



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di scienze matematiche, fisiche e naturali

Corso di laurea in Biotecnologie Molecolari ed Industriali

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

Influenza dei pathways coinvolti nella riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA nell'instabilità genomica indotta da BRCA1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Relatore:

Dott. Alvaro Galli

Candidato:

Lodovichi Samuele

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

## INDICE:

RIASSUNTO.....	pag. 4
ABSTRACT.....	pag. 6

### **CAPITOLO 1: Introduzione**

1.1 <i>Genetica del tumore al seno</i> .....	pag. 8
1.2 <i>Riparazione per ricombinazione omologa delle rotture a doppio filamento del DNA</i> .....	pag. 9
1.2.1 <i>Il gene BRCA1</i> .....	pag.12
1.2.2 <i>Il gene MRE11</i> .....	pag.13
1.2.3 <i>Il gene RAD50</i> .....	pag.14
1.2.4 <i>Il gene RAD51</i> .....	pag.14
1.3 <i>Il mismatch-repair ed il gene MSH6</i> .....	pag.15
1.4 <i>Saggi funzionali per caratterizzare le varianti di BRCA1</i> .....	pag.18
1.5 <i>Modificatori del rischio</i> .....	pag.21
1.6 <i>Scopo della tesi</i> .....	pag.23

### **CAPITOLO 2: Materiali e Metodi**

2.1 <i>Ceppo RSY6</i> .....	pag.24
2.2 <i>Plasmide pYES2</i> .....	pag.26
2.3 <i>Terreni</i> .....	pag.27
2.4 <i>Trasformazione batterica con plasmide</i> .....	pag.28
2.5 <i>Estrazione DNA plasmidico da batteri</i> .....	pag.29
2.6 <i>Trasformazione di s.cerevisiae con DNA plasmidico</i> .....	pag.30
2.7 <i>Gene Targeting</i> .....	pag.31
2.8 <i>Amplificazione del DNA tramite PCR</i> .....	pag.32
2.8.1 <i>Yeast Colony PCR</i> .....	pag.33
2.9 <i>Estrazione genomico da lievito</i> .....	pag.33
2.10 <i>Saggio di ricombinazione omologa e reversione genica</i> .....	pag.34
2.11 <i>Western Blot</i> .....	pag.36
2.12 <i>Saggio di inibizione della crescita</i> .....	pag.40

### **CAPITOLO 3: Risultati**

3.1 Costruzione del ceppo RSY6 delecto per il gene del mismatch repair <i>msh6</i> .....	pag.41
3.2 Espressione di <i>BRCA1</i> nel ceppi RSY6rad50Δ, RSY6mre11Δ, RSY6rad51Δ e RSY6msh6Δ.....	pag.45
3.3 Effetto dell'espressione di <i>BRCA1</i> e delle varianti sulla ricombinazione e mutazione dei ceppi RSY6rad50Δ, RSY6mre11Δ, RSY6rad51Δ e RSY6msh6Δ.....	pag.48
3.3.1 Ceppo RSY6mre11Δ.....	pag.49
3.3.2 Ceppo RSY6msh6Δ.....	pag.52
3.3.3 Ceppo RSY6rad51Δ.....	pag.55
3.3.4 Ceppo RSY6rad50Δ.....	pag.58
3.4 Effetto dell'espressione di <i>BRCA1</i> e delle varianti sulla crescita nel ceppo aploide RSY6, RSY6mre11Δ, RSY6msh6Δ, RSY6rad50Δ e RSY6rad51Δ.....	pag.61

<b>CAPITOLO 4: Discussione.....</b>	<b>pag.67</b>
-------------------------------------	---------------

<b>CAPITOLO 5: Conclusioni e prospettive.....</b>	<b>pag. 73</b>
---	----------------

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>pag.74</b>
--------------------------	---------------

## RIASSUNTO

Nell'uomo, il gene BRCA1 codifica per una proteina facente parte di un complesso multiproteico implicato nella riparazione del DNA.

Tali pathway di riparazione si ritrovano nell'organismo modello *Saccharomyces cerevisiae* e questo rende il lievito un ottimo candidato per questo tipo di studi. Poichè, il lievito non ha l'omologo umano di BRCA1, l'espressione viene mediata attraverso un vettore plasmidico tramite crescita in terreno contenente l'induttore specifico che in questo caso è il galattosio.

