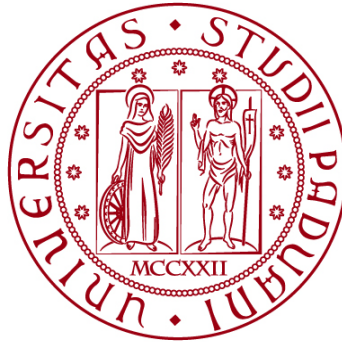


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Comprensione del ruolo della nuova proteina
MYTHO/*C16orf70* nella senescenza**

**Relatore: Prof. Marco Sandri
Dipartimento di Scienze Biomediche**

**Correlatore: Dott.ssa Anaïs Franco-Romero
Dipartimento di Scienze Biomediche**

Laureanda: Francesca Ghirardi

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Abstract.....	3
Capitolo 1: Introduzione.....	4
1.1 Scoperta della proteina MYTHO	4
1.2 L'autofagia.....	5
1.2.1 Regolazione dell'attivazione dell'autofagia	5
1.2.2 Le fasi dell'autofagia	6
1.2.3 Il ruolo di MYTHO nell'autofagia.....	8
1.2.4 Il ruolo di MYTHO nel muscolo scheletrico	10
1.3 La senescenza cellulare	13
1.3.1 Autofagia e senescenza	13
1.3.2 MYTHO e la senescenza	13
1.3.3 La senescenza cellulare e il danno al DNA	15
1.3.4 Le proteine coinvolte nella riparazione del danno al DNA	17
1.3.5 La senescenza e la sintesi dei dNTP	19
Capitolo 2: Obiettivi.....	23
Capitolo 3: Materiali e metodi	24
3.1 Estrazione dei dNTP.....	24
3.2 Immunoprecipitazione.....	27
3.3 NanoBiT® PPI Starter Systems	31
3.3.1 Clonaggio.....	31
3.3.2 Protocollo del saggio NanoBiT.....	36
3.4 Western blotting.....	40
3.5 Esperimenti <i>in vivo</i>	43
3.5.1 Protocollo di genotipizzazione.....	43
3.5.2 Echo-MRI	44
Capitolo 4: Risultati e discussione	45
4.1 Alterazione del pool di dNTP nei miotubi con <i>Mytho</i> silenziato	45
4.2 Mytho interagisce con gli enzimi che sintetizzano i dNTP: Ctps1 e Tk1 ...	48

4.3 Mytho interagisce in modo diretto con Tk1	51
4.3.1 Risultati del clonaggio	51
4.3.2 Risultati del saggio NanoBiT.....	55
4.4 Alterazioni nella risposta e riparazione dei danni al DNA nelle cellule <i>Mytho</i> -knockout.....	58
4.4.1 Elaborazione dei dati	59
4.4.2 Interpretazione dei risultati	60
4.5 Studio dei topi <i>Mytho</i> -knockout	64
Capitolo 5: Conclusioni e prospettive future.....	69
Bibliografia e sitografia	72

Abstract

Diversi studi hanno dimostrato che l'assenza della proteina MYTHO accelera la senescenza e causa mortalità precoce, indicando che potrebbe avere un ruolo nell'invecchiamento. Un'analisi proteomica aveva inoltre rivelato che immunoprecipita con CTPS1 e TK1 ed è stato ipotizzato che MYTHO potrebbe influenzare la funzionalità di questi enzimi nella sintesi pirimidinica, processo essenziale per mantenere un corretto pool di dNTP e riparare i danni al DNA.

Nel corroborare l'ipotesi, gli esperimenti di questa ricerca di tesi hanno constatato l'effettiva interazione di MYTHO con i due enzimi e una compromissione del pool di dNTP in assenza della proteina.

Inoltre, ci si è domandati se la mancanza di MYTHO alteri il pathway di riparazione del DNA, meccanismo che protegge la cellula dall'invecchiamento. Negli esperimenti, dopo l'induzione di danni al genoma, è stato osservato che la fosforilazione di H2AX e p53 era ridotta nelle cellule *Mytho*-knockout rispetto alle wild-type, suggerendo una diminuzione nella rilevazione e riparazione del danno. Anche nel modello murino è stato notato come l'assenza della proteina accorci l'aspettativa di vita.

In sintesi, i dati preliminari ottenuti supportano l'ipotesi che MYTHO svolga un ruolo chiave nel bilancio dei dNTP e nel riparo dei danni al DNA, processi importanti nella senescenza.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Scoperta della proteina MYTHO

Nel centro di ricerca biomedica VIMM (Istituto Veneto di Medicina Molecolare) di Padova specializzato nello studio delle malattie legate all'invecchiamento è stata scoperta recentemente una nuova proteina, chiamata in seguito MYTHO, che svolge un ruolo importante nel processo di senescenza cellulare.

MYTHO è un gene FoxO-dipendente (Fork-head Box O) che codifica per la proteina omonima MYTHO (47.5 kDa) il cui acronimo corrisponde all'abbreviazione di Macroautophagy and YouTH Optimizer, ovvero, ottimizzatore della macroautofagia e della giovinezza.

Le proteine FoxO fanno parte di un sottogruppo della famiglia dei fattori di trascrizione Forkhead che possiedono un dominio di legame al DNA conservato chiamato "Forkhead Box" o FOX. In particolare, la classe "O" viene regolata dalla via di segnalazione dell'insulina/PI3K/AKT. (1)

FoxO viene attivato quando la cellula è sottoposta a condizioni di stress, come possono essere la presenza di proteine mal ripiegate, di ROS (specie reattive dell'ossigeno), di danni al DNA e digiuno, e svolge il ruolo di fattore di trascrizione inducendo l'espressione di proteine in grado di far ritornare la cellula ad una condizione di equilibrio. (2)

Al fine di scoprire nuovi geni codificanti proteine che agiscono in tali circostanze, sono stati eseguiti screening di profili trascrittomici per sequenze di DNA, comprendenti geni con una funzione ancora sconosciuta, che erano sovraregolati in condizioni di aumento di degradazione delle proteine, una situazione di stress che può essere indotta dal digiuno, ma non lo erano quando la proteolisi era bloccata per l'inibizione di FoxO. Successivamente, grazie a strumenti bioinformatici, le sequenze sono state screenate in favore di quelle che possedevano una open reading frame (ORF) e che erano conservate tra le specie.

Per ridurre ulteriormente il numero di geni candidati, le sequenze di interesse sono state selezionate se possedevano anche regioni di interazione con LC3, chiamate LIR, e motivi di interazione con GABARAP, chiamati GIM. Tra i geni con queste caratteristiche, è risaltata la sequenza *C16orf70* nell'uomo, denominata in seguito *MYTHO*.

MYTHO è espresso in diversi tessuti come polmoni, cuore, fegato e muscolo scheletrico ed è conservato tra le specie da *Caenorhabditis elegans*, al topo e all'uomo e possiede il 95% di omologia nella sequenza degli amminoacidi tra l'uomo ed il topo. (3)

1.2 L'autofagia

L'autofagia è un processo di degradazione catabolica cellulare attraverso cui organelli, proteine e porzioni di citoplasma vengono reclutati, digeriti e riciclati per sostenere il metabolismo e mantenere l'omeostasi cellulare.

Esistono tre tipi di autofagia:

1. la macroautofagia, chiamata in seguito "autofagia": è il meccanismo principale, finalizzato allo smaltimento di organuli danneggiati o proteine mal foldate o inutilizzate. Questi vengono reclutati da un autofagosoma per poi fondersi con i lisosomi per la degradazione grazie agli enzimi lisosomiali;
2. la microautofagia: il materiale da degradare viene direttamente inglobato dal lisosoma attraverso delle invaginazioni ed evaginazioni della membrana lisosomiale;
3. l'autofagia chaperone-mediata o CMA: è il processo in cui i componenti da degradare si legano ad un chaperone molecolare che li marca e li trasporta ai lisosomi per la degradazione.

Tramite diversi studi sotto riportati, è stato scoperto che la proteina MYTHO è coinvolta nel primo processo che riguarda la macroautofagia, durante il quale la formazione dei compartimenti degradativi richiede proteine citosoliche, organelli intracellulari, come il reticolo endoplasmatico (RE) e il Golgi, e il sistema endosoma-lisosoma.

1.2.1 Regolazione dell'attivazione dell'autofagia

Nell'induzione dell'autofagia, uno dei fattori di trascrizione coinvolti è FoxO, che è regolato dal pathway di segnalazione insulinico PI3K/AKT. (Figura 1)

L'insulina, un ormone prodotto dal pancreas in situazioni di abbondanza di nutrienti, si lega al recettore sulla superficie cellulare, attivandolo. L'attivazione innesca la fosforilazione del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) che si trasforma in fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP3) da parte dell'enzima fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe I (PI3K). Il PIP3 è importante per il reclutamento e la successiva attivazione, tramite fosforilazione, della serina/treonina chinasi AKT. Quest'ultima promuove il metabolismo, la crescita cellulare e la sintesi proteica tramite l'attivazione della proteina-chinasi mTOR (mechanistic target of rapamycin). mTOR, a sua volta, fosforila la chinasi ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinases 1) sulla serina 757, inibendone l'attività e, in questo modo, viene repressa l'autofagia poiché ULK1 è essenziale per l'attivazione del processo autofagico.

Il fattore di trascrizione FoxO è controllato negativamente dalla via di segnalazione AKT-mTOR: l'attivazione di AKT, infatti, inibisce FoxO1 e FoxO3 attraverso la

loro fosforilazione, che ne promuove l'esportazione dal nucleo al citoplasma dove non possono svolgere la loro funzione trascrizionale.

In condizioni di digiuno, invece, la via di segnalazione AKT-mTOR è ridotta, poiché i segnali che la attiverebbero diminuiscono (es. il legame dell'insulina), ULK1 non viene repressa e l'autofagia viene attivata.

Inoltre, il sensore energetico AMP-chinasi (AMPK) viene attivato in queste condizioni di bassa disponibilità energetica e fosforila ULK1 sulla serina 777, segnale che induce l'autofagia (la fosforilazione avviene in una serina diversa rispetto alla fosforilazione inibitoria da parte di mTOR).

AMPK fosforila anche FoxO in più residui, potenziando la sua traslocazione al nucleo, dove attiva la trascrizione dei geni autofagici coinvolti sia all'inizio del processo come *ULK1/2*, sia nella nucleazione della membrana come *BECLIN1*, *ATG14*, *PI3KIII* e *MYTHO* sia nell'elongazione e chiusura del fagoforo come *LC3*, *GABARAP1*, *ATG4*, *ATG5* and *ATG12*. (4)

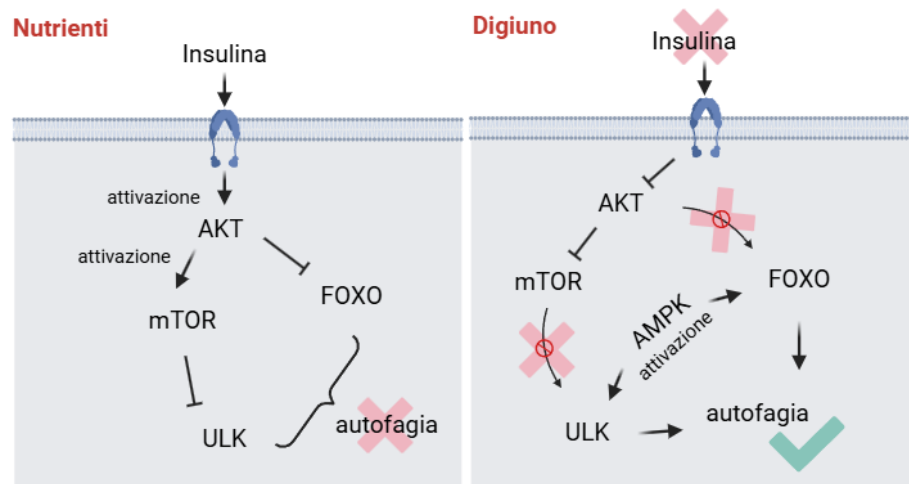


Figura 1 Condizioni di attivazione del pathway di segnalazione insulinico/AKT

1.2.2 Le fasi dell'autofagia

L'autofagia è un processo che si sviluppa essenzialmente in quattro stadi: (Figura 2)

1. Fase di induzione: è regolata da mTOR, che funge da sensore dei livelli di energia cellulare e di amminoacidi disponibili. Quando questi scarseggiano, le chinasi ULK1 e ULK2 vengono defosforilate, si attivano e si localizzano nei pressi del fagoforo, una cisterna specializzata che si chiuderà formando un vacuolo a doppia membrana, l'autofagosoma. (5) La struttura del fagoforo si pensava originasse principalmente dal RE mentre è stato osservato che probabilmente evolve da strutture chiamate endosomi

riciclatori (positivi per RAB11A) che reclutano proteine chiave per la loro formazione, come WIPI2. (6)

2. Inizio della formazione dell'autofagosoma "nucleazione": il materiale da degradare viene inglobato nell'autofagosoma grazie all'azione degli enzimi codificati dai geni *ATG* (Autophagy-related genes).

Quando le chinasi ULK1/2 si trovano nei pressi del fagoforo reclutano sulla sua superficie la PI3K di classe III (VPS34), insieme a diverse proteine come BECLIN-1, BIF1 e ATG14. Il complesso formato da questi enzimi è essenziale per la produzione di fosfatidilinositolo 3-fosfato (PI3P) e facilita il reclutamento di altre proteine ATG necessarie per l'espansione della membrana del fagoforo. (7)

PI3K di classe III è la chinasi che genera il PI3P dal fosfatidilinositolo (PI). Questa reazione avviene sulla membrana dell'omegasoma, una struttura associata al RE coinvolta nelle fasi iniziali dell'autofagia.

Il PI3P recluta le proteine effettrici WIPI2 e DFCP1 che richiamano a loro volta ATG12 e ATG5 che formano un complesso associato ad ATG16L. Quest'ultima è richiesta per convogliare LC3 al sito di formazione dell'autofagosoma e forma un complesso con WIPI2 che a sua volta si associa alle proteine MYTHO/BCAS3.

3. Allungamento e maturazione del fagoforo: le proteine ATG7 e ATG3 facilitano la lipidazione di LC3-I (forma citosolica di LC3), richiamato precedentemente, tramite l'incorporazione di fosfatidiletanolamina (PE), un componente delle membrane cellulari. In questo modo, si forma LC3-II che si inserisce sulla superficie dell'autofagosoma e recluta componenti che contengono una regione che interagisce con esso, chiamata LIR, che permettono l'allungamento e la chiusura della membrana del fagoforo attorno ai materiali da degradare.
4. Sigillatura e fusione con il lisosoma: avviene la sigillatura della membrana allungata e si forma la vescicola a doppio strato chiamata autofagosoma. La sua membrana esterna si fonde con il lisosoma formando l'autofagolisosoma, passaggio gestito dalle proteine LAMP. Infine, le idrolasi lisosomiali, enzimi attivi al pH acido del lisosoma (circa 5.0), completano il processo degradando la membrana interna dell'autofagosoma e gli organelli o proteine sequestrati.

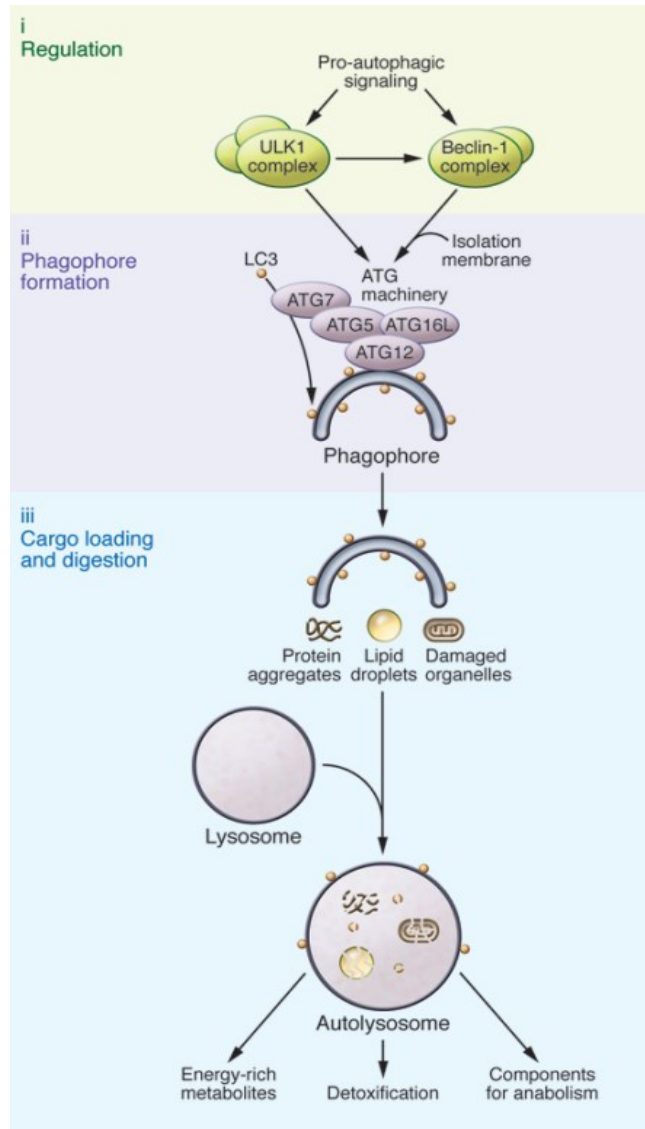


Figura 2 Fasi dell'autofagia

1.2.3 Il ruolo di MYTHO nell'autofagia

Nel processo dell'autofagia, MYTHO regola la formazione degli autofagosomi controllando l'assemblaggio del sistema di coniugazione al fagoforo. (Figura 3)

In primo luogo, sono state identificate diverse proteine con cui interagisce: tra le principali troviamo WIPI2 e BCAS3. MYTHO funge da impalcatura legandole insieme.

BCAS3 è coinvolta nella formazione dell'autofagosoma e forma un complesso con MYTHO con il quale si associa al sito di formazione del fagoforo in modo dipendente da PI3P. (8)

WIPI2 interagisce con ATG16L ed ha il compito di reclutare il complesso ATG5-ATG12-ATG16L per consentire il legame covalente di LC3B alla fosfatidiletanolamina (reazione di lipidazione).

In un esperimento effettuato su cellule, è stata indotta l'espressione di un mutante di WIPI2 incapace di interagire con PI3P e si è osservato che il legame tra MYTHO e WIPI2 rimaneva. Invece, utilizzando WIPI2 mutato in modo che non potesse interagire con ATG16L, il legame con MYTHO non era più presente. Questi dati hanno consentito di affermare che MYTHO si lega al complesso WIPI2-ATG16L indipendentemente dal reclutamento di WIPI2 alle membrane arricchite con PI3P.

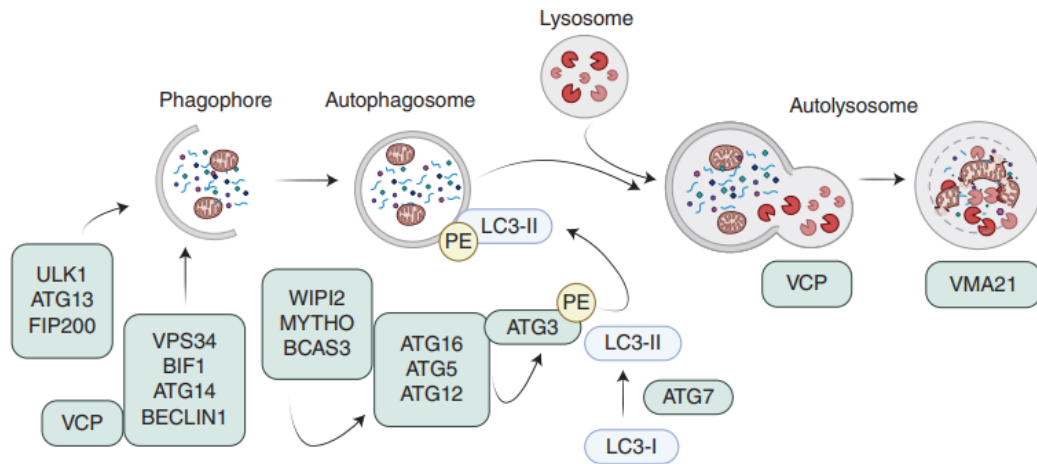


Figura 3 Il ruolo di MYTHO nell'autofagia

Attraverso diversi esperimenti di localizzazione, è stato constatato che MYTHO colocalizza con le regioni arricchite con PI3P, gli omegasomi.

In particolare, colocalizza con LC3-B, un marcatore che identifica la posizione degli autofagosomi, e successivamente anche con LAMP2, un marcatore dei lisosomi.

Ciò è stato rivelato attraverso uno studio *in vivo*, nel quale il muscolo scheletrico dei topi è stato elettroporato con plasmidi contenenti MYTHO-GFP, LC3-Cherry e LAMP2 con il fine di visualizzare l'interazione dei due marcatori con la nostra proteina di interesse. Dopo un periodo di digiuno, condizione che induce l'autofagia, gli animali sono stati sacrificati, le fibre del muscolo isolate ed è stato constatato che MYTHO interagiva con entrambi i marcatori e che il segnale aumentava con l'incremento del flusso autofagico.

Successivamente, altri topi, oltre all'elettroporazione, sono stati sottoposti anche al trattamento con una sostanza, chiamata colchicina, che distrugge la rete dei microtubuli e quindi inibisce la fusione autofagosoma-lisosoma (Figura 4). In questo caso, la colocalizzazione di MYTHO con LC3 non era cambiata, mentre quella con LAMP2 era diminuita significativamente. I risultati hanno dimostrato che MYTHO si localizza inizialmente negli autofagosomi e poi si sposta, insieme a questi, presso gli autofagolisosomi per il completamento del processo autofagico.

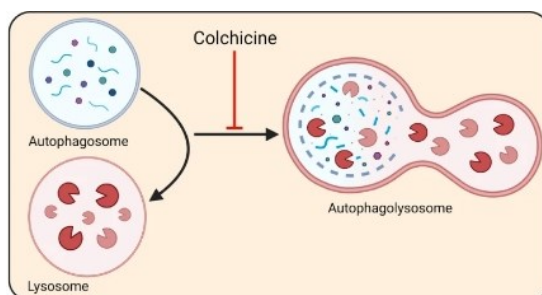


Figura 4 Fusione autofagosoma-lisosoma

Per sottolineare l'importanza di MYTHO nel processo autofagico, tra i vari studi riportati in letteratura, ne risalta uno nel quale sono stati utilizzati topi *Atg7*-knockout (KO) che sono privi del sistema autofagico e in questi animali è stato osservato che la localizzazione di MYTHO ai lisosomi era completamente abrogata, confermando che è necessaria l'autofagia poiché raggiunga i lisosomi. Inoltre, è stato analizzato il flusso autofagico nella linea cellulare C2C12 *Mytho*-KO monitorando l'incremento di LC3B-II (che aumenta quando l'autofagia è attiva) in presenza di cloroquina, un inibitore dell'attività dei lisosomi. L'accumulo di LC3B-II era proporzionale al numero di autofagosomi generati e accoppiati ai lisosomi. Il trattamento con cloroquina non ha aumentato la lipidazione di LC3B-II nelle cellule *Mytho*-KO come, invece, è avvenuto nelle cellule di controllo, indicando che il flusso autofagico basale è ridotto in assenza di Mytho.

1.2.4 Il ruolo di MYTHO nel muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è uno degli organi con il più alto rate di flusso autofagico quando i nutrienti scarseggiano.

Il livello di attività del processo dipende dai nutrienti, dall'attività fisica, dagli ormoni/citochine, dallo stato energetico della cellula, dallo stress del RE, dall'ipossia, da infezioni patogene e anche da elementi epigenetici e fattori genetici. Se il processo autofagico viene ridotto si può incorrere in miopatie, minore forza muscolare, cellule muscolari caratterizzate da mitocondri anormali, stress ossidativo e aggregati proteici con conseguente degradazione delle miofibre e morte prematura.

