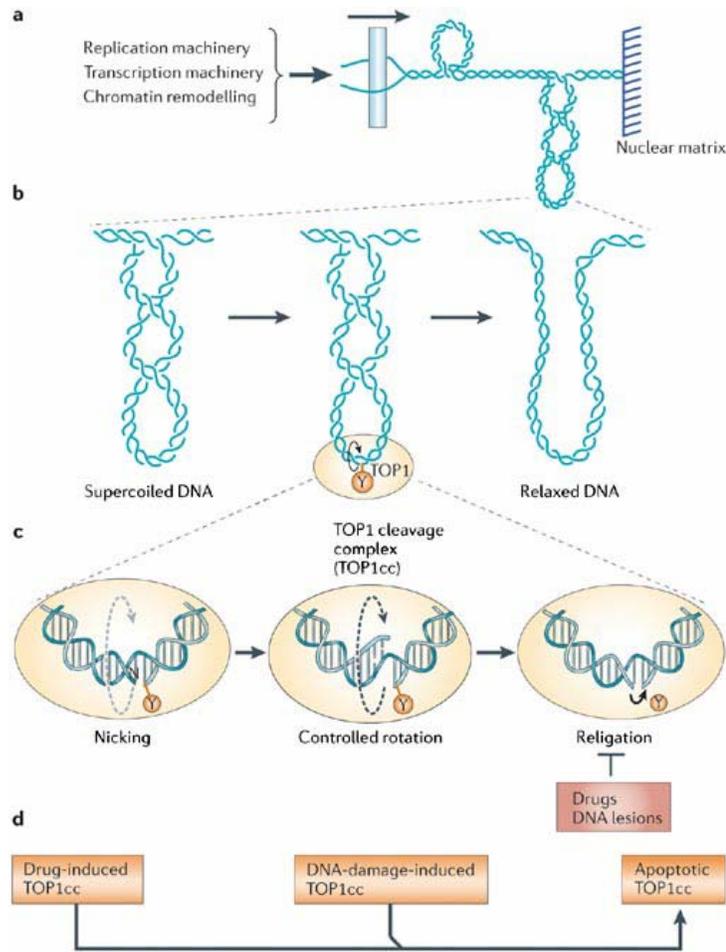


Figura 4. Svolgimento del superavvolgimento. Visione laterale (a) e frontale (b) del complesso DNA topoisomerasi I-B. (Figura da J J. Champoux . Dna topoisomerase: Structure, Function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369–413, 2001).

Successivamente, amminoacidi del sito attivo si trovano in posizione tale da permettere l'attacco della Tyr 723 ad un legame fosfodiesterico del DNA. Una volta che l'intermedio covalente (noto come Top1 'cleavage complex', Top1cc) si è formato, il rilassamento della superelica può avvenire attraverso uno o più cicli di "rotazione controllata" del filamento spezzato intorno a quello intatto. La rotazione è presumibilmente guidata dalla tensione torsionale interna al DNA. Successivamente, il filamento spezzato è rilegato con il concomitante rilascio del DNA da parte della Tyr 723. La reazione di rilegazione esige che il gruppo 5'-idrossile all'estremità del DNA sia allineato con il legame fosfotirosinico Top1-Tyr – DNA (Fig. 5c). In condizioni normali, i Top1ccs sono transienti e non rilevabili, perché la rilegazione è più favorita del taglio. Tuttavia, i Top1ccs possono accumularsi nei casi in cui Top1 resta intrappolata da alterazioni endogene del DNA (siti abasici, mismatches, addotti, nicks) (14-16) o da alterazioni della cromatina indotte dall'apoptosi (17, 18) (Fig. 5d). Comunque, in condizioni normali, al termine del ciclo catalitico, una molecola di DNA è stata rilassata, in altri termini il numero di superavvolgimenti è stato ridotto. Il DNA, eventualmente, può rilegarsi all'enzima per subire un ulteriore ciclo catalitico.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figura 5. Rilassamento dei superavvolgimenti del DNA generati da replicazione, trascrizione e rimodellamento della cromatina (a, b) per mezzo dei complessi di taglio mediati da Top1, TOP1ccs (c), e intrappolamento dei TOP1ccs da parte di farmaci, modificazioni del DNA e durante l'apoptosi (d). (Figura da y. Pommier. Topoisomerasi I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature. Rev./ Cancer.*, 6: 789–802, 2006).

1.3.2 CPT: un inibitore specifico della topoisomerasi I-B.

Oltre che nelle numerose attività cellulari, le DNA topoisomerasi eucariotiche rivestono una particolare importanza nella terapia farmacologia antitumorale, mentre le DNA girasi e la topoisomerasi IV procariotiche sono i principali bersagli di importanti farmaci antibatterici,

quali i chinoloni (19, 20). Numerosi veleni o inibitori delle DNA topoisomerasi, usati come farmaci, sono composti naturali, prodotti da piante o da microrganismi. Questi composti sono spesso altamente tossici per altri microrganismi, suggerendo che la loro funzione sia in relazione all'autodifesa della specie produttrice. Il fenomeno dell'avvelenamento delle DNA topoisomerasi si è, dunque, conservato nel corso dell'evoluzione, probabilmente perché è un efficace meccanismo di citotossicità.

Tra gli inibitori della Top1, la camptotecina (CPT) e analoghi, usati prevalentemente nella cura dei tumori solidi, sono inibitori specifici di questo enzima. La CPT, scoperta circa 30 anni fa, è un alcaloide estratto dall'albero *Camptotheca acuminata*, mentre l'identificazione di questa molecola come antitumorale è molto più recente. La camptotecina è un inibitore non-competitivo della Top 1, che agisce intercalandosi nel complesso covalente Top 1-DNA in modo reversibile. In particolare, CPT 'intrappola' i Top1ccs in cui le basi fiancheggianti il DNA rotto sono una timida in posizione -1 e una guanina in +1. La CPT lega molto debolmente il DNA da solo, mentre non lega la sola Top1 (21). Analisi cristallografiche col topotecano e, più recentemente, con altri alcaloidi inibitori di Top1, hanno rivelato che sempre i farmaci legano simultaneamente il DNA mediante interazioni idrofobiche e Top1 attraverso un network di legami idrogeno (22-24). Le stesse analisi hanno rivelato sorprendentemente che i residui di Top1 coinvolti in tali interazioni idrofobiche sono gli stessi precedentemente identificati come mutazioni puntiformi nelle cellule resistenti alla CPT (25). Dunque, la resistenza sarebbe dovuta a un indebolimento, ma non all'abolizione, del legame del farmaco al Top1cc. Tuttavia, ciò interferisce col meccanismo d'azione della CPT e dei suoi derivati, che si esplica stabilizzando i Top1ccs in un complesso ternario e prevenendo la ricucitura del filamento di DNA rotto (Fig. 6).

La CPT presenta una struttura planare aromatica a 5 anelli, con un α -idrossilattone in E che viene rapidamente convertito in un carbossilato inattivo contro Top1. Numerosi studi di struttura-attività hanno stabilito

le relazioni esistenti tra abilità di stabilizzare il complesso Top1-DNA e la loro capacità di uccidere le cellule cancerose. Le camptotecine sono uniche dal punto di vista farmacologico per diverse ragioni: 1) Top1 è il loro unico bersaglio, come dimostra sia l'osservazione che cellule di lievito in cui è stato rimosso l'unico gene (TOP1) codificante per la Top1 sono completamente resistenti all'azione della CPT (26), sia l'esistenza di singole mutazioni puntiformi in Top1 in linee cellulari di vertebrati selezionate per la resistenza alla CPT (25) ; 2) solo l'enantiomero 20-S-CPT, l'alcaloide esistente in natura, è attivo; 3) le camptotecine penetrano nelle cellule dei vertebrati rapidamente e bersagliano Top1 dopo pochi minuti di esposizione; tuttavia, l'affinità di CPT per Top1cc è bassa e sono necessarie concentrazioni nell'ordine del micromolare di farmaco nei test biochimici per rilevare i complessi ternari. Si può concludere, dunque, che la CPT sia stata selezionata in natura sulla base della sua selettività, piuttosto che della potenza. Per tutte le ragioni elencate, la CPT è anche utilizzata spesso per gli studi sui danni al DNA dipendenti da replicazione e trascrizione e sui fattori genetici coinvolti nella regolazione del checkpoint e nel riparo del DNA in risposta ai danni mediati da Top1.

Una peculiarità di tutti gli inibitori delle DNA topoisomerasi è che la loro azione è sequenza specifica (20, 27). Esperimenti *in vitro* con le topoisomerasi purificate evidenziano in modo particolarmente chiaro come farmaci appartenenti a classi chimiche diverse in genere stimolino le rotture del DNA in siti differenti, risultando in patterns di intensità di rotture farmaco-specifico (20). Nella cromatina nucleare la situazione è, però, più complessa, in quanto l'accessibilità del DNA alla topoisomerasi è fortemente limitata dalla presenza di altre proteine e, soprattutto, dei nucleosomi e dell'istone H1 (20, 28). Quindi, nella cromatina di cellule in coltura la localizzazione delle rotture del DNA prodotte dall'enzima e stimulate dai farmaci è determinata da più fattori, inclusi il farmaco stesso e la struttura locale della cromatina.

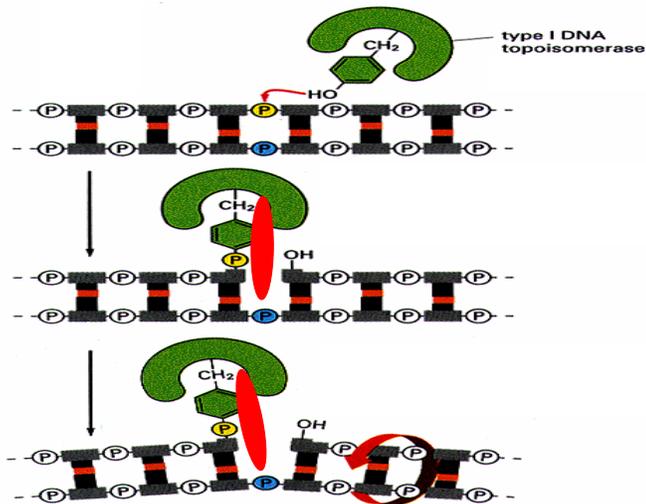


Figura 6. Meccanismo d'azione della CPT. La CPT stabilizza il complesso covalente Top1-DNA.

1.3.3 Danni al DNA mediati dalla topoisomerasi I-B e risposte cellulari.

Poiché gli inibitori di Top1 si legano reversibilmente ai Top1ccs, e Top1 rilega il DNA tagliato dopo l'allontanamento del farmaco, non sono gli inibitori di Top1 a danneggiare direttamente il DNA, ma è l'enzima stesso congiuntamente ai processi di replicazione e trascrizione. Infatti, gli inibitori di Top1 sono detti 'veleni'. Molti geni hanno un ruolo cruciale nelle risposte cellulari ai danni al DNA mediati da Top1 (ATM, ATR, H2AX, p53, TDP1, CSA, CSB, PARP 1-2 ...) e gli stessi possono essere mutati nei tumori; ciò spiegherebbe, almeno in parte, la maggiore sensibilità delle cellule tumorali agli inibitori di Top1 rispetto alle cellule normali.

E' noto che la camptotecina uccide selettivamente le cellule in fase S (29). Quest'azione si ottiene attraverso un meccanismo che prevede la collisione tra forza replicativa, che avanza lungo il DNA, e complesso

ternario bloccato sullo stesso filamento. Lo scontro si risolve nella creazione di una rottura a doppio filamento, nell'arresto della forca replicativa e nella formazione di un complesso covalente Top 1-DNA irreversibile; inoltre, l'effetto della collisione si ripercuote sulla vitalità stessa della cellula, che può morire o subire un arresto del ciclo in fase G2. In effetti, la collisione con la forca replicativa è il principale meccanismo citotossico degli inibitori di Top1 in cellule in proliferazione (Fig.7a). A conferma di ciò, è stato osservato che le cellule tumorali tendono ad essere resistenti se sono fuori dalla fase S (30, 31), o se la replicazione viene bloccata al momento del trattamento con CPT (32, 33). La natura del danno mediato dalla replicazione è stata studiata nelle cellule di mammifero a livello del cluster dei geni ribosomali. I Top1ccs sono convertiti in doppie rotture (DSB) da un 'replication run-off', quando l'ultimo nucleotide al 5' del DNA tagliato sul filamento guida viene replicato (34).

La comparsa dei DSB induce molteplici risposte molecolari ben caratterizzate. A livello della cromatina, la variante istonica H2AX, che rappresenta il 10-20% dell'istone H2A (35), viene fosforilata entro pochi minuti (36). La forma fosforilata γ -H2AX è un marcatore molto sensibile della presenza di DSB prodotti da agenti che danneggiano il DNA, ma anche dalla instabilità genomica (37) e dall'apoptosi (38). L'inattivazione genetica di H2AX sensibilizza le cellule, sia di lievito che di mammifero, alla CPT (36, 39). Altre proteine la cui fosforilazione è indotta dai DSB, in seguito al trattamento con CPT sono: RPA2 (replication protein A2), ATM (ataxia telangectasia mutated), CHK2 (checkpoint kinase 2), CHK1 (checkpoint kinase 1), BLM, la elicasi mutata nella Bloom syndrome, e p53. In sintesi, si attiva una risposta pleiotropica coinvolgente molti sensori ed effettori dei DSB: DNAPK (DNA-dependent protein kinase) fosforila RPA2 e H2AX insieme ad ATM (37, 40); si attiva anche l'asse ATM-CHK2-p53 (41, 42); ATR attiva CHK2.

Studi effettuati ormai più di trent'anni fa hanno dimostrato che la CPT, oltre a bloccare la sintesi del DNA, inibisce anche quella dell'RNA

(43). Più recentemente, è stato osservato un rapido arresto della trascrizione dopo esposizione delle cellule al farmaco (44), e una redistribuzione del complesso di elongazione (TEC) lungo il gene (45). Questo suggerisce che il composto inibisce specificamente la fase di elongazione. Il meccanismo molecolare che sta alla base di tale fenomeno, individuato grazie ad esperimenti *in vitro*, postula la formazione di un complesso ternario covalente sul filamento stampo dell'RNA polimerasi, che costituisce un blocco all'avanzamento dell'enzima e, quindi, alla trascrizione stessa (46). La collisione tra TEC e complesso ternario reversibile genererebbe un danno a singolo filamento irreversibile (47). L'azione molecolare della CPT, quindi, risulta nell'aumento delle rotture del DNA nelle cellule esposte al composto. In generale, il complesso covalente della Top 1 può essere visto come una forma di stress per la cellula che, eventualmente, viene convertito da alcuni processi cellulari in un danno al DNA irreversibile (9). Comunque, in cellule tumorali altamente proliferanti la trascrizione sembra contribuire molto meno della replicazione all'attività antitumorale della CPT, e solo a concentrazioni alte ($>1\mu\text{M}$) la citotossicità della CPT diventa indipendente dalla replicazione (31, 32). D'altra parte, le lesioni al DNA dipendenti dalla trascrizione associate con i top1ccs possono indurre l'apoptosi in cellule post-mitotiche, come i neuroni (48). Le risposte cellulari ai danni al DNA dipendenti dalla trascrizione sono ancora poco caratterizzate. L'ipersensibilità delle cellule CS (Cockayne syndrome), deficienti nel sistema di riparazione TCR (transcription-coupled repair), indica una possibile connessione con la riparazione dei danni al DNA associati alla trascrizione.

Inoltre, la collisione tra il complesso ternario e il macchinario trascrizionale può indurre la degradazione proteasomica sia di Top1 che di RNAPII (49), sebbene ciò necessiti di una esposizione ad alte dosi di CPT e per tempi prolungati. Poiché le cellule tumorali spesso difettano in questa risposta, è stato ipotizzato che si tratti di un meccanismo di adattamento alla CPT nelle cellule non trasformate, per cui queste degradano Top1, se esposte al farmaco (50).

Un'altra conseguenza dei Top1ccs bloccati dalla CPT durante la trascrizione potrebbe essere l'accumulo di superavvolgimenti negativi a valle del punto in cui la trascrizione si arresta, che potrebbe favorire la formazione di strutture R-loop (ibridi DNA:RNA), note come citotossiche e mutageniche (Fig.7b).

E' stato anche riportato che la CPT blocca l'attività SR-chinasi di Top1. In questo caso, si produrrebbe un'alterazione della regolazione dello splicing, poiché il processamento di alcuni pre-mRNA risulta alterato (Fig.7b) (51). Una delle cause potrebbe essere l'inattività della SR-proteina ASF, che favorirebbe la formazione degli R-loops (52). Comunque, sono necessari ulteriori studi per capire meglio gli effetti dei Top1ccs sulla trascrizione, in generale.

Infine, per quanto riguarda la riparazione dei complessi covalenti irreversibili di Top1, possiamo sinteticamente elencare tre principali pathway: 1) il pathway di escissione della tyrosil-DNA-phosphodiesterase, che coinvolge anche XRCC1 e il complesso BER (base excision repair); pare che sia il pathway coinvolto nei danni al DNA associati alla trascrizione (53, 54); 2) il pathway delle endonucleasi centrato su MRE11, MUS81 e RAD1 e sulla ricombinazione omologa; questo pathway è associato soprattutto ai danni dovuti alla replicazione; 3) il pathway della regressione della forca, che dipende dal complesso della elicasi BLM con TOP3 α (14).

L'apparente ridondanza di questi sistemi di riparazione è coerente con la presenza e l'importanza dei Top1ccs in condizioni fisiologiche (14, 15).

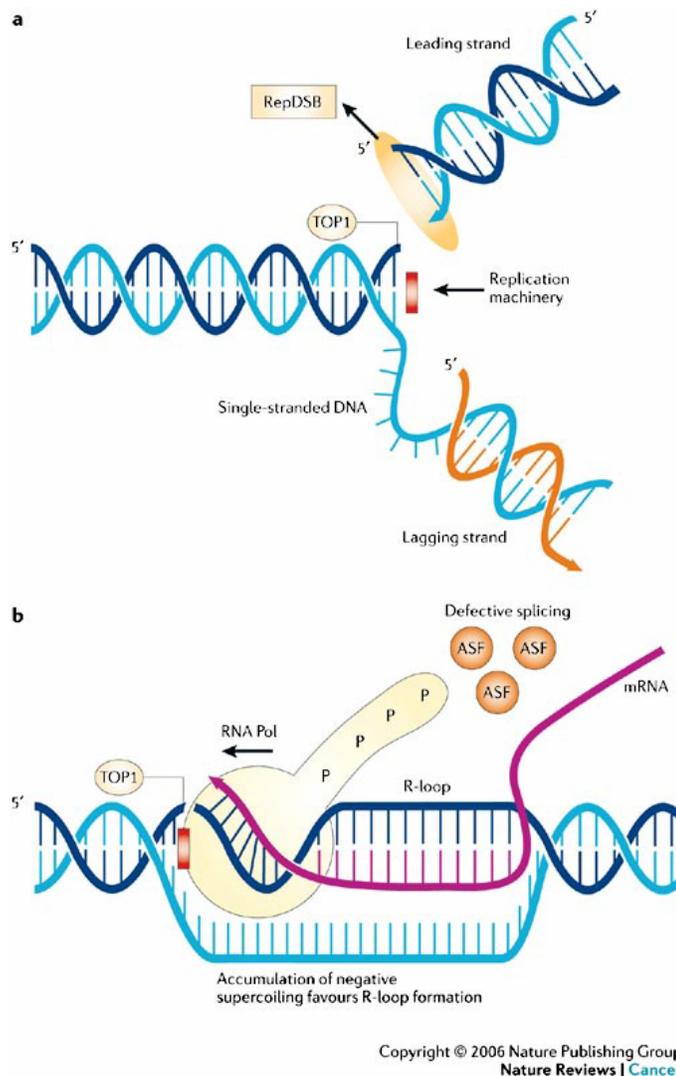


Figura 7. Conversione dei complessi di taglio di Top1 in danni al DNA a causa della collisione con una forca di replicazione (a) o con l'apparato trascrizionale. (Figura da y. Pommier. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature. Rev./ Cancer.*, 6: 789–802, 2006).

1.3.4 DNA topoisomerasi I-B ed espressione genica.

Il coinvolgimento della DNA topoisomerasi IB nell'espressione genica è testimoniato da diversi studi (55); per esempio, 1) dalla localizzazione dell'enzima in regioni genomiche attivamente trascritte: sembra che la corretta localizzazione sia guidata dal dominio N-terminale di Top1 (12, 56) e che questa avvenga, in cellule umane, grazie

all'interazione con l'antigene T di SV40, la nucleolina, p53 e altre proteine (57, 58); 2) dall'influenza della CPT sull'espressione di molti geni; a tal proposito, la diversità degli effetti osservati nelle analisi di microarray (59) relativamente a specifici geni supporta l'idea che Top1 possa avere molteplici ruoli nella trascrizione. E' stato osservato che CPT induce l'espressione di molti geni, come *JUN* (60), e l'inizio della trascrizione di altri, come *DHFR* (60); mentre provoca l'inattivazione del promotore in certi geni, quali *EGFR* (61), e l'inibizione della traduzione di altri, come HIF1 α (62); 3) da studi effettuati con mutanti di lievito per Top1, dai quali è nata l'ipotesi che Top1 abbia un ruolo importante nella repressione generale della trascrizione durante la fase stazionaria della crescita (63).

Le principali funzioni di Top1 nella trascrizione dei geni individuate e maggiormente studiate attualmente sono: a) il rilassamento dei superavvolgimenti nelle regioni trascritte durante l'elongazione; b) il ruolo nelle fasi iniziali a livello dei promotori; c) la regolazione della struttura della cromatina; d) il coinvolgimento nello splicing.

a) Ogni evento nucleare che generi un'onda di denaturazione della doppia elica può causare stress torsionali a monte e a valle dell'onda stessa. La trascrizione di un gene è uno di questi eventi. Quando il complesso multiproteico della RNA polimerasi non può ruotare intorno al DNA stampo e i filamenti di DNA non sono liberi di ruotare uno intorno all'altro, la trascrizione genera superavvolgimenti positivi e negativi davanti e dietro alla RNA polimerasi che trascrive. Ne risultano, quindi, due domini topologici distinti ed opposti nel DNA stampo. Questo modello è noto come “**twin-supercoiled domain**” (13, 64-66) (Fig. 8).

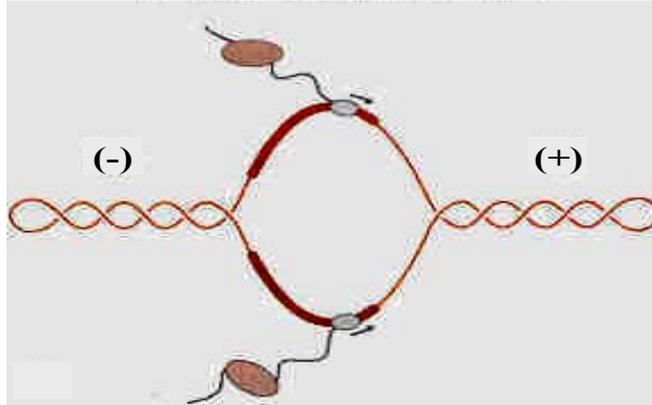


Figura 8. Twin-domain model. Variazioni topologiche indotte durante i processi di trascrizione. Il superavvolgimento trascrizionale, positivo davanti e negativo dietro alla polimerasi, si genera quando si verificano due condizioni: la prima è che ci sia impedimento nella rotazione del complesso trascrizionale attorno al DNA stampo e l'altra è che vi sia una barriera alla rotazione libera dei due filamenti di DNA.

Il modello dei due domini topologici prevede che lo stress torsionale, oltre una certa soglia, possa impedire l'ulteriore avanzamento della RNA polimerasi e, quindi, la ulteriore sintesi del trascritto, soprattutto quando il tasso di trascrizione è alto (67). Inoltre, molti esperimenti indicano che l'estensione del cambiamento della topologia del DNA è proporzionale alla lunghezza della regione trascritta (68). E', quindi, facile prevedere che una delle principali attività di Top1 sia di rilassare i superavvolgimenti prodotti dalla trascrizione. In particolare, studi condotti su cellule di lievito in cui contemporaneamente gli enzimi Top1 e Top2 erano inattivati, mentre era espressa la topoisomerasi di *E.coli*, che rilassa preferenzialmente i superavvolgimenti negativi, hanno chiaramente dimostrato che l'accumulo di superavvolgimenti positivi causa l'inibizione della trascrizione (69). Ancor maggiore importanza assume la funzione di rilassamento degli stress topologici indotti dalla trascrizione da parte di Top1, se si considera che cambiamenti localizzati del superavvolgimento del DNA possono essere sfruttati per la

regolazione di altri processi nucleari (70). Per esempio, è stato dimostrato con esperimenti *in vitro* che la ricombinazione del DNA potrebbe essere accoppiata alla trascrizione attraverso cambiamenti topologici del DNA stampo (71).

b) Top1 è stata implicata anche nella fase di inizio della trascrizione. Uno dei primi ruoli ipotizzati è stato quello per cui Top1 favorirebbe la formazione di un complesso attivo TFIID-TFIIA sul promotore (72-74). In particolare, studi condotti *in vitro* sui fattori necessari per attivare la trascrizione mediata dalla RNA polimerasi II (Pol II) dimostrarono che Top1 attiva la trascrizione in presenza di un attivatore, mentre la reprime in sua assenza, in un promotore contenente la TATA box (Fig. 9). L'enzima può associarsi ad un promotore contenente la TATA box solo in seguito al legame di TFIIA e TFIID. Un mutante senza la Tyr catalitica è in grado di influenzare la trascrizione come l'enzima wild-type, mostrando, quindi, che l'attività rilassante non è richiesta per questa funzione. Il meccanismo ipotizzato alla luce di questi studi è che Top1 possa essere caricata nel complesso di trascrizione grazie alle interazioni col complesso TFIID; in assenza dell'attivatore tale interazione si traduce nella repressione della trascrizione, ma, se c'è l'attivatore, allora Top1 viene traslocata al complesso di elongazione. Ciò permetterebbe di aumentare l'efficienza della sintesi dell' RNA, perché si avrebbe la rimozione delle tensioni torsionali da parte di Top1, in modo concertato con l'avanzamento della RNA polimerasi. Comunque, è da sottolineare che i superavvolgimenti negativi potrebbero favorire l'inizio della trascrizione e il legame funzionale di TFIID anche a livello dei promotori eucariotici (2, 3); Top1, almeno in alcuni casi, potrebbe modulare questi processi.

In ogni modo, sono necessari altri studi per stabilire il meccanismo e la specificità dell'influenza di Top1 sull'inizio della trascrizione in cellule umane. Studi recenti suggeriscono che un bersaglio per la Top1 nel complesso d'inizio potrebbe essere la stessa RNA polimerasi II. In effetti, è stato osservato che Top1 è una delle numerose proteine che interagiscono con la phospho-CTD (hyperphosphorylated C-terminal

repeat domain) della Pol II, ma non con la forma ipofosforilata (CTD) dello stesso enzima (75).

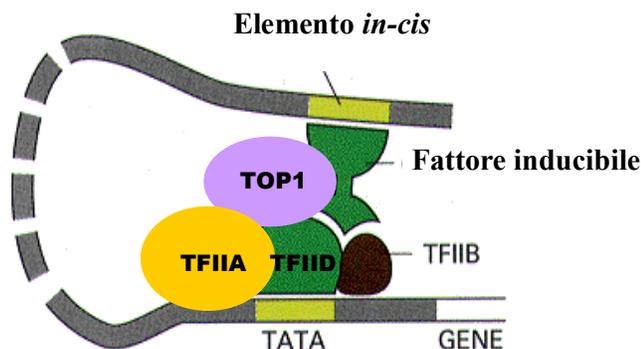


Figura 9. Topoisomerasi I-B e assemblaggio del complesso d'inizio sul promotore. Interazione della topoisomerasi I con le proteine del complesso trascrizionale.

c) La Topoisomerasi I-B potrebbe anche essere coinvolta nella traslocazione della polimerasi lungo un DNA nucleosomale (76). Infatti, i nucleosomi possono reprimere fortemente la trascrizione, e negli ultimi anni è stato mostrato che molti fattori di trascrizione agiscono come attivatori modulando l'assemblaggio e il posizionamento dei nucleosomi (77). In principio, i superavvolgimenti positivi che si accumulano davanti alla polimerasi elongante potrebbero compensare quelli negativi associati ai nucleosomi, inducendo una decondensazione della cromatina favorevole al passaggio dell'enzima. Studi effettuati sui minicromosomi di lievito (78) hanno evidenziato che i superavvolgimenti positivi potrebbero fornire un meccanismo in grado di generare, ma non di mantenere, una conformazione della cromatina favorevole alla elongazione (78). Tale ipotesi ha trovato ulteriore conferma da studi *in vitro* sul ruolo di Top1 e Top2, dai quali è risultato che sia l'uno che l'altro enzima sono necessari per una efficiente trascrizione, quando lo stampo è la cromatina, ma non se si tratta di DNA nudo (79, 80). In particolare, il fatto che, in assenza delle topoisomerasi, la trascrizione sulla cromatina risulti repressa solo per trascritti di lunghezza superiore

alle 200 bp, indica chiaramente che l'accumulo di superavvolgimenti positivi frena la traslocazione della polimerasi lungo la cromatina (80). Il coinvolgimento di Top1 nell'organizzazione della struttura della cromatina e dei nucleosomi è stato indagato anche attraverso esperimenti *in vivo* su cellule di lievito e di mammifero. In questi studi veniva saggiata la topologia del DNA e la struttura della cromatina in seguito a trattamenti con la CPT (81). Il risultato osservato era un aumento del linking number dei plasmidi recuperati, immediato e Top1-dipendente, che può essere attribuito alla presenza delle rotture indotte dalla CPT o, data l'immediatezza della risposta, all'inibizione dell'attività catalitica di Top1. Tutte queste osservazioni lasciano ipotizzare che una delle principali funzioni di Top1 sia di facilitare il processo di assemblaggio/disassemblaggio dei nucleosomi, regolando le tensioni torsionali che si generano durante il processo stesso. Ulteriori studi sono necessari per capire se Top1 sia anche coinvolta nella regolazione delle modificazioni enzimatiche degli istoni da parte di quegli enzimi associati alla polimerasi, sia sul promotore che durante l'elongazione (77).

d) Per la DNA topoisomerasi I-B è stato anche proposto un ruolo nei processi di maturazione dell' mRNA (51), anche attraverso l'interazione con i fattori dello splicing della famiglia SR, compreso il fattore ASF/SF2 (82), che inibirebbe l'attività rilassante di Top1 (83). L'interazione col fattore PSF (pyrimidine tract binding protein-associated splicing factor), invece, pare determini un marcato aumento della attività dell'enzima (84). Sorprende che da recenti analisi di proteomica dei complessi proteici di Top1 sia emerso che 10 delle 36 proteine identificate come partners di Top1 siano coinvolte nello splicing dell'RNA (85). In ultimo, è stato riportato che il trattamento di cellule di mammifero con i 'veleni' di Top1 influenzi lo splicing alternativo di alcuni geni (86, 87), anche se resta da valutare la specificità di tali farmaci, in quanto sembra che anche i 'veleni' di Top2 possano influenzare le reazioni di maturazione dei trascritti. Comunque, le funzioni delle topoisomerasi nelle reazioni di splicing restano ancora da chiarire.

1.4 ELONGAZIONE DELLA RNA POLIMERASI II: RUOLO DEI SITI DI PAUSA TRASCRIZIONALI.

L'espressione genica è un processo altamente sofisticato ed è fino ad oggi una delle aree di ricerca più intensamente studiate ed indagate. Sebbene siano molti i processi cellulari in grado di controllare l'espressione di un gene, la regolazione più immediata ed importante si verifica durante la trascrizione e viene diretta dalla RNA polimerasi II. All'inizio la maggior parte degli studi miravano a chiarire i meccanismi molecolari degli stadi più precoci della trascrizione come le fasi di pre-inizio (formazione del complesso d'inizio della trascrizione) e d'inizio che rappresentano le reazioni limitanti alla biosintesi del messaggero. Oggi risulta chiaro che anche la fase d'elongazione gioca un ruolo cruciale nel ciclo di trascrizione e che sia un processo dinamico ed altamente regolato, capace di coordinare gli eventi ad esso successivi. E' importante ricordare che i processi connessi alla maturazione del messaggero sono modulati attraverso interazioni con il complesso d'elongazione (TEC), mediante l'intervento di distinti fattori, che funzionano in contesti trascrizionali specifici. Un ciclo di trascrizione include le fasi di pre-inizio, inizio, allontanamento dal promotore, elongazione e terminazione. La produzione di un trascritto maturo da parte della Pol II, implica il verificarsi di molti eventi (inizio, elongazione, splicing, capping, ecc.), alcuni dei quali avvengono in successione, altri in parallelo.

A ciò si affianca poi il ciclo di fosforilazione e defosforilazione del CTD di Pol II. Il dominio carbossi-terminale della subunità maggiore dell'enzima, consta di ripetizioni multiple di un eptapeptide (YSPTSPS) che si ritrova conservato negli organismi eucariotici e che aumenta nel numero in relazione alla complessità genomica. Le serine nelle posizioni 2 e 5 (Ser-2 e Ser-5) sono il bersaglio di fosforilazioni e defosforilazioni (88) da parte di attività cinasiche contenute rispettivamente in P-TEFb(ciclina T-cdk9) e in TFIIH (ciclina H-cdk7), nonché delle fosfatasi

Ssu72 e FCP1. I differenti stati di fosforilazione di Pol II si associano a momenti diversi della trascrizione genica: quando l'enzima si trova nelle regioni prossime ai promotori, prevale la forma fosforilata in Ser-5; durante l'elongazione la Ser-5 è defosforilata mentre la Ser-2 subisce la fosforilazione di P-TEFb, questo assicura il corretto rilascio del TEC dal sito di pausa (vedi sotto). Le fosfatasi intervengono nelle fasi conclusive del processo per promuovere un'efficiente terminazione, ma anche per garantire il turnover della Pol II che, nello stato defosforilato, è pronta per un nuovo ciclo di trascrizione (fig. 8) (77, 88).

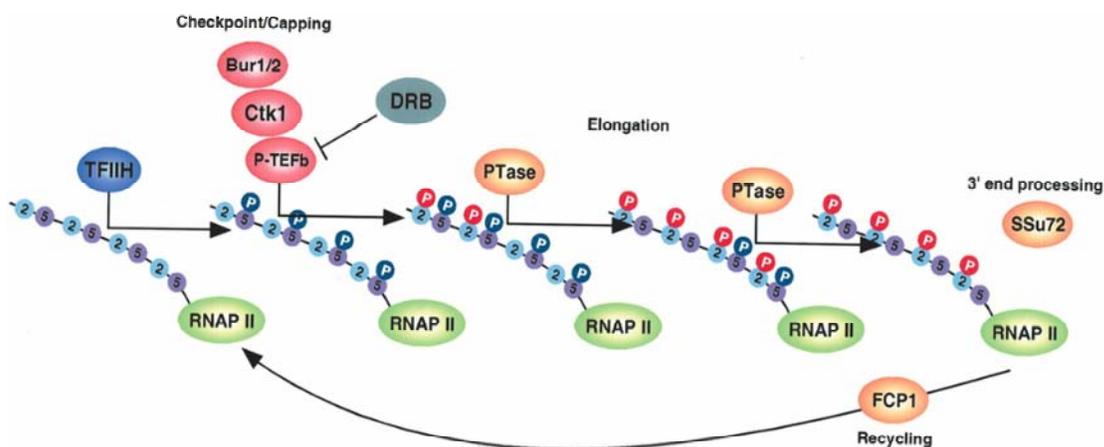


Figura 8. Ciclo di fosforilazione del CTD della subunità maggiore di Pol II. (Figura da Sims R J III, Belotserkovskaya R, and Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev. Review*, 18:2437-2468, 2004).

Probabilmente il significato di queste modificazioni è quello di rendere il CTD competente per il reclutamento di appropriati fattori del capping, dell'elongazione o della terminazione sul sito di trascrizione.