Studi precedenti effettuati dal gruppo dove ho svolto la tesi, hanno dimostrato che, in lievito, l'espressione di varianti missenso di BRCA1 associate a tumore causano un aumento della ricombinazione e che l'espressione di BRCA1 wild type determina un difetto nella crescita.

Lo scopo di questo studio è determinare se questi pathway specifici di riparazione possano influenzare la ricombinazione e mutazione genica e che quindi potrebbero avere un ruolo nella tumorigenesi dovuta a BRCA1. In particolare, i geni omologhi a quelli di lievito che influenzano il fenotipo indotto dalle varianti BRCA1, potrebbero avere un ruolo nella tumorigenesi come “modificatori” del rischio in pazienti che portano queste varianti.

I ceppi aploidi di *Saccharomyces cerevisiae* difettivi per i suddetti pathway di riparazione presi in esame sono: *RSY6rad51Δ* difettivo nella riparazione per ricombinazione omologa e *RSY6rad50Δ* e *RSY6mre11Δ* difettivi nella riparazione per ricombinazione omologa e non. Poiché è noto che il mismatch repair influenza la ricombinazione in lievito, abbiamo costruito per gene targeting un nuovo ceppo difettivo per il mismatch repair chiamato *RSY6msh6Δ* per poter determinare anche l'effetto di questo gene sul fenotipo indotto da BRCA1. Questi ceppi sono stati trasformati con plasmidi contenenti BRCA1 wt o le varianti BRCA1 scelte secondo la loro classificazione. Prima di determinare l'effetto di BRCA1 in questi ceppi, abbiamo determinato il livello della proteina BRCA1 wild type o mutata in tutti i ceppi utilizzati. I risultati di Western blot mostrano che sia la proteina wt che le varianti scelte vengono espresse in tutti ceppi di lievito. Questo risultato è considerato molto importante, quando si vuole validare un saggio funzionale.

Poiché i ceppi derivati da RSY6 contengono un sistema di ricombinazione intracromosomica che permette di misurare la frequenza di tale evento direttamente in piastra, abbiamo determinato se l'espressione di BRCA1 wt e delle varianti influenzasse la ricombinazione. Dai risultati ottenuti sembra che questi pathway non influiscano in modo significativo nel processo di ricombinazione genica nel ceppo aploide, eccetto che nel ceppo *RSY6rad50Δ*

dove l'espressione di alcune varianti diminuisce della frequenza di ricombinazione. Al contrario, in tutti i ceppi studiati alcune varianti sembrano determinare un aumento della mutazione. In particolare, nel ceppo *RSY6rad50Δ* dove tutte le varianti inducono un forte aumento della frequenza di mutazione indicando che questo pathway ha una forte relazione con BRCA1 e quindi può essere un forte modificatore del rischio in pazienti che portano mutazione sul gene BRCA1. L'espressione di BRCA1 wt inibisce la crescita in lievito. Poiché, il ruolo dei pathway della riparazione del DNA su questo fenotipo non è completamente chiaro, abbiamo determinato se l'effetto sulla crescita determinato dall'espressione di varianti BRCA1 associate a tumore possa essere in qualche modo modulato da questi pathway che, come ampiamente riportato, influenzano la sopravvivenza e la crescita cellulare. I dati ottenuti mostrano chiaramente che le diverse varianti inducono diversi livelli di inibizione della crescita nei vari ceppi deleti, indicando quindi che questi pathway modulano l'effetto inibitorio indotto da BRCA1.

Ancora una volta, si dimostra con questa tesi che il lievito *Saccharomyces cerevisiae* può essere un sistema genetico importante per determinare quali interazioni sono rilevanti per la tumorigenesi dovuta a mutazioni del gene BRCA1.

## ABSTRACT

In humans, the BRCA1 gene encodes for a protein part of a multiprotein complex involved in DNA repair.

These repair pathways can be found in the organism model *Saccharomyces cerevisiae* and this makes yeast a great candidate for this kind of studies. Since, the yeast has not the human homolog of BRCA1, the expression is mediated through a plasmid vector by growth in medium containing the specific inducer which in this case is the galactose.

Previous studies by the group where I done the thesis, have shown that, in yeast, the expression of missense variants of BRCA1 associated with tumor cause an increase of recombination and that the expression of wild type BRCA1 causes a defect in the growth.

The purpose of this study is to determine if these specific repair pathway may affect the recombination and gene mutation, and therefore may have a role in tumorigenesis due to BRCA1. In particular, genes homologous to those of yeast that affect the phenotype induced by BRCA1 variants, may have a role in tumorigenesis as "modifiers" of the risk in patients who carry these variants.

