

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare



**Validazione funzionale di interazioni miRNA-
mRNA per radiosensibilizzare cellule tumorali
umane A549**

Relatore: Prof.ssa Maddalena Mognato
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Correlatore: Dott. Alberto Biscontin
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Laureando: Celeste Piotto

Anno Accademico 2015/2016

Sommario

Abstract	1
1.Introduzione	3
1.1.Risposta cellulare alle doppie rotture al DNA.....	3
1.2.Ricombinazione Omologa	6
1.3.Ricombinazione Non Omologa	8
1.4.Ricombinazione Non Omologa Alternativa	11
1.5.MicroRNAs	16
1.6.Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNAs.....	17
1.7.Ruolo dei miRNAs nel <i>pathway</i> DDR	20
1.8.Tumore al polmone.....	23
Scopo della tesi	25
2.Materiali e metodi	27
2.1.Colture cellulari	27
2.2.Trasfezione cellulare.....	28
2.3.Trattamento con gli inibitori enzimatici RI-I e NU7026	29
2.4.Irradiazione con raggi γ	29
2.5.Saggio clonogenico	30
2.6.Estrazione e quantificazione dell'RNA totale	30
2.7.Retrotrascrizione di RNA messengeri	31
2.8.Analisi di espressione di mRNA mediante qRT-PCR.....	32
2.9.Clonaggio di porzioni 3'-UTR di geni target in vettori pmirGLO.....	34
2.9-I Amplificazione.....	35
2.9-II Ligazione dell'inserto	38
2.9-III Trasformazione cellule competenti	38
2.9-IV PCR da colonia.....	40
2.9-V Miniprep (estrazione DNA plasmidico da batteri)	41
2.9-VI Digestione enzimatica	41
2.9-VII Reazione di ligazione.....	42
2.9-VIII Trasformazione cellule competenti One Shot Top10	43
2.9-IX Sequenziamento	43
2.10.In-Fusion[®] HD Cloning	44

2.10-I Amplificazione	44
2.10-II Reazione di Fusione	45
2.10-III Trasformazione cellule competenti Stellar	45
2.11.Saggio Dual-Luciferase Reporter Assay System.....	46
3.Risultati	49
3.1.Analisi della radio-resistenza delle cellule A549	49
3.2.Analisi di geni differenzialmente espressi mediante qRT-PCR	51
3.3.Costruzione dei vettori pmiRGLO	53
3.4.Validazione sperimentale delle interazioni miRNA-mRNA	55
3.5.Effetti dell'inibizione dei sistemi di riparazione HR e NHEJ sulla radio-resistenza delle cellule A549	60
3.6.Effetti della sovra-espressione dei miRNAs sulla radio-resistenza delle cellule A549	62
4.Discussione	67
5.Conclusioni e prospettive future	71
Bibliografia	73

Abstract

La resistenza alle radiazioni ionizzanti (IR) è il fattore principale che limita l'efficacia terapeutica della radioterapia dei tumori. La radio-resistenza è spesso correlata con la sovra-espressione di geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, in particolare le doppie rotture (double-strand breaks, DSBs). Lo scopo di questo studio, condotto in cellule umane radio-resistenti (A549), è di investigare se l'espressione di geni coinvolti nella riparazione di DSBs possa essere regolata tramite microRNAs (miRNAs), sensibilizzando le cellule alle radiazioni. I miRNAs tipicamente diminuiscono l'espressione genica mediante associazione diretta con i trascritti target. A questo scopo ho costruito dei vettori plasmidici contenenti la porzione 3'-UTR dei geni *RAD51* e *LIG1*, coinvolti il primo nella ricombinazione omologa e il secondo nella ricombinazione omologa e non-omologa, ed ho eseguito la validazione funzionale con i miRNAs miR-96, miR-144, miR-874, e miR-342, scelti sulla base di predizioni bioinformatiche. In seguito, ho analizzato gli effetti dei miRNAs validati sulla sopravvivenza di cellule A549, e per confronto nelle stesse cellule trattate con inibitori proteici di due proteine chiave coinvolte nei meccanismi di riparazione omologa e non-omologa (*RAD51* e *DNA-PKcs*).

1.Introduzione

1.1.Risposta cellulare alle doppie rotture al DNA

Ogni cellula è costantemente impegnata nel mantenimento dell'integrità genomica, poiché danni al materiale genetico si verificano in continuazione per una varietà di cause esogene o stress metabolici endogeni. I possibili tipi di danno al DNA sono molteplici, ma le rotture a doppio filamento (DSBs, double-strand breaks) sono considerate le lesioni più deleterie dato che, se non riparate, provocano grande instabilità genomica portando a traslocazione cromosomica e/o aneuploidia. Questi due eventi hanno forti conseguenze sulla cellula: causano delezioni, duplicazioni e mutazioni geniche che possono dare origine ai processi di tumorigenesi se per esempio aumentano il numero di copie e/o l'espressione di oncogeni, o viceversa, se diminuiscono il numero di copie e/o inattivano geni oncosoppressori. Le rotture a doppio filamento sono il principale tipo di danno causato da radiazioni ionizzanti (IR), ovvero raggi-X e raggi- γ , in particolare questi ultimi a causa della maggior energia ad essi associata. Sia nei procarioti che negli eucarioti si riscontrano due principali, ed in parte conservati, meccanismi per la risoluzione di DSBs: la ricombinazione omologa (HR, homologous recombination) e la ricombinazione non omologa (NHEJ, non-homologous end-joining). La presenza di una doppia rottura al DNA dà origine ad una cascata di eventi che porta all'attivazione di una complessa risposta cellulare al danno, nota come DNA-Damage Response (DDR) [1]. Questa comprende diverse fasi tra cui rilevazione del danno e trasduzione del segnale a proteine effettrici coinvolte nella riparazione del DNA, nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione di apoptosi. In presenza di DSBs si attivano le Ser/Thr chinasi appartenenti alla famiglia PIKKs (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases): ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit). Il loro ruolo consiste nel trasmettere ed amplificare il segnale di danno alle proteine effettrici in modo da sollecitare un'opportuna risposta ed insieme fosforilano più di 700 proteine regolando il ciclo cellulare, promuovendo il rimodellamento della cromatina e contribuendo a reclutare e trattenere le proteine coinvolte nella

riparazione del DNA [1, 2, 3]. La presenza di danni al DNA infatti blocca il ciclo cellulare per dar modo alla cellula di riparare i danni. Questa regolazione avviene grazie a proteine che agiscono sui checkpoint cellulari, le Chks (Checkpoint kinases), attivate tramite fosforilazione. Le chinasi Chks inibiscono le proteine CDKs (Cycline-dependent kinases), bloccando il ciclo cellulare in uno dei tre checkpoint: durante la progressione G1-S, nella fase S, durante la progressione G2-M. In particolare ATM agisce sulla chinasi Chk2 ed è attivata da rotture a doppio filamento, mentre ATR agisce sulla chinasi Chk1 e viene attivata da rotture a singola elica o lesioni alle basi [3, 1]. Un'altra importante ed immediata risposta cellulare è la modificazione della cromatina nell'area lesa. Tale azione, svolta principalmente da ATM, prevede la fosforilazione rapida ed abbondante della Ser-139 nella variante istonica H2AX presente nei nucleosomi che circondano i siti di doppia rottura. Il ruolo della fosforilazione istonica sembra essere quello di indicare i siti danneggiati e rendere meno condensata la cromatina, aumentando così lo spazio per il reclutamento delle proteine di riparazione [4]. Si formano dunque foci H2AX correlati ad ogni DSB ed uno dei primi complessi richiamati a livello di questi foci è MRN (MRE11/RAD50/NBS1), reclutato dalla proteina RAD17, attivata da ATM. I componenti del complesso MRN sono diffusi in tutto il nucleo in concentrazione costante durante il ciclo cellulare e vengono rapidamente rilocalizzati al momento del bisogno [2]. MRE11 (Meiotic Recombination 11 Homolog A) è una proteina nucleare che possiede un'attività intrinseca di legame al DNA con specificità per DSBs, un'attività endonucleasica ed una esonucleasica 3'-5' verso una varietà di substrati a singola elica (ssDNA) e a doppia elica (dsDNA). Promuove la resezione del DNA con formazione di ssDNA, contribuendo così ad attivare ATR. Costituisce la fase preliminare ad entrambi i *pathways* HR e NHEJ, ma la mancanza di un'attività esonucleasica 5'-3' non le permette di generare i lunghi filamenti 3' sporgenti necessari per HR. Poiché sia in lievito sia nei mammiferi sono state identificate altre 5'-3' esonucleasi che contribuiscono alla HR, si ritiene che altri enzimi operino in concerto con il complesso MRN per quanto riguarda la riparazione per ricombinazione omologa [2]. La proteina RAD50 è un membro della famiglia SMC (Structural Maintenance of Chromosome) e contiene un lungo dominio interno coiled-coil che termina con un motivo "zinc-hook" (CxxC), mentre le

porzioni N- e C- terminali si associano a formare una struttura globulare con attività ATPasica, che lega le estremità a doppio filamento e le srotola parzialmente. RAD50 e MRE11 formano tetrameri $MRE11_2RAD50_2$ che si inseriscono a livello delle rotture e contribuiscono a tenere ravvicinate le due estremità rotte di DNA: i dimeri MRE11 facilitano questa azione sulle corte distanze, mentre RAD50 è in grado di connettere due molecole di DNA molto più distanti (come un cromosoma rotto ed il suo cromatidio fratello) dimerizzando tramite i domini zinc-hook [2]. La terza proteina del complesso è NBS1 (Nijmegen breakage syndrome) che grazie alla sequenza di localizzazione nucleare è responsabile della traslocazione nel nucleo di $MRE11_2RAD50_2$ tramite legame con MRE11, mentre porta il complesso sui foci H2AX attraverso il legame con RAD17. NBS1, in cooperazione con RAD50, stimola l'attività esonucleasica di MRE11, mentre lega ed attiva dimeri di ATM. L'attivazione di ATM prevede l'autofosforilazione a livello della Serina1981 ed il passaggio alla forma di monomero attivo, con un certo numero di monomeri che rimangono in prossimità delle rotture (fosforilando i substrati co-localizzati) ed altri monomeri che invece diffondono al di fuori dei siti DSBs per agire su target nucleari coinvolti nella DDR. Si ha dunque che una frazione di ATM viene inizialmente attivata in seguito a DSBs, andando a fosforilare RAD17, il quale a sua volta porta il complesso MRN a livello delle DSBs dove promuove un'ulteriore attivazione di ATM, generando così un loop di amplificazione del segnale [2].

1.2. Ricombinazione Omologa (*Homologous Recombination, HR*)

Il macchinario enzimatico coinvolto in tale processo è lo stesso impiegato nei meccanismi di crossing-over (CO) ed è perciò attivo solamente durante la fase S tardiva e la fase G2 del ciclo cellulare, quando il DNA è replicato. In questo modo il cromosoma danneggiato può essere riparato senza perdita di informazione genetica (a patto che il cromatidio fratello sia integro) e ciò rende la HR il

meccanismo per eccellenza per la preservazione della stabilità genomica. Il processo può essere suddiviso in quattro fasi: i) riconoscimento delle rotture ii) processamento delle estremità con formazione di filamenti a singola elica iii) formazione della Giunzione di Holliday iv) risoluzione della Giunzione di Holliday.

Inizialmente il complesso MRN agisce eliminando i nucleotidi in direzione 5'-3' a livello delle estremità rotte, producendo corti filamenti a singola elica 3' terminale. L'attività di MRE11 non è sufficiente per creare i lunghi filamenti ssDNA atti alla HR, che necessita di nucleasi con maggiore attività. In lievito (*S. cerevisiae* e *S. pombe*) è presente un modello a "due step" per la resezione di DSBs: MRE11 coopera con SAE2 (SUMO1 Activating Enzyme Subunit 2), omologo di CtIP nell'uomo, per una limitata resezione (~100bp), che serve come substrato per una resezione più estesa (~2-

3kb) mediata dall'attività esonucleasica 5'-3' di EXO1 (Esonucleasi 1) e da quella endonucleasica di DNA2 (DNA Replication Helicase/Nuclease 2) in collaborazione con l'elicasi BLM (Bloom Syndrome, RecQ Helicase-Like) [5]. Nell'uomo questa attività di resezione è meno chiara, ma è noto che CtIP (CTBP-

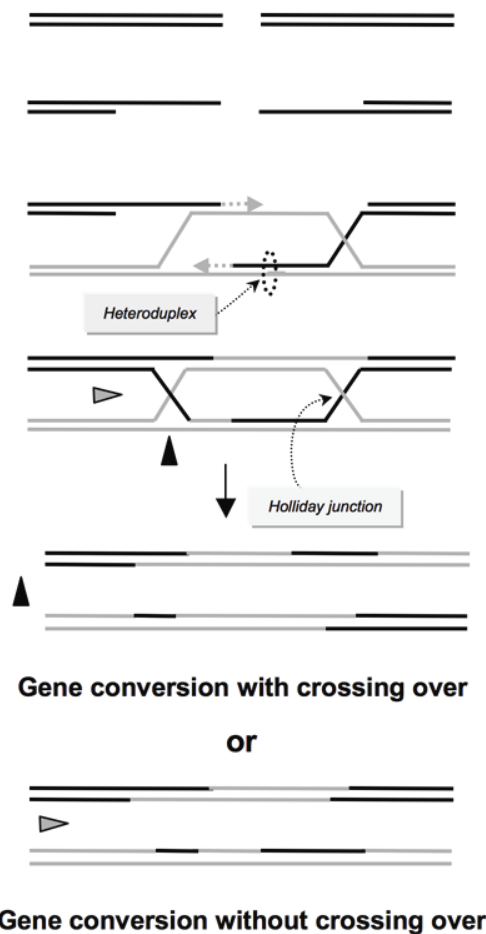


Figura 1: rappresentazione del meccanismo di invasione del filamento omologo e risoluzione della Giunzione di Holliday [6]

Interacting Protein) presenta diversi siti di fosforilazione ed alcuni di questi, localizzati nella regione centrale della proteina, risultano necessari per l'associazione con NBS1. NBS1 promuove la fosforilazione di CtIP da parte di ATM, evento importante per la resezione delle estremità. Inoltre sia CtIP sia MRN sono importanti per il reclutamento di Exo1 sui siti DSBs. Il lungo filamento 3'-ssDNA che si genera viene quindi riconosciuto e legato da RPA (Replication Protein A) per affinità, impedendo che si avvolga su stesso o che formi strutture secondarie come le forcine, le quali prevengono l'assemblaggio della proteina a valle, la ricombinasi RAD51 [5]. In seguito BRCA2 (Breast Cancer 2) scalza RPA e recluta RAD51, permettendone la traslocazione nel nucleo. RAD51 è la proteina che media lo step cruciale della HR, cercando omologie di sequenza e promuovendo l'invasione, da parte del filamento a singola elica danneggiato, dell'omologo filamento di DNA a doppia elica, un processo chiamato "DNA strand exchange" [6]. Si viene a formare inizialmente un D-loop dove una DNA-polimerasi estende il 3' terminale ssDNA che ha invaso il cromatide fratello; successivamente comincia la sintesi anche sull'altro filamento ssDNA con formazione della cosiddetta Giunzione di Holliday, una struttura mobile a croce composta da quattro filamenti di DNA. Tale giunzione permette lo scorrimento del DNA, ovvero la capacità del filamento che invade di scalzare il filamento omologo. La risoluzione della struttura può avvenire in due diversi orientamenti, generando conversione genica con o senza crossing-over; infine le estremità tagliate verranno saldate dalla DNA Ligasi1 (LIG1). Tale processo tollera alcune differenze di sequenza tra le molecole coinvolte e per questo si parla di un ibrido di molecole dsDNA detto "heteroduplex". Tuttavia una minima sequenza di omologia di circa 200-250 paia di basi (bp) nei mammiferi (MEPS, Minimal Efficient Processing Segment) è richiesta per promuovere efficientemente la HR [6]. Il complesso MRN-CtIP svolge dunque un'azione preliminare molto importante, perché estremità "blunt" o modestamente processate vengono legate da dimeri delle proteine KU (NHEJ) mentre se correttamente tagliate preparano la cellula per il reclutamento di RAD51. Mentre i componenti del complesso MRN sono costantemente presenti durante tutto il ciclo cellulare, la concentrazione della proteina CtIP ed il suo livello di fosforilazione variano a seconda della fase: è appena identificabile in G0/G1 mentre mostra una

massima concentrazione in S/G2, con 12 potenziali siti di fosforilazione target di CDK [2, 5]. Allo stesso modo, la proteina RAD51 mostra i massimi livelli di espressione durante le fasi S/G2 [7].

1.3. Ricombinazione Non Omologa (*Non-Homologous End-Joining, NHEJ*)

A differenza della ricombinazione omologa questo meccanismo di riparazione è attivo durante tutto il ciclo cellulare dal momento che non richiede un partner intatto, ma non è in grado di conservare interamente la sequenza originale e le delezioni sono inevitabili. Le doppie rotture portano alla perdita di nucleotidi alle estremità coinvolte e la mancanza di uno stampo non permette il recupero della sequenza. Analogamente alla HR, il processo può essere suddiviso in diverse fasi: i) riconoscimento delle rotture ii) processamento delle estremità iii) ligazione. Le estremità esposte vengono legate da eterodimeri delle proteine KU70/80 che hanno affinità per strutture terminali a doppio filamento, sia “blunt” sia “sticky”, indipendentemente dalla sequenza. Essi formando anelli asimmetrici che racchiudono al loro interno la doppia elica ed in seguito traslocano allontanandosi dalla rottura così da permettere il reclutamento della proteina DNA-PKcs, la quale andrà ad interagire direttamente con le estremità libere [8, 9]. KU70 e KU80 agiscono infatti come “scaffold” richiamando altre proteine coinvolte nella NHEJ, mentre DNA-PKcs è una Ser/Thr chinasi che gioca un ruolo chiave in questo meccanismo. Essa ha il ruolo di bloccare un'impropria degradazione e/o una ligazione prematura finché le due estremità del cromosoma danneggiato non saranno correttamente giustapposte, impedendo l'accesso a nucleasi o ligasi con la sola presenza fisica [8]. Non è richiesta né attività enzimatica né regolazione tramite fosforilazione per il legame al DNA: essa viene reclutata dal C-terminale di KU80 attraverso una regione conservata di 12 residui che interagiscono direttamente con DNA-PKcs, anche se si ritiene esista un'interazione più complessa che non coinvolga solo questi residui [9]. DNA-PKcs è composta da un largo dominio N-terminale ad α -elica che forma due lunghe braccia dentro alle quali si posiziona il DNA danneggiato e che risultano essere (tramite predizioni) parecchio flessibili, mentre le regioni alla base mostrano un'apertura, suggerendo

come queste strutture possano muoversi attorno al DNA [8]. L'autofosforilazione a livello della serina S2056 comporta un cambiamento conformazionale della proteina, mediando l'apertura e la chiusura delle due braccia e così la sua dissociazione dal DNA, che avviene solamente una volta raggiunto il corretto allineamento delle estremità del cromosoma danneggiato. Non solo, anche la fosforilazione da parte di ATM sulle treonine T2609 e T2647 produce lo stesso effetto [8]. La presenza sul DNA della DNA-PK richiama la nucleasi Artemis (DNA Cross-Link Repair 1C, DCLRE1C) ed il complesso XLF-XRCC4-LIG4, con l'enzima Ligasi 4 responsabile dell'unione dei due pezzi di cromosoma. Artemis possiede attività 5'-3' esonucleasica ed attività 5'-3' endonucleasica in presenza di forcine, segmenti sporgenti e della proteina DNA-PKcs, regolando in tal modo la resezione. Il suo C-terminale infatti, altamente fosforilato in vivo, interagisce con DNA-PKcs e LIG4 [9]. Le proteine XRCC4 (X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4) e XLF (XRCC4-like factor) non mostrano alcuna attività enzimatica, ma la prima interagisce con il C-terminale di LIG4 stabilizzandola, mentre la seconda ne stimola l'attività e ne promuove l'adenilazione [9]. Entrambe interagiscono con KU ed è stato dimostrato in vitro che KU è in grado di reclutare XRCC4-LIG4 e XLF sul DNA [9]. XRCC4 e XLF dimerizzano formando lunghi filamenti ad elica che agiscono come ponti, trattenendo ed allineando le estremità da ligare e proteggendole da nucleasi. Il legame della LIG4 con XRCC4 destabilizza i dimeri XRCC4-XLF in vitro, promuovendo una possibile dissociazione dei filamenti e suggerendo una conformazione dove i complessi XRCC4-LIG4 siano presenti solamente alle terminazioni delle estremità da ligare, mentre LIG4 sarebbe assente all'interno dei filamenti XRCC4-XLF [9]. Infine, poiché sia DNA-PKcs che XLF proteggono le estremità dalla resezione, è possibile che i filamenti XRCC4-XLF non si formino finché DNA-PKcs non rilascia le rotture [9]. Un importante modulatore della NHEJ è la proteina 53BP1 (p53 Binding Protein), che trattiene le estremità rotte e sopprime la resezione probabilmente formando una barriera o inibendo l'attività della EXO1 [6]. La ricombinazione non omologa permette dunque di unire due estremità non del tutto complementari, con la possibilità di generare diversità a livello della giunzione. È considerato un meccanismo *error prone* ma a differenza di altri *pathways* non conservativi, la ricombinazione non omologa cerca di

preservare il più possibile della sequenza di DNA attraverso una resezione ristretta, a scapito di introdurre mutazioni dovute peraltro non alla scarsa efficienza del meccanismo, ma alla struttura della doppia elica in seguito alla rottura [10]. Il meccanismo NHEJ (detto anche Classical NHEJ, C-NEHJ) protegge dunque da un'eccessiva degradazione non conservativa alla ricerca di omologie perfette di sequenza più distali, usate per esempio nella A-EJ (Alternative End-Joining).