Negli eucarioti superiori la trascrizione si caratterizza per una speciale modalità di regolazione che prevede l'accumulo della Pol II su siti prossimi ai promotori; questo fenomeno denominato anche "pausing trascrizionale" è stato dimostrato in numerosi geni cellulari e virali come *hps70* e *hps26* di *Drosophila*, *c-myc*, *c-fos*, *c-myb* e *DHFR* di cellule mammifere (89-93). Il pausing trascrizionale è un evento reversibile, che ha la funzione di assicurare una corretta maturazione del pre-mRNA; si

presume che l'allontanamento dell'enzima dalle regioni di pausa rappresenti un passaggio limitante per la trascrizione, esso è pertanto regolato da numerosi fattori che intervengono per sfruttare o alleviare il blocco della Pol II. L'arresto dell'enzima è probabilmente il risultato di un suo scivolamento sui nucleotidi causato da un disallineamento tra sito catalitico della Pol II ed estremità 3'OH del trascritto nascente (77). Quando la Pol II si blocca temporaneamente sul sito di pausa si crea un intermedio inattivo che esibisce una grande flessibilità conformazionale, una caratteristica ottimale per effettuare riarrangiamenti o spostamenti che le consentono di ripristinare l'elongazione. Viceversa la forma attiva del TEC è particolarmente rigida ed è in grado di ottimizzare traslocazione, legame ai nucleotidi e catalisi senza risentire minimamente degli effetti della sequenza di DNA (94).

Studi recenti rivelano che alcuni fattori proteici globalmente definiti N-TEFs (negative elongation factors) giocano ruoli importanti nella regolazione negativa dell'elongazione (95), in maniera speculare i P-TEFs (positive elongation factors) prevengono l'arresto o ripristinano la forma attiva della Pol II quando questa è in uno stato bloccato (96). A quest'ultimo gruppo appartengono mediatori come **TFIIF** che si riassocia al TEC quando il complesso è bloccato, inducendo un cambiamento conformazionale nella Pol II necessario per riprendere l'elongazione; l'**Elongin A** che funziona probabilmente riallineando il 3'OH del trascritto nel sito attivo dell'enzima; il fattore **ELL** analogo funzionale di TFIIF ed elongin A (77).

Un contributo particolare in tal senso è fornito da **P-TEFb** che grazie alla sua attività cinasica conferisce processività al complesso d'elongazione, promuovendo l'uscita dal pausing e contrastando l'effetto negativo del complesso DSIF/NELF. **DSIF** è un eterodimero costituito dagli omologhi umani di *Saccharomyces cerevisiae* Spt4 e Spt5. Originariamente presentato come un inibitore dell'elongazione, studi più recenti (97) suggeriscono invece il contrario, data la capacità che ha Spt4 di antagonizzare il controllo negativo sulla trascrizione. Questa ambivalenza funzionale potrebbe essere spiegata ammettendo che DSIF

sia una proteina adattatrice che connette altri modulatori al TEC. In effetti questo fattore si ritrova spesso associato con il complesso NELF, vero promotore del pausing trascrizionale, che diventa funzionalmente attivo solo in presenza di DSIF.

NELF è un complesso multiproteico che consta di 5 subunità: NELF-A, NELF-B, NELF-C, NELF-D, NELF-E. Tramite le componenti A ed E lega rispettivamente Pol II e DSIF associate sul DNA stampo, questo contatto ne determina l'attivazione. La sua capacità di favorire il blocco della trascrizione, è coerente con la funzione proposta per NELF di fungere da competitore di TFIIF (77, 98). Sulla base di evidenze sperimentali, la regolazione dell'elongazione tramite il pausing prevede che DSIF contatti la Pol II elongante nelle primissime fasi del processo; NELF riconosce e lega il complesso DSIF-Pol II favorendo un blocco dell'elongazione all'altezza del sito di pausa. L'arresto di Pol II avviene generalmente a circa 20-50 bp dal punto d'inizio della trascrizione (99) ed è mantenuto grazie all'azione relativamente prolungata di DSIF/NELF che in questo modo facilitano la maturazione del messaggero. Sebbene siano necessari ulteriori dati circa il meccanismo alla base del blocco di Pol II, sembra che l'arresto dell'enzima non sia influenzato dalle sequenze a monte o a valle del sito di pausa (100). Il CTD di Pol II insieme alla subunità Stp5 di DSIF, costituisce un segnale di richiamo per gli enzimi del capping che vengono quindi reclutati sul DNA per modificare correttamente il trascritto. L'attività cinasica di P-TEFb che agisce di concerto sia sulla Ser-2 del CTD che su Stp5 bersaglio anche della metilasi PRMT1, stimola probabilmente il rilascio di NELF e la ripresa dell'elongazione (vedi Fig. 9).

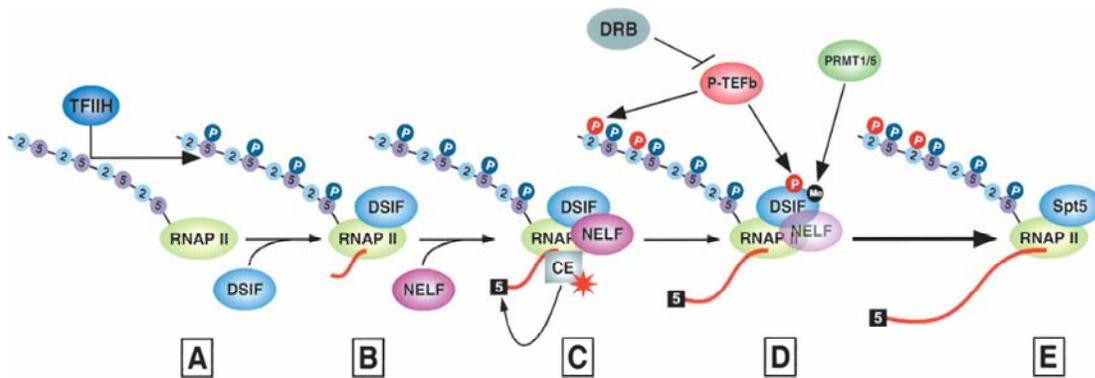


Figura 9. Regolazione dei siti di pausa prossimi ai promotori. (Figura da Sims R J III, Belotserkovskaya R, and Reinberg D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev. Review*, 18:2437-2468, 2004).

Numerose informazioni sono state ottenute sul controllo dei siti di pausa trascrizionali e sui fattori (proteici e non) che intervengono in questo tipo di regolazione. Studi effettuati su c-MYC ad esempio, hanno permesso di ipotizzare che il controllo del pausing-site sul sito P2, potrebbe dipendere dalla formazione di un loop tra la regione FUSE ed il promotore P2 stesso. Una regolazione diversa caratterizza invece geni sensibili agli androgeni come PSA e NKX3-1 (101). Esperimenti di ChIP hanno rivelato che in presenza di una stimolazione ormonale, i livelli di Pol II sulle regioni prossime ai promotori di questi geni sono paragonabili a quelli registrati nella sequenza interna. Poiché la maggior parte dei geni umani mostrano la presenza di siti di pausa per Pol II, questi dati suggeriscono che gli ormoni potrebbero abrogare il pausing trascrizionale su PSA e NKX3-1 esercitando un controllo di ordine superiore sulla trascrizione.

Rimangono ancora da chiarire molti aspetti relativi a ciò che promuove il blocco ed alle proteine coinvolte in queste regolazioni; la compattazione della cromatina ad esempio, ha profondi effetti su tutti i processi che richiedono un DNA accessibile, inclusa la trascrizione. Fattori che rimodellano la cromatina, fattori che facilitano l'assemblaggio degli istoni, proteine che modificano gli istoni sono fondamentali per un'efficiente trascrizione. Sperimentalmente è stato provato che la

proteina FACT (facilitates chromatin transcription) agisce associata alla cinasi P-TEFb, alleviando il blocco trascrizionale imposto da DSIF/NELF sul sito di pausa.

FACT è un regolatore generale della struttura cromatinica che destabilizza i nucleosomi rimuovendo selettivamente il dimerico H2A/H2B, consentendo in tal modo alla Pol II di transitare lungo il gene (102). Così come FACT, si pensa che molte altre proteine capaci di modellare la cromatina, di influire sulla struttura del DNA o sulla sua topologia, possano avere un ruolo nel controllo dei pausing-site (44). Questo tipo di indagine costituisce parte del lavoro sperimentale della presente tesi che si è focalizzata sul ruolo della DNA topoisomerasi nella regolazione dell'elongazione con particolare interesse sul controllo dei siti di pausa trascrizionali.

1.5 SCOPO DELLA RICERCA DI TESI.

La DNA topoisomerasi I umana (Top1) è coinvolta in numerose attività cellulari, tra cui l'espressione genica. Per l'enzima sono stati proposti diversi ruoli nei processi trascrizionali: co-attivatore nella fase di inizio, enzima che rilassa i superavvolgimenti positivi e negativi generati da Pol II nella fase di elongazione. Recentemente si sta anche indagando sulle possibili interazioni dell'enzima con le varie componenti dell'apparato trascrizionale. Top1 è anche il bersaglio specifico della CPT, un farmaco antitumorale, nonché inibitore della trascrizione. La maggior parte degli studi che hanno condotto a ipotizzare sia i vari ruoli di Top1 nella trascrizione, sia il modello della collisione per spiegare l'effetto della CPT sulla trascrizione stessa, sono stati condotti principalmente utilizzando sistemi *in vitro*; quindi, trascurando molti aspetti della complessità dei sistemi di espressione genica *in vivo*, come le caratteristiche della struttura della cromatina, le interazioni tra i fattori proteici e tra le proteine col DNA. Fattori che potrebbero essere determinanti per il reclutamento di Top1 nelle regioni genomiche trascritte, o per la loro partecipazione nelle fasi di inizio e/o elongazione della trascrizione genica.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello analizzare *in vivo* gli effetti precoci dell'inibizione specifica di Top1 sul legame di Pol II alla cromatina attivamente trascritta e, partendo da questi, formulare un'ipotesi sul meccanismo di regolazione trascrizionale in cui Top1 è coinvolta e la cui inibizione, da parte di CPT, causa gli effetti stessi. Quindi, la nostra ricerca si è focalizzata sulla regolazione dei siti di pausa trascrizionali prossimi ai promotori genici, dove è massimamente evidente l'effetto di CPT sul legame di Pol II al DNA. Abbiamo voluto approfondire l'analisi del possibile ruolo di Top1 nel controllo di tali regioni valutando anche i possibili partner molecolari dell'enzima che intervengono durante questa regolazione.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

Tutti i reagenti usati sono della ditta SIGMA, a meno che non sia diversamente indicato.

2.1 COLTURE CELLULARI.

Materiali:

Cellule Jurkat (linea di cellule T umane)

Cellule MRC5 (linea di fibroblasti umani immortalizzati con SV40)

Cellule CS3BE (Cockayne Syndrome, gruppo di complementazione A-
linea di fibroblasti umani immortalizzati con SV40 mutanti nel gene
CSA)

Cellule CS1AN (Cockayne Syndrome, gruppo di complementazione B-
linea di fibroblasti umani immortalizzati con SV40 mutanti nel gene
CSB)

Cellule HCT116:

-B (linea di carcinoma del colon con RNA interference per hTop I)

-H1 (linea di carcinoma del colon - controllo)

Terreni di coltura:

- RPMI-1640 (Jurkat)
- DMEM (MRC5, CS3BE, CS1AN, HCT116 H1 e HCT116 B)

Fetal bovine serum (INVITROGEN)

PBS 1X (INVITROGEN)

Tripsina (Euroclone)

Fiasche colturali (corning)

Camptotecina, α -amanitina, Afidicolina, Igromicina, Cisplatino,
Teniposide (Bristol-Myers Squibb), DRB (5,6-dicloro-1-b-D-
ribofuranosilbenzimidazolo).

Procedure:

Mantenere le cellule in coltura ad una densità compresa tra:

- $2 \cdot 10^5$ - 10^6 cellule/mL (Jurkat),
- $2 \cdot 10^4$ - 10^5 cellule/cm² (MRC5, CS3BE, CS1AN),
- $5 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^5$ HCT116 .

Propagarle a 37 °C in terreno con 10% FCS e in atmosfera al 5 % di CO₂.
Propagare le HCT 116 in terreno selettivo con igromicina (500uM).
Effettuare i diversi trattamenti farmacologici a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂, su cellule in fase di crescita esponenziale.

-per il trattamento con la camptotecina usare il farmaco alla concentrazione finale di 10 µM. Trattare per 60 minuti o per 5, 10, 30 e 60 minuti (cinetica). Nei saggi contro-dose, trattare con camptecina per 60 minuti alle concentrazioni finali di 0,4, 2 10 µM.

-per il trattamento con l'α-amanitina usare il veleno alla concentrazione finale 2 µM. La durata del trattamento è 2 ore.

Quando è previsto pretrattamento con

-afidicolina, usare il composto alla concentrazione di 3 µM per 15 minuti ;

-con DRB, usare il composto alle concentrazioni di 50 o 100 µM per 15 minuti ;

2.2 PREPARAZIONE DELLA CROMATINA.

I protocolli per la preparazione della cromatina e per la CHIP sono stati adattati sulla base di precedenti lavori svolti nel nostro laboratorio (66, 67).

Soluzioni :

TEET

TrisCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	0 mM
EGTA	0,5 mM
TritonX-100	0,25 %

TEEN

TrisCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	10 mM
EGTA	0,5 mM
NaCl	200 mM

TEE

TrisCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	10 mM
EGTA	0,5 mM

TE

TrisCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

Inibitori delle proteasi (stock 1000X): pepstatina, leupeptina, aprotinina
(concentrazione finale 1 mM)

SDS 10 %

Glicina 1 M

Formaldeide 36,5 % (FLUKA)

Proteinasi K 20 mg/mL

Fenolo/cloroformio/alcol isoamilico (25/24/1), pH 8,0

EtOH 100 % e 70 %

NACH₃COO (3 M, pH 5,2)

glicogeno 10 µg/µL (Roche Diagnostic, Mannheim)

Strumenti:

Rocker Vary-mix Thermoline

Branson 250 Sonifier (Branson Ultrasonic Corporation)

Spettrofotometro SmartSpec™ 3000

Il metodo consiste di tre fasi:

1. FISSAGGIO *in vivo* DELLE CELLULE, DA CUI SI OTTIENE LA “X-Chromatin”;
2. SOLUBILIZZAZIONE E FRAMMENTAZIONE DELLA “X-Chromatin”;
3. REVERSAL DEI CROSSLINKS.

FISSAGGIO DELLE CELLULE CON FORMALDEIDE *in Vivo*¹

Procedura:

-per cellule in sospensione (Jurkat)

Contare le cellule subito prima del fissaggio: la densità cellulare non è superiore a 10^6 cellule/mL, perché la cromatina deve essere ottenuta da cellule in fase di crescita esponenziale.

Trasferire la coltura in tubi Falcon da 50 mL.

Aggiungere la soluzione di HCOH arrivando ad una concentrazione finale pari a 1 %.

Fissare per 15 minuti a temperatura ambiente sul rocker .

Bloccare le reazione di fissaggio aggiungendo la soluzione di glicina 1 M fino alla concentrazione 0,125 M.

Centrifugare a 780 g per 7 minuti a 4°C.

Risospendere in PBS freddo in modo da ottenere la densità di $2 \cdot 10^6$ cellule/mL.

Lavaggi consecutivi in ghiaccio con 15-20 mL di PBS, di TEET (lasciare per 5-7 minuti), di TEEN (dopo ogni lavaggio precipitare i pellets centrifugando a 780 g per 5 minuti) e di TEE.

-per cellule adese (MRC5, CS3BE, CS1AN, HCT 116 H1, HCT116 B)

24 ore prima del trattamento contare le cellule e riseminarle in modo che le cellule siano trattate in fase di crescita esponenziale.

Dopo il trattamento fissare le cellule per 15 minuti con HCOH arrivando ad una concentrazione finale pari a 1 %.Bloccare la reazione con glicina 1M fino alla concentrazione 0,125 M.

Lavare le cellule con 20 ml di PBS freddo e poi con 5ml di TEET lasciandolo per 5-7 minuti, staccare quindi le cellule con lo scraper e trasferire la sospensione in Falcon da 50 ml.

Procedere come sopra.

¹ Il metodo consente di preservare l'architettura delle strutture cromatiniche di ordine superiore. La formaldeide è un agente che favorisce la formazione di legami facilmente reversibili tra proteina-DNA, proteina-RNA, proteina-proteina (103). Questi legami si originano tra gli amminogruppi esociclici e gli imminogruppi endociclici delle basi del DNA con gli azoti delle catene laterali dei residui di lisina, arginina e istidina (come pure con gli α -amminogruppi di tutti gli amminoacidi) (104).

NB:aggiungere gli inibitori delle proteasi a tutte le soluzioni di lavaggio subito prima dell'uso.

I campioni possono essere conservati a 4°C per tempi brevi.

Prelevare un'aliquota del campione fissato, "X-Chromatin", e diluirlo 100 volte con SDS 0,5 %, per effettuare una lettura dell'assorbanza a A260 e A280. Se la lettura di A260 fornisce un valore compreso tra 0,25-0,4 (unità di assorbanza, AU), diluire ciascun campione fino ad ottenere 10 AU/ml con TEE + inibitori delle proteasi. Così il campione è pronto per essere sonicato.

SOLUBILIZZAZIONE E FRAMMENTAZIONE DELLA "X-Chromatin"²

Il campione di "X-Chromatin" ottenuto da 80-100*10⁶ cellule dovrebbe contenere circa 1000-1250 µg di DNA .

Procedura (mantenere i campioni sempre in ghiaccio):

- Fissare il contenitore col campione in modo che questo risulti sempre immerso in un bagno di acqua e ghiaccio. Sonicare a **0,4 DUTY** per 1 minuto. **AMPLITUDE**: 10, 15 20. Ripetere 3 volte la sonicazione per ciascun valore di "amplitude" Attendere 1 minuto per il raffreddamento prima di ogni avvio successivo.
- Portare il campione di "X-Chromatin" all'1 % di SDS.
- Centrifugare a 10000 g per 10 minuti a 10°C e trasferire il surnatante in un nuovo tubo.
- Ripetere la sonocazione.
- Prelevare un'aliquota contenente 20-30 µg (100µl) di DNA per valutare le dimensioni dei frammenti ottenuti.

REVERSAL DEI CROSSLINKS

² Con questo metodo è possibile ottenere frammenti di DNA di diverse dimensioni variando le condizioni di sonicazione. Il protocollo impiegato prevede, infatti, 2 cicli: dopo il primo ciclo di sonicazione si ottengono frammenti di dimensioni distribuite in un range molto ampio che va da 200 a >5000 bp; dopo il secondo ciclo, invece, la maggior parte dei frammenti ha una lunghezza di circa 200 bp (105).

Occorre per revertire i legami, “crosslinks”, originati dal fissaggio *in vivo* delle cellule con formaldeide e per analizzare il DNA puro.

Procedura:

Portare i campioni contenenti “X-Chromatin” al volume di 150-160 (200) μL con TE allo 0,5 % di SDS.

Incubare per almeno 4-6 ore (anche overnight) a 65°C per revertire i crosslinks.

Centrifugare brevemente i campioni e aggiungere la proteinasi k fino alla concentrazione di $500 \mu\text{g}/\text{mL}$; lasciare avvenire la digestione per 2-3 ore a $50-55^{\circ}\text{C}$.

Aggiungere $150 \mu\text{L}$ di TE allo 0,5 % di SDS.

Estrarre i campioni due volte con fenolo/cloroformio/alcol isoamilico.

Aggiungere $1/9$ del volume di NACH_3COO (3 M, pH 5,2), $20 \mu\text{g}$ di glicogeno, 3V di etanolo assoluto pre-raffreddato a -20°C . Lasciare a -20°C per almeno 30 minuti.

Precipitare il DNA centrifugando per 20 minuti a 18000 g a 4°C . Lavare i pellets con etanolo 70 % pre-raffreddato.

Aspirare i surnatanti e lasciare asciugare i pellets per 2-3 minuti a $50-60^{\circ}\text{C}$.

Risospendere i pellets $50 \mu\text{L}$ di TE .

Analizzare la distribuzione delle dimensioni del DNA frammentato utilizzando un gel di TAE agarosio 1,2 % (o procedere con la real-time PCR).

2.2.1 Valutazione delle dimensioni del DNA frammentato

Per calcolare le dimensioni medie dei frammenti di DNA ottenuti dopo la sonicazione e purificati, il gel di TAE agarosio all' 1,2 % è stato colorato con bromuro di etidio. Sull'immagine ottenuta le corsie del DNA frammentato, per confronto con quelle dei markers, sono state suddivise in 20 intervalli ogni circa 500 bp da 0 a 10000 bp. L'intensità della fluorescenza, proporzionale al numero di moli ed alla lunghezza dei frammenti di DNA, è stata valutata per ciascun intervallo per densitometria usando il software per analisi delle immagini Molecular

AnalystTM. Quindi, le dimensioni medie dei frammenti di DNA sono state calcolate con la formula:

$$S_{AV} = \sum (L_i * n_i^{\circ} \text{moli} / n_{\text{tot}} \text{ moli})$$

Dove L_i è la lunghezza media dei frammenti compresi nell'intervallo i -esimo; $n_i^{\circ} \text{ moli}$ è il numero di moli nell'intervallo i -esimo, calcolato come rapporto tra un valore proporzionale all'intensità della fluorescenza relativa all'intervallo selezionato e L_i ; $n_{\text{tot}} \text{ moli}$ è la somma del numero delle moli di tutti gli intervalli selezionati.

2.3 IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA (XChip)³.

Soluzioni:

RIPA

TrisCl, pH 8	50 mM
EDTA	1 mM
EGTA	0,5 mM
NaCl	50 mM
Triton X-100	1 %
Sodio deossicolato	0,1 %
SDS	0,1 %

RIPA-500

TrisCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM
EGTA	0,5 mM
NaCl	500 mM

³ Il metodo consente di recuperare i frammenti di DNA a cui sono legate le proteine di interesse, alle quali si legano gli anticorpi specifici. Per garantire una maggiore specificità del materiale immunoprecipitato, si procede attraverso due fasi: prima l'IMMUNOPRE-CLEARING, per eliminare le molecole che legherebbero le porzioni costanti (legami non specifici) degli anticorpi specifici; poi, l'IMMUNOPRECIPITAZIONE con anticorpi specifici (vedi Diagramma di flusso a pagina 43).

Triton X-100	1 %
Sodio deossicolato	0,1 %
SDS	0,1 %

RIPA 10X (sds-)

TrisCl, pH 8,0	500 mM
EDTA	10 mM
EGTA	5 mM
NaCl	500 mM
Triton X-100	10 %
Sodio deossicolato	1 %

Li250 (wb1)

TrisCl, pH 8	10 mM
EDTA	1 mM
LiCl	250 mM
NP-40	0,5 %
Sodio deossicolato	0,5 %

TE (wb2)

TrisCl, pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

Proteinasi K (20 mg/mL)

NaCH₃COO (3 M, pH 5,2)

EtOH 70 % e 100 % (-20°C)

Glicogeno 10 µg/µL (Roche Diagnostic, Mannheim)

Materiali:

Fenolo/cloroformio/alcol isoamilico (25/24/1) pH 8,0

Montage PCR microconcentrators (MILLIPORE)

Protein A /Protein G Sepharose beads non bloccate e bloccate con

Salmon testes DNA, BSA (Amersham Bioscience)

Anticorpi (Tabella 2)

Tabella 2. Anticorpi utilizzati.

TIPO	PRODUTTORE
Ab anti- γ -H2AX	Upstate
Ab anti-Topo I(C15)	SantaCruz Biotechnology
Ab anti-TBP(SI-1)	SantaCruz Biotechnology
Ab anti-RNA Pol II(H-224)	SantaCruz Biotechnology
Ab anti-H1(AE-4)	SantaCruz Biotechnology
Ab.anti-Actina (I-19)	SantaCruz Biotechnology
Non-immune rabbit IgG	Cedarlane
Normal goat IgG	SantaCruz Biotechnology
Normal mouse IgG	SantaCruz Biotechnology
mAb anti-RNA Pol II (4H8)	Abcam
mAb anti DNA ligasi I (5H5)	Areta

Procedura (da eseguire interamente in ghiaccio e usando puntali con filtro):

IMMUNOPRECLARING - si può effettuare separatamente o per tutti i campioni contemporaneamente –

Portare il campione di “X-Chromatin” sonicato alle condizioni del tampone usato per l’immunoprecipitazione (RIPA). Solitamente, per ciascun anticorpo:

40 μ L RIPA 10 X (SDS-)

319,6 μ L H₂O sterile

40 μ L “X-Chromatin” (corrispondenti a circa 12 μ g di DNA)

Aggiungere 4 μ g di normal IgG a ciascun campione da immunoprecipitare.

Usare normal IgG della stessa origine dello specifico anticorpo che si intende usare per ciascuna immunoprecipitazione.

Per ogni 4 μ g di siero usato aggiungere 20 μ L della sospensione 50 % di ProteinA/ProteinG Sepharose beads non bloccate per togliere il normal IgG e per limitare eventuali interazioni aspecifiche della cromatina anche con le beads. Incubare sul rocker per 2 ore a 4°C.

Centrifugare a 1000g per 2-3 minuti per raccogliere le beads e trasferire i surnatanti in tubi nuovi. Trasferire 100 uL di surnatante in un tubo e conservarli come **INPUT**; questi serviranno per costruire la curva di calibrazione nella PCR quantitativa

IMMUNOPRECIPITAZIONE

Aggiungere l'anticorpo specifico (4 µg/campione); incubare sul rocker overnight a 4°C. Aggiungere 40 µL della sospensione (50%) ProteinA/ProteinG Sepharose beads (bloccate, nel senso che la presenza di BSA sfavorisce le interazioni non specifiche).

Centrifugare a 1000g per 2-3 minuti per raccogliere le beads, eliminare i surnatanti.

LAVAGGI DELLE BEADS – usare 0.9-1 mL di soluzione di lavaggio-

Lavare consecutivamente le beads:

- 4-5 volte (per 10 minuti ciascuna) con RIPA
- 1 volta con RIPA 500
- 1 volta con Li250
- 2 volte con TE.

Risospendere i pellets finali con 160 µL di TE-SDS 0,5 %.

REVERSAL DEI CROSSLINKS NELL'INPUT E NEI CAMPIONI IMMUNOPRECIPITATI (vedi sopra).

Risospendere i pellets di DNA in 50 µL di TE.

2.4 PCR QUANTITATIVA “REAL TIME”.

Strumento: LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim).

Kit: Master SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim).

Per la composizione della mix di reazione vedi la Tabella 3.

Per le coppie di primers usate vedi Tabella 4.

Tabella 3. Composizione mix (per 1 campione):

COMPONENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
FastStart DNA SYBR Green I Master Mix	1.2 µL	1 X
MgCl ₂	1.0 µL	3 mM
H ₂ O	3.6µL	
Primer mix	2.1µL each	350 nM
Template DNA	2.0 µL	
	TOT.12 µL (vol. di reaz.)	

Tabella 4. Coppie di primers usate per le PCR real time sul DNA immunoprecipitato. Nella tabella sono riportate le sequenze dei primer utilizzari nelle rt-PCR con le corrispondenti lunghezze (L) dell'amplificato, temperature di melting (T_m) e temperature di annealing (T_a).

POSIZIONE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	L.	T _m	T _a
H2A -1000	GTTACGCTGATTTCTTTGAA	AGCTGTGACAAAGTCTGTTTA	225	81	60
H2A -500	ACAGTCTTCTGGCTCTGTC	GAGAAACCCTGTCTCCAGTA	206	87,5	60
H2A 0	GGGTCAACATAAACCTTAC	GCGACCCAGACATAACTACTT	217	81,5	60
H2A +500	GAAAACTGAGAGCCATCAT	TACTAAAAGTGCCACCACTCA	217	84	60
H2A+1000	GAGTATGTATTTCCCAAAT	ATAAGAAGTGTGGGCAATTAG	232	88	60
H2A+1500	CAGGAGCCTCTCTTAATCTG	CGAGCTGTCTGTTTAGTACG	201	84,5	60
H2A+2000	GAGCGTAAATGTAAAGTCA	ATAGCACCTTAATAAGGTCAG	233	80,5	60
H2A+2500	GGCTGTAAACATTAACCTGA	ACAGGCAAGAAGTACTGAAA	257	81	60
H2A+3000	TGGCCTACATCTAGAATGTA	CGCTTGATAAAGAGTCAAGAA	243	79	60
H2A+3500	AGAACAAGGATTCTGCTGT	GGTTATTCTGCAAACAACAC	218	77	60
α-Sat	AGCTCACAGAGCTCAAACA	CTTTTTTCATCATAGGCCTCAA	277	82,5	60
MyoD	CGCTTTCCTTAACCCACAA	AAACACGGGTCGTCATAGAAG	286	92	65
Myc P2	TCTTCCCGTCCCGAAGAGTC	TCTGCCTCTCGCTGGAATTAC	123	85,5	65
Myc exo 1	CACTTTGCACTGGAACCTAC	TGCTTACCTGGTTTTCCACTA	179	90	65
Myc intro 1	AATGCCTAAATAGGGTGTCT	CACAATAAAGCAGGAATGTC	249	85,5	60
Myc intro 1B	GATTCTCCTGGAATCGTTGA	TCAATACGGAGATGCAACTG	222	93	65
Myc exo 2	CTCAGAGAAGCTGGCCTCCT	CGTCGAGGAGAGCAGAGAAT	247	89,5	65
Myc exo 3	AGCCACAGCATAACATCCTGT	CTCAGCCAAGGTTGTGAGGTT	232	83,5	65
Myc 3' far	ATCAGCTGGCTGCTTGTGAG	GGAGCCGTCATGAGTCTGATT	217	83	65
Myc exo 6	TGTGTCTTAAAGTTAGGATC	CTTAAGATTTGGCTCAATGAT	162	74,5	60
GAPD Pr.	ATCGAGTCCGGAGTTCTGGA	AAGAAGATGCGGCTGACTGTC	161	92	65
GAPD exo 3	ATCTAAGAGACAAGAGGCA	TGTAGCACTCACCATGTAGTT	131	84,5	60

Dopo ogni ciclo di amplificazione la fluorescenza viene misurata ad una temperatura immediatamente (1-2°C) inferiore a quella di melting del prodotto specifico. La specificità dei prodotti viene controllata con l'analisi delle curve di melting e con l'elettroforesi su gel di agarosio. I programmi per l'amplificazione vengono impostati per ciascuna reazione realizzata con le diverse coppie di primers seguendo le indicazioni suggerite nel manuale dello strumento.

Per le quantificazioni si usa il metodo del "crossing point". Dopo aver sottratto la fluorescenza di background, il livello soglia della fluorescenza viene fissato per ogni esperimento nella fase esponenziale dell'amplificazione. I "crossing points" vengono calcolati in modo tale che essi corrispondano al numero del ciclo (C_T) al quale la fluorescenza nel campione è uguale al valore soglia. La curva standard si ottiene plottando i valori dei "crossing points" sul logaritmo della concentrazione del DNA stampo.

Per creare la curva standard, nel caso della quantificazione del DNA recuperato in seguito all'X-ChIP si usano almeno 4 diluizioni seriali del DNA input; in questo modo i frammenti vengono quantificati come percentuale del DNA input. Dalla pendenza della stessa curva si può calcolare l'efficienza della reazione di PCR.

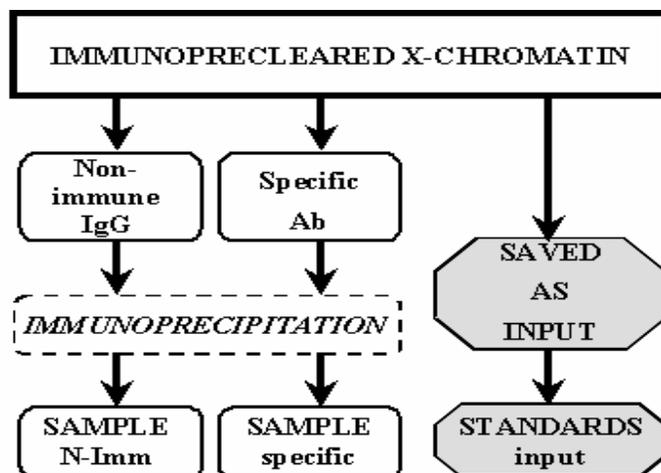


Diagramma di flusso dell'X-ChIP. Passaggi che conducono al recupero dei frammenti di DNA immunoprecipitati in modo aspecifico (N-Imm) e specifico (specific), e dei frammenti di DNA genomico non sottoposto ad immunoprecipitazione (standards input).

2.5 SAGGI DI CITOTOSSICITA'.

Seminare le cellule ad una densità minima di $7 \cdot 10^3$ cellule/cm² in 12 Multi-well-plates.

- 24 ore dopo la semina, trattare le cellule con il farmaco alle concentrazioni finali pari a:

Cisplatino 2, 10, 50 μ M;

α -amanitina 0,08, 0,4, 2 μ M;

Camptotecina 0,08, 0,4, 2, 10 μ M;

incubare per 72 ore a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂.

Coltare le cellule alla camera di burker.

- 24 ore dopo la semina, pretrattare con afidicolina 3 μ M per 15 minuti e successivamente aggiungere camptotecina per 60 minuti alle concentrazioni finali di 10, 25, 50, 100 μ M.

Rimuovere il medium ed aggiungere terreno fresco. Aspettare 72 ore. Contare le cellule alla camera di burker.

2.6 PREPARAZIONE DEGLI ISTONI.

Materiali:

LYSIS BUFFER:

TrisCl, pH 7,5 10 mM

MgCl₂ 1 mM

NP-40 0,5 %

NB: aggiungere gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi prima dell'uso.

SALT WASH BUFFER:

Lysis Buffer

NaCl 0,4 M

EXTRACTION SOLUTION:

H ₂ SO ₄	0,22M
Glicerolo	20% v/v
2-mercaptoetanolanmina	10 mg/ml

TCA 100%

Trattamenti: CPT 10 μ M per 5, 10, 30, 60 e 120 minuti.

Trattare le cellule ad una densità cellulare pari a $8 \cdot 10^5$ cellule/ml.

Effettuare i trattamenti a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Procedura:

Effettuare 2 lavaggi con PBS freddo (centrifugare a 200g per 5 minuti a 4°C)

Risospendere in 750 μ l di Lysis Buffer, centrifugare a 16000g per 1 minuto a 4°C. Eliminare il surnatante. Aggiungere 500 μ l di Salt Wash Buffer e incubare per 15 minuti in ghiaccio; centrifugare a 16000g per 1 minuto a 4°C. Eliminare completamente il surnatante.

Aggiungere ad ogni campione 5 volumi di Extraction Buffer Solution. Incubare overnight a 4°C.

Centrifugare a 16000g per 10 minuti a 4°C. Trasferire interamente i surnatanti in tubi da 1,5 ml. Misurare il volume di ciascun surnatante ed aggiungere TCA 100% fino al 20%. Questo assicura la precipitazione degli istoni.

Centrifugare a 16000g per 10 minuti a 4°C. Eliminare i surnatanti, lavare i pellet con EtOH 100% successivamente asciugarli all'aria.

NB: i pellet possono essere conservati a -20°C fino al loro utilizzo.

2.7 WESTERN BLOT DI PROTEINE ISTONICHE.

Materiali:

Laemli Buffer

β -mercapto-etanolo (0,2%)

Hybond ECL-Nitrocellulosa

Anticorpi (vedi tabella 1)

Gel di poliacrilammide 13%:

RESOLVING GEL

Per un volume finale di 10 ml:

Acilammide:Bisacilammide (29:1)	4,3 ml
TrisCl, pH 8,8 1,5M	2,7 ml
SDS 10%	100 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O	2,8 ml
APS 10%	50 µl

STACKING GEL

Per un volume finale di 5 ml:

Acilammide:Bisacilammide (29:1)	0,75 ml
TrisCl, pH 6,8 0,5M	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
TEMED	5 µl
H ₂ O	2,9 ml
APS 10%	25 µl

RUNNING BUFFER

TRIZMA-Base	3g
Glicina	14,4g
SDS 10%	10 ml
Portare a 1 L con acqua.	