Il muscolo scheletrico è un tessuto insulina-sensibile infatti regola il livello di glucosio e lipidi nel sangue. Inoltre, grazie a sistemi di controllo si adatta a condizioni di stress e consente di modificare la sua dimensione.

Al fine di mantenere la massa del muscolo è necessario un equilibrio tra la degradazione e la sintesi proteica. Il pathway che ne influisce la sintesi è la via di segnalazione dell'insulina/IGF1 (fattore di crescita insulino-simile 1): l'insulina si lega ai suoi recettori e porta all'attivazione della proteina AKT che stimola la crescita cellulare e la sintesi proteica attraverso l'inibizione della chinasi GSK-3 β

(Glycogen synthase kinase-3 β), l'attivazione di mTOR e l'inibizione di FoxO portando alla crescita delle miofibre.

Il segnale ridotto di IGF1 signaling, invece, influisce positivamente la degradazione e l'atrofia rilasciando FoxO. Ciò porta alla riduzione delle miofibre e l'induzione dell'autofagia, condizioni date anche dalla ridotta attività di mTORC1 (complesso 1 di mTOR che ha il compito di inibire attraverso fosforilazione il complesso di ATG13 e ULK1).

Tuttavia, la proteolisi causa il rilascio di amminoacidi che influenza positivamente mTORC1 e stimola alla sintesi proteica: il risultato è quindi un bilancio dei due processi che definisce la massa muscolare. (9)

I fattori di trascrizione FoxO promuovono l'atrofia muscolare in risposta a condizioni cataboliche, come la denervazione, la sepsi, il digiuno e la cachessia da cancro. Infatti, la loro inibizione previene l'attivazione dei geni coinvolti nell'autofagia e blocca la perdita muscolare.

La perdita di massa e l'atrofia, in condizioni di bassa disponibilità di nutrienti, comportano l'attivazione delle proteine correlate al processo autofagico, come MYTHO, la quale viene quindi riconosciuta come un nuovo regolatore dell'integrità del muscolo scheletrico.

In studi effettuati sui topi, è stato osservato che un'inibizione acuta, quindi per un tempo breve, di *Mytho* rallentava l'attivazione dell'autofagia e preservava la massa muscolare in condizioni cataboliche come nel digiuno, denervazione, sepsi e cachessia. Dato che l'espressione di *Mytho* aumentava in condizioni atrofiche, inibendo questo gene, invece, è possibile contrastare l'atrofia durante le condizioni cataboliche acute.

In risposta ad un knockdown prolungato del gene, i topi manifestavano un fenotipo patologico del muscolo caratterizzato dalla compromissione dell'autofagia con accumulo di vacuoli autofagici, degenerazione delle miofibre causata da gravi anomalie ultrastrutturali, come nuclei centrali, e infiltrato infiammatorio. Inoltre, era sovraregolata l'espressione di diversi geni coinvolti nella crescita, come l'iperattivazione di mTOR, e la massa muscolare risultava ipertrofica ma non funzionale con una riduzione della generazione della forza.

Quando, invece, nella medesima situazione di knockdown di *Mytho*, il pathway di mTOR era inibito dalla rapamicina, il fenotipo miopatico era attenuato, migliorando l'impatto deleterio dovuto all'assenza del gene. (10) (Figura 5)

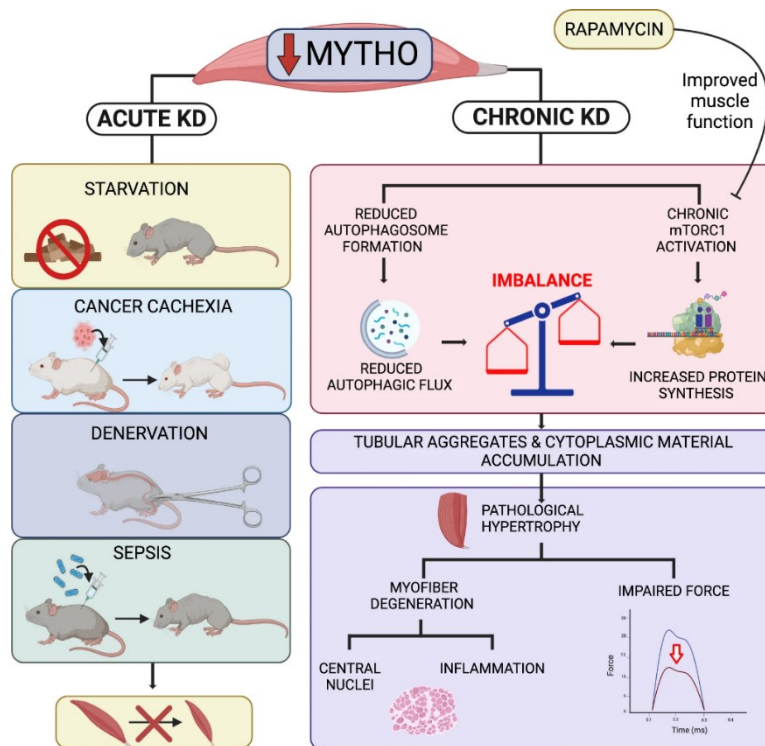


Figura 5 Schema che illustra il ruolo di MYTHO nell'omeostasi del muscolo scheletrico

L'autofagia è un processo compromesso durante l'invecchiamento e la disfunzione muscolare dipendente dall'avanzare dell'età quindi quest'ultima potrebbe essere ritardata incrementando l'autofagia.

Il muscolo scheletrico è uno dei primi organi che sperimenta cambiamenti correlati all'età come la perdita della massa e della funzione muscolare. Quando i cambiamenti risultano eccessivi si sviluppa la sarcopenia ovvero uno stato di malattia che peggiora la mortalità, la morbilità e impatta la qualità della vita. Il fenotipo sarcopenico si manifesta con declino della proteostasi soprattutto dovuto all'autofagia.

La perdita della massa, forza e funzione del muscolo può essere dovuta alla disregolazione delle proteine e organelli che controllano la qualità delle cellule: il sistema autofagia-lisomiale.

Diversi meccanismi contribuiscono all'impovertimento dell'autofagia durante l'invecchiamento come l'iperattivazione di mTOR indipendente da IGF-AKT nei topi anziani e la ridotta espressione dei geni e proteine coinvolti nell'autofagia.

L'impovertimento dell'autofagia nei muscoli induce caratteristiche tipiche dell'aging come la disfunzione mitocondriale, l'aumento della produzione di ROS, l'ossidazione miosina (che causa riduzione della proprietà di scorrimento), la denervazione, la riduzione della massa muscolare e della capacità di generare forza. Tutto ciò può condurre alla morte prematura dell'animale.

1.3 La senescenza cellulare

1.3.1 Autofagia e senescenza

Il processo di invecchiamento di un organismo è strettamente correlato all'accumulo di danni cellulari e alla disfunzione degli organelli all'interno delle cellule. Quando ciò accade, la cellula entra in uno stato di senescenza che conduce al deterioramento generale dell'organismo e all'invecchiamento.

L'autofagia è una dei processi chiave che interviene in queste situazioni e rimuove i componenti danneggiati permettendo di mantenere l'omeostasi cellulare e rallentando i processi di invecchiamento. Infatti, l'inibizione di questo sistema potrebbe favorire l'insorgenza di malattie e una prematura senescenza dell'organismo.

La senescenza cellulare è caratterizzata dalla progressiva perdita delle funzioni fisiologiche delle stesse portando alla morte cellulare.

Invecchiando, si osservano disfunzioni in vari sistemi cellulari, oltre che all'autofagia, anche alla proteostasi (sistema di controllo della qualità delle proteine), la funzionalità dei mitocondri e la stabilità genomica, ovvero, l'integrità del DNA.

Tutte queste possibili alterazioni contribuiscono a creare un ambiente cellulare instabile, favorendo lo sviluppo di patologie legate all'età come il cancro, il diabete, le malattie cardiovascolari e quelle neurodegenerative. (11)

1.3.2 MYTHO e la senescenza

Oltre alle funzioni già note di MYTHO, si aggiunge la capacità di contrastare l'invecchiamento e promuovere la longevità degli organismi.

Studi recenti hanno mostrato che il gene è sovraregolato sia nel topo che nell'uomo anziano, evidenziando il suo ruolo in questi processi.

In esperimenti effettuati *in vitro*, si è osservato come in assenza del gene il rate di replicazione delle cellule era molto rallentato. Ciò era dovuto all'aumentata espressione di inibitori del ciclo cellulare, come p21 (inibitore del ciclo cellulare che blocca la progressione attraverso la fase G₁ ed S), alla disfunzionalità dei mitocondri (rilevata dall'eccessiva produzione di ROS) e della proteostasi ed erano presenti danni al DNA. Inoltre, l'attività della β-galattosidasi, un marker associato alla senescenza, era aumentata (alcuni esperimenti sono mostrati in [Figura 6](#)).

Nonostante l'aumento dei ROS e di p21, il marcatore di danno al DNA pH2AX era ridotto. Questa evidenza potrebbe alludere ad un problema nel rilevamento del danno al DNA, funzione di pH2AX, e un minore reclutamento delle proteine di riparazione del DNA ove richieste.

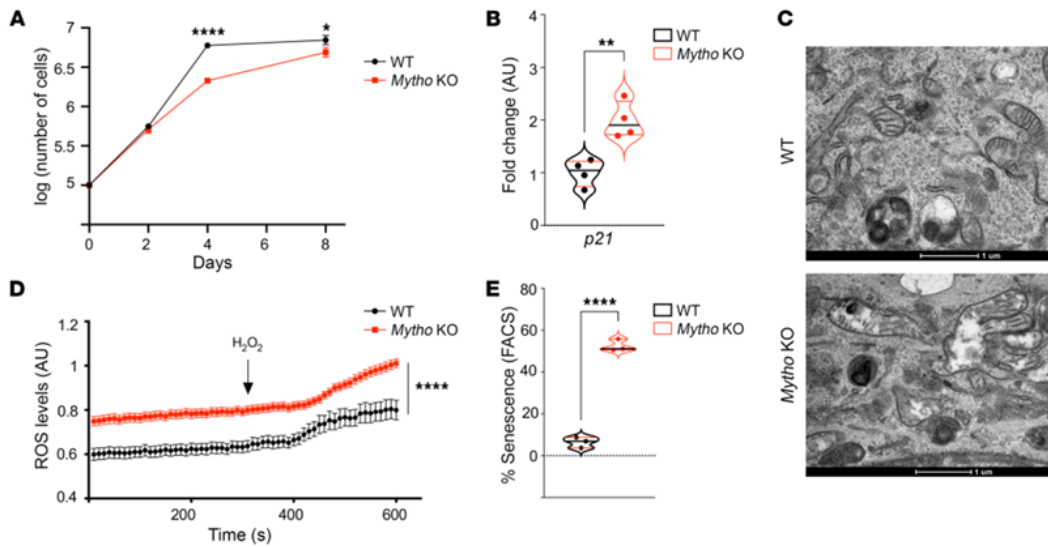


Figura 6 La deplezione di *Myths* induce la senescenza cellulare:
 (A) Il grafico indica il logaritmo (log) del numero totale di cellule misurato a 2, 4 e 8 giorni dopo la semina. La confluenza cellulare è stata raggiunta a 4 giorni nel controllo e a 8 giorni nelle cellule carenti di *Myths* ($N = 3$) (test *t* di Student a due code).
 (B) Real-time PCR quantitativa di *p21* nelle cellule C2C12 WT e *Myths*-KO, normalizzata per *Gapdh* ed espressa come fold increase ($N = 3$) (test *t* di Student a due code).
 (C) Immagini di microscopia elettronica del citoplasma delle cellule C2C12 WT (in alto) e *Myths*-KO (in basso). Nelle cellule KO sono presenti mitocondri gonfi anormali. (scala 1 μm).
 (D) La fluorescenza di *Mt-roGFP* è stata misurata in cellule singole ($n = 30$ per condizione; $N = 2$). La freccia indica l'aggiunta di H_2O_2 .
 (E) Percentuale di senescenza nelle cellule C2C12 WT e *Myths*-KO misurata mediante FACS ($n = 3$) (test *t* multiplo non appaiato).
 $N =$ numero di esperimenti indipendenti; $n =$ numero totale di individui. Le barre indicano ES (errore standard). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

Per approfondire questi aspetti *in vivo*, è stato utilizzato *C. elegans*, un organismo modello impiegato comunemente in studi sull'invecchiamento, utilizzando il gene ortologo di *MYTHO*: *myt-1* (T01G9.2).

Gli esperimenti condotti hanno rilevato che l'espressione del gene nei muscoli dei vermi era correlata all'età, mostrandone un aumento negli organismi più vecchi.

Infatti, i nematodi con *myt-1* inibito presentavano una ridotta aspettativa di vita e movimenti corporei ridotti. Un buon movimento del corpo è considerato un indicatore di salute in *C. elegans* e questi risultati suggeriscono che *Myths* potrebbe avere un ruolo protettivo contro il declino funzionale associato all'età.

Risultati simili sono stati anche ottenuti studiando l'organismo modello Zebrafish.

Mediante altri esperimenti utilizzando *C. elegans* e Zebrafish è stato riscontrato che gli animali *Mytho*-knockout avevano una minore sopravvivenza quando sottoposti ad un maggiore stress ossidativo indicando che questa proteina svolge un compito importante nel contrastarlo e mantenere l'integrità cellulare, fondamentale in favore di un invecchiamento sano (Figura 7).

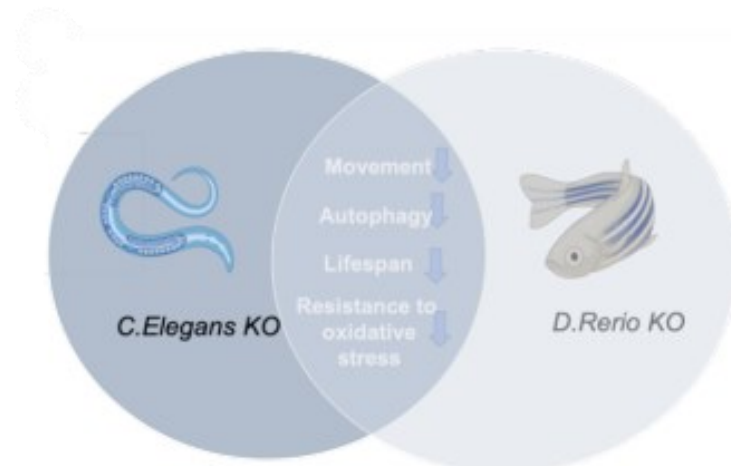


Figura 7 Rappresentazione schematica delle caratteristiche condivise degli animali MYTHO KO *C. elegans* e Zebrafish

In conclusione, dai dati riportati, si nota come MYTHO possa avere un ruolo nella senescenza cellulare, tuttavia, i meccanismi attraverso cui esercita questa funzione rimangono ancora in parte sconosciuti.

1.3.3 La senescenza cellulare e il danno al DNA

Come menzionato sopra, una delle principali cause della senescenza è l'instabilità genomica: il DNA è vulnerabile ad attacchi chimici da radicali liberi, elettrofilo, radiazioni ad alta energia o durante la replicazione è soggetto a mutazioni, rotture a doppio filamento (double strand breaks, DSB) o ossidazione e nitrosilazione delle basi.

Quando viene identificato un danno, la cellula è generalmente in grado di attivare meccanismi di riparazione per contrastarlo ma quando è particolarmente severo e questi processi non sono efficaci, le cellule vanno incontro a morte programmata (apoptosi), oppure iniziano un processo di senescenza cellulare, ovvero un arresto irreversibile del ciclo cellulare indotto dal signaling della risposta al danno. (12)

Anche l'organismo *in toto* nel tempo può risentirne, in quanto, è possibile sviluppare malattie correlate alla senescenza come quelle neurodegenerative e il cancro.

Le azioni dedicate all'alterazione della progressione del ciclo cellulare sono note come funzioni di checkpoint e, insieme a quelle dedicate alla riparazione del DNA, sono collettivamente chiamate DDR, ovvero DNA Damage Response.

Il danno al DNA nucleare attiva il pathway DDR che ha la funzione di bloccare la progressione del ciclo cellulare per consentire alla cellula di avere il tempo necessario a riparare il danno e prevenire la propagazione dell'informazione genetica errata alle cellule figlie.

Alcuni fattori di risposta implicati nel DDR si accumulano nei siti dove il DNA è danneggiato e formano foci nucleari composti da cromatina modificata, data per esempio dalla fosforilazione dell'istone H2AX (variante della proteina istone H2A) in γ H2AX, e ad altre proteine associate tra cui MDC1, 53BP1 e la forma attivata della chinasi atassia-teleangectasia mutata (ATM). Questi foci segnalano i siti di danno e contribuiscono all'attivazione del checkpoint e all'arresto del ciclo cellulare fino a quando il danno non viene riparato.

Una volta avvenuto ciò, i foci DDR si disassemblano grazie all'azione delle macchine di rimodellamento della cromatina e alla defosforilazione da parte delle fosfatasi di γ H2AX.

Se la cellula, invece, non è in grado di far fronte alla risoluzione del danno, viene prolungato il segnale DDR e avviene un arresto proliferativo prolungato sotto forma di senescenza cellulare. (13) (Figura 8)

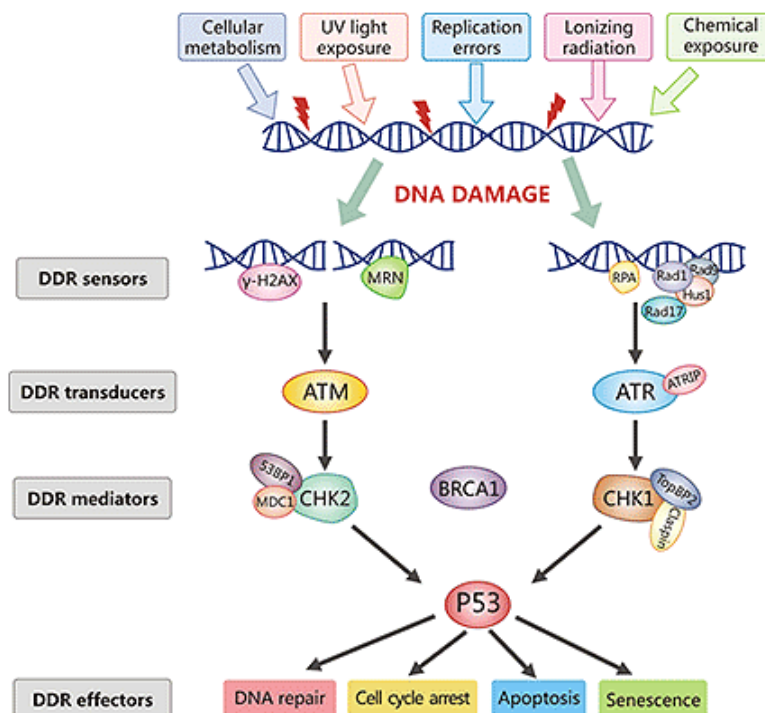


Figura 8 DNA damage

Esperimenti riportati in letteratura affrontano lo studio del danno al DNA mediante l'analisi delle proteine coinvolte nel DDR. È emerso, per esempio, che la perdita della proteina CHK1 (spiegata in dettaglio in seguito) causa stress nella replicazione del DNA e accumulo di danni. (14)

Proprio per tale motivo, in questa ricerca di tesi, è stata studiata l'espressione di alcuni degli enzimi coinvolti e la loro fosforilazione utilizzando la linea cellulare C2C12 di tipo wild-type e *Mytho*-knockout.

La fosforilazione è un importante meccanismo di regolazione delle proteine, una modifica post-traduzionale che può avvenire su diversi residui amminoacidici, che può attivare o inattivare una proteina e di conseguenza attivare o inibire il pathway in cui quella molecola è coinvolta.

Uno degli obiettivi è stato, infatti, quello di capire se vi fossero differenze in queste linee cellulari e se quindi la mancanza della proteina *Mytho* apportasse un maggiore danno al DNA o una incapacità della cellula di ripararlo.

1.3.4 Le proteine coinvolte nella riparazione del danno al DNA

Nel DDR sono coinvolte molte proteine, tra le quali sono importanti mTOR, DNA-PK, ATR e ATM che fanno parte di una famiglia di sensori chiamata PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases), un gruppo di chinasi correlate al fosfoinositide 3-chinasi.

ATM è una serina/treonina chinasi che viene reclutata e attivata soprattutto in seguito ad un DSB ed ha il compito di fosforilare proteine che portano all'arresto del ciclo cellulare e alla riparazione del DNA.

La rottura a doppio filamento viene riconosciuta da proteine sensore (chiamate MRN) e richiamano ATM al sito della rottura.

Successivamente, vengono fosforilate altre proteine e in questo modo si amplifica il segnale verso la sua trasduzione agli effettori a valle.

ATM è presente nella cellula sotto forma di omodimeri inattivi, poi in risposta al DSB avviene un'autofosforilazione *in trans* e forma dei monomeri parzialmente attivi. I monomeri sono poi reclutati nel sito della rottura tramite interazioni con i sensori del danno ed è qui che vi è una completa attivazione di ATM e agisce su più substrati. Uno di questi è l'istone **H2AX** che viene trasformato in γ H2AX.

Importante, è anche la fosforilazione da parte di ATM dell'effettore **CHK2** (Checkpoint kinase 2) su una specifica treonina (T68) e quando viene fosforilato e attivato si dissocia dal sito di danno e sotto forma di monomeri agisce su altri substrati coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, apoptosi e trascrizione genica.

CHK2 fosforila la fosfatasi CDC25A, portando alla sua degradazione. Ciò impedisce a CDC25A di defosforilare il complesso CDK1-ciclina B, causando l'arresto del ciclo cellulare.

Sia ATM che CHK2 giocano un ruolo cruciale anche nell'attivazione della risposta al danno mediata da p53 grazie alla fosforilazione dello stesso e quella dei suoi stabilizzatori MDM2 e MDMX.

Una volta fosforilato, p53 attiva la trascrizione di vari geni, tra cui p21, che è responsabile dell'arresto del ciclo cellulare nella fase G₁ a lungo termine.

Quando, invece, la replicazione è ostacolata, per danni da radiazioni ultraviolette o deplezione di nucleotidi, consegue che la DNA polimerasi si disaccoppia all'elicasi replicativa generando tratti di DNA a singolo filamento (ssDNA). Questi tratti vengono rivestiti dalla Proteina A di Replicazione (**RPA**), un eterotrimerico che si lega sia in condizioni fisiologiche che di danno. Infatti, impedisce al filamento di riavvolgersi su sé stesso o formare strutture secondarie e lo protegge dall'attacco di endonucleasi fino all'arrivo della DNA polimerasi che replica il filamento.

Nel caso specifico in cui ci sia un danno, RPA si lega all'ssDNA e recluta e attiva l'effettore **ATR** (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) tramite l'autofosforilazione di quest'ultimo. Tra i substrati di ATR vi è l'effettore **CHK1** (Checkpoint kinase 1), coinvolto nel controllo del ciclo cellulare poiché attiva a sua volta CDC25A, CDC25C e p53.

Inoltre, per ottenere un'efficiente attivazione di ATR e la conseguente fosforilazione a valle di CHK1 è importante l'azione di TopBP1 e Claspin. TopBP1 contiene un dominio che stimola l'attività di ATR, mentre, la proteina Claspin fosforilata recluta CHK1 ai complessi ssDNA-RPA, portandolo in stretta prossimità con ATR attivo e permettendo ad ATR di fosforilare direttamente CHK1 in diversi siti S/T-Q all'interno del dominio regolatore C-terminale, in particolare nelle serine (S) S317 e S345.

CHK1 viene reclutato anche in misura minore dalla chinasi ATM. (15)

Il fattore di trascrizione **p53** è un omotetramero che in una cellula sana viene prodotto e ubiquitinato dalla proteina MDM2 (E3 ligasi). (16)

Nel caso sia presente, invece, un danno importante come una rottura a singolo o doppio filamento, p53 viene attivato mediante fosforilazione sia da ATM e ATR che da CHK1 e CHK2, e non è più suscettibile all'ubiquitinizzazione. Quando è attivo e svolge il suo ruolo di fattore di trascrizione e porta alla trascrizione di geni come BAX (coinvolto nell'apoptosi), GADD45 (proteina per il riparo del DNA) e p21.