The haploid strains of *Saccharomyces cerevisiae* defective for the previous repair pathways examined are: RSY6rad51 $\Delta$  defective in the repair by homologous recombination and RSY6rad50 $\Delta$  and RSY6mre11 $\Delta$  defective in the repair by homologous recombination and not. Since it is known that the mismatch repair influence recombination in yeast, we made a new strain thought gene targeting defective for the mismatch repair called RSY6msh6 $\Delta$  in order to determine the effect of this gene on the phenotype induced by BRCA1.

These strains were transformed with plasmids containing wt BRCA1 or BRCA1 variants choices according to their classification. Before determining the effect of BRCA1 in these strains, we determined the level of BRCA1 wild type or mutated in all strains used. The results of Western blot analysis show that both the wt protein that variants are expressed in all yeast strains. This is a main result in order to validate a functional assay.

Since the strains derived from RSY6 contain an intrachromosomal recombination system that allows measurement of the frequency of this event directly on plate we determined whether the expression of BRCA1 wt and variants influenced the recombination. By the results obtained it seems that these pathways do not affect significantly the process of gene recombination in the haploid strain, except that in the strain RSY6rad50 $\Delta$  where the expression of some variants decreases the recombination's frequency.

In contrast, on all strains studied some variants seem to determine a mutation increases. In particular, the strain RSY6rad50 $\Delta$  where all variants induce a strong increase in mutation's frequency indicating that this pathway has a strong relationship with BRCA1 and therefore can be a strong risk modifier in patients carrying the BRCA1 gene mutation.

BRCA1 expression inhibits growth in yeast. Since, the role of DNA repair pathways on this phenotype is not completely clear, we determined if the effect on growth determined by the expression of BRCA1 variants associated with cancer can be somewhat modulated by these pathways which, as widely reported influence the survival and cell growth.

The data obtained clearly show that the different variants induce different levels of growth's inhibition in the various deleted strains, indicating that these pathways modulate the inhibitory effect induced by BRCA1.

Once more this work proves that yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be an important genetic system to determine which interactions are relevant for tumorigenesis caused by mutations in the BRCA1 gene.

# CAPITOLO 1: Introduzione

## 1.1 GENETICA DEL TUMORE AL SENO

Il tumore al seno è il cancro più comune nonché il secondo principale responsabile di mortalità nelle donne (Parkin et al., 2005). La storia familiare è il maggiore fattore di rischio indicando che i fattori genetici sono molto importanti nello sviluppo della malattia (Antoniou and Easton., 2006).

Studi di associazione genetica (linkage) svolti dal 1990 hanno identificato BRCA1 e BRCA2 come due maggiori geni di suscettibilità nel tumore al seno.

La funzione principale svolta dalle proteine codificate da questi geni è quella di riparare le rotture del DNA a doppio filamento (DNA-double strand breaks), quindi l'insorgenza della patologia potrebbe essere associata ad una deficienza in questi pathway di riparazione ed un conseguente accumulo di danni al DNA.

Mutazioni germinali a carico di questi geni occorrono raramente ma conferiscono un alto rischio di insorgenza della patologia se presenti.

Negli anni successivi sono stati trovati altri geni collegati all'insorgenza del tumore come TP53 e PTEN, oltre che altri geni implicati nella riparazione del DNA come CHEK2, ATM, BRIP e PALB2 (Laloo Evans, 2012) (Poumpouridou and Kroupis., 2011).

Solo il 25% dei casi di tumore vengono associati a mutazioni in questi geni, pertanto la maggior parte dei casi deve essere legata ad una combinazione di multipli alleli di suscettibilità, ognuno dei quali, preso singolarmente, conferisce una piccola percentuale di rischio.

Questo modello definito poligenico spiega, quindi, la suscettibilità genetica al tumore al seno in termini di rischio come una combinazione di molte varianti a bassa penetranza (Fanale et al., 2012).

Quando parliamo di varianti di BRCA1 facciamo riferimento a varianti alleliche del gene *brca1*, dove un cambiamento a livello genomico, in una posizione specifica della sequenza di DNA del gene, causa il cambiamento di un amminoacido sulla proteina con un amminoacido diverso.