TRANSFER BUFFER

TRIZMA-Base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,0375%
Metanolo	20%

ROSSO PONCEAU

Ponceau	130 mg
---------	--------

Isopropanolo	20 ml
Acido acetico	7,5 ml
Portare a 50 ml con acqua. Filtrare.	

COMASSIE BRILLANT BLUE

Comassie brillant blue	250 mg
Metanolo:acqua 1:1	90 ml
Acido acetico	10 ml
Sciogliere e filtrare.	

Procedura:

Risospendere i campioni in 50 µl di Laemli Buffer a cui è stato aggiunto β-mercapto-etanolo (0,2%). Bollire i campioni per 5 minuti e caricarli sul gel di poliacrilammide 13%. Fare correre a 15 mA per 2 ore a 4°C.

Montare l'apparato di trasferimento ed effettuare il trasferimento su membrana Hybond ECL-Nitrocellulosa in Transfer Buffer a 50 mA overnight a 4°C (la membrana va lavata per 5 minuti in acqua ed equilibrata per 10 minuti in Transfert buffer; il gel va equilibrato 10 minuti in Transfert buffer).

Smontare l'apparato e colorare la membrana con rosso ponceau per verificare la presenza delle proteine, colorare il gel in comassie brillant blue per verificare che tutte le proteine si siano trasferite correttamente.

Decolorare la membrana in acqua.

Lavare la membrana in TBS-tween 0,1% pH 7,6.

Bloccare la membrana in 10% latte in polvere in TBS-tween per 1 ora a temperatura ambiente in leggera agitazione.

Lavare la membrana 2 volte per 10 minuti in TBS-tween 0,1%.

Incubare la membrana con l'anticorpo primario:

- Ab anti- γH2AX (diluizione 1:500) per 4 ore a temperatura ambiente in agitazione;
- Ab anti H1 (diluizione 1:200) per 1 ora e 30 minuti .

Lavare la membrana 3 volte per 10 minuti in TBS-tween 0,1%.

Incubare la membrana con l'anticorpo secondario:

-Ab anti- rabbit (diluizione 1:2000) corrispondente a Ab anti-
 γ H2AX;

-Ab anti-mouse (diluizione 1:1000) corrispondente a Ab anti
H1.

Mantenere in agitazione per almeno un'ora a temperatura ambiente.

Rivelare con Kit ECL plus dell'Amersham e leggere con lo Storm.

2.8 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI.

BUFFER A

HEPES, pH 7,9	1M
MgCl ₂	1M
KCl	1M
DTT	1M
PMSF	0,1M

Portare a volume con acqua.

BUFFER C

HEPES, pH 7,9	1M
Glicerolo	2,5 ml
NaCl	5M
MgCl ₂	1M
EDTA	0,5M
DTT	1M
PMSF	0,1M

Portare a volume con acqua.

NB: aggiungere DTT e PMSF solo immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere anche inibitori delle fosfatasi.

Trattamenti: CPT 10 μ M per 60 minuti; α -amanitina 2 μ M per 120 minuti.

Trattare le cellule ad una densità cellulare pari a $8 \cdot 10^5$ cellule/ml.

Effettuare i trattamenti a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Procedure:

Lavare 2 volte le cellule con il PBS freddo (centrifugare a 200g per 5 minuti a 4°C).

Risospendere in 2 ml di PBS. Centrifugare a 220g per 5 minuti a 4°C e risospendere in 1 ml di Buffer A.

Centrifuga a 220g per 5 minuti a 4°C.

Risospendere in 1 ml di Buffer A; lasciare in ghiaccio per 10 minuti, per ottenere la lisi cellulare. Agitare per 30 secondi sul vortex, centrifugare a 220g per 5 minuti a 4°C, quindi eliminare i surnatanti.

Risospendere ciascun pellet con un volume uguale di Buffer C e lasciare in ghiaccio per 15-20 minuti.

Centrifugare a 20000g per 5 minuti a 4°C, prelevare 10 µl per la quantificazione (vedi sotto).

Aggiungere un volume uguale di Laemli buffer.

Bollire i campioni per 5 minuti e conservarli a -20°C.

2.9 DOSAGGIO DEGLI ESTRATTI PROTEICI (Kit Biorad).

Risospendere 1,6 mg di BSA in 1 ml di Buffer C e fare le seguenti diluizioni seriali in Buffer C:

1,6 µg/ µl

0,8 µg/ µl

0,4 µg/ µl

0,2 µg/ µl

Queste diluizioni rappresentano gli standard.

Diluire ciascun campione 1:5 in Buffer C.

Addizionare a 50 µl di ogni standard, 50 µl di Buffer C e 50 µl di ogni campione. Aggiungere alla soluzione 250 µl di Soluzione A' (per 3 ml di Soluzione A', aggiungere 60 µl di reagente S a 3 ml di Reagente A).

Vortexare. Aggiungere 2 ml di Soluzione B quindi agitare col vortex; dopo 15 minuti leggere l'assorbanza a 750 nm.

2.10 PREPARAZIONE DEI LISATI CELLULARI.

Lavare 2 volte le cellule con il PBS (centrifugare a 220g per 5 minuti).
Risospendere i pellet in Laemli Buffer (a cui è stato precedentemente aggiunto β -mercapto-etanolo 0,2%) in modo da avere 10000cellule/ μ l.
Vortex per 30 secondi.
Bollire i campioni per 5 minuti.
Sonicare ciascun campione per 3 cicli ad una “amplitude” pari a 10.
Conservare i campioni a -20°C.

2.12 WESTERN BLOT DI PROTEINE NON ISTONICHE.

Per i materiali e la procedura vedi western blot delle proteine istoniche.
In questo caso il gel di poliacrilammide è al 6,5%.

Anticorpo primario:

- Ab anti-RNA Pol II (diluizione 1:1000);
- Ab anti actina (diluizione 1:1000)

incubare per 4 ore.

Anticorpo secondario:

- Ab anti- rabbit HRP (diluizione 1:3000);
- Ab anti mouse (diluizione 1:1000)

incubare per 1 ora.

2.12 SAGGIO DI IMMUNOFLUORESCENZA.

I saggi di immunofluorescenza sono stati effettuati in collaborazione con la dottoressa Alessandra Montecucco e la dottoressa Rossella Rossi (Istituto di genetica molecolare, CNR, Pavia)

Strumenti:

Microscopio ottico Olympus IX71 provvisto di obiettivo 63x collegato ad una macchina fotografica digitale Cool SNAP_{ES} Photometrics.

Procedura:

Seminare le cellule su vetrini pretrattati con poly L-lisina.

Lavare le cellule con PBS e fissarle con metanolo freddo per 4 minuti.

Incubare le cellule con l'anticorpo primario mAb anti RNA Pol II (diluizione 1:1000 in PBS contenente latte scremato al 2%) per 1 ora a 37°C in ambiente umido.

Lavare i vetrini 3 volte con PBS quindi incubare con l'anticorpo secondario coniugato a TRITC.

Per colorare il DNA utilizzare DAPI (4,6'-diamino-2-phenylindole) alla concentrazione finale di 0,1µg/ml.

Acquisire i dati utilizzando MetaMorph software (Universal Imaging Corporation).

2.13 CLONAGGI.

Materiali:

- Enzimi di restrizione

Tipo	Produttore
Nhe I	BioLabs
Age I	BioLabs
Hind III	Fermentas
Bsp EI	BioLabs
Eco RV	BioLabs
Nde I	BioLabs
Xho I	BioLabs
Bst XI	BioLabs

- Enzimi vari

Tipo	Produttore
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
Taq DNA polymerase	Promega
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
Alcaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	BioLabs
T4 DNA Ligase	BioLabs
BP Clonase™ Enzyme	Invitrogen

LR Clonase™ Enzyme	Invitrogen
--------------------	------------

- Farmaci

Tipo	Produttore
Ampicillina	Sigma
Kznzmicina	Sigma

- Tipi cellulari

Tipo	Produttore
<i>E. coli</i> TOP 10 F'	Stratagene
One Shot® match1-T1 <i>E. coli</i>	Invitrogen
DB3.1™ <i>E. coli</i>	Invitrogen
GM82 dam- <i>E. coli</i>	
DH5α™ <i>E. coli</i>	Invitrogen
<i>S. cerevisiae</i> JEL1 Δtop1(MAT α, leu2, trp1, ura3-52, prb1-1122, pep4-3, ΔHIS3::pGal1-Gal4, Δtop1)	Prof. P. Benedetti, Università di Padova

- Plasmidi

Tipo	Produttore
PEZ2T TOP1	Prof. Capranico
PAR7HA	Prof. Capranico
pT-RExT-DEST30	Invitrogen
pDONR221	Invitrogen
pCR-Blunt-II-TOPO	Invitrogen

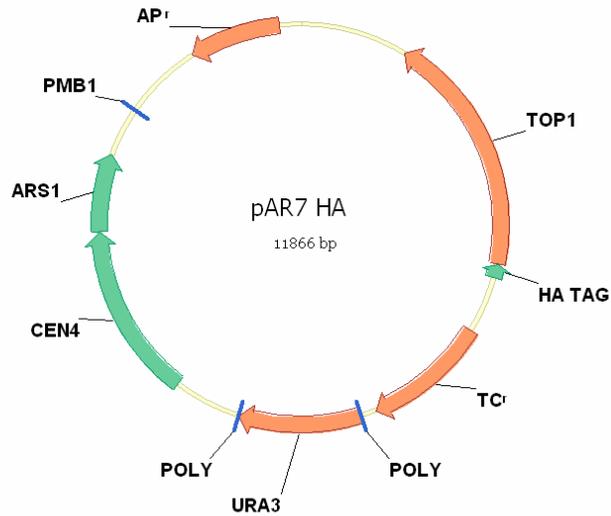


Fig.10: Mappa del plasmide pAR7HA. Il plasmide ha 4 CDS (TOP1 col tag HA, TCr tetraciclina resistenza, URA3 orotidina-5'-fosfato decarbossilasi, AP(R) beta-lattamasi, ampicillina resistenza) 4 Poly, 1 origine di replicazione Cen-Ars, 1 origine di replicazione PMB1.

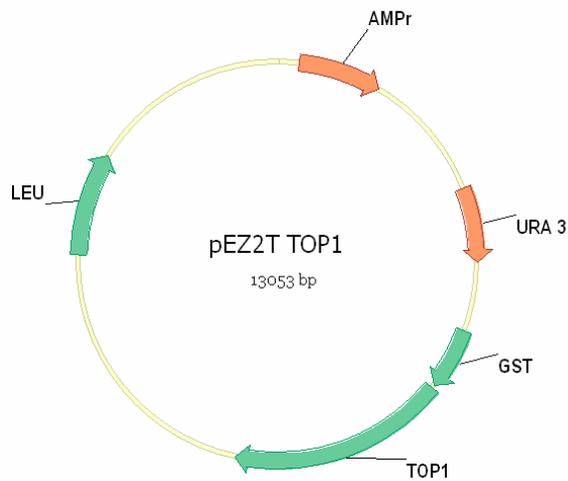


Fig11: Mappa del plasmide pEZ2T TOP1. Il plasmide ha 4 CDS (TOP1 umana col tag GST, AMPr ampicillina resistenza, URA3 orotidina-5'-fosfato decarbossilasi, LEU) .

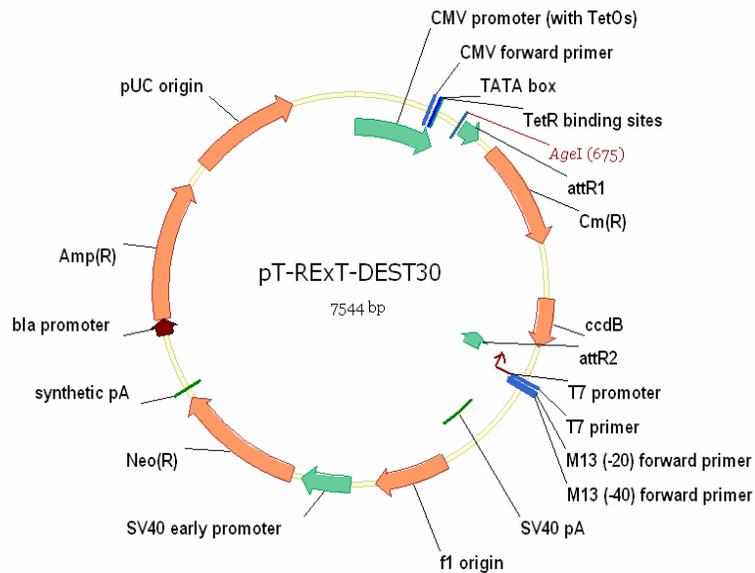


Fig.12: Mappa del plasmide pT-RexT-DEST30. Il plasmide presenta i siti di ricombinazione attR1 e attR2, che permettono il clonaggio di un gene di interesse sotto il controllo del promotore CMV, regolabile con le tetracicline. Il gene ccdB permette la selezione negativa dei cloni.

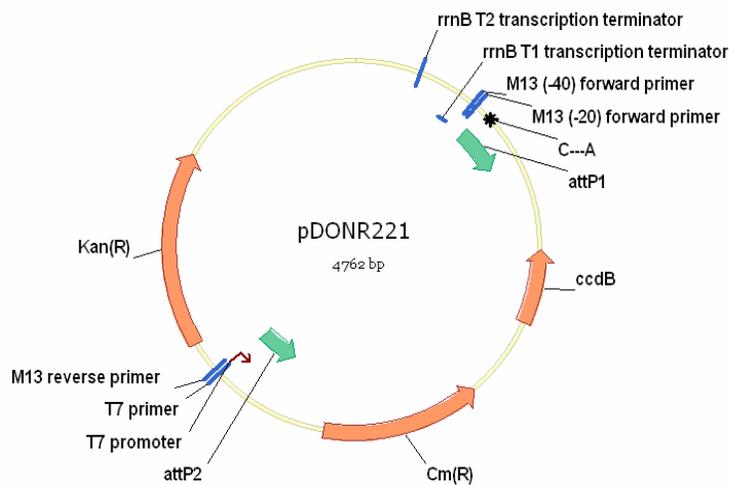


Fig.13: Mappa del plasmide pDONR221. Il plasmide presenta i siti di ricombinazione attP1 e attP2, che permettono il clonaggio di un gene di interesse.

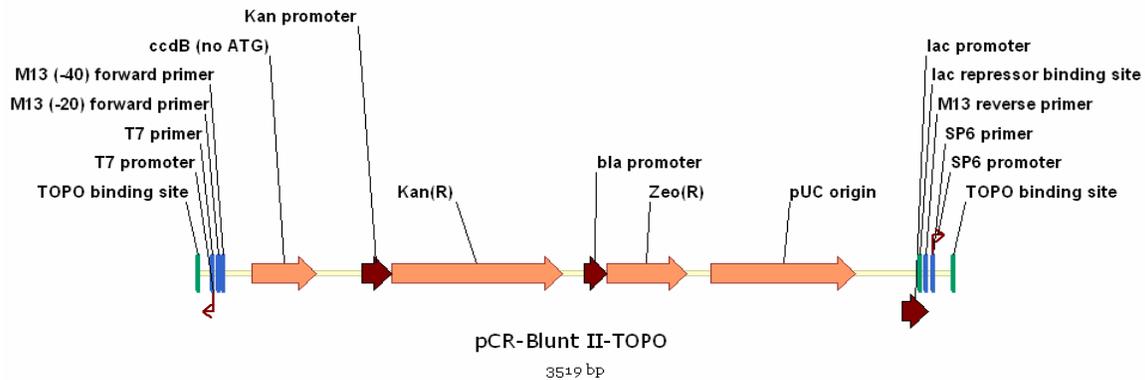


Fig.14: Mappa del plasmide pCR-BLUNT II-TOPO.

- Terreni di coltura

LB liquido (per 1 litro) :

- Tryptone (Sigma) 10 g
- Yeast Extract (Sigma) 5 g
- NaCl (Sigma) 10 g
- pH 7.2
- H₂O a volume

LB agar (per 1 litro) :

- Tryptone (Sigma) 10 g
- Agar (Sigma) 1.5%
- Yeast Extract (Sigma) 5 g
- NaCl (Sigma) 5 g
- pH 7.2
- H₂O a volume

SOB (per 1 litro):

- Tryptone (Sigma) 20 g
- Yest Extract (Sigma) 5 g
- NaCl (Sigma) 0.5 g
- Sciogliere in 950 mL H₂O
- Aggiungere 10 mL di soluzione KCl (Carlo Erba) 250 mM
- Portare a pH7.0 con NaOH (Carlo Erba) 5N
- Portare a volume con H₂O

SOC:

- SOB
- Glucosio (Sigma) 20mM

MgSO₄ 1M:

- 0.05 moli di MgSO₄ eptaidrato (Sigma) in 50 mL H₂O (12.32 g)
- Filtrare con 0.2 um diametro

YP (per 1 litro):

- Yeast Extract (Sigma) 10 g
- Tryptone (Sigma) 20 g
- Agar (Sigma) 20 g nel caso di terreno per piastre
- H₂O a volume
- Aggiungere 2% di glucosio (Sigma) già sterile dopo aver autoclavato il terreno 20' 120°C

URA- terreno selettivo per lievito (per 1 litro):

- Drop Out Mix 0.72 g
- Ammonio Solfato(Sigma) 5 g
- Yast Nitrogen Base (Sigma) 1.7 g
- Agar (Sigma) 20 g nel caso di terreno per piastre
- pH a 6.2 con NaOH (Carlo Erba)
- H₂O a volume
- Aggiungere 2% di glucosio (Sigma) già sterile dopo aver autoclavato il terreno 20' 120°C

GYT:

- Glicerolo (Sigma) 10%
- Yeast extract (Sigma) 0.125 %
- Tryptone (Sigma) 0.25%
- Filtrare con filtro di diametro 0.2 um
- Conservare a 4°C

GTE:

- Glucosio (Sigma) 50mM
- EDTA (Sigma) 10mM
- Tris (Sigma) pH8.0 25mM
- H₂O a volume (15mL)

- Gel d'agarosio
 - Agarose (SeaKem) da 0.8% a 1.5%
 - TAE 1X

TAE 5X (per 1 litro):

- Tris Base (Sigma)242 g

- Acido Acetico Glaciale (Sigma) 57.1 mL
- EDTA (Sigma) pH8 0.5M 100 mL
- H2O a volume

Marker:

Gene Ruler DNA Ladder Mix (M-Medical srl) 0.05 mg DNA/mL

Metodi

- Protocollo di PCR

Reagenti	Concentrazioni finali
DNA	1-10 ng
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
DNTP 2.5 mM	200uM
Primer Forward 2uM	0.2 uM
Primer Reverse 2uM	0.2 uM
Taq polymerase	0.05U/ uL
H2O	a volume

Primer usati

lfHA fw	5'-cgcgaccggtgccaccatggccgcacatctttacc -3'
lfHA rv	5'- tcgataccggtctgagcagcgtaatctggaactcg -3'
Sac II fw	5'- ggattctgtattatggataac - 3'
Sac II rv	5'- tgtatgtacggaaaacttttgcggaagtcctccatgag -3'
Nhe I fw	5'- ctcatggaggactaccgcaaaagttttccgtacataca -3'
Nhe I rv	5'- tctctgaacagccttcttctt -3'
AttB1	5'- ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttatgagtggggaccac ctccacaacg -3'
AttB2	5'- ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcctactaaaactcatagt cttcacagcc -3'

Termocicli

HA :

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 15''
3. 60°C 130'' annealing
4. 68°C 40'' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 68°C 10'
7. 4°C for ever
8. end

MUT:

1. 95°C 5' denaturazione
2. 95°C 30''

3. 50°C 30'' annealing
4. 72°C 45'' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 10'
7. 4°C for ever
8. end

attB:

1. 95°C 2' denaturazione
2. 95°C 15''
3. 55°C 30'' annealing
4. 68°C 2' elongazione
5. step 2 per 30 volte
6. 68°C 10'
7. 4°C for ever
8. end

- **Protocollo per Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices**

- Diluire il prodotto di PCR fino a 500 uL con H₂O sterile
- Aggiungere il volume totale alla resina senza toccare la membrana
- Centrifugare 1000 g 15' RT
- Spostare il filtro in una provetta da 1.5 mL pulita per la raccolta
- Aggiungere 20 uL di H₂O ed invertire la resina
- Centrifugare 1000 g 2' RT
- Volume finale atteso: 18-20 uL

- **Protocollo per Amicon Microcon Y-30**

- Diluire il campione fino a 500 uL con H₂O sterile
- Aggiungere il volume totale alla resina senza toccare la membrana
- Centrifugare 14000 g 12' RT
- Rimuovere l'eluato
- Lavare (ancora per 2 volte) con H₂O sterile
- Ripetere la centrifugata
- Spostare il filtro in una provetta da 1.5 mL pulita per la raccolta
- Invertire la resina
- Centrifugare 1000 g 3' RT
- Volume finale atteso : 10-12 uL

- **Protocollo per il Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (Invitrogen)**

Topo Cloning Reaction

Reagenti	Concentrazioni finali
DNA PCR product	100-400 ng
Salt Solution	1 uL diluizione 1:4*
PCR II Blunt Topo	10 ng
H ₂ O	A volume (6 uL)

* Salt Solution stock:

1. MgCl₂ 0.06 M → 50 mM finale
2. NaCl 1.2M → 2.5 mM finale

- Mescolare la reazione delicatamente
- Incubare 10' RT

- Protocollo per la preparazione delle cellule e di *E. coli* elettrocompetenti
 - Inoculare una colonia singola di *E. coli* in 2 mL di terreno liquido LB + Ampicillina 50 ug/mL + Tetraciclina 15 ug/mL
 - Incubare 6h 37°C 170 rpm
 - Diluire la coltura a 50 mL con terreno LB + antibiotici fresco
 - Incubare 16 h 37°C 170 rpm
 - Inoculare 25 mL della coltura in 475 mL di terreno LB + antibiotici fresco (beuta da 2 litri)
 - Incubare a 37°C 170 rpm fino a densità ottica 0.35-0.4
 - Incubare la beuta in ghiaccio 15'-30' e agitarla di tanto in tanto
 - Centrifugare le cellule 1000 g 15' 4°C
 - Eliminare il supernatante
 - Risospendere il pellet in 500 mL di H₂O (4°C) (50 mL per 10 falcon 50)
 - Centrifugare 1000 g 20' 4°C
 - Eliminare il supernatante
 - Risospendere il pellet in 250 mL di glicerolo (Sigma) 10% (25 mL per 10 falcon 50)
 - Centrifugare 1000 g 20' 4°C
 - Eliminare il supernatante
 - Risospendere il pellet in 10 mL di glicerolo (Sigma) 10% (1 mL per 10 falcon 50)
 - Centrifugare 1000 g 20' 4°C
 - Eliminare tutto il supernatante
 - Risospendere il pellet in 1 mL totale di GYT freddo (+4°C) agitando delicatamente, non mescolando vigorosamente o pipettando
 - Aliquotare 40 uL di cellule per ogni tubo da 1.5 mL
 - Conservare subito a -80°C

- Protocollo per l'elettroporazione di *E. coli*
 - Preraffreddare le cuvette a -20°C (Kartel)
 - Aggiungere ad un'aliquota di cellule appena scongelate da -80°C una quantità di DNA fra 10 pg e 25 ng in volumi di 1-2 uL
 - Incubare 10' RT
 - Elettroporare a 1.8 V (BioRad)
 - Risospendere velocemente le cellule in 1 mL di terreno SOB
 - Incubare 1h 37°C
 - Piastrare 100 uL su piastre SOB Agar + MgSO₄ 20mM + antibiotico selettivo
 - Centrifugare i restanti 900 uL 1' 20000 g
 - Eliminare il sopranatante e risospendere le cellule in 100 uL di SOC
 - Piastrare tutto su piastre SOB Agar + MgSO₄ 20mM + antibiotico selettivo
 - Incubare 16 h 37°C

- Protocollo per PCR Colony
 - Stemperare la colonia di *E. coli* in 20 uL di H₂O e ristisciarla su piastre di terreno LB + antibiotico selettivo
 - Reazione di PCR con opportuni primer e 5 uL /20 di H₂O in cui si è precedentemente stemperata la colonia

- Protocollo per Mini Prep da *E. coli*

- Inoculare una singola colonia batterica in 5 mL di terreno LB + antibiotico selettivo
- Incubare 16 h 37°C 170 rpm
- Centrifugare 1.5 mL della coltura in provetta da 2 mL 3' a 18000 g
- Eliminare il supernatante
- Centrifugare altri 1.5 mL di coltura nella stessa provetta da 2 mL 3' a 18000 g
- Eliminare il supernatante
- Aggiungere 100 uL GTE (Glicerol Tris EDTA)
- Aggiungere 200 uL di una miscela di NaOH 0.2 M e SDS 1%
- Mescolare 10' per la rottura delle membrane
- Aggiungere 150 uL di KOAc 3 M pH 5.0 (+4°C)
- Mescolare delicatamente per inversione 10''
- Incubare in ghiaccio 5' (precipitazione DNA genomico, il plasmidico resta in soluzione)
- Centrifugare 17000 g 5' 4°C
- Recuperare il supernatante
- Aggiungere 5 uL RNAasi A 10mg/mL Sigma
- Incubare 1 h 37°C
- Aggiungere 450 uL di Phe/CH3Cl (Sigma)
- Agitare vigorosamente 30''
- Centrifugare 3' 4°C 15000 g
- Trasferire il supernatante in una nuova eppendorf
- Aggiungere 450 uL di CH3Cl (Sigma)
- Agitare vigorosamente 30''
- Centrifugare 3' 4°C 15000 g
- Trasferire il supernatante in una nuova eppendorf
- Aggiungere 900 uL EtOH 100%
- Incubare almeno 1 h -20°C
- Centrifugare 30' 4°C 20000 g
- Lavare con EtOH 70%
- Centrifugare 15' 4° 20000 g
- Eliminare il supernatante e far seccare il pellet
- Risospendere in H2O

• Protocollo per Mini Prep Qiagen

- Inoculare una singola colonia in 2 mL (x 2) di terreno LB + antibiotico selettivo
- Incubare 6 h 37°C 170rpm
- Aggiungere i 2 mL di coltura a 48 mL di terreno LB + antibiotico selettivo fresco (x 2)
- Incubare 16 h 37°C 170 rpm
- Centrifugare i 100 mL totali (in 2 falcon da 50 mL) 6000 g 15' 4°C
- Eliminare il supernatante
- Risospendere i pellet in 4 mL di Buffer P1 (+4°C) con RNAasi A 10mg/mL Sigma
- Agitare vigorosamente
- Aggiungere 4 mL di Buffer P2
- Mescolare delicatamente 4-6 volte –non agitare vigorosamente-
- Incubare RT 5' –non oltre-
- Aggiungere 4 mL di Buffer P3
- Mescolare delicatamente 4-6 volte
- Incubare in ghiaccio 15'
- Centrifugare 10600 g 30' 4°C
- Recuperare il supernatante
- Ricentrifugarlo 10600 g 15' 4°C
- Recuperare il supernatante
- Equilibrare la QIAGEN-TIP 100 con 4 mL di Buffer QBT
- Far svuotare la colonna per gravità
- Mettere il supernatante in colonna e lasciarlo eluire per gravità
- Lavare la colonna con 2 x 10 mL di Buffer QC
- Eluire il DNA con 5 mL di Buffer QF

- Precipitare il DNA con isopropanolo, mescolare
- Centrifugare 15000 g 30' 4°C
- Lavare il pellet con EtOH 70%
- Centrifugare 15000 g 10' 4°C
- Eliminare il supernatante e far seccare il pellet
- Risospendere in 200 uL di H₂O

- Protocolli di digestione enzimatica

Digestione con Age I

Reagente	Concentrazione finale
Buffer NEB1BioLabs 10X	1X
Spermidina Sigma 6.3 mM	0.1 mM
Enzima AGE I BioLabs 5U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	10 ug
H ₂ O	A volume (100 uL)

Incubare 16 h 37°C

Digestione con Bsp EI

Reagente	Concentrazione finale
Buffer NEB3 BioLabs 10X	1X
Enzima Bsp EI BioLabs 10U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H ₂ O	A volume (25 uL)

Incubare 3 h 37°C

Digestione con Hind III

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer R+ (Fermentas) 10X	1X
Enzima Hind III (Fermentas) 10U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	150 ng
H ₂ O	A volume (20 uL)

Incubare 3 h 37°C

Digestione con Nhe I

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB2 (BioLabs) 10X	1X
BSA 10X	1X
Enzima Nhe I (BioLabs) 5U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H2O	A volume (20 uL)

Incubare 3 h 37°C

Digestione con Xho I

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB2 (BioLabs) 10X	1X
BSA 10X	1X
Enzima Xho I (BioLabs) 20U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H2O	A volume (20 uL)

Incubare 3 h 37°C

Digestione con Bst XI

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB3 (BioLabs) 10X	1X
Enzima Bst XI (BioLabs) 10U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H2O	A volume (25 uL)

Incubare 6 h 55°C

Digestione con Nde I

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB4 BioLabs) 10X	1X
Enzima Nde I (BioLabs) 20U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H2O	A volume (25 uL)

Incubare 16 h 37°C

Digestione con Eco RV

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB3 (BioLabs) 10X	1X
BSA 10X	1X
Enzima Eco RV (BioLabs) 5U/ uL	1U/100 ng DNA
DNA	300 ng
H2O	A volume (25 uL)

Incubare 2 h 37°C

- **Protocollo di defosforilazione**

Defosforilazione con Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)

Reagenti	Concentrazione finale
Buffer NEB4 BioLabs 10X	1X
Enzima CIP BioLabs 10U/ uL	0.5U/ug DNA
DNA	10 ug
H2O	A volume (100 uL)

Incubare 60' 37°C

- **Elettroeluzione di DNA da gel d'agarosio**

Pretrattamento delle membrane da dialisi (dialysis tubing Sigma)

- Rimuovere la glicerina lavando i tubi con H2O in agitazione per 3-4 h
- Rimuovere i componenti sul furei trattando i tubi con 0,3% (peso/volume) di solfito di sodio a 80°C 1'
- Lavare con H2O calda (60°C) 2' seguita da acidificazione con 0,2% (volume/volume) di acido solforico
- Risciacquare con H2O calda per rimuovere l'acido
- Riporre a RT

- Bollire le membrane 10' in 2% di NaHCO₃ (Sigma) e EDTA (Sigma) 1 mM pH 8.0
- Lavarle con H2O distillata
- Bollirle 10' in EDTA 1 mM pH 8.0
- Lasciarle raffreddare in H2O distillata (sommerse)
- Conservarle a +4°C

Elettroeluzione

- Chiudere la membrana da dialisi con una clip ed inserire la fetta d'agarosio tagliata
- Aggiungere un certo volume di TAE 1X (proporzionale alle dimensioni della fettina di gel)
- Chiudere l'altra estremità della membrana con la clip evitando le bolle d'aria
- Corsa in tampone TAE 1X a 4-5 V/cm per 2-3 h
- Invertire la polarità 1'

- Rimuovere il tampone TAE dalla membrana e lavarla con del tampone fresco (100 uL)
 - Precipitazione del DNA elettroeluito con NaOAc 3M pH 5.2 (1/10 vol) ed EtOH 100% (2.5 VOL)
 - Colorazione con EtBr delle fettine di gel per verificare l'eluizione
- Trasformazione di lievito JEL 1 Δ top1 con sali (litio acetato)
 - Inoculare una colonia singola in 10 mL di YP liquido
 - Incubare 16 h 30°C 170 rpm
 - Leggere la densità ottica finché non diventa 1
 - Controllare i lieviti al microscopio ottico
 - Centrifugare i 10 mL di coltura 800 g 5' RT
 - Eliminare il surnatante
 - Lavare le cellule e pellettate con 1 mL di soluzione A
 - Centrifugare 800 g 5' RT
 - Eliminare il surnatante
 - Risospendere le cellule in 1/100 del volume iniziale (100 uL) di soluzione A
 - Aggiungere 100 ug di DNA Salmon Sperm (prebollito 5') Sigma
 - Aggiungere per ogni trasformazione 50 ng DNA
 - Aggiungere 0.7 mL di soluzione C
 - Risospendere bene le cellule
 - Incubare 1 h 30°C 170 rpm e invertire i tubi di tanto in tanto
 - Heat Shock in bagno caldo a 42°C 15'
 - Centrifugare 12000 g 5'' RT
 - Aspirare il supernatante con la pipetta
 - Lavare il pellet con 1 mL di TE 1X e risospendere bene le cellule
 - Centrifugare 12000 g 5'' RT
 - Aspirare il supernatante
 - Risospendere in 100 uL TE 1X e piastrare 100 uL su terreno selettivo URA- agar
 - Incubare 30°C

Soluzione A

- LiAc (Fluka) 0.1 M
- Tris HCl 10mM pH 7.5-8.0
- Na₂EDTA (Sigma) 1mM

Soluzione C

- PEG 4000 40% Sigma
- LiAc (Fluka) 0.1 M
- Tris HCl 10mM pH 7.5-8.0
- Na₂EDTA (Sigma) 1mM

TE 1X

- Tris HCl 10mM pH 7.5
- Na₂EDTA (Sigma) 1mM

- Protocollo per le Mini Prep da lievito

- Inoculare una singola colonia di lievito in 10 mL di terreno selettivo URA-
- Incubare 30°C 40 h 170 rpm
- Centrifugare la coltura 800 g 10' RT
- Eliminare il supernatante
- Lavare con 10 mL H₂O sterile

- Centrifugare 800 g 10' RT
 - Eliminare il supernatante
 - Risospendere in 800 uL di soluzione: LiCl (Sigma) 2.5M, Tris 50mM pH8.0, Na2EDTA (Sigma) 62.5mM, Triton X-100 (Sigma) 4%
 - Aggiungere lo stesso volume di glass bits (Sigma)
 - Agitare vigorosamente 2'
 - Centrifugare 2' RT 18000 g
 - Recuperare il supernatante
 - Aggiungere 4 uL RNAasi A 10mg/mL Sigma
 - Incubare 5' 37°C
 - Aggiungere Proteinasi K 0.1 mg/mL (Invitrogen)
 - Incubare 60' 60°C
 - Aggiungere ugual volume di fenolo: cloroformio (Sigma)
 - Centrifugare 1600 g 3' 4°C
 - Recuperare la fase superiore
 - Ripetere l'estrazione con fenolo: cloroformio
 - Aggiungere ugual volume di cloroformio (Sigma)
 - Centrifugare 1600 g 3' 4°C
 - Recuperare la fase superiore
 - Precipitare con NaOAc 3M pH5.2 (1/10 vol) ed EtOH 100% (2.5 vol)
- GATEWAY TECNOLOGY (Invitrogen)

BP recombination reaction

Reagenti	Concentrazioni finali
AttB-PCR product	40-100 fmol
pDONR221 vector	300 ng
5X BP clonase reaction buffer	1 X
TE buffer pH 8.0	A volume (16 uL)
BP clonase enzyme mix	4 uL

- Mescolare bene la reazione (vortex 2 volte per 2 secondi)
- Incubare a 25°C per 1 h
- Aggiungere 4 ug di Proteinasi K. Incubare per 10 minuti a 37°C
- Procedere alla trasformazione delle cellule competenti.

LR recombination reaction

Reagenti	Concentrazioni finali
Entry clone	100-300 ng
pT-RexT-DEST30 vector	600 ng
5X LR clonase reaction buffer	1 X
TE buffer pH 8.0	A volume (16 uL)
LR clonase enzyme mix	4 uL

- Mescolare bene la reazione (vortex 2 volte per 2 secondi)
- Incubare a 25°C per 1 h
- Aggiungere 4 ug di Proteinasi K. Incubare per 10 minuti a 37°C
- Procedere alla trasformazione delle cellule competenti.