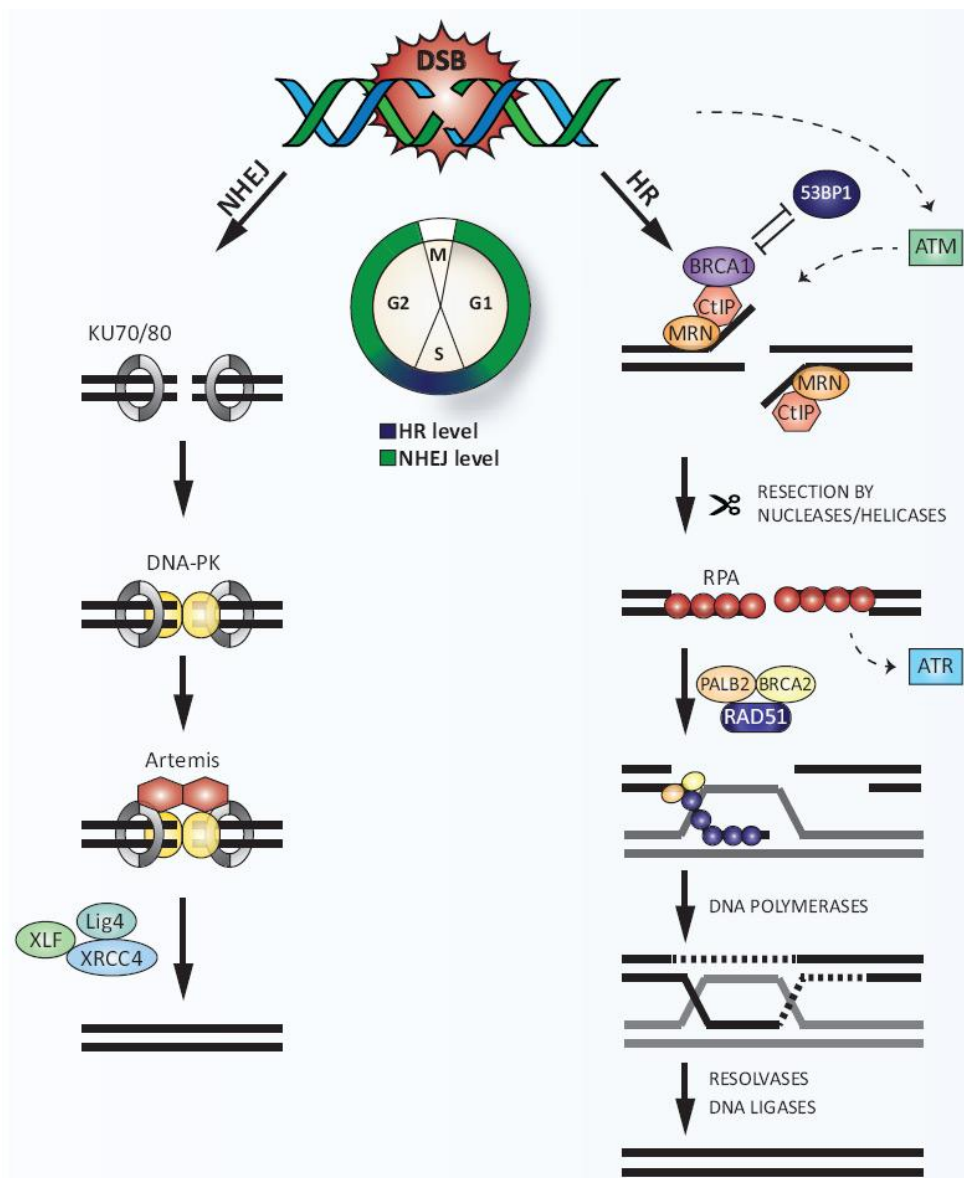


Figura 1.2: Meccanismi d'azione dei due principali *pathways* per la riparazione di DSBs [Targeting DNA double-strand break signalling and repair: recent advances in cancer therapy, 2013, Daniela Hühn, Hella A. Bolck, Alessandro A. Sartori, Swiss Med Wkly].

1.4. Ricombinazione Non Omologa Alternativa (*Alternative End-Joining, A-EJ*)

Recentemente è emerso un nuovo processo che non necessita di un partner omologo, è altamente mutagenico e causa larghe delezioni. Esso è DNA-PKcs-LIG4- e KU- indipendente, mentre condivide le fasi iniziali di resezione con il meccanismo HR, sebbene non necessita di un'estesa resezione. Il complesso MRN è coinvolto in questo meccanismo alternativo, assieme alle proteine Ligasi 1 e 3, XRCC1, PARP1 [11]. Il meccanismo A-EJ sembra operare quando il *pathway* canonico C-NHEJ è compromesso, anche se recenti studi mostrano il contrario sia in cellule normali che tumorali [11]. Inoltre non presenta un meccanismo d'azione unico, ma sono evidenti diversi modelli che non permettono di parlare di A-EJ come di un singolo *pathway*. La maggior parte delle riparazioni che avvengono mediante A-NHEJ utilizzano regioni di "microomologia" ovvero sequenze di omologia corte, rispetto a quelle impiegate nella HR. Si parla così di MMEJ (Microhomology mediate end-joining) ma anche in questo punto la letteratura non fornisce dati certi, in quanto alcuni studi riportano sequenze di omologia lunghe 2-8nt [10] mentre un lavoro più recente indica come sia necessario un minimo di 5nt [11]. Nella ricerca di queste omologie di sequenza è coinvolta la nucleasi Mre11 [6, 2]. È noto anche il meccanismo PARP1-EJ, il quale utilizza la proteina PARP1 e condivide le stesse proteine sopra citate con il meccanismo MMEJ, ma non sembra essere attivo in presenza del macchinario completo e funzionante della NHEJ, in quanto la presenza di KU sul DNA bloccherebbe l'accesso a PARP1 (entrambi hanno affinità per DSB); MMEJ invece risulta in parte attivo anche in presenza di una NHEJ funzionale, quando le rotture a doppia elica sono fiancheggiate da sequenza di omologia. Lo step conclusivo è in ogni caso la ligazione delle estremità ad opera di XRCC1, LIG1 e/o LIG3, dove entrambe le ligasi mostrano un ruolo nella MMEJ [11].

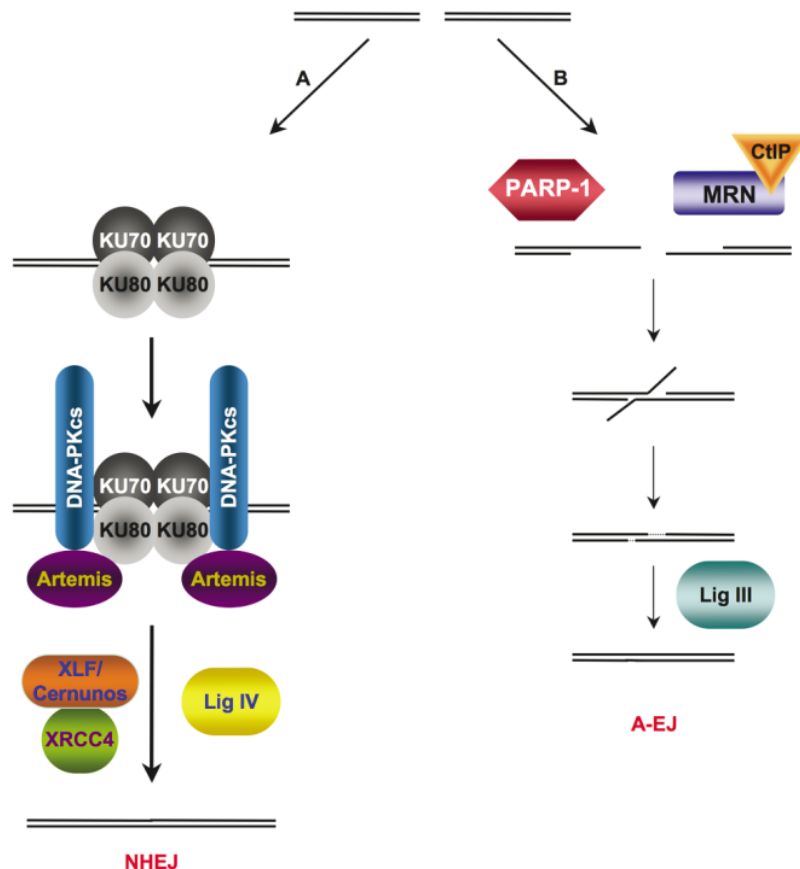


Figura 1.3: I diversi step delle vie di riparazione Canonical NHEJ ed Alternative NHEJ [6].

La scelta del meccanismo di riparazione più appropriato è essenziale per preservare l'integrità del genoma, tenendo sotto controllo l'equilibrio tra stabilità genetica e mutazioni. L'importanza dei meccanismi di riparazione dei DSBs durante l'evoluzione è dimostrata dalla conservazione delle principali proteine coinvolte dal lievito fino ai mammiferi (PIKK, RAD51, KU). La scelta invece varia tra le diverse specie e tipi cellulari. Nel lievito e negli eucarioti semplici la presenza di un genoma compatto e con relativamente poche sequenze ripetute, favorisce l'uso di HR; nei mammiferi il contenuto di DNA non codificante aumenta notevolmente assieme alla percentuale di elementi ripetuti, orientando la scelta verso il meccanismo di NHEJ che risulta essere più rapido ed efficiente, oltre che sempre disponibile [2]. I fattori che influenzano la scelta sono:

i) Ciclo cellulare

Mentre NHEJ e A-EJ sono sempre attive, HR opera solamente durante le fasi S/G2. Lo shift da NHEJ a HR che si verifica con l'avanzare del ciclo cellulare da G1 a S/G2 è regolato dalla disponibilità di alcune proteine chiave come RAD51, la cui presenza nella cellula diventa significativa solamente durante la replicazione del genoma (fasi S/G2), mentre è quasi assente in cellule uscite dal ciclo cellulare (G0) [7].

ii) Processamento delle estremità

Estremità "blunt" o modestamente processate sono target dei dimeri KU70/80, mentre la resezione mediata da MRE11/EXO1/DNA2 orienta la cellula verso HR o A-EJ a seconda della fase del ciclo cellulare. Nelle fasi G0 e G1 la resezione è regolata negativamente e viene promosso il meccanismo NHEJ, mentre durante le fasi S/G2 si ha un'estensiva resezione a livello delle rotture per facilitare il legame di RPA e sfavorire il dimero KU70/80 che mostra poca affinità per lunghi filamenti 3' terminali ssDNA. La riparazione non omologa non è comunque assente, anzi compete per il legame delle doppie rotture e rimane molto attiva nei processi di riparazione. Il processamento delle estremità è una condizione essenziale per la HR ma deve essere strettamente regolato per una serie di ragioni: potrebbe favorire il processo di A-EJ che non è conservativo e porta a grande instabilità; se gli eventi di CO avvengono fra sequenze ripetute (di cui il nostro DNA è ricco) potrebbe portare a gravi riarrangiamenti genomici come delezioni, amplificazioni, inversioni, traslocazioni, conversione genica; infine, gli intermedi non risolti dei processi di HR sono tossici e possono generare instabilità genetica [6].

iii) MRN e KU

Il complesso MRN ha un ruolo a monte dei due processi HR e NHEJ, agendo come sensore di danno ed aumentando l'attivazione di ATM. Esso può contribuire alla HR promuovendo il reclutamento delle nucleasi EXO1/DNA2 mentre nella NHEJ un set unico di proteine è deputato al riconoscimento delle rotture, i dimeri KU70/80. È certo che questi due complessi di proteine si inibiscono a vicenda: KU sopprime HR riducendo l'accesso della EXO1 al DNA, mentre SAE2

(ortologo della proteina umana CtIP) sembra essere necessario per la rimozione di KU dalle estremità rotte. Non è ancora chiaro se l'evento iniziale di legame di KU e MRN al DNA sia random (pura competizione) o se esista un meccanismo che favorisca la scelta del più appropriato in accordo con la fase del ciclo cellulare. È possibile che alcune proteine ostacolino il legame di KU, in particolare durante la fase S dove la HR necessita di essere promossa. A tal proposito è noto come CtIP formi complessi con BRCA1, facilitando la rimozione di RIF1 (Replication Timing Regulatory Factor 1), proteina coinvolta nella NHEJ, e reclutata da 53BP1. I complessi 53BP1-RIF1 e CtIP-BRCA1 competono per il legame alle estremità DSBs, regolando la scelta del meccanismo di riparazione, con BRCA1 che restringe RIF1 alla fase G1, e RIF1 che a sua volta restringe la presenza di BRCA1 sul DNA alle fasi S/G2 [5].

iv) DNA-PKcs

La sola presenza di questa proteina nei siti di danno è in grado di impedire la ricombinazione omologa, in quanto la sua assenza porta ad un aumento nell'uso di HR, mentre una sua inibizione chimica impedisce entrambi i meccanismi di NHEJ e HR. Ciò è dovuto al fatto che inibendo l'attività enzimatica della proteina DNA-PKcs non si previene la sua associazione al DNA, ma si impedisce l'autofosforilazione ed il conseguente distacco dal sito di danno. In questo modo le proteine coinvolte nei successivi step della NHEJ o quelle coinvolte nella HR, non possono accedere al DNA e operare di conseguenza. Esperimenti di resezione in vitro mostrano come l'inibizione enzimatica (tramite NU7026) della DNA-PKcs inibisce fortemente la resezione delle estremità in presenza di MRN, mentre la sua assenza ne provoca un notevole aumento. L'aggiunta di ATM consente il recupero della resezione in presenza di NU7026 e questo è spiegato dal fatto che il rilascio del DNA da parte della DNA-PKcs è regolato anche tramite fosforilazione da parte di ATM. [12].

Per quanto riguarda le cellule di mammifero si può dire che esista una gerarchia funzionale per questi tre pathways, allo scopo di garantire una riparazione rapida ed accurata delle DSBs, con il meccanismo di NHEJ che domina sugli altri due [13]. Studi su fibroblasti umani riportano una frequenza della ricombinazione non omologa di 3:1 rispetto a quella omologa, con tempi di riparazione che vanno dai ~30 minuti per NHEJ a più di 7 ore per HR. Gli esperimenti sono stati effettuati su cellule ciclanti [14]. In cellule in G0 si ritiene che il contributo della HR sia ulteriormente inferiore, dal momento che queste cellule non necessitano più di replicare l'intero genoma. Infatti, la principale causa di DSBs in condizioni fisiologiche è il collasso delle forche di replicazione e quindi, essendo il rischio di DSBs minimo per le cellule che sono uscite dal ciclo, le proteine coinvolte nella riparazione omologa vengono regolate negativamente [7,14].

1.5. MicroRNAs

I microRNAs sono RNA non codificanti lunghi ~22 nucleotidi (nt) che influiscono su stabilità e traduzione di RNA messaggeri (mRNAs) tramite appaiamento alla regione 3'-UTR (Untranslated Region). Se l'appaiamento è perfetto si ha la rapida degradazione del mRNA target tramite taglio endonucleolitico diretto, altrimenti, se è presente qualche mismatch si avrà blocco della traduzione e de-adenilazione del poly(A) accelerando così il normale processo di degradazione [15,16]. Il primo caso è il *modus operandi* tipico delle piante, il secondo invece è la via preferenziale che si riscontra negli animali [15]. I miRNAs possono essere suddivisi in quattro categorie in base alla loro posizione nel genoma: intergenici se il precursore è localizzato tra due geni codificanti consecutivi; esonici o intronici se si trovano rispettivamente in esoni o introni di geni codificanti proteine; infine una categoria “mista” che comprende precursori di miRNAs localizzati in regioni 3'-UTR, 5'-UTR o in una qualsiasi combinazione di regioni introniche, esoniche, 3'-UTR, 5'-UTR [17]. Nell'uomo la maggior parte dei miRNAs risulta essere intronica [16]. I miRNAs intergenici sono trascritti come unità indipendenti, dotati di un loro proprio promotore (TSS, transcription start site) che viene legato dalla RNA Polimerasi II e dagli stessi fattori di trascrizione implicati nella biogenesi degli mRNAs. Le altre categorie di miRNA vengono trascritte assieme all'RNA messaggero del gene del quale fanno parte e rilasciate grazie ad un processamento post-trascrizionale tramite il macchinario proteico responsabile dello splicing (spliceosoma). Questi miRNAs vengono chiamati “*Mirtrons*” e sono soggetti ai promotori che regolano la trascrizione dei geni codificanti, ma non è ancora del tutto chiaro se la loro biogenesi è un processo separato da quello responsabile della produzione del mRNA maturo, o se è interconnesso [17]. Il 60% circa dei miRNAs nei mammiferi fanno parte di trascritti policistronici e vengono quindi identificati come una famiglia di miRNA, con livelli di espressione spesso, ma non sempre, fortemente correlati [16]. I miRNAs organizzati in cluster sono principalmente intergenici e condividono in genere funzioni biologiche simili, agendo sullo stesso *pathway* [16,17]. I microRNAs non sono gli unici acidi nucleici non codificanti con funzione regolatoria. Si conoscono molte altre classi di RNA quali i siRNAs (short

interference RNA) presenti anche in procarioti ed archea con un'origine evolutiva molto antica ed un ruolo anti virale in piante ed animali; i piRNAs (piwi RNA) che assicurano la stabilità della linea germinale reprimendo i trasposoni; i lncRNAs (long non coding RNA) che hanno svariate funzioni nella regolazione trascrizionale ed epigenetica, e molti altri [15]. Tra tutti gli RNA non codificanti, i miRNAs sono quelli che presentano il più complesso network di azione sia all'interno che all'esterno della cellula, regolando moltissime funzioni cellulari e venendo a loro volta regolati in svariati modi.

1.6. Biogenesi e meccanismo d'azione dei miRNAs

Per quanto riguarda i miRNAs intergenici, essi vengono trascritti nel nucleo in lunghe molecole dette pri-miRNAs, che possono superare i 1000 nucleotidi (nt). Queste si ripiegano generando una struttura a forcina (*stem-loop*) grazie a sequenze interne abbastanza complementari, dove uno dei due filamenti della forcina diventerà il miRNA maturo. I pri-miRNAs posseggono un "cap" al 5' (m⁷G) ed un poly(A) al 3' e vengono processati liberando una forcina più corta (60-90nt), parzialmente a doppia elica, detta pre-miRNA. Il taglio avviene ad opera di un complesso detto Microprocessor, costituito da due endonucleasi di tipo Rnasi III, DROSHA (Drosha, Ribonuclease Type III) e DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) [15, 18]. DROSHA taglia il pri-miRNA sullo strand 3', 11paia di basi dalla base della forcina e per certi miRNAs necessita di cofattori aggiuntivi come le elicasi DEAD-box p68 e p72 che sembrano stabilizzare il Microprocessor, o le proteine SMAD che invece sono coinvolte nella regolazione positiva di certi miRNA, come il miR-21. Il pre-miRNA presenta 2nt sporgenti all'estremità 3', un gruppo fosfato in 5' e viene attivamente esportato nel citoplasma dal complesso Esportina5/RAN sfruttando l'energia di una molecola di GTP. L'Esportina è una GTPasi in grado di portare il pre-miRNA al poro nucleare, dove, stimolando l'idrolisi del Ran-GTP a Ran-GDP causa il disassemblaggio del complesso con il rilascio del pre-miRNA nel citoplasma. L'Esportina torna nel nucleo tramite diffusione attraverso il poro, per mediare un successivo processo, mentre il pre-miRNA viene riconosciuto e legato dal

complesso DICER (Dicer 1, Ribonucleasi Tipo III)/TRBP (trans-attivatore RNA (tar)-binding protein) [15].