In questo senso si distinguono le varianti con quelle che sono mutazioni non senso o frameshift, dove nel primo caso la mutazione a livello genomico causa la sostituzione di un codone per un amminoacido con un codone di STOP e quindi abbiamo la produzione di una

proteina tronca e spesso non funzionale e nel secondo caso abbiamo l'inserzione di una base che cambia la cornice di lettura di tutta la sequenza con la conseguente produzione di una proteina profondamente mutata.

Una variante missenso determina la produzione di una proteina BRCA1 della stessa dimensione e peso molecolare della wt, ma con un singolo amminoacido diverso dalla WT e che può quindi avere una funzionalità modificata e predisporre così all'insorgenza di diverse patologie.

## **1.2 RIPARAZIONE PER RICOMBINAZIONE OMOLOGA DELLE ROTTURE A DOPPIO FILAMENTO DEL DNA**

Una rottura al DNA a doppio filamento (DNA double strand break, DSB) è una lesione estremamente tossica per la cellula che può generare riarraggiamenti genetici o addirittura morte cellulare se non viene riparata.

Questa lesione può essere causata da stress esogeni come radiazioni ionizzanti o da cause endogene come stress ossidativo o problemi durante la replicazione, infatti è stato ampiamente dimostrato che un arresto prolungato della forza replicativa causa un accumulo di DSBs (Petermann et al., 2010).

I DSBs possono però anche essere sfruttati dalla cellula stessa per indurre diversità genetica, in questo caso la rottura è modulata da enzimi cellulari, ma i meccanismi di riparazione sono gli stessi di quelli utilizzati nel caso di rottura indotta da stress.

Esistono diversi meccanismi di riparazione (Richardson et al., 2000; Pierce et al., 2001) e la scelta, essenziale per mantenere la stabilità genomica, viene fatta in relazione alla fase del ciclo cellulare.

La ricombinazione omologa è il meccanismo di riparazione dei double strand breaks maggiormente accurato poiché questo processo sfrutta il cromatidio fratello come template per riparare la rottura.

Dal momento che il cromatidio fratello è presente solo nelle fasi G2 e S del ciclo cellulare, questo processo può avvenire solo se la cellula si trova in una di queste due fasi.

Quando una lesione del genere viene segnalata dalla cellula, si ferma il ciclo cellulare e si attivano i processi di riparazione. La proteina BRCA1 svolge un ruolo di coordinazione per indirizzare le diverse proteine coinvolte nel pathway a livello del sito dove devono svolgere la

loro funzione (Roy et al., 2011).

Il processo di riparazione delle rotture a doppio filamento per ricombinazione omologa è schematizzato in figura 1. Una delle prime fasi consiste nel veicolare il complesso MRN (MRE11/RAD50/NBS2), nell'uomo, a livello del danno. Quindi il danno al DNA viene "processato" dal complesso MRN che trasforma la rottura in "gap" mediante un processo di degradazione. Il complesso MRN a sua volta recluta le proteine necessarie all'arresto del ciclo cellulare e determina quindi la formazione di due filamenti di DNA a singolo filamento (ssDNA).

Inizialmente il ssDNA viene legato da RPA probabilmente al fine di evitare la formazione di strutture secondarie, in seguito RPA viene scalzato dalla ricombinasi RAD51.

Dopo che si è legato RAD51 viene promossa un' invasione del cromatidio fratello con formazione di un D-loop, se anche l'altra estremità della rottura viene legata dal D-loop si ha la formazione di una struttura particolare detta giunzione di Holliday. In questa fase entrano in gioco altre proteine come si vede dalla figura 1; la proteina RAD54 che ha un'attività elicastica e quindi permette l'apertura della doppia elica del DNA (Golub et al., 1997), e altre proteine dette "paraloghi" di RAD51 che interagiscono con la ricombinasi Rad51 e ne regolano l'attività. L'azione concertata di RAD51, di RAD54 e delle altre proteine stabilizzano il D-loop (Golub et al., 1997). La formazione della giunzione di Holliday permette la sintesi del DNA nella posizione dove inizialmente si era formata la lesione utilizzando il cromatidio fratello come template. Infine, la giunzione di Holliday viene risolta da proteine topoisomerasi come BLM topoisomerasi IIIa (Pardo et al., 2009). A seconda di come viene risolta la giunzione di Holliday, si può avere un evento di crossing-over oppure solo di conversione genica se a livello della rottura iniziale fosse stato presente un marcatore genetico.