Quest'ultima arresta il ciclo cellulare bloccando l'attività di due complessi chinasi CDK2-ciclina E e CDK4-ciclina D1 che, quando sono bloccate, non riescono a fosforilare Rb1 che rimane legato al fattore di trascrizione E2F e la cellula rimane in fase G₀, esce dal ciclo cellulare, così ha il tempo necessario per la riparazione. E2F se non rimanesse legato a Rb1 svolgerebbe la sua azione di trascrizione di geni per la sintesi del DNA permettendo la progressione del ciclo cellulare.

Il gene TP53 che produce la proteina p53 è mutato nella maggior parte dei tumori: se non è funzionale il ciclo cellulare non viene bloccato, di conseguenza non può avvenire la risoluzione del danno e la cellula è esposta a possibili mutazioni aggiuntive.

Un altro membro della famiglia PIKK è **DNA-PK** (DNA-dependent protein Kinase). Questa proteina mantiene l'integrità genomica quando è presente una rottura a doppio filamento ed è importante per il processo di ricombinazione non omologa (NHEJ). Quando è presente un danno si lega alle estremità danneggiate e catalizza la sua autofosforilazione e la fosforilazione di altre proteine coinvolte nel NHEJ. Inoltre, coopera con ATR e ATM per fosforilare proteine coinvolte nei check-point del ciclo cellulare. (17)

Infine, un'altra proteina che svolge un ruolo importante nel DDR è **KAP1** (KRAB-associated protein 1), un corepressore che reprime la trascrizione di geni che sono legati da fattori di trascrizione come quelli della famiglia Zinc finger proteins ZFP che reclutano KAP1 sul DNA. Questi fattori di trascrizione hanno un dominio KRAB Krüppel-associated box.

Quando nel DNA è presente un DSB, viene attivata ATM, la quale fosforila KAP1 che migra verso il sito di danno e si colocalizza con altre proteine coinvolte nel DDR.

La perdita della sumoilazione e la fosforilazione di KAP1 è un processo critico per il riparo del DNA poiché induce la derepressione dei geni target di KAP1, come quello che codifica per GADD45, che hanno la funzione di arrestare del ciclo cellulare e indurre dell'apoptosi, processi che vengono quindi attivati. (18)

1.3.5 La senescenza e la sintesi dei dNTP

Tutte le cellule che si possono dividere richiedono un pool corretto di deossinucleotidi trifosfati (dNTP) per copiare il DNA nella fase S del ciclo cellulare e trasmettere accuratamente il genoma intatto alla generazione successiva. (19)

Un fattore cruciale nel mantenimento della stabilità genomica è il mantenimento dei livelli dei dNTP entro un intervallo ottimale per la replicazione cromosomica.

Con l'espressione "pool di dNTP" si fa riferimento alla concentrazione di nucleotidi desossiribonucleotidici presenti nella cellula, ovvero, dATP e dGTP che contengono basi puriniche (adenina e guanina) e dTTP e dCTP che contengono, invece, basi pirimidiniche (timina e citosina). I quattro tipi di nucleotidi sono formati da una base azotata, uno zucchero e un gruppo fosfato e vengono incorporati nella struttura a doppia elica del DNA durante la sua sintesi. (Figura 9)

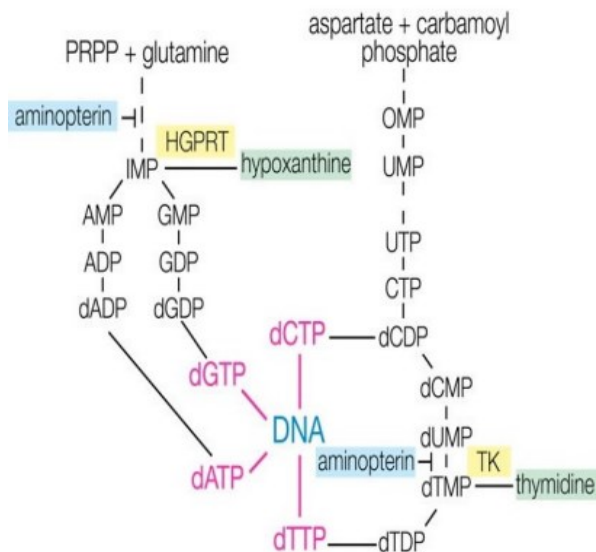


Figura 9 Pathways involved in nucleotide synthesis

L'instabilità genomica può derivare da diversi difetti che influenzano la replicazione del DNA, la riparazione, la funzione delle vie di checkpoint e la segregazione cromosomica.

Non solo i livelli complessivi di dNTP nella cellula influenzano la replicazione del DNA ma anche l'equilibrio tra i singoli dNTP è essenziale, poiché anomalie nel rapporto tra di essi possono portare a errori di incorporazione delle basi da parte delle DNA polimerasi. (20)

Una delle cause dell'accumulo di danni al DNA può essere la carenza di dNTP, dovuta ad una perturbazione del loro metabolismo, e si può incorrere ad un ostacolo nella progressione della fase S, attivazione del DDR, induzione dei pathway infiammatori e di uno stato di senescenza cellulare.

Inoltre, durante la senescenza le cellule sono sottoposte ad un maggiore stress ossidativo che può danneggiare il DNA (ad esempio per la presenza di ROS) che influenza negativamente la sintesi dei dNTP e la funzione degli enzimi coinvolti nella regolazione della sintesi. Se non è presente quindi un corretto equilibrio del pool di dNTP che garantisce la stabilità genomica e regola il ciclo cellulare e la risposta allo stress, si va incontro al deterioramento cellulare e all'ingresso in uno stato di senescenza.

Un altro elemento essenziale che serve a mantenere la stabilità genomica è la comunicazione tra mitocondrio e nucleo.

I mitocondri sono la centrale energetica della cellula e convertono i substrati in ATP. Inoltre, partecipano anche alla biosintesi di fosfolipidi, alla produzione di ROS, alla regolazione del calcio e alla risposta cellulare allo stress.

Se i mitocondri non svolgono correttamente le loro funzioni, la cellula può imbattersi in diverse problematiche: una tra queste è una disfunzione del metabolismo delle pirimidine al quale consegue la produzione di un pool non

bilanciato dei dNTP a livello cellulare. In particolare, viene intaccato il metabolismo del dTTP.

Ciò può essere spiegato dalla presenza nella cellula di una localizzazione non corretta degli enzimi coinvolti nel metabolismo delle pirimidine che porta a instabilità genomica da cui possono derivare errori nella replicazione, stress e possibili DSB. Tutto ciò inficia la senescenza cellulare.

Anche la distribuzione perinucleare dei mitocondri è importante poiché disponendosi in questo modo formano una barriera per l'ossigeno in modo che quest'ultimo non entri nei pori nucleari evitando così di intaccare il DNA e la stabilità del genoma.

Inoltre, i mitocondri hanno anche il compito di generare un segnale retrogrado al nucleo in grado di alterare l'espressione di alcuni geni e modificare le funzioni cellulari e il metabolismo. (21) Se tale localizzazione viene meno, la cellula avrà mitocondri disfunzionali e un maggior danno al DNA con rischio di senescenza.

Da studi precedenti, è stato osservato che diversi aspetti che sono importanti per la stabilità genomica e in particolare sul mantenimento del pool di dNTP potrebbero essere dipendenti dalla proteina MYTHO.

Infatti, per esempio, la deplezione di MYTHO nei mioblasti mostrava una riduzione dei contatti tra mitocondrio e nucleo e un'alterazione nella morfologia dei mitocondri. Questo, come descritto precedentemente, potrebbe influire sia sul danno al DNA che sulla sintesi delle pirimidine, processi in cui i mitocondri sono coinvolti.

Inoltre, da un'analisi proteomica è stato riscontrato che MYTHO (*C16orf70* nella [Figura 10](#)) interagisce con le proteine TK1 e CTPS1 coinvolte nella sintesi delle pirimidine e quindi nella produzione del pool di dNTP di una cellula.

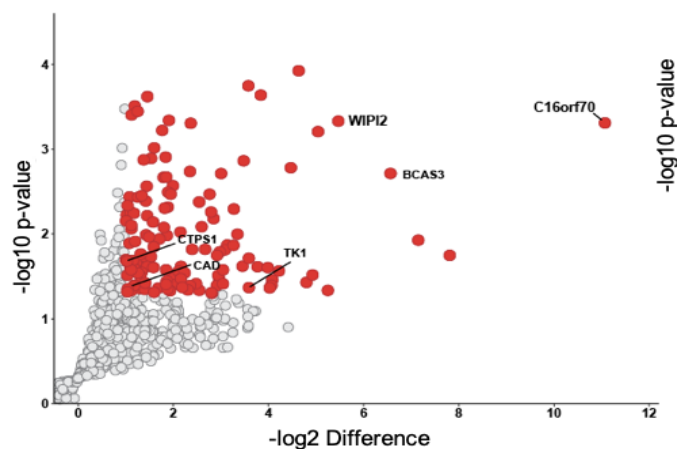


Figura 10 Analisi proteomica

La timidina chinasi (TK1) è un enzima citoplasmatico appartenente alla categoria delle chinasi, deputato al trasferimento di un gruppo fosfato sul suo substrato, la timidina. La TK1 svolge un ruolo cruciale nella generazione del precursore sintetico del DNA, la deossitimidina trifosfato (dTTP), catalizzando il trasferimento del fosfato dall'ATP alla deossitimidina (dT) nella cellula generando la deossitimidina monofosfato (dTMP). L'attività di TK1 è regolata in modo dipendente dal ciclo cellulare: si accumula durante la fase G₁, raggiunge livelli massimi nella fase S e viene degradata prima della divisione cellulare. È considerata un utile marcatore di proliferazione cellulare; tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che TK1 gioca un ruolo nella risposta al danno del DNA. Lo stress genotossico promuove un aumento dell'espressione e dell'attività della chinasi TK1, portando a una riduzione dell'apoptosi cellulare e a una maggiore efficienza nella riparazione del DNA. (22) L'enzima citosina trifosfato sintasi 1 o CTP sintasi 1 (CTPS1), invece, è responsabile della sintesi *de novo* del CTP. Catalizza il trasferimento ATP-dipendente dell'azoto dell'ammide della glutammina alla posizione C-4 dell'UTP per formare il CTP. (23)

Se la funzione di questi enzimi viene meno la cellula risulta sensibile a possibili danni al DNA e anche i sistemi di riparo non saranno efficienti.

L'interazione di MYTHO con questi due enzimi indica che potrebbe avere un ruolo nel mantenimento della disponibilità di un pool corretto di dNTP all'interno della cellula, essenziale per contrastare la senescenza cellulare.

Capitolo 2: Obiettivi

Il presente progetto di tesi si pone come obiettivo quello di studiare ed investigare sulle altre possibili funzioni cellulari della proteina MYTHO non ancora delineate. In particolare, il ruolo che potrebbe assumere nel processo complesso della senescenza cellulare, attraverso i seguenti esperimenti:

1. Analizzare se la riduzione della proteina MYTHO induce una variazione del pool di deossinucleosidi trifosfati (dNTP). Se non è presente un pool di dNTP corretto, la capacità di riparazione del DNA può essere compromessa, portando a un aumento del danno e potenzialmente alla senescenza cellulare.
L'esperimento è stato effettuato in cellule C2C12 (mioblasti e miotubi) ed è stata messa a punto la tecnica della downregolazione di *Mytho* tramite siRNA (short interfering RNA) specifici che riducono l'espressione del gene. In questo modo, si valuta se nelle cellule con il gene *Mytho* downregolato sono presenti variazioni a livello del pool di dNTP;
2. Identificare i partner molecolari di *Mytho*, tra i quali gli enzimi che sintetizzano le pirimidine, come Ctps1 e Tk1, che potrebbero influenzare il pool di dNTP delle cellule e, quindi, compromettere la possibilità di riparare il DNA, attraverso le due tecniche seguenti:
 - il saggio di immunoprecipitazione grazie al quale è possibile precipitare e, quindi, isolare proteine che interagiscono tra loro o che fanno parte di un complesso;
 - la tecnica NanoBiT® PPI Starter Systems (promega.com) che permette di corroborare le interazioni e determinare se sono dirette;(24)
3. Analizzare se il deficit di *Mytho* compromette il pathway di segnalazione e riparazione dei danni al DNA, che potrebbe comportare una precoce senescenza cellulare. Ciò è stato studiato in cellule C2C12 wild-type e *Mytho*-knockout trattate o non trattate con l'agente genotossico etoposide. Attraverso la tecnica del Western blot si possono quantificare proteine specifiche coinvolte in questa via e quindi constatare se è presente una differenza nella loro espressione o nello stato di fosforilazione;
4. Seguire la linea di topi *Mytho*-knockout e studiare se si riscontrano differenze a livello della composizione della massa corporea degli animali e a livello della loro sopravvivenza rispetto ai topi con un genotipo wild-type.

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1 Estrazione dei dNTP

Condizioni di coltura e downregolazione di Mytho con i siRNA

I siRNA (short interfering RNA) sono piccole molecole di RNA a doppio filamento capaci di silenziare geni specifici legandosi e degradando molecole di RNA messaggero (mRNA) specifiche inibendone la traduzione a proteina. Utilizzando questo sistema è stato possibile downregolare *Mytho*.

Per l'esperimento, sono state utilizzate cellule della linea C2C12 (mioblasti murini). (Figura 11)

I mioblasti sono stati seminati ottenendo 110000 cellule per piastra e in piastre rivestite di gelatina sono stati seminati altri mioblasti successivamente differenziati in miotubi.

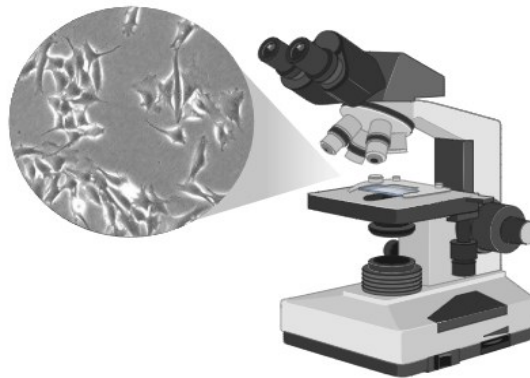


Figura 11 Aspetto delle cellule C2C12 osservate al microscopio

Il giorno dopo la semina, i mioblasti sono stati trasfettati con oligonucleotidi siRNA specifici per *Mytho* (Mytho-siRNA) e con oligonucleotidi siRNA non specifici, utilizzati come controllo negativo, alla concentrazione di 20 nM:

- in una piastra Petri di 50 mm, sono stati utilizzati 15 μ l di Mytho-siRNA (stock concentration 10 μ M, Cat# AM16708) aggiunti a 15 μ l di Opti-MEM™ Reduced-Serum Medium (Opti-MEM) (Figura 12) e 15 μ l di RNAiMax (per facilitare la trasfezione) aggiunti a 172.5 μ l di Opti-MEM.

Dopo 5 minuti, le due soluzioni sono state combinate e la soluzione è stata incubata a temperatura ambiente (RT) per 25 minuti.

- In una piastra Petri 50 mm, sono stati impiegati 3 μ l di silencer negative control siRNA (stock concentration 50 μ M) che è stato aggiunto a 172.5 μ l di Opti-MEM e 15 μ l di RNAiMax a 172.5 μ l di Opti-MEM.

Dopo 5 minuti, le due soluzioni sono state combinate e incubate a RT per 25 minuti.

Durante i 25 minuti, è stato cambiato il terreno delle cellule con circa 5 ml di terreno con 10% siero di bovino fetale (FBS), senza l'aggiunta di antibiotici. Poi sono state aggiunte le soluzioni preparate con i siRNA e le piastre sono state incubate a 37°C.

Il giorno successivo, sono stati aggiunti 4 ml di terreno di crescita e le piastre sono state riposte in incubatore per un altro giorno.

I mioblasti sono stati poi ritrasfettati impiegando un terreno di differenziamento, costituito da Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco™ DMEM, high glucose) (Figura 12) con aggiunta di 2% di horse serum e antibiotici, usando la procedura precedente. Durante i 25 minuti di incubazione è stato cambiato il terreno delle cellule con terreno di differenziamento. Poi sono state aggiunte le soluzioni preparate con i siRNA e le piastre sono state incubate a 37 gradi.



Figura 12 Terreno Opti-MEM a sinistra e DMEM a destra

Il giorno dopo, sono stati aggiunti 2 ml di terreno di differenziamento e le piastre sono state riposte in incubatore per un altro giorno. Questo passaggio è stato effettuato due volte.

È stato eseguito un lavaggio delle cellule con il versene e sono state staccate dalla piastra con tripsina diluita 1:5 e incubate 5 minuti a 37°C.

Una volta neutralizzata la tripsina e raccolte le cellule, sono state posizionate in un'altra piastra e incubate per 30 minuti a 37°C.

Infine, sono state raccolte le cellule sospese, maggiormente miotubi, mentre i mioblasti sono rimasti adesi alla piastra.

I passaggi di raccolta delle cellule sospese sono stati ripetuti e le cellule sospese sono state trasferite in Falcon da 15 ml.

Estrazione dei dNTP dai mioblasti (cellule adese) e da miotubi purificati

Tutte le procedure sperimentali sono state eseguite in stanza fredda a 4°C e in ghiaccio per evitare la degradazione dei dNTP:

1. lavare tre volte con tampone fosfato salino (Phosphate-buffered saline, PBS)

2. per ottenere i miotubi purificati tripsinizzare 5 minuti, staccare e raccogliere le cellule con il terreno di proliferazione (DMEM + FBS). Lasciare aderire le cellule alla piastra per 30 minuti a 37°C, poi raccogliere quelle rimaste sospese e trasferirle in Falcon da 15 ml. Ottenere un pellet di miotubi tramite centrifugazione a 4°C a 400g per 5 minuti, rimuovere il terreno, risospenderlo in PBS freddo e ripetere il lavaggio n. 2 volte.
3. Estrazione dei dNTP:
 - Per quanto riguarda i miotubi, risospenderli in 1 ml di metanolo al 60%, trasferire in tubi 2 ml (spinnare i tubi 15 ml per raccogliere i campioni) e incubare a 4°C per almeno un'ora o due, usando un rotatore o controllando che le cellule rimangano ben sospese;
 - Alle piastre con i mioblasti aggiungere 2 ml di MeOH 60% per 1-2 ore e raccogliere la soluzione in Eppendorf
4. ottenere un pellet centrifugando a 4°C a 19000g per 10 minuti e raccogliere il supernatante in tubi da 15 ml
5. bollire i tubi per 3 minuti e trasferire i campioni in tubi di vetro (spinnare i tubi per raccogliere i campioni) adatti per l'essiccazione sottovuoto.

I mioblasti rimasti sulla piastra dopo l'estrazione sono stati dissolti in 1 ml di una soluzione 0.3 M NaOH.

L'assorbanza a 260 nm della frazione di NaOH contenente le macromolecole cellulari rimaste dopo l'estrazione del pool è stata utilizzata come indice della massa cellulare.

Per quanto riguarda i miotubi purificati, il pellet ottenuto dal punto 4 dell'estrazione dei dNTP è stato usato per misurare la massa cellulare dalla quale è stata effettuata l'estrazione:

1. aggiungere 1 ml di 0.3 M NaOH dei tubi e incubare overnight a RT
2. il giorno dopo, incubare i tubi a 37°C per 15 minuti e risospendere vigorosamente
3. diluire i campioni appropriatamente e misurare l'assorbanza a 260 nm.

Dopo la messa a punto della tecnica di estrazione dei deossinucleotidi in mioblasti e miotubi, l'analisi e la quantificazione dei dNTP sono state effettuate in collaborazione con la Prof.ssa Chiara Rampazzo (Dipartimento di Biologia DiBio, Unipd).

3.2 Immunoprecipitazione

Per studiare l'interazione di MYTHO con le proteine identificate dall'analisi proteomica (CTPS1, TK1), è stato allestito un saggio di immunoprecipitazione.

Le cellule sono state trasfettate con un plasmide contenente la sequenza Myths-GFP (Green Fluorescent Protein), la cui proteina di fusione codificata legherà le biglie (beads) rivestite con delle "trap" che hanno il compito di legare la proteina GFP.

Quando ciò avviene, la proteina Myths-GFP trascina con sé le altre proteine che interagiscono con Myths, permettendo di isolare e analizzare i complessi proteici interagenti.

Come controllo negativo sono stati usati due plasmidi: uno contenente la sequenza della GFP utilizzato per analizzare l'interazione di Myths-Ctps1 e un altro con la sequenza di SNAP25-GFP utilizzato per analizzare l'interazione Myths-Tk1. Il plasmide SNAP25-GFP è stato scelto poiché, in esperimenti precedenti, l'anticorpo anti-TK1 si legava aspecificamente alla GFP e dato che i pesi molecolari di Tk1 e GFP sono simili (25kDa e 28kDa rispettivamente), il solo utilizzo della GFP non permetteva una corretta interpretazione del segnale.

Preparazione dei campioni

Per l'esperimento, sono state utilizzate cellule HEK (Human embryonic kidney 293 cells) coltivate con il terreno DMEM a cui vengono aggiunti: siero di bovino fetale (FBS) scomplementato a 55°C per un'ora e filtrato e gli antibiotici penicillina e streptomina per evitare la contaminazione.

Inizialmente, sono state preparate quattro piastre Petri da 10 cm secondo il protocollo seguente:

1. eseguire un coating della piastra con poli-D-lisina per facilitare l'adesione delle cellule
2. lavare con PBS
3. seminare 2750000 cellule per piastra e aggiungere terreno DMEM fino ad un volume di 10 ml
4. incubare overnight a 37°C.

È stato seguito il seguente protocollo di trasfezione delle cellule con i plasmidi, utilizzando il Lipofectamine 3000 Transfection kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific): (Figura 13)

1. preparare una Falcon in cui inserire 28 µg di plasmide MYTHO-GFP in 4.4 ml di Opti-MEM
2. preparare una Falcon in cui inserire 14 µg di plasmide SNAP25-GFP in 2.2 ml di Opti-MEM

3. preparare il controllo GFP con una Falcon in cui inserire 14 μg di plasmide in 2.2 ml di Opti-MEM
(in tutte e tre le soluzioni è stato aggiunto il reagente (P3000 Reagent) per aumentare l'efficienza di trasfezione)
4. in un'altra Falcon preparare la lipofectamina (Lipofectamine 3000) per i quattro campioni: 80 μl di lipofectamina e 7.2 ml di Opti-MEM. Questa sostanza ha la funzione di permettere ai plasmidi di attraversare la membrana cellulare e facilitare la trasfezione cellulare.
5. Incubare le soluzioni 5 minuti a temperatura ambiente (RT)
6. inserire la soluzione con la lipofectamina nelle Falcon contenenti i plasmidi
7. lasciare agire 20 minuti a RT
8. aggiungere il preparato con il plasmide e la lipofectamina nelle rispettive piastre
9. lasciare le piastre in incubatore overnight a 37°C.

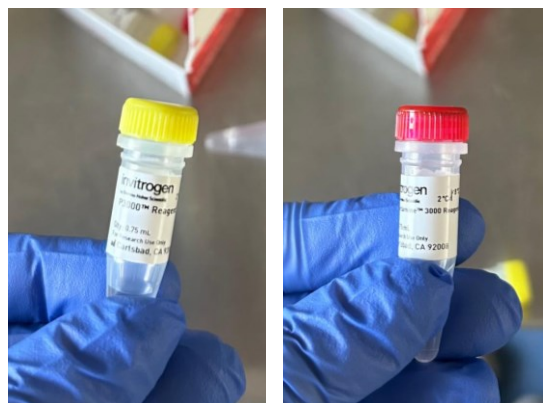


Figura 13 P3000 Reagent a sinistra e Lipofectamine 3000 a destra conservati a 4°C

Il giorno seguente, è stata controllata l'avvenuta trasfezione mediante il microscopio: era visibile il segnale proveniente dalla GFP dentro le cellule nelle piastre confermando che erano state trasfettate correttamente.