Primer usati per il sequenziamento

pDest seq	5'- GGAGGTCTATATAAGCAGAG -3'
Toposeq 2b	5'- GAGCCTCTTCCAGAGAATGT -3'
Toposeq 3b	5'- GTCCGGCATGATAACAAGGT -3'
Sere 44	5'- CCGTGCCAATCGAGCTGTTGC -3'
Sere 55	5'- GGCTGTTCAGAGACTGGAGG -3'
Leo44	5'- CCTACAAC TATTTATGGAGAACAAGC -3'

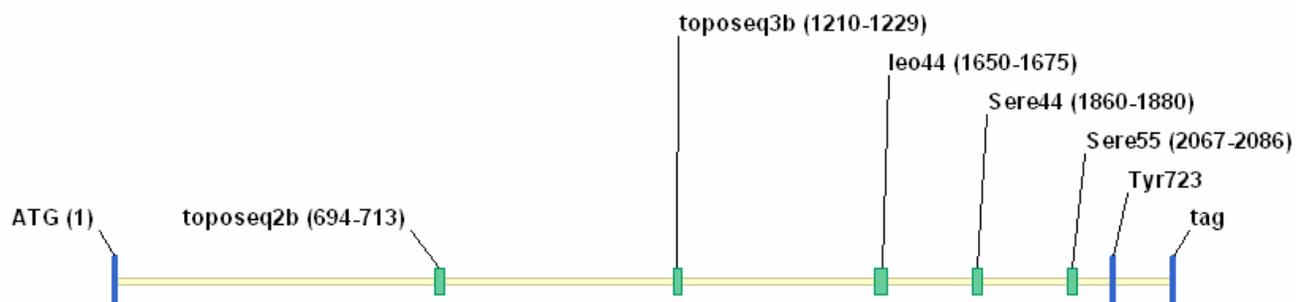


Fig.15: Mappa dei primer usati per il sequenziamento di Top1.

CAPITOLO 3

Risultati

3.1 EFFETTI DIVERSI DELLA CAMPTOTECINA E DELLA α -AMANITINA SUL LEGAME DELLE PROTEINE POL II, TBP E TOPO I ALLA CROMATINA.

Uno degli effetti noti della camptotecina (CPT) sulle cellule in coltura è quello di provocare l'inibizione della sintesi dell'RNA messaggero (9). L'ipotesi più accreditata è che tale effetto sia da ricondurre alla collisione tra i complessi ternari Topo I-DNA-camptotecina bloccati sulla cromatina e l'RNA polimerasi II (Pol II) in fase di elongazione lungo le sequenze trascritte (9). La prima conseguenza di tali scontri sarebbe l'accumulo di Pol II lungo il gene e in particolare al 5' delle sequenze trascritte (45).

Per verificare questa ipotesi siamo partiti dal confronto dell'effetto della CPT e dell' α -amanitina sui livelli di Pol II, TBP e Top1 legate alla cromatina trascritta in cellule umane Jurkats in coltura. L' α -amanitina, è un inibitore specifico della subunità maggiore di Pol II, che blocca direttamente la traslocazione dell'enzima lungo lo stampo e, quindi, dovrebbe incrementare i livelli di Pol II legata alla regione trascritta (106-109).

Pol II, TBP e Top1 sono state mappate lungo una porzione di 5 kbp del locus umano HIST1 (cromosoma 6), che comprende i geni H2AB e H3B codificanti per gli istoni canonici ciclo-dipendenti H2A e H3, rispettivamente. I siti di legame delle proteine alla cromatina sono stati mappati con la ChIP e i livelli del DNA recuperato misurati con la real-time PCR su 10 frammenti di 200-250 bp uniformemente spazati lungo il locus. I frammenti usati come controllo sono una regione alfa satellite centromerica sul cromosoma 2 (risultato non mostrato) e l'esone 1 del gene MYOD, non trascritto nelle cellule Jurkats usate. Innanzitutto, sono stati studiati i livelli delle proteine legate al DNA in cellule di controllo e, poi, questi sono stati confrontati con quelli misurati in cellule trattate con CPT (10 μ M per 1 ora) e con α -amanitina (2 μ M per 2 ore) in condizioni di crescita esponenziale. Le dosi ed il tempo scelti per i trattamenti non

sono sufficienti per la degradazione proteasomica di Pol II e di Top1 conseguente ai trattamenti farmacologici. Infatti, l'emivita della subunità maggiore della di Pol II è 4-8 ore in presenza di 5-20 μM di α -amanitina (107); e la degradazione di Pol II e Top1 sono state osservate dopo trattamenti di 3-6 ore con 25 μM di CPT (49).

Nella cromatina di controllo, Pol II si localizza preferenzialmente nelle regioni trascritte (segmenti C, D, F, G) ed in quantità minore, nelle regioni adiacenti ai 3' (segmenti E, H). I recuperi su H3B sono più alti rispetto ad H2AB (Fig.16) il che rispecchia i differenti livelli di trascrizione che caratterizzano i due geni: mediante RT-PCR (dati non mostrati) abbiamo osservato che H3B è 23 volte più trascritto di H2AB; inoltre, la stabilità dei geni istonici ciclo-dipendenti è molto simile (110). TBP si trova specificamente nelle regioni C ed F che comprendono le sequenze TATA dei promotori. In accordo con la letteratura (58, 111), i dati dimostrano la presenza di Top1 sulla cromatina attivamente trascritta ed in particolar modo nelle regioni adiacenti ai 3' dei geni (Fig. 16). Non si registrano per le varie proteine, recuperi significativi sulla cromatina repressa dell' α -satellite e su quella silente di MyoD (Fig. 16).

Nella cromatina delle cellule trattate con camptotecina i livelli di Pol II sulle regioni trascritte sono marcatamente ridotti, al contrario i valori di TBP non cambiano (Fig. 16). Il gene H3B è molto più sensibile all'effetto del trattamento e la diminuzione di Pol II (3,8 volte su F e 2,3 volte su G) qui è più marcata rispetto a quella su H2AB. La distribuzione di Top1 dopo esposizione al farmaco, sebbene meno riproducibile, risulta alterata: si osserva una diminuzione nelle posizioni G ed E, mentre in nessuna posizione si evidenzia un significativo aumento (Fig. 16). Inaspettatamente la camptotecina non determina un accumulo di Pol II lungo il gene trascritto, ma interferendo con l'attività della Top 1, ne influenza i livelli sui promotori lasciando inalterato il legame di TBP alla cromatina. (Fig. 16).

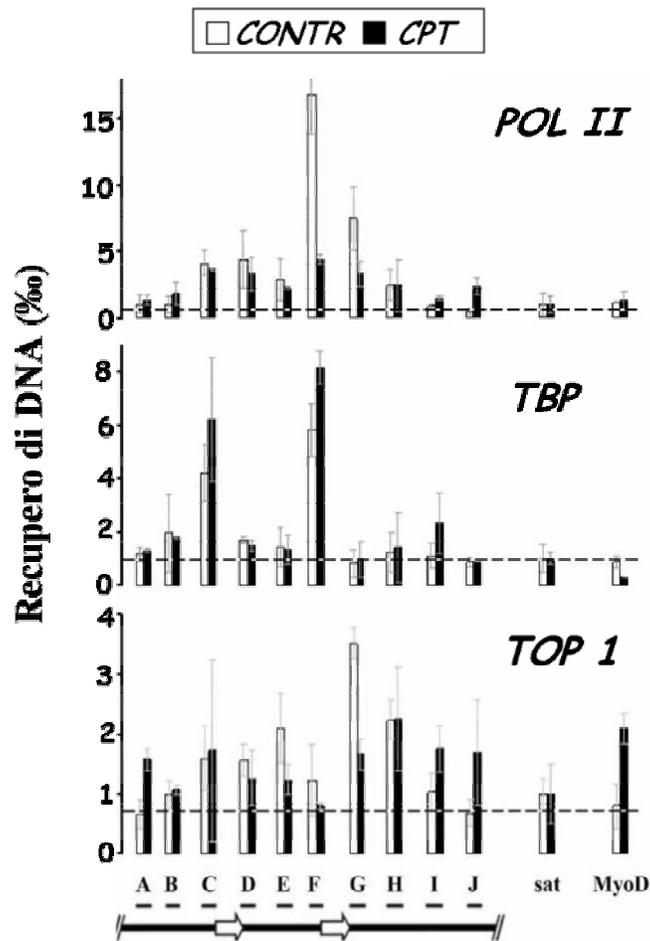


Figura 16. Effetto della camptotecina sul legame della RNA Pol II, di TBP e di Topo I alla cromatina nel locus istonico H2AFM-H3FL in cellule umane Jurkats. Ogni grafico mostra i livelli delle proteine indicate legate alla cromatina, in cellule di controllo (colonne bianche) ed in cellule trattate (CPT 10 μ M per un'ora; colonne nere). Le frecce rappresentano i due geni istonici H2AB e H3B; sat indica una regione di DNA ripetuto, l' α -satellite, sul cromosoma 2; MyoD indica l'esone 1 del gene MYOD. I valori nei grafici rappresentano la media dei risultati ottenuti dalle analisi con la rtPCR del DNA immunoprecipitato ciascuna ripetuta almeno due volte. I recuperi di DNA provenienti da 3 - 6 esperimenti indipendenti, sono normalizzati per il valore massimo. Le linee tratteggiate mostrano il livello di background cioè il recupero aspecifico di DNA ottenuto con l'anticorpo IgG (NON IMMUNE).Le barre indicano gli errori standard.

La risposta all' α -amanitina che, come la camptotecina, è in grado di influenzare i livelli d'espressione genica cellulare (vedi in basso), è molto diversa. Il trattamento con l' α -amanitina non altera i recuperi dell'enzima sui promotori considerati, tuttavia riduce i livelli di TBP legato alla cromatina (Fig. 17).

Abbiamo misurato l'attività di inibizione della trascrizione da parte dei due agenti alle nostre condizioni sperimentali attraverso esperimenti di run-on (non mostrati). I risultati hanno mostrato che camptotecina ed α -amanitina provocano su H3B e H2AB una riduzione dei trascritti del 94% e 73% rispettivamente.

Quindi, i due farmaci hanno una efficacia molto simile come inibitori della trascrizione, pur avendo effetti diversi sulla cromatina. In particolare, la camptotecina altera la distribuzione di Top1 e riduce i livelli di Pol II sui promotori, ma questi restano inalterati dopo esposizione ad α -amanitina.

Questi risultati suggeriscono una differenza nei meccanismi d'inibizione della trascrizione da parte dei due farmaci, che probabilmente intervengono su tale processo in momenti diversi: l' α -amanitina, com'è noto, influenza la fase d'elongazione, la camptotecina, riducendo i livelli di Pol II anche sul promotore, potrebbe intervenire, oltre che durante l'elongazione, nelle fasi più precoci della trascrizione.

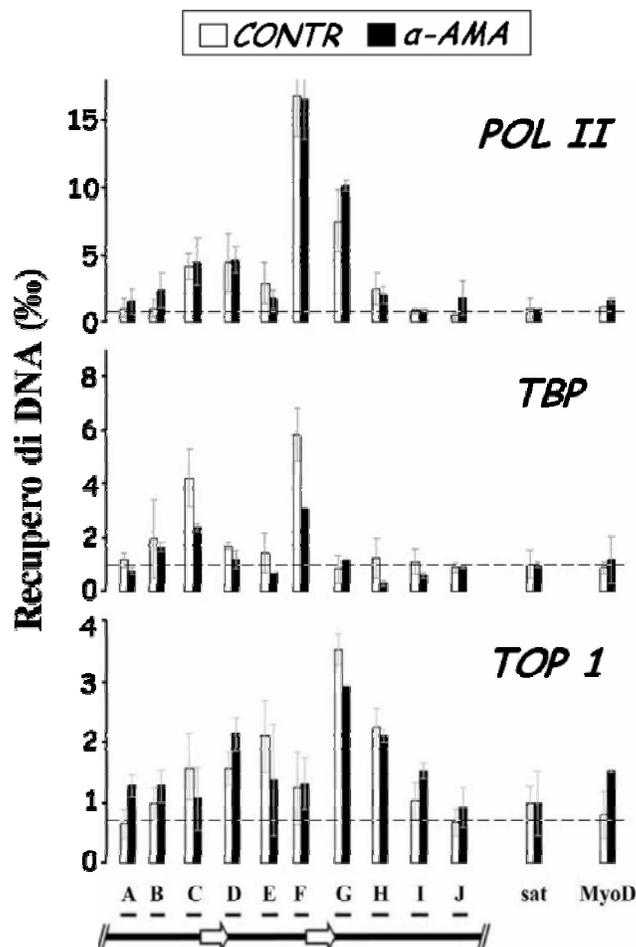


Figura 17. Effetto dell' α -amanitina sul legame di Pol II, TBP e Top 1 alla cromatina lungo il locus istonico H2AFM-H3FL in cellule umane Jurkats. Il trattamento consiste nella somministrazione di α -amanitina 2 μ M per 2 ore. Le linee tratteggiate indicano il recupero aspecifico (NON IMMUNE). Le barre indicano gli errori standard.

3.2 EFFETTI DIVERSI DELLA CAMPTOTECINA E DELLA α -AMANITINA SULLA STRUTTURA DELLA CROMATINA.

Dal momento che i due inibitori studiati hanno effetti così diversi sulle proteine legate alla cromatina (Pol II e TBP), ci siamo chiesti se tali cambiamenti potessero essere dovuti ad alterazioni della struttura della cromatina indotte dai farmaci stessi, che la rendessero più o meno accessibile. Quindi, abbiamo misurato i livelli di H1 e di acetilazione degli istoni H3 (K9ac e K14ac) e H4 (K5ac, K8ac, K12ac e K16ac) lungo

lo stesso locus istonico. La presenza di H1 e l'acetilazione di H3 e H4 hanno un'azione opposta nel regolare l'accessibilità della cromatina.

I livelli di acetilazione di H3 e H4 nelle cellule di controllo sono molto elevati nel locus istonico rispetto a rispetto all' α -satellite e MyoD (Fig.18 e 19). In particolare, l'istone H3 è più acetilato nelle regioni intergeniche E e D. Similmente, il livello massimo di acetilazione di H4 si osserva in E. In prossimità delle regioni dei promotori (C e F) l'acetilazione di H3 e H4 raggiunge i livelli minimi. In F l'acetilazione di H4 è simile a quella dell' α -satellite e di MyoD, il che suggerisce che la densità di nucleosomi in prossimità dei promotori è molto ridotta. Inoltre, data l'elevata acetilazione degli istoni nei siti intergenici, è ipotizzabile la presenza di un elemento di regolazione in E. La presenza di H1 lungo tutto il locus istonico è significativamente inferiore rispetto all'eterocromatina dell' α -satellite e a MyoD (Fig. 18 e 19).

Dopo il trattamento con α -amanitina, l'istone H1 aumenta nel frammento E e meno significativamente in G e I (Fig.19), mentre la CPT causa una certa generale diminuzione di H1 lungo il locus studiato, eccetto che nei frammenti B, H e I (Fig.18). Inoltre, mentre l' α -amanitina non ha molto effetto sull'acetilazione di H3 e H4, la CPT ne induce un aumento (Fig.18 e 19). E' interessante notare che l'acetilazione di H4 aumenta in modo specifico in C, D e in G, H e I, che corrispondono alle regioni trascritte o a quelle immediatamente al 3'; invece, non si osservano alterazioni nelle regioni genomiche represses.

Nel complesso questi risultati dimostrano che le risposte molecolari alla α -amanitina e alla camptotecina sono caratterizzate da effetti diversi sui livelli di H1 e dell'acetilazione di H3 e H4 lungo il locus studiato, sebbene entrambi gli agenti bloccherebbero la traslocazione di Pol II. In particolare, la camptotecina promuove le modificazioni degli istoni, suggerendo una conformazione della cromatina più accessibile e, perciò, escludendo la possibilità che la ridotta densità di Pol II possa essere dovuta a una transizione della struttura locale della cromatina a una conformazione più chiusa.

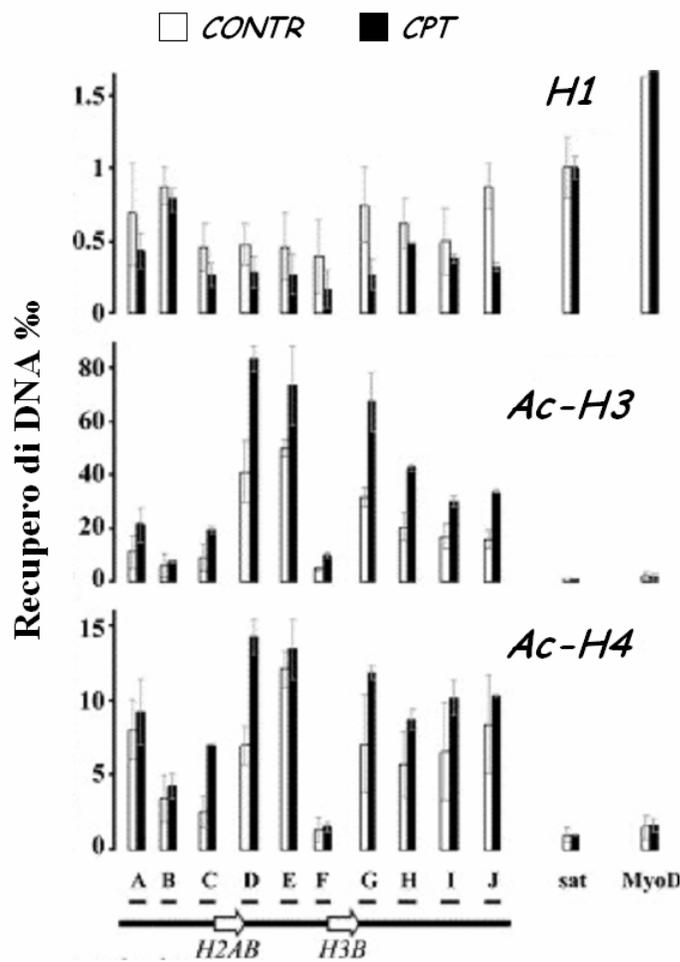


Figura 18. Effetto della camptotecina sulle modificazioni degli istoni nel locus istonico H2AFM-H3FL in cellule umane Jurkats. Il grafico mostra i livelli di H1 (H1) o degli istoni H3 acetilato in K9 e K14 (Ac-H3) e H4 acetilato in K5, K8, K12 e K16 (Ac-H3) in cellule di controllo (colonne bianche) ed in cellule trattate (CPT 10 μ M per un'ora; colonne nere). I recuperi relativi medi per non-immune IgG sono 0.02, 0.17 e 0.04 rispettivamente per l'istone H1 e gli istoni acetitati H3 e H4.

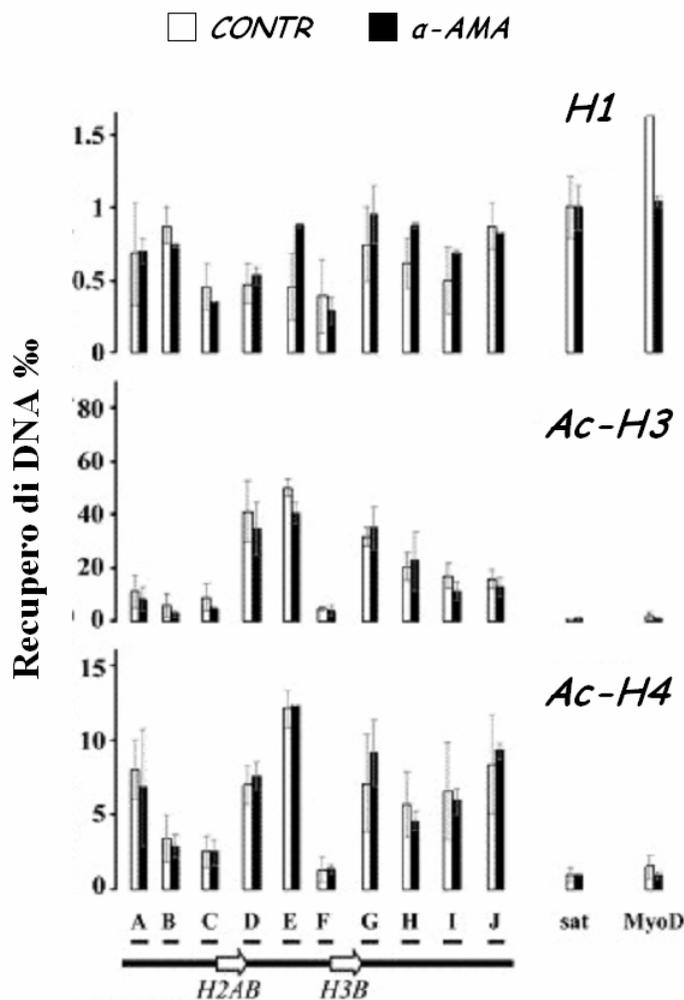


Figura 19. Effetto dell' α -amanitina sulle modificazioni degli istoni nel locus istonico H2AFM-H3FL in cellule umane Jurkats.

Il grafico mostra i livelli di H1 (H1) o degli istoni H3 acetilato in K9 e K14 (Ac-H3) e H4 acetilato in K5, K8, K12 e K16 (Ac-H3) in cellule di controllo (colonne bianche) ed in cellule trattate (α -amanitina 2 μ M per 2 ore; colonne nere).

3.3 LA RIDUZIONE DEI LIVELLI DI POL II SUI PROMOTORI E' UNA RISPOSTA IMMEDIATA E INDIPENDENTE DALLE ROTTURE DOPPIE DEL DNA IN SEGUITO AL TRATTAMENTO CON CAMPTOTECINA.

Poiché la riduzione dei livelli di Pol II in seguito al trattamento con CPT è un effetto inatteso, rispetto al suo accumulo lungo i geni, ci siamo chiesti se il fenomeno fosse comune ad altri loci trascritti e abbiamo cercato di avere maggiori informazioni sulle caratteristiche temporali dell'effetto stesso.

Pertanto, l'analisi è stata estesa a geni più lunghi di H3B come c-MYC e GAPD. Nell'esperimento sono stati quantificati, a tempi diversi di trattamento con camptotecina, i livelli di Pol II sulle regioni prossime ai promotori e contenenti le regioni TATA di H3B, GAPD e MYC, nonché sull' α -satellite (Fig. 20). Nelle cellule non trattate (tempo 0) i recuperi di Pol II sono più alti sul promotore del gene GAPD, mentre sono paragonabili sugli altri due promotori. Nelle cellule trattate con camptotecina i livelli di Pol II nelle regioni studiate diminuiscono con cinetiche molto simili: la riduzione si osserva molto precocemente (10 minuti) per poi diventare rilevante dopo 30 minuti (Fig. 20).

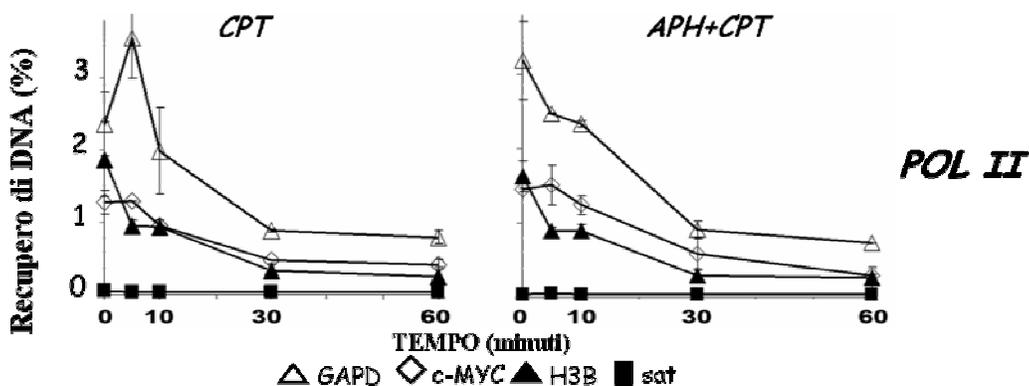


Figura 20. Cinetica di Pol II sui promotori di geni trascritti in cellule Jurkats. Le cellule sono trattate con camptotecina (10 μ M per 10, 30, 60minuti) o con camptotecina dopo pre-trattamento con afidilcolina (3 μ M per 15 minuti). I recuperi di DNA sono la media di 3 esperimenti indipendenti. Nel grafico sono riportati anche i valori di recupero ottenuti sull' α -satellite che fungono da controllo dell'esperimento.

Alle stesse condizioni di trattamento abbiamo anche analizzato la cinetica di fosforilazione della variante istonica H2AX (γ -H2AX), che ci ha permesso di ottenere importanti informazioni sui tempi di comparsa delle doppie rotture. Infatti, la comparsa della forma fosforilata di H2AX

in prossimità dei siti di doppia rottura è ritenuta un precoce segnale della presenza di un danno al DNA (36). Dall'esperimento (Fig. 21) si osserva che γ -H2AX appare solo a 30 minuti di trattamento con camptotecina. Quindi, il calo di densità di Pol II sui promotori analizzati è un evento più precoce rispetto alla fosforilazione di H2AX.

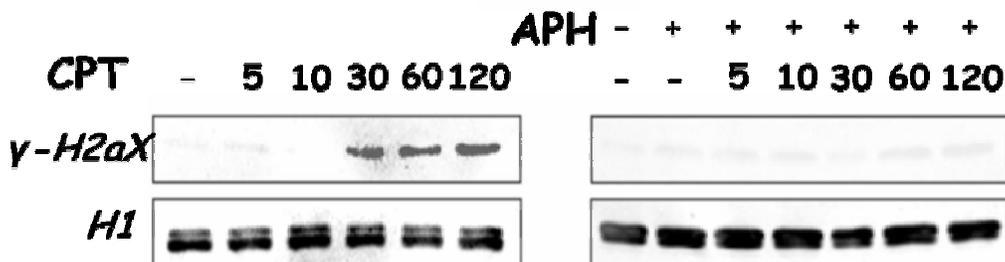


Figura 21. Cinetica di fosforilazione di H2AX. Le cellule Jurkats sono trattate con camptotecina (10 μ M per 5, 10, 30, 60 e 120 minuti) o con camptotecina ed afidicolina (pre-trattamento 3 μ M per 15 minuti). L'istone H1 rappresenta il controllo della quantità di lisato caricata.

Poiché gli effetti molecolari maggiori della CPT sono dovuti alla collisione tra forza le replicative e la Top1 bloccata sul DNA (9, 34, 112, 113), ci siamo chiesti se il decremento di Pol II osservato fosse secondario alle rotture a doppio filamento provocate da tali eventi. Dunque, abbiamo somministrato la camptotecina alle cellule previo trattamento con afidicolina, un inibitore specifico della DNA Pol α . Dai test di citotossicità (dati non mostrati) avevamo osservato che cellule esposte a un trattamento con CPT 10 μ M per 1 ora manifestano un 60% di sopravvivenza, e, come atteso (9, 112), l'effetto citotossico è completamente abolito da un pretrattamento con afidicolina 3 μ M. Quindi, abbiamo trattato le cellule Jurkats con questa dose protettiva di afidicolina per 15 minuti e, poi, aggiunto CPT 10 μ M per 1 ora. Nonostante ciò, abbiamo, comunque, osservato una riduzione di Pol II sui promotori e con un andamento simile a quello ottenuto dopo il trattamento con sola camptotecina (Fig. 20). Al contrario, il trattamento con afidicolina previene la fosforilazione di H2AX (Fig. 21), indicando

una assenza di rotture doppie del DNA e, quindi, di collisioni tra le forche di replicazione e Top1.

In conclusione, dunque, la riduzione di Pol II sui promotori è indipendente dalla replicazione e/o dalle doppie rotture del DNA a livello delle forche di replicazione.

L'analisi è stata estesa anche a TBP. I risultati ottenuti mostrano che nella cromatina di controllo, i livelli della proteina sui promotori studiati sono grossolanamente proporzionali a quelli registrati per Pol II sulle stesse regioni (Fig. 22). I diversi trattamenti con sola CPT oppure con afidicolina e CPT non influenzano il legame di TBP alle regioni promotrici dei geni.

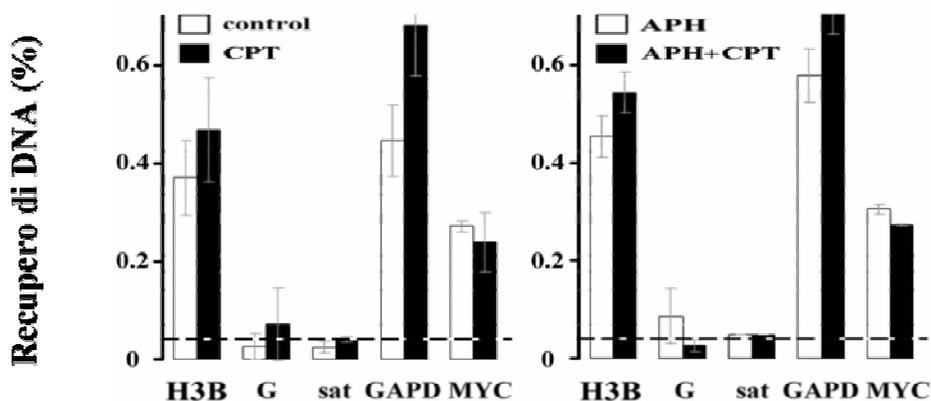


Figura 22. Mappaggio di TBP sulle regioni promotrici dei geni d'interesse. Le cellule Jurkats sono trattate con camptotecina (10 μ M per 1 ora), afidilcolina (3 μ M per 1 ora), o con afidilcolina (pre-trattamento 3 μ M per 15 minuti) e camptotecina. Nell'esperimento sono riportati anche i due controlli negativi rappresentati dall' α -satellite (sat) e dall'estremità 3' del gene H3B (G).

Per confrontare gli effetti della CPT con quelli dell' α -amanitina, abbiamo analizzato le cinetiche degli effetti di questa sul legame di Pol II nel locus istonico. Al contrario della CPT, non si osserva una diminuzione dei livelli di Pol II a nessun tempo del trattamento con l'inibitore. Anzi, pare che ci sia un aumento di Pol II al 3' dei geni entro la prima ora di trattamento (Fig. 23).

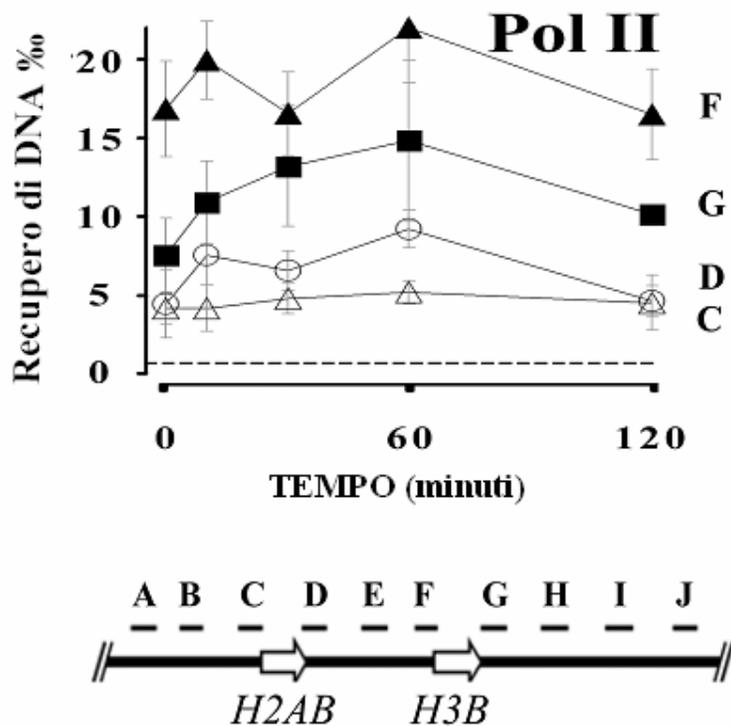


Figura 23. Cinetica di Pol II sui promotori dei geni istonici in cellule Jurkats. Le cellule sono state trattate con α -amanitina 2 μ M per 0, 10, 30, 60, 120 min. I valori riportati sono la media di 4 esperimenti indipendenti. La linea tratteggiata rappresenta il recupero aspecifico (NON IMMUNE).

In conclusione, i dati ottenuti e riportati finora dimostrano che la camptotecina promuove una riduzione della Pol II a livello dei promotori genici, il che rappresenta una risposta sensibile, specifica e precoce al farmaco, non correlabile con il fenomeno della replicazione del DNA. Il riscontrarla su più geni, ci permette di ipotizzare che sia una conseguenza piuttosto comune all'inibizione di Top1 sui loci trascritti.

3.4 DISTRIBUZIONE DI POL II LUNGO I GENI TRASCRITTI DOPO INIBIZIONE DI TOP1.

Quello che accade alla Pol II dopo trattamento con camptotecina risulta difficile da spiegare ricorrendo al modello della collisione, soprattutto considerando che una grossa quantità di Pol II è ferma (“paused”) in un sito prossimale al promotore ed è, quindi, poco

probabile che possa collidere. Allo scopo di ottenere maggiori dettagli sui precoci eventi molecolari indotti dal farmaco, è stato realizzato uno studio di cinetica della Pol II espandendo il mappaggio all'intera lunghezza dei geni c-MYC e GAPD.

L'analisi di c-MYC ci permette anzitutto di riscontrare un accumulo di Pol II sul promotore P2 (frammento M in Fig. 24). I livelli della proteina su questa regione sono marcatamente più alti rispetto ai recuperi registrati lungo la sequenza trascritta dove si arriva al 23%, 14%, 6% e 10% del recupero sul promotore, rispettivamente per i frammenti N, Q, R, S (Fig. 24). Questi dati sono coerenti con quanto presente in letteratura: il promotore P2 è, infatti, un noto sito di pausa per la RNA Pol II (114), in corrispondenza del quale diversi fattori comprendenti anche TFIIH, regolano finemente l'enzima nel suo arresto (115-117) e, di conseguenza, nella sua differente distribuzione lungo il gene. Durante il trattamento con camptotecina si verifica un progressivo decremento dei livelli di Pol II sul sito P2 ed un interessante incremento degli stessi all'interno del gene, senza mai, però, raggiungere i valori osservati sul promotore delle cellule non trattate. Diversamente da quanto accade sugli esoni 2 e 3 (frammenti Q e R in Fig. 24), dove i recuperi sembrano raggiungere il plateau tra 30 e 60 minuti di trattamento, nell'esone 1 (N, Fig. 24) all'aumento dopo 5 minuti segue subito una marcata e graduale diminuzione.

Anche sui promotori di GAPD e H3B, similmente a MYC, registriamo livelli di Pol II molto più alti rispetto alle sequenze interne attivamente trascritte, il che fa ipotizzare la presenza di un sito di pausa trascrizionale anche su questi geni (100, 101). La cinetica che si registra su GAPD tra promotore (U) ed esone 3 (V, posto a circa 2000 bp dal 5') ha un andamento molto simile a quello riscontrato su MYC tra sito P2 (M) ed esone 2 (Q, localizzato a 2050 bp dall'inizio della trascrizione) (Fig. 24). I livelli di Pol II sul promotore di GAPD calano dopo 30 minuti di trattamento, mentre aumentano progressivamente sull'esone 3 (Fig. 24).

Analogamente anche per il gene H3B, lungo solo 500 bp, i livelli di recupero dell'enzima sul promotore (F) subiscono un sostanziale calo dopo trattamento farmacologico, mentre a valle, a circa 450 bp dall'inizio della trascrizione (G), la curva ha un andamento a campana simile a quella tracciata sull'esone 1 di MYC (N) (Fig. 24).