La proteina RAD51 viene coadiuvata nella sua funzione anche da RAD52; infatti anche questa proteina è in grado di legare i filamenti ssDNA e media l'interazione DNA-DNA necessaria per l'annealing allo strand complementare (Kitao and Yuan., 2002).

In lievito *Saccharomyces cerevisiae* non è presente BRCA1 ed il complesso MRN è detto MRX in quanto è presente la proteina XRS2 omologa di NBS2 umana.

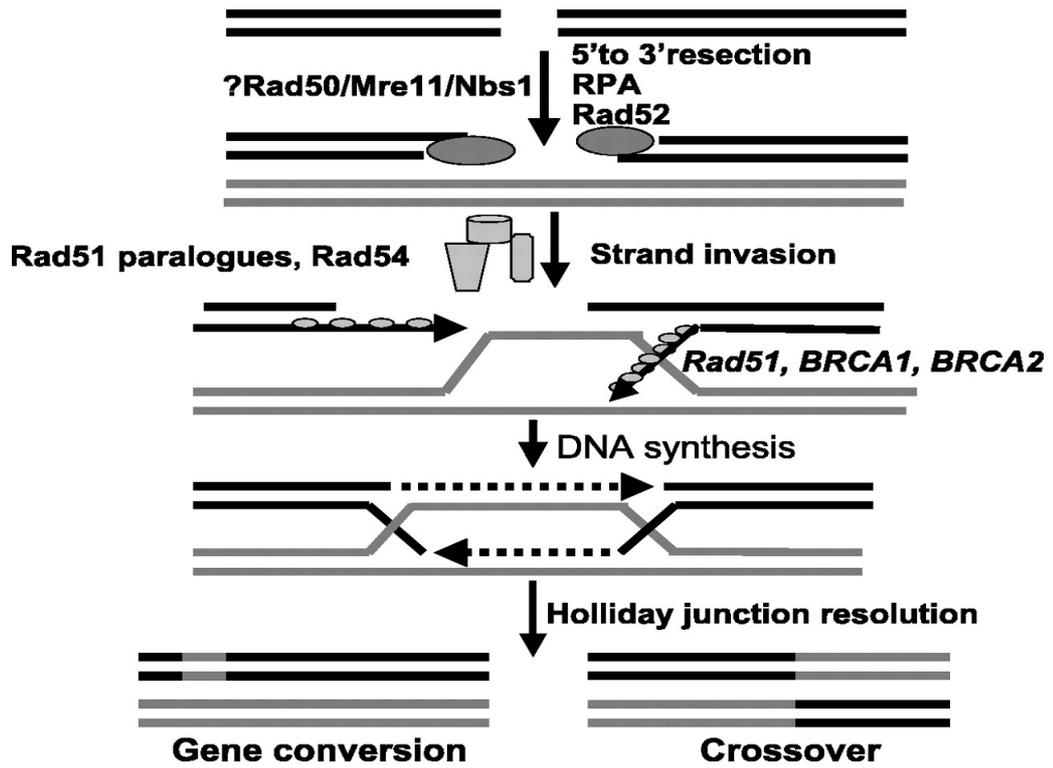


Figura 1: Pathway della ricombinazione omologa, i nomi delle proteine coinvolte e con i due possibili prodotti finali.

### 1.2.1 IL GENE BRCA1

Il gene *BRCA1* è situato sul cromosoma 17 e codifica per una proteina di circa 1812 amminoacidi (220kDa), chiamata “Breast cancer type 1 susceptibility protein”.