Prima del saggio di immunoprecipitazione vero e proprio, le cellule sono state sottoposte ad un periodo di starvation per due ore a 37°C mediante la sostituzione del terreno precedente con un terreno privo di nutrienti chiamato Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco™ HBSS).

Successivamente, sono stati effettuati tre lavaggi delle piastre con PBS, le quali sono state poste in ghiaccio e su di esse è stato sparso il buffer di lisi (contenente inibitori di proteasi e fosfatasi). Successivamente, è stato eseguito uno scraping e raccolto il volume ottenuto. I campioni sono stati poi incubati in ghiaccio per 5 minuti, centrifugati a 4°C a 13300 rpm per 10 minuti ed è stato raccolto il supernatante. Da quest'ultimo sono stati prelevati 50 μl che rappresentano gli

“input” ovvero la quantità totale di proteina presente nel campione originale prima del saggio.

Preparazione delle beads

Nella preparazione, le beads sono state lavate e risospese con il buffer di lisi cellulare preparato senza la presenza degli inibitori. Le eppendorf contenenti il buffer e le beads sono state ribaltate delicatamente più volte e centrifugate a 4°C a 5200 rpm per 2 minuti. Questi passaggi sono stati ripetuti 4 volte.

Infine, le beads lavate sono state risospese nel buffer di lisi in presenza degli inibitori di proteasi e fosfatasi.

Immunoprecipitazione

Il supernatante ottenuto dai campioni cellulari è stato aggiunto alle beads lavate precedentemente. Le provette Eppendorf pronte per il saggio sono state quindi incubate su un rotatore per tre ore a 4°C, permettendo alle proteine di legarsi alle beads durante questo periodo di tempo.

Successivamente, sono state estratte le proteine che si sono legate alle beads tramite il protocollo seguente:

1. centrifugare i campioni per due minuti
2. estrarre un certo volume dal supernatante che rappresenta l'“unbound” (UB). Questo campione contiene le proteine che non si sono legate alle biglie o che non hanno interagito con le proteine legate.
3. Togliere il restante volume di supernatante
4. aggiungere 500 µl di lysis buffer e mescolare delicatamente
5. centrifugare per due minuti
6. ripetere i passaggi n. 4 e 5 per tre volte
7. aggiungere 30 µl di una soluzione contenente ditiotreitolo (DTT), dodecil solfato di litio (LDS sample buffer 4X) e Nuclease-Free Water (NF H₂O)
8. porre i campioni nel termoblocco impostato a 95°C per 10 minuti.
In questo passaggio, la GFP si stacca dalle “trap”, i legami tra le proteine si rompono ed esse si denaturano.
9. Centrifugare i campioni per due minuti a 2500 rpm
10. prelevare il surnatante e porlo in nuove Eppendorf.

Esecuzione del Western blot

Per analizzare le proteine che hanno interagito con la proteina di interesse, è stato allestito un Western blot (metodo descritto dettagliatamente nel capitolo “3.4 Western blotting”) dove erano presenti gli input, gli unbound e i campioni. Degli

input e degli unbound è stato inserito l'1.5% del volume dei campioni e per prepararli alla corsa sono stati aggiunti LDS sample buffer 4X e DTT. Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana è stato effettuato utilizzando il kit di trasferimento Invitrogen (Figura 14), i legami aspecifici delle membrane sono stati bloccati con latte 5% in TBS-Tween20 (Tris, NaCl, acqua Milli-Q, 0.1% tween) e gli anticorpi anti-Tk1, Ctps1 e GFP sono stati preparati in latte 5% TBS-T alla concentrazione 1:1000 (Tabella 1).

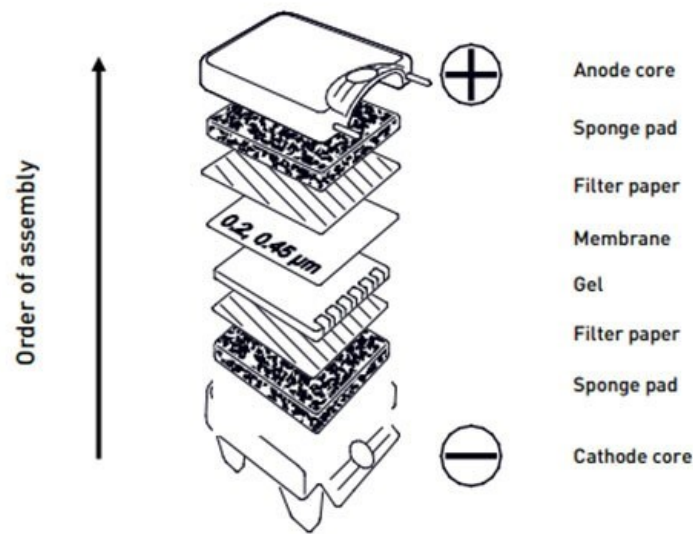


Figura 14 "Sandwich" per il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana

Antibody	dilution for WB	dilution in
TK1	1:1000	milk
CTPS1	1:1000	milk
GFP	1:1000	milk

Tabella 1 Anticorpi per il WB

3.3 NanoBiT® PPI Starter Systems

La tecnica NanoBiT® PPI Starter Systems consiste in un sistema a due subunità basato sulla nanoluciferasi (NanoLuc) e viene utilizzato per la rilevazione intracellulare delle interazioni proteina-proteina (PPI). Le subunità Large BiT (LgBiT; 17.6 kDa) e Small BiT (SmBiT; 11 amminoacidi) vengono fuse alle proteine di interesse e quando espresse, le PPI avvicinano le due subunità, permettendo loro di formare un enzima funzionale che genera un segnale luminescente. Poiché le due subunità hanno una affinità debole, il segnale è dato solamente quando si avvicinano grazie al contatto tra le proteine che si stanno studiando.

L'interazione proteica è possibile identificarla in cellule vive in tempo reale grazie ad un composto permeabile alla membrana cellulare contenente furimazina: il substrato dell'enzima NanoLuc (Figura 15).

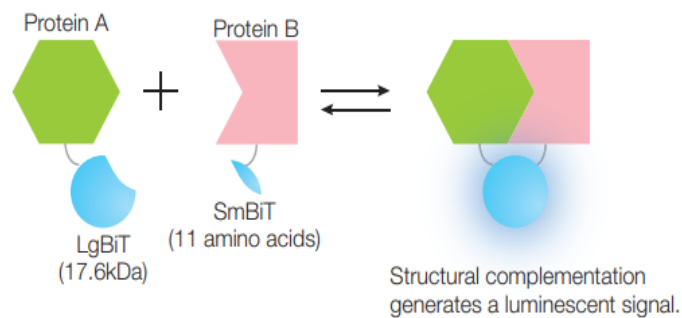


Figura 15 Principio della tecnica NanoBiT

Per mettere in atto la tecnica NanoBiT è necessario seguire diversi step:

1. clonaggio dei geni di interesse nei vettori contenenti le sequenze LgBiT e SmBiT forniti dal kit;
2. semina e trasfezione delle cellule con i plasmidi ottenuti;
3. aggiunta dei reagenti e lettura del segnale di luminescenza.

3.3.1 Clonaggio

Una volta scelte le proteine di interesse per le quali si vuole studiare l'interazione, in questo caso l'interazione di Mytho con Ctps1 e Tk1, si procede con un protocollo di clonaggio standard per introdurre il gene che codifica per queste proteine nei vettori forniti dal kit NanoBiT: pBiT1.1-C [TK/LgBiT], pBiT2.1-C [TK/SmBiT], pBiT1.1-N [TK/LgBiT] and pBiT2.1-N [TK/SmBiT].

I vettori contengono sequenze riconosciute da vari enzimi di restrizione che possono essere selezionati per il clonaggio e una sequenza genetica per la resistenza all'antibiotico ampicillina dei batteri.

Disegno dei primer

Per poter eseguire il saggio, sono stati disegnati i primer (forward e reverse) per il clonaggio del gene *Mytho* nel vettore in modo da ottenere la sequenza LgBiT al C-terminale di *Mytho*. SmBiT è stato clonato sia al C-terminale che all’N-terminale delle proteine codificate dai geni *Ctps1* e *Tk1*.

Nei primer è stata inserita la specifica sequenza di riconoscimento per gli enzimi di restrizione scelti per la digestione degli inserti e dei vettori.

Il protocollo di clonaggio seguito è stato il medesimo per tutti e tre i geni, modificando i primer utilizzati e gli enzimi di restrizione.

Sequenze dei primer:

MYTHO:

pBiT1.1-C [TK/LgBiT] Vector

MytCtermNheI_Fw: 5’-GCAAAGCTAGCATGCTGGACCTGGAGGTGGT-3’

MytCtermXho_Rev: 5’-TCACTGCTCGAGCCGGGCAGCTCTGCTGTTCTCA-3’

CTPS1:

pBiT2.1-C [TK/SmBiT] Vector

CTPS1CtermEcoRI_Fw: 5’-

CAGTAGAATTCATGAAGTACATTCTAGTTACTGG-3’

CTPS1CtermXhoI_Rv: 5’-

TCACTGCTCGAGCCGTCCTGACTTATTGATGGAA-3’

pBiT2.1-N [TK/SmBiT] Vector

CTPS1NtermXhoI_Fw: 5’-

TCACTGCTCGAGCGGTATGAAGTACATTCTAGTTACTGG 3’

CTPS1NtermEcorI_Rv: 5’-CAGTAGAATTCTCAGTCCTGACTTATTGATG-3’

TK1:

pBiT2.1-C [TK/SmBiT] Vector

TK1CtermNHEI_Fw: 5’-GATCTGCTAGCATGAGCTACATCAATCTGCCCA-3’

TK1CtermXhoI_Rv: 5’-

TCACTGCTCGAGCCGTTGGCAGAGTTGTATTGTAGGAC-3’

pBiT2.1-N [TK/SmBiT] Vector

TK1NtermXhoI_Fw: 5’-

TGGAGGCTCGAGCGGTATGAGCTACATCAATCTGCCCA-3’

TK1NtermNheI_Rev: 5’-

GATCTGCTAGCTCAGTTGGCAGAGTTGTATTGTAGGAC-3’

Preparazione dell'inserto

Tramite una PCR sono state amplificate le sequenze dei geni delle proteine di interesse con i seguenti materiali:

- Phusion Buffer = 12 μ l
- dNTPs 10 μ M = 1.2 μ l
- Phusion Hot Start DNA Polymerase = 0.6 μ l
- NF H₂O = 39.2 μ l
- Forward primer 10 μ M = 3 μ l
- Reverse primer 10 μ M = 3 μ l

Di questa soluzione 10 μ l di volume sono stati utilizzati come controllo negativo e al restante volume è stata aggiunta una quantità di DNA stampo (*Mytho*, *Ctps1* o *Tkl1*) di 30 ng.

Il programma di amplificazione con il termociclatore è il seguente:

- 98°C per 30 secondi

3 cicli:

- 98°C 10 sec
- 56°C 20 sec
- 72°C 35 sec

25 cicli:

- 98°C 10 sec
- * 20 sec
- 72°C 35 sec

Fine dei cicli:

- 72°C 5 min
- 4°C

Dove è indicato * è stata scelta una temperatura diversa basandosi sulla temperatura ottimale di annealing dei primers utilizzati.

Dopo la reazione, i campioni sono stati inseriti nei pozzetti di un gel di agarosio 1% in tampone TAE 1X a 100V per circa 30 minuti.

È stato seguito il protocollo PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) per estrarre l'inserto dal gel e quantificata la concentrazione di DNA ottenuto con lo strumento Nanodrop.

Digestione

Nello step della digestione dell'inserto e dei vettori sono stati impiegati gli enzimi di restrizione scelti in precedenza per ottenere le estremità compatibili necessarie alla successiva ligazione tra di essi (Tabella 2).

I campioni sono stati preparati e posti nel termociclatore per due ore a 37°C, successivamente è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio, sono state purificate le bande ottenute con il protocollo PCR Clean-up e quantificate con il Nanodrop.

Mytho	Insert Mytho	Vector LgBiT
		19 µl inserto
Enzima XhoI	1 µl	1 µl
Enzima NheI	1 µl	1 µl
CutSmart buffer	2.5 µl	2.5 µl
NF H2O	1.5 µl	18.5 µl

Ctps1	Insert Ctps1	Vector SmBiT
		19 µl inserto
Enzima XhoI	1 µl	1 µl
Enzima EcoRI	1 µl	1 µl
CutSmart buffer	2.5 µl	2.5 µl
NF H2O	1.5 µl	18.5 µl

Tk1	Insert Tk1	Vector SmBiT
		19 µl inserto
Enzima XhoI	1 µl	1 µl
Enzima NheI	1 µl	1 µl
CutSmart buffer	2.5 µl	2.5 µl
NF H2O	1.5 µl	18.5 µl

Tabella 2 Digestione di inserto e vettore

Ligazione

Tramite l'enzima DNA ligasi, sono state unite le estremità ottenute tramite gli enzimi di restrizione dallo step precedente della digestione.

Per aumentare l'efficienza della ligazione, sono state utilizzate quantità diverse di inserto e vettore. La quantità del vettore è stata fissata a 50 ng mentre quella dell'inserto è stata calcolata tenendo in considerazione il numero di coppie di basi (bp) presenti nei geni e nei vettori (Tabella 4). Il saggio è stato eseguito con due diversi rapporti tra vettore e inserto 1:3 e 1:5, per far sì che l'inserto fosse presente in quantità maggiore e per determinare quale delle due condizioni favorisse una maggiore crescita delle colonie batteriche, aumentando le probabilità di successo. Inoltre, sono stati preparati anche dei controlli negativi dove non è stato inserito l'inserto, per confermare che la ligazione sia avvenuta con l'introduzione dell'inserto nel vettore e non per eventuali "auto-ligazioni" del vettore (Tabella 3). I campioni preparati sono stati incubati 5 minuti a temperatura ambiente.

	Base pairs (bp)
pBiT2.1-N [TK/SmBiT]	3423
pBiT2.1-N [TK-SmBiT]	3417
pBiT1.1-C [TK-LgBiT]	3865
Mytho	1269
Ctps1	1776
Tk1	702

Tabella 3 Base pairs di vettori e inserti

Trasformazione

Come ultimo step, è stata eseguita la trasformazione dei batteri con i nuovi plasmidi attenendosi al protocollo seguente:

1. aggiungere 2.5 µl del preparato di ligazione a 25 µl di batteri
2. incubare 30 minuti in ghiaccio
3. porre i batteri a 42°C per 30 secondi e rimetterli in ghiaccio: in questo modo i batteri sono sottoposti ad uno shock termico che induce la formazione di pori nelle membrane cellulari, permettendo al plasmide di entrare nelle cellule
4. aggiungere 250 µl di SOC medium (Super Optimal broth with Catabolite repression), un terreno arricchito per batteri
5. porre i batteri a 37°C per un'ora in agitazione
6. spargere i batteri trasformati su piastre Petri ([Figura 16](#)) preparate con terreno per batteri contenente agar e l'antibiotico a cui i batteri hanno sviluppato la resistenza: l'ampicillina
7. incubare le piastre a 37°C overnight.

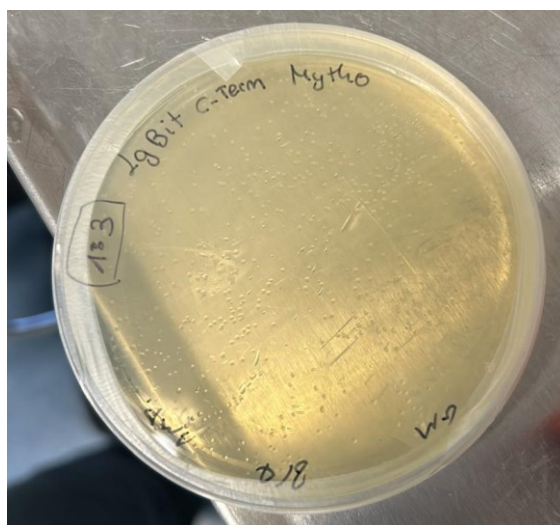


Figura 16 Piastra Petri in cui sono cresciute le colonie di batteri trasformati col vettore contenente LgBiT al C-term dell'inserto Mytho nella proporzione 1:3

Il giorno successivo, sono state prelevate alcune delle colonie cresciute sulle piastre (nei controlli negativi non erano cresciute), poste in 5 ml di terreno addizionato con ampicillina e incubate in agitazione overnight a 37°C.

Successivamente, è stata eseguita una Miniprep per estrarre il plasmide e con il materiale ottenuto sono stati preparati i campioni con gli enzimi di restrizione specifici per ogni proteina e posti nel termociclatore per due ore a 37°C con i seguenti materiali:

- 2 µl Cutsmart 10x
- 4 µl campione di DNA (plasmide)
- 0.5 µl enzima di restrizione 1
- 0.5 µl enzima di restrizione 2
- 13 µl di NF H₂O

I campioni sono stati inseriti in un gel di agarosio 1% in tampone TAE 1X per verificare la presenza dell'inserto nel vettore attraverso le bande ottenute.

3.3.2 Protocollo del saggio NanoBiT

Semina delle cellule

Le cellule HEK293 sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti caratterizzata da un materiale non trasparente ma bianco ([Figura 17](#)) in modo da garantire al meglio la resa del segnale di luminescenza al momento della lettura dei risultati.

Sono state seminate 300000 cellule/ml in terreno DMEM (con aggiunta di FBS, scomplementato e filtrato, e penicillina e streptomina) nei pozzetti centrali della piastra e quelli esterni rimasti vuoti sono stati riempiti con PBS sterile per minimizzare eventuali gradienti termici e l'evaporazione. La piastra è stata posta in incubatore per 24 ore a 37°C.

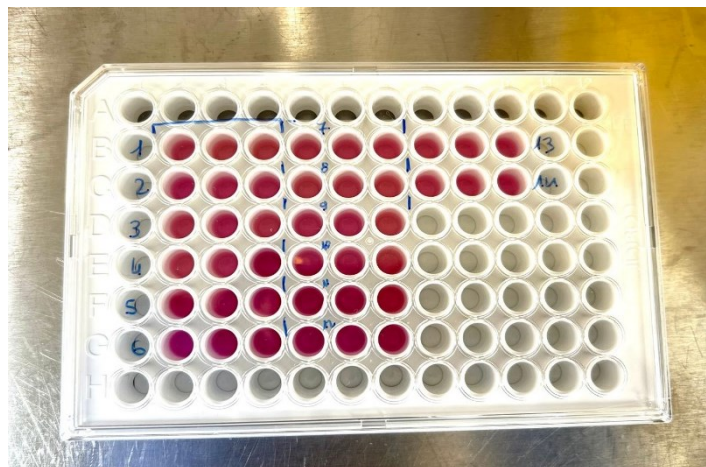


Figura 17 Piastra a 96 pozzetti in cui sono state seminate le cellule nei pozzetti centrali

Sono state studiate n. 14 condizioni (Figura 18) diverse elencate in seguito e l'esperimento è stato condotto in triplicato, contando un totale di 42 pozzetti. Tra i campioni troviamo un controllo non trasfettato, i controlli negativi, un controllo positivo, i diversi background (segnale di fondo non specifico) ovvero le subunità trasfettate singolarmente per osservare la luminescenza che emettono senza l'interazione e i campioni nei quali si vuole studiare l'interazione tra Mytho e gli enzimi Ctps1 e Tk1.

Il controllo negativo fornito dal kit è composto dalla subunità SmBiT chiamata HaloTag®-SmBiT che non interagisce con quella LgBiT, questa è stata combinata sia con Mytho C'-LgBiT sia con la porzione LgBiT del controllo positivo. Quest'ultimo è composto da due porzioni che interagiscono sicuramente chiamate SmBiT-PRKACA Control Vector e LgBiT-PRKAR2A Control Vector.

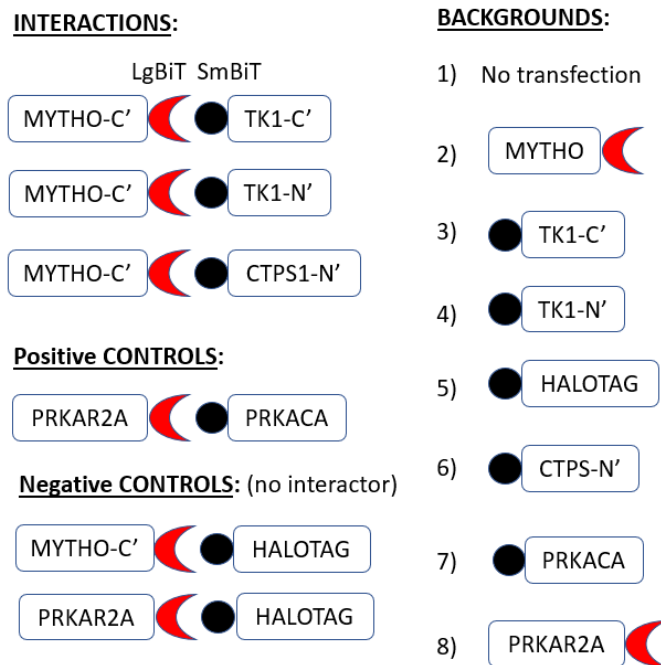


Figura 18 Tutte le combinazioni dei plasmidi trasfettate nelle cellule

Trasfezione delle cellule

Il giorno successivo, le cellule sono state trasfettate con i plasmidi preparati in precedenza.

La trasfezione prevedeva le seguenti quantità: 0.1 µg di DNA, 0.2 µl di reagente P3000TM e 0.15 µl di lipofectamina (Lipofectamine 3000 Reagent).

Inizialmente, sono stati preparati i tubini con il mix di trasfezione per ogni triplicato composto da 15 µl di Opti-MEM a cui sono stati aggiunti 0.6 µl del reagente P3000 e le Eppendorf sono state mescolate con il vortex per miscelare al meglio il reagente. Successivamente, è stato aggiunto il volume di plasmide calcolato per ottenere i 0.1 µg di DNA per pozzetto tranne nel controllo "non trasfettato".

La lipofectamina è stata preparata con 210 μl di Opti-MEM e 6.3 μl di lipofectamina e la soluzione è stata tenuta 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo questo tempo, sono stati aggiunti 15 μl di soluzione con la lipofectamina in ogni tubino e mantenuti 15 minuti a temperatura ambiente.

Ad ogni pozzetto della piastra è stato aspirato il terreno del giorno precedente e sono stati aggiunti 90 μl di terreno DMEM e 10 μl di soluzione di trasfezione per ottenere un volume totale di 100 μl . Infine, la piastra è stata posta in incubatore a 37°C per 24 ore.

Aggiunta dei reagenti

Trascorso il tempo necessario, è stata aspirata dai pozzetti la soluzione di trasfezione e sono stati aggiunti i reagenti per la reazione NanoBiT preparati con 1 volume di Nano-Glo® Live Cell Substrate contenente il substrato furimazina e 19 volumi di Nano-Glo® LCS Dilution Buffer, una soluzione acquosa che stabilizza la furimazina, ottenendo uno stock 5X.