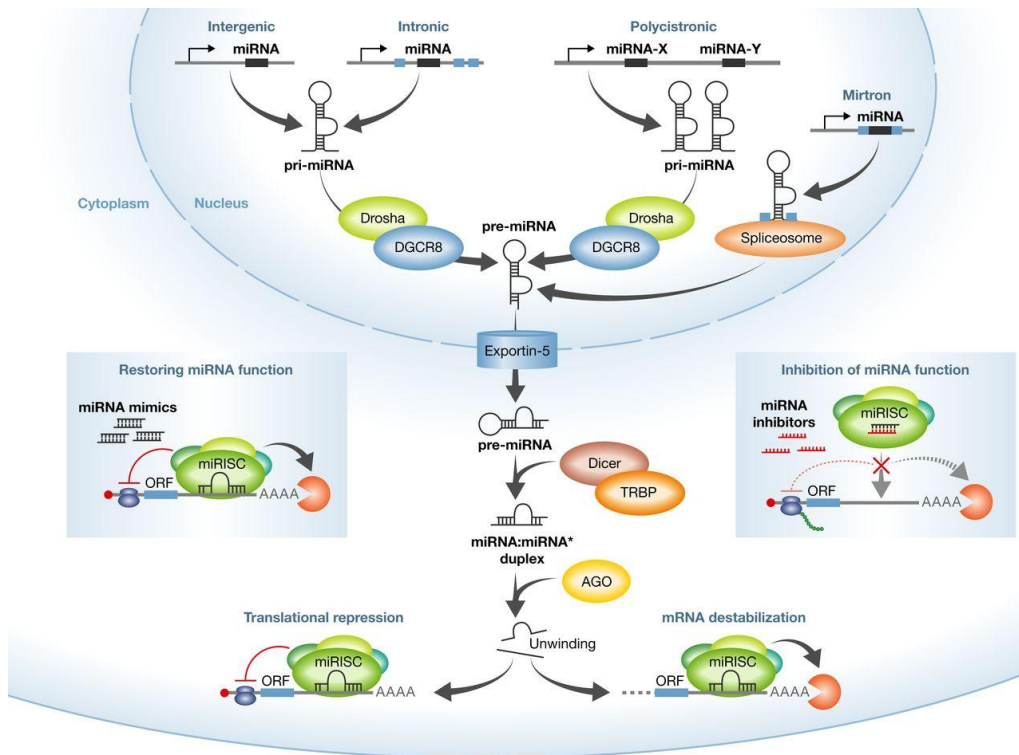


Figura 1.4: biogenesi e meccanismo d'azione delle varie classi di microRNA [Development of microRNA therapeutics is coming of age, 2014, Eva van Rooij, Sakari Kauppinen, EMBO Mol Med].

L'enzima DICER è una ribonucleasi di tipo III come DROSHA, ma a differenza di quest'ultima contiene un dominio PAZ, il quale consente di legare i 2nt sporgenti generati da DROSHA. DICER taglia il pri-miRNA ~22nt dal sito di taglio di DROSHA, rimuovendo il loop terminale e generando un duplex contenente gli strands miRNA e miRNA*, rispettivamente il miRNA maturo e la sequenza complementare che viene generalmente degradata. La relazione fra struttura secondaria (compresi criteri termodinamici) e processamento del pri-miRNA ha una grande influenza sulla scelta dello strand maturo, il quale può originare sia da uno che dall'altro strand, con alcuni pre-miRNA che producono miRNAs maturi da entrambi [15]. Il filamento maturo viene quindi caricato nel complesso RISC (Rna-induced Silencing Complex) mentre il filamento complementare miRNA*

viene degradato [18, 15, 16]. Il miRNA maturo guida il RISC verso mRNAs bersaglio, conferendo specificità al complesso attraverso una sequenza al 5' detta "seed" che occupa le posizioni 2-7 del miRNA. La regione *seed* è l'unica a formare un vero duplex (doppia elica) con il trascritto target e se le sequenze sono perfettamente complementari, il messaggero verrà tagliato dalla proteina catalitica del complesso RISC, Argonata 2 (AGO2) nell'uomo. Le proteine Argonata sono caratterizzate da due domini di legame, un dominio PAZ (Piwi-Argonate/Zwille) che lega il 3' terminale del miRNA e un dominio MID che lega il 5' terminale. Il taglio è mediato dal dominio Piwi (presenta omologia di struttura con RNase H) ed avviene tra i nucleotidi dell'RNA messaggero complementari alle posizioni 10 e 11 del miRNA [16]. Le proteine Argonata sono presenti in tutti e tre i domini viventi e mostrano una conservazione a livello strutturale non indifferente, suggerendo una possibile antica funzione nel processamento di corti acidi nucleici regolatori [16]. Nel caso la sequenza *seed* non sia perfettamente complementare (situazione standard negli animali) si ha da subito l'inibizione della traduzione, bloccando l'azione del ribosoma, prevenendone il legame, o sequestrando i mRNAs nei P-bodies dove si ha una regolazione del loro turnover. Nel primo caso si può avere il distacco prematuro del ribosoma, un suo blocco sulla proteina o un rallentamento dell'allungamento, ciascuno dei quali seguito dalla degradazione della proteina. In secondo luogo il complesso RISC recluta, attraverso le proteine GW182 direttamente legate ad Argonata, due complessi di deadenilasi (PAN2-PAN3 e CCR4-NOT) che eliminano il poly(A), mentre DCP2 (Decapping MRNA 2) rimuove il *cap* in 5'. Infine l'RNA messaggero viene degradato da XRN1 (5'-3' Exoribonuclease 1) un'esonucleasi citoplasmatica [16]. Al termine del suo ruolo, anche il miRNA maturo verrà degradato da esoribonucleasi 5'-3' o 3'-5' [18]. I *mirtrons* seguono lo stesso percorso tranne che per il processamento nucleare che da pri-miRNA genera pre-miRNA, dove interviene lo spliceosoma, anche se alcuni studi riportano un'interazione tra spliceosoma e Microprocessor [18]. Sono noti anche miRNAs intronici che posseggono una propria regione promotoriale, TSS, sebbene non frequenti [17]. Oltre alla via classica d'azione sopra descritta esistono varianti, seppur rare, dove per esempio la sequenza bersaglio dei miRNAs si trova al di fuori della regione *seed*; il legame all'RNA messaggero non

avviene nella canonica regione 3'-UTR, ma nel 5'-UTR; una sequenza nell'estremità 3' terminale del miRNA può intervenire nell'appaiamento con l'mRNA target, compensando l'imperfetto appaiamento della regione *seed* [16]. La ridotta dimensione della sequenza *seed* ed il fatto che non è richiesta una perfetta complementarietà con la regione target, fanno sì che i miRNAs possano regolare numerosi geni target (anche centinaia) e quindi per ogni miRNA si ha un complesso network di azione cellulare.

1.7. Ruolo dei miRNAs nel *pathway* DDR

I geni coinvolti nel *pathway* DDR subiscono spesso cambiamenti di espressione in seguito ad eventi genotossici. Dal momento che la trascrizione subisce una repressione generale in seguito a danni al DNA, sono necessari altri meccanismi che regolino la sintesi proteica da un pool già esistente di RNA. Approssimativamente il 50% dei cambiamenti nei livelli di mRNAs osservato in seguito a stress cellulari è dovuto al turnover, mentre il restante 50% è dovuto ad alterazioni della trascrizione [3]. Ad oggi è noto che molti geni coinvolti in risposta/riparazione di danni al DNA vengono fortemente regolati a livello post-trascrizionale dai microRNAs. Si stima che più della metà dei geni che regolano i checkpoints cellulari e la riparazione del DNA contengano siti target per miRNAs conservati [19]. Noti sono i miR-34a/34b/34c che controllano i geni responsabili della progressione del ciclo cellulare e dell'apoptosi: i promotori contengono siti di riconoscimento per p53 ed una volta indotti promuovono la morte cellulare; in particolare il miR-34a riduce i livelli della proteina anti-apoptotica BCL-2 (B-Cell CLL/Lymphoma 2) [3]. Anche il miR-144 controlla il processo di apoptosi regolando il gene pro-apoptotico BAX (BCL2-Associated X Protein [20]).

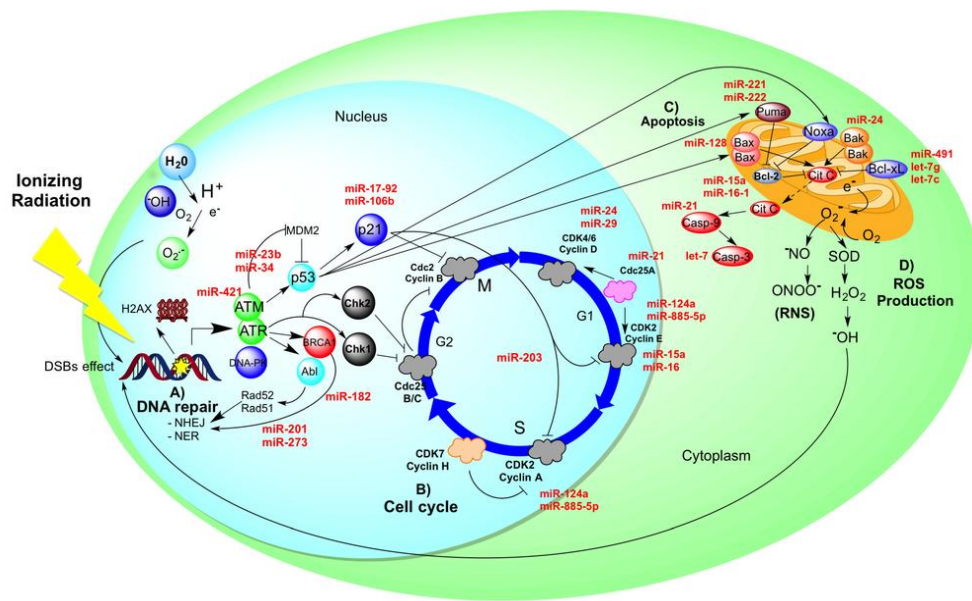


Figura 1.5: Rappresentazione delle principali risposte cellulari alla IR a) riparazione del DNA b) regolazione del ciclo cellulare c) induzione di apoptosi per danni irreparabili, e regolazione tramite miRNA [MicroRNAs in Cervical Cancer: Evidences for a miRNA Profile Deregulated by HPV and Its Impact on Radio-Resistance, 2014, Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, Molecules]

La via di segnale *DNA Damage Response* attivata in seguito a DSBs comporta l'attivazione di microRNAs implicati nella regolazione della riparazione di rotture a doppio filamento. I seguenti microRNAs sono alcuni fra i numerosi miRNAs, che hanno come bersaglio geni coinvolti nei processi HR e NHEJ: miR-101 (*DNA-PKcs* e *ATM*), miR-155 (*RAD51*), miR-96 (*RAD51*), miR-182 (*BRCA1*), miR-26a (*ATM*) [31]. Una delle principali cause di rotture DSBs sono le radiazioni ionizzanti (IR) a causa dell'alta energia ed esse associata, in particolare i raggi gamma ($\lambda < 10^{-10}$ m). Le radiazioni ionizzanti causano l'attivazione dei complessi meccanismi cellulari che danno origine alla *DNA Damage Response*, provocando alterazioni dei livelli di espressione di specifici miRNAs, che a loro volta alterano l'espressione genica. ATM è una delle prime proteine attivate da DSBs e sembra essere in grado di indurre molti miRNAs in seguito a IR. Essa attiva CREB (cAMP response element-binding protein), coinvolto in buona misura nell'espressione del miR-335 legandosi al suo promotore. Il miR-335 ha come target CtIP, modulando così gli step iniziali della resezione del DNA e la ricombinazione omologa. ATM fosforila anche p53, che a sua volta induce la

famiglia miR-34 come sopra descritto [18]. È stato riportato inoltre come ATM possa regolare la produzione di miRNAs non solo attraverso i fattori di trascrizione CREB e p53, ma anche agendo sulla loro biogenesi tramite BRCA1 e KSRP (KH-type splicing regulatory protein). Queste due proteine si legano ai complessi DROSHA/DICER accelerando il processamento dei pri-miRNAs [18].

Le radiazioni ionizzanti sono usate nella radioterapia contro tumori localizzati, colpendo le cellule tumorali con raggi- γ e provocando numerosi danni (principalmente DSBs) che causano spesso la morte della cellula colpita. Analizzando i profili di espressione di tessuti tumorali si è visto come un gran numero di microRNAs risultino sovraespressi o assenti rispetto a tessuti normali. I microRNA sovraespressi vengono classificati come oncogenici (detti oncomiRs) e promuovono la crescita tumorale destabilizzando gli RNA messaggeri di geni oncosoppressori. Al contrario, geni oncogeni richiedono bassi livelli di espressione dei miRNAs correlati. In particolare alcuni tipi tumorali mostrano una chiara resistenza alle radiazioni ionizzanti, riparando i numerosi danni indotti dalla radioterapia rispetto ad altre linee cellulari tumorali, dove, la sopravvivenza è nettamente inferiore e la terapia risulta più efficace. I tumori radio-sensibili sono infatti caratterizzati da difetti nei meccanismi di riparazione di danni al DNA, mentre in quelli radio-resistenti si riscontrano specifici microRNAs/profilo di microRNA sovra/sotto-regolati, con sovraespressione di proteine coinvolte nei *pathways* HR, NHEJ, A-EJ e DDR. Ad esempio, il gene *RAD51* risulta sovraespresso in diversi tumori (seno, polmone, prostata) e correlato a radio-resistenza. L'uso in vitro del miR-155 sensibilizza cellule tumorali del seno alle radiazioni ionizzanti [21]. Il miR-101 invece, produce miRNAs matrici da entrambi gli strands, sopprimendo i livelli di RNA messaggero dei geni *ATM* (miR-101) e *DNA-PKcs* (miR-101*), rendendo sensibili sia tumori polmonari che glioblastomi alla radioterapia [22]. Molti altri miRNAs sono stati validati e sono oggetto di studio, e potrebbe diventare buoni candidati per un futuro uso *in vivo*. La sovraespressione di miRNAs che hanno come targets oncogeni può infatti essere una potenziale strategia nella lotta alla radio-resistenza delle cellule tumorali, abbassando i livelli di espressione dei geni coinvolti in DDR e meccanismi di riparazione del DNA. La ridotta presenza delle relative proteine non consente un'efficiente riparazione delle doppie rotture indotte dalla radioterapia, causando

la morte delle cellule colpite dalle radiazioni. Tale strategia prevede l'utilizzo di miRNAs sintetici detti mimics, disegnati appositamente per mimare l'effetto di miRNAs endogeni. I mimics sono corte molecole di RNA a doppia elica, precursori di miRNAs maturi (pre-miRNAs), in grado di assicurare che il filamento corretto venga riconosciuto dal complesso RISC. Poiché alterazioni nei livelli di espressione dei geni coinvolti nella DDR sono spesso associate a radioresistenza, studiare quali siano i profili trascrizionali mutati e regolarli tramite microRNAs, potrebbe essere una prospettiva futura nella lotta alla radioresistenza.

1.8. Tumore al polmone

Secondo l'American Cancer Society il tumore al polmone è il secondo tumore per incidenza in uomini e donne, con un tasso di mortalità elevato (meno del 15% dei pazienti riescono a sopravvivere oltre i 5 anni dalla diagnosi). Esso si presenta in tre tipologie principali: NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) che rappresenta l'85% dei casi; SCLC (Small Cell Lung Cancer) riscontrabile nel 10-15% dei casi, caratterizzato da maggiore malignità e precoce metastasi; LCT (Lung Carcinoid Tumor) non comune (<5% dei casi) le cui cellule crescono lentamente e raramente danno metastasi. Il tumore al polmone viene trattato chirurgicamente, ove possibile, con l'impiego di chemio- e radio- terapia in base allo stadio di avanzamento. Chemio- e radio- terapia si basano sulla capacità di indurre danni citossici nelle cellule colpite, causandone la morte cellulare. In particolare, i raggi- γ impiegati nella radioterapia producono rotture a doppio filamento (DSBs) e la presenza di un solo DSB non riparato può portare ad apoptosi. Certi tumori al polmone risultano però resistenti a queste terapie, suggerendo alterazioni nei meccanismi di riparazione del DNA impiegati. Capire quali siano i geni che promuovono tale resistenza potrebbe aiutare non solo a diagnosticare il grado di resistenza di un tumore alla terapia, ma favorire la nascita di nuove terapie basate sulla specifica alterazione genica. Tali terapie cercano di annullare l'effetto di geni oncogeni, promotori di chemio- o radio- resistenza, in modo da aumentare l'efficacia di queste cure [23].

Scopo della tesi

Il lavoro svolto durante questo tirocinio di laurea magistrale ha come scopo quello di radiosensibilizzare cellule tumorali resistenti alle radiazioni ionizzanti, precisamente ai raggi- γ , che sono usati *in vivo* nella radioterapia. L'obiettivo di questo studio è quello di poter utilizzare specifici miRNAs in combinazione con le radiazioni ionizzanti per aumentarne gli effetti citotossici nelle cellule tumorali. Infatti, la somministrazione *in vitro* di miRNAs sintetici (miRNA-mimics) che modulano l'espressione di geni della riparazione del DNA può perturbare il processo di riparazione del DNA, rendendo le cellule più sensibili alle radiazioni. Come modello sperimentale ho utilizzato cellule umane radio-resistenti della linea tumorale A549, derivante da un carcinoma polmonare umano. Poiché le radiazioni ionizzanti causano principalmente rotture a doppio filamento del DNA, ho studiato i geni coinvolti nei meccanismi di riparazione specifici per questo tipo di danno, la ricombinazione omologa (HR) e la ricombinazione non omologa (NHEJ). I geni *RAD51* (HR), *LIG1* (HR e NHEJ alternativa), assieme al gene *DNA-PKcs* (NHEJ), sono stati scelti per indagare il loro contributo sulla sopravvivenza di cellule A549 irradiate con raggi- γ . A tale scopo, ho diminuito la loro espressione agendo sui loro RNA messaggeri tramite miRNAs, scelti sulla base di predizioni bioinformatiche. Dal momento che i programmi di predizione producono spesso falsi positivi ho proceduto tramite saggio della luciferasi per validare funzionalmente le interazioni miRNA-mRNA. Ho quindi clonato le porzioni 3'UTR dei trascritti dei geni d'interesse in vettori pmiRGLO, a valle del gene *Firefly Luciferase* e ho co-trafettato le cellule A549 con i vettori pmiRGLO ed il relativo miRNA predetto ed effettuato il saggio della luciferasi. I miRNAs che hanno dato un abbassamento significativo dei valori di luminescenza emessi dall'enzima *Firefly* sono stati scelti per i successivi saggi. Ho quindi usato i microRNAs validati in esperimenti di sopravvivenza cellulare condotti su cellule A549 irradiate. Ho inoltre indagato il contributo relativo dei due meccanismi di riparazione HR e NHEJ, incubando le cellule A549 con inibitori enzimatici per due proteine chiave, RAD51 (HR) e DNA-PKcs (NHEJ). Le cellule trattate con tali inibitori sono state poi irradiate e la loro sopravvivenza è stata analizzata tramite saggi clonogenici.

2. Materiali e metodi

2.1. Colture cellulari

Le linee cellulari usate sono: cellule A549, una linea cellulare umana derivata da un carcinoma polmonare di un uomo di 58 anni; sono cellule epiteliali che in un polmone sano, permettono la diffusione di acqua, elettroliti ed altre sostanze attraverso la superficie degli alveoli. Le cellule crescono in terreno F-12K Nut Mix (1X) Medium (Life Technologies) con aggiunta di siero bovino fetale (fetal bovine serum, FBS; Biochrom) alla concentrazione finale del 10% e streptomicina 25mg/ml, penicillina 30mg/ml. La seconda linea cellulare usata è NCI-H2347, una linea epiteliale umana derivante da un carcinoma polmonare di una donna di 54 anni; viene coltivata in terreno RPMI-1640 Medium (Life Technologies) con 10% di FBS e streptomicina 25mg/ml, penicillina 30mg/ml. Entrambe le linee sono classificate come NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) e crescono adese in monostrato, all'interno di fiasche da 75cm², in incubatori ad una temperatura di 37°C. Vengono sub-coltivate due volte alla settimana, con una semina di 1x10⁶ cellule/fiasca.