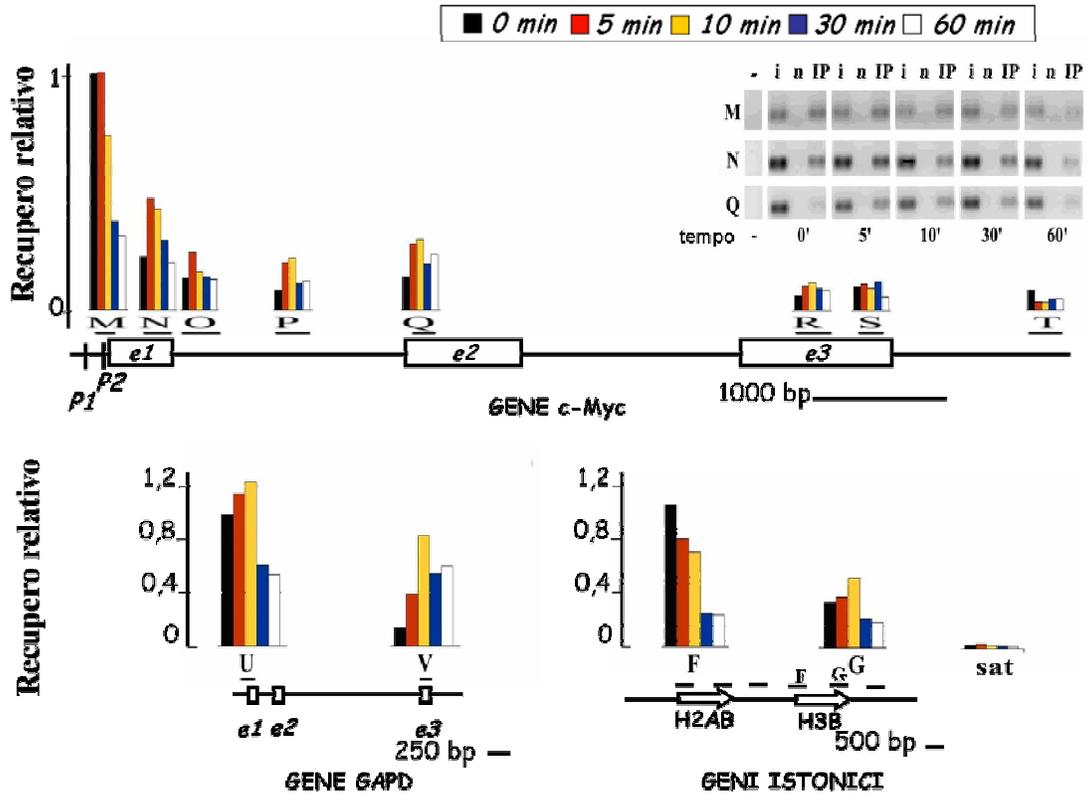


Figura 24. Cinetica di distribuzione di Pol II lungo i geni trascritti durante trattamento con camptotecina (10 μ M per 5, 10, 30, 60 minuti) in cellule umane Jurkats. Per ciascun gene, i recuperi di DNA (medie di 2 diversi esperimenti di ChIP) sono normalizzati sui valori massimi ottenuti nei controlli (M, U, F). I rettangoli numerati mostrano l'organizzazione degli esoni dei diversi geni. Per il gene MYC sono riportati anche i prodotti di PCR ricavati utilizzando il DNA input (cromatina sonicata non esposta ad anticorpi)(i), il NON IMMUNE (n) ed il DNA immunoprecipitato con l'anticorpo contro RNA Pol II (IP). I primer utilizzati corrispondono al promotore P2 (M) all'esone 1 (N) ed all'esone 2 (Q) del gene; la corsia di sinistra (senza templat) rappresenta il controllo della reazione di PCR.

Dunque, dopo esposizione alla camptotecina il legame di Pol II alla cromatina dei geni studiati mostra una dinamica peculiare.

L'allontanamento dell'enzima dal promotore verso il 3' del gene ricorda un'onda in movimento lungo la sequenza trascritta. Infatti, i livelli di Pol II internamente alla sequenza codificante sono progressivamente più bassi rispetto al promotore, indicando una diluizione dell'enzima via via che si muove lungo il gene. Al momento non possiamo escludere la presenza di siti di pausa interni ai geni che potrebbero influenzare anch'essi la distribuzione di Pol II.

Comunque, è evidente che l'inibizione di Top1 favorisce l'allontanamento della Pol II dal sito di pausa, suggerendo che l'enzima sia coinvolto nel controllo della transizione alla fase di elongazione della RNA Pol II.

3.5 L'EFFETTO DELLA CAMPTOTECINA SUL LEGAME DI POL II ALLA CROMATINA È SOPPRESSO DAL DRB, UN INIBITORE DELL'ELONGAZIONE.

L'ipotesi che la camptotecina favorisca il passaggio di Pol II alla fase di elongazione fa supporre che inibendo questa transizione si riesca a revertire l'effetto del farmaco. Quindi, ci siamo chiesti se le CDKs (cyclin-dependent kinases) che regolano la fase di elongazione della trascrizione fossero coinvolte negli effetti della CPT osservati. A tal proposito cellule umane Jurkats sono state sottoposte a cinque diversi trattamenti sperimentali consistenti in: somministrazione di DRB (50 o 100 μ M per 45 minuti), di camptotecina (10 μ M per 30 minuti), o di entrambi i farmaci (DRB 50 μ M o 100 μ M 15 minuti prima della somministrazione di CPT 10 μ M per 30 minuti). Il DRB (5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazolo) è un analogo nucleotidico il cui target molecolare è rappresentato dalle cinasi ciclina dipendenti che regolano l'elongazione (es.: CDK7 di TFIIH, CDK9 di P-TEFb) (77, 96). Nelle cellule incubate col solo DRB si manifesta un calo della Pol II sui promotori; in ogni caso il farmaco è in grado di revertire pienamente l'effetto della camptotecina anche se la risposta varia a seconda del gene

considerato (Fig. 25). In particolare, la riduzione di Pol II sul sito P2 di c-MYC (M) è sostanzialmente della stessa entità per i diversi trattamenti effettuati. Diversamente sui promotori di GAPD e H3B (U e F) il DRB riesce ad annullare il calo della proteina. La tendenza ad abolire l'effetto della CPT è riscontrabile anche nelle regioni trascritte interne ai geni (Q e V); in tal caso l'incremento dei livelli di Pol II, osservato dopo incubazione con l'inibitore, è pienamente annullato dall'azione del DRB. Ciò dimostra che l'elongazione di Pol II è bloccata in tali condizioni (Fig. 25).

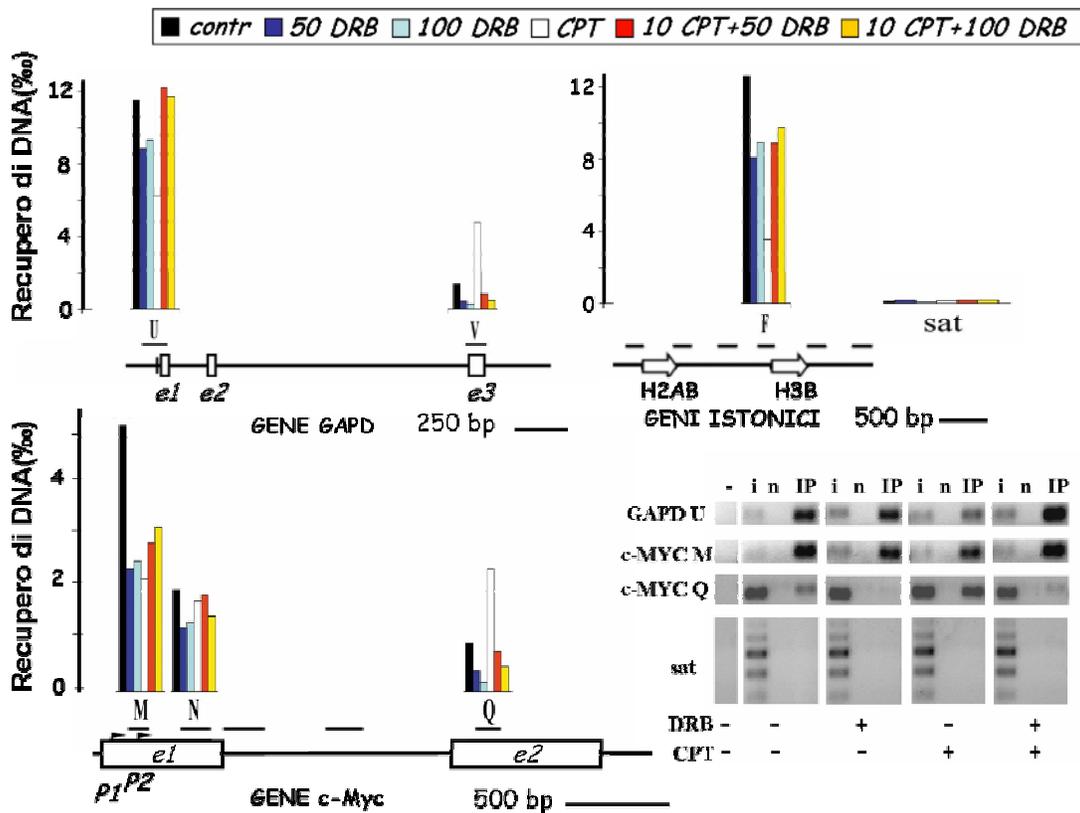


Figura 25. Effetto della camptotecina sul legame di Pol II alla cromatina in presenza del DRB, un inibitore dell'elongazione. Nel grafico sono riportati i recuperi di Pol II (%o) sui geni GAPD (U, V), H3B (F) MYC (M, N, Q) e sul DNA dell' α -satellite (sat). Tali valori sono le medie di 2 quantificazioni. Sono mostrati anche i prodotti di PCR ottenuti utilizzando il DNA input (i), il DNA immunoprecipitato con l'anticorpo non immune (n) e quello immunoprecipitato con l'anticorpo contro RNA Pol II (IP) utilizzando primers corrispondenti al promotore P2 (M), all'esone 2 di c-MYC (Q), al promotore di GAPD (U) e all' α -satellite.

I dati ottenuti dall' analisi di western blot eseguita sui lisati di cellule sottoposte agli stessi trattamenti della ChIP, confermano l'efficacia del DRB, in quanto evidenziano la netta inibizione della fosforilazione del CTD di Pol II (Fig. 26).

Quindi, interferendo con l'azione delle cdk, il DRB riesce a revertire la peculiare dinamica indotta dalla camptotecina su Pol II lungo i geni analizzati. I risultati riguardanti il promotore di MYC sono in linea con un possibile ruolo di cdk7 (TFIIH) nel reclutamento di Pol II sul sito P2 (115, 117, 118) e riflettono più in generale una differente regolazione del gene.

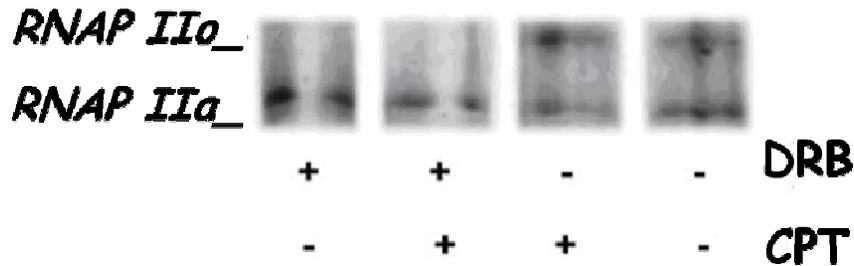


Figura 26. Analisi dello stato di fosforilazione di Pol II tramite analisi di western blot di lisati cellulari. Il western blot mostra le due forme della subunità maggiore di Pol II (iperfosforilata ed ipofosforilata) dopo trattamento con DRB (50 μ M per 45 minuti), con camptotecina (10 μ M per 30 minuti) o con entrambi i farmaci aggiungendo il DRB 15 minuti prima della camptotecina.

3.6 LA CAMPTOTECINA PROVOCA UN AUMENTO DELLA FORMA IPERFOSFORILATA DI POL II, MA NON ALTERA LA DISTRIBUZIONE NUCLEARE DEI FOCI DELL'ENZIMA.

Successivamente è stata valutata la possibilità che i trattamenti coi vari farmaci influenzassero il contenuto cellulare di Pol II tramite analisi di western blot e di microscopia. Nel primo caso, le cellule Jurkats sono state trattate con α -amanitina (2 μ M per 120 minuti) e camptotecina (10

μM per 30 e 60 minuti). Poi, sono state direttamente lisate per ebollizione in loading buffer o lisate in soluzione ipotonica per isolare i nuclei, da cui estrarre le proteine in presenza di 400 mM di sali.

Lo scopo delle analisi sui lisati e sugli estratti nucleari è anche di valutare eventuali variazioni di ciascuna delle forme di Pol II (Pol IIa, forma ipofosforilata, libera, competente per il reclutamento sul promotore; Pol IIo, forma iperfosforilata coinvolta nel processo di elongazione) dopo esposizione ai vari inibitori. In particolare, la valutazione sugli estratti nucleari è anche indicativa della frazione di proteina non fortemente associata alla cromatina, come quella non ancora reclutata sui promotori.

In assenza di trattamento osserviamo una prevalenza della forma Pol IIa sia nella frazione totale che nell'estratto nucleare. Il trattamento con camptotecina altera questa situazione provocando un aumento della forma Pol IIo rispetto alla Pol IIa, sia nei lisati cellulari che nell'estratto nucleare (Fig. 27).

Quindi, i risultati mostrano che il contenuto cellulare di Pol II non diminuisce dopo trattamento con camptotecina, pertanto la riduzione vista sui promotori studiati non è dovuta ad una sua complessiva riduzione nella cellula. Inoltre, l'incremento della frazione iperfosforilata nell'estratto nucleare fa ipotizzare un'inibizione del turn-over della proteina, che rimarrebbe bloccata nella forma Pol IIo non reclutabile nuovamente sui promotori. Ciò, insieme all'aumentata frequenza di allontanamento dal sito di pausa stimolata dal farmaco, potrebbe essere responsabile della caduta di Pol II osservata sui promotori stessi.

Similmente a Pol II, anche i livelli di TBP non variano dopo i trattamenti coi farmaci, mentre Top1 diminuisce leggermente dopo il trattamento con CPT, che probabilmente ne causa l'intrappolamento nella frazione del DNA ad alta massa molecolare (119) (Fig. 27).

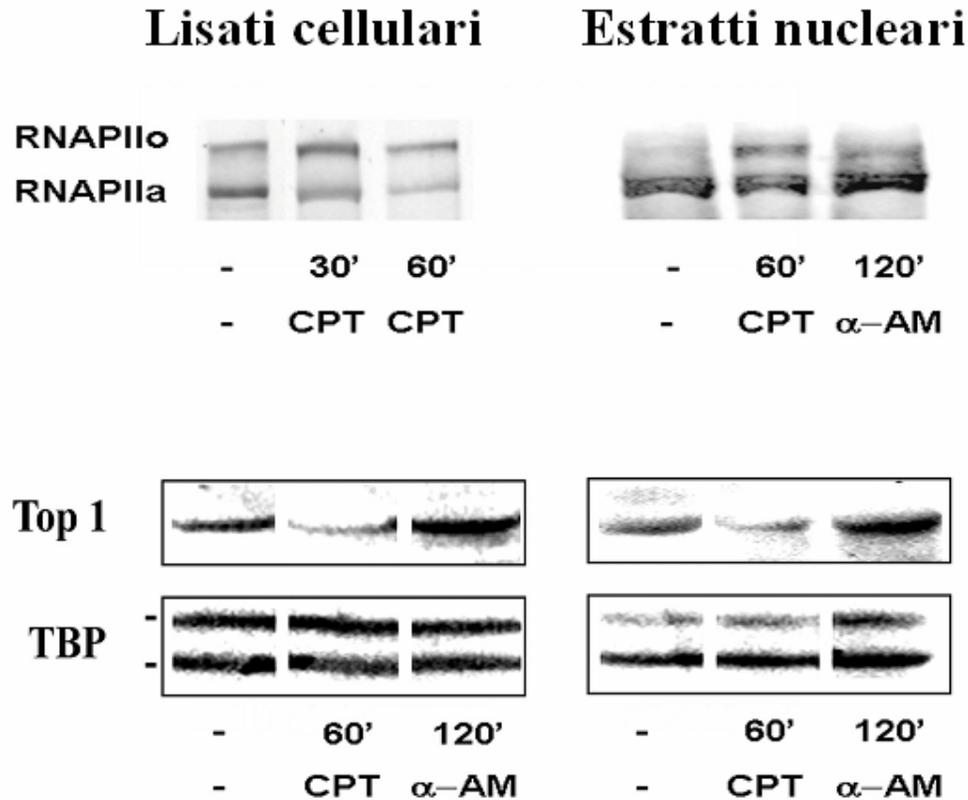


Figura 27. Determinazione di Pol II, Top1 e TBP tramite analisi di Western Blot di lisati cellulari ed estratti nucleari. RNA Pol Ilo e RNA Pol Ila sono rispettivamente le forme iperfosforilata e ipofosforilata della subunità maggiore di RNA Pol II. Le cellule sono trattate con 10 μ M di CPT e 2 μ M di α -amanitina. I tempi sono riportati sotto ogni corsia.

Un' ulteriore analisi dei livelli di Pol II intracellulari è stata condotta con la microscopia ottica, che mostra le "transcription factories" e le "replication factories" (120) rispettivamente come aggregati di RNA Pol II e di DNA ligasi I (Fig. 28 e 29). Nei nuclei di controllo i foci di RNA Pol II hanno un aspetto granulare e sono distribuiti in maniera omogenea nel nucleoplasma ad eccezione dei nucleoli, questa situazione è solo lievemente perturbata dalla camptotecina, anche dopo trattamenti più lunghi e concentrazioni più alte di farmaco (Fig.28). Diversamente le replication factories visualizzate nei nuclei in fase S come aggregati di DNA ligasi I (121), sono completamente distrutte dal farmaco (Fig.29).

Tale effetto è la conseguenza della collisione tra le forche replicative e i complessi ternari bloccati sul DNA (122, 123). Quindi, i risultati indicano che in una condizione in cui l'inibizione di Top1 danneggia irreversibilmente l'apparato replicativo e le "replication factories", il contenuto intracellulare di Pol II e le "transcription factories" non vengono sostanzialmente alterati.

Questi risultati sono coerenti con la presenza di una maggiore frazione di Pol II coinvolta nella fase di elongazione della trascrizione subito dopo l'esposizione delle cellule alla camptotecina.

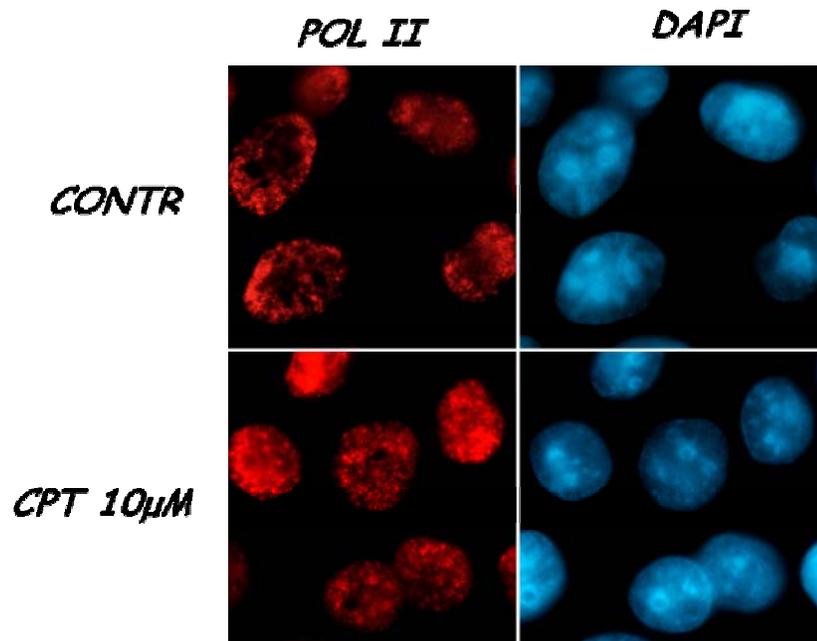


Figura 28. Effetto della camptotecina sulle transcription factories. Cellule HeLa sono state trattate con camptotecina 10 μ M per 2 ore. La colorazione DAPI mostra i nuclei cellulari.

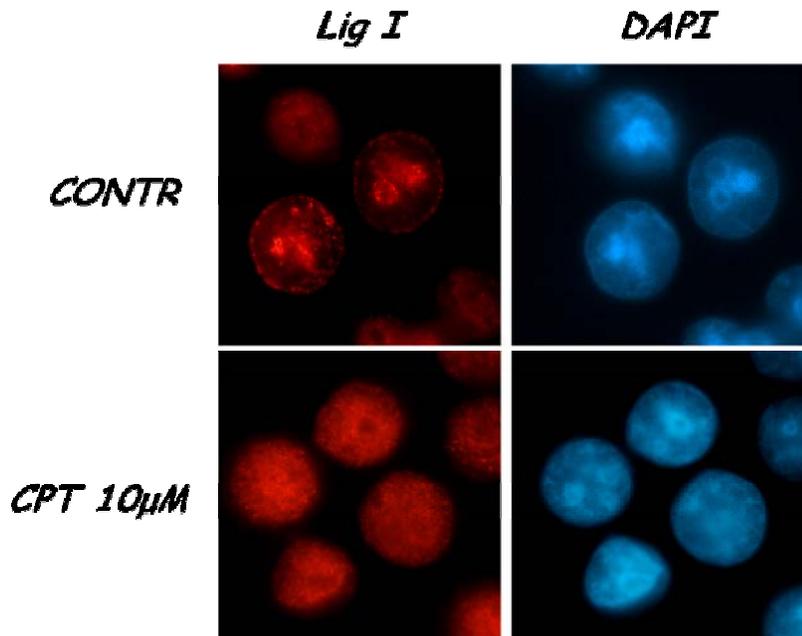


Figura 29. Effetto della camptotecina sulle replication factories. Cellule HeLa sono state trattate con camptotecina 10 μM per 3 ore. La colorazione DAPI mostra i nuclei cellulari.

3.7 L'EFFETTO DELLA CAMPTOTECINA SUL LEGAME DI POL II ALLA CROMATINA È SPECIFICO PER IL FARMACO: CONFRONTO CON ALTRI AGENTI CHE DANNEGGIANO IL DNA.

Il confronto tra l'effetto della camptotecina con quello dell' α -amanitina sul legame di Pol II al DNA ci ha permesso di affermare che la risposta alla camptotecina è specifica. Tuttavia, tenendo presente che la camptotecina provoca danni sul DNA a doppio, ma anche a singolo filamento, è opportuno anche chiedersi se l'influenza sul legame di Pol II ai promotori sia un effetto comune agli agenti che danneggiano il DNA.

Per verificare questo, il legame di Pol II alla cromatina è stato analizzato in seguito a diversi trattamenti farmacologici, effettuati con camptotecina, cisplatino e teniposide (VM26). Il cisplatino è un farmaco che reagisce con il DNA provocando la formazione di addotti, che bloccano la replicazione ed inibiscono la trascrizione (124). Il teniposide

è un inibitore specifico della Topo II in grado di bloccare l'attività catalitica dell'enzima e di originare rotture a doppio filamento del DNA (9).

Fibroblasti umani (MRC5) sono stati incubati per un'ora con tre differenti concentrazioni di ciascun farmaco; per il trattamento con cisplatino e VM26 si è scelto di utilizzare le concentrazioni 2, 10 e 50 μM ; per la camptotecina sono state impiegate dosi più basse, pari a 0.4, 2 e 10 μM . I livelli di recupero di Pol II dopo i vari trattamenti sono stati normalizzati rispetto ai valori di controllo in modo da poter effettuare un confronto tra le risposte ai vari agenti.

Appare subito chiaro come l'effetto del cisplatino sul legame di Pol II alla cromatina sia molto modesto (Fig. 30). Indipendentemente dal promotore analizzato, il cisplatino induce una riduzione dei livelli dell'enzima, fino a dimezzarli (c-MYC e GAPD), solo a dosi molto alte (50 μM).

Il teniposide sembra essere più potente del cisplatino (Fig. 30). La risposta al VM26 osservata sui promotori di H3B e c-MYC, che si presenta sostanzialmente molto simile, è tale da evidenziare alle concentrazioni più basse (2 μM) una marcata diminuzione della Pol II. L'enzima raggiunge progressivamente circa il 50% dei suoi livelli di controllo. Rispetto agli altri, il promotore di GAPD sembra meno responsivo al farmaco e i recuperi di Pol II su di esso iniziano a calare solo a concentrazioni più alte (10 μM).

La camptotecina induce una drastica caduta della proteina sul promotore di H3B già a concentrazioni minime (0.4 μM). Su GAPD la diminuzione è marcata, ma più progressiva; sul promotore di c-MYC il calo è graduale e più modesto (Fig. 30).

I tre promotori mostrano indiscutibilmente una sensibilità alla camptotecina maggiore rispetto a cisplatino e VM26. E' interessante notare che l'effetto di ciascun farmaco in ciascuna di queste regioni è diverso solo in risposta al trattamento con camptotecina. Questo ci

permette di ipotizzare un coinvolgimento gene-specifico di Top1 nella regolazione dei siti di pausa localizzati in prossimità dei promotori.

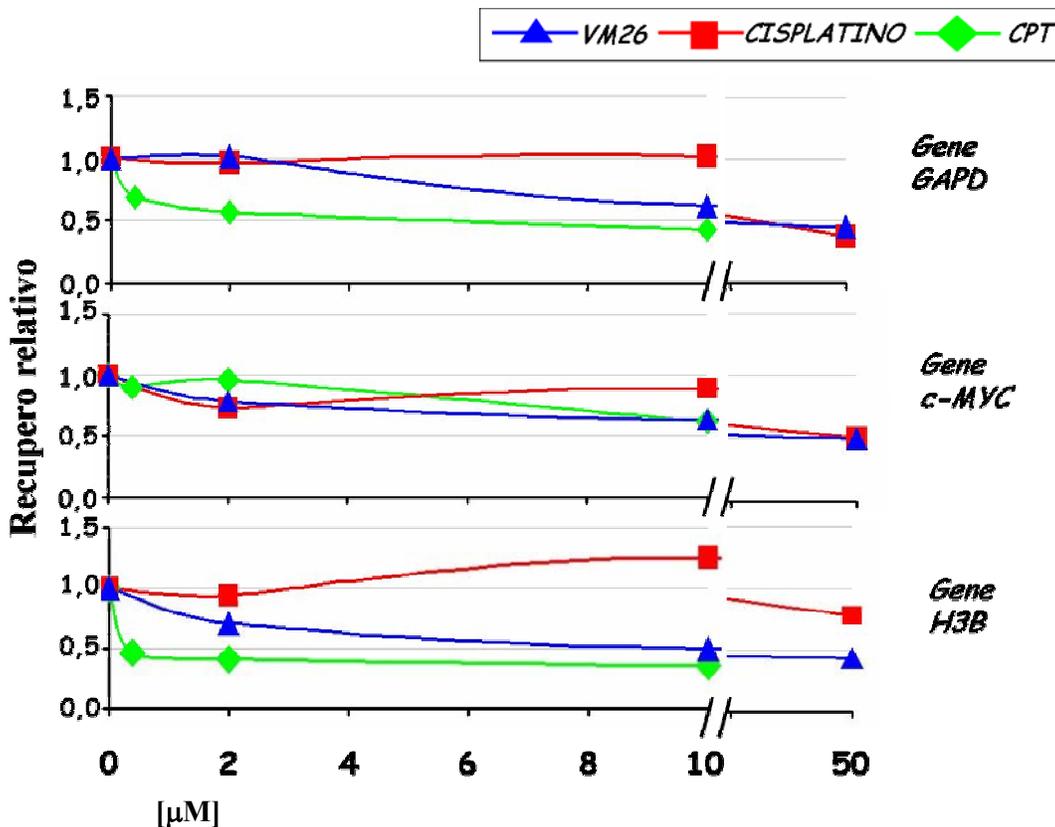


Figura 30. Analisi del legame di Pol II sui promotori d'interesse in fibroblasti umani (MRC5) trattati con differenti concentrazioni di VM26, cisplatino e camptotecina. I grafici riportano i recuperi di Pol II sui promotori di H3B, c-MYC e GAPD dopo un'ora di trattamento con differenti concentrazioni di camptotecina (0,4, 2, 10 μ M), cisplatino (2, 10, 50 μ M) e VM26 (2, 10, 50 μ M). Per ciascuna posizione, le medie di 2 quantificazioni, sono normalizzate sui valori di controllo.

Nelle sequenze trascritte interne ai geni GAPD e MYC, il comportamento di Pol II in risposta alla CPT si discosta completamente da quello osservato dopo i trattamenti con cisplatino e VM26 (Fig. 31). I livelli di recupero dell'enzima a circa 2000 bp dal 5' dei geni (esone 3 di GAPD, ed esone 2 di MYC) subiscono, infatti, un incremento abbastanza significativo, con i valori più alti registrati sull'esone 3 di GAPD (Fig. 31). Analizzando il caso di MYC, non riscontriamo una corrispondenza

tra il notevole incremento di Pol II sull'esone 2 e la caduta piuttosto modesta registrata sul promotore del gene. Questo potrebbe essere spiegato con l'ipotesi per cui il reclutamento di Pol II sul promotore non venga particolarmente inibito da basse dosi di camptotecina. Risultati opposti si ottengono in seguito ai trattamenti con cisplatino e VM26 (Fig. 31): il primo provoca un lieve decremento dei valori di recupero di Pol II solo su MYC; il secondo, evidentemente più potente, riduce i recuperi di Pol II su entrambi gli esoni di circa il 50%.

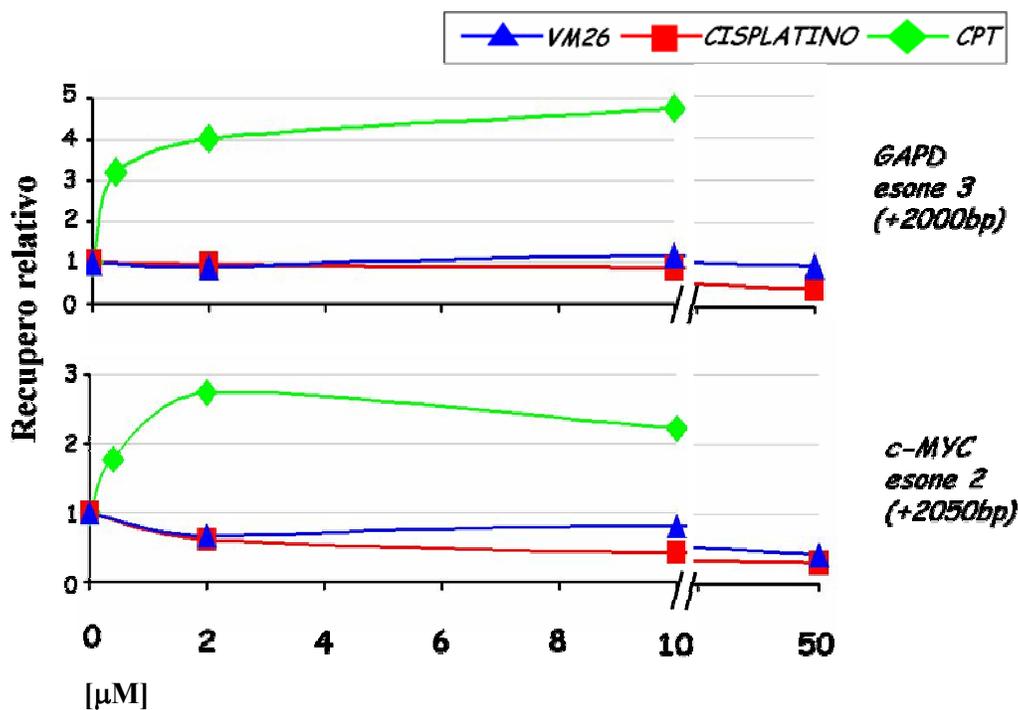


Figura 31. Analisi del legame di Pol II nella sequenza codificante dei geni analizzati in fibroblasti umani (MRC5) esposti a differenti concentrazioni di VM26, cisplatino e camptotecina. I grafici riportano i recuperi di Pol II sull'esone 3 di GAPD e sull'esone 2 di c-MYC, dopo un'ora di trattamento con differenti concentrazioni di camptotecina (0,4, 2, 10 μM), cisplatino (2, 10, 50 μM) e VM26 (2, 10, 50 μM). Per ciascuna posizione, le medie di 2 quantificazioni, sono normalizzate sui valori di controllo.

I risultati ottenuti, in generale, indicano che la risposta alla camptotecina osservata sui geni studiati è un evento indipendente dalla presenza di danni al DNA, sensibile e specifico. Questo studio, inoltre, rafforza l'ipotesi precedentemente formulata circa la specificità

dell'effetto immediato della camptotecina sui siti di pausa dei promotori. Infatti, mentre nel caso della camptotecina alla diminuzione dei livelli di Pol II sul sito d'inizio della trascrizione corrisponde un aumento nelle regioni a valle, dopo esposizione a cisplatino e teniposide i livelli dell'enzima si abbassano sia sul promotore, sia lungo il gene. Ciò fa pensare, negli ultimi due casi, a un distacco e/o a un mancato reclutamento della Pol II, mentre nel caso della CPT, come abbiamo già detto, a una maggiore frequenza di allontanamento dal sito di pausa e transizione alla fase di elongazione.

3.8 EFFETTO DELLA CAMPTOTECINA SUI LIVELLI DI POL II NELLE REGIONI TRASCritte IN CELLULE CHE ESPRIMONO BASSE QUANTITÀ DI TOP1.

Le informazioni ottenute finora ci permettono di ipotizzare che Top1 intervenga nella regolazione dei siti di pausa di Pol II. Ulteriori conferme di questa ipotesi sono state ottenute con esperimenti di ChIP realizzati su particolari linee cellulari, differenti tra loro per i livelli di espressione di Top1. HCT H1 rappresenta la popolazione cellulare di controllo, che esprime livelli normali di Top1; HCT B identifica, invece, la linea trasformata con un vettore che produce l'RNA interference per il messaggero della proteina (125), in grado di abbassare i livelli d'espressione dell'enzima del 70%. Analisi di western blot hanno dimostrato l'efficacia del silenziamento (Fig. 32).

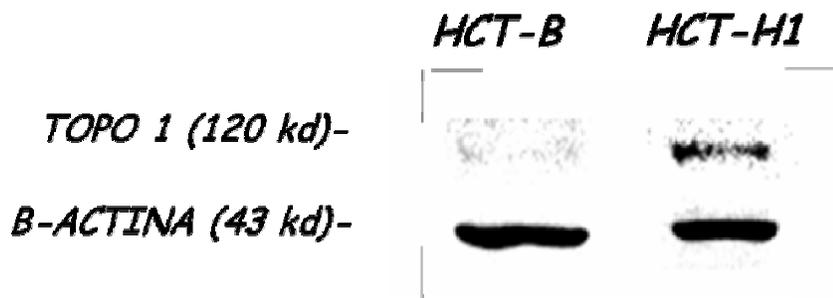


Figura 32. Determinazione dei livelli di espressione di Top1 tramite analisi di Western Blot in cellule HCT. A sinistra sono riportati i pesi molecolari delle proteine analizzate. La β -actina rappresenta il controllo della quantità di lisato caricata.

Le cellule in fase di crescita esponenziale sono state incubate per un'ora con camptotecina (10 μ M). Quindi, si è proceduto con la ChIP, al fine di valutare eventuali cambiamenti dei livelli di Pol II legata al DNA in entrambe le popolazioni.

Già in assenza di trattamento le due linee differiscono per i recuperi di Pol II sui promotori (Fig. 34): rispetto alle HCT H1, nelle HCT B si registrano livelli più alti di Pol II soprattutto sui geni istonici (dell' 83% e del 58% per H3B e H2AB rispettivamente), ma anche sui promotori di MYC e GAPD (48% e 42%). Queste osservazioni correlano con un maggior tasso di proliferazione cellulare delle HCT B rispetto alle HCT H1 (tabella 5 e Fig. 33).

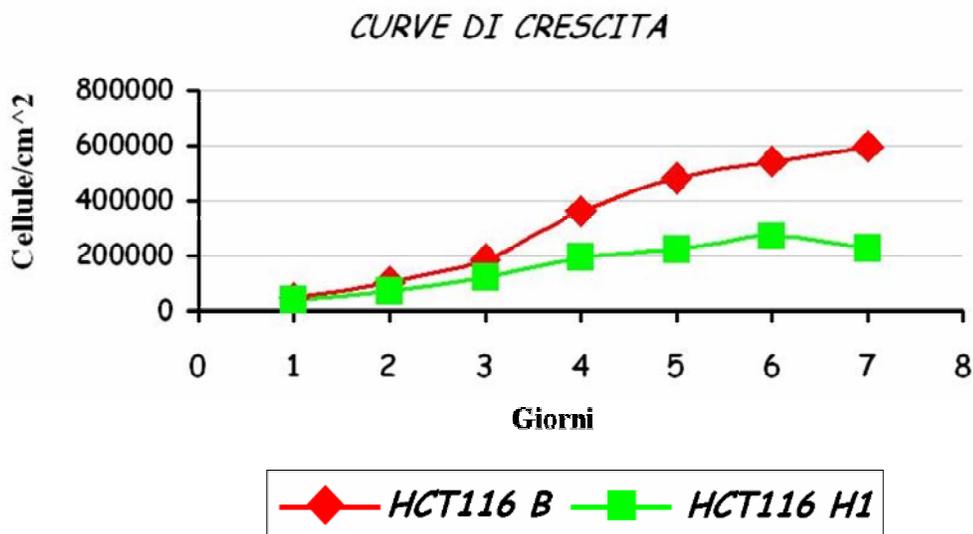


Figura 33. Curve di crescita di HCT 116 B e HCT 116 H1.