In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μl di terreno DMEM e 25 μl della soluzione composta dai reagenti. (Figura 19)

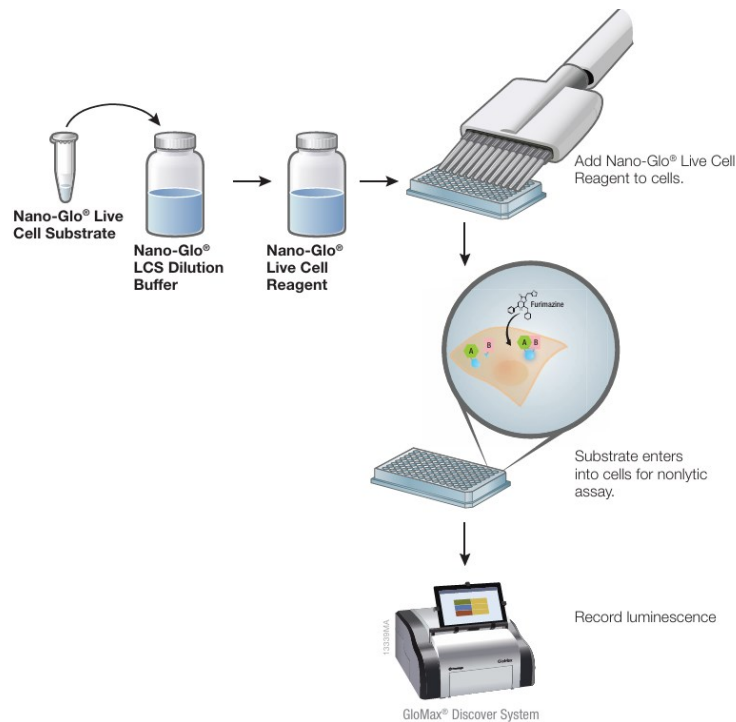


Figura 19 Passaggi seguiti per l'impiego dei reagenti e la lettura del segnale

Letture del segnale

Dopo l'aggiunta dei reagenti, la piastra è stata posta nel lettore di micropiastre Thermo Scientific Varioskan™ LUX (Figura 20) per l'acquisizione dei risultati impostato a 37°C e in modo tale da fornire ogni minuto una lettura del segnale per un tempo complessivo di 40 minuti.



Figura 20 Varioskan LUX Microplate Reader

3.4 Western blotting

Condizioni di coltura cellulare

Le cellule che sono state utilizzate per l'esperimento sono della linea C2C12 di tipo wild type e *Mytho*-knockout coltivate con il terreno DMEM a cui vengono aggiunti: siero di bovino fetale (FBS) scomplementato a 55°C per un'ora e filtrato e gli antibiotici penicillina e streptomina per evitare la contaminazione.

Alcune delle cellule sono state sottoposte ad un trattamento con etoposide, una sostanza che permette di creare un modello controllato di danno al DNA, utile per studiare i meccanismi di risposta al danno.

Preparazione dei campioni

Nell'esperimento sono state seminate 300000 cellule in piastre a sei pozzetti e incubate a 37°C con il terreno DMEM. Dopo 24 ore, le cellule sono state sottoposte al trattamento con etoposide (conservato a -20°C) alla concentrazione di 5 µM preparato in terreno DMEM per due ore in incubatore a 37°C prima della lisi cellulare. Per quanto riguarda i controlli non trattati, il terreno è stato preparato con DMSO (dimetilsolfossido) al posto dell'etoposide.

Successivamente, sono stati effettuati due lavaggi dei pozzetti con PBS (conservato a 4°C), le piastre sono state poi poste in ghiaccio ed è stato aggiunto il buffer di lisi (RIPA a basso contenuto di SDS e triton) per lisare le cellule, al quale sono stati addizionati prima dell'uso inibitori di proteasi e fosfatasi. Dopo un'ora di incubazione con il buffer in ghiaccio, è stato effettuato lo "scraping" dei pozzetti e raccolto il lisato cellulare.

I campioni sono stati poi centrifugati a 4°C per 15 minuti a 13300 rpm: in questo modo le cellule non lisate e i detriti cellulari formano un pellet sul fondo della provetta. È stato raccolto il supernatante dove si trovano le proteine che erano contenute nelle cellule.

Infine, è stato quantificato il contenuto proteico con lo strumento Qubit.

Dopo aver utilizzato questo protocollo, i risultati non sono stati del tutto soddisfacenti e un problema poteva essere la lisi incompleta delle cellule. Per questo motivo, sono state apportate delle variazioni utilizzando un differente buffer di lisi, contenente una maggiore concentrazione di SDS, e la sonicazione, al fine di migliorare la lisi delle cellule e dei nuclei:

- il buffer usato per la lisi era costituito da 2% SDS, 10% glicerolo e 60 mM Tris pH 6.8 SDS 2%
- dopo lo scraping dei pozzetti, il lisato è stato posto nel termoblocco a 70°C per 5 minuti.
- i campioni sono stati sottoposti a sonicazione per 5 secondi

- dopo la centrifuga e la raccolta del supernatante, il contenuto proteico è stato analizzato tramite il saggio dell'acido bicinconinico (BCA).

Esecuzione del Western blot

Per allestire la corsa elettroforetica, è stata valutata la quantità in ng di proteina da caricare nei pozzetti del gel, calcolato il volume in μl di campione da prelevare ed aggiunto buffer di lisi fino a raggiungere un volume di 14 μl ai quali vengono aggiunti 5 μl di LDS sample buffer 4X e 1 μl di DTT per denaturare le proteine e ridurre i ponti disolfuro rispettivamente, ottenendo un volume finale di 20 μl per campione. I campioni sono stati posti nel termoblocco a 70°C per 10 minuti ed infine caricati nei pozzetti in presenza di una marker.

Le condizioni del Western Blot hanno previsto l'utilizzo del tampone di corsa MES. La corsa elettroforetica è stata effettuata a 90 volt (V) per 10 minuti e 120 V per circa un'ora e mezza.

Le proteine sono state poi trasferite dal gel ad una membrana di nitrocellulosa utilizzando il sistema Invitrogen che prevede spugne, fogli di carta assorbente e la membrana imbevuti in un transfer buffer (20% metanolo, buffer Tris-glicina e acqua Milli-Q) e posti in un trans-blot a formare un "sandwich".

Il trasferimento è stato impostato a 20 V per un'ora e ne è stata valutata l'efficienza mediante il rosso Ponceau. (Figura 21)

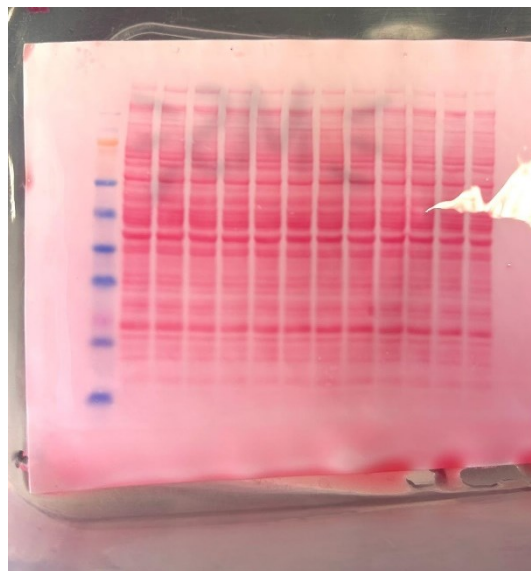


Figura 21 Colorazione della membrana con il rosso Ponceau

Come agente bloccante i legami aspecifici degli anticorpi alla membrana è stato utilizzato latte al 5% o BSA al 2% entrambi preparati in TBS-Tween20.

Dopo un'ora di bloccaggio, è stato incubato overnight a 4°C in agitazione l'anticorpo primario preparato in latte 5% o BSA 2% in TBS-Tween20. (Tabella 4)

Il giorno seguente sono stati effettuati tre lavaggi di 5 minuti ciascuno sempre in agitazione con TBS-Tween20 a temperatura ambiente (RT) e successivamente è stato incubato l'anticorpo secondario per un'ora in agitazione, preparato in latte 5% TBS-Tween20 mouse o rabbit a seconda dell'anticorpo primario utilizzato.

Prima della visualizzazione dei risultati, sono stati effettuati altri tre lavaggi con TBS-T in agitazione per 5 minuti a RT; dopodichè la membrana è stata esposta ai reagenti Enhanced Chemiluminescence (luminolo, H₂O₂, enhacer) per rilevare il segnale degli anticorpi che si sono legati mediante chemioluminescenza.

Nell'esecuzione del Western blot (WB) è stato impiegato un housekeeping (enzima gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi di 36kDa, GAPDH) per controllare che le variazioni del segnale non siano dovute a variazioni tecniche al momento del caricamento dei campioni.

Tuttavia, per normalizzare i campioni è stato utilizzato il segnale di H3 (Histone 3) poiché ha consentito di valutare meglio anche la riuscita della lisi cellulare.

Antibody	dilution for WB	dilution in
ATM	1:1000	milk
ATR	1:1000	milk
CHK1 (2G1D5)	1:1000	milk
Histone H3	1:5000	milk
P53	1:1000	milk
pATM (Ser1981)	1:1000	BSA
pATR (T1989)	1:1000	BSA
pCHK1 (S317)	1:1000	BSA
γH2AX (Ser139)	1:1000	BSA
pP53 (Ser15)	1:1000	BSA
GAPDH	1:10000	milk

Tabella 4 Anticorpi utilizzati per il WB: diluizione e mezzo di preparazione

3.5 Esperimenti *in vivo*

In laboratorio, è stata seguita la linea dei topi *Mytho*-knockout. Il genotipo degli animali è stato analizzato tramite il sequenziamento del gene estraendo il DNA dalle dita dei topi.

3.5.1 Protocollo di genotipizzazione

Il genotipo *Mytho*-KO è caratterizzato da un'inserzione di solamente un nucleotide che viene individuata tramite il sequenziamento del gene.

In primo luogo, i campioni da cui viene estratto il DNA si pongono in una eppendorf con 50 μ l di buffer di lisi per un'ora nel termoblocco a 57°C.

In secondo luogo, viene preparato il materiale per la MIX per la PCR (Tabella 5):

	50 μ l reaction (μ l)
5x Go Taq Buffer	10
25 mM MgCl ₂	4
dNTPs mix (10 mM)	1
Primer forward 5 μ M	5
Primer reverse 5 μ M	5
Go Taq DNA polymerase	0.25
DNA	2
NF water	22.75

Tabella 5 Materiale per il genotyping

48 μ l della MIX vengono inseriti in Eppendorf e si aggiungono i 2 μ l di campione di DNA ottenendo un volume totale di 50 μ l.

Una volta preparati i campioni, si pongono nel termociclatore per due ore impostando le temperature e i tempi seguendo il protocollo:

- 95°C 3 minuti

35 cicli:

- 95°C 1 minuto
- 65°C 1 minuto
- 72°C 1 minuto

Fine dei cicli:

- 72°C 10 minuti
- 4°C

Al completamento dei cicli, si purifica il DNA amplificato seguendo il protocollo PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL), successivamente si misura la sua quantità con il Nanodrop.

Una volta ottenuto il sequenziamento, si analizza la sequenza grazie a software specifici (es. Chromas) per valutare se il topo possiede un genotipo wild-type, eterozigote o knockout facendo riferimento alla Figura 22.

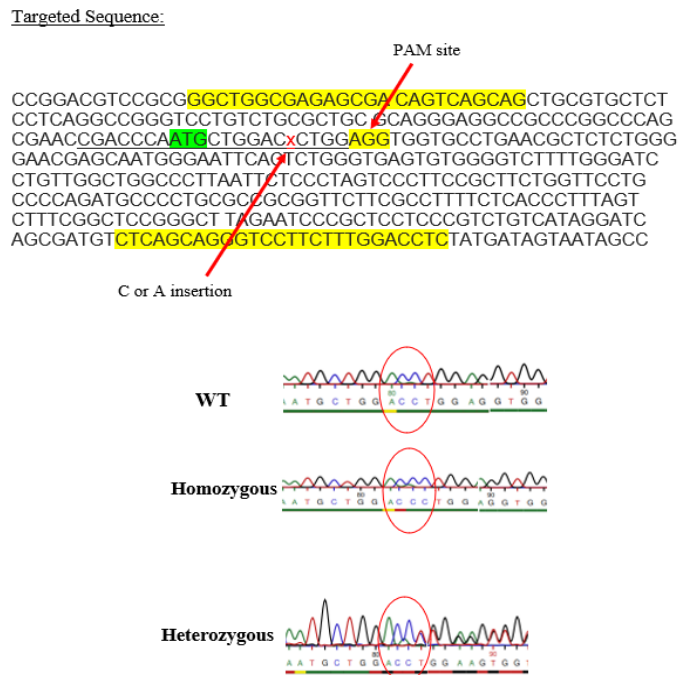


Figura 22 Genotyping

3.5.2 Echo-MRI

Sono state effettuate anche analisi del peso degli animali e della proporzione tra la massa magra e la massa grassa tramite lo strumento Echo-MRI (Figura 23): una risonanza magnetica che permette di analizzare la composizione corporea nell'animale vivo.

Il topo viene inserito in un tubo posto a sua volta all'interno dello strumento e dopo qualche secondo la macchina mostra i valori riferiti alla massa grassa, massa magra ed il contenuto in acqua.



Figura 23 Echo-MRI

Capitolo 4: Risultati e discussione

4.1 Alterazione del pool di dNTP nei miotubi con *Mytho* silenziato

Tra i diversi fattori che proteggono la cellula dalla senescenza vi è la stabilità genomica garantita da un corretto pool di dNTP disponibile per l'incorporazione delle basi durante la replicazione, per riparare danni al DNA, ecc...

La dimensione e composizione del pool di dNTP influenzano la stabilità genetica dei mammiferi poiché la fedeltà della sintesi del DNA richiede quantità adeguate e bilanciate di dNTP. La concentrazione di ciascuno di essi è il risultato della sua produzione, del suo utilizzo per la sintesi del DNA e della sua degradazione. (25)

La dimensione del pool di dNTP varia a seconda dello stato funzionale della cellula: si espande grazie all'aumento della sintesi degli enzimi coinvolti nella loro produzione appena prima della fase S quando la necessità dei dNTP è elevata mentre durante la quiescenza (permanente o reversibile) i dNTP sono necessari solamente per la replicazione mitocondriale e il riparo del DNA e il pool diventa più piccolo. In breve, le quantità di dNTP sono più alte nelle cellule che proliferano rispetto alle cellule che non si dividono più.

Seguendo questo principio, i miotubi contengono in generale una piccola riserva di dNTP e livelli bassi di tutti i deossinucleotidi al contrario dei mioblasti proliferanti che presentano quantità più elevate e proporzioni bilanciate tra i singoli dNTP. (26)

Per indagare se *Mytho* influisce sulle riserve di dNTP è stato condotto un esperimento su cellule C2C12: mioblasti e mioblasti differenziati a miotubi. Dalle cellule sono stati estratti e quantificati i deossinucleotidi per studiare se vi fossero differenze tra le loro quantità in cellule wild-type e quelle sottoposte al silenziamento di *Mytho* con i siRNA.

In collaborazione con la Prof.ssa Chiara Rampazzo, dopo l'estrazione sono stati quantificati dATP, dTTP, dGTP e dCTP grazie ad una tecnica basata sull'impiego di composti radioattivi e la loro assorbanza. Partendo da quest'ultima, tramite una retta di taratura con campioni a concentrazioni note, sono state ottenute le picomoli (pmol) dei dNTP presenti nel campione. I valori sono stati poi normalizzati con l'indice della massa cellulare ricavato tramite l'impiego dell'NaOH come spiegato in "Materiali e metodi".

Per quanto riguarda le condizioni sperimentali, nel caso dei mioblasti sono state analizzate n. 2 repliche dell'esperimento con tre campioni biologici ciascuna mentre per i miotubi è stata considerata n. 1 replica dell'esperimento con due campioni biologici ciascuna. In ogni campione biologico erano presenti le cellule di controllo e quelle trattate con i siRNA.

Nei primi due grafici mostrati in Figura 24 (Myotube e Myoblast) sono presenti i controlli nominati “scrambled” e i campioni nei quali era stato silenziato il gene *Mytho* con l’impiego dei siRNA specifici chiamati “*Mytho* siRNA”. Le concentrazioni dei dNTP estratti dalle cellule sono espresse in pmol/OD 260nm e indicate nell’asse y del grafico mentre sull’asse x sono presenti le diverse tipologie di dNTP.

Oltre alle quantità assolute dei deossinucleotidi è stata considerata anche la percentuale di ogni singolo dNTP sulla quantità di dNTP totali e sono stati ottenuti i grafici “Myotube %” e “Myoblast %”. Infatti, è importante considerare sia la quantità effettiva di questi sia un possibile squilibrio tra i singoli dNTP dovuto ad alterazioni delle funzioni cellulari.

Dai grafici che riguardano i miotubi, è possibile apprezzare delle differenze tra i campioni di controllo e i campioni *Mytho* siRNA infatti vi è una tendenza soprattutto da parte di dATP, dTTP e dCTP ad avere una concentrazione minore nelle cellule nelle quali il gene d’interesse era stato silenziato.

Per la statistica e la significatività dei risultati è tuttavia necessario aumentare il numero dei campioni.

Nel grafico che indica la percentuale (Myotube %) si nota anche uno squilibrio della percentuale delle varie tipologie di deossinucleotidi.

Per quanto riguarda i mioblasti invece non è riscontrabile la stessa condizione osservata nei miotubi, infatti, le differenze tra le cellule di controllo e quelle trattate con i siRNA della quantità dei dNTP non sono significative.

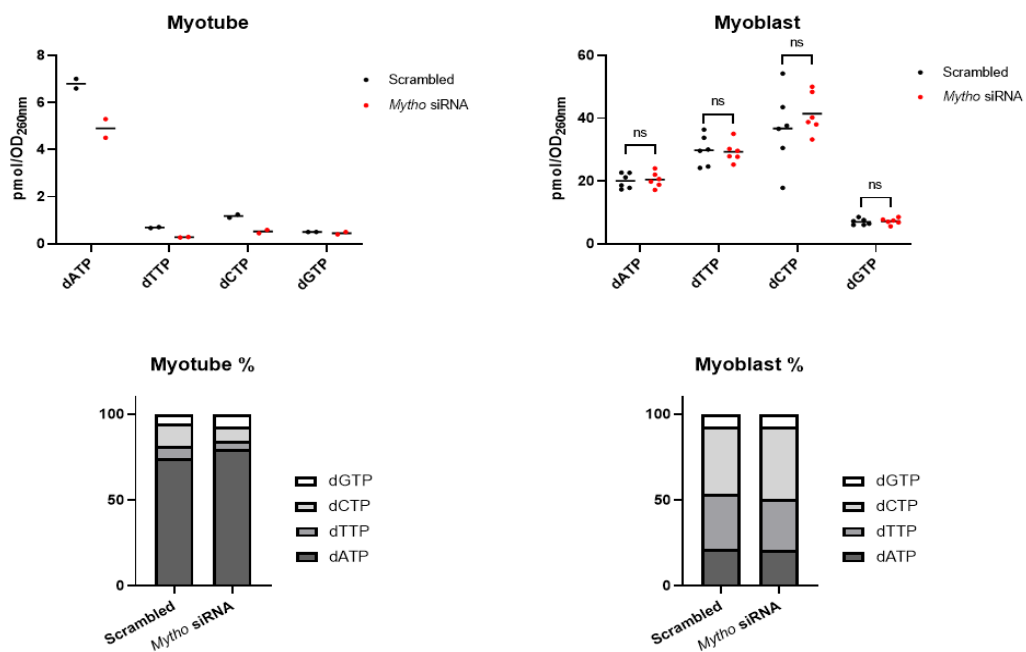


Figura 24 *Quantifica dei dNTP in cellule C2C12 (mioblasti e miotubi): nei primi grafici sono rappresentate le quantità in pmol/OD260nm e nei grafici in basso le percentuali dei vari dNTP sul totale presente nelle cellule*

Dall'esperimento preliminare si può ipotizzare che in cellule come i miotubi nelle quali c'è una riduzione della proteina Myh9 siano presenti una quantità minore e uno squilibrio dei dNTP. Questa condizione in cui si trova la cellula potrebbe influenzare negativamente le situazioni nelle quali è fondamentale la disponibilità dei dNTP come la riparazione di danni al DNA. Ciò può portare alla compromissione della stabilità genomica della cellula a cui consegue l'ingresso in una fase di senescenza.

È necessario in studi futuri confermare il dato aumentando la numerosità degli esperimenti e approfondendo se ciò si riscontra anche in altri tipi cellulari.

4.2 Mytho interagisce con gli enzimi che sintetizzano i dNTP: Ctps1 e Tk1

Secondo l'analisi proteomica in cui è stato effettuato il pull-down di MYTHO-GFP è stato osservato che interagisce con diverse proteine, tra le quali TK1 e CTPS1, due enzimi importanti per la formazione del dTTP e dCTP rispettivamente. La loro funzionalità consente alla cellula di formare un corredo di dNTP adeguato utile a garantire la stabilità del genoma.

È stato condotto un esperimento di immunoprecipitazione per confermare l'effettiva interazione tra questi due enzimi e Mytho tramite l'impiego di beads ricoperte di GFP-trap. Durante il saggio, la proteina Mytho-GFP si lega alle biglie portando con sé anche ai suoi interattori.

Se dovesse risultare un'interazione tra di essi, si porterebbe a concludere che Mytho influisca sulla sintesi delle pirimidine e quindi sulla stabilità del DNA.

Successivamente all'incubazione del lisato cellulare con le biglie, è stato eseguito un Western blot per analizzare le proteine co-precipitate con Mytho. I campioni ottenuti che sono stati utilizzati erano gli input, gli unbound e quelli che comprendevano le proteine legate alle "trap".

In seguito alla corsa sul gel, le proteine sono state trasferite sulle membrane e tramite l'utilizzo di anticorpi ne è stato rilevato il segnale attraverso la tecnica della chemiluminescenza.

Dall'interpretazione delle bande mostrate in [Figura 25 e 26](#), è stato possibile dedurre quanto segue:

- Il segnale corrispondente alla proteina **Ctps1** presente nella prima riga (indicata dalla freccia) è visibile a 78 kDa (peso molecolare (PM) della proteina) nella colonna corrispondente al pozzetto Mytho-GFP, mentre non è presente alla stessa altezza nella colonna GFP. Da questo si evince che durante l'esperimento di immunoprecipitazione la proteina Mytho-GFP si è legata alle beads e ha richiamato a sé anche Ctps1, la quale interagiva con Mytho.

Nel campione contenente solamente il plasmide GFP, invece, la proteina Ctps1 non si è legata alle trap infatti la banda in questo caso non è visibile. Per completare l'esperimento è necessario interpretare anche altri segnali che confermano l'avvenuta precipitazione delle proteine considerate.

Il segnale ottenuto con l'anticorpo anti-GFP ha mostrato una banda nella colonna Mytho-GFP al peso molecolare di 77 kDa (28 kDa PM di GFP + 49 kDa PM di Mytho; nei Western blot il segnale di Mytho è visibile a 49 kDa) convalidando che la proteina Mytho-GFP è precipitata insieme alle beads poiché la GFP si è legata alle trap.

Nell'ultima riga dell'immagine possiamo osservare il segnale della GFP molto evidente nella prima colonna che corrisponde alla proteina che si è legata alle GFP-trap.

Gli input rappresentano l'1.5% del lisato totale e servono sia per confermare che la banda di Ctps1 immunoprecipitata (IP) sia alla stessa altezza dalla banda che si vede nell'input sia per normalizzare la proteina immunoprecipitata con la quantità di Ctps1 di partenza: $(\text{ratio del segnale IP/Input} \times 100) = \% \text{ di binding}$

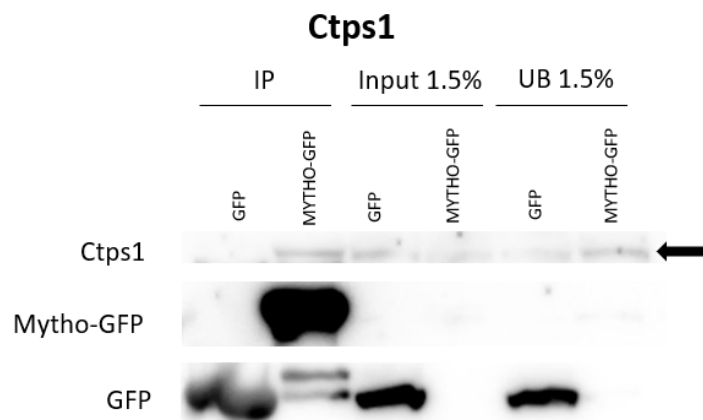


Figura 25 Membrana che mostra la co-precipitazione dell'enzima Ctps1 con Myths

- Analogamente, il segnale di **Tk1** a 26 kDa è visibile nella colonna Myths-GFP ma assente in quella del campione SNAP25-GFP (riga indicata dalla freccia). In questo caso la presenza/assenza della banda della proteina precipitata è ancora più apprezzabile.

