

Titolo del progetto per Assegno (posizione post-doc):  
**G4 binder-induced genome instability and immune response in cancer cells**

## **PROGETTO SCIENTIFICO**

Il presente progetto per l'Assegno è parte integrante del grant IG - 2019 - ID 23032 – PI Capranico Giovanni “Mechanistic roles of R loops and micronuclei in the innate immune response induced by anticancer G-quadruplex binders” finanziato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Milano.

## **INTRODUZIONE**

Gli R loop sono strutture a 3 filamenti di acidi nucleici, costituite da una doppia elica ibrida DNA-RNA e un filamento singolo di DNA. Queste strutture si formano a livello trascrizionale quando l'RNA nascente dietro la RNA polimerasi si appaia di nuovo con il filamento stampo del DNA. Recentemente, gli R loop sono emersi come strutture del DNA che possono causare instabilità genomica e trasformazione neoplastica delle cellule.

Tra le strutture non-B degli acidi nucleici, i quartetti di guanine (G4) sono strutture secondarie di DNA e RNA di grande interesse in quanto possono svolgere ruoli fondamentali ma non ancora completamente caratterizzati. Inoltre, leganti specifici dei G4 sono composti di grande interesse per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali nell'ambito della medicina personalizzata. Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente pubblicato dati che dimostrano come agenti che legano i G4 in modo specifico aumentano gli R loop e i G4 nel nucleo di cellule tumorali. Questo aumento di R loop correla con l'induzione di danno al DNA visualizzato come foci di H2AX e 53BP1 fosforilati (marcatori specifici del danno al DNA) e formazione di micronuclei (*De Magis et al., PNAS 2019*). Il nostro lavoro dimostra che i leganti i G4 possano stabilizzare in maniera indiretta anche gli R loop, legando un G4 sul filamento opposto rispetto alla doppia elica ibrida DNA:RNA. Ciò può avere conseguenze inibitorie della trascrizione e della replicazione, da una parte, e produrre rotture doppie del DNA, dall'altra. Inoltre, ipotizziamo che specifici fattori di riparazione del danno al DNA (per esempio, BRCA1) possano modulare la formazione di R loop.

Pertanto, lo scopo del presente progetto è la definizione del meccanismo della formazione dei micronuclei a partire dal danno al DNA indotto da leganti specifici dei G4.

## **FASE SPERIMENTALE**

La formazione di R loop sarà studiata in cellule tumorali con immunofluorescenza (IF) utilizzando un anticorpo specifico contro gli ibridi DNA-RNA, disponibile nel nostro laboratorio. Linee cellulari stabili overesprimenti l'RNase H1, capace di degradare specificamente l'ibrido DNA:RNA, saranno utilizzate come controllo negativo delle varie condizioni sperimentali. Si studieranno in questo modo diverse linee cellulari umane, silenziate o meno per i

fattori BRCA1 e BRCA2 mediante siRNA. Quindi, si determineranno le mappe genomiche di R loop tramite la metodica DRIP (correntemente utilizzata in laboratorio per altri progetti) e i risultati genomici così ottenuti saranno validati a livello di singolo locus con DRIP-qrtPCR in presenza e assenza di agenti che legano i G4. I dati genomici verranno inoltre incrociati con database di sequenze formanti i G4 presenti in letteratura, per validare la co-localizzazione delle strutture secondarie in questione. Un'analisi parallela sarà anche condotta in presenza di inibitori della trascrizione o della replicazione, per valutare il coinvolgimento dei suddetti meccanismi nell'effetto osservato. L'associazione tra R loop alterati e rotture doppie del DNA sarà studiata sia tramite IF che tramite ChiP contro l'istone H2AX fosforilato e la proteina 53BP1 fosforilata. Inoltre, si determineranno i siti genomici di rotture del DNA tramite NGS e metodiche di purificazione delle rotture del DNA genome-wide. Le mappe di R loop e di danno al DNA saranno quindi analizzate con metodiche bioinformatiche anche in relazione a funzioni specifiche delle regioni genomiche implicate.

#### RISULTATI ATTESI

Al termine del progetto, avremo delle mappe genomiche di R loop in cellule tumorali umane esposte a specifici ligandi i G4 dopo diversi tempi di trattamento. Avremo stabilito il meccanismo di modulazione degli R loop da parte di questi composti e di fattori della riparazione del danno al DNA. I risultati avranno dunque delle implicazioni a livello di instabilità genomica/vitalità cellulare prodotte da ligandi i G4 utili per lo sviluppo di farmaci a partire da ligandi i G4.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) A De Magis et al., DNA Damage and Genome Instability by G-quadruplex Ligands Are Mediated by R Loops in Human Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (3), 816-825. 2019.
- 2) A Cristini et al. Dual Processing of R-Loops and Topoisomerase I Induces Transcription-Dependent DNA Double-Strand Breaks *Cell Rep* 28 (12), 3167-3181.e6. 2019.
- 3) Manzo SG, Hartono SR, Sanz L, De Biasi S, Cossarizza A, Capranico G\*, Chedin F\* (\*co-corresponding). DNA Topoisomerase I differentially modulates R loops across long genes and at human replication origins. *19* (1), 100, 2018.
- 4) Capranico G, Marinello J, Chillemi G. Type I DNA Topoisomerases. *J Med Chem.* 2017 Mar 23;60(6):2169-2192. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00966.
- 5) Marinello J, Chillemi G, Bueno S, Manzo SG, Capranico G. Antisense transcripts enhanced by camptothecin at divergent CpG-island promoters associated with bursts of topoisomerase I-DNA cleavage complex and R-loop formation. *Nucleic Acids Res.* 2013 Dec;41(22):10110-23.
- 6) Amato J, et al. Toward the Development of Specific G-Quadruplex Binders:

Synthesis, Biophysical, and Biological Studies of New Hydrazone Derivatives. *J Med Chem.* 2016 Jun 23;59(12):5706-20

- 7) Hänsel-Hertsch R, Di Antonio M, Balasubramanian S. DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 May;18(5):279-284.
- 8) Cristini A, Park JH, Capranico G, Legube G, Favre G, Sordet O. DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions. *Nucleic Acids Res.* 2016 Feb 18;44(3):1161-78.
- 9) Baranello L, Bertozzi D, Fogli MV, Pommier Y, Capranico G. DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1alpha gene locus. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan; 38(1):159-71.

## **PIANO di ATTIVITA' e 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 i risultati di esperimenti di correlazione tra osservazioni e analisi di biologia cellulare (*cell imaging*) e dati genomici di DRIP-seq e ChIP-seq
- Capacità di usare il Cell Sorter 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 della letteratura scientifica pertinente;
- B) interazioni 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 membri del gruppo di ricerca.
- E) partecipazione a congressi nazionali e/o internazionali pertinenti.

I seminari interni (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.