

Titolo del progetto per assegno (posizione post-doc):

### **R-loops and G4: relationship in genome stability**

Il presente progetto per l'assegno di ricerca è parte integrante del Progetto MIUR PRIN 2017 "G-quadruplexes as modulators of genomestability", 2017KSZZJW\_004, Responsabile Scientifico Maria Pia Longhese, titolare fondi dell'unità operativa Jessica Marinello – CUP J34I19000900005.

## **PROGETTO SCIENTIFICO**

Introduzione.

Gli R-loops sono strutture non canoniche del DNA in cui uno dei due filamenti della doppia elica del DNA si appaia temporaneamente con un filamento di RNA, in posizioni geniche attivamente trascritte. Gli R-loops sono strutture fondamentali in processi cellulari fisiologici ma sono stati recentemente individuati anche come fattori chiave nel causare instabilità genomica.

I G-quadruplex sono anch'essi delle strutture non-B del DNA, in cui un filamento del DNA si struttura in quartetti planari di guanine assumendo strutture tipiche chiamate "motivi G4".

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato come le due strutture descritte siano correlate tra loro in specifici loci genici, poiché la stabilizzazione dei G4 mediante composti chimici specifici porta ad aumento di strutture R-loops in cellule tumorali umane, e conseguente induzione del danno al DNA e formazione di micronuclei.

Con il presente progetto ci si pone lo scopo di definire il ruolo delle topoisomerasi nella regolazione degli R-loop e dei G4.

Fase sperimentale.

Per chiarire il meccanismo mediante il quale la Topoisomerasi 1 sia coinvolta nel processo di modulazione di queste strutture non-B del DNA, utilizzeremo inizialmente vari inibitori specifici della Top1, come la camptotecina e delle indenoisochinoline. Verranno condotte analisi di immunofluorescenza in cellule tumorali umane per definire l'aumento delle strutture R-loops e G4 dopo vari tempi di trattamento con i composti in esame, usando degli anticorpi specifici per il riconoscimento di queste strutture. Per valutare la specificità del segnale di immunofluorescenza, verranno condotti esperimenti in cui verrà overespressa la RNase H1 e in cellule silenziate per l'elicasi Senataxin. Successivamente si proverà a colocalizzare gli R-loops e i G4 in cellule in interfase mediante Proximity Ligation Assay. Se i risultati saranno coerenti con l'idea progettuale descritta, verranno fatte analisi di immunoprecipitazione per confermare mediante metodica diversa la colocalizzazione delle suddette strutture a seguito di trattamento con inibitori della Top1.

Risultati attesi.

Al termine del progetto, sarà possibile definire se l'inibizione delle topoisomerasi possa determinare nei stessi loci genici simultanea stabilizzazione di R-loops e G4, con potenziali implicazioni sull'instabilità genomica e sul danno al DNA.

## **PIANO DI ATTIVITA' DI FORMAZIONE**

Formazione di un ricercatore per analisi genomiche e di instabilità del genoma.

Nell'ambito del progetto di ricerca, l'assegnista acquisirà:

- Capacità di disegnare, eseguire e interpretare risultati di esperimenti di correlazione tra osservazioni e analisi di biologia cellulare (cell imaging) e dati genomici di immunoprecipitazione.
- Capacità di usare un microscopio confocale di recente acquisizione da parte del Dipartimento.
- Capacità di tutoraggio di studenti in tesi di laurea magistrale e dottorandi.

La formazione teorica sarà basata su:

- a) Studio intenso di letteratura scientifica pertinente
- b) Interazione con bioinformatici del gruppo di ricerca
- c) Esposizione e discussione di articoli scientifici con tutti i membri del gruppo di ricerca
- d) Presentazione e discussione dei risultati ottenuti agli altri membri del gruppo di ricerca
- e) Partecipazione a congressi nazionali e/o internazionali pertinenti.

I seminari interni ai punti c e d avranno cadenza settimanale.

Al termine del periodo di assegno il ricercatore saprà in piena autonomia affrontare ricerche di Genomica funzionale e Biologia cellulare per il raggiungimento di specifici obiettivi scientifici.