Confrontando i risultati, si può concludere che la proteina Tk1 è co-precipitata con MYTHO, implicando una loro interazione.

Nelle altre due righe, si possono osservare le bande a 77 kDa per quanto riguarda Myths-GFP e a 53 kDa corrispondente a SNAP25-GFP (28 kDa PM GFP + 25 kDa PM SNAP25), ottenute con l'anticorpo anti-GFP. Il segnale di entrambi i campioni attesta che le proteine si sono legate alle beads ricoperte dalle trap anti-GFP.

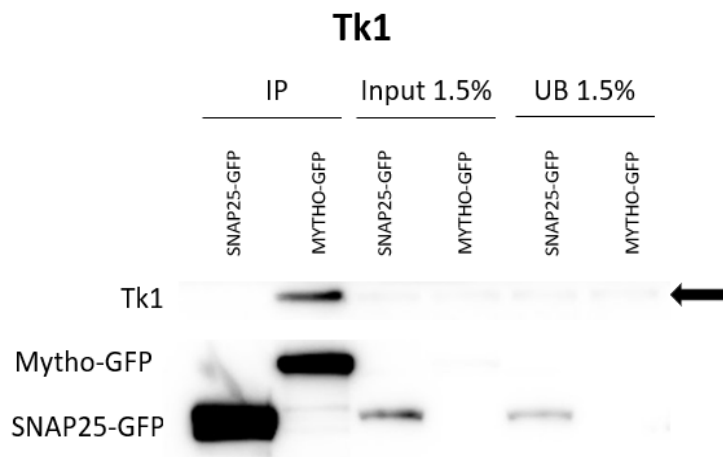


Figura 26 Membrana che mostra la co-precipitazione dell'enzima Tk1 con Mytho

L'esperimento di immunoprecipitazione eseguito ha quindi confermato le previsioni derivate dall'analisi proteomica ovvero Mytho interagisce con Ctps1 e Tk1, suggerendo un suo ruolo nella sintesi delle pirimidine.

Infatti, le proteine spesso non funzionano come sostanze singole ma piuttosto come componenti che collaborano in modo sinergico in una rete dinamica. (27)

Le interazioni proteina-proteina sono cruciali in molti processi biologici nelle cellule e quella rilevata in questo saggio potrebbe indicare che Mytho eserciti qualche tipo di azione, effetto o influenza su questi due enzimi. Se ciò avviene, quando Mytho è poco presente, può essere indebolita la via di formazione dei dNTP nella quale Ctps1 e Tk1 sono coinvolti.

La tecnica dell'immunoprecipitazione utilizzata non è però specifica per l'interazione esclusiva delle due proteine di interesse ma esse potrebbero essere legate insieme indirettamente grazie alla mediazione di altre molecole oppure tramite la formazione di complessi.

Per comprendere se l'interazione è diretta è necessario l'impiego di altre metodologie che permettono di scoprire la modalità di contatto tra di esse.

4.3 Mytho interagisce in modo diretto con Tk1

A conferma dei dati raccolti dalla proteomica e dall'immunoprecipitazione, è stato effettuato il saggio NanoBiT per studiare se il contatto visto tramite l'immunoprecipitazione tra Mytho e gli enzimi Ctps1 e Tk1 è diretto. Questi enzimi infatti sono importanti per la sintesi del dCTP e dTTP e garantiscono quindi che nella cellula sia presente il pool di dNTP adeguato, importante per l'integrità del genoma.

La tecnica consiste nel clonaggio delle proteine di interesse nei vettori contenenti rispettivamente le due porzioni dell'enzima NanoLuc (nanoluciferasi). Successivamente, si trasfettano le cellule (HEK293) con i plasmidi ottenuti e infine vengono impiegati i reagenti della reazione contenenti il substrato dell'enzima (furimazina).

Se le due proteine interagiscono, infatti, si forma l'enzima funzionante composto dalle due porzioni che reagendo con il substrato emette un segnale di luminescenza. La tecnica NanoBiT permette di studiare l'interazione diretta anche se debole e transitoria tra due proteine poiché rileva in tempo reale anche livelli bassi del segnale di luminescenza espresso in Unità di Luce Relativa (RLU).

È infatti progettato in modo da differenziare il segnale di fondo (background), quindi non specifico e il segnale vero e proprio di contatto anche se a bassa affinità.

4.3.1 Risultati del clonaggio

Clonaggio del gene Mytho

I plasmidi ottenuti dalle colonie dei batteri trasformati sono stati sottoposti al taglio da parte degli enzimi di restrizione e inseriti in un gel di agarosio. Dall'analisi delle bande nella [Figura 27](#) se ne possono osservare due per ciascun pozzetto: una corrispondente alle paia di basi presenti nella sequenza di *Mytho* e una, più alta, che corrisponde alla sequenza del vettore contenente LgBiT. La presenza di questi due segnali indica che gli enzimi hanno digerito nel punto specifico la sequenza e hanno separato l'inserto dal vettore.

Inoltre, il campione più a destra (c-) rappresenta il controllo negativo dove, al momento della preparazione dei campioni, non erano stati inseriti tra i reagenti gli enzimi di restrizione e infatti la sequenza in questo caso non è stata digerita.

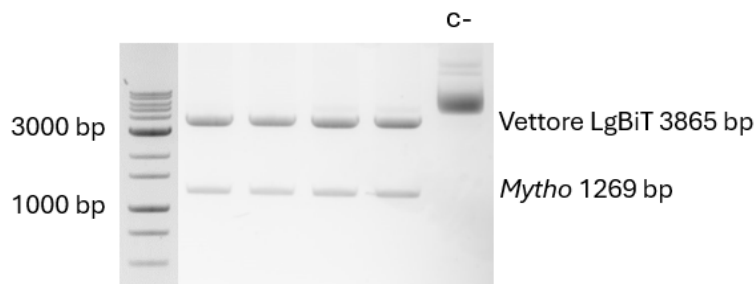


Figura 27 Colonie contenenti l'inserto *Mytho* nel vettore *LgBiT* clonato al C-terminale

Per un'ulteriore conferma è importante sequenziare il gene *Mytho* al fine di verificare il suo inserimento accurato all'interno del vettore e la sequenza registrata è risultata corretta.

Verifica della sequenza dell'inserto "Mytho"

```

CCTCCCCTCATAAACAAGTTCCGTCCAAGTGAACGACTACTTTTTAACTATTTTAC
TCTCGGAGTGGACATCCTGTTTGATGCAAATACACACAAAGTGAAGAAGTTTGCCTG
CATACCAATTACCCTGGGCATTATAATTTTAACTTTACCACCGCTGTGAGTTCAAGA
TCCCCTGGCCATAAAGAAAGAAAATGCAGGTGGTCAGACTGAAATATGCACAACCT
ACAGCAAGTGGGACAGCATCCAGGAGCTTCTGGGCCATCCTGTGGAGAAGCCTGTTG
TCTTGACACAGGTCCTCATCCCCAAATAACACCAATCCGTTTGCTCCACATTCTGCTT
TGGTCTTCAGCGGATGATCTTTGAGGTCATGCAGAACAACCACATTGCCTCAGTGACC
CTGTATGGCCCCCCCAGGCCTGGTGCCACCTGAGAACAGCAGAGCTGCCCGGCTCG
AGCGGTGGTGGCGGGAGCGGAGGTGGAGGGTCGTCAGGTGTCTTCACACTCGAAGAT
TTCGTTGGGGACTGGGAACAGACAGCCGCCTACAACCTGGACCAAGTCCTTGAACAG
GGAGGTGTGTCCAGTTTGCTGCAGAATCTCGCCGTGTCCGTAACCTCCGATCCAAAGGA
TTGTCCGGAGCGGTGAAAATGCCCTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCCTATGA
AGGTCTGAGCGCCGACCAATGGCCCAGATCGAAGAGGTGTTTAAAGGTGGTGTACCC
TGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCCCTATGGCACACTGGTAATCGACGGG
GTTACGCCGAACATGCTGAACTATTCGGACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTCC
ACGGCAAAAAGATCACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACG
AGCGCCTGATACCCCCGACGGCTCCATGCTGTTCCGAGTAACCATCAACAGCTAA

```

Mytho è in frame con *LgBiT* al suo C-terminale

Parte finale della sequenza di *Mytho*

Sequenza di *LgBiT*

Clonaggio di *Ctps1* e *Tk1* e verifica dei sequenziamenti

Anche per le altre due proteine, *Ctps1* e *Tk1*, è stato eseguito il clonaggio dei geni corrispondenti, in questo caso nel vettore contenente *SmBiT*. Entrambi i geni sono stati clonati in modo da ottenere la sequenza *SmBiT* sia al C-terminale che all'N-terminale delle proteine.

È stata effettuato un esperimento di verifica dei plasmidi ottenuti dai batteri su gel di agarosio e sono state esaminate le bande (esempio in [Figura 28](#)).

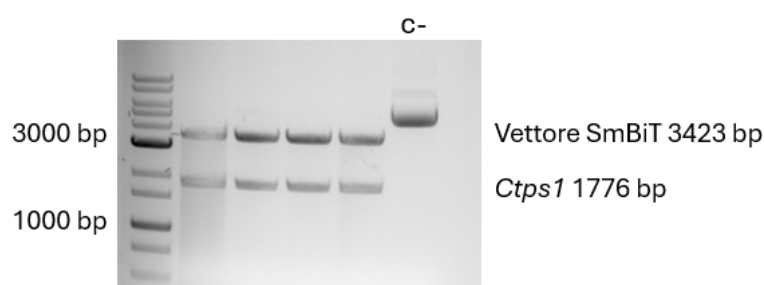


Figura 28 Colonie contenenti l'inserto Ctps1 nel vettore SmBiT clonato al C-terminale della proteina Ctps1 (c-= controllo negativo senza enzimi di restrizione)

Infine, sono stati sequenziati i due geni per verificare il loro inserimento nel vettore e tutte le sequenze sono risultate corrette in entrambe le opzioni del clonaggio (C-terminale e N-terminale delle proteine codificate).

Ctps1 N'-SmBiT:

```

ATGGTGACCGGCTACCGGCTGTTTCGAGGAGATTCTCGGGAGTCCGGTGGTGGCGGG
AGCGGAGGTGGAGGCTCGAGCGGTATGAAGTACATTCTAGTTACTGGTGGTGTATAT
CAGGAATTGAAAAGGAGTCATCGCCAGCAGTGTGGGCACAATACTAAATCATGTG
GCTTACATGTAACATCAATTAAGATTGACCCCTATATTAACATTGATGCAGGAACATT
CTCTCCTTATGAACATGGAGAAGTCTTTGTGCTGGATGATGGTGGAGAAGTTGACCTT
GACTTGGGAAATTATGAGCGATTCTTGATATCCGTCTCACCAAGGACAATAATCTGA
CCACAGGGAAGATATAACCAGTACGTCATTAACAAGGAGCGCAAAGGGGATTACTTAG
GGAAGACTGTCCAGGTTGTCCCTCACATCACTGATGCAATCCAAGAGTGGGTGATGA
GACAGGCATTAATACCCGTAGACGAAGATGGCTTAGAACCTCAAGTGTGTGTTATTG
AGCTTGGTGGCACAGTGGGAGACATTGAAAGCATGCCCTTCATTGAGGCCTTCCGCCA
GTTCCAGTTCAAGGTCAAGAGGGAAAACCTTTTGTAAATCCATGTCAGTCTGGTTCCT
CAGCCAAGTTCAACAGGGGAACAGAAGACAAAACCCACCCAGAACAGTGTTCGGGA
ACTTAGAGGACTCGGGCTTTCTCCAGACTTAGTGGTGTGCAGGTGCTCAAATCCTCTT
GACACATCTGTGAAAGAGAAAATATCAATGTTTTGCCATGTGGAACCTGAACAAGTG
ATCTGTGTTTCATGATGTTTCATCCATCTACCGGGTACCCTTGTTGTTAGAAGAGCAAG
GGTGTGACTACTTTCTCGGAGACTTGACCTTCCTATTGAGAGACAGTCACGAAA
GATGCTGATGAAATGGAAGAGATGGCAGACAGGTATGACCGCTTGCTGGAGACCTG
CTCGATCGCTCTTGTTGGGCAAATACACAAATTCTCAGACTCGTACGCCTCTGTCATT
AAAGCGCTAGAGCACTCTGCATTGGCCATTAACCACAAGCTGGAGATCAAGTACATC
GATCCACAGACCTGGAGCCAAGTACCCTGCAGGAAGAGCCTGTGCGCTACCATGAG
GCATGGCAGAAGCTCTGCAGTGTCTATGGAGTGTGGTTCAGGAGGATTGGTGTTC
GGGGAACAGAAGGAAAAATTCAAGCAATTGCTTGGGCTCGGAAACAGAAGAAGCCT
TTTTTGGGTGTGTGCTTAGGAATGCAGTAGCAGTGGTAGAATTTTCAAGAAATGTGC
TGGGATGGCAAGATGCCAATTCTACAGAGTTTGACCCCAAGACTAGTCACCCTGTGGT
TATAGACATGCCAGAACATAACCCTGGGCAAATGGGTGGAACCATGAGGCTGGGCAA
GAGGAGAACCCTGTTCCAGACCAAGAACCTCAGTCATGAGGAAACTCTATGGAGACAC
AGACTACTTGAAGAAAGGCACCGCCACCCGATTTGAGGTGAACCCAGTCCTGAAAAA
GTGCTTGAAGAGCAAGGCTTGAAGTTCGTTGGCCAAGATGTGGAAGCGCAGAGGAT
GGAGATCGTGGAGTTGGAAGATCATCCATTTTTTGTGGAGTGCAGTATCACCCCGAG
TTCCTGTCCAGGCCTATCAAGCCCTCCCCACCCTACTTTGGCCTCCTCTGGCCTCTGT
GGGGCGGCTCCACATTACCTTCAGAAAGGTTGCCGGCTCTCACCCAGGGACACTTAC
AGTGACAGAAGCGGGAGCAGCTCCCCGACTCGGAAATCACTGAACTCAAGTTCCA
TCAATAAGTCAGGACTGA

```

SmBiT è in frame con Ctps1 al suo N-terminale

Sequenza di *Ctps1*

Sequenza di SmBiT

Ctps1 C'-SmBiT:

ATGAAGTACATTCTAGTTACTGGTGGTGTATATCAGGAATTGGAAAAGGAGTCATCG
CCAGCAGTGTGGGCACAATACTTAAATCATGTGGCTTACATGTAACATCAATTAAGAT
TGACCCCTATATTAACATTGATGCAGGAACATTCTCTCCTTATGAACATGGAGAAGTC
ITTGTGCTGGATGATGGTGGAGAAGTTGACCTTGACTTGGGAAATTATGAGCGATTCC
TTGATATCCGTCTACCAAGGACAATAATCTGACCACAGGGAAGATATAACAGTACG
TCATTAACAAGGAGCGCAAAGGGGATTACTTAGGGAAGACTGTCCAGGTTGTCCCTC
ACATCACTGATGCAATCCAAGAGTGGGTGATGAGACAGGCATTAATACCCGTAGACG
AAGATGGCTTAGAACCTCAAGTGTGTGTTATTGAGCTTGGTGGCACAGTGGGAGACA
TTGAAAGCATGCCCTTCATTGAGGCCTTCCGCCAGTTCAGTTCAAGGTCAAGAGGGA
AACTTTTGTAAATCCATGTCAGTCTGGTTCCTCAGCCAAGTTCAACAGGGGAACAG
AAGACAAAACCCACCCAGAACAGTGTTCGGGAACCTTAGAGGACTCGGGCTTCTCCA
GACTTAGTGGTGTGCAGGTGCTCAAATCCTCTTGACACATCTGTGAAAGAGAAAATAT
CAATGTTTTGCCATGTGGAACCTGAACAAGTGATCTGTGTTTCATGATGTTTCATCCATC
TACCGGGTACCCTTGTTGTTAGAAGAGCAAGGGGTTGTAGACTACTTCTTCGGAGAC
TTGACCTTCTATTGAGAGACAGTCACGAAAGATGCTGATGAAATGGAAAGAGATGG
CAGACAGGTATGACCGCTTGCTGGAGACCTGCTCGATCGCTCTTGTGGGCAAATACAC
CAAATTCTCAGACTCGTACGCCTCTGTCATTAAGCGCTAGAGCACTCTGCATTGGCC
ATTAACCACAAGCTGGAGATCAAGTACATCGATTCCACAGACCTGGAGCCAAGTACC
CTGCAGGAAGAGCCTGTGCGCTACCATGAGGCATGGCAGAAGCTCTGCAGTGCTCAT
GGAGTGCTGGTTCAGGAGGATTTGGTGTTCGGGGAACAGAAGGAAAAATTCAAGCA
ATTGCTTGGGCTCGGAAACAGAAGAAGCCTTTTTTGGGTGTGTGCTTAGGAATGCAGC
TAGCAGTGGTAGAATTTCAAGAAATGTGCTGGGATGGCAAGATGCCAATTCTACAG
AGTTTGACCCCAAGACTAGTCACCCTGTGGTTATAGACATGCCAGAACATAACCCTGG
GCAAATGGGTGGAACCATGAGGCTGGGCAAGAGGAGAACCCTGTTCCAGACCAAGA
ACTCAGTCATGAGGAACTCTATGGAGACACAGACTACTTGAAGAAAGGCACCGCC
ACCGATTTGAGGTGAACCCAGTCCTGAAAAAGTGCTTGAAGAGCAAGGCTTGAAGT
TCGTTGGCCAAGATGTGGAAGGCGAGAGGATGGAGATCGTGGAGTTGGAAGATCATC
CATTTTTGTTGGAGTGCAGTATACCCCGAGTTCCTGTCCAGGCCTATCAAGCCCTCC
CCACCCTACTTTGGCCTCCTCCTGGCCTCTGTGGGGCGGCTCCCACATTACCTTCAGAA
AGGTTGCCGCTCTACCCAGGGACACTTACAGTGACAGAAGCGGGAGCAGCTCCCC
CGACTCGGAAATCACTGAACTCAAGTTTCCATCAATAAGTCAGGACGGCTCGAGCGG
TGGTGGCGGGAGCGGAGGTGGAGGGTCGTCAGGTGTGACCGGCTACCGGCTGTTCGA
GGAGATTCTGTAA

SmBiT è in frame con Ctps1 al suo C-terminale

Sequenza di *Ctps1*

Sequenza di SmBiT

Tk1 N'-SmBiT:

```
ATGGTGACCGGCTACCGGCTGTTTCGAGGAGATTCTCGGGAGTTCCGGTGGTGGCGGG
AGCGGAGGTGGAGGCTCGAGCGGTATGAGCTACATCAATCTGCCACCGTGCTGCC
AGTCCCCCAGCAAGACTCGGGGGCAGATTCAGGTGATTCTCGGGCCCATGTTCTCAG
GGAAAAGCACAGAGCTGATGAGAAGAGTCCGGCGCTTCCAGATCGCCAGTACAAGT
GCCTGGTCATCAAGTATGCCAAAGACACGCGCTATAGCAACAGCTTCTCCACACATG
ATCGGAACACCATGGACGCATTGCCAGCCTGCATGCTCCGCGATGTGACCCAGGAGT
CCTTGGGTGTGGCCGTCATTGGCATCGATGAGGGCAGTTTTTTCCTGACATTGTGGA
TTTCTGTGAAATGATGGCCAACGAGGGCAAGACAGTAATTGTGGCAGCGCTGGATGG
GACCTCCAGAGGAAGGCTTTCGGCAGCATCTTGAACCTGGTGCCCTGGCGGAGAG
TGTGGTGAAGCTCACCGCTGTGTGCATGGAGTGCTTCCGAGAAGCTGCCTACACGAA
GAGGCTGGGCCTGGAGAAAGAGGTGGAGGTGATTGGCGGAGCCGACAAGTATCACTC
CGTGTGCCGCTGTGCTACTTTAAGAAGTCTTCCAGCCAGACTGCTGGCTCAGACAAC
AAGAAGTGTCTGGTGTGGGGCAGCCGGGAGAGGCCTTGGTTGTCAGGAAGCTCTTT
GCCTCTCAGCAAGTCTACAATACTGCCAAC TGA
```

SmBiT è in frame con Tk1 al suo N-terminale

Sequenza di *Tk1*

Sequenza di SmBiT

Tk1 C'-SmBiT:

```
ATGAGCTACATCAATCTGCCACCGTGCTGCCAGCTCCCCCAGCAAGACTCGGGGGC
AGATTCAGGTGATTCTCGGGCCCATGTTCTCAGGGAAAAGCACAGAGCTGATGAGAA
GAGTCCGGCGCTTCCAGATCGCCAGTACAAGTGCCTGGTCATCAAGTATGCCAAAG
ACACGCGCTATAGCAACAGCTTCTCCACACATGATCGGAACACCATGGACGCATTGC
CAGCCTGCATGCTCCGCGATGTGACCCAGGAGTCCTTGGGTGTGGCCGTCATTGGCAT
CGATGAGGGGCAGTTTTTTCCTGACATTGTGGATTCTGTGAAATGATGGCCAACGAG
GGCAAGACAGTAATTGTGGCAGCGCTGGATGGGACCTTCCAGAGGAAGGCTTTCGGC
AGCATCTTGAACCTGGTGCCCTGGCGGAGAGTGTGGTGAAGCTCACCGCTGTGTGCA
TGGAGTGCTTCCGAGAAGCTGCCTACACGAAGAGGCTGGGCCTGGAGAAAGAGGTGG
AGGTGATTGGCGGAGCCGACAAGTATCACTCCGTGTGCCGCTGTGCTACTTTAAGAA
GTCTTCCAGCCAGACTGCTGGCTCAGACAACAAGAAGTGTCTGGTGTGGGGCAGCC
GGGAGAGGCCTTGGTTGTCAGGAAGCTCTTGCCTCTCAGCAAGTCTACAATAACAAC
TCTGCCAACGGCTCGAGCGGTGGTGGCGGGAGCGGAGGTGGAGGGTGCCTCAGGTGTG
ACCGGCTACCGGCTGTTTCGAGGAGATTCTGTAA
```

Tk1 è in frame con SmBiT al suo C-terminale

Sequenza di *Tk1*

Sequenza di SmBiT

4.3.2 Risultati del saggio NanoBiT

Dopo 24 ore dalla trasfezione dei plasmidi è stato rilevato il segnale ottenuto dal lettore di micropiastre e sono stati prodotti i grafici seguenti che indicano il tempo espresso in secondi e la luminescenza (Unità di Luce Relativa, RLU).

Grazie all'impiego del controllo positivo fornito dal kit è possibile constatare che l'esperimento è riuscito (Figura 29). Dopo una stabilizzazione iniziale, il segnale aumenta indicando che le due proteine PRKAR2A e PRKACA interagiscono tra loro e permettono la formazione dell'enzima con le due subunità SmBiT e LgBiT. La NanoLuc è in questo modo funzionale e interagisce con il substrato emettendo luminescenza.

I background e il controllo negativo invece mostrano un segnale molto basso corroborando che la interazione tra PRKAR2A e PRKACA è specifica.