Le cellule M059J e M059K sono due linee isogeniche umane di glioblastoma che crescono in monostrato in terreno DMEM and Ham's F-12 medium (DMEM/F-12, Gibco, Life Technologies), HEPES 20mM, 1% di amminoacidi non essenziali, antibiotici a 10% di FBS. Le linee A549, NCI-H2347 e Mo59J sono fornite dalla ATCC[®] Company, mentre le cellule M059K sono state gentilmente fornite dal prof. S.C. West (Cancer Research UK London Research Institute, Claren Hall Laboratories, South Mimms UK).

Per la subcoltura le cellule private del terreno vengono lavate con 4ml di versene (PBS 1X + EDTA), in modo da favorire la reazione di proteolisi mediata dalla tripsina. Un'incubazione a 37°C di circa 3minuti con 1ml di tripsina 0.25% EDTA è sufficiente per staccare le cellule. Si procede dunque alla neutralizzazione con 4ml di terreno completo. Le cellule vengono poi risospese e contate con la camera di Bürker.

2.2. Trasfezione cellulare

Le cellule A549 vengono seminate 24h prima della trasfezione, in modo da avere una confluenza del 60-80% al momento dell'esperimento.

Le cellule A549 vengono seminate 24h prima della trasfezione, in modo da avere una confluenza del 60-80% al momento dell'esperimento. Per la trasfezione con miRNAs vengono usati dei miRNA-mimics, piccole molecole di RNA a doppia elica disegnate per mimare l'effetto di miRNAs maturi endogeni. La concentrazione finale di questi mimics dev'essere di 32nM in 2.5ml totali. Le cellule vengono seminate in piastre da 6 pozzetti, 0.25×10^6 cellule per pozzetto. L'introduzione dei mimics nelle cellule avviene grazie a lipofectamine (Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent, Invitrogen), complessi lipidici carichi positivamente che attirano e trattengono gli acidi nucleici carichi negativamente presenti in soluzione. Il terreno usato è F-12K Medium al 10% FBS con antibiotico. Volumi e reagenti: Controllo= 2.5ml terreno; Controllo MOCK= 2.375ml terreno, 125 μ l lipofectamine; Trattato con miRNA= 2.25ml terreno, 125 μ l lipofectamine, 125 μ l miRNA. Le lipofectamine ed i mimics vengono diluiti in terreno OPTIMEM, leggermente vortexati e lasciati 5' a temperatura ambiente (T_{amb}). Per i trattati si uniscono 125 μ l di lipofectamine con 125 μ l di mimics, si incuba 10-15' T_{amb} e si aliquota goccia a goccia nei pozzetti. Le cellule vengono poste in incubatore a 37°C.

Per la co-trasfezione di vettori pmirGLO e mimics le cellule vengono seminate in piastre da 24 pozzetti, 0.14×10^6 cellule per pozzetto. La reazione avviene in 500 μ l terreno totali, con 50ng di plasmide pmirGLO e concentrazione finale di mimics di 32nM. Le lipofectamine usate sono le Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), adatte alla trasfezione di plasmidi di DNA e consentono inoltre l'ingresso dei mimics. Il terreno usato è F-12K Medium in assenza di siero e antibiotico. Volumi e reagenti: Controllo= 500 μ l terreno; Controllo MOCK= 450 μ l terreno, 50 μ l Lipofectamine; Controllo con solo vettore= 400 μ l terreno, 50 μ l Lipo, 50 μ l pmirGLO; Trattato (vettore + miRNA) = 400 μ l terreno, 50 μ l Lipo, 50 μ l di miscela vettore pmirGLO+miRNA. I reagenti vengono diluiti in terreno

OPTIMEM e incubati 5' T_{amb}. Si uniscono 50µl lipofectamine a 50µl di pmirGLO ed a 50µl di miscela pmirGLO + miRNA, si incuba 25' T_{amb}. Si aliquota goccia a goccia i complessi nei relativi pozzetti e si trasferiscono le cellule in incubatore a 37°C. A 4-5h dalla trasfezione si sostituisce il terreno con terreno completo di siero al 10% e senza antibiotico.

2.3.Trattamento con gli inibitori enzimatici RI-I e NU7026

Per il trattamento con gli inibitori RI-I e NU7026 ho seminato 0.5×10^6 cellule A549 in piastre petri 60x15mm. L'incubazione è stata eseguita in 5ml di terreno F-12K Medium completo con una concentrazione finale di inibitori pari a 10µM.

Volumi e reagenti:

-nella condizione di controllo (CTR) le cellule A549 crescono in 5ml terreno;

-per l'incubazione con inibitori le cellule vengono incubate con i singoli inibitori e con la combinazione di entrambi: Trattato RI-I= 4998µl terreno, 2µl RI-I; Trattato NU7026= 4995µl terreno, 5µl NU7026; Trattato RI-I + NU7026= 4993µl terreno, 2µl RI-I, 5µl NU7026;

-poiché gli inibitori sono sciolti in DMSO ho testato un controllo MOCK dove la cellule A549 sono cresciute in presenza di DMSO: Controllo MOCK= 4995µl terreno, 5µl DMSO, la quantità di DMSO aggiunta è pari al massimo volume di inibitore che è stato usato;

Le cellule sono state poste in incubatore per 24h.

2.4.Irradiazione con raggi-γ

La sorgente radioattiva che emette raggi-γ è costituita da un nucleo di cesio Cs-137 in dotazione presso il Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche dell'Università di Padova. La dose di raggi-γ fornita viene misurata in Gray (Gy) = 1J/kg, ovvero una radiazione che deposita un joule ($1\text{kg}\cdot\text{m}^2/\text{s}^2$), per chilogrammo (kg) di materia. I campioni di cellule A549 vengono seminati 24h prima dell'irradiazione (0.5×10^6 cellule/petri 60x15mm; 0.2×10^6 cellule/petri 35x10mm) cosicché le cellule si trovino ancora in una fase esponenziale di crescita al momento dell'irradiazione. Nel caso i campioni A549 vengano trattati

(vedi paragrafo 2.2, 2.3) ed irradiati, la semina viene effettuata 48 prima dell'irradiazione, mentre il trattamento viene somministrato 24h prima dell'irradiazione. Ad i campioni irradiati si sostituisce il terreno con terreno fresco completo e si rimettono le cellule in incubatore: l'istante in cui le piastre vengono poste incubatore rappresenta il "tempo zero" a partire dal quale si inizia a decorrere il tempo per monitorare la variazione dell'espressione genica a seguito dell'irradiazione. Nel caso invece si proceda con i saggi clonogenici, il terreno viene eliminato e si staccano le cellule per la conta cellulare e semina in quadruplicato.

2.5.Saggio clonogenico

Le cellule A549 e NCI-H2347 vengono seminate o trattate in petri (60x15mm), $0,5 \times 10^6$ cellule per petri ed irradiate 24h dopo con le dosi 0Gy, 1Gy, 2Gy, 5Gy. Subito dopo l'irradiazione, vengono staccate e contate con la camera di Bürker. Per ogni condizione testata si seminano 4 petri (60x15mm) con 300 o 500 cellule in 5ml di terreno condizionato e terreno fresco 1:1, con 10% FBS. Le cellule vengono lasciate in incubatore a 37°C per 7-10 giorni. Durante questo tempo, le cellule sopravvissute al trattamento aderiscono alla petri e cominciano a proliferare formando cloni (>50cellule per clone). Si colora poi con violetto di genziana e si contano i cloni. L'efficienza di clonaggio (EC) per ogni condizione indagata, si calcola considerando le 4 repliche insieme come: n° totale di cloni contati / n° totale di cellule seminate x100. La sopravvivenza cellulare si calcola come: EC Trattato / EC controllo e la sopravvivenza delle cellule di controllo è posta al 100%.

2.6.Estrazione e quantificazione dell'RNA totale

In questa tecnica viene usato il Trizol[®], un composto di fenolo in grado di lisare le cellule, e guanidina isotocianato, un agente caotropico che inibisce le ribonucleasi. Il Trizol permette di isolare l'RNA che rimarrà nella fase acquosa, mentre il DNA, assieme a proteine e lipidi andrà nella fase organica (fenolo e cloroformio). La precipitazione dell'RNA avviene in isopropanolo, un alcol che grazie alla sua

elevata affinità per l'acqua, sottrae tali molecole presenti in soluzione inducendo l'aggregazione e la precipitazione degli acidi nucleici. La procedura prevede di staccare le cellule in coltura con metodo standard (versene, tripsina) e centrifugarle 10', 125rcf, 4°C. Risospendere il pellet in 1ml di PBS 1X e trasferire in eppendorf RNase free; centrifugare 10', 125rcf, 4°C; eliminare il surnatante, risospendere con 1ml di Trizol e lasciare agire per 5'; aggiungere 200 µl di cloroformio e mescolare per inversione 20 volte; tenere i campioni in ghiaccio 15'; centrifugare 15' 12000rcf 4°C e trasferire la fase acquosa in eppendorf RNase free; aggiungere un uguale volume di isopropanolo e mescolare per inversione 20 volte; incubare a -20°C overnight; centrifugare 20' 12000g 4°C e rimuovere surnatante; lavare il pellet con 250µl EtOh 75% per rimuovere le tracce di isopropanolo; centrifugare 10' 12000g 4°C per eliminare EtOh; asciugare i campioni all'aria e risospenderli in 22µl di H₂O RNase free.

La quantificazione viene effettuata mediante lo strumento Nanodrop[®] ND – 1000 (Nanodrop Technologies), uno spettrofotometro UV-Visibile con uno spettro che va dai 220nm ai 750nm e consente di determinare la concentrazione di DNA, RNA e proteine. Il volume da analizzare (1µl) viene posto all'estremità terminale della fibra ottica ricevente; la fibra ottica dalla quale proviene il segnale luminoso (generato da una lampada allo xenon a luce pulsata) si trova invece sul braccio mobile. Illuminando il campione alla lunghezza d'onda di 260nm si ha assorbimento da parte degli acidi nucleici, secondo la legge di Lambert-Beer $A = \varepsilon * l * C$ dalla quale si può esprimere la concentrazione dei campioni come $C = A / \varepsilon * l = ng / \mu l$ dove $A = 260nm$. La purezza dell'acido nucleico si ricava dai rapporti fra le assorbanze a 260, 280 e 230nm. Il rapporto $A_{260/280}$ permette di valutare la contaminazione da proteine, dove il valore ottimale è ~1,8 per il DNA e ~2 per l'RNA. Il rapporto $A_{260/230}$ indica la presenza di carboidrati e fenoli (solventi organici) e i valori dovrebbero cadere nell'intervallo 1,8-2,2.

2.7.Retrotrascrizione di RNA messengeri

La reazione di retrotrascrizione viene effettuata con il kit *ImProm-IITM Reverse Transcription System* (Promega), dove oligonucleotidi Oligo(dT) sono in grado di

innescare la reazione appaiandosi all'estremità 3' terminale degli mRNA maturi, ovvero al poli(A). In questo modo tutta la popolazione di RNA messaggeri verrà trascritta in cDNA senza bisogno di primers specifici. Preparazione del campione: prelevare un volume di campione tale che contenga 1µg di RNA totale; portare ad un volume di 4,7µl con H₂O RNase free; aggiungere 0,6ml di Oligo-dT₁₂₋₁₈ [0.5µg/µl] (Invitrogen); incubare 5' 70°C per denaturare il campione; raffreddare in ghiaccio per 5'. Preparazione della mix in eppendorf RNase free:

Reagenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
ImProm-II Reaction Buffer 5X	2	1X
MgCl ₂ 25mM	1.2	3mM
dNTP mix 10 mM	0.5	0.5mM
ImProm-II Reverse Transcriptase 160U/µl	0.5	80U
H ₂ O RNase free	0.5	
Volume totale	4.7	

Aliquotare 4,7µl della mix preparata in ghiaccio a ciascun campione; incubare 5' a temperatura ambiente per la reazione di appaiamento degli oligo-dT; incubare 1h a 42°C per favorire la reazione dell'enzima retrotrascrittasi; inattivare l'enzima incubando 15' a 70°C. I volumi finali saranno di 10µl, alla concentrazione di 1µg/10µl di cDNA. Terminata la reazione si può procedere con gli esperimenti o conservare i campioni a -20°C.

2.8. Analisi di espressione di mRNA mediante qRT-PCR

La qRT-PCR è il nome con cui vengono identificate due tecniche spesso usate in combinazione, la retrotrascrizione e la seguente PCR quantitativa. Quest'ultima permette di amplificare e quantificare simultaneamente il cDNA, mantenendo inalterati i valori di concentrazione dei diversi RNA messaggeri. In questo modo è possibile misurare l'espressione relativa di un gene in seguito a un particolare trattamento, o in una cellula o in un tipo di tessuto. Il kit usato è *GoTaq® qPCR*

Master Mix (Promega), dove la Master Mix contiene tutti i componenti necessari per la reazione (GoTaq® Hot Start Polymerase, MgCl₂, dNTPs, Buffer e un colorante fluorescente che richiede gli stessi filtri del SYBER Green ma mostra un'intensità maggiore). Il protocollo prevede di caricare 1µl di cDNA [10ng/µl] per ogni campione da testare; la retrotrascrizione fornisce cDNA [1µg/10µl] perciò è sufficiente prelevare 0.1µl cDNA e diluirlo in 0.9µl H₂O nuclease free per ogni reazione di Real-Time PCR. Ai campioni si aggiunge la seguente mix:

Reagenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
Master Mix 2X	5	1X
Primer Forward [10µM]	0.2	0.2mM
Primer Reverse [10µM]	0.2	0.2mM
H ₂ O RNase free	3.6	
Volume totale	9	

Per un volume finale di 10µl. La piastra viene caricata nell'apposito strumento, *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystem) dove avviene la reazione classica di PCR con rilevazione dell'intensità di fluorescenza dopo ogni turno di amplificazione. I campioni vengono illuminati con l'opportuna lunghezza d'onda emessa da una lampada alogena. I prodotti della PCR aumentano inizialmente in modo lineare, per poi crescere esponenzialmente a partire dal terzo ciclo di amplificazione, con la formazione degli ampliconi. Viene definito ciclo soglia (C_T, Threshold Cycle) il numero del ciclo al quale i segnali di fluorescenza emessi sono chiaramente misurabili, generalmente intorno alla metà della fase esponenziale. La tecnica Real-Time fornisce una buona correlazione tra ciclo soglia e quantità iniziale di stampo, restituendo una curva di amplificazione sigmoideale ed il valore di C_T. Maggiore è il numero del C_T, minore è la presenza di un determinato mRNA.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei risultati viene usata una quantificazione relativa, dove il C_T di ogni gene target viene comparato con il C_T di un gene housekeeping endogeno (GAPDH, gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi), per normalizzare i dati ottenuti. Si basa quindi sull'espressione relativa di un gene target in confronto con l'espressione di un gene di riferimento, secondo il modello matematico di M. Pfaffl [24], dove R (valore di espressione relativa) si calcola come:

$$R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_{T\text{target}}(\text{control-sample})} / (E_{\text{reference}})^{\Delta C_{T\text{reference}}(\text{control-sample})}$$

E = efficienza della reazione di Real-Time PCR di un ciclo della fase esponenziale, calcolata per il gene target e per il gene di riferimento.

ΔC_T = è la differenza tra le medie dei valori di C_T del gene target/gene di riferimento nella situazione di controllo (non trattato) e nella condizione trattata (sample).

Un secondo modello per il calcolo di R è stato presentato da *PE Applied Biosystem* (Perkin Elmer, Forster City, CA), detto "Delta-delta method". In questa formula viene posto $E=2$ assumendo che l'efficienza di amplificazione dei gene target e di riferimento sia uguale ed eccellente.

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad \text{con } \Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{sample}} - \Delta C_{T\text{control}}$$

$\Delta C_{T\text{sample}}$ = differenza fra la media dei C_T del gene d'interesse trattato e la media dei C_T del gene di controllo endogeno trattato.

$\Delta C_{T\text{control}}$ = differenza fra la media dei C_T del gene d'interesse non trattato e la media dei C_T del gene di controllo endogeno non trattato.

2.9. Clonaggio di porzioni 3'-UTR di geni target in vettori pmirGLO

I procedimenti e le tecniche di clonaggio sono state eseguite in collaborazione con il laboratorio del professor R. Costa (Dipartimento di Biologia, Complesso Vallisneri). Le sequenze relative alla porzione 3'UTR dei trascritti dei geni

d'interesse vengono inserite in vettori pmiRGLO grazie a reazioni di restrizione e ligazione. Sia i vettori che le porzioni 3'UTR vengono tagliati con diversi enzimi di restrizione in modo da generare due estremità sticky coesive ma non compatibili fra di loro, evitando la circolarizzazione della molecola ed aumentando l'efficienza di ligazione. Inizialmente le porzioni 3'UTR vengono amplificate tramite PCR, inserite in vettori *StrataClone* e clonate in batteri competenti *StrataClone Solo Pack Cells*. Questo passaggio mi permette di effettuare una reazione di restrizione migliore, che non agendo sul 3'UTR presente nel prodotto di PCR. Le porzioni 3'UTR tagliate vengono poi legate ai vettori pmiRGLO linearizzati. In seguito, i vettori pmiRGLO vengono trasformati in batteri competenti *One Shot Top10*, dai quali posso ricavare quantità di plasmide necessaria per i successivi esperimenti. In seguito sono elencati i vari passaggi.

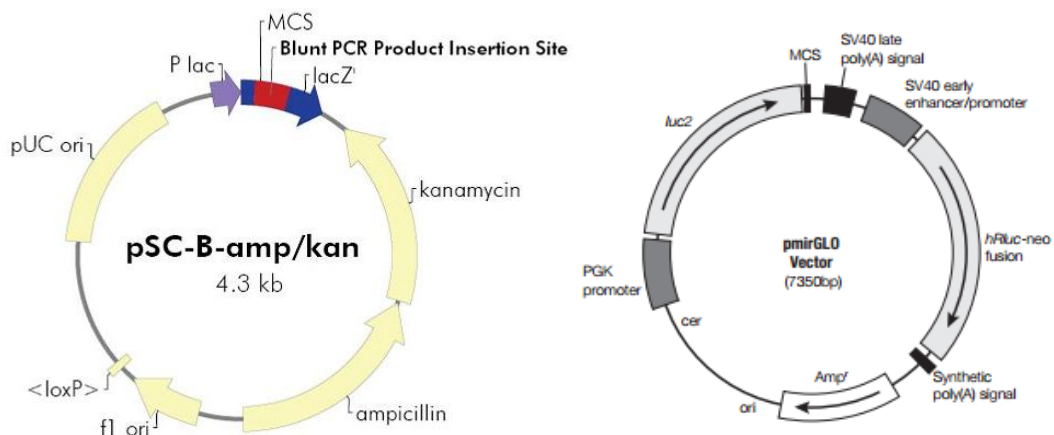


Figura 2.4: (a sinistra) Vettore StrataClone creato con il kit *StrataClone PCR Cloning Kit* (immagine fornita da *Agilent Technologies*). (a destra) Vettore pmiRGLO fornito da *Promega* (immagine fornita da *Promega*).

2.9-I Amplificazione

I primers usati per amplificare il 3'UTR dei geni oggetto di studio sono stati gentilmente disegnati dal Dr. Cristiano de Pittà, con il software *Primer3 Web* (<http://primer3.ut.ee/>) e sintetizzati da Invitrogen. Alle estremità 5' di ciascun primer sono state aggiunte le sequenze di taglio per specifici enzimi di restrizione (in nero), necessarie all'inserimento dell'amplificato nel sito di policloneggiamento

(MCS) del vettore pmirGLO. Le sequenze di taglio sono precedute da 6 basi, ATCTAG, per facilitare l'interazione dell'enzima con l'acido nucleico (in azzurro).