Tabella 5. Differenze dei recuperi di Pol II a livello dei promotori nelle due linee HCT.

	<i>H2AB</i>	<i>H3B</i>	<i>c-MYC</i>	<i>GAPD</i>
HCT116 %Δ(B-H1)	83	58	48	42

La camptotecina riduce il legame di Pol II ai promotori sia nelle HCT H1 che nelle HCT B, ma in misura diversa: nelle HCT H1 la caduta di Pol II sui promotori è più marcata, soprattutto nei geni istonici, dove è pari circa al 70% (H3B); nelle HCT B, meno sensibili al farmaco, la diminuzione è più modesta, pari a circa il 52% (H3B) (Fig. 34). E' importante sottolineare, inoltre, che l'accumulo di Pol II nella sequenza codificante di GAPD (V) è riscontrabile quasi esclusivamente nella popolazione cellulare di controllo (un aumento del 127% nelle HCT H1 contro il 17% nelle HCT B) (Fig. 34).

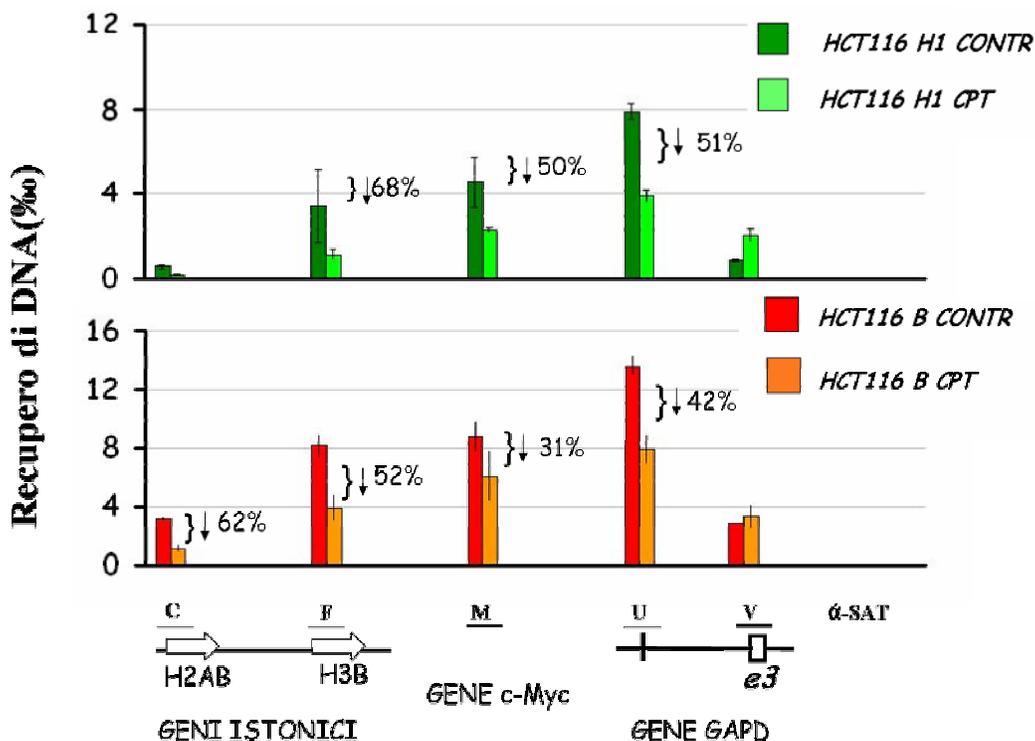


Figura 34. Studio del legame di Pol II alla cromatina dei geni d'interesse in cellule HCT trattate con camptotecina (10 μ M per 1 ora). I dati rappresentati sono la media dei valori ottenuti da un solo esperimento di CHIP. Nei grafici non è stato riportato il NON IMMUNE pari a 0,21, perché troppo basso. Le barre indicano gli errori standard.

In base ai risultati ottenuti, sembra che nelle cellule HCT B la ridotta espressione di Top1 si associ a un aumento dei livelli di Pol II sui promotori. Questi diminuiscono in seguito al trattamento con

camptotecina, soprattutto nella popolazione che esprime livelli normali di Top1. Il modesto effetto che, comunque, si osserva nelle HCT B è probabilmente dovuto alla residua espressione di Top1 in questa popolazione (circa il 30%). Questi dati confermano, dunque, che l'enzima ha un ruolo importante nella regolazione di Pol II sui siti di pausa analizzati.

3.9 VALUTAZIONE DI POTENZIALI PARTNER DI TOP1 NELLA REGOLAZIONE DEI SITI DI PAUSA.

Il controllo delle fasi iniziali della trascrizione è operato, in generale, da una serie di fattori che interagiscono reciprocamente con Pol II regolandone finemente il reclutamento, l'allontanamento dal promotore e l'accumulo sui siti di pausa. Se la camptotecina stimola la transizione alla fase d'elongazione, quali fattori di trascrizione sono coinvolti nell'evento? Per indagare questo processo, il legame di Pol II alla cromatina è stato analizzato in mutanti per proteine coinvolte in diverse fasi della trascrizione.

Le cellule umane CS1AN (derivate da un individuo affetto dalla sindrome di Cockayne) difettano per il fattore CSB: una ATPasi DNA-dipendente appartenente alla famiglia dei fattori SWI2/SNF2 e funzionalmente coinvolta nei processi di trascrizione e riparazione del DNA (TCR) (126, 127). Studi in vitro hanno dimostrato la capacità di questa proteina di stimolare l'elongazione attraverso un'interazione diretta con Pol II o la modulazione dell'attività di altri fattori, come TFIIS (128). Le cellule umane CS3B (derivate da un individuo affetto dalla sindrome di Cockayne), invece, sono mutanti CSA. Questa proteina è funzionalmente e fisicamente correlata a CSB e, come questa, gioca un ruolo importante sia nel TCR che nei processi di trascrizione (129, 130). La sindrome di Cockayne è una grave malattia associata a ritardo nella crescita, degenerazione neurologica ed invecchiamento precoce (130, 131).

Le linee mutanti CS sono state scelte per i nostri studi anche perchè ipersensibili alla CPT, come dimostrato in lavori precedenti (132) e nel nostro laboratorio attraverso saggi di citotossicità (risultati non mostrati). Nei saggi risultava che CPT determina una riduzione del numero di cellule molto maggiore nelle linee CS rispetto ai fibroblasti di controllo (MRC5). Infatti, una concentrazione pari a 0.08 μ M di farmaco inibiva la crescita delle cellule MRC5 del 54%, mentre l'inibizione era del 95% e 80% per le cellule CS3B e CS1AN rispettivamente

Obiettivo dello studio realizzato su queste cellule e sulla linea di controllo mediante ChIP, è quello di valutare se eventualmente le proteine CSA e CSB influiscano sulla risposta all'inibizione di Top1 a livello dei promotori dei geni di interesse.

Nei vari esperimenti i fibroblasti di controllo (MRC5), le CS1AN e le CS3B sono stati incubati per un'ora con camptotecina (10 μ M) in condizioni di crescita esponenziale. Con la ChIP abbiamo, poi, determinato i livelli di Pol II e TBP nel locus istonico e lungo i geni c-MYC e GAPD.

Nelle MRC5 non trattate Pol II è presente prevalentemente sui promotori genici (ad eccezione di H2AB). I livelli di recupero, però, sono molto diversi e su GAPD si registrano i valori più alti. TBP, invece, si localizza specificamente nelle regioni che comprendono le sequenze TATA dei promotori (Fig. 35). L'esposizione al farmaco provoca una forte riduzione di Pol II sui promotori, con un calo piuttosto consistente su GAPD e H3B (76% e 81% rispettivamente). Il legame di TBP alla cromatina, al contrario, non è minimamente disturbato dalla CPT. E' interessante notare come nelle regioni più a valle interne ai geni c-MYC e GAPD si registri un incremento dei livelli di Pol II dopo il trattamento farmacologico, un risultato che conferma i precedenti esperimenti di ChIP realizzati su una differente linea cellulare (Jurkats), e che dimostra che l'effetto della CPT è generalizzabile a cellule di altro isotipo. In particolare, nelle regioni a valle di entrambi i geni, c-MYC e GAPD, la densità di Pol II raggiunge quella registrata sui promotori, sempre dopo il

trattamento: l'impressione è che nelle MRC5 la distribuzione di Pol II lungo tutto un gene diventi quasi omogenea per effetto della CPT (Fig. 35).

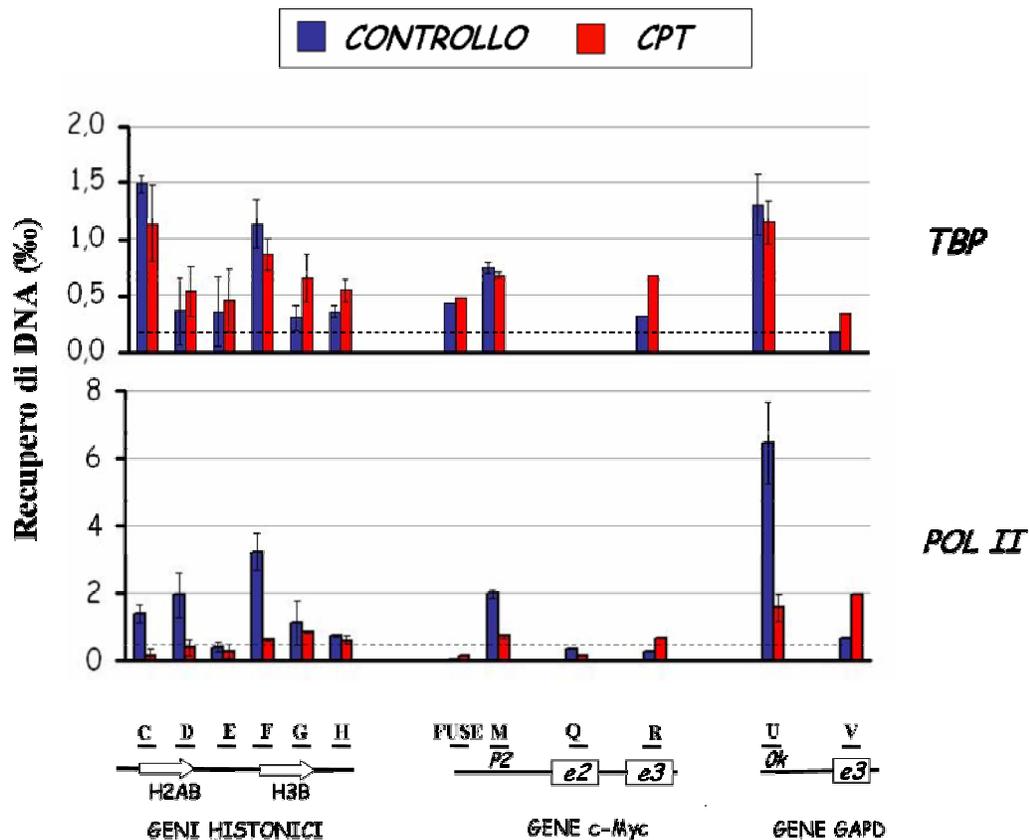


Figura 35. Effetto della camptotecina sul legame di Pol II e TBP alla cromatina dei geni d'interesse in cellule MRC5. Ogni grafico mostra i livelli delle proteine indicate legate alla cromatina di H2AB, H3B, c-MYC e GAPD, in assenza di trattamento (colonne blu) ed in cellule trattate con 10 μ M di camptotecina per un'ora (colonne rosse). Tali valori rappresentano le medie di due esperimenti indipendenti. Le linee tratteggiate mostrano il livello soglia cioè il recupero aspecifico di DNA ottenuto con l'anticorpo IgG. Le barre indicano gli errori standard.

I risultati degli esperimenti condotti sui mutanti CSA (CS3B) rivelano, innanzitutto, che in assenza del farmaco la densità di Pol II sui promotori (soprattutto su quelli di GAPD e MYC) è più alta che nelle MRC5 (Fig. 36). I livelli di TBP concordano con questo andamento. E'

interessante che, tuttavia, nelle regioni interne dei geni non si verifichi una situazione corrispondente, cioè la presenza di Pol II a livelli proporzionalmente maggiori rispetto alle MRC5. Questa osservazione rende improbabile l'ipotesi che sui promotori dei geni dei mutanti CSA la maggiore densità di Pol II sia correlata a una maggiore attività trascrizionale. Piuttosto, sembra che una frazione di Pol II reclutata sui promotori resti "frenata" sugli stessi. La camptotecina anche in queste cellule induce una diminuzione dei livelli dell'enzima sui promotori e ne determina anche un aumento nelle regioni a valle interne ai geni più lunghi (MYC e GAPD) (Fig. 36).

Tuttavia, è molto interessante notare che il calo di Pol II sui promotori è di entità inferiore rispetto ai fibroblasti di controllo (nel caso di GAPD: 76% nelle MRC5 e 66% nelle CS3BE; nel caso di H3: 81% nelle MRC5 e 70% nelle CS3BE), così come l'aumento nelle regioni interne dei geni (su GAPD è +184% nelle MRC5 e +154% nelle CS3BE). In ultimo, non si osserva, come nelle MRC5, una redistribuzione di Pol II dopo il trattamento con CPT, tale da rendere omogenei i livelli dell'enzima lungo un gene.

Sembrirebbe che in queste cellule l'effetto della CPT nel favorire l'allontanamento di Pol II dal promotore sia attenuato dall'assenza di CSA. Dunque, CSA potrebbe avere un qualche ruolo nella regolazione dei siti di pausa dei promotori.

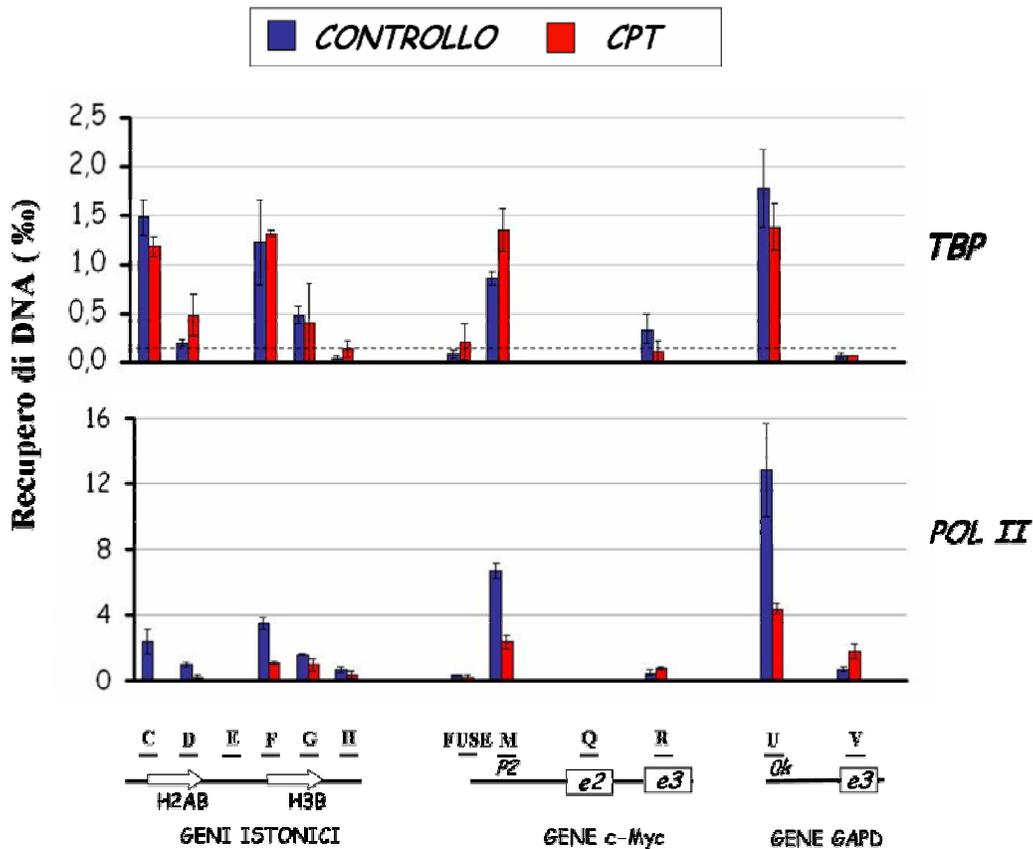


Figura 36. Effetto della camptotecina sul legame di Pol II e TBP alla cromatina dei geni d'interesse in cellule CS3B. Ogni grafico mostra i livelli delle proteine indicate legate alla cromatina di H2AB, H3B, c-MYC e GAPD, in assenza di trattamento (colonne blu) ed in cellule trattate con 10 μ M di camptotecina per un'ora (colonne rosse). Tali valori rappresentano le medie di due esperimenti indipendenti. La linea tratteggiata mostra il livello soglia cioè il recupero aspecifico di DNA ottenuto con l'anticorpo IgG. Per il grafico di Pol II tale valore (pari a 0,18) non è riportato perché troppo basso.

Esperimenti analoghi sono stati condotti sulla linea mutante per la proteina CSB. Le CS1AN si differenziano dalle MRC5 per un minore reclutamento di TBP e di Pol II sui promotori (Fig. 37). Sul promotore di GAPD, ad esempio, il reclutamento della Pol II è del 50% inferiore rispetto ai valori ottenuti nella linea di controllo. Sugli altri geni una riduzione nello stesso senso c'è, ma in misura più modesta (Fig. 37). Analogamente, anche i livelli di TBP sulle regioni promotrici sembrano minori rispetto alle MRC5, in modo grossolanamente proporzionale a quanto registrato per la Pol II. Il trattamento con la camptotecina riduce

ulteriormente i livelli di recupero dell'enzima: il calo è più accentuato rispetto a quello visto nelle MRC5 dopo il trattamento con CPT; in particolare, sui promotori di H3B e di GAPD (nel caso di GAPD: 76% nelle MRC5 e 83% nelle CS1AN; nel caso di H3: 81% nelle MRC5 e 89% nelle CS1AN). E' interessante che anche in questa linea mutante, come nelle MRC5, a valle dei geni lunghi (esoni 3 di MYC e GAPD) si riscontri un aumento di Pol II in seguito al trattamento con CPT (Fig. 37), tale che l'enzima si ritrovi distribuito in modo quasi omogeneo lungo un intero gene. Questo fa pensare che CSB non interferisca con l'effetto che ha la CPT di promuovere l'elongazione. TBP sui promotori non sembra risentire del trattamento; a valle di alcuni geni (H2AB e MYC), invece, si registrano dei recuperi relativamente più alti.

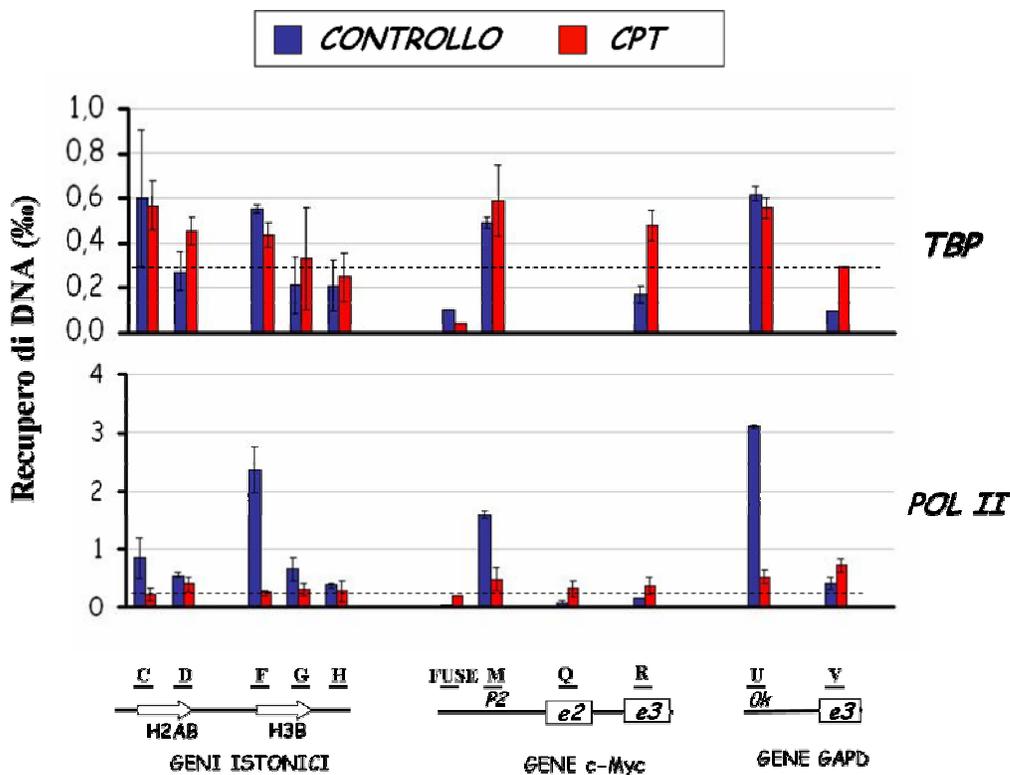


Figura 37. Effetto della camptotecina sul legame di Pol II e TBP alla cromatina dei geni d'interesse in cellule CS1AN. Ogni grafico mostra i livelli delle proteine indicate legate alla cromatina di H2AB, H3B, c-MYC e GAPD, in assenza di trattamento (colonne blu) ed in cellule trattate con 10 μ M di camptotecina per un'ora (colonne rosse). Tali valori rappresentano le medie di due esperimenti indipendenti.

Sembra, dunque, che la proteina CSB non influenzi l'azione di Top1 nel controllo dei siti di pausa. Tuttavia, per il fatto che nei mutanti CSB si osserva sia un minore reclutamento di Pol II sui siti di pausa dei promotori nella popolazione di controllo, sia una risposta più evidente all'inibizione della Top1, non possiamo escludere l'ipotesi di un possibile ruolo di CSA nel reclutamento della Pol II sui siti d'inizio della trascrizione e/o nella regolazione negativa della sua degradazione in combinazione con CSB (130). In tal caso, l'assenza di una o di entrambe queste funzioni nelle CS3B, sommata all'effetto della CPT sulla regolazione dei siti di pausa, giustificherebbe la maggiore riduzione dei livelli di Pol II in seguito al trattamento con CPT.

Infine, osservando le curve di crescita delle tre linee cellulari (Fig. 38), è possibile rintracciare una certa corrispondenza tra le velocità di crescita di ciascuna linea cellulare e i livelli di Pol II misurati sui geni studiati (Fig. 35, 36, 37). Le CS3B si contraddistinguono dai fibroblasti di controllo e dal mutante CSB per il più alto tasso di crescita cellulare (Fig. 38), oltre che per la maggiore densità di Pol II sui promotori studiati. Per le CS1AN vale esattamente l'opposto. Le MRC5 si collocano, in tal senso, a metà strada tra le due popolazioni mutanti, con valori intermedi di recupero della Pol II e di velocità proliferativa.

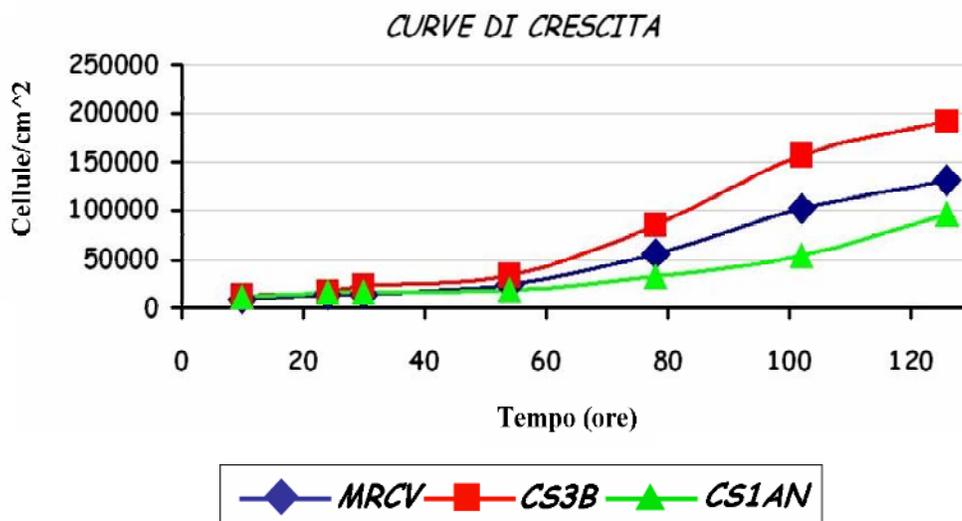


Figura 38. Curve di crescita di mutanti CS (CS1AN e CS3B) e fibroblasti normali (MRC5).

3.10 COSTRUZIONE DI UN VETTORE PER L'ESPRESSIONE REGOLABILE DELLA DNA TOPOISOMERASI I UMANA IN CELLULE HCT116.

Al duplice scopo di a) localizzare con buona efficienza Top1 lungo i geni di interesse e b) confermare l'ipotesi dell'effetto di CPT sul promoter escape di Pol II valutando l'eventuale correlazione tra le variazioni della sua frequenza dopo il trattamento e i livelli di Top1 espressi nella cellula, abbiamo costruito un vettore di espressione in cui il gene di Top1 fosse fuso in N-terminale al TAG HA (emoagglutinina), che costituisce un epitopo di buoni anticorpi per studi di immunoprecipitazione, e sotto il controllo di un promotore inducibile. A tale scopo, abbiamo scelto di utilizzare la strategia GATEWAY.

Si tratta di una strategia di clonaggio universale che trae vantaggio dalle proprietà della ricombinazione sito-specifica del batteriofago λ , per trasferire in modo efficiente e rapido un gene di interesse in un vettore di espressione. I passaggi previsti per l'espressione di un tale gene sono:

1. clonare il gene di interesse in un entry vector, che nel nostro caso è il pDONR221 (vedi MATERIALI E METODI), per creare un entry clone;
2. generare il clone di espressione mediante una reazione di ricombinazione, che sfrutta i siti LR, tra l'entry clone e un Gateway destination vector, nel nostro caso pT-Rex-DEST30 (vedi MATERIALI E METODI), modificato per aggiunta del gene codificante per un triplo epitopo di emoagglutinina ;
3. co-trasfettare il clone di espressione ottenuto e il plasmide pcDNA 6TR, che esprime il repressore Tet, nella linea cellulare scelta.

3.10.1 Costruzione del plasmide pFFHA T-Rex-DEST30.

Il vettore da cui siamo partiti, pT-Rex-DEST30, è un vettore che permette l'espressione di un gene d'interesse regolata dalle tetracicline, in quanto contiene 2 siti TetO₂ (Tetracyclin operator 2) all'interno del promotore umano CMV. Le sequenze TetO₂ servono da siti di legame per 2 omodimeri del repressore Tet, consentendo la regolazione dell'espressione del gene. In assenza delle tetracicline, l'espressione del gene è repressa dal legame degli omodimeri del repressore. L'aggiunta delle tetracicline al mezzo di coltura dereprime il promotore ibrido CMV/Tet O₂. A valle di quest'ultimo, a circa 200 bp, si trova la regione di ricombinazione, delimitata dai siti attR1 e attR2, all'interno dei quali viene trasferito il gene di interesse, che nel nostro caso è Top1. Al fine di ottenere la proteina di fusione HA-Top1, abbiamo inserito un triplo epitopo di emoagglutinina (3xHA) nella regione compresa tra il promotore e attR1, clonando una sequenza codificante tale epitopo nel sito di restrizione unico AgeI (Fig. 39).

Sono stati fatti sintetizzare i due primer lFHAFw e lFHArv, il primo dei quali porta l' ATG dell'epitopo a valle di una sequenza consenso Kozak, mentre entrambi portano le sequenze del sito di restrizione Age I, da inserire alle estremità del frammento da clonare. I due primer, infatti, sono stati usati per effettuare una PCR (termociclo HA; enzima AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase INVITROGEN) utilizzando come stampo il plasmide pAR7HA (vedi MATERIALI E METODI), contenente la sequenza del triplo epitopo di interesse. Il frammento di PCR ottenuto (Fig.40) è stato clonato nel vettore pCR-BLUNT II-TOPO con il Zero Blunt Topo PCR Cloning System utilizzando il ceppo One Shot® match1-T1 *E. coli*.

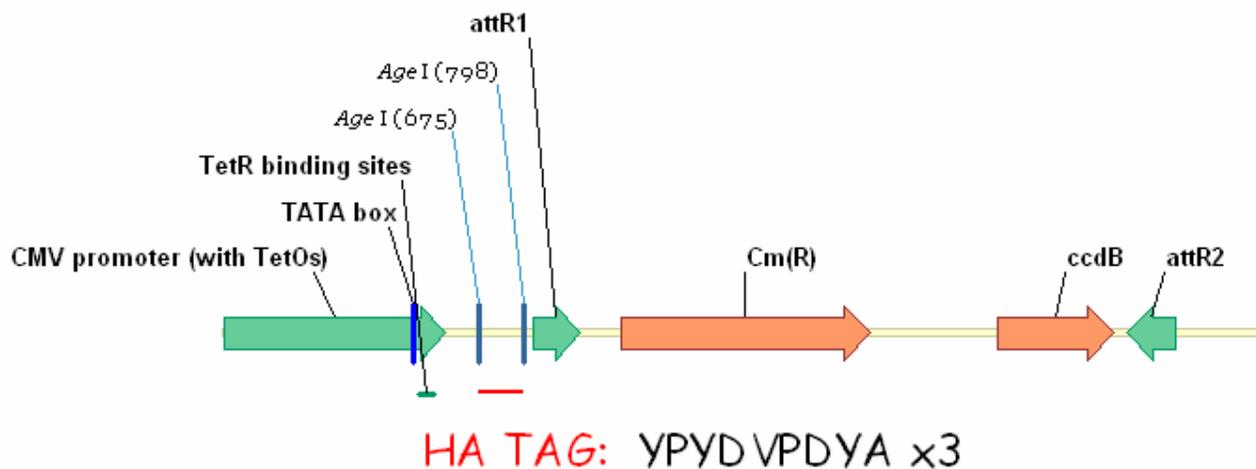


Figura 39. Porzione del plasmide pFFHAT-Rex-DEST30. La regione contiene il promotore ibrido CMV/TetO₂, i siti di ricombinazione attR, il gene della resistenza al cloramfenicolo, il gene *ccdB* per la selezione negativa dei cloni e i siti di restrizione AgeI tra i quali abbiamo inserito il triplo epitopo HA. Sotto alla mappa è indicata la sequenza amminoacidica dell'epitopo stesso.

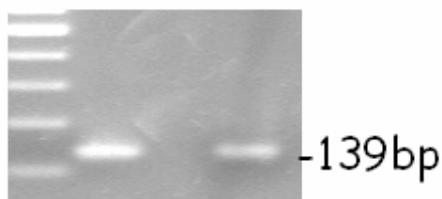


Figura 40. Frammento di PCR ottenuto dal plasmide pAR7HA. Il frammento amplificato contiene la sequenza codificante per il triplo epitopo di emoagglutinina.

Le colonie ottenute sono state analizzate con una PCR colony per verificare la presenza dell'inserto. Dalle colonie positive sono stati estratti i DNA plasmidici e digeriti con l'enzima di restrizione AgeI (Fig. 41). Il pool di frammenti corrispondenti all'inserto (129 bp) è stato purificato da gel di agarosio e utilizzato in una reazione di "ligasi" con il plasmide pT-Rex-DEST30 digerito anch'esso con AgeI e defosforilato.

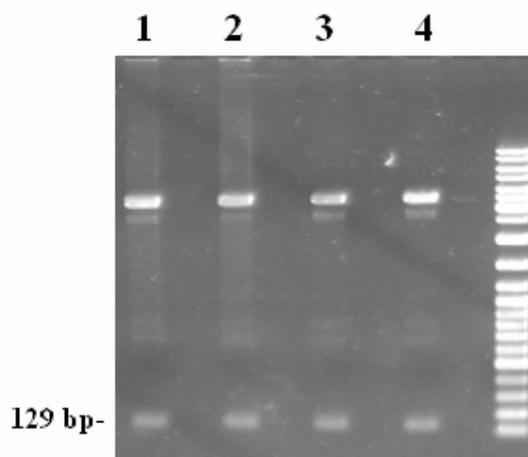


Figura 41. Digestione con l'enzima di restrizione *AgeI* di 4 diversi cloni.

Sono stati testati i rapporti molarli plasmide:inserto 1:1, 1:2, 1:4, 1:6. Con i prodotti di tali reazioni è stato trasformato, tramite elettroporazione, il ceppo di *E. Coli* DB3.1. Alcune delle colonie ottenute sono state scelte per l'estrazione del DNA plasmidico, nel quale è stato verificato il corretto orientamento dell'inserto tramite reazione di PCR con le coppie di primer lfHAfw e pDESTseq oppure lfHArv e pDESTseq. Se il frammento si è inserito in modo corretto, solo la seconda coppia di primer deve dare un prodotto di PCR. Il plasmide estratto dalla colonia risultata positiva a tali analisi è stato controllato tramite sequenziamento col primer pDESTseq (vedi APPENDICE): l'epitopo si è inserito in modo corretto e non sono presenti mutazioni. Il plasmide ottenuto è il pFFHA T-Rex-DEST30 (Fig. 42).

Questo plasmide potrà essere usato per il clonaggio e l'espressione regolabile di qualsiasi proteina di interesse fusa a un triplo epitopo HA. Nel nostro caso, la proteina di interesse è la topoisomerasi I umana e, in studi futuri, la sua forma cataliticamente inattiva.

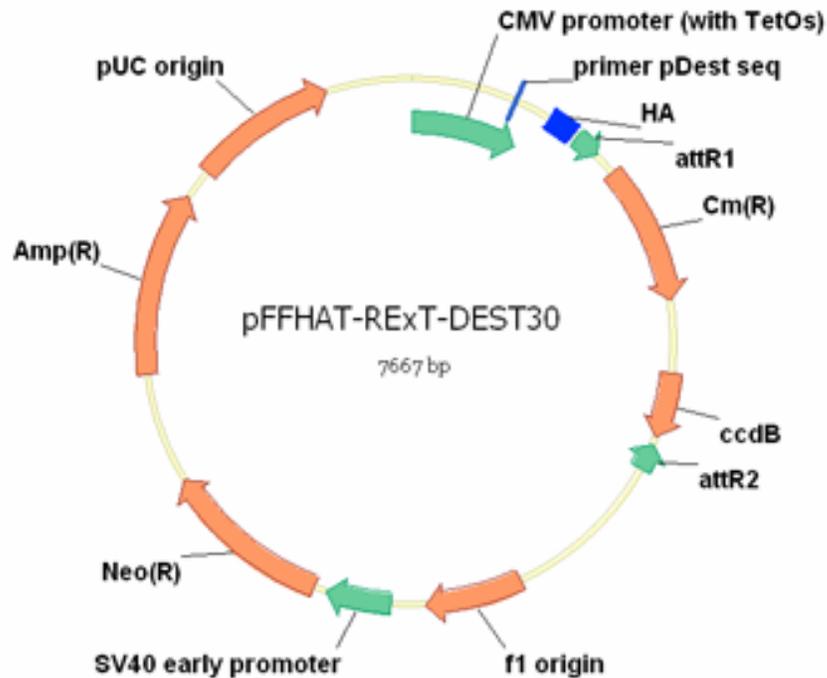


Figura 42. Mappa del vettore di espressione pFFHA T-RexT-DEST30. E' indicata la posizione del primer pDestseq usato per sequenziare l'inserto clonato.