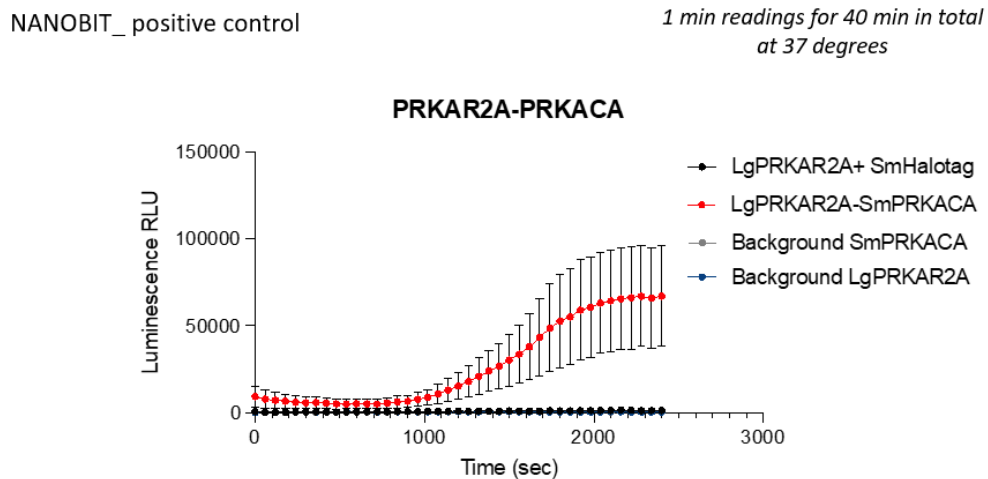


Figura 29 Grafico del segnale di luminescenza nel corso del tempo dell'interazione tra PRKAR2A e PRKACA (controllo positivo)

Per quanto riguarda l'interazione tra le proteine di interesse Myths e **Tk1** sono stati ottenuti i seguenti grafici in Figura 30.

L'esperimento ha coinvolto la proteina Tk1 nella sua clonazione al C-terminale e N-terminale.

Nel grafico di Tk1 con SmBiT clonato al C-terminale è possibile osservare l'interazione con Myths-LgBiT infatti dopo una stabilizzazione iniziale, il segnale aumenta fino a circa 4000 RLU.

Il segnale dei background e delle cellule non trasfettate invece è molto più debole. Il risultato indica che vi è una interazione tra le due proteine e che avviene in modo diretto senza intermediari.

Nel grafico con Tk1 clonato all'N-terminale invece il segnale dell'interazione tra Myths C'-LgBiT e Tk1 N'-SmBiT è paragonabile a quello del background e del controllo negativo, non è stata registrata alcuna interazione.

Alla luce dei due risultati si può concludere che le due proteine interagiscono ma probabilmente per l'interazione con Myths è importante la regione N-terminale di Tk1 e che quindi quando è codificata con la porzione SmBiT l'interazione viene meno.

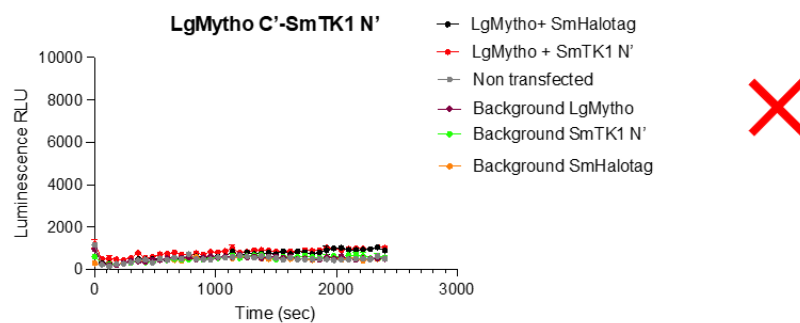
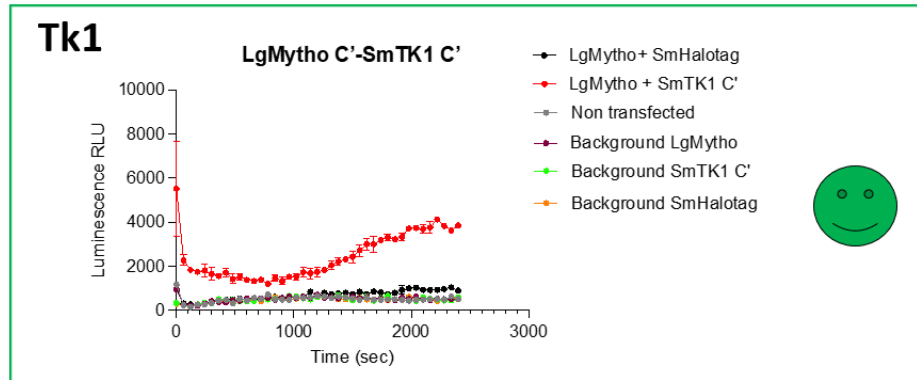


Figura 30 Grafico del segnale di luminescenza nel corso del tempo tra Tk1 e Mytho: sopra Tk1 C'-SmBiT e sotto Tk1 N'-SmBiT

Nell'analisi dell'interazione tra Mytho e **Ctps1** (Figura 31) è risultato che non vi è interazione quando il clonaggio di SmBiT avviene all'N-terminale di Ctps1 poiché non è presente un segnale di luminescenza significativo. Questa regione dell'enzima potrebbe essere importante per il contatto con Mytho oppure la proteina Ctps1 taggata all'N-terminale induce un mal piegamento della proteina evitando la sua interazione.

Nell'esperimento non è stata effettuata l'analisi con Ctps1 clonato al C-terminale poiché è stato necessario ripetere il clonaggio, in esperimenti futuri sarebbe quindi interessante continuare l'analisi includendo anche questa possibilità.

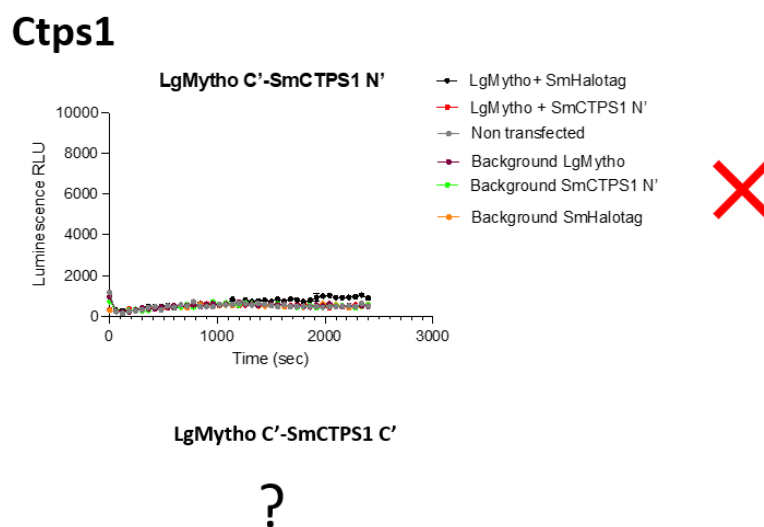


Figura 31 Grafico del segnale di luminescenza nel corso del tempo tra Ctps1 (clonato all'N-term) e Mytho

4.4 Alterazioni nella risposta e riparazione dei danni al DNA nelle cellule *Mytho*-knockout

Quando il DNA di una cellula subisce danni (sia per fattori esterni che interni) viene attivato il pathway di riparazione che consiste in una rete complessa di proteine che si attivano mediante autofosforilazione o fosforilandosi tra loro e consentono alla cellula di bloccare temporaneamente il ciclo cellulare per risolvere il danno.

Dato che si ipotizza che MYTHO sia coinvolto nel processo di mantenimento della stabilità del genoma tramite la sintesi dei dNTP, è interessante esplorare come viene attivato il processo di risoluzione dei danni al DNA in sua assenza e se vi sono delle modifiche.

Utilizzando cellule C2C12 wild-type e *Mytho*-knockout sia trattate che non trattate con etoposide (una sostanza che causa danni al DNA) sono state estratte e analizzate tramite Western blot le proteine coinvolte in questo pathway e la loro attivazione mediante fosforilazione.

Gli esperimenti hanno consentito anche la messa a punto della tecnica di estrazione, infatti, dopo vari tentativi, è risultato più efficiente per la lisi cellulare l'utilizzo del buffer più aggressivo e l'aggiunta della procedura di sonicazione.

Per i risultati sono stati presi in considerazione solamente quelli in cui era stato usato questo metodo, infatti, le cellule e i rispettivi nuclei si sono lisati più efficacemente e le proteine liberate sono state raccolte con successo al momento della preparazione dei campioni.

È stata rilevata la presenza di ogni proteina sia nella sua forma fosforilata sia la proteina totale. La prima indica quanta della proteina totale viene attivata e quindi a che livello di intensità viene stimolato il pathway di segnalazione di riparo del DNA nella quale è coinvolta.

Dopo l'estrazione e la corsa dei campioni su gel, le proteine sono state trasferite sulla membrana che a sua volta è stata incubata con gli anticorpi specifici tramite i quali è stato possibile rilevare il segnale grazie all'impiego dei reagenti di chemiluminescenza. In questo modo è stata ottenuta la [Figura 32](#) nella quale sono presenti le bande corrispondenti al segnale delle proteine.

La stessa membrana è stata prima incubata con l'anticorpo che si lega alla forma fosforilata e successivamente con quello anti-proteina totale.

Sia per le cellule wild-type che *Mytho*-knockout sono stati prelevati tre campioni a livello basale e altri tre dopo il trattamento con etoposide.

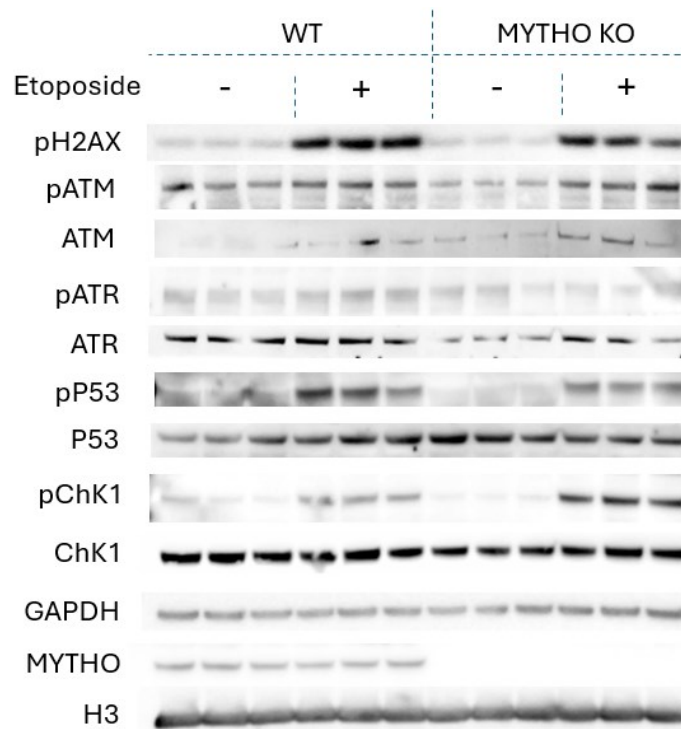


Figura 32 Western blot: analisi del segnale delle proteine totali e fosforilate coinvolte nel DNA damage

4.4.1 Elaborazione dei dati

Per misurare l'intensità del segnale delle bande è stato utilizzato il metodo di quantificazione basato sull'analisi dell'intensità dei picchi del programma ImageJ. Per calcolare la quantità presente di proteina dai segnali ottenuti, questi ultimi sono stati normalizzati rispetto ad H3 (Histone 3). In questo modo si ottiene un calcolo preciso della variazione della quantità della proteina e non verranno considerate alterazioni dovute alle condizioni sperimentali. È stato scelto in particolare H3 poiché gli istoni si trovano in una quantità relativamente costante nel nucleo delle cellule e trovandosi in questo compartimento consentono di indicare anche se i nuclei delle cellule sono stati lisati equamente. Utilizzando questa proteina come riferimento è stato quindi possibile standardizzare la quantità di campione caricato nel gel.

Grazie ai valori ricavati sono stati realizzati i seguenti grafici, nei quali il campione wild-type (WT) di ogni proteina è stato tenuto come riferimento e impostato a 1, questo valore rappresenta il livello basale di espressione della proteina. Il "fold increase", ovvero aumento rispetto al controllo, indica invece quanto i valori degli altri campioni variano rispetto al campione WT. Se i valori sono maggiori di 1 aumenta dell'espressione di quella determinata proteina mentre se è minore diminuisce rispetto al WT.

4.4.2 Interpretazione dei risultati

In esperimenti precedenti era stato osservato che nelle cellule *Mytho*-KO era ridotta la fosforilazione di **H2AX** in seguito a lesioni del DNA, modifica considerata come un marker del danno. Ciò implica che, quando la cellula dovrebbe attivare la fosforilazione di questa proteina che attiva a sua volta varie proteine coinvolte nella riparazione del DNA, in assenza di *Mytho* è ridotta la sua attivazione e la cellula non riesce a far fronte al danno come nelle cellule WT. Questi dati suggeriscono quindi la presenza di problematiche per quanto riguarda il rilevamento del danno al DNA e un'alterazione del reclutamento delle proteine che avrebbero il compito di ripararlo nei siti dove la cromatina è danneggiata.

Nel Western blot che è stato effettuato nell'esperimento, è stato confermato questo dato, infatti, il segnale delle bande corrispondenti a pH2AX delle cellule *Mytho*-KO sottoposte a etoposide, quindi a un danno al DNA, è più basso. Come si può notare dal grafico in [Figura 33](#), per quanto riguarda le cellule wild-type, quando sono state sottoposte ad etoposide vi è un aumento notevole di questa forma della proteina mentre nel caso delle cellule KO l'aumento è minore. Il livello di significatività statistica riguardante la differenza tra i valori dei due gruppi di cellule trattate con etoposide è altamente significativo (p-value (p) < 0.001).

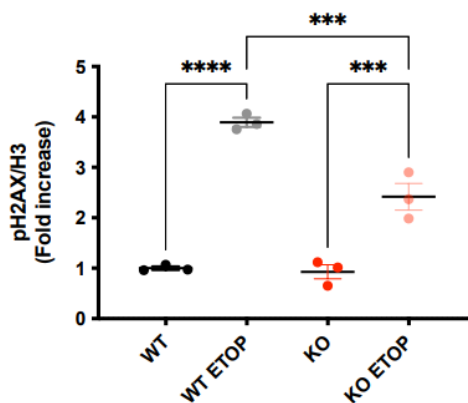


Figura 33 Grafico del segnale di pH2AX in cellule WT e KO
I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
*** $p < 0.001$

Per quanto riguarda **pp53** ([Figura 34](#)) dopo l'induzione del danno al DNA si registra una ridotta fosforilazione di p53 nelle cellule KO rispetto alle WT.

Quindi in condizioni basali la quantità è simile mentre dopo il danno è ridotta la presenza della forma fosforilata quando *Mytho* non è presente, indicando il fatto che p53 non viene attivato come nei WT.

Si osserva un aumento della proteina totale p53 nelle cellule KO rispetto alle WT nel gruppo non trattato con etoposide. La differenza è quasi significativa poiché il valore di p è di 0.0536.

P53 pathway

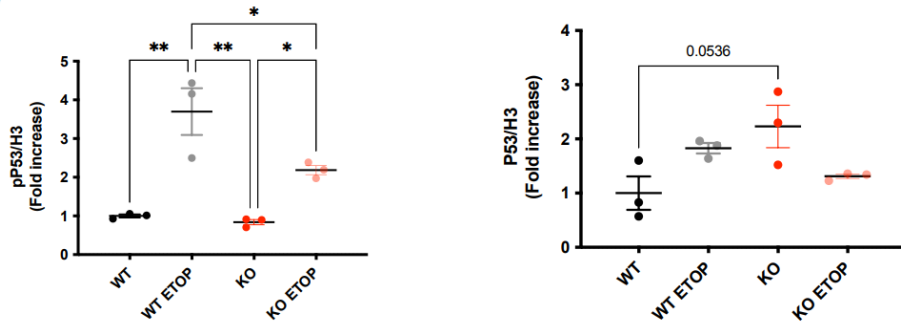


Figura 34 Grafico del segnale di p53 e pp53 in cellule WT e KO
I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Per comprendere la via upstream di regolazione di p53 e H2AX sono state analizzati i pathway di segnalazione di ATM e ATR.

Dai dati preliminari ottenuti si può notare che il segnale di ATR (Figura 35) mostra un aumento di fosforilazione (attivazione) nelle cellule WT dopo il trattamento con etoposide in linea con quanto riportato in letteratura. (28)

Sarà comunque necessario aumentare il numero di campioni per ottenere una significatività statistica.

D'altro canto, si nota chiaramente che non vi è la stessa tendenza di incremento della fosforilazione tra il campione KO trattato con etoposide e non trattato. Ciò indica che la via di attivazione di pATR è minore.

Una delle cause della sua minore attivazione potrebbe essere data dai livelli di ATR di per sé più bassi. Infatti, i livelli della proteina totale rilevata sono inferiori nei campioni KO rispetto ai WT sia a livello basale che dopo il trattamento con etoposide.

ATR pathway

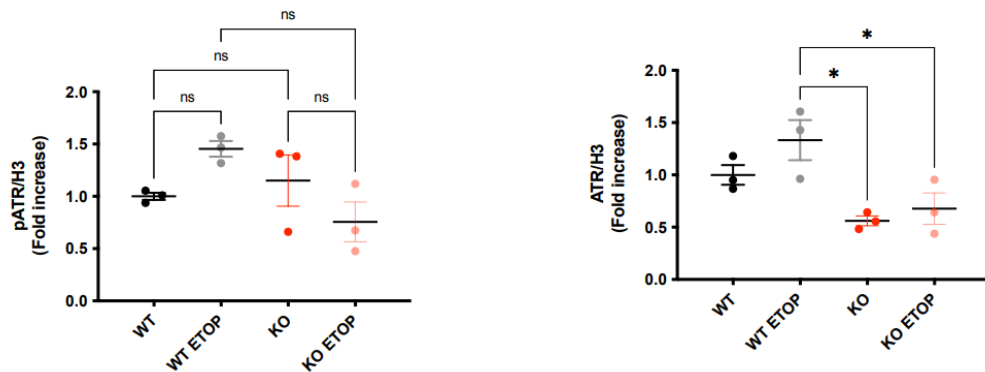


Figura 35 Grafico del segnale di ATR e pATR in cellule WT e KO
I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
* $p < 0.05$, ns=non significativo

Il secondo enzima preso in esame è pATM (Figura 36) che non mostra differenze significative tra KO e WT. Dopo il trattamento con etoposide, secondo quanto atteso, i livelli di pATM sono aumentati ma non ancora significativamente in entrambi i gruppi. Più esperimenti sono necessari per valutare la significatività del dato.

La quantità della proteina totale ATM in condizioni basali senza l'utilizzo dell'etoposide è più elevata nelle cellule KO rispetto alle WT. Questa evidenza potrebbe essere spiegata dall'ipotesi secondo la quale la via di ATM sta provando a compensare il pathway ridotto di ATR osservato precedentemente.

Dopo l'utilizzo dell'etoposide, nelle cellule WT aumenta la concentrazione della proteina. Tra le cellule WT e le cellule WT sottoposte al danno vi è una differenza significativa ma tra quelle KO e KO sottoposte al danno non aumenta significativamente. Ciò potrebbe essere dovuto alla quantità già troppo alta della proteina totale ATM presente a livello basale.

ATM pathway

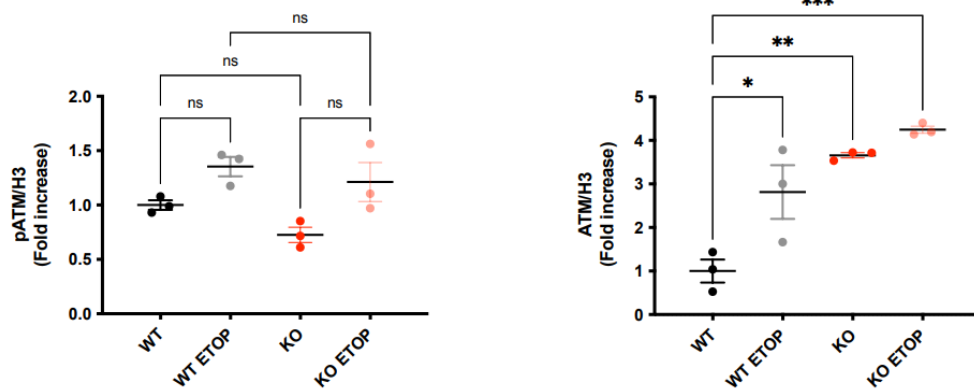


Figura 36 Grafico del segnale di ATM e pATM in cellule WT e KO
I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = non significativo

Successivamente, sono state considerate alcune delle proteine attivate dagli enzimi ATR e ATM tra le quali CHK1 e CHK2.

Purtroppo, gli anticorpi anti-pCHK2 non hanno funzionato e non è stato possibile analizzare l'attivazione di questa via.

Riguardo pCHK1 (Figura 37), invece, possiamo constatare che sono presenti differenze altamente significative ($p < 0.001$) tra i gruppi di cellule WT e KO a livello basale e il gruppo WT e KO dopo il trattamento. Tuttavia, si nota che la differenza tra le cellule non trattate e trattate con etoposide è molto più evidente in quelle KO, infatti, dopo l'induzione del danno si registra un aumento maggiore della proteina nelle cellule KO rispetto alle WT.

I livelli totali di CHK1 non mostrano differenze tra WT e KO e prima e dopo il trattamento.

L'incremento della forma fosforilata potrebbe indicare un aumento del danno al DNA, probabilmente maggiore nel caso delle cellule KO.

PCHK1 pathway

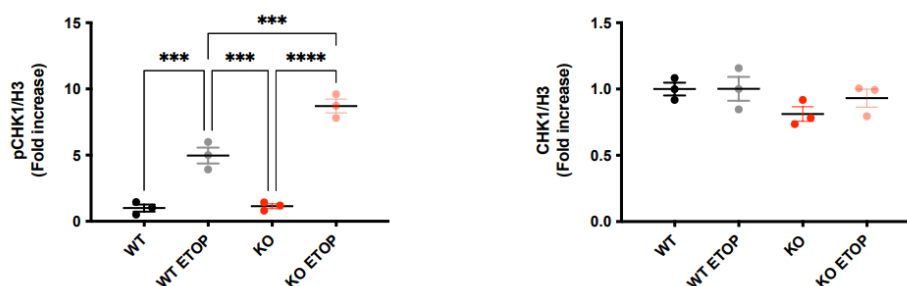


Figura 37 Grafico del segnale di CHK1 e pCHK1 in cellule WT e KO
 I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
 *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Dal Western blot è risultato quindi che è importante indagare a fondo sul pathway di riparazione del danno al DNA in assenza di Mytho poiché le cellule in cui la proteina è assente mostrano alcune differenze rispetto alle cellule WT soprattutto in risposta ad un trattamento con l'etoposide.

I valori risultati da pH2AX e pp53 evidenziano che vi è una diminuzione della risoluzione del danno mentre l'aumentata fosforilazione di CHK1 indica invece l'arresto del ciclo cellulare e che la riparazione è in corso. Quando CHK1 si attiva, infatti, non blocca il ciclo cellulare solamente tramite p53 ma agisce anche su altre proteine come le fosfatasi CDC25A e CDC25C.

Un prolungamento dell'attivazione del pathway di riparazione segnala alla cellula che non sta avvenendo la corretta riparazione del genoma e ciò conduce la cellula all'ingresso in uno stato di senescenza, in tal modo non avviene il trasferimento alle cellule figlie dell'informazione errata del DNA. (29)

Questi risultati segnalano che la fosforilazione degli enzimi coinvolti nel processo è modificata nel gruppo cellulare *Mytho*-knockout paragonato alle cellule WT. *Mytho* infatti potrebbe influenzare sia il rilevamento del danno che l'attivazione di queste proteine.

Il pathway di riparo e arresto del ciclo cellulare non è costituito da proteine singole ma più vie composte da molti enzimi che interagiscono tra loro rendendo complessa l'interpretazione dei risultati. Per avere una visione più chiara d'insieme è fondamentale ripetere gli esperimenti analizzando anche l'attivazione delle altre proteine coinvolte, per esempio CHK2, DNA-PK, KAP1 ed RPA.