Gene	Primer	Sequenza	Enzima di restrizione
RAD51	Forward	ATCTAGGAGCTCTGCAGCCTAATGAGAGTGCA	SacI
	Reverse	ATCTAGTCTAGAACATGGTCTCACTCTGTCACC	XbaI
BRCA2	Forward	ATCTAGGCTAGCTGACGCTTAACCTTTCCAGT	NheI
	Reverse	ATCTAGTCTAGATCAGTGCCAATTTGAAAGCAA	XbaI
LIGASE 1	Forward	ATCTAGGAGCTCCTTACGTGCGGATAGATGGC	SacI
	Reverse	ATCTAGTCTAGAGATGAATCCCAGACTCCGGA	XbaI
GADD45A	Forward	ATCTAGGAGCTCGTGCTGGTGACGAATCCAC	SacI
	Reverse	ATCTAGTCTAGACCCTTTCCGGCTTTTCTTTTACT	XbaI
DDB2	Forward	ATCTAGGAGCTCGGACCAGAAGAGCGGATCC	SacI
	Reverse	ATCTAGTCTAGAAACTGCTTGATCCCTCTGCT	XbaI
PKRDC	Forward	ATCTAGGAGCTCACTTTGGTTGGCAGCATTCC	SacI
	Reverse	ATCTAGCTCGAGAACAGTTTGGGTGTGGAGGA	XhoI
XRCC5	Forward	ATCTAGGAGCTCCAAAACAAGTTGGATGCGGC	SacI
	Reverse	ATCTAGCTCGAGACGACTTATGAGGGTGCTGA	XhoI

La reazione di PCR si svolge con il kit *StrataClone PCR Cloning Kit*, dove l'enzima presente, *Easy-A PCR cloning enzyme*, consente di aggiungere un nucleotide, preferenzialmente "A", all'estremità 3' dell'amplicone. L'enzima possiede un'attività transferasica terminale ed un'attività esonucleasica 3' → 5' (proofreading) per un'amplificazione più accurata. Il tasso di errori risulta sei volte più basso rispetto a quello di una normale Taq DNA polimerasi. Il protocollo usato prevede di preparare in ghiaccio la seguente mix:

Reagenti	Volume (μl)	Concentrazione finale
Easy-A Reaction Buffer 10X	5	1X
DNTPs (10mM per ogni dNTP)	1	0.2mM(per ogni dNTP)
DNA template [100ng/ μ l]	1	100ng
Primer forward [10 μ M]	1	0.2 μ M
Primer reverse [10 μ M]	1	0.2 μ M
Easy-A high-fidelity PCR cloning enzyme (5U/ μ l)	0.5	2.5U
H ₂ O distillata	40.5	
Volume totale	50	

Impostare nel termociclatore il seguente programma:

Fase	Numero di cicli	Temperatura	Durata
Denaturazione iniziale	1	95°C	2'
Denaturazione	35	95°C	20"
Annealing		Primer _{T_m} -5°C	30"
Estensione		72°C	1.3'
Estensione finale	1	72°C	5'
Termine dei cicli		4°C	∞

Analizzare il prodotto di PCR con una corsa elettroforetica su gel 1% d'agarosio.

2.9-II Ligazione dell'inserto

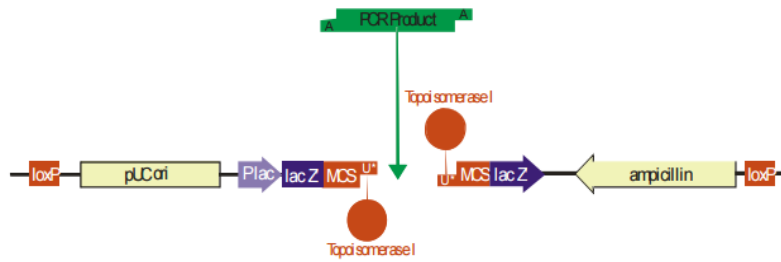


Figura 2.5: Reazione di ligazione fra la sequenza d'interesse amplificata mediante PCR ed i due adattatori forniti con *StrataClone PCR Cloning Kit*. La reazione forma una molecola lineare con siti loxP alle estremità (immagine fornita da *Agilent Technologies*).

L'inserto viene legato a due adattatori i quali presentano un sito loxP ad un'estremità ed un'uridina modificata (U*) sporgente all'altra estremità, alla quale è legata una molecola di topoisomerasi I. Gli ampliconi con le estremità 3'-adenosina sporgenti, generati con la precedente PCR, si legheranno efficacemente a queste sequenze mediante appaiamento A-U* seguito da una ligazione mediata dalla topoisomerasi. Si ottiene così una molecola lineare (vector arm^{ori}-PCR product-vector arm^{amp/kan}) che verrà trasformata senza step di purificazione all'interno delle cellule competenti. La reazione di ligazione prevede i seguenti passaggi (*StrataClone PCR Cloning Kit*):

3µl Buffer

2µl Prodotto di PCR

1µl Adattatori

Incubazione di 5' a temperatura ambiente

2.9-III Trasformazione cellule competenti

Le *StrataClone Solo Pack Cells* sono cellule ingegnerizzate per esprimere transientemente l'enzima *Cre recombinase*, una tirosin ricombinasi derivata del batteriofago P1, in grado di effettuare ricombinazione tra due specifiche sequenze di riconoscimento dette loxP (34bp, palindrome). Questo enzima è così in grado di catalizzare la fusione di due segmenti di DNA se entrambi contengono siti loxP, come nel caso della molecola lineare precedentemente generata, producendo così un plasmide stabile. Tale plasmide contiene:

- un'origine di replicazione *pUC ori*, derivata dal plasmide pMB1 dove una mutazione puntiforme fa sì che questo plasmide diventi “high copy number”, con una presenza di ~500 copie per batterio
- il gene *lacZ* derivato dall'operone *lac* di *E.coli* per la produzione della β-galattosidasi, preceduto dal promotore P_{lac} che non necessita dell'induttore IPTG
- un sito di policlonaggio MCS
- un gene per la resistenza all'ampicillina e alla kanamicina

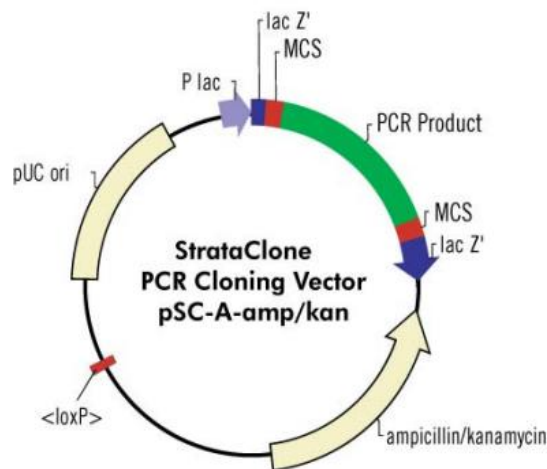


Figura 2.6: Vettore StrataClone ottenuto circolarizzando la molecola linearizzata presente in figura 2.5 (immagine fornita da Agilent Technologies).

Le cellule scongelate vengono trasferite in tubi Sarsted da 13ml e si aggiunge 1μl della mix di ligazione. Il protocollo fornito dal kit *StrataClone PCR Cloning Kit* prevede di: incubare in ghiaccio per 20'; tenere nel bagnetto a 42°C per 45" e trasferire in ghiaccio 2'; aggiungere 250μl di terreno LB scaldato a 37°C e mettere a incubare 1h a 37°C in agitazione; infine aggiungere alle piastre di LB (con ampicillina) 100μl di X-gal [40μg/ml]; piastrare 100μl di batteri competenti trasfettati e trasferire overnight a 37°C. Il gene che conferisce resistenza all'antibiotico permette la crescita dei soli batteri trasformati. Il gene *lacZ* permette la selezione dei batteri trasformati con la sequenza lineare vector arm^{ori}–PCR product–vector arm^{amp/kan}, data dalla ligazione fra 3'UTR e gli adattatori ingegnerizzati. Il gene *lacZ* produce l'enzima β-galattosidasi in grado di scidere l'X-gal, dando origine ad un prodotto di un blu intenso. All'interno del gene è

stato inserito il sito di policlونaggio MCS, perciò, se il prodotto di PCR si lega, il gene lacZ sarà interrotto dalla sequenza dell'inserto; altrimenti si avrà ligazione dei due adattatori, con un gene lacZ funzionale che colora la colonia batterica di blu.

2.9-IV PCR da colonia

La PCR da colonia permette di testare l'effettiva presenza dell'inserto desiderato ed evitare falsi positivi o inserti aspecifici. La seguente mix viene preparata in ghiaccio (*Kit GoTaq® Colorless Master Mix Protocol, Promega*):

Reagenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
5X colorless GoTaq® Reaction Buffer	5	1X (1.5mM MgCl ₂)
DNTPs (10mM ogni dNTP)	1	0.2mM ogni dNTP
Primer M13 (10µM)	1	0.2µM
GoTaq® DNA Polymerase(5U/µl)	0.5	2.5U
H ₂ O distillata	40.5	
Volume	50	

I primers M13 (Fw:GTAAAACGACGGCCAG; Rv: CAGGAAACAGCTATGAC) sono disegnati sul plasmide, all'esterno del sito di policlونaggio. Nel caso la colonia piccata sia un falso positivo, l'uso di questi primers consente di capire se la ligazione non del 3'UTR non è avvenuta o se si è legata una sequenza aspecifica. Le colonie di colore bianco vengono quindi piccate e aggiunte alla mix di PCR. Si imposta nel termociclatore le seguenti fasi:

Fase	Numero di cicli	Temperatura	Durata
Denaturazione iniziale e lisi dei batteri	1	95°C	10'
Denaturazione	35	95°C	20"
Annealing		55°C	30"
Estensione		72°C	1.3'
Estensione finale	1	72°C	5'
Termine dei cicli		4°C	∞

La reazione viene verificata tramite corsa su gel d'agarosio, dove si può vedere se la banda generata è caratterizzata dal peso molecolare atteso.

2.9-V Miniprep (estrazione DNA plasmidico da batteri)

Le colonie che risultano essere trasformate vengono fatte crescere in tubi Sarsted con 4ml di LB + Ampicillina, per 12-16h in agitazione a 37°C. Dopodiché si estrae il plasmide dai batteri attraverso la tecnica miniprep, effettuata con *EUROGOLD Plasmid Miniprep Kit*. I batteri subiscono una lisi alcalina, durante la quale il DNA si denatura a causa del pH. La fase di neutralizzazione riporta il pH a valori fisiologici, consentendo al plasmide di recuperare la conformazione originale ma non al DNA genomico perché di dimensioni troppo grandi. Una successiva centrifuga rimuove membrane, detriti cellulari e DNA genomico che precipita rimanendo intrappolato alle proteine, mentre il plasmide rimarrà in soluzione. La soluzione viene trasferita in colonnine dotate di una resina carica positivamente in grado di legare il DNA plasmidico carico negativamente. Seguono una serie di lavaggi per purificare il DNA plasmidico. Infine si ottiene il distacco del plasmide dalla resina mediante un lavaggio con etanolo e si porta in soluzione con acqua Rnase free.

2.9-VI Digestione enzimatica

I 3' UTR presenti nei plasmidi StrataClone ed i vettori pmirGLO sono stati tagliati con specifici enzimi di restrizione in modo da generare estremità coesive non compatibili fra loro, aumentando così l'efficienza di ligazione.

Endonucleasi	Fonte	Organismo d'origine	Sequenza di riconoscimento
SacI	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	5'...GAGCTC...3' 3'...CTCGAG...5'
NheI	<i>E. coli</i>	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis</i>	5'...GCTAGC...3' 3'...CGATCG...5'
XbaI	<i>E. coli</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'...TCTAGA...3' 3'...AGATCT...5'
XhoI	<i>E. coli</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	5'...CTCGAG...3' 3'...GAGCTC...5'

Protocollo per la doppia digestione: enzimi e buffer sono forniti da NEB® (*New England BioLabs*)

Reagenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
Buffer CutSmart® 10X	4	1X
Dna		5µg
Enzima 1 [20U/µl]	1	20U
Enzima 2 [20U/µl]	1	20U
H2O nuclease free	/	
Volume finale	40	

La mix viene preparata in eppendorf da 1,5ml ed incubata in termoblocco 1h a 37°C. Segue una fase di 20' a 80°C necessaria per inattivare l'attività endonucleasica. Infine il prodotto viene caricato interamente in gel d'agarosio 0,7% agar: si verifica se il taglio è avvenuto correttamente e si estrae il prodotto (3'UTR o pmiRGLO linearizzato) dalla banda del gel, in modo da ottenere la sola molecola desiderata, evitando aspecifici che potrebbe essere presenti nella mix di restrizione. L'estrazione viene effettuata con il kit "PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel)" ed infine si quantifica al Nanodrop.

2.9-VII Reazione di ligazione

Per le ligazioni (Protocollo e reagenti NEB) è stato scelto un rapporto vettore/inserto 1:3 e grazie al calcolatore presente nel sito NEB

(<http://nebiocalculator.neb.com/#/>) è stata calcolata la quantità di inserto necessaria per 50ng di vettore, tenendo conto della lunghezza (bp) di entrambi.

Reagenti	Volume (µl)	Concentrazione finale
10X T4 DNA Ligase Buffer	2	1X
Vettore pmirGLO		50ng
Inserto 3'UTR		37.5ng
T4 DNA Ligase [400.000 U/ml]	1	400U
H2O nuclease free	/	
Volume finale	20	

La mix è stata incubata a 16°C overnight. Per inattivare l'enzima T4 DNA ligasi si procede con un'incubazione a 65°C 10'.

2.9-VIII Trasformazione cellule competenti One Shot Top10

La trasformazione viene effettuata in tubi Sarsted da 13ml, secondo il protocollo *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* (ThermoFisher). Scongela le cellule ed aggiungere da 1 a 5 µl della reazione di ligazione; tenere in ghiaccio 30'; incubare a 42°C 30''; trasferire nuovamente in ghiaccio 2'; aggiungere 250 µl SOC e incubare 1h 37°C 225rpm; piastrare 150 µl di cellule in petri con terreno LB+Ampicillina e lasciare crescere per una notte 37°C. Verificare tramite PCR da colonia la presenza dell'inserto usando i primers costruiti sul vettore pmirGLO (vedi paragrafo successivo). Estrarre il DNA plasmidico con metodo miniprep, e quantificare al Nanodrop.

2.9-IX Sequenziamento

Il DNA plasmidico ottenuto sia delle cellule competenti StrataClone che One Shot TOP10 viene seccato e inviato al centro *BMR Genomics* dove sarà analizzato tramite sequenziamento Sanger. I primers usati per il sequenziamento del plasmide in batteri StrataClone sono quelli universali T3 e T7. Per il pmiRGLO sono stati usati primers disegnati appositamente sul vettore.

T3 (Fw)	AATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7 (Rv)	TAATACGACTCACTATAGGG
pmirGLO Fw	ACACGGTAAAACCATGAC
pmirGLO Rv	TCCAAACTCATCAATGT

2.10.In-Fusion® HD Cloning

Questa metodica consente una clonazione rapida e direzionata di uno o più frammenti di DNA all'interno di un qualsiasi vettore, senza la necessità di effettuare reazioni di restrizione e ligazione. Il 3'UTR verrà fuso sul pmirGLO linearizzato, in seguito ad appaiamento inserto-vettore grazie a 15 basi disegnate appositamente alle estremità dei primers forward e reverse, complementari alle estremità generate in seguito alla digestione del vettore (in blu).

Gene	Primer	Sequenza
BRCA2	Fw	CTAGTTGTTTAAACGTGACGCTTAACCTTTCCAGT
	Rv	GCAGGTTCGACTCTAGTCAGTGCCAATTTGAAAGCAA
XRCC5	Fw	CTAGTTGTTTAAACGCAAAACAAGTTGGATGCGGC
	Rv	GCAGGTTCGACTCTAGACGACTTATGAGGGTGCTGA
PRKDC	Fw	CTAGTTGTTTAAACGACTTTGGTTGGCAGCATTCC
	Rv	GCAGGTTCGACTCTAGAACAGTTTGGGTGTGGAGGA

2.10-I Amplificazione

Le porzioni 3' UTR vengono amplificate tramite PCR (In-Fusion® Cloning kit), usando CloneAmp HiFi PCR Premix che contiene dNTPs, Buffer e CloneAmp HiFi Polymerase formulata per avere un'alta sensibilità, specificità ed efficienza.

La mix di PCR prevede i seguenti reagenti:

25µl	CloneAmp HiFi PCR Premix
1µl	P _{Fw} [10µM]
1µl	P _{Rv} [10µM]
30ng	DNA plasmidico (StrataClone)
/	H ₂ O nuclease free
50 µl	Volume finale

Cicli e temperature vedi tabella nel paragrafo 2.9-I. La reazione è stata fatta correre in gel d'agarosio 0.7%, seguita da estrazione da banda e quantificata al Nanodrop. L'estrazione da banda serve a purificare il prodotto di PCR, ottenendo il solo amplificato senza reagenti ed eventuali aspecifici.

2.10-II Reazione di Fusione

Il vettore pmiRGLO è stato tagliato con gli enzimi di restrizione XbaI e SacI secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.9-V. La reazione di fusione con le porzioni 3'UTR prevede i seguenti reagenti (In-Fusion[®] Cloning kit):

2 µl 5X In-Fusion HD Enzyme Premix

50ng Vettore linearizzato

100ng Prodotto di PCR purificato

/ H₂O nuclease free

10 µl Volume finale

La mix viene posta a 50°C per 15' e poi raffreddata in ghiaccio. L'enzima fornito è in grado di ricombinare il segmento di DNA appaiato, inserendolo nel vettore.

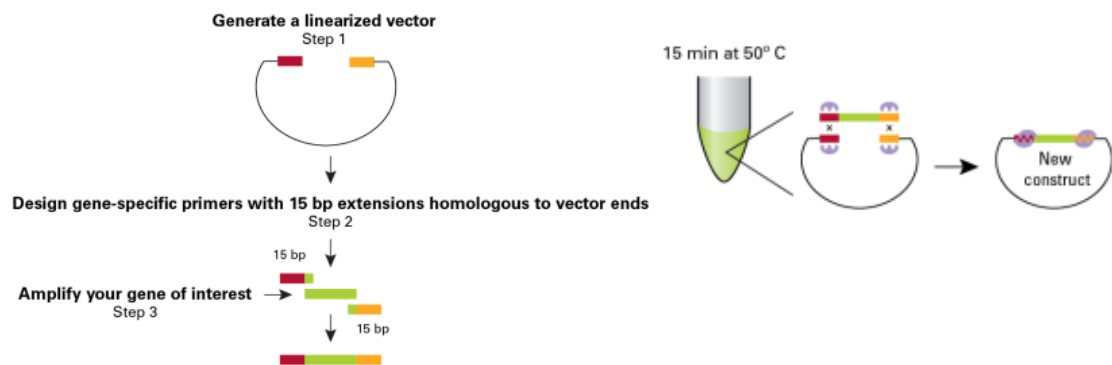


Figura 2.7: Riassunto delle reazioni necessarie per clonare inserti in qualsiasi tipo di vettore attraverso In-Fusion[®] Cloning kit (immagine fornita da Clontech Laboratories)

2.10-III Trasformazione cellule competenti Stellar

La trasformazione è stata eseguita secondo il protocollo presente in *In-Fusion[®] HD Plus Kit*: scongelare le cellule in ghiaccio e aggiungere 2,5µl della reazione di fusione; tenere in ghiaccio 30'; incubare a 42°C 45''; lasciare in ghiaccio 1-2'; aggiungere 500µl SOC e incubare 1h 37°C in agitazione; piastrare 150µl di

cellule in petri con terreno LB+ampicillina. Solamente i batteri trasformati cresceranno grazie al gene per la resistenza all'ampicillina presente nel vettore pmiRGLO. Il successo della reazione di ligazione pmiRGLO-3'UTR viene verificato tramite PCR da colonia. Dai batteri che hanno acquisito il prodotto di ligazione viene estratto il plasmide tramite da miniprep, quantificato al Nanodrop e sequenziato presso il centro *BMR Genomics*.

2.11.Saggio Dual-Luciferase Reporter Assay System

Questo saggio permette di validare l'interazione fra geni target e relativi microRNA, solitamente nella regione 3' UTR dei geni. Questa porzione viene inserita in vettori pmiRGLO atti al saggio *Dual-luciferase*. Questi vettori sono ingegnerizzati per contenere al loro interno due geni in grado di emettere luminescenza in seguito a reazioni di ossidazione, *luc2* e *hRluc2*, assieme ad altri elementi chiave per le tecniche di clonaggio:

- Il promotore *PGK* (fosfoglicerato chinasi umana) è costitutivamente espresso, garantendo un'espressione minima ma costante del gene *luc2*
- *Firefly luciferase (luc2)* è il gene reporter, codifica per la luciferasi di lucciola la cui traduzione è sfavorita dall'interazione miRNA-gene target
- *MCS* è il sito di policlونaggio a valle del gene *luc2*, permette di inserire il 3' UTR
- *SV40 (Simian virus 40) late poly(A) signal* è una sequenza necessaria per una corretta terminazione della trascrizione e poliadenilazione del gene *luc2*
- *SV40 early enhancer/promoter* garantisce la trascrizione costitutiva del gene *hRluc2-neo fusion*
- *Renilla luciferase (hRluc2)* è il gene reporter di controllo, codifica per la luciferasi presente nel pesce *Renilla Reniformis*, ed è necessario per normalizzare la luminescenza della firefly luciferase
- *Synthetic poly(A) signal* funge da terminatore della trascrizione
- *Amp^r* è il gene batterico che conferisce resistenza all'ampicillina, permette di selezionare positivamente i batteri che hanno acquisito il vettore

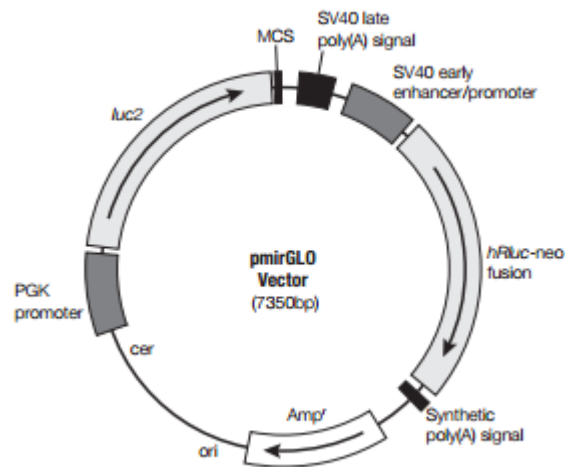


Figura 2.8: Vettore pmirGLO atto al saggio “dual-luciferase reporter assay system” (immagine fornita da *Agilent Technologies*)

Se un miRNA agisce effettivamente su un gene target, si avrà una riduzione nella traduzione dell'enzima *Firefly luciferase*, con seguente diminuzione di bioluminescenza. La luce emessa dalla *Renilla luciferase* invece rimarrà costante permettendo di tenere sotto controllo quelle variazioni inevitabili che si hanno durante l'esperimento, come numero di cellule, errori durante il pipettaggio, efficienza di lisi ed efficienza del saggio, normalizzando i dati.