3.10.2 Costruzione del plasmide pEZ2T TOP1 SiRNAr

Poiché l'espressione regolata della proteina di fusione HA-Top1 dovrà avvenire nelle cellule HCT116 B, nelle quali l'espressione della Top1 endogena è ridotta tramite RNA interference, è stato necessario introdurre delle mutazioni nella sequenza di Top1 (Fig. 43), che andremo a clonare nel vettore pFFHAT-Rex-DEST30, per fare in modo che il messaggero di HA-Top1 non costituisca un bersaglio dell'RNA interference.

A tale scopo, è stato mutato il plasmide pEZ2T TOP1 (vedi MATERIALI E METODI), contenente il gene della Top1 umana. Questo plasmide è stato usato sia come substrato delle reazioni di PCR mutageniche, sia nella ricombinazione omologa in lievito con i

frammenti recanti le mutazioni, prodotti dalle stesse reazioni di PCR mutageniche.

ggc ttg aca gcc aag gta ttc	sequenza siRNA cDNA
gga ctt acc gca aaa gtt ttc	sequenza mutata
gly leu thr ala lys val phe	

Figura 43. In alto: sequenza del cDNA codificante per l'RNA interference. in basso: indicate in blu sono le mutazioni da introdurre nel DNA codificante per Top1.

Per le PCR mutageniche sono state usate le coppie di primer Sacfw e Sacrv oppure Nhefw e Nherv. Sacrv e Nhefw sono oligonucleotidi complementari, ciascuno dei quali si appaia a una stessa regione di 40 bp sul plasmide pEZ2T TOP1, pur presentando ciascuno nella propria sequenza le mutazioni da introdurre. I primer Sacfw e Nherv si appaiano in regioni a circa 100 bp rispettivamente a monte del sito di restrizione Sac II e a valle del sito riconosciuto dall'enzima Nhe I (Fig.44). Il termociclo usato è MUT e l'enzima Platinum® Taq DNA Polymerase INVITROGEN (vedi MATERIALI E METODI).

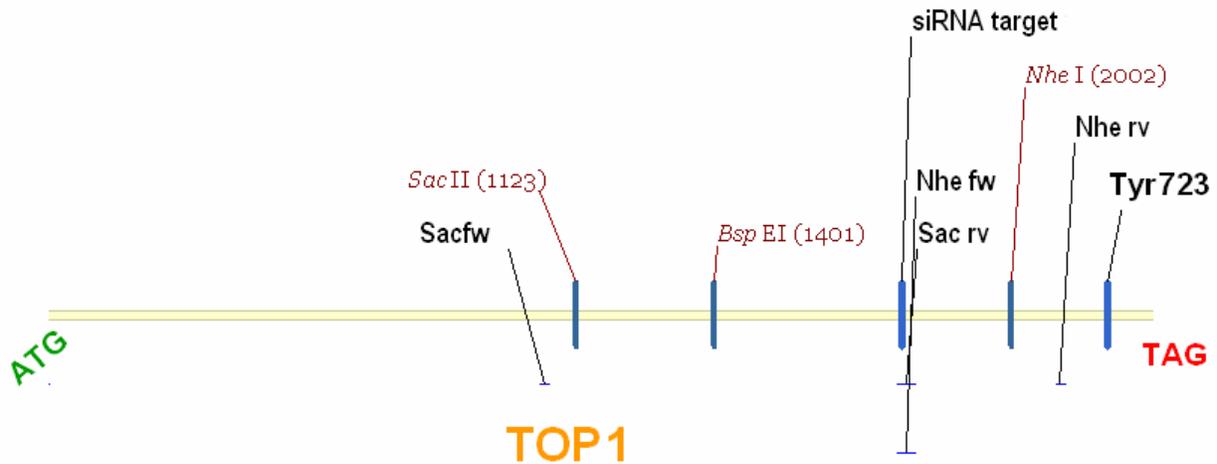


Figura 44. Mappa della sequenza di Top1 nel plasmide pEZ2T TOP1. Sono indicate sia le regioni di appaiamento delle coppie di primer usate nelle PCR mutageniche, sia i siti di restrizione degli enzimi usati per tagliare il vettore che sarà usato nella ricombinazione omologa in lievito.

I due frammenti di PCR (Fig.45) sono stati clonati di nuovo nel pEZ2T TOP1 per ricombinazione omologa in lievito utilizzando un ceppo (JEL1 Δ top1) mancante di una Topoisomerasi I funzionale. Innanzitutto, il plasmide, estratto da un ceppo dam- di *E.coli* (il GM82), è stato digerito con gli enzimi di restrizione NheI e, dopo un veloce cambio buffer con Amicon Microcon Y-30, BspEI (sensibile alla metilazione del DNA); successivamente è stato defosforilato con l'enzima CIP. Il DNA pEZ2T TOP1 è, infine, stato purificato tramite elettroforesi ed eluizione da gel, per essere utilizzato come vettore per trasformare i lieviti.

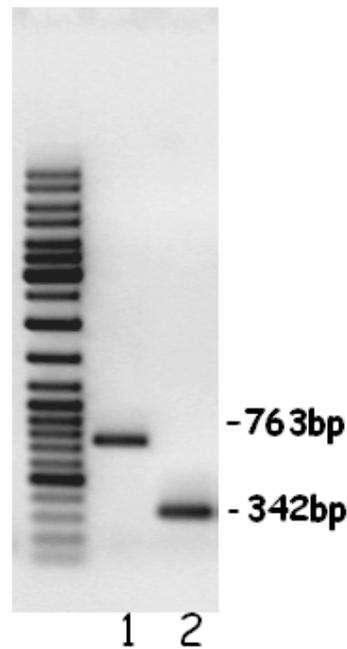


Figura 45. Frammenti di DNA prodotti mediante le PCR effettuate con le coppie di primer Sacfw e Sacrv (lane 1) oppure Nhefw e Nherv (lane 2).

Cellule di lievito sono state trasformate con 50 ng di vettore digerito (pEZ2T TOP1) e con i prodotti delle due PCR in un rapporto molare plasmide: prodotto PCR pari a 1:10000 per ciascun prodotto. La selezione dei lieviti è stata eseguita con terreno selettivo URA-, poiché il vettore porta il gene URA3, che permette la crescita solo dei ricombinanti. L'efficienza della trasformazione è risultata bassa, essendo

cresciute su piastra solo quattro colonie. Da queste sono stati estratti i plasmidi, successivamente trasferiti in GM82 dam- *E. coli*. I plasmidi estratti da cinque dei cloni batterici cresciuti su diverse piastre sono stati analizzati con una reazione di PCR effettuata con i primer sacfw e Nherv (non mostrata), per controllare la presenza di entrambi gli inserti. Tutte le analisi davano risultato positivo. Dunque, abbiamo fatto sequenziare l'intero gene Top1 solo di uno dei cloni ottenuti, utilizzando i primer Toposeq2b, Toposeq3b, Leo44, Sere44 e Sere55 (vedi MATERIALI E METODI): la sequenza intera (non mostrata) non presentava altre mutazioni, fuorché quelle appositamente introdotte per avere l'espressione di una Top1 resistente al 'targeting' dell'RNA interference (Fig.46). Il plasmide ottenuto è il pEZ2T TOP1 SiRNAr e la sequenza mutata del gene per la Top1 umana che esso veicola (TOP1 SiRNAr) può, quindi, essere usata per i successivi clonaggi, che utilizzeranno la tecnologia Gateway.

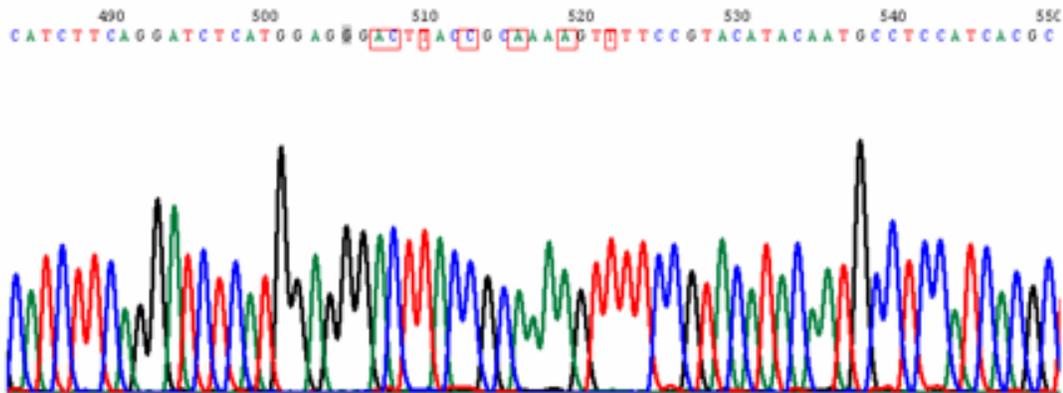


Figura 46. Cromatogramma della regione di Top1 in cui sono state inserite le mutazioni (circondate in rosso). Le mutazioni indicate conferiscono la resistenza all' RNA interference al messaggero della proteina, senza variane la sequenza amminoacidica.

3.10.3 Costruzione del vettore di espressione pFFHA T-Rex-DEST30 Top1 SiRNAr.

Per clonare nel vettore di espressione pFFHA T-Rex-DEST30 il gene TOP1 SiRNAr, presente nel plasmide pEZ2T TOP1 SiRNAr ottenuto (paragrafo precedente), si è dovuto passare attraverso la costruzione del vettore intermedio ‘di entrata’ pENTR TOP1 SiRNAr. Tale passaggio è stato realizzato utilizzando la reazione BP del kit GATEWAY (vedi MATERIALI E METODI), in cui avviene la ricombinazione tra i siti attB fiancheggianti la sequenza del gene di interesse e i siti attP presenti sul pDONR. Il gene TOP1 SiRNAr fiancheggiato dalle sequenze di riconoscimento da parte della BP clonasi (attB1 e attB2) è stato ottenuto con una reazione di PCR (Fig. 47). In questa reazione il primer forward (AttB1) era un oligonucleotide di 55 bp, recante al terminale 5’ la sequenza attB1 (29 bp), mentre al 3’ era presente la sequenza iniziale della topoisomerasi (25 bp) con l’ATG. Il primer reverse (AttB2) era, invece, di 58 bp e presentava all’estremità 5’ la sequenza AttB2 (29 bp), mentre al 3’ la sequenza terminale di Top1 e due codoni di terminazione TAG. Il DNA stampo nella reazione era il plasmide pEZ2T TOP1 SiRNAr; l’enzima usato, Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity INVITROGEN; il termociclo, attB (vedi MATERIALI E METODI).

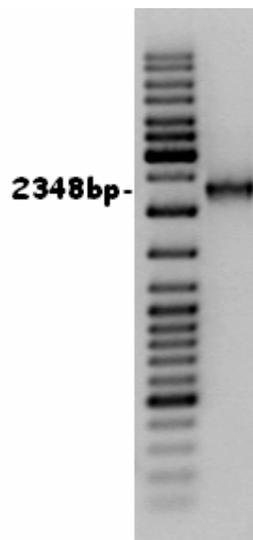


Figura 47. Prodotto della PCR effettuata con la coppia di primer attB1 e attB2.

L'amplificato ottenuto è stato purificato dai primer per elettroforesi ed eluizione da gel. Successivamente, è stata assemblata la reazione che prevede l'utilizzo della BP clonasi, del pDONR221 e del prodotto di PCR da clonare. Il sistema sfrutta la strategia di ricombinazione tipica del fago lambda, in cui le ricombinasi specifiche guidano la ricombinazione tra le regioni comprese tra i siti AttB1 e AttB2, presenti nel DNA amplificato con la PCR, e le zone comprese tra i siti AttP1 e AttP2, presenti nel pDONR221.

Il prodotto della reazione di ricombinazione (1/16 del volume) è stato utilizzato per trasformare cellule *E.coli* DH5 α elettrocompetenti. La selezione dei trasformanti era duplice: le cellule che ricevevano il plasmide che non aveva ricombinato morivano, perché tra i siti attP del pDONR221 è presente il gene *ccdB*, codificante per una tossina; d'altra parte, solo le cellule col plasmide ricombinante potevano sopravvivere, perché questo fornisce la resistenza alla kanamicina. Dalla piastra dei trasformanti sono stati prelevati 10 cloni, dai quali è stato estratto il DNA plasmidico, successivamente analizzato per elettroforesi. Sono stati scelti 2 cloni, il 5 e il 6, sulla base dell'osservazione che in essi era assente DNA plasmidico non ricombinante, e questi sono stati ulteriormente processati per digestione enzimatica multipla. Per una digestione sono stati usati gli enzimi Nde I+Eco RV, mentre per un'altra Xho I+Hind III+BstXI. Se i plasmidi fossero stati quelli desiderati, la prima digestione avrebbe dovuto produrre due frammenti di 3122 bp e 1722 bp; la seconda, invece, tre frammenti di 2989 bp, 1034 bp e 821 bp, rispettivamente. I risultati delle digestioni enzimatiche suggerivano che i plasmidi potessero essere quelli desiderati (Fig. 48).

A questo punto, abbiamo deciso di procedere al sequenziamento dell'intero inserto in entrambi i cloni utilizzando i primer M13, Toposeq2b, Toposeq3b, Sere44 (vedi MATERIALI E METODI). Dalle analisi delle sequenze risultava che entrambi i cloni, pENTR TOP1 SiRNAr 5 e 6, avevano conservato la sequenza corretta di Top1 e le mutazioni precedentemente introdotte nella regione bersaglio dell'RNA interference (risultato non mostrato).

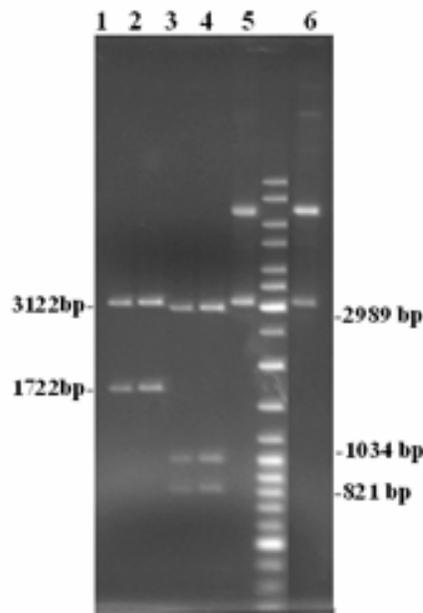


Figura 48. Prodotti delle digestioni enzimatiche dei cloni pENTR TOP1 SiRNAr 5 (corsie 1, 3, 5) e 6 (corsie 2, 4, 6). Corsie 1 e 2: digestione con Nde I+Eco RV; corsie 3 e 4: digestione con Xho I+Hind III+BstX; corsie 5 e 6: plasmidi non digeriti.

Pertanto, sia l'uno che l'altro sono stati usati per la seconda reazione di clonaggio che sfrutta la tecnologia GATEWAY: il trasferimento del gene nel vettore di espressione pFFHA T-Rex-DEST30.

Questo passaggio avviene mediante la reazione detta LR, in quanto sfrutta l'enzima LR clonasi, che riconosce le sequenze di ricombinazione attL (presenti nei vettori di entrata pENTR TOP1 SiRNAr 5 e 6) e attR (presenti nel vettore di espressione pFFHA T-Rex-DEST30). I prodotti ottenuti sono stati, quindi, usati per trasformare cellule *E.coli* DH5 α elettrocompetenti, successivamente selezionate, come nel caso della reazione BP, sulla base del gene *ccdB* e di un antibiotico selettivo (ampicillina, in questa circostanza). Da due cloni derivanti dalla reazione con pENTR TOP1 SiRNAr 6 (6_5 e 6_6) e uno derivante dalla reazione con pENTR TOP1 SiRNAr 5 (5_5) sono stati estratti i plasmidi pFFHA T-Rex-DEST30 Top1SiRNAr 5_5, 6_5 e 6_6 e, successivamente, analizzati per digestione con gli enzimi di restrizione. Nelle analisi sono stati usati gli enzimi: HindIII+XhoI e NdeI+EcoRV. I frammenti attesi erano: nella prima digestione di 4246

bp, 1677 bp, 1034 bp, 904 bp e 454 bp; nella seconda, invece, di 5064 bp, 1896 bp, 732 bp e 623 bp. I prodotti delle digestioni enzimatiche (Fig. 49) suggerivano che tutti e tre i vettori di espressione contenessero l'inserto desiderato, le cui sequenze erano state controllate nei passaggi precedenti. Del clone pFFHA T-Rex-DEST30 Top1SiRNAr 6_5 è stata sequenziata anche la regione compresa tra l'epitopo HA e l'inizio della sequenza di Top1, utilizzando il primer pDest seq, per verificare che negli eventi di ricombinazione non si fossero generati dei codoni di terminazione o, comunque, delle mutazioni. L'analisi ha dato risultati positivi: il clone pFFHA T-Rex-DEST30 Top1SiRNAr 6_5 codifica per l'intera proteina di fusione HA-Top1; pertanto, esso potrà essere usato per la co-trasformazione, insieme al plasmide pcDNA 6TR, che codifica per il repressore Tet, delle cellule HCT116, al fine di ottenere una linea cellulare che esprime livelli regolabili dell'enzima DNA topoisomerasi I fusa all'epitopo HA.

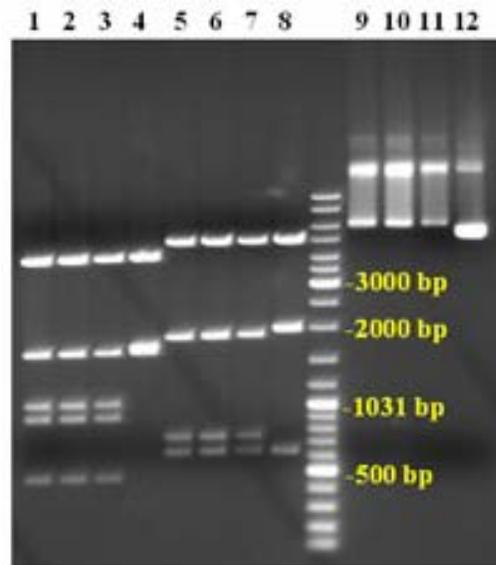


Figura 49. Prodotti delle digestioni enzimatiche dei cloni pFFHA T-Rex-DEST30 Top1SiRNAr 5_5 (corsie 1, 5, 9), 6_5 (corsie 2, 6, 10), 6_6 (corsie 3, 7, 11) e del vettore pFFHA T-Rex-DEST30 (corsie 4, 8, 12). Corsie 1-4: digestione con Hind III + Xho I; corsie 5-8: digestione con Nde I + Eco RV; corsie 9-12: plasmidi non digeriti.

CAPITOLO 4

Discussione

4.1 L'analisi in vivo degli effetti immediati dell' inibizione di Top1 sui complessi DNA-proteina nelle regioni genomiche trascritte fa ipotizzare un nuovo ruolo di Top1 come regolatore del pausing di Pol II.

L'inibizione specifica di Top1 da parte della CPT provoca il blocco della trascrizione nelle cellule eucariotiche (122). Per definire meglio il ruolo di Top1 durante il processo trascrizionale, abbiamo studiato gli effetti della CPT sui complessi DNA-proteina lungo geni trascritti, in cellule umane.

Innanzitutto, mediante esperimenti di ChIP, abbiamo analizzato la distribuzione delle proteine direttamente coinvolte nell'espressione genica, TBP e Pol II, nella cromatina di controllo, osservando che essa risulta coerente con la presenza dei geni trascritti. TBP è localizzata proprio a monte di ciascuna delle CDS, dove si trovano le sequenze TATA; mentre Pol II si distribuisce lungo i geni risultando più abbondante all'inizio di quelli più trascritti. Il mappaggio di Top1 ha evidenziato che l'enzima è presente nel locus con una specifica distribuzione: esso tende a localizzarsi a valle della CDS, dove sarebbe utile a rilassare i superavvolgimenti positivi che, in accordo col "twin-domain model", si generano davanti alla Pol II (13, 64). In linea con quanto emerge dalla letteratura, questi risultati dimostrano che la topoisomerasi I è funzionalmente associata alle sequenze attivamente trascritte con particolare preferenza per le regioni al 3' dei geni (58, 111), ed è reclutata sulle regioni codificanti del DNA quando Pol II è legata agli stessi siti e la sintesi del messaggero è in corso.

Il confronto tra i risultati ottenuti dagli esperimenti di ChIP effettuati a partire da cellule trattate con camptotecina o α -amanitina sui complessi DNA-proteina, ha ispirato l'ipotesi di un meccanismo di inibizione della trascrizione da parte della CPT specificamente legato a un ruolo di Top1 nel regolare l'attività di Pol II nelle fasi di inizio della trascrizione.

Infatti, sebbene per entrambi i farmaci sia nota la capacità di bloccare la transizione di Pol II alla fase d'elongazione (9, 107), solo la CPT causa una diminuzione dei livelli di Pol II sui siti di pausa vicini ai promotori e

un aumento nella sequenza trascritta interna ai geni; l'esposizione delle cellule all' α -amanitina, invece, provoca solo un lieve accumulo dell'enzima lungo i geni studiati. Gli effetti dei due farmaci sono diversi anche rispetto al legame al DNA di altre proteine: TBP risulta disturbata nel legame alla cromatina solo in presenza dell' α -amanitina, mentre conserva la sua localizzazione specifica in corrispondenza delle regioni TATA, dopo il trattamento con CPT. Inoltre, solo quest'ultimo modifica la distribuzione di Top1 nel locus.

Il calo dei livelli di Pol II, che si registra lungo le sequenze promotrici per effetto della CPT, potrebbe esser attribuito all'ubiquitinazione e alla degradazione dell'enzima attraverso il macchinario proteasomico (49). Tuttavia le analisi di western blot e gli esperimenti di microscopia ottica attestano il contrario, dimostrando che la degradazione non avviene. Ubiquitinazione e degradazione sono, pertanto, da considerarsi eventi più tardivi rispetto ai cambiamenti nella distribuzione delle proteine analizzate lungo i loci trascritti.

Prima di ipotizzare una qualsiasi relazione tra l'inibizione di Top1 e l'effetto diretto sull'attività trascrizionale di Pol II, ci siamo accertati che la risposta di Pol II all'azione di CPT non fosse correlata alle doppie rotture, originatesi sul DNA dall'incontro-scontro tra macchinario replicativo e complesso ternario. Confrontando le cinetiche della comparsa di γ -H2AX e della diminuzione di Pol II, sia dopo trattamento con sola camptotecina, che dopo co-trattamento con CPT ed afidicolina, risulta che la fosforilazione dell'istone è un evento più tardivo rispetto alla risposta di Pol II all'inibizione da parte della CPT. Risposta che, comunque, non risulta minimamente alterata dal blocco dell'apparato replicativo e, quindi, dall'assenza di rotture.

Il modello della collisione potrebbe rappresentare una possibile spiegazione all'accumulo dell'enzima registrato lungo il gene. Tale modello è supportato da studi *in vitro*, che hanno mostrato la reale possibilità che una Pol II lungo un gene collida con il complesso ternario intrappolato sul DNA, provocando uno scontro che si risolve nell'arresto della trascrizione e nella conversione del complesso di taglio in un danno

a singolo filamento irreversibile (46). Tuttavia, considerando che una grossa frazione di Pol II è localizzata nei siti di pausa prossimi ai promotori, pronta a iniziare la trascrizione, piuttosto che lungo il gene già in fase di elongazione, è più verosimile ipotizzare che la camptotecina, inibendo Top 1, promuova un maggior escape di Pol II. In altre parole, l'ipotesi da verificare è che la CPT stimoli Pol II, normalmente arrestata sul sito di pausa trascrizionale per favorire la maturazione del trascritto nascente, ad allontanarsi con più facilità da tale regione. Anche se i dati discussi finora non rappresentano evidenze dirette di ciò, l'ipotesi è coerente con i pattern di distribuzione della Pol II sui geni MYC, GAPD e H3B dopo trattamento col farmaco. E' importante sottolineare, inoltre, che se l'incremento dell'enzima sugli esoni prossimi ai promotori fosse dovuto principalmente a un blocco dell'elongazione causato dalla collisione, questo sarebbe probabilmente persistente e non transiente come, invece, abbiamo osservato. Anche i dati presenti in letteratura relativi ai primi studi realizzati su cellule umane trattate con CPT sarebbero coerenti con la nostra ipotesi, descrivendo una stimolazione della trascrizione immediatamente a valle del 5' dei geni ribosomali da parte del farmaco (45).

Comunque, gli esperimenti che abbiamo effettuato utilizzando il DRB, l'inibitore specifico delle cinasi dell'elongazione, rappresentano la prova più rilevante a sostegno della nostra ipotesi. L'idea di partenza è che, se l'inibizione di Top 1 stimola la transizione di Pol II alla fase di elongazione, pretrattando le cellule col DRB l'effetto della camptotecina deve risultare sostanzialmente annullato e l'accumulo dell'enzima nella sequenza codificante non più osservabile. I risultati ottenuti mostrano che questo è esattamente quanto accade nella realtà.

Inoltre, il fatto che né il contenuto cellulare di Pol II né la morfologia delle transcription factories risultino alterate supporta ulteriormente l'ipotesi che una larga frazione d'enzima sia coinvolta nel passaggio all'elongazione subito dopo esposizione alla camptotecina, e fa anche pensare che, probabilmente, la collisione tra Pol II e il complesso

ternario, *in vivo* e alle condizioni di trattamento usate, accada piuttosto raramente.

In conclusione, l'inibizione dell'attività di Top1 da parte della CPT promuove l'allontanamento della Pol II dai siti di pausa vicini ai promotori. Si tratta di un effetto specifico del farmaco, non comune ad altri agenti, che pure danneggiano il DNA (VM26 e cisplatino) e che, al contrario, sembrano provocare il distacco dell'enzima dalla sequenza trascritta, probabilmente allo scopo di liberare la regione e consentire l'accesso ai fattori di riparo del TCR (127). Inoltre, la camptotecina, ma non l' α -amanitina, induce un'apertura della cromatina nelle regioni trascritte che, se da un lato potrebbe ricollegarsi alle esigenze dei meccanismi di riparazione, dall'altro, è coerente con la maggiore transizione all'elonagazione della Pol II.

4.2 Le diverse risposte delle linee CS1AN e CS3BE agli inibitori della trascrizione confermano che i fattori CSA e CSB hanno ruoli distinti in fasi diverse della trascrizione e potrebbero indicare un coinvolgimento di CSA nella regolazione dei siti di pausa dei promotori di Pol II.

Al fine di individuare potenziali partner di Top1 nella regolazione dei siti di pausa, sono stati condotti esperimenti sui fibroblasti di controllo MRC5 e sui mutanti Cockayne syndrome CS1AN e CS3BE, per valutare se le proteine CSB e CSA, in particolare, influiscano sulla risposta all'inibizione di Top1 a livello dei promotori dei geni di interesse.

Inaspettato e interessante è un dato emerso dal confronto tra le caratteristiche di crescita delle varie linee e i livelli di Pol II osservati sui promotori negli esperimenti di ChIP: sembra che vi sia una sorta di proporzionalità diretta tra il tasso di crescita cellulare e i livelli di recupero di Pol II nelle sequenze analizzate. In altri termini, cellule che crescono più lentamente, come le CS1AN, sono caratterizzate anche da valori più bassi di Pol II sui promotori; viceversa, nelle CS3B, molto più veloci nella crescita rispetto alla linea di controllo, anche i recuperi

dell'enzima sui promotori sono più alti. Osservazioni analoghe verranno fatte sulle linee HCT B, con più alto tasso di proliferazione, e HCT H1.

Questa presunta correlazione tra la proliferazione cellulare e i livelli di Pol II meriterebbe di essere indagata più approfonditamente, magari attraverso la quantificazione del contenuto cellulare della proteina o la valutazione della morfologia e del numero delle transcription factories.

L'analisi dell'effetto della CPT, in termini di variazione del legame di Pol II alla cromatina, effettuata con gli esperimenti di ChIP, evidenzia differenze interessanti tra le tre linee. In tutte il farmaco determina una riduzione dei livelli di Pol II sui promotori, ma l'entità dell'effetto e l'andamento della localizzazione dell'enzima risultante dalla sua redistribuzione lungo i geni mostra alcune differenze.

Nelle MRC5 tale distribuzione diventa quasi omogenea in seguito al trattamento con CPT.

Nelle CS3BE il calo di Pol II sui promotori è di entità inferiore rispetto ai fibroblasti di controllo e non si osserva una redistribuzione di Pol II, dopo il trattamento con CPT, tale da rendere omogenei i livelli dell'enzima lungo un gene: questi restano sempre inferiori nelle regioni al 3' rispetto al 5'. Sembrerebbe che in queste cellule l'effetto della CPT nel favorire l'allontanamento di Pol II dal promotore sia attenuato dall'assenza di CSA. Questo risultato, insieme al fatto che la densità di Pol II sui promotori, ma non a valle, è più alta che nelle MRC5, fa pensare che una frazione di Pol II reclutata sui promotori resti "frenata" sugli stessi. Dunque, CSA potrebbe avere un qualche ruolo nella regolazione dei siti di pausa dei promotori.

Nelle CS1AN la CPT induce un calo dei livelli di Pol II sui promotori più accentuato rispetto a quello visto nelle MRC5, ma, come nella linea di controllo, in seguito al trattamento con l'inibitore, l'enzima si ritrova distribuito in modo quasi omogeneo lungo un intero gene. Questo fa pensare che CSA non interferisca con l'effetto che ha la CPT di promuovere l'elongazione. Sia il minore reclutamento di Pol II sui siti di pausa dei promotori in assenza di CPT, sia la risposta più evidente all'inibizione della Top1, fanno ipotizzare un possibile ruolo di CSA nel

reclutamento della Pol II sui siti d'inizio della trascrizione e/o nella regolazione negativa della sua degradazione in combinazione con CSB (92). Infatti, la maggiore riduzione dei livelli di Pol II in seguito al trattamento con CPT potrebbe essere giustificato dal fatto che l'assenza di una o di entrambe queste funzioni nelle CS3B si vada a sommare all'effetto della CPT sulla regolazione dei siti di pausa.

Concludendo, CSA, ma non CSB, potrebbe in qualche modo essere coinvolto nella regolazione dei siti di pausa dei promotori. I fattori CSA e CSB sembrano contribuire con ruoli diversi al processo trascrizionale.

4.3 Linee cellulari che esprimono diversi livelli di Top1 potrebbero permettere la valutazione di una eventuale correlazione tra i livelli dell'enzima nella cellula e l'effetto di CPT sul pausing, in termini di frequenza di escape di Pol II.

L'analisi della distribuzione di Pol II lungo le CDS, anche in seguito al trattamento con CPT, è stata effettuata anche in linee cellulari con ridotta espressione di Top 1. Dalla letteratura è noto che le cellule umane non sopravvivono alla completa assenza dell'enzima (57), pertanto, l'unico modo per saggiare in modo inequivocabile il coinvolgimento di Top1 nella regolazione dei pausing-site trascrizionali e la specificità dell'effetto della CPT, è variare l'espressione dell'enzima nel contesto cellulare.

Dai risultati di ChIP ottenuti utilizzando le linee cellulari HCT H1, che esprime livelli normali di Top1, e HCT B, la linea in cui un RNA interference riduce i livelli d'espressione dell'enzima del 70%, è possibile affermare che la ridotta espressione di Top1 si associ a un aumento dei livelli di Pol II sui promotori, i quali diminuiscono in seguito al trattamento con CPT, soprattutto nella popolazione che esprime livelli normali di Top1. Questi dati confermano, dunque, che l'enzima ha un ruolo importante nella regolazione di Pol II sui siti di pausa analizzati e che, in particolare, l'enzima controlli negativamente i

livelli di Pol II sugli stessi. Inoltre, che l'effetto della CPT dipende dalla presenza di Top 1 nella cellula.

Per indagare ulteriormente la presunta correlazione tra i recuperi di Pol II sui geni trascritti e la quantità di Top1 espressa nella cellula, abbiamo costruito un vettore di espressione col quale sarà possibile esprimere nelle cellule HCT B diversi livelli di Top 1, regolabili sulla base della concentrazione delle tetracicline presenti nel mezzo di coltura.

Inoltre, poiché tra i principali obiettivi resta quello di mappare Top1 sulle aree genomiche attivamente trascritte, abbiamo costruito il vettore di espressione in modo che esso esprima l'enzima Top 1 fuso al triplo epitopo HA. Poiché questo costituisce un epitopo di buoni anticorpi per studi di immunoprecipitazione, il sistema consentirà sia di migliorare l'efficienza di questo tipo di analisi, sia di distinguere la Top 1 ricombinante da quella endogena nel contesto delle analisi stesse.

4.4 Modello proposto.

Nel complesso, i risultati ottenuti ci permettono di ipotizzare che Top1 intervenga nella regolazione dei siti di pausa prossimi ai promotori genici. A prescindere dalle diverse regolazioni dei singoli geni, questo potrebbe essere considerato come un generale meccanismo di controllo; l'enzima, infatti, non presenta alcuna specificità di sequenza e l'effetto della CPT su Pol II è comune a tutti i promotori analizzati.

In realtà, il ruolo della topologia del DNA nella regolazione della trascrizione è stato approfonditamente studiato, sia in modelli procariotici che eucariotici (1, 58). Uno dei geni più indagati in tal senso è C-MYC , la cui espressione è controllata da un sito di pausa per Pol II localizzato vicino al promotore P2. Si pensa che un loop di DNA possa formarsi dall'interazione tra il complesso FBP-FIR, posizionato nella regione FUSE a monte del promotore, e TFIIH sul sito P2. Top1 modulandone la topologia potrebbe regolare questa struttura, così intervenendo indirettamente sul controllo del pausing-site.

D' altra parte, è noto che il complesso di pre-inizio, comprendente fattori di trascrizione (TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF), RNA Pol II ed eventualmente attivatori e coattivatori, si assembla sul promotore di una unità trascrizionale (Fig. 9), e che Top1 probabilmente gioca il ruolo di coattivatore in tale contesto. E' stato dimostrato che ciò dipende dalla sua capacità di interagire con TFIID e di favorire la formazione del complesso TFIID-TFIIA, fondamentale per l'inizio della trascrizione.

L'enzima può agire da fattore strutturale stabilizzando il DNA distorto dal legame con altre proteine e si presume che, almeno in parte, la sua funzione di coattivatore sia il risultato di tali proprietà (74). Una volta formatosi il complesso d'inizio grazie, dunque, anche alla presenza di Top 1, la trascrizione può iniziare.

Sulla base di quanto mostrato e dei dati raccolti dalla letteratura, proponiamo il seguente modello. Top 1, interagendo col CTD della Pol II (75), scorre insieme al complesso trascrizionale lungo lo stampo. Il TEC si arresta, poi, sul sito di pausa prossimo al 5' del gene, al fine di promuovere l'aggiunta del *cap* al messaggero nascente (77). A questo livello, diversi fattori proteici modulano l'arresto di Pol II tramite fosforilazioni e defosforilazioni del suo dominio CTD, che funge, infatti, da perno centrale nel connettere altri processi cellulari alla trascrizione. Anche Top1 interverrebbe in questo tipo di regolazione, promuovendo l'arresto dell'apparato trascrizionale sul sito di pausa. L'aggiunta del suo inibitore specifico, infatti, altera il normale processo, in quanto svincola Pol II dal blocco imposto da Top 1 sulla regione regolatoria. Ne risulta che CPT promuove l'allontanamento della polimerasi dal promotore e, dunque, il passaggio alla fase d'elongazione (Fig. 50).

Concludendo, questo modello propone una nuova e inaspettata funzione per la topoisomerasi I, cioè quella di regolatore della pausa trascrizionale di Pol II nelle regioni prossimali ai promotori dei geni. Qualora confermata da ulteriori dati, questa nuova funzione andrebbe a sommarsi alle già note attività dell'enzima nel contesto della trascrizione (inizio ed elongazione). Resta ancora da dimostrare il meccanismo tramite cui avviene questo tipo di regolazione. Studi su linee cellulari

Appendice

D) SEQUENZE DELL' EPITOPO HA CLONATO NEL PLASMIDE pT-Rex-DEST30.

