

TITOLO DEL PROGETTO

Studio dell'instabilità genomica mediata da R-loop e G4.

PROGETTO SCIENTIFICO

L'attività prevista per l'assegno di ricerca rientra nell'ambito del progetto PRIN 2017 (2017KSZZJW_004) dal titolo: "G-quadruplexes as modulators of genome stability", CUP J34I19000900005. Responsabile scientifico e titolare dei fondi: Dott.ssa Jessica Marinello.

Introduzione.

Gli R-loops e i G-quadruplex (G4) sono entrambi strutture non-B del DNA: negli R-loops uno dei due filamenti della doppia elica del DNA si appaia temporaneamente con un filamento di RNA, in posizioni geniche attivamente trascritte; nei G4 un filamento del DNA si struttura in quartetti planari di guanine assumendo strutture a quattro filamenti appaiati, da cui "G-quadruplex". Entrambe le strutture sono fondamentali in processi cellulari fisiologici ma sono state recentemente individuate anche come fattori chiave nel causare instabilità genomica. Un enzima importante nella regolazione delle tensioni torsionali del DNA duplex, che regolano la formazione di queste strutture non canoniche del DNA, è la Topoisomerasi I (Top1) la cui funzione principale è la risoluzione dei superavvolgimenti del DNA.

Nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato come queste due strutture 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. Abbiamo inoltre evidenziato come la generazione di micronuclei possa indurre la cascata cellulare mediata dal pathway di cGAS/STING, con conseguente effetto immunomodulatorio a livello cellulare.

Con il presente progetto ci si pone lo scopo di definire in maniera più accurata il meccanismo molecolare che porta alla generazione dei micronuclei, andando in particolar modo a studiare se dopo trattamento con composti quali Camptotecina (CPT, inibitore delle topoisomerasi 1) o Piridostatina (PDS, stabilizzante dei G4) vi è generazione di ponti di cromatina durante la mitosi che portano a fallimento della citochinesi e multinucleazione.

Fase sperimentale.

Al fine di valutare sperimentalmente se la formazione dei micronuclei viene generata dalla formazione di ponti di cromatina durante la mitosi cellulare, sarà valutato il coinvolgimento di varie nucleasi quali TREX1 e SLX4 nella risoluzione dei ponti in questione. Per fare ciò verrà utilizzato come sistema modello la linea cellulare cancerosa HeLa. Le nucleasi verranno silenziate in maniera transiente e si valuterà mediante tecnica di immunofluorescenza la persistenza o meno di ponti di cromatina e micronuclei dopo trattamento con composti quali la camptotecina e la piridostatina, in cellule in attiva fase mitotica. Verrà inoltre studiato il coinvolgimento di MRE11, una nucleasi coinvolta nel sistema di ricombinazione omologa e nella risposta allo stress replicativo, nella stabilizzazione dei ponti di cromatina e micronuclei dopo trattamento con CPT e PDS. Anche nel caso di MRE11, la proteina verrà silenziata in maniera transiente o inibita con composti chimici specifici. Tutti gli esperimenti verranno condotti in linee cellulari wt o overesprimenti la RNaseH1, per valutare il coinvolgimento degli R-loops nel fenomeno descritto.

Risultati attesi.

Al termine del progetto, sarà possibile definire la connessione tra generazione di ponti di cromatina e formazione di micronuclei in cellule trattate con inibitori delle topoisomerasi 1 o stabilizzanti i G4, e un possibile ruolo quindi di R-loops e G4 in questo meccanismo.