Le cellule vengono co-trasfettate con vettori pmirGLO e miRNAs e lasciate in incubatore a 37°C come descritto nel paragrafo 2.2. A 24h dalla trasfezione si effettua il saggio della luciferasi con il kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega). Il vettore pmirGLO contiene il gene *Firefly luciferase* (*experimental reporter*) fuso alla porzione 3'UTR clonata: se il miRNA testato interagisce con la regione 3'UTR, bloccherà la traduzione dell'mRNA e di conseguenza le cellule trasfettate avranno livelli inferiori dell'enzima di lucciola e daranno luminescenza minore. Il vantaggio di questo “dual reporter” sta nella presenza di un secondo enzima in grado di produrre bioluminescenza, la *Renilla luciferase* (*control reporter*), la cui produzione è costante. La presenza della *Renilla* è il controllo interno al sistema che permette di minimizzare le variabili sperimentali causate da

diverse efficienze di trasfezione, di lisi e diverso numero di cellule. I valori vengono così normalizzati grazie al rapporto fra i due volari di luminescenza Firefly/Renilla. Questi due enzimi hanno strutture enzimatiche differenti e richiedono substrati diversi, potendo così discriminare le rispettive reazioni; inoltre non richiedono modificazioni post traduzionali per la loro attività. Firefly Luciferase: l'ossidazione del substrato *luciferina* richiede ATP, Mg^{2+} , O_2 e produce una luce giallo-verde (560nm). Renilla Luciferase: l'ossidazione del substrato *coelenterazine* richiede O_2 e produce luce blu.

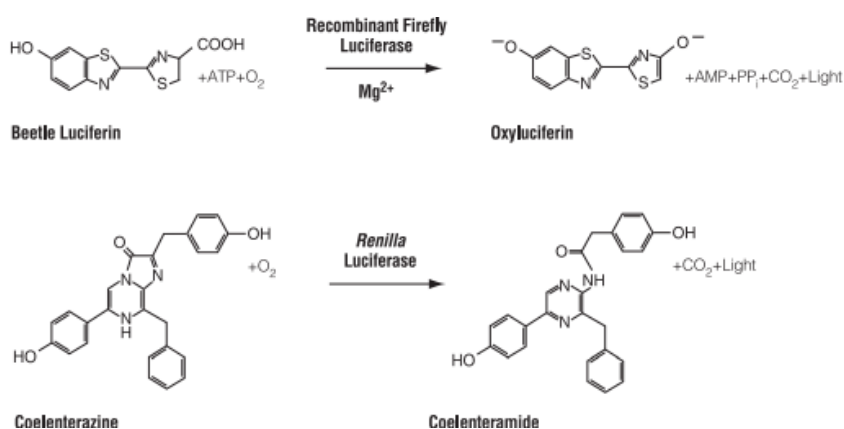


Figura 2.9: Reazioni enzimatiche catalizzate dai due geni reporter (immagine fornita da *Promega*)

Procedimento: rimuovere il terreno a 24h dalla trasfezione e lavare con PBS 1X; aliquotare 100 μ l di PLB (Passive Lysis Buffer) 1X in ogni pozzetto; tenere la piastra in agitazione per 15' a T_{amb} ; trasferire il lisato di ciascun pozzetto in una eppendorf RNase free; nei tubi per luminometro caricare 50 μ l di Lar II (Luciferase Assay Reagent II - luciferina) e 20 μ l di lisato; leggere al luminometro i valori di luminescenza della Firefly; aggiungere 50 μ l di Stop&Glo Reagent (coelenterazine) e vortexare brevemente; leggere i valori di luminescenza della Renilla. Lo strumento fornisce sia i valori di luminescenza dei due enzimi sia il rapporto Firefly/Renilla.

3. Risultati

Nel lavoro svolto durante questo tirocinio di laurea magistrale ho utilizzato la linea cellulare A549 derivante da un carcinoma polmonare e classificata come NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer). Dopo aver valutato il livello di radio-resistenza di questa linea cellulare tramite saggio di sopravvivenza cellulare, ho misurato i livelli di espressione di alcuni dei principali geni coinvolti nei meccanismi di risposta al danno al DNA tramite qRT-PCR. I geni *RAD51* e *LIG1* sono risultati particolarmente sovraespressi a 24h dall'irradiazione e sono stati scelti per la costruzione di plasmidi pmIRGLO contenenti il 3'-UTR dei suddetti. Tali plasmidi mi hanno permesso di valutare l'interazione fra geni e putativi miRNAs, scelti attraverso predizioni bioinformatiche, tramite saggio della luciferasi. Ho poi proceduto con saggi clonogenici per testare l'azione di tali miRNAs in cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics ed irradiate con 2Gy di raggi- γ . Ho effettuato saggi clonogenici anche con miRNAs già validati in letteratura, il miR-101 ed il miR-155 che targettano rispettivamente i trascritti dei geni DNA-PKcs [22] e RAD51[21].

3.1. Analisi della radio-resistenza delle cellule A549

Le cellule A549 mostrano una significativa tolleranza alle radiazioni [25], tuttavia per valutare il loro grado di radioresistenza ho eseguito un saggio clonogenico irradiando le cellule a dosi diverse di raggi- γ (1Gy, 2Gy, 5Gy). Questo saggio permette di indagare gli effetti citotossici di specifici trattamenti sulla sopravvivenza cellulare con maggior efficacia e sensibilità dei comuni saggi di vitalità cellulare, in quanto è basato sulla capacità delle cellule di proliferare e formare cloni, che è esclusiva delle cellule vitali e sane. La sopravvivenza cellulare viene valutata confrontando il numero di cloni che originano da cellule di controllo e da cellule sottoposte a trattamento. In parallelo ho condotto saggi clonogenici anche in cellule di diverso tipo per avere un confronto in termini di radiosensibilità. In particolare, ho usato le cellule M059K e M059J, due linee isogeniche umane di glioblastoma, dove la linea M059J è nota per essere radio-sensibile a causa della mancanza della proteina DNA-PKcs e quindi il loro

meccanismo di riparazione non omologa NHEJ è compromesso. Le cellule M059K invece sono *wild-type* per la proteina DNA-PKcs e perciò meno sensibili alle radiazioni ionizzanti [26]. Ho usato inoltre cellule della linea umana di carcinoma polmonare NCI-H2347, classificate come NSCLC, della quale non è nota la sensibilità alle radiazioni. I saggi clonogenici sono stati eseguiti sottoponendo le cellule alle stesse dosi di raggi- γ usate per la linea A549. Come mostrato in Figura 3 le cellule A549 mostrano una resistenza alla radiazione rispetto alle altre linee cellulari, data la loro maggiore sopravvivenza a tutte le dosi di raggi- γ , ma più marcata alla dose 2Gy. Le cellule M059J sono chiaramente radiosensibili, con una bassissima sopravvivenza cellulare (~4.5%) già alla dose più bassa di raggi- γ (1Gy) e completo abbattimento alla dose 2Gy. Per le altre linee cellulari sottoposte a 2Gy la sopravvivenza è di ~80% nelle A549, ~40% nelle NCI e ~27% nelle M059K. La radiazione con 5Gy di raggi- γ risulta letale per tutte le linee cellulari analizzate, ad eccezione delle A549 che mostrano un ~10% di sopravvivenza.

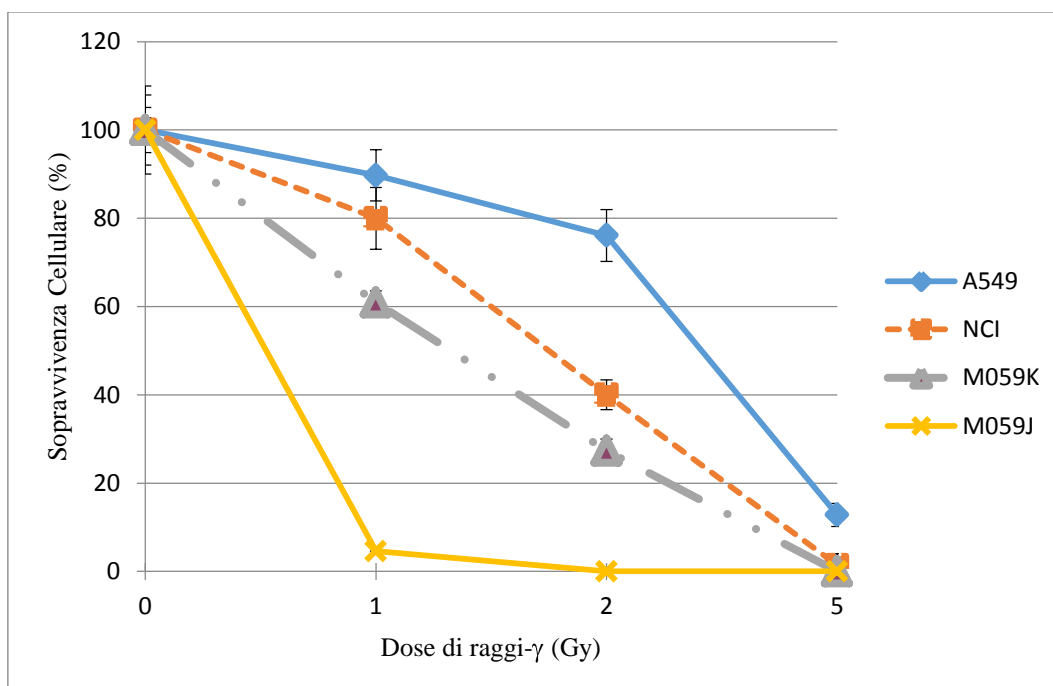


Figura 3: Sopravvivenza cellulare dopo irradiazione con raggi- γ . In grafico è riportato l'andamento della sopravvivenza cellulare nelle quattro linee cellulari testate, A549, NCI-H2347, M059K, M059J, alle dosi 1, 2 e 5 Gy. La sopravvivenza nella condizione di controllo (0Gy) è posta al 100%. I dati riportati si riferiscono ad un esperimento condotto in quadruplicato (4 repliche per ciascuna dose).

3.2. Analisi di geni differenzialmente espressi mediante qRT-PCR

Non è ancora chiaro quali siano i geni che conferiscano radioresistenza alle cellule A549. Dal momento che le radiazioni ionizzanti provocano principalmente DSBs, ho deciso di indagare i livelli di espressione dei geni coinvolti nella riparazione di tali danni al DNA, concentrandomi in particolare sui principali geni coinvolti nei meccanismi di riparazione omologa (HR) e non omologa (NHEJ). Per il meccanismo HR sono stati scelti i geni *BRCA2* e *BRCA1*, le cui proteine co-localizzano a livello dei siti di danno richiamando la proteina RAD51; il gene *RAD51*, la cui proteina porta alla formazione della Giunzione di Holliday, necessaria affinché il cromosoma danneggiato possa usare il cromatidio fratello come stampo per recuperare la sequenza di DNA nel punto di rottura; il gene *LIG1* che lega le estremità in seguito alla risoluzione della Giunzione di Holliday. Per il meccanismo NHEJ ho studiato i geni *KU70* e *KU80*, le cui proteine formano dimeri sulle estremità rotte del cromosoma dove richiamano la subunità catalitica del complesso, DNA-PKcs; il gene *DNA-PKcs*, codificante una chinasi che protegge ed allinea le estremità della rottura; il gene *XRCC4* la cui proteina richiama l'enzima DNA Ligasi 4 a livello delle rotture; il gene *LIG4* che codifica la proteina in grado di risolvere la doppia rottura, saldando le estremità. Oltre ai geni che mediano la riparazione di DSBs ho deciso di studiare i livelli di espressione di geni coinvolti nella risposta al danno al DNA (DDR). Tra questi ho scelto *GADD45A* (Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Alpha), gene attivato in seguito ad arresto del ciclo cellulare causato da danni al DNA, risponde a stress esogeni attivando il *pathway* p38/JUNK, un complesso meccanismo cellulare che regola sopravvivenza, proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare, spesso regolato negativamente nel cancro [27]; *p21* perché promuove l'arresto del ciclo cellulare (inibisce le proteine CDK) e media i processi di senescenza; *DDB2* (Damage-Specific DNA Binding protein 2) che codifica per una proteina coinvolta nel meccanismo di riparazione NER (nucleotide excision repair), attivato in seguito a danni al DNA a singola elica quali ad esempio legami covalenti fra basi adiacenti [28]. Ho deciso di studiare anche quest'ultimo gene perché nonostante le radiazioni ionizzanti producano principalmente DSBs, queste non sono le uniche lesioni al DNA, ma si formano anche lesioni minori, che

riguardano la singola elica. In particolare, i geni *GADD45A* e *DDB2* sono stati scelti perché sono responsivi in seguito a trattamento con raggi- γ , variando significativamente la loro espressione in linfociti umani [20]. Dunque, per capire se questi geni vengano differenzialmente espressi nelle cellule A549 dopo irradiazione, ho effettuato analisi di quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) su retrotrascritti di cellule A549 e NCI-H2347 in condizioni di controllo (0Gy) e dopo irradiazione con le dosi 2Gy e 5Gy. Per quanto riguarda le cellule A549 irradiate con 2Gy variazioni di espressione genica si osservano per i geni *RAD51* e *LIG1*, che risultano sovraespressi (Tabella 1). I geni *DDB2* e *DNA-PKcs* risultano di poco sovraespressi, mentre i geni *GADD45A*, *XRCC4*, *KU70*, *BRCA2*, *p21*, *LIG4* sono sotto-espressi. *BRCA1* e *KU80* mostrano una leggera variazione rispetto alla condizione di controllo. Nelle cellule A549 irradiate con 5Gy l'espressione relativa dei geni segue lo stesso andamento di sovra/sotto-espressione riportato per la dose 2Gy, ma con valori inferiori. I risultati di qRT-PCR di cellule NCI-H2347 irradiate con 2Gy di raggi- γ non riportano variazioni di espressione genica paragonabili alle variazioni ottenute nelle cellule A549. Alcuni geni risultano sovra-espressi, quali *XRCC4*, *RAD51*, *KU80*, *p21*, *LIG4*, mentre *DDB2* risulta sotto-espresso, ma con valori di indice R che si discostano poco da "1". Nemmeno la dose 5Gy sembra indurre una risposta significativa ed anzi i valori di espressione relativa (R) non seguono lo stesso andamento riportato per la dose 2Gy.

Simbolo del gene	A549				NCI-H2347			
	2Gy	Dev.st.	5Gy	Dev.st.	2Gy	Dev.st.	5Gy	Dev.st.
<i>RAD51</i>	5.08	0.11	1.32	0.03	1.23	0.13	1.13	0.13
<i>DDB2</i>	1.52	0.07	1.23	0.06	0.72	0.14	0.66	0.10
<i>LIG1</i>	9.07	0.25	2.316	0.002	0.92	0.23	1.08	0.15
<i>GADD45A</i>	0.32	0.06	0.426	0.117	1.04	0.24	0.58	0.07
<i>XRCC4</i>	0.41	0.19	0.74	0.02	1.76	0.27	1.15	0.05
<i>DNA-PKcs</i> (<i>PRKDC</i>)	1.36	0.02	1.16	0.08	1.04	0.29		0.04
<i>BRCA1</i>	1.07	0.05			1.01	0.13		
<i>LIG4</i>	0.2	0.06			1.11	0.22		
<i>KU70</i> (<i>XRCC6</i>)	0.8	0.25			0.9	0.27		
<i>KU80</i> (<i>XRCC5</i>)	1.15	0.16			1.2	0.27		
<i>p21</i>	0.35	0.18			1.57	0.02		
<i>BRCA2</i>	0.54	0.03			1.41	0.19		

Tabella 1: Analisi dei livelli di espressione genica mediante qRT-PCR in cellule A549 e NCI-H2347 irradiate con raggi- γ . In grafico sono riportati i valori di espressione relativa dei geni analizzati, calcolati come indice R, a 24h dall'irradiazione con 2Gy e con 5Gy.

3.3. Costruzione dei vettori pmiRGLO

I vettori pmiRGLO consentono di validare l'interazione tra il trascritto di un gene d'interesse ed il putativo miRNA attraverso saggi della luciferasi. L'interazione mRNA-miRNA avviene generalmente nella regione 3'UTR del trascritto. Ho quindi inserito tali porzioni di RNA messengeri nei vettori pmiRGLO per clonare alcuni geni coinvolti nella risposta al danno al DNA e testati in precedenza mediante qRT-PCR: *RAD51*, *LIG1*, *DNA-PKcs*, *DDB2*, *GADD45A*, *BRAC2*, *KU80*. Ho scelto i geni *LIG1* e *RAD51* che dall'analisi di Real Time PCR risultano sovraespressi, ed il gene *BRCA2* perché fondamentale per questo processo di riparazione, nonostante non risulti regolato positivamente. Per il meccanismo NHEJ ho scelto i geni *DNA-PKcs* e *KU80* perché, sebbene non ci siano grandi cambiamenti di espressione in seguito a radiazione, giocano un ruolo

chiave nella riparazione non omologa. In particolare, *KU80* mostra un basso valore di Ct (~19.5) già in cellule A549 in condizioni di controllo, non irradiate, suggerendo come questa linea cellulare possa avere alti livelli endogeni di questo gene. Infine ho clonato i geni *DDB2* e *GADD45A*. Ho quindi costruito i seguenti costrutti: pGLO-*RAD51*, pGLO-*BRCA2*, pGLO-*LIG1*, pGLO-*PRKDC* (*DNA-PKcs*), pGLO-*XRCC5* (*KU80*), pGLO-*DDB2*, pGLO-*GADD45A*. Ho amplificato le porzioni 3'UTR dei geni sopra citati e le ho inserite in batteri competenti StrataClone Solo Pack Cells, sotto forma di plasmidi. Ho effettuato le reazioni di restrizione su tali plasmidi per ottenere i 3'-UTR con le opportune estremità "sticky" da inserire in vettori pmiRGLO tagliati con gli stessi enzimi di restrizione. Con questa tecnica sono riuscita ad inserire nei vettori pmiRGLO quattro geni: *RAD51*, *LIG1*, *DDB2*, *GADD45A*.

I geni *BRCA2*, *XRCC5*, *PRKDC* hanno dato problemi durante le varie fasi di clonaggio e sono stati inseriti nei plasmidi pmiRGLO grazie alla tecnica In-Fusion. Ho dunque disegnato nuovi primers che contengano alle estremità 5' una sequenza di 15bp complementare alla sequenza presente nel vettore che fiancheggia il sito di inserzione. In questo modo si ha l'appaiamento vettore-3'-UTR ed inserzione del 3'-UTR grazie all'enzima fornito dal kit. I vettori pmiRGLO necessitano di essere linearizzati per la reazione di inserzione del 3'-UTR, li ho quindi tagliati con gli enzimi XbaI e SacI. Non è necessario usare enzimi di restrizione specifici perché lo scopo è solamente di linearizzare il plasmide. Con questa tecnica ho clonato i geni *BRCA2*, *XRCC5*, *PRKDC* nei vettori pmiRGLO.