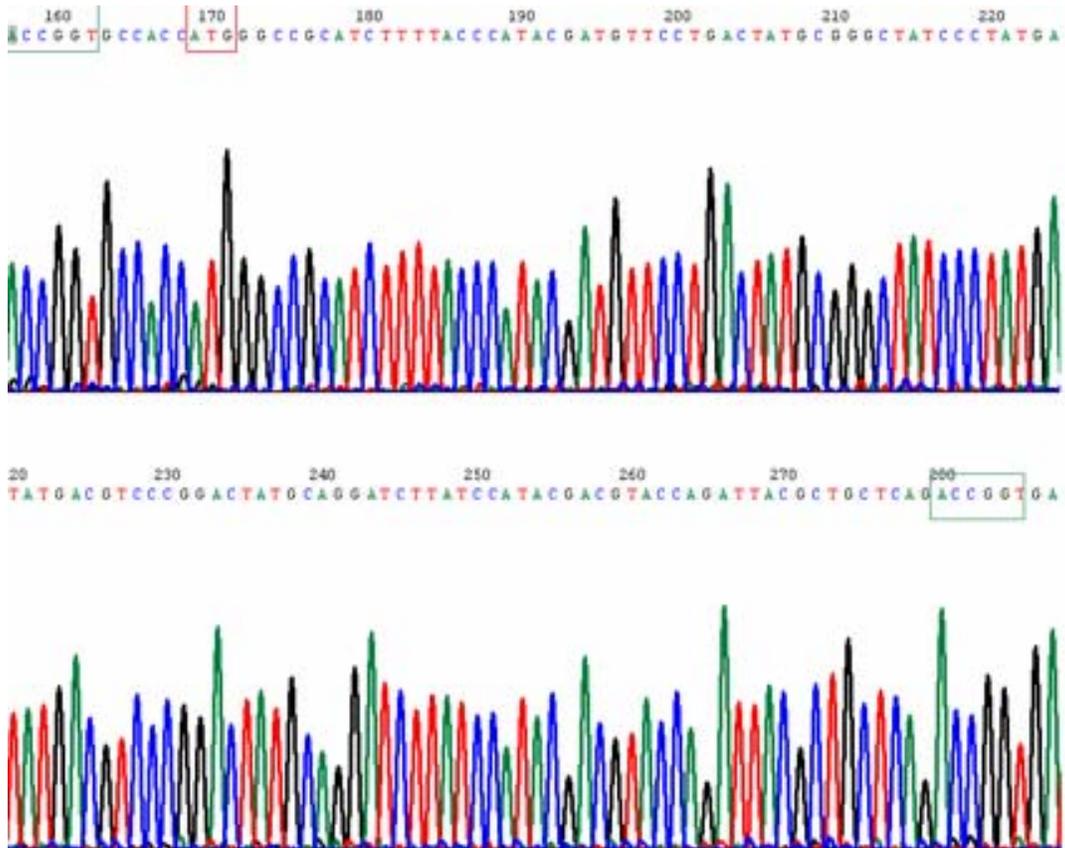
La sequenza teorica clonata nel vettore di espressione pT-Rex-DEST30 e codificante per il triplo epitopo HA è la seguente:

```

atgggcgcgatcttttacccatagcatgttcctgactatgcgggctatccctatgacgtc
M G R I F Y P Y D V P D Y A G Y P Y D V
ccggactatgcaggatcttatccatagcagctaccagattacgctgctcagaccggt
P D Y A G S Y P Y D V P D Y A A Q T G
  
```

Da notare che la porzione codificante della sequenza clonata inizia con l'ATG, mentre termina con la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione Age I. Sono evidenziate le tre ripetizioni dell'epitopo.

Il cromatogramma sottostante, invece, rappresenta l'analisi dell'intero frammento clonato.



Sono evidenziati i siti di restrizione per l'enzima Age I, usati per il clonaggio, alle estremità della sequenza, e il codone di inizio ATG.

II) SEQUENZA DELLA DNA TOPOISOMERASI I.

Di seguito è riportata la sequenza teorica della DNA topoisomerasi I clonata nei plasmidi pENTR TOP1 SiRNAr e pFFHA T-Rex-DEST30 Top1SiRNAr a partire dal pEZ2T TOP1 SiRNAr. Sono evidenziati i codoni di inizio e fine della traduzione (in rosso) e la regione con le mutazioni per la resistenza al SiRNA (in blu):

```
atgagtggggaccacctccacaacgattcccagatcgaagcggatttccgattgaatgat
M S G D H L H N D S Q I E A D F R L N D
tctcataaacacaaagataaacacaaagatcgagaacaccggcacaaagaacacaagaag
S H K H K D K H K D R E H R H K E H K K
gagaaggaccgggaaaagtccaagcatagcaacagtgaacataaagattctgaaaagaaa
E K D R E K S K H S N S E H K D S E K K
cacaagagaaggagaagaccaaacacaaagatggaagctcagaaaagcataaagacaaa
H K E K E K T K H K D G S S E K H K D K
cataaagacagagacaaggaaaaacgaaaagaggaaaagggttcgagcctctggggatgca
H K D R D K E K R K E E K V R A S G D A
aaaataaagaaggagaaggaaaatggcttctctagtcaccacaaattaaagatgaacct
K I K K E K E N G F S S P P Q I K D E P
gaagatgatggctatTTTTgttccctcctaagaggatataaagccattaaagagacctcga
E D D G Y F V P P K E D I K P L K R P R
gatgaggatgatgctgattataaacctaagaaaattaaacagaagataccaagaaggag
D E D D A D Y K P K K I K T E D T K K E
aagaaaagaaaactagaagaagaagaggatggtaaattgaaaaaacccaagaataaagat
K K R K L E E E E D G K L K K P K N K D
aaagataaaaaagttcctgagccagataacaagaaaaagaagccgaagaaggaggaagaa
K D K K V P E P D N K K K K P K K E E E
cagaagtggaaatggtggaagaagagcgctatcctgaaggcatcaagtggaaattccta
Q K W K W W E E E R Y P E G I K W K F L
gaacataaaggtccagtatTTGCCCCaccatgatgagcctcttccagagaatgtcaagttt
E H K G P V F A P P Y E P L P E N V K F
tattatgatggtaaagtcatgaagctgagcccaagcagaggaagtagctacgttcttt
Y Y D G K V M K L S P K A E E V A T F F
gcaaaaatgctcgaccatgaatataactaccaaggaaatatttaggaaaaatttctttaa
A K M L D H E Y T T K E I F R K N F F K
gactggagaaaggaaatgactaatgaagagaagaatattatcaccaacctaaagcaaatgt
D W R K E M T N E E K N I I T N L S K C
gattttaccagatgagccagtatTTCAAAGCCcagacggaagctcggaaacagatgagc
D F T Q M S Q Y F K A Q T E A R K Q M S
aaggaagagaaactgaaaatcaaagaggagaatgaaaaattactgaaagaatatggattc
K E E K L K I K E E N E K L L K E Y G F
tgtattatggataaccacaaagagaggattgctaacttcaagatagagcctcctggactt
C I M D N H K E R I A N F K I E P P G L
```

ttccgtggccgcggaaccacccaagatgggcatgctgaagagacgaatcatgcccgag
F R G R G N H P K M G M L K R R I M P E
gatataatcatcaactgtagcaaagatgccaaggttccttctcctcctccaggacataag
D I I I N C S K D A K V P S P P P G H K
tggaagaagtccggcatgataacaaggttacttggctggtttctggacagagaacatc
W K E V R H D N K V T W L V S W T E N I
caaggttccattaaatacatcatgcttaaccctagttcacgaatcaagggtgagaaggac
Q G S I K Y I M L N P S S R I K G E K D
tggcagaaatacagagactgctcggcggtgaaaaaatgtgtggacaagatccggaaccag
W Q K Y E T A R R L K K C V D K I R N Q
tatcgagaagactggaagtccaagagatgaaagtccggcagagagctgtagccctgtac
Y R E D W K S K E M K V R Q R A V A L Y
ttcatcgacaagcttgcctctgagagcaggcaatgaaaaggaggaaggagaaacagcggac
F I D K L A L R A G N E K E E G E T A D
actgtgggctgctgctcacttctgtgtggagcacatcaatctacaccagagttggatggt
T V G C C S L R V E H I N L H P E L D G
caggaatatgtggtagagtttgacttctcgggaaggactccatcagatactataacaag
Q E Y V V E F D F L G K D S I R Y Y N K
gtccctgttgagaaacgagtttttaagaacctacaactatztatggagaacaagcagccc
V P V E K R V F K N L Q L F M E N K Q P
gaggatgatctttttgatagactcaatactgggtattctgaataagcatcttcaggatctc
E D D L F D R L N T G I L N K H L Q D L
atggagggacttaccgcaaaaagttttcgtacatacaatgcctccatcacgctacagcag
M E G L T A K V F R T Y N A S I T L Q Q
cagctaaaagaactgacagccccggatgagaacatcccagcgaagatcctttcttataac
Q L K E L T A P D E N I P A K I L S Y N
cgtgccaatcgagctggttgaattctttgtaaccatcagagggcaccacaaaaactttt
R A N R A V A I L C N H Q R A P P K T F
gagaagtctatgatgaacttgcaaactaagattgatgccaagaaggaacagctagcagat
E K S M M N L Q T K I D A K K E Q L A D
gcccggagagacctgaaaagtgctaaggctgatgccaaggatcatgaaggatgcaaagacg
A R R D L K S A K A D A K V M K D A K T
aagaaggtagtagagtcaaagaagaaggctgttcagagactggaggaacagttgatgaag
K K V V E S K K K A V Q R L E E Q L M K
ctggaagttcaagccacagaccgagaggaaaataaacagattgccctgggaacctccaaa
L E V Q A T D R E E N K Q I A L G T S K
ctcaattatctggaccctaggatcacagtggttgggtgcaagaagtgggggtgtcccaatt
L N Y L D P R I T V A W C K K W G V P I
gagaagatttacaacaaaaccagcgggagaagtttgcctgggccattgacatggctgat
E K I Y N K T Q R E K F A W A I D M A D
gaagactatgagtttttag
E D Y E F

Bibliografia

- 1 Hatfield,G.W. and Benham,C.J. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*, *Annu.Rev.Genet.*, *36:175-203. Epub;2002 Jun 11.*: 175-203, 2002.
- 2 Mizutani,M., Ohta,T., Watanabe,H., Handa,H. and Hirose,S. Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *88*: 718-722, 1991.
- 3 Mizutani,M., Ura,K. and Hirose,S. DNA superhelicity affects the formation of transcription preinitiation complex on eukaryotic genes differently, *Nucleic Acids Res.*, *19*: 2907-2911, 1991.
- 4 Gellert,M. DNA topoisomerases, *Annu.Rev.Biochem.*, *50:879-910.*: 879-910, 1981.
- 5 Wang,J.C. DNA topoisomerases: why so many?, *J.Biol.Chem.*, *266*: 6659-6662, 1991.
- 6 Wang,J.C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega, *J.Mol.Biol.*, *55*: 523-533, 1971.
- 7 Gellert,M., Mizuuchi,K., O'Dea,M.H. and Nash,H.A. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *73*: 3872-3876, 1976.
- 8 Caron,P.R. and Wang,J.C. Appendix. II: Alignment of primary sequences of DNA topoisomerases, *Adv.Pharmacol.*, *29B:271-97.*: 271-297, 1994.
- 9 Li,T.K. and Liu,L.F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, *41:53-77.*: 53-77, 2001.
- 10 Redinbo,M.R., Stewart,L., Kuhn,P., Champoux,J.J. and Hol,W.G. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA, *Science.*, *279*: 1504-1513, 1998.
- 11 Stewart,L., Redinbo,M.R., Qiu,X., Hol,W.G. and Champoux,J.J. A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science.*, *279*: 1534-1541, 1998.
- 12 Christensen,M.O., Barthelmes,H.U., Boege,F. and Mielke,C. The N-terminal domain anchors human topoisomerase I at fibrillar centers of nucleoli and nucleolar organizer regions of mitotic chromosomes, *J.Biol.Chem.*, *277*: 35932-35938, 2002.
- 13 Giaever,G.N. and Wang,J.C. Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells, *Cell.*, *55*: 849-856, 1988.
- 14 Pommier,Y., Barcelo,J.M., Rao,V.A., Sordet,O., Jobson,A.G., Thibaut,L., Miao,Z.H., Seiler,J.A., Zhang,H., Marchand,C., Agama,K., Nitiss,J.L. and Redon,C. Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage, *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, *81:179-229.*: 179-229, 2006.
- 15 Pourquier,P. and Pommier,Y. Topoisomerase I-mediated DNA damage, *Adv.Cancer Res.*, *80:189-216.*: 189-216, 2001.

- 16 Pommier,Y., Redon,C., Rao,V.A., Seiler,J.A., Sordet,O., Takemura,H., Antony,S., Meng,L., Liao,Z., Kohlhagen,G., Zhang,H. and Kohn,K.W. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage, *Mutat.Res.*, 532: 173-203, 2003.
- 17 Sordet,O., Khan,Q.A., Plo,I., Pourquier,P., Urasaki,Y., Yoshida,A., Antony,S., Kohlhagen,G., Solary,E., Saparbaev,M., Laval,J. and Pommier,Y. Apoptotic topoisomerase I-DNA complexes induced by staurosporine-mediated oxygen radicals, *J.Biol.Chem.*, 279: 50499-50504, 2004.
- 18 Sordet,O., Liao,Z., Liu,H., Antony,S., Stevens,E.V., Kohlhagen,G., Fu,H. and Pommier,Y. Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis, *J.Biol.Chem.*, 279: 33968-33975, 2004.
- 19 Pommier,Y., Zwelling,L.A., Kao-Shan,C.S., Whang-Peng,J. and Bradley,M.O. Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 45: 3143-3149, 1985.
- 20 Capranico,G., Binaschi,M., Borgnetto,M.E., Zunino,F. and Palumbo,M. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons, *Trends Pharmacol.Sci.*, 18: 323-329, 1997.
- 21 Leteurtre,F., Fesen,M., Kohlhagen,G., Kohn,K.W. and Pommier,Y. Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm, *Biochemistry.*, 32: 8955-8962, 1993.
- 22 Staker,B.L., Hjerrild,K., Feese,M.D., Behnke,C.A., Burgin,A.B., Jr. and Stewart,L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 15387-15392, 2002.
- 23 Staker,B.L., Feese,M.D., Cushman,M., Pommier,Y., Zembower,D., Stewart,L. and Burgin,A.B. Structures of three classes of anticancer agents bound to the human topoisomerase I-DNA covalent complex, *J.Med.Chem.*, 48: 2336-2345, 2005.
- 24 Marchand,C., Antony,S., Kohn,K.W., Cushman,M., Ioanoviciu,A., Staker,B.L., Burgin,A.B., Stewart,L. and Pommier,Y. A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex, *Mol.Cancer Ther.*, 5: 287-295, 2006.
- 25 Pommier,Y., Pourquier,P., Urasaki,Y., Wu,J. and Laco,G.S. Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance, *Drug Resist.Updat.*, 2: 307-318, 1999.
- 26 Bjornsti,M.A., Benedetti,P., Viglianti,G.A. and Wang,J.C. Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin, *Cancer Res.*, 49: 6318-6323, 1989.
- 27 Jaxel,C., Capranico,G., Kerrigan,D., Kohn,K.W. and Pommier,Y. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin, *J.Biol.Chem.*, 266: 20418-20423, 1991.

- 28 Kas,E., Poljak,L., Adachi,Y. and Laemmli,U.K. A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin, *EMBO J.*, *12*: 115-126, 1993.
- 29 D'Arpa,P., Beardmore,C. and Liu,L.F. Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons, *Cancer Res.*, *50*: 6919-6924, 1990.
- 30 Horwitz,S.B. and Horwitz,M.S. Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle, *Cancer Res.*, *33*: 2834-2836, 1973.
- 31 O'Connor,P.M., Nieves-Neira,W., Kerrigan,D., Bertrand,R., Goldman,J., Kohn,K.W. and Pommier,Y. S-phase population analysis does not correlate with the cytotoxicity of camptothecin and 10,11-methylenedioxcamptothecin in human colon carcinoma HT-29 cells, *Cancer Commun.*, *3*: 233-240, 1991.
- 32 Holm,C., Covey,J.M., Kerrigan,D. and Pommier,Y. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells, *Cancer Res.*, *49*: 6365-6368, 1989.
- 33 Hsiang,Y.H., Lihou,M.G. and Liu,L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin, *Cancer Res.*, *49*: 5077-5082, 1989.
- 34 Strumberg,D., Pilon,A.A., Smith,M., Hickey,R., Malkas,L. and Pommier,Y. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff, *Mol.Cell Biol.*, *20*: 3977-3987, 2000.
- 35 Redon,C., Pilch,D., Rogakou,E., Sedelnikova,O., Newrock,K. and Bonner,W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ, *Curr.Opin.Genet.Dev.*, *12*: 162-169, 2002.
- 36 Furuta,T., Takemura,H., Liao,Z.Y., Aune,G.J., Redon,C., Sedelnikova,O.A., Pilch,D.R., Rogakou,E.P., Celeste,A., Chen,H.T., Nussenzweig,A., Aladjem,M.I., Bonner,W.M. and Pommier,Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes, *J.Biol.Chem.*, *278*: 20303-20312, 2003.
- 37 Gorgoulis,V.G., Vassiliou,L.V., Karakaidos,P., Zacharatos,P., Kotsinas,A., Liloglou,T., Venere,M., Dittullo,R.A., Jr., Kastriakis,N.G., Levy,B., Kletsas,D., Yoneta,A., Herlyn,M., Kittas,C. and Halazonetis,T.D. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions, *Nature.*, *434*: 907-913, 2005.
- 38 Rogakou,E.P., Nieves-Neira,W., Boon,C., Pommier,Y. and Bonner,W.M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139, *J.Biol.Chem.*, *275*: 9390-9395, 2000.
- 39 Redon,C., Pilch,D.R., Rogakou,E.P., Orr,A.H., Lowndes,N.F. and Bonner,W.M. Yeast histone 2A serine 129 is essential for the efficient repair of checkpoint-blind DNA damage, *EMBO Rep.*, *4*: 678-684, 2003.

- 40 Shao,R.G., Cao,C.X., Zhang,H., Kohn,K.W., Wold,M.S. and Pommier,Y. Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes, *EMBO J.*, *18*: 1397-1406, 1999.
- 41 Pommier,Y., Weinstein,J.N., Aladjem,M.I. and Kohn,K.W. Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors, *Clin.Cancer Res.*, *12*: 2657-2661, 2006.
- 42 Takemura,H., Rao,V.A., Sordet,O., Furuta,T., Miao,Z.H., Meng,L., Zhang,H. and Pommier,Y. Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks, *J.Biol.Chem.*, *281*: 30814-30823, 2006.
- 43 Kessel,D. Effects of camptothecin on RNA synthesis in leukemia L1210 cells, *Biochim.Biophys.Acta.*, *246*: 225-232, 1971.
- 44 Khobta,A., Ferri,F., Lotito,L., Montecucco,A., Rossi,R. and Capranico,G. Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells, *J.Mol.Biol.*, *357*: 127-138, 2006.
- 45 Zhang,H., Wang,J.C. and Liu,L.F. Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *85*: 1060-1064, 1988.
- 46 Bendixen,C., Thomsen,B., Alsner,J. and Westergaard,O. Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription, *Biochemistry.*, *29*: 5613-5619, 1990.
- 47 Wu,J. and Liu,L.F. Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription, *Nucleic Acids Res.*, *25*: 4181-4186, 1997.
- 48 Morris,E.J. and Geller,H.M. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity, *J.Cell Biol.*, *134*: 757-770, 1996.
- 49 Desai,S.D., Zhang,H., Rodriguez-Bauman,A., Yang,J.M., Wu,X., Gounder,M.K., Rubin,E.H. and Liu,L.F. Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes, *Mol.Cell Biol.*, *23*: 2341-2350, 2003.
- 50 Desai,S.D., Li,T.K., Rodriguez-Bauman,A., Rubin,E.H. and Liu,L.F. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells, *Cancer Res.*, *61*: 5926-5932, 2001.
- 51 Soret,J., Gabut,M., Dupon,C., Kohlhagen,G., Stevenin,J., Pommier,Y. and Tazi,J. Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I, *Cancer Res.*, *63*: 8203-8211, 2003.
- 52 Li,X. and Manley,J.L. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability, *Cell.*, *122*: 365-378, 2005.

- 53 El-Khamisy,S.F., Saifi,G.M., Weinfeld,M., Johansson,F., Helleday,T., Lupski,J.R. and Caldecott,K.W. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1, *Nature.*, *434*: 108-113, 2005.
- 54 Miao,Z.H., Agama,K., Sordet,O., Povirk,L., Kohn,K.W. and Pommier,Y. Hereditary ataxia SCAN1 cells are defective for the repair of transcription-dependent topoisomerase I cleavage complexes, *DNA Repair (Amst).*, *5*: 1489-1494, 2006.
- 55 Capranico,G., Ferri,F., Fogli,M.V., Russo,A., Lotito,L. and Baranello,L. The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: Roles of DNA topoisomerase I, *Biochimie.*, *..*:2007.
- 56 Shaiu,W.L. and Hsieh,T.S. Targeting to transcriptionally active loci by the hydrophilic N-terminal domain of Drosophila DNA topoisomerase I, *Mol.Cell Biol.*, *18*: 4358-4367, 1998.
- 57 Champoux,J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism, *Annu.Rev.Biochem.*, *70:369-413.*: 369-413, 2001.
- 58 Wang,J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, *3*: 430-440, 2002.
- 59 Daoud,S.S., Munson,P.J., Reinhold,W., Young,L., Prabhu,V.V., Yu,Q., LaRose,J., Kohn,K.W., Weinstein,J.N. and Pommier,Y. Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study, *Cancer Res.*, *63*: 2782-2793, 2003.
- 60 Kharbanda,S., Rubin,E., Gunji,H., Hinz,H., Giovanella,B., Pantazis,P. and Kufe,D. Camptothecin and its derivatives induce expression of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells, *Cancer Res.*, *51*: 6636-6642, 1991.
- 61 Ljungman,M. and Hanawalt,P.C. The anti-cancer drug camptothecin inhibits elongation but stimulates initiation of RNA polymerase II transcription, *Carcinogenesis.*, *17*: 31-35, 1996.
- 62 Rapisarda,A., Uranchimeg,B., Sordet,O., Pommier,Y., Shoemaker,R.H. and Melillo,G. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications, *Cancer Res.*, *64*: 1475-1482, 2004.
- 63 Choder,M. A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary phase in yeast, *Genes Dev.*, *5*: 2315-2326, 1991.
- 64 Wu,H.Y., Shyy,S.H., Wang,J.C. and Liu,L.F. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template, *Cell.*, *53*: 433-440, 1988.
- 65 Wang,J.C. DNA topoisomerases, *Annu.Rev.Biochem.*, *65:635-92.*: 635-692, 1996.
- 66 Liu,L.F. and Wang,J.C. Supercoiling of the DNA template during transcription, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *84*: 7024-7027, 1987.

- 67 Drolet,M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology, *Mol.Microbiol.*, *59*: 723-730, 2006.
- 68 Osborne,B.I. and Guarente,L. Transcription by RNA polymerase II induces changes of DNA topology in yeast, *Genes Dev.*, *2*: 766-772, 1988.
- 69 Gartenberg,M.R. and Wang,J.C. Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *89*: 11461-11465, 1992.
- 70 Wang,J.C. and Giaever,G.N. Action at a distance along a DNA, *Science.*, *240*: 300-304, 1988.
- 71 Wang,Z. and Droge,P. Differential control of transcription-induced and overall DNA supercoiling by eukaryotic topoisomerases in vitro, *EMBO J.*, *15*: 581-589, 1996.
- 72 Kretzschmar,M., Meisterernst,M. and Roeder,R.G. Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *90*: 11508-11512, 1993.
- 73 Merino,A., Madden,K.R., Lane,W.S., Champoux,J.J. and Reinberg,D. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription, *Nature.*, *365*: 227-232, 1993.
- 74 Shykind,B.M., Kim,J., Stewart,L., Champoux,J.J. and Sharp,P.A. Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription, *Genes Dev.*, *11*: 397-407, 1997.
- 75 Carty,S.M. and Greenleaf,A.L. Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing, *Mol.Cell Proteomics.*, *1*: 598-610, 2002.
- 76 Felsenfeld,G., Clark,D. and Studitsky,V. Transcription through nucleosomes, *Biophys.Chem.*, *86*: 231-237, 2000.
- 77 Sims,R.J., III, Belotserkovskaya,R. and Reinberg,D. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it, *Genes Dev.*, *18*: 2437-2468, 2004.
- 78 Lee,M.S. and Garrard,W.T. Positive DNA supercoiling generates a chromatin conformation characteristic of highly active genes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *88*: 9675-9679, 1991.
- 79 Mondal,N. and Parvin,J.D. DNA topoisomerase IIalpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates, *Nature.*, *413*: 435-438, 2001.
- 80 Mondal,N., Zhang,Y., Jonsson,Z., Dhar,S.K., Kannapiran,M. and Parvin,J.D. Elongation by RNA polymerase II on chromatin templates requires topoisomerase activity, *Nucleic Acids Res.*, *31*: 5016-5024, 2003.

- 81 Duann,P., Sun,M., Lin,C.T., Zhang,H. and Liu,L.F. Plasmid linking number change induced by topoisomerase I-mediated DNA damage, *Nucleic Acids Res.*, *27*: 2905-2911, 1999.
- 82 Tazi,J., Rossi,F., Labourier,E., Gallouzi,I., Brunel,C. and Antoine,E. DNA topoisomerase I: customs officer at the border between DNA and RNA worlds?, *J.Mol.Med.*, *75*: 786-800, 1997.
- 83 Andersen,F.F., Tange,T.O., Sinnathamby,T., Olesen,J.R., Andersen,K.E., Westergaard,O., Kjems,J. and Knudsen,B.R. The RNA splicing factor ASF/SF2 inhibits human topoisomerase I mediated DNA relaxation, *J.Mol.Biol.*, *322*: 677-686, 2002.
- 84 Straub,T., Grue,P., Uhse,A., Lisby,M., Knudsen,B.R., Tange,T.O., Westergaard,O. and Boege,F. The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction, *J.Biol.Chem.*, *273*: 26261-26264, 1998.
- 85 Czubaty,A., Girstun,A., Kowalska-Loth,B., Trzcinska,A.M., Purta,E., Winczura,A., Grajkowski,W. and Staron,K. Proteomic analysis of complexes formed by human topoisomerase I, *Biochim.Biophys.Acta.*, *1749*: 133-141, 2005.
- 86 Solier,S., Lansiaux,A., Logette,E., Wu,J., Soret,J., Tazi,J., Bailly,C., Desoche,L., Solary,E. and Corcos,L. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells, *Mol.Cancer Res.*, *2*: 53-61, 2004.
- 87 Soret,J., Bakkour,N., Maire,S., Durand,S., Zekri,L., Gabut,M., Fic,W., Divita,G., Rivalle,C., Dauzonne,D., Nguyen,C.H., Jeanteur,P. and Tazi,J. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *102*: 8764-8769, 2005.
- 88 Komarnitsky,P., Cho,E.J. and Buratowski,S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription, *Genes Dev.*, *14*: 2452-2460, 2000.
- 89 Andrulic,E.D., Guzman,E., Doring,P., Werner,J. and Lis,J.T. High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation, *Genes Dev.*, *14*: 2635-2649, 2000.
- 90 Krumm,A., Meulia,T., Brunvand,M. and Groudine,M. The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region, *Genes Dev.*, *6*: 2201-2213, 1992.
- 91 Plet,A., Eick,D. and Blanchard,J.M. Elongation and premature termination of transcripts initiated from c-fos and c-myc promoters show dissimilar patterns, *Oncogene.*, *10*: 319-328, 1995.
- 92 Tang,H., Liu,Y., Madabusi,L. and Gilmour,D.S. Promoter-proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila melanogaster* depends on the upstream regulator, *Mol.Cell Biol.*, *20*: 2569-2580, 2000.

- 93 Cheng,C. and Sharp,P.A. RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes, *Mol.Cell Biol.*, *23*: 1961-1967, 2003.
- 94 Palangat,M., Hittinger,C.T. and Landick,R. Downstream DNA selectively affects a paused conformation of human RNA polymerase II, *J.Mol.Biol.*, *341*: 429-442, 2004.
- 95 Gu,W., Wind,M. and Reines,D. Increased accommodation of nascent RNA in a product site on RNA polymerase II during arrest, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *93*: 6935-6940, 1996.
- 96 Kim,D.K., Yamaguchi,Y., Wada,T. and Handa,H. The regulation of elongation by eukaryotic RNA polymerase II: a recent view, *Mol.Cells.*, *11*: 267-274, 2001.
- 97 Wada,T., Takagi,T., Yamaguchi,Y., Ferdous,A., Imai,T., Hirose,S., Sugimoto,S., Yano,K., Hartzog,G.A., Winston,F., Buratowski,S. and Handa,H. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs, *Genes Dev.*, *12*: 343-356, 1998.
- 98 Renner,D.B., Yamaguchi,Y., Wada,T., Handa,H. and Price,D.H. A highly purified RNA polymerase II elongation control system, *J.Biol.Chem.*, *276*: 42601-42609, 2001.
- 99 Lis,J. Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation, *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, *63*:347-56.: 347-356, 1998.
- 100 Li,B., Weber,J.A., Chen,Y., Greenleaf,A.L. and Gilmour,D.S. Analyses of promoter-proximal pausing by RNA polymerase II on the hsp70 heat shock gene promoter in a *Drosophila* nuclear extract, *Mol.Cell Biol.*, *16*: 5433-5443, 1996.
- 101 Morris,D.P., Michelotti,G.A. and Schwinn,D.A. Evidence that phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeats is similar in yeast and humans, *J.Biol.Chem.*, *280*: 31368-31377, 2005.
- 102 Wada,T., Orphanides,G., Hasegawa,J., Kim,D.K., Shima,D., Yamaguchi,Y., Fukuda,A., Hisatake,K., Oh,S., Reinberg,D. and Handa,H. FACT relieves DSIF/NELF-mediated inhibition of transcriptional elongation and reveals functional differences between P-TEFb and TFIID, *Mol.Cell.*, *5*: 1067-1072, 2000.
- 103 Orlando,V., Strutt,H. and Paro,R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking, *Methods.*, *11*: 205-214, 1997.
- 104 Kuo,M.H. and Allis,C.D. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment, *Methods.*, *19*: 425-433, 1999.
- 105 Hecht,A., Strahl-Bolsinger,S. and Grunstein,M. Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins. Crosslinking studies in yeast, *Methods Mol.Biol.*, *119*:469-79.: 469-479, 1999.

- 106 Cochet-Meilhac,M. and Chambon,P. Animal DNA-dependent RNA polymerases. 11. Mechanism of the inhibition of RNA polymerases B by amatoxins, *Biochim.Biophys.Acta.*, 353: 160-184, 1974.
- 107 Nguyen,V.T., Giannoni,F., Dubois,M.F., Seo,S.J., Vigneron,M., Kedinger,C. and Bensaude,O. In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin, *Nucleic Acids Res.*, 24: 2924-2929, 1996.
- 108 Bushnell,D.A., Cramer,P. and Kornberg,R.D. Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 A resolution, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99: 1218-1222, 2002.
- 109 Gong,X.Q., Nedialkov,Y.A. and Burton,Z.F. Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II, *J.Biol.Chem.*, 279: 27422-27427, 2004.
- 110 Marzluff,W.F., Gongidi,P., Woods,K.R., Jin,J. and Maltais,L.J. The human and mouse replication-dependent histone genes, *Genomics.*, 80: 487-498, 2002.
- 111 Pommier,Y., Pourquier,P., Fan,Y. and Strumberg,D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochim.Biophys.Acta.*, 1400: 83-105, 1998.
- 112 Pommier,Y., Pourquier,P., Fan,Y. and Strumberg,D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochim.Biophys.Acta.*, 1400: 83-105, 1998.
- 113 Anderson,V.E. and Osheroff,N. Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials: turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde, *Curr.Pharm.Des.*, 7: 337-353, 2001.
- 114 Levens,D., Duncan,R.C., Tomonaga,T., Michelotti,G.A., Collins,I., vis-Smyth,T., Zheng,T. and Michelotti,E.F. DNA conformation, topology, and the regulation of c-myc expression, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 224:33-46.: 33-46, 1997.
- 115 Liu,J., He,L., Collins,I., Ge,H., Libutti,D., Li,J., Egly,J.M. and Levens,D. The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription, *Mol.Cell.*, 5: 331-341, 2000.
- 116 Liu,J., Akoulitchev,S., Weber,A., Ge,H., Chuikov,S., Libutti,D., Wang,X.W., Conaway,J.W., Harris,C.C., Conaway,R.C., Reinberg,D. and Levens,D. Defective interplay of activators and repressors with TFIIH in xeroderma pigmentosum, *Cell.*, 104: 353-363, 2001.
- 117 Weber,A., Liu,J., Collins,I. and Levens,D. TFIIH operates through an expanded proximal promoter to fine-tune c-myc expression, *Mol.Cell Biol.*, 25: 147-161, 2005.
- 118 Liu,J., Akoulitchev,S., Weber,A., Ge,H., Chuikov,S., Libutti,D., Wang,X.W., Conaway,J.W., Harris,C.C., Conaway,R.C., Reinberg,D. and Levens,D. Defective interplay of activators and repressors with TFIIH in xeroderma pigmentosum, *Cell.*, 104: 353-363, 2001.

- 119 Desai,S.D., Liu,L.F., Vazquez-Abad,D. and D'Arpa,P. Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin, *J.Biol.Chem.*, *272*: 24159-24164, 1997.
- 120 Cook,P.R. The organization of replication and transcription, *Science.*, *284*: 1790-1795, 1999.
- 121 Montecucco,A., Rossi,R., Ferrari,G., Scovassi,A.I., Prosperi,E. and Biamonti,G. Etoposide induces the dispersal of DNA ligase I from replication factories, *Mol.Biol.Cell.*, *12*: 2109-2118, 2001.
- 122 Li,T.K. and Liu,L.F. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs, *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, *41:53-77*: 53-77, 2001.
- 123 Sordet,O., Khan,Q.A., Kohn,K.W. and Pommier,Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors, *Curr.Med.Chem.Anticancer Agents.*, *3*: 271-290, 2003.
- 124 Furuta,T., Ueda,T., Aune,G., Sarasin,A., Kraemer,K.H. and Pommier,Y. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells, *Cancer Res.*, *62*: 4899-4902, 2002.
- 125 Sordet,O., Liao,Z., Liu,H., Antony,S., Stevens,E.V., Kohlhagen,G., Fu,H. and Pommier,Y. Topoisomerase I-DNA complexes contribute to arsenic trioxide-induced apoptosis, *J.Biol.Chem.*, *279*: 33968-33975, 2004.
- 126 Christiansen,M., Thorslund,T., Jochimsen,B., Bohr,V.A. and Stevnsner,T. The Cockayne syndrome group B protein is a functional dimer, *FEBS J.*, *272*: 4306-4314, 2005.
- 127 Svejstrup,J.Q. Rescue of arrested RNA polymerase II complexes, *J.Cell Sci.*, *116*: 447-451, 2003.
- 128 Selby,C.P. and Sancar,A. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *94*: 11205-11209, 1997.
- 129 Kamiuchi,S., Saijo,M., Citterio,E., de,J.M., Hoeijmakers,J.H. and Tanaka,K. Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *99*: 201-206, 2002.
- 130 Licht,C.L., Stevnsner,T. and Bohr,V.A. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions, *Am.J.Hum.Genet.*, *73*: 1217-1239, 2003.
- 131 Chu,G. and Mayne,L. Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the diseases?, *Trends Genet.*, *12*: 187-192, 1996.
- 132 Squires,S., Ryan,A.J., Strutt,H.L. and Johnson,R.T. Hypersensitivity of Cockayne's syndrome cells to camptothecin is associated with the generation of abnormally high levels of double strand breaks in nascent DNA, *Cancer Res.*, *53*: 2012-2019, 1993.