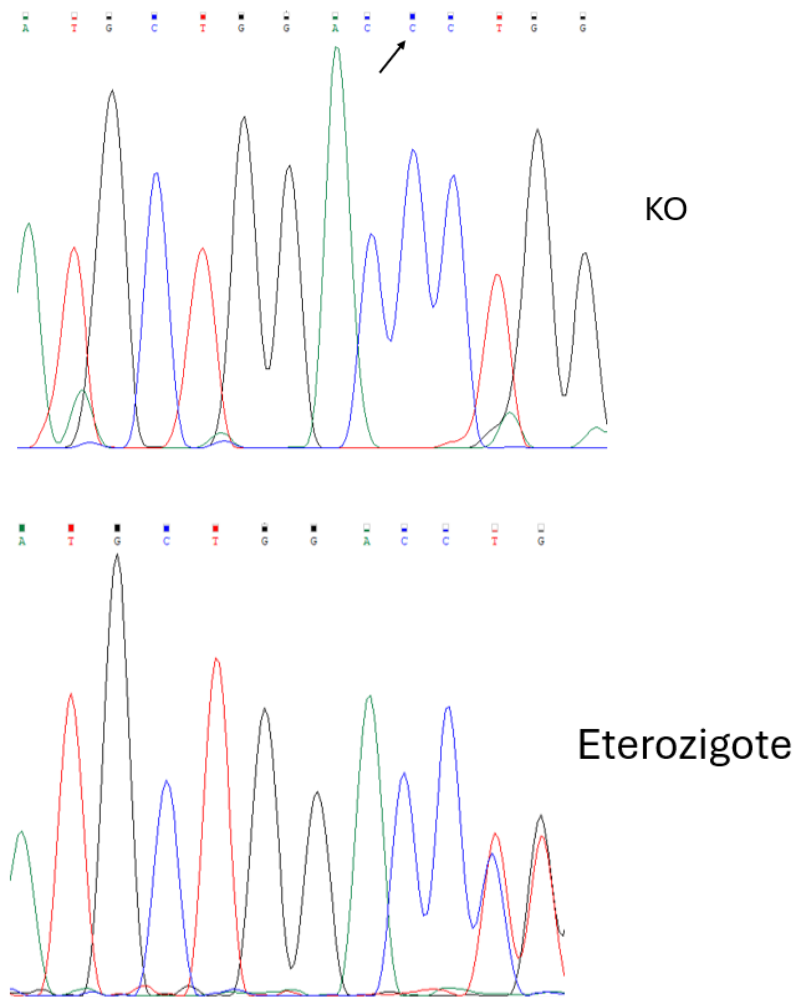
4.5 Studio dei topi *Mytho*-knockout

Per studiare gli effetti dell'assenza della proteina MYTHO *in vivo* è stata generata la linea di topi *Mytho*-knockout.

Seguendo il protocollo di genotipizzazione è possibile stabilire se le nascite comprendono animali che hanno un genotipo wild-type, *Mytho*-knockout o eterozigote.

Nella [Figura 38](#) sono presenti degli esempi dei risultati di sequenziamento del gene di alcuni topi tramite il software Chromas.

Nella prima sequenza è stata riscontrata l'inserzione di una C (indicata dalla freccia) che identifica il topo come KO, la seconda mostra il genotipo di un organismo eterozigote poiché è presente un segnale doppio partendo dal punto specifico dell'inserzione tipica della modifica del gene mentre nella terza immagine è riportata la sequenza estratta da un topo WT con il segnale delle basi non alterato, l'inserzione non è presente.



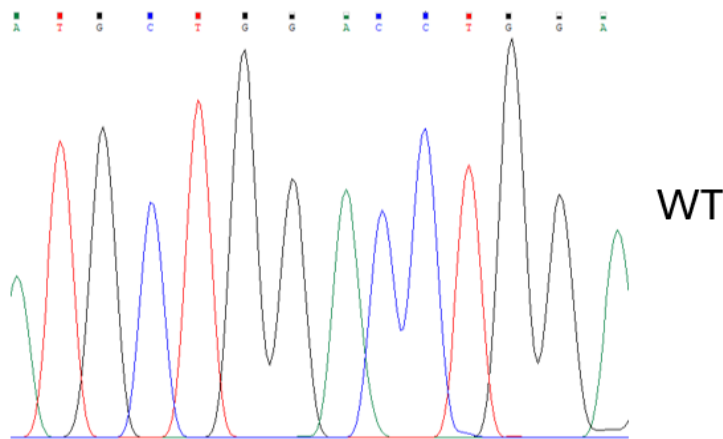


Figura 38 Esempi di genotipi di topi *Myths*-knockout (KO), eterozigoti e wildtype (WT)

Tramite l'osservazione degli animali è stato possibile constatare che l'assenza di *Myths* conferma anche *in vivo* la sua influenza nell'aging soprattutto per quanto riguarda gli organismi di sesso maschile.

Nella Figura 39 è rappresentato il grafico che riporta la sopravvivenza dei topi maschi della linea *Myths*-knockout con i tre genotipi differenti denominati wild-type (WT), eterozigoti (MYTHO +/-) e *Myths*-knockout (MYTHO -/-). L'asse delle ordinate indica la percentuale di sopravvivenza mentre l'asse delle ascisse il tempo espresso in mesi.

Si può notare che gli organismi WT (n= 3) compongono una curva di sopravvivenza stabile del 100% indicata in questo grafico solamente fino a 25 mesi poiché la morte naturale dei topi considerati per la statistica è ancora da registrare.

Gli eterozigoti (n= 2), invece, evidenziano in generale una sopravvivenza minore rispetto ai WT ma comunque maggiore dei topi KO suggerendo un possibile effetto negativo di una sola copia del gene *Myths* mutata.

I topi KO (n= 5) presentano la sopravvivenza più bassa, infatti, vi è una sua riduzione significativa nel corso dei mesi.

Questo dato conferma che la mancanza della proteina ha effetti negativi sulla longevità degli animali e influenza la durata della loro vita.

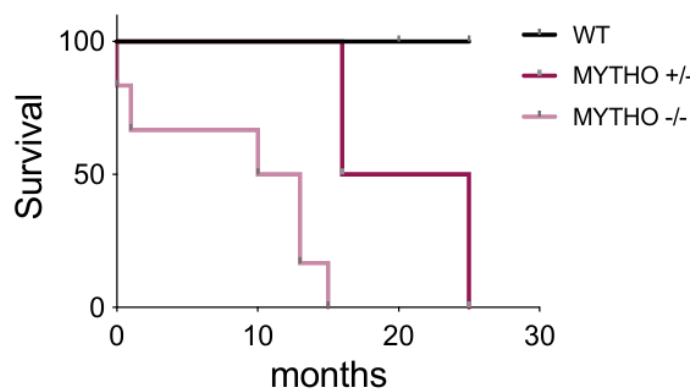


Figura 39 Grafico della sopravvivenza dei topi maschi della linea *Myths*-knockout

Il grafico in [Figura 40](#) riporta la percentuale di nascite dei topi WT, KO ed eterozigoti. La modifica del gene potrebbe avere una certa letalità riscontrata a livello embrionale causando alla nascita di pochi individui KO rispetto al totale delle nascite. Non è infatti rispettato il rapporto mendeliano atteso secondo il quale ci si aspetterebbe un 50% di nascite di eterozigoti, 25% di WT e 25% di organismi KO.

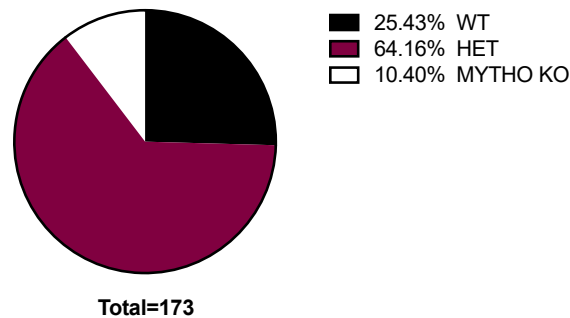


Figura 40 Diagramma a torta con la percentuale delle nascite dei topi wild-type (WT), eterozigoti (HET) e MYTHO-KO

Gli organismi KO non solo presentano una sopravvivenza ridotta ma sembrano anche entrare in uno stato di invecchiamento precoce, probabilmente a causa dell'assenza dei meccanismi associati ad un invecchiamento sano.

Infatti, anche a livello fisico si riscontrano differenze evidenti nei topi maschi: i *Mytho*-knockout (MYTHO KO) presentano una corporatura diversa rispetto agli animali wild-type (WT) ed eterozigoti. Confrontando i topi WT e KO in [Figura 41](#), si nota come i KO sono di taglia più piccola e con il progredire dell'età, visibile in foto a 15 mesi, risultano magri, con il pelo bianco e non mostrano in generale un aspetto in salute.

TOPI MASCHI

3 mesi:

WT MYTHO KO



15 mesi:

WT

MYTHO KO



Figura 41 Foto che confronta i topi maschi Mytho-knockout e wild type a 3 e 15 mesi

Tramite l’Echo-MRI è stato riscontrato che i topi maschi hanno anche meno grasso corporeo rispetto agli altri (grafico in [Figura 42](#)): la differenza tra la massa grassa in % dei WT e dei KO è molto significativa ($p < 0.01$) mentre gli eterozigoti presentano un fenotipo intermedio.

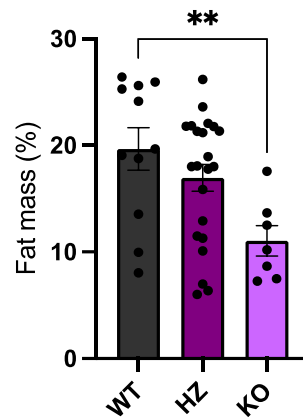


Figura 42 Indice della massa grassa dei topi maschi in %
 I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
 ** $p < 0.01$

Infine, sono stati confrontati diversi individui sia maschi che femmine per capire se presentassero differenze nel peso, osservate anche ad occhio nudo. Dai grafici del peso degli animali a 5 mesi ([Figura 43](#)) risulta che vi è una differenza significativa tra i maschi WT e KO ($p < 0.001$) e anche per le femmine p è minore di 0.01, anche gli eterozigoti in questo caso pesano meno dei WT.

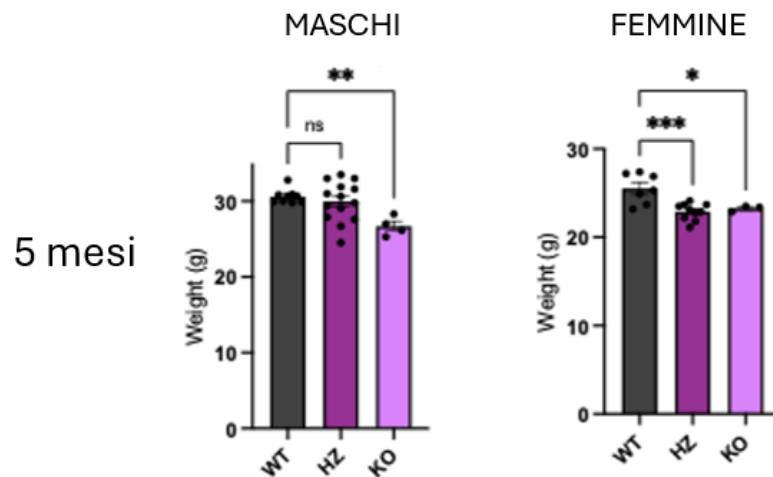


Figura 43 Confronto del peso in grammi (g) dei topi WT, HZ e KO di maschi e femmine separatamente
 I dati sono presentati come media \pm ES (con punti come i valori individuali)
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns= non significativo

Riassumendo, i diversi indici analizzati evidenziano che sono presenti differenze nei topi KO rispetto ai WT.

L'assenza della proteina sembra essere associata innanzitutto ad una letalità a livello embrionale, come suggerito dal numero ridotto di organismi KO alla nascita. Inoltre, i topi KO hanno una ridotta aspettativa di vita, invecchiando prima e non in salute, infatti, vi sono evidenze di condizioni corporee peggiori col trascorrere dei mesi.

Anche le dimensioni dei topi KO sono minori rispetto ai WT e presentano un peso minore, fatto riscontrabile di solito in condizioni di salute precaria o patologie, e una ridotta massa grassa probabilmente dovuta ad una minore riserva di grasso corporeo.

Capitolo 5: Conclusioni e prospettive future

La proteina MYTHO scoperta recentemente è coinvolta nell'autofagia, un processo importante per mantenere l'omeostasi cellulare in quanto consente di eliminare eventuali organelli o molecole danneggiate e riciclare elementi ancora utilizzabili. Da alcuni dati ottenuti in studi precedenti è stato predetto che la proteina MYTHO possa influenzare anche la senescenza cellulare poiché promuove la risposta allo stress e la longevità.

Sono stati effettuati nel progetto diversi esperimenti che permettono di valutare se l'ipotesi possa essere corretta e di indagare sul modo in cui MYTHO svolge questa funzione focalizzandosi maggiormente sulla stabilità del genoma. L'integrità del DNA è infatti fondamentale per mantenere le cellule e di conseguenza l'intero organismo in una condizione di salute e condurlo verso un invecchiamento sano.

Innanzitutto, da una proteomica era risultato che MYTHO interagiva con enzimi coinvolti nella sintesi delle pirimidine. Per questo è stato effettuato un esperimento nel quale sono stati estratti e quantificati i dNTP, derivati anche dalle basi pirimidiniche, in assenza di Mytho.

Nel tipo cellulare dei miotubi è stata notata una tendenza ad avere una minore quantità di dNTP disponibile quando il gene *Mytho* era silenziato dai siRNA. Anche se i miotubi non sono in attiva divisione, è importante che mantengano comunque un reservoir adeguato di dNTP utile alle funzioni mitocondriali e alla riparazione di eventuali danni al DNA.

Il dato rilevato è tuttavia solamente preliminare infatti è necessario per la significatività statistica aumentare il numero di campioni dei gruppi di cellule da cui si estraggono i dNTP.

Inoltre, sono stati condotti due tipi di esperimenti per confermare l'interazione di Mytho con gli enzimi coinvolti nel processo di sintesi dei nucleotidi pirimidinici dCTP e dTTP: Ctps1 e Tk1.

Il primo esperimento è quello di immunoprecipitazione ed ha confermato l'effettiva interazione con i due enzimi tramite l'impiego di beads che legavano la proteina Mytho-GFP e di conseguenza i suoi interattori.

Il secondo è la tecnica NanoBiT grazie alla quale è stata osservata l'interazione tra Mytho e Tk1. Tramite questo saggio è stato possibile anche constatare che Mytho e Tk1 interagiscono in modo diretto, senza altre molecole che fungono da intermediari, poiché la tecnica prevede la formazione di un enzima funzionale attraverso il contatto diretto tra due proteine.

Per quanto riguarda Ctps1, non è stata riscontrata alcuna interazione ma una parte dell'esperimento è ancora da approfondire.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che Mytho, interagendo con gli enzimi menzionati, influenzi la sintesi dei dNTP quindi di conseguenza condizioni anche la stabilità genomica.

Un esperimento futuro potrebbe essere quello in cui viene analizzata l'interazione individuata tra Mytho e Tkl anche in cellule trattate con etoposide, una sostanza che induce i danni al DNA, per studiare se l'interazione tra essi in queste circostanze è maggiore.

Nella ricerca di tesi è stato anche avviato lo studio del pathway di riparazione del DNA e la sua attivazione è stata confrontata tra cellule *Mytho*-knockout e wild-type entrambe trattate e non trattate con etoposide.

I risultati ottenuti dal saggio Western blot mostrano che in assenza di Mytho è compromessa sia la segnalazione del danno da parte di p53 che l'attivazione di p53. Invece, i dati relativi a CHK1 rivelano una sua maggiore attivazione nelle cellule *Mytho*-knockout dopo l'induzione di danni al DNA.

Questo suggerisce una risoluzione del danno non efficiente e un prolungamento dell'arresto del ciclo cellulare indotto da CHK1 che favorisce il segnale di ingresso della cellula in uno stato di senescenza.

Tuttavia, per confermare queste ipotesi è necessario aumentare il numero dei campioni e studiare anche l'attivazione di altre proteine importanti coinvolte nel pathway di riparazione.

Dopo la scoperta di MYTHO, sono state testate diverse condizioni su animali modello per monitorare l'impatto della proteina *in vivo*.

Per esempio, i vermi *C. elegans* knockout per *myt-1* possedevano caratteristiche tipiche degli organismi vecchi come la minor resistenza allo stress ossidativo e la ridotta capacità di movimento.

Anche nei topi vecchi e addirittura nell'uomo anziano è stata riscontrata una regolazione del gene correlata all'età.

Successivamente, è stata generata la linea di topi *Mytho*-knockout e al momento si stanno registrando diverse caratteristiche degli animali ed effettuando esperimenti per capire l'impatto della sua assenza sull'organismo.

Tramite lo studio della linea dei topi *Mytho*-knockout è stato visto che muoiono prima rispetto ai WT, presentano caratteristiche diverse a livello fisico e con l'aumento dell'età non mostrano un aspetto in salute. Probabilmente anche a livello embrionale la mutazione di entrambe le copie del gene ha una certa letalità poiché nascono pochi organismi KO rispetto a quanto atteso. Tutto ciò porta ad ipotizzare che possano entrare in uno stato di senescenza precoce e che il loro life-span diminuisca.

In esperimenti riportati in letteratura, nel muscolo scheletrico del topo era stato testato il knockdown prolungato del gene e si era osservato che la massa muscolare restava invariata ma era stata registrata una diminuzione della forza muscolare e altre caratteristiche anormali anche a livello microscopico.

Dato che in questo progetto sono stati registrati dati secondo i quali in assenza di *Mytho* la massa grassa dei topi maschi diminuisce mentre non ci sono differenze sostanziali nella massa magra, come esperimento futuro si potrebbe testare la forza dei muscoli nei topi *Mytho*-knockout mediante delle “prove di forza” e confrontarla con quella gli organismi WT.

Bibliografia e sitografia

1. *FOXO transcription factors*. Carter ME, Brunet A. 4, 20 Feb 2007, *Curr Biol*, Vol. 17. 17307039.
2. *Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy*. Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik JH, Frasson L, Seydel A, Zhao J, Abraham R, Goldberg AL, Blaauw B, DePinho RA, Sandri M. 6670, 10 Apr 2015, *Nat Commun*, Vol. 6. 25858807.
3. *C16ORF70/MYTHO promotes healthy aging in C.elegans and prevents cellular senescence in mammals*. Franco-Romero A, Morbidoni V, Milan G, Sartori R, Wulff J, Romanello V, Armani A, Salviati L, Conte M, Salvioli S, Franceschi C, Buonomo V, Swoboda CO, Grumati P, Pannone L, Martinelli S, Jefferies HB, Dikic I, van der Laan J, Cabreiro F, et al. 15, 13 Jun 2024, *J Clin Invest*, Vol. 134. 38869949.
4. *Autophagy in Skeletal Muscle*. Franco-Romero A, Sandri M, Schiaffino S. 12 Ago 2024, *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 39134378.
5. *ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery*. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. 7, Apr 2009, *Mol Biol Cell*, Vol. 20. 19225151.
6. *Phagophores evolve from recycling endosomes*. Puri C, Vicinanza M, Rubinsztein DC. 8, 2018, *Autophagy*, Vol. 14. 29940791.
7. *Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes*. Simonsen A, Tooze SA. 6, 21 Sep 2009, *J Cell Biol.*, Vol. 186. 19797076.
8. *Mammalian BCAS3 and C16orf70 associate with the phagophore assembly site in response to selective and non-selective autophagy*. Kojima W, Yamano K, Kosako H, Imai K, Kikuchi R, Tanaka K, Matsuda N. 8, Aug 2021, *Autophagy.*, Vol. 17. 33499712.
9. *Role of autophagy in muscle disease*. Franco-Romero A, Sandri M. Dec 2021, *Mol Aspects Med*. 34625292.
10. *MYTHO is a novel regulator of skeletal muscle autophagy and integrity*. Leduc-Gaudet JP, Franco-Romero A, Cefis M, Moamer A, Broering FE, Milan G, Sartori R, Chaffer TJ, Dulac M, Marcangeli V, Mayaki D, Huck L, Shams A, Morais JA, Duchesne E, Lochmuller H, Sandri M, Hussain SNA, Gousspillou G. 1, 2 Mar 2023, *Nat Commun.*, Vol. 14. 36864049.

11. *The hallmarks of aging*. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 6, 6 Jun 2013, Cell., Vol. 153. 23746838.
12. *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. F., d'Adda di Fagagna. 7, Jul 2008, Nat Rev Cancer., Vol. 8. 18574463.
13. *Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities*. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. 2, Feb 2021, Nat Rev Mol Cell Biol., Vol. 22. 33328614.
14. *SARS-CoV-2 infection induces DNA damage, through CHK1 degradation and impaired 53BP1 recruitment, and cellular senescence*. Gioia U, Tavella S, Martínez-Orellana P, Cicio G, Colliva A, Cecon M, Cabrini M, Henriques AC, Fumagalli V, Paldino A, Presot E, Rajasekharan S, Iacomino N, Pisati F, Matti V, Sepe S, Conte MI, Barozzi S, Lavagnino Z, Carletti T, Volpe MC, et al. 4, Apr 2023, Nat Cell Biol., Vol. 25. 36894671.
15. *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. 2010, Adv Cancer Res. 21034966.
16. *Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation*. Goto H, Kasahara K, Inagaki M. 2015, Cell Struct Funct. 25748360.
17. *Double-strand DNA break repair: molecular mechanisms and therapeutic targets*. Tan J, Sun X, Zhao H, Guan H, Gao S, Zhou PK. 5, 5 Oct 2023, MedComm (2020), Vol. 4. 37808268.
18. *KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome*. Iyengar S, Farnham PJ. 30, 29 Jul 2011, J Biol Chem., Vol. 286. 21652716.
19. *Targeting the DNA damage response and repair in cancer through nucleotide metabolism*. Helleday T, Rudd SG. 21, Nov 2022, Mol Oncol. , Vol. 16. 35583750.
20. *A Critical Balance: dNTPs and the Maintenance of Genome Stability*. Pai CC, Kearsy SE. 2, 31 Jan 2017, Genes (Basel)., Vol. 8. 28146119.
21. *Nuclear-Mitochondrial Interactions*. Walker BR, Moraes CT. 3, 10 March 2022, Biomolecules, Vol. 12. 35327619.
22. <https://www.cellsignal.com/>. [Online]
23. *Differential roles of CTP synthetases CTPS1 and CTPS2 in cell proliferation*. Minet N, Boschat AC, Lane R, Laughton D, Beer P, Asnagli H, Soudais C, Bourne T, Fischer A, Martin E, Latour S. 9, 22 Jun 2023, Life Sci Alliance, Vol. 6. 37348953.

24. <https://ita.promega.com/en/products/protein-interactions/live-cell-protein-interactions/nanobit-ppi-starter-systems/?catNum=N2014>. [Online]
25. *Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances*. Rampazzo C, Miazzi C, Franzolin E, Pontarin G, Ferraro P, Frangini M, Reichard P, Bianchi V. 1, 28 Nov 2010, *Mutat Res*, Vol. 703. 20561600.
26. *A defective dNTP pool hinders DNA replication in cell cycle-reactivated terminally differentiated muscle cells*. Pajalunga D, Franzolin E, Stevanoni M, Zribi S, Passaro N, Gurtner A, Donsante S, Loffredo D, Losanno L, Bianchi V, Russo A, Rampazzo C, Crescenzi M. 5, May 2017, *Cell Death Differ*, Vol. 24. 28186504.
27. *Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation*. Lin JS, Lai EM. 2017, *Methods Mol Biol*. 28667615.
28. *Cellular response to etoposide treatment*. Montecucco A, Biamonti G. 1, 8 Jul 2007, *Cancer Lett*, Vol. 252. 17166655.
29. *DNA damage-how and why we age?* Yousefzadeh M, Henpita C, Vyas R, Soto-Palma C, Robbins P, Niedernhofer L. 29 Jan 2021, *Elife*. 33512317.