3.4. Validazione sperimentale delle interazioni miRNA-mRNA

Grazie a predizioni bioinformatiche sono stati predetti alcuni miRNAs che interagiscono con i geni oggetti di questo studio: miR-144, miR-96-5p, miR-874-3p, miR-342-3p. Le predizioni delle interazioni miRNA-mRNA si basano sulla complementarità parziale fra miRNA (di solito limitata alla regione *seed*) e gene target, e sulla conservazione evolutiva del sito di target in gruppi di organismi sufficientemente vicini (es. vertebrati). Esse però producono molti falsi positivi ed è necessario validare sperimentalmente i miRNAs che l'algoritmo fornisce, attraverso saggi della luciferasi. I saggi della luciferasi testano l'azione di miRNA-mimics su geni target, in genere nella regione 3'-UTR del gene. La regione 3'-UTR viene fusa con il gene *Firefly luciferase* presente nel vettore pmiRGLO (come descritto nel paragrafo 2.9), appositamente disegnato per contenere anche il gene reporter *Renilla luciferase*. Se il miRNA predetto interagisce con il 3'UTR del gene target, si avrà una repressione della traduzione del gene *Firefly luciferase*, con conseguente calo della bio-luminescenza; i valori di luminescenza prodotti dal gene *Firefly* vengono normalizzati sui valori di luminescenza prodotta dalla *Renilla luciferase*. Ho quindi co-trasfettato le cellule A549 con i plasmidi pmiRGLO precedentemente costruiti ed i relativi miRNA-mimics e misurato l'attività di due geni *Firefly* e *Renilla*. I saggi di luciferasi sono stati condotti in cellule co-trasfettate con pGLO-*LIG1* e miR-874 o miR-342 e in cellule co-trasfettate con pGLO-*RAD51* e miR-96 o miR-144. Nelle tabelle 2, 3, 4, 5 riporto i valori di luminescenza registrati al luminometro nei vari esperimenti condotti a 24h dalla trasfezione. Per ogni esperimento è presente un campione di controllo, A549 trasfettate con solo pmiRGLO, e riportato con il nome del gene il cui trascritto è inserito nel vettore; un campione trattato, A549 trasfettate con pmiRGLO e relativo miRNA-mimic, e riportato con il nome del gene il cui trascritto è inserito nel vettore più il miRNA-mimic usato.

pmiRGLO-RAD51, miR-144

		Firefly	Renilla	Ratio	Ratio medio
Esp. I	RAD51	1352	2907	0.465	0.486
		1441	3067	0.470	
		1440	2754	0.523	
	RAD51 + miR-144	1556	4709	0.330	0.351
		1350	3560	0.379	
		1489	4348	0.342	
Esp.III	RAD51	1297	1335	0.971	0.880
		1166	1477	0.789	
	RAD51 + miR-144	1256	1837	0.683	0.689
		1409	1934	0.728	
		1224	1863	0.657	
Esp.III	RAD51	817.3	1235	0.661	0.800
		1001	1118	0.895	
		848.7	1005	0.844	
	RAD51 + miR-144	1197	1854	0.645	0.654
		1133	1741	0.650	
		1298	1945	0.667	

Tabella 2: Saggio di luciferasi eseguito in cellule A549 co-trasfettate con pmiRGLO-RAD51 e miR144 mimic

pmiRGLO-RAD51, miR-96

		Firefly	Renilla	Ratio	Ratio medio
Esp. I	RAD51	1113	2222	0.501	0.515
		1108	2212	0.501	
		1132	2086	0.543	
	RAD51 + miR-96	667.5	2153	0.310	0.321
		757.3	2314	0.327	
		635	1949	0.326	
Esp.III	RAD51	866.5	2197	0.394	0.374
		485.8	1224	0.397	
		723.4	2182	0.332	
	RAD51 + miR-96	814.3	2819	0.289	0.291
		1045	3563	0.293	
Esp.III	RAD51	1376	3490	0.394	0.420
		1596	3591	0.444	
		1431	3388	0.422	
	RAD51 + miR-96	1105	3513	0.315	0.330
		1154	3413	0.338	
		688.7	2041	0.337	

Tabella 3: Saggio di luciferasi eseguito in cellule A549 co-trasfettate con pmiRGLO-RAD51 e miR-96 mimic.

pmiRGLO-LIG1, miR-874

		Firefly	Renilla	Ratio	Ratio medio
Esp. I	LIG1	1503	6914	0.217	0.214
		1759	8396	0.210	
		1649	7706	0.214	
	LIG1 + miR-874	1158	7885	0.147	0.144
		1287	8396	0.153	
Esp.III	LIG1	733.1	4020	0.182	0.188
		608.3	3084	0.197	
		597.1	3245	0.184	
	LIG1 + miR-874	790.5	5429	0.146	0.150
		867.4	5592	0.155	
Esp.III	LIG1				0.219
		745.2	3512	0.212	
		896.1	3982	0.225	
	LIG1 + miR-874	969.8	5788	0.168	0.166
		857.2	5095	0.168	
		1030	6365	0.162	

Tabella 4: Saggio di luciferasi eseguito in cellule A549 co-trasfettate con pmiRGLO-LIG1 e miR-874 mimic.

pmiRGLO-LIG1, miR-342

		Firefly	Renilla	Ratio	Ratio medio
Esp. I	LIG1	657.6	3583	0.184	0.202
		589.6	2675	0.220	
		546.9	2707	0.202	
	LIG1 + miR-342	379.3	2423	0.157	0.155
		349.8	2287	0.153	
Esp.II	LIG1	904.1	3452	0.262	0.269
		1232	4460	0.276	
	LIG1 + miR-342	946.5	4130	0.229	0.231
		929.7	3692	0.252	
		807.4	3787	0.2123	

Tabella 5: Saggio di luciferasi eseguito in cellule A549 co-trasfettate con pmiRGLO-LIG1 e miR-342 mimic.

I risultati complessivi sono riportati in Figura 3.2 e mostrano una correlazione significativa per le interazioni miR144-RAD51 ($P < 0.01$), miR-96-RAD51 ($P < 0.05$), miR-874-LIG1 ($P < 0.05$), come si può notare dall'abbassamento dell'attività dell'enzima *Firefly*. Per l'interazione miR-342-LIG1 non è riportata la significatività statistica perché i dati fanno riferimento a due esperimenti indipendenti. Controllo: cellule A549 trasfettate con solo pmiRGLO; i valori di luminescenza vengono posti al 100%. Trattato: cellule A549 co-trasfettate con vettori pmiRGLO e miRNA-mimics.

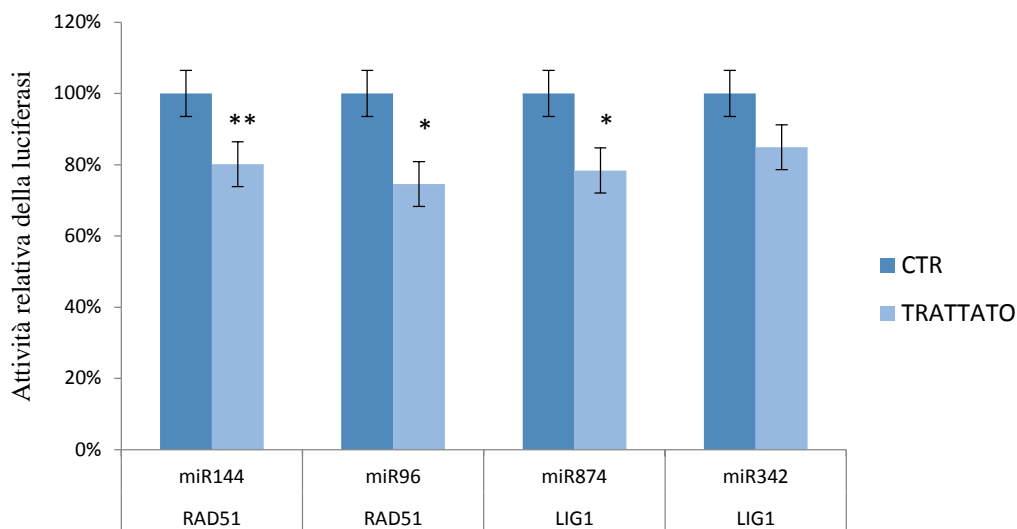


Figura 3.2: Analisi dell'attività della luciferasi in cellule A549 co-trasfettate con plasmidi pmiRGLO contenenti la regione 3'-UTR dei geni target e con miRNA-mimics. I valori di espressione di *Firefly Luciferase* sono stati normalizzati sui valori di luminescenza del gene *Renilla Luciferase*. I risultati presenti in grafico sono media \pm deviazione standard di esperimenti indipendenti (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *t*-test).

3.5. Effetti dell'inibizione dei sistemi di riparazione HR e NHEJ sulla radio-resistenza delle cellule A549

Per capire meglio in che misura i due meccanismi di riparazione HR e NHEJ influiscano sulla sopravvivenza cellulare ho effettuato saggi clonogenici con gli inibitori enzimatici NU7026 e RI-I, che impediscono rispettivamente l'azione delle proteine DNA-PKcs e RAD51, senza agire su altre proteine cellulari. L'incubazione con gli inibitori è stata condotta 24h prima dell'irradiazione con dose 2Gy, per dar modo agli inibitori, permeabili alla membrana, di entrare nelle cellule ed interagire con le proteine target. Poiché questi inibitori sono sciolti in DMSO, ho testato condizioni con solo DMSO associato e non a radiazione, per valutare quanto l'effetto tossico del composto influisca sulla sopravvivenza cellulare. La quantità di DMSO aggiunta al terreno è pari alla massima quantità prelevata di inibitori enzimatici (5 μ l). Come si può notare in Tabella 6, il DMSO (MOCK = 0Gy+DMSO) ha scarsa tossicità cellulare, dando valori di efficienza di clonaggio (EC) paragonabili al controllo non trattato (CTR).

Condizione	Efficienza di clonaggio (EC)	Deviazione standard
CTR	76%	4%
MOCK	74%	11%
2Gy MOCK	46%	11%
2Gy RI-I	50%	8%
2Gy NU7026	31%	8%
2Gy RI-I + NU7026	28%	6%

Figura 6: Efficienza di clonaggio (EC) di cellule A549 incubate con gli inibitori enzimatici NU7026 e RI-I ed irradiate con 2Gy di raggi- γ . Sono riportate in grafico la media dei valori di efficienza di clonaggio con relativa deviazione standard.

Mentre per quanto riguarda la sopravvivenza cellulare, questa è stata calcolata rispetto alla condizione MOCK, dal momento che tutti i trattati contengono DMSO. Come si può vedere dal grafico in figura 3.3, l'inibitore NU7026 causa una mortalità maggiore rispetto all'inibitore RI-I, con una sopravvivenza cellulare rispettivamente del ~41% e del ~67%. I livelli di significatività calcolati con il metodo *t*-test riportano i seguenti valori: per la condizione trattata con dose di raggi gamma 2Gy $P= 0.0002$; per le cellule trattate con l'inibitore NU7026 $P= 0.0121$; per le cellule trattate con l'inibitore RI-I il *t*-test non ha fornito una valutazione significativa; per l'ultima condizione, NU7026+RI-I, $P= 0.00432$.

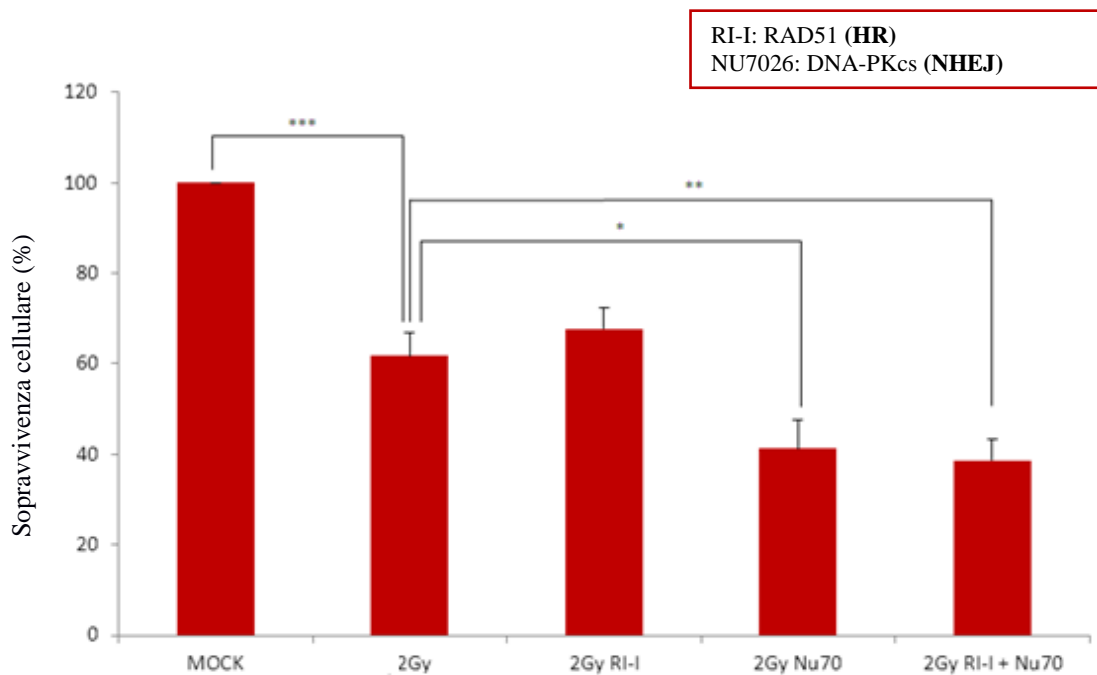


Figura 3.3: Sopravvivenza cellulare di cellule A549 incubate con gli inibitori enzimatici NU7026 e RI-I che inibiscono l'attività delle proteine DNA-PKcs e RAD51 rispettivamente. In grafico è riportata la media della sopravvivenza cellulare con relativa deviazione standard (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, t -test). Le cellule non irradiate (MOCK) e irradiate (2Gy) sono state incubate con solo DMSO.

3.6. Effetti della sovra-espressione dei miRNAs sulla radio-resistenza delle cellule A549

Dopo aver validato tramite il saggio della luciferasi l'interazione tra i miRNA-mimics ed i trascritti target *RAD51* e *LIG1*, ho analizzato l'azione di questi miRNAs sulla sopravvivenza delle cellule A549 irradiate tramite saggi clonogenici. Lo scopo di questi saggi è vedere quanto i meccanismi di riparazione HR e NHEJ influiscano sulla sopravvivenza cellulare in cellule irradiate. Ho dunque trasfettato le cellule A549 con miRNA-mimics e dopo 24h le ho irradiate con la dose 2Gy. È stata scelta questa dose perché le cellule A549 hanno riportato radio-resistenza in termini di sopravvivenza cellulare (Figura 3) e perché i geni del pathway DDR sono responsivi [20]. Inoltre, 2Gy è la dose tipicamente utilizzata nella radioterapia [29]. Ho testato sia miRNA-mimics singoli, sia combinazioni di due miRNA-mimics. Poiché i mimics vengono veicolati all'interno delle cellule grazie a complessi lipidici, le lipofectamine, ho testato

condizioni con solo lipofectamine associate e non a radiazione. L'effetto citotossico delle lipofectamine viene valutato in base alla diversa efficienza di clonaggio delle cellule trasfettate con solo lipofectamine (Controllo MOCK) rispetto al controllo non trattato (CTR). In entrambi gli esperimenti, l'efficienza di clonaggio (EC) riportata nelle tabelle 7 e 8 mostra come le lipofectamine non provochino una grande mortalità cellulare.

Nel saggio mostrato in Figura 3.4 sono riportati i risultati della sopravvivenza cellulare di cellule A549 sovra-esprimenti miR-144, miR-96 e miR-874 e irradiate con dose 2Gy. Non ho testato il miR-342 perché non ha dato risultati significativi con il saggio della luciferasi. Tutti e tre i miRNAs mostrano avere un effetto, abbassando la sopravvivenza cellulare in presenza di IR, ma anche in assenza di radiazione come si può vedere dall'efficienza di clonaggio riportata in tabella 7. I miR-96 e miR-874 danno valori di sopravvivenza cellulare minori rispetto al miR-144 (Figura 3.2).

Condizione	Efficienza di clonaggio (EC)	Deviazione standard
CTR	75%	0%
MOCK	74%	0.3%
2Gy MOCK	36%	0.9%
miR-144	50%	1.4%
miR-96	38%	1.4%
miR-874	39%	3.2%
2Gy miR-144	28%	1.3%
2Gy miR-96	18%	0.7%
2Gy miR-874	22%	0.4%

Tabella 7: Efficienza di clonaggio (EC) di cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics e irradiate oppure no con 2Gy di raggi- γ . Sono riportate in grafico le medie dei valori di CE \pm deviazione standard.

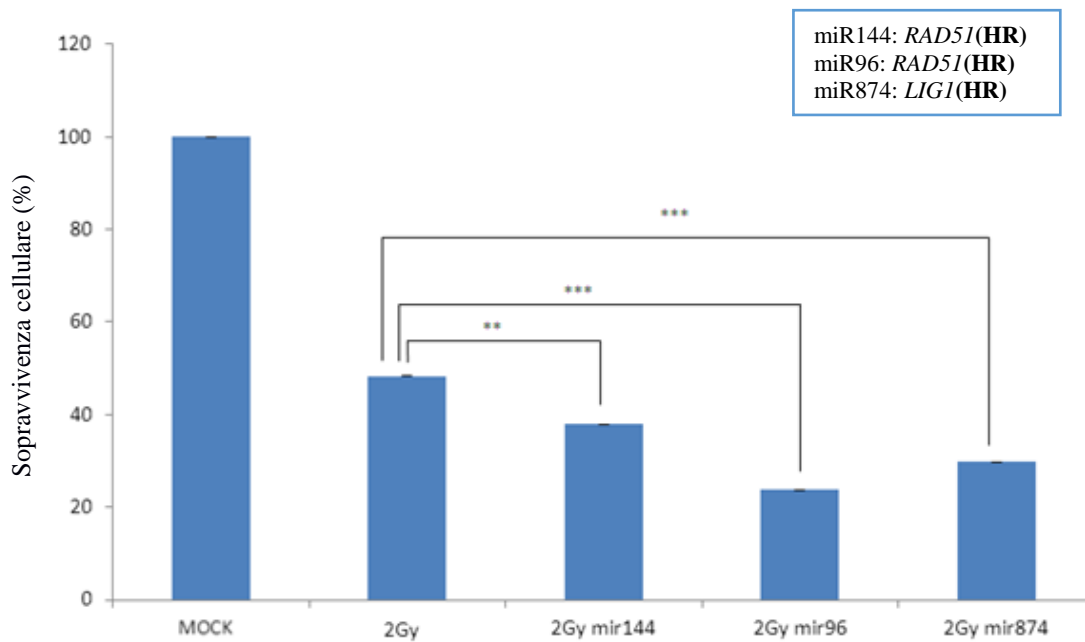


Figura 3.4: Sopravvivenza cellulare di cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics e irradiate con 2Gy di raggi- γ . Sono riportate in grafico le medie dei valori di sopravvivenza \pm deviazione standard. Le cellule non irradiate (MOCK) e irradiate (2Gy) sono state incubate con solo lipofectamine.

Nel saggio riportato in Figure 3.5 è stato valutato l'effetto di due miRNAs già validati tramite saggi di luciferasi in letteratura: miR-155-5p, che ha come target l'mRNA del gene *RAD51* [21], e miR-101-5p ha come target l'mRNAs del gene *DNA-PKcs* [22]. La sopravvivenza cellulare mostra come il miR-101 associato a radiazione abbia un forte effetto sulla sopravvivenza delle cellule A549. Il miR-155 ha invece effetti più moderati, favorendo comunque la mortalità cellulare. Al contrario, la combinazione di questi due miRNA-mimics non potenzia l'effetto dei singoli, ma dà una sopravvivenza cellulare intermedia. Dai dati riportati in tabella 8 si nota come, analogamente all'esperienza precedente, la presenza dei soli miRNAs abbia effetti sulla sopravvivenza cellulare anche in cellule A549 non irradiate.

Condizione	Efficienza di clonaggio (EC)	Deviazione standard
CTR	80%	7.7%
MOCK	71%	0.3%
2Gy MOCK	37%	0.4%
miR-101	25%	4.7%
miR-155	50%	12%
miR-101+miR-155	35%	15.6%
2Gy miR-101	13%	7.6%
2Gy miR-155	25%	10%
2Gy miR-101+ miR-155	17%	3.8%

Tabella 8: Efficienza di clonaggio (EC) di cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics e irradiate con dose 2Gy di raggi- γ . Sono riportate in tabella le medie dei valori di CE \pm deviazione standard.

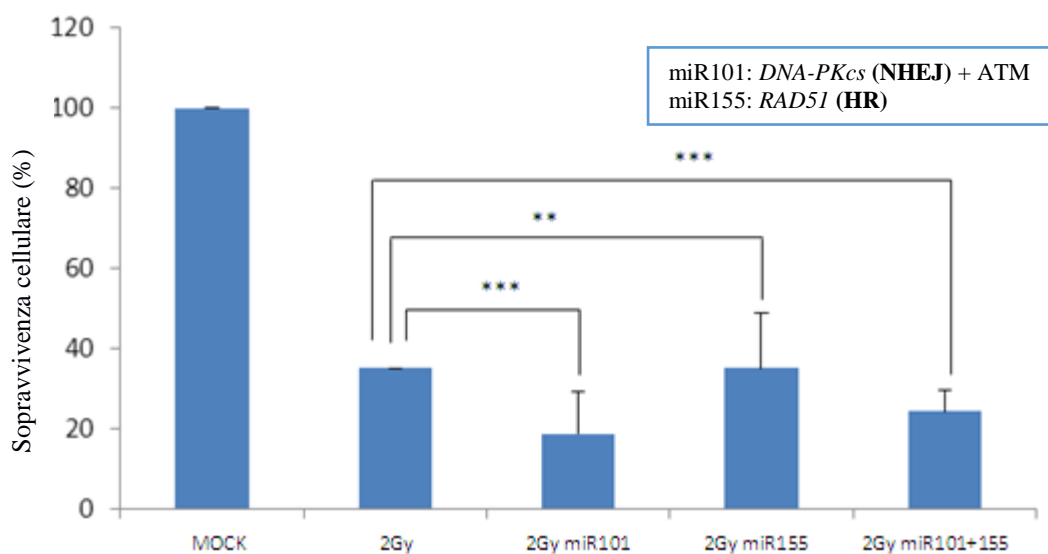


Figura 3.5: Sopravvivenza cellulare di cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics, alcune condizioni sono sottoposte a 2Gy di raggi- γ . Sono riportate in grafico le medie dei valori di sopravvivenza \pm deviazione standard. Le cellule non irradiate (MOCK) e irradiate (2Gy) sono state incubate con solo lipofectamine.

4. Discussione

Lo studio qui riportato ha permesso di indagare il ruolo di alcuni miRNAs nella radioresistenza della linea cellulare A549. La radioresistenza è data da alterazioni nei livelli di espressione dei geni del *pathway* DDR, che rendono le cellule tumorali poco sensibili ai danni al DNA indotti dalle terapie antitumorali (radioterapia e chemioterapia). Le proteine chiave dei principali processi di riparazione di DSBs (HR e NHEJ) sono infatti spesso sovra-esprese nei tumori radioresistenti [21, 22]. Mutazioni in queste proteine compromettono la funzionalità dei processi HR e NHEJ, con impatti sulla sopravvivenza cellulare come si può vedere per la linea cellulare M059J (Figura 3) deficiente della proteina DNA-PKcs [26]. Quest'ultima gioca un ruolo chiave nella riparazione NHEJ ed essendo NHEJ il meccanismo principalmente impiegato nelle cellule di mammifero per la risoluzione di DSBs [13], si spiega la grande sensibilità alle radiazioni della linea M059J. In seguito ho indagato i livelli di espressione di alcuni geni che, dai dati riportati in letteratura e vista la loro azione, potrebbero subire cambiamenti in seguito a IR. In tabella 1 sono riportati i valori di espressione di alcuni dei principali geni coinvolti nella riparazione del DNA, ottenuti con il metodo qRT-PCR. Due geni, *RAD51* e *LIG1*, mostrano una sovraespressione nelle cellule A549 irradiate con 2Gy di raggi- γ . Entrambe le proteine sono coinvolte nella ricombinazione omologa, mentre *LIG1* partecipa anche alla ricombinazione non omologa alternativa (A-EJ). Essendo le cellule A549 una linea tumorale e perciò in costante proliferazione, molte cellule della popolazione si trovano in fase S-G2 del ciclo cellulare e la ricombinazione omologa viene quindi utilizzata data la disponibilità del cromatidio fratello. Ho quindi voluto indagare il contributo dei due meccanismi di riparazione HR e NHEJ nelle cellule A549 in seguito a radiazione con raggi- γ (2Gy). A tale scopo ho condotto saggi clonogenici con inibitori enzimatici NU7026 e RI-I specifici per le proteine DNA-PKcs e *RAD51* rispettivamente, due proteine con un ruolo chiave nei meccanismi NHEJ e HR. I risultati ottenuti dimostrano come la compromissione di questi due meccanismi di riparazione sensibilizzi le cellule alle radiazioni (Figura 3.3). Entrambi gli inibitori abbassano la sopravvivenza

cellulare (S), con un dato significativo per NU7026 (S~67%) e per la combinazione RI-I+NU7026 (S~38%). Secondo Yi Zhou et al. [12] l'inibitore NU7026 non compromette solamente il meccanismo non omologo, ma ha effetti anche sulla riparazione omologa poiché l'inibizione della proteina DNA-PKcs impedisce l'autofosforilazione della stessa, evento che media il distacco dai siti di rottura. La presenza della proteina DNA-PKcs sulle DSBs non permette un corretto reclutamento delle proteine coinvolte nel meccanismo HR (RPA e RAD51), influenzando così su entrambi i meccanismi. I dati di sopravvivenza cellulare riportati in Figura 3.3 mostrano però come un'inibizione della ricombinazione omologa non abbia effetti significativi sulla sopravvivenza cellulare. Si può quindi pensare che il *pathway* NHEJ sia il meccanismo maggiormente usato dalle cellule A549 per la riparazione di DSBs dal momento che l'inibizione della proteina DNA-PKcs ha un impatto maggiore. Come ci si può aspettare, l'inibizione di entrambi i meccanismi HR e NHEJ compromette ancora di più la sopravvivenza cellulare, dando però valori di sopravvivenza (S~38%) molti simili a quelli ottenuti con l'inibitore NU7026 e confermando come la riparazione non omologa abbia un ruolo significativo in queste cellule. In seguito ho indagato il contributo di alcuni geni sulla sopravvivenza delle cellule A549 irradiate con 2Gy. Ho scelto i geni *RAD51* e *LIG1* perché hanno dimostrato di rispondere alla dose 2Gy, essendo sovraespressi nelle analisi di qRT-PCR. Analisi bioinformatiche hanno predetto miRNAs in grado di interagire con tali geni: miR-96 e miR-144 per il gene *RAD51*, miR-874 e miR-342 per il gene *LIG1*. Le interazioni predette necessitano di essere validate tramite saggi della luciferasi dal momento che gli algoritmi di predizione riportano spesso falsi positivi. Ho quindi costruito vettori pmiRGLO nei quali ho inserito le porzioni 3'-UTR dei trascritti dei geni scelti. I vettori pmiRGLO ed i miRNA-mimics sono stati usati per co-trasfettare cellule A549 sulle quali ho eseguito i saggi della luciferasi. I risultati complessivi mostrati in Figura 3.2 riportano interazioni significative per le co-trasfezioni di pGLO-*RAD51* e miR-144 o miR-96, per la co-trasfezione di pGLO-*LIG1* e miR-874, abbassando i valori di luminescenza prodotti dal gene *Firefly luciferase* di circa un 20%. Ho quindi analizzato l'effetto dei miRNAs validati sulla sopravvivenza di cellule A549 irradiate con dosi di raggi- γ 2Gy. Il saggio clonogenico riportato in Figura 3.4 mostra come l'uso di

miRNAs associati a radiazione abbassano la capacità delle cellule A549 di formare cloni. Il miR-144 associato a dose 2Gy comporta una sopravvivenza cellulare del 38% circa, mentre i miR-874 e miR-96 associati a radiazione provocano effetti maggiori, con valori di sopravvivenza S del 30% e 24% circa rispettivamente. Anche la sola sovraespressione dei miRNAs in cellule non irradiate ne abbassa la sopravvivenza, come riportato in tabella 7. Ho poi indagato l'effetto di due miRNAs già validati in letteratura, il miR-101 ed il miR-155, sulla sopravvivenza di cellule A549 irradiate aventi come geni bersaglio rispettivamente *DNA-PKcs* [22] e *RAD51* [21]. In Figura 3.5 ho riportato la sopravvivenza cellulare della linea A549 trasfettata con i miRNA-mimics miR-155 e miR-101 e co-trasfettata con entrambi i miRNAs. La radiazione combinata alla presenza di miRNAs abbassa la sopravvivenza, come si può vedere per le condizioni testate 2Gy+miR-101, 2Gy+miR-155, 2Gy+miR-155+miR-101. Il miR-101 ha un effetto maggiore del miR-155, abbassando maggiormente la sopravvivenza cellulare, con valori S di circa 13%, in confronto al 25% ottenuto con il miR-155. La combinazione di entrambi i miRNA miR-101 e miR-155 invece, non abbassa ulteriormente la sopravvivenza delle cellule A549, ma riporta valori di sopravvivenza intermedi (~17%) fra quelli ottenuti trasfettando le cellule con i singoli miRNAs. Come nel precedente saggio clonogenico con i miRNAs miR-144, miR-96 e miR-874, i singoli miRNAs miR-101 e miR-155 hanno effetti sulla sopravvivenza di cellule A549 non irradiate. In particolare il miR-101 ha un impatto maggiore, come si può vedere notare dai valori di efficienza di clonaggio (EC) riportati in Tabella 8. La scarsa capacità proliferativa di campioni A549 trattati con il solo con miR-101 potrebbe essere dovuta al fatto che il miR-101 ha come target anche l'RNA messaggero del gene mTOR [30], che codifica per una proteina multifunzionale implicata in numerosi processi cellulari, tra i quali la regolazione del ciclo cellulare e della proliferazione. In confronto al saggio clonogenico su campioni di cellule A549 incubate con inibitori enzimatici, i saggi clonogenici con miRNA-mimics hanno effetti maggiori sulla sopravvivenza cellulare in seguito a radiazioni. L'analisi preliminare di radioresistenza di questa linea cellulare dà un valore di 75% di sopravvivenza cellulare alla dose 2Gy (Figura 3). Il minimo valore di sopravvivenza ottenuto con gli inibitori proteici è ~38% (NU7026 + RI-I), mentre con i miRNA-mimics il minimo valore di sopravvivenza è la metà,

~19%, ottenuto con il singolo miR-101 associato a radiazione. I precedenti saggi clonogenici con miRNA-mimics hanno dimostrato come il meccanismo d'azione dei miRNAs influisca sulla capacità delle cellule A549 di dare origine a cloni. Ma i miRNAs endogeni hanno in genere centinaia di geni target [16], e non si può escludere sia così anche per i miRNA-mimics. Dunque, gli effetti che sono stati ottenuti non possono essere attribuiti esclusivamente alla ridotta espressione dei geni target che ho validato con il saggio della luciferasi, ovvero i geni *DNA-PKcs* (NHEJ), *LIG1* a *RAD51* (HR).

5. Conclusioni e prospettive future

I risultati ottenuti nel mio lavoro di tesi dimostrano come miRNA-mimics in grado di influire sui livelli di espressione di geni coinvolti nella riparazione di DSBs indotti da raggi- γ , sensibilizzino la linea cellulare radioresistente A549 alle radiazioni ionizzanti. La sopravvivenza delle cellule A549 è stata indagata diminuendo l'espressione dei tre geni *RAD51*, *DNA-PKcs* e *LIG1*: il gene *RAD51* è coinvolto nella riparazione omologa HR, il gene *DNA-PKcs* in quella non omologa NHEJ, mentre il gene *LIG1* partecipa sia alla riparazione omologa che alla riparazione non omologa alternativa A-EJ, il cui contributo nelle cellule A549 non è stato indagato. Il ruolo di due di questi geni, *RAD51* e *DNA-PKcs*, è stato confermato anche tramite saggi clonogenici con inibitori enzimatici specifici per i relativi prodotti proteici. In questo modo è stato dimostrato l'effettivo contributo di questi due geni e del rispettivo meccanismo HR e NHEJ, nella riparazione di DSBs. I miRNAs infatti hanno in genere molteplici geni bersaglio, molti dei quali non sono noti e che potrebbero aver contribuito a sensibilizzare le cellule alle radiazioni ionizzanti, agendo sullo stesso o su altri *pathways* non indagati, con un'azione sinergica e/o cooperativa. Ulteriori studi sono necessari sia per confermare questi dati, sia per capire meglio l'azione dei miRNA-mimics usati. Riguardo al lavoro svolto, è necessario eseguire esperimenti di qRT-PCR per confermare che, nelle cellule A549 trasfettate con miRNA-mimics, ci siano effettivamente alti livelli dei miRNAs introdotti e che i relativi geni bersaglio siano invece sotto-regolati. Si potrebbe inoltre confermare la sotto-regolazione genica non solo da un punto di vista trascrizionale, ma anche analizzando la concentrazione delle proteine tramite Western Blot. Infine, potrebbe essere interessante vedere se le cellule A549 rispondano alla dose 2Gy a sole 4 ore dall'irradiazione. Studi di RNA-seq condotti sul trascrittoma di cellule A549 mostrano come ci sia un elevato numero di geni differenzialmente espressi, tra i quali, *DDB2* risulta significativamente sovra-espresso a 4h dall'irradiazione con dose 2Gy di raggi- γ [25]. È possibile che negli esperimenti di qRT-PCR riportati in Tabella 1, *DDB2* abbia subito una sotto-regolazione a 24 ore dalla radiazione. Non si può escludere che avvenga una diversa regolazione genica nelle prime ore

in seguito a irradiazione e che i dati ottenuti da esperimenti di qRT-PCR variano in base alla tempistica dell'analisi. Ulteriori studi di qRT-PCR potrebbero confermare tali dati, uniti a microarray di microRNA per avere una visione più ampia.

Bibliografia

1. **The DNA-damage response in human biology and disease**, Stephen P. Jackson and Jiri Bartek. *Nature*, 2009, doi:10.1038/nature08467
2. **The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance**, 2012, B rardon J Lamarche, Nicole Orazio, and Matthew D Weitzman, *FEBS Lett.* 584(17): 3682–3695
3. **Posttranscriptional regulation of gene expression—adding another layer of complexity to the DNA damage response**, 2012, Jorge Boucas, Arina Riabinska, Mladen Jokic, Grit S. Herter-Sprie, Shuhua Chen, Katja Höpker and H. Christian Reinhard, *Front Genet.* doi: 10.3389/fgene.2012.00159
4. **DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139**, 1998, Rogakou EP1, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, *J Biol Chem*, 273(10):5858-68
5. **Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs**, 2013, L. P. Ferretti , Lafranchi L, Sartori AA, *Front Genet.* 3;4:99
6. **Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining**, 2012, Anastazja Grabarz, Aurélie Barascu, Josée Guirouilh-Barbat, Bernard S Lopez *Am J, Cancer Res* 2(3):249-268
7. **Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes**, 1996, Jenny Flygare, Fiona Benson, Dennis Hellgren, Elsevier, doi:10.1016/0167-4889(96)00040-7
8. **Small molecules, inhibitors of DNA-PK, targeting DNA repair, and beyond**, 2013, David Davidson, Lilian Amrein, Lawrence Panasci and Raquel Aloyz, *Frontiers in Pharmacology, Pharmacology of Anti-Cancer Drugs Volume 4, Article 5*
9. **Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time**, 2014, Williams GJ, Hammel M, Radhakrishnan SK, Ramsden D, Lees-Miller SP, Tainer JA, *DNA Repair (Amst).* 17:110-20

10. **Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal non-homologous ends**, 2007, Guirouilh-Barbat J, Rass E, Plo I, Bertrand P, Lopez BS, Proceedings of the National Academy of Sciences, DOI: 10.1073/pnas.0708541104
11. **Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining**, 2015, Sharma S, Javadekar SM, Pandey M, Srivastava M, Kumari R, Raghavan SC, Cell Death Dis. doi: 10.1038/cddis.2015.58
12. **DNA-dependent Protein Kinase Regulates DNA End Resection in Concert with Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) and Ataxia Telangiectasia-mutated (ATM)**, 2013, Yi Zhou and Tanya T. Paull, J Biol Chem. 288(52):37112-25. doi: 10.1074/jbc.M113.514398
13. **The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining**, 2013, Mansour WY1, Borgmann K, Petersen C, Dikomey E, Dahm-Daphi J, DNA Repair 1134–1142
14. **Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells**, 2008, Zhiyong Mao, Michael Bozzella, Andrei Seluanov, Vera Gorbunova, DNA Repair (Amst), 7(10): 1765–1771.
15. **Small silencing RNAs: an expanding universe**, 2009, Megha Ghildiyal and Phillip D. Zamore, Nature Reviews Genetics 10, 94–108, doi:10.1038/nrg2504
16. **The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks**, 2013, Allan M. Gurtan and Phillip A. Sharp, J Mol. Biol. 425, 3582–3600
17. **miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes**, 2014, Atanu Ghorai and Utpal Ghosh, Front Genet, doi: 10.3389/fgene.2014.00100
18. **microRNA Expression and Biogenesis in Cellular Response to Ionizing Radiation**, 2014 Aihong Mao, Yang Liu, Hong Zhang, Cuixia Di and Chao Sun García-Castillo, Jacobo-Herrera, Herrera LA, Peralta-Zaragoza López-Camarillo, De Leon, Fernández-Retana, Cerna-Cortés, Pérez-Plasenci, DNA Cell Biol. 33(10): 667–679.

19. **MicroRNAs: new players in the DNA damage response**, 2011, Hailiang Hu and Richard A. Gatti, *J Mol Cell Biol.* 3(3):151-8. doi: 10.1093/jmcb/mjq042
20. **Analysis of miRNA and mRNA Expression Profiles Highlights Alterations in Ionizing Radiation Response of Human Lymphocytes under Modeled Microgravity**, 2012, Cristina Girardi, Cristiano De Pittà, Silvia Casara, Gabriele Sales, Gerolamo Lanfranchi, Lucia Celotti, Maddalena Mognato, *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0031293
21. **Protective role of miR-155 in breast cancer through *RAD51* targeting impairs homologous recombination after irradiation**, 2014, Pierluigi Gasparini,^a Francesca Lovat,^a Matteo Fassan,^{a,b} Lucia Casadei,^a Luciano Cascione,^{a,c} Naduparambil Jacob, Stefania Carasi, Dario Palmieri, Stefan Costinean^e and Charles Shapiro,^f Kay Huebner,^a and Carlo M. Croce, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(12): 4536–4541
22. **Targeting DNA-PKcs and ATM with miR-101 Sensitizes Tumors to Radiation**, 2010, Dan Yan, Wooi Loon, Xiangming Zhang, Ping Wang, Zhaobin Zhang, Yin-Yuan Mo, Hui Mao, Chunhai Hao, Jeffrey J. Olson, Walter J. Curran, Ya Wang, *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0011397
23. **Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer**, 2013, Willers H1, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F, *Cancer J.* 19(3):200-7. doi: 10.1097/PPO.0b013e318292e4e3
24. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**, 2001, Michael W. Pfaffl, *Nucleic Acids Research* Vol. 29, No. 9 00
25. **Investigation of Radiation-induced Transcriptome Profile of Radioresistant Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells Using RNA-seq**, 2013, Hee Jung Yang, Namshin Kim, Ki Moon Seong, HyeSook Youn, BuHyun Youn, *Plos One*, DOI: 1371/journal.pone.0059319
26. **Frameshift mutation in PRKDC, the gene for DNA-PKcs, in the DNA repair-defective, human, glioma-derived cell line M059J**, 2001, Anderson CW1, Dunn JJ, Freimuth PI, Galloway AM, Allalunis-Turner MJ, *Radiat Res.* 156(1):2-9.

27. **Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development**, 2009, Wagner EF, Nebreda AR, Nat Rev Cancer, 9(8):537-49. doi: 10.1038/nrc2694.
28. **NER Initiation Factors, DDB2 and XPC, Regulate UV Radiation Response by Recruiting ATR and ATM Kinases to DNA Damage Sites**, 2013, Alo Ray1, Keisha Milum, Aruna Battu, Gulzar Wani, and Altaf A. Wani, DNA Repair (Amst), doi:10.1016/j.dnarep.2013.01.003
29. **Radiation oncology: a century of achievements**, 2004, Jacques Bernier, Eric J. Hall & Amato Giaccia, Nature Rev Cancer 4, 737-747 doi:10.1038/nrc1451
30. **Human Cytomegalovirus Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species That Affect Its Replication**, 2008, Fu-Zhang Wang, Frank Weber, Carlo Croce, Chang-Gong Liu, Xudong Liao, and Philip E. Pellett, JOURNAL OF VIROLOGY, No. 18 doi:10.1128/JVI.00961-08
31. **MicroRNAs Used in Combination with Anti-Cancer Treatments Can Enhance Therapy Efficacy**, 2015, Maddalena Mognato and Lucia Celotti Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 1052-1062