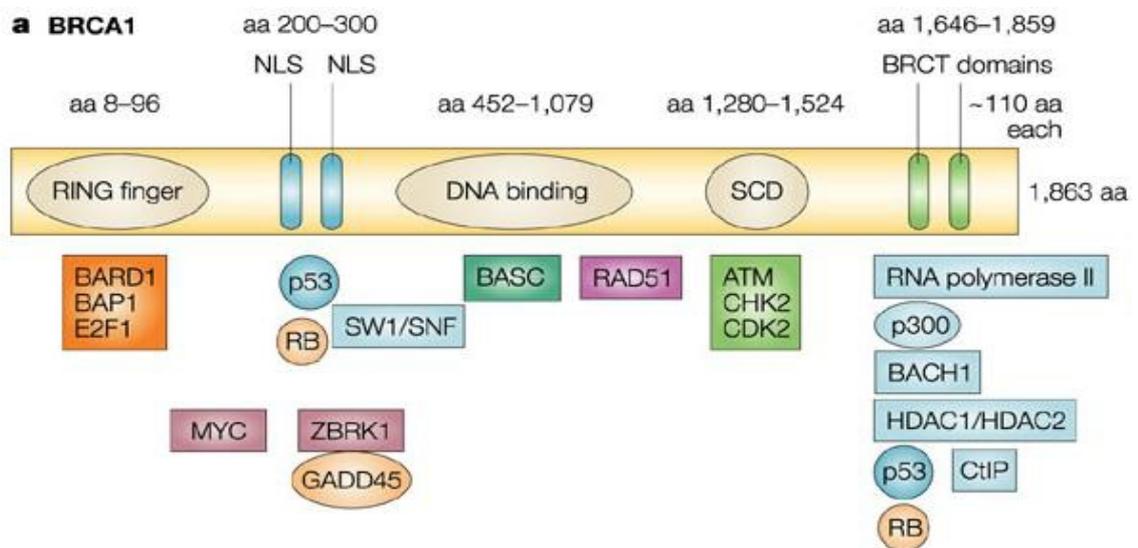


Figura 2: Proteina BRCA1 WT con i diversi domini funzionali e le sue interazioni.

La proteina completa può essere suddivisa in diversi domini:

⌚ I primi 150 amminoacidi formano una regione conservata evolutivamente, ovvero un RING domain. Questo dominio è essenziale affinché BRCA1 possa dimerizzare con BARD1 (BRCA1- associated RING domain protein 1), questo stabilizza BRCA1 stesso e permette l'interazione con l'ubiquitina ligasi E3. Grazie a questo legame l'ubiquitina ligasi E3 può svolgere la sua funzione ubiquitinando le proteine ed indirizzandole verso il pathway della degradazione (Roy et al., 2012).

Mutazioni a livello di questa regione (es. la variante patogenetica C61G), studiate in topo, causano mortalità embrionale.

⌚ Circa la metà della sequenza della proteina è codificata da un singolo esone (esone 11), questa regione viene fosforilata dalla proteina ATM (ataxia telangiectasia mutated) chinasi e dalla CHK2 (Checkpoint kinase 2). Questa fosforilazione è necessaria affinché p53 venga fosforilato a sua volta. Quest ultima fosforilazione induce la trascrizione di CDK (cyclin dependent kinase) che può così svolgere la sua funzione di attivatore del checkpoint della fase G1/S del ciclo cellulare (Siciliano et al., 1997).

Delezioni in questa regione determinano instabilità genomica e ridotta efficienza della

ricombinazione omologa, ma viene generata comunque una proteina in grado di localizzarsi a livello delle rotture a doppio filamento del DNA. Mutazioni in questo dominio causano letalità prenatale nei topi, mentre la delezione totale BRCA1 causa morte embrionale (in utero).

⌚ Dopo la regione codificata dall'esone 11 troviamo un dominio coiled-coil (CCD) necessario per l'interazione con Palb2 (Partner and localizer of BRCA2). Palb2 è richiesto per il processo di ricombinazione omologa di BRCA2 e di BRCA1, infatti sembra essere implicato nel reclutamento di RAD51 a livello dei siti danneggiati del DNA.

Mutazioni in questa regione sono state trovate in tumori al pancreas, prostata, seno ed ovaie (Erkko et al., 2007).

⌚ La parte terminale della proteina è caratterizzata dalle ripetizioni BRCT; questi motivi riconoscono dei residui di fosfoserina su diretti partners di BRCA1 (Abraxas, BACH1/BRIP1, CtIP) e sono richiesti per la localizzazione del complesso a livello dei siti del DNA danneggiati.

L'associazione *in vivo* con CtIP sembra essere essenziale affinché BRCA1 possa interagire con il complesso MRN (MRE11/RAD50/NBS1) implicato nel riconoscimento delle rotture a doppio filamento (Wang et al., 2012).

Il legame con Abraxas è invece implicato nell'attivazione del checkpoint G2/M in caso di danni al DNA, ad esempio, in seguito a radiazioni ionizzanti (Wang et al., 2007).

Delezioni a livello di questa regione danno origine a topi vitali, ma maggiormente predisposti all'insorgenza di cancro (Shakya et al., 2011).

### **1.2.2 IL GENE *MRE11***

Poiché in questa tesi abbiamo determinato se alcuni geni della riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA potessero influenzare l'effetto dell'espressione di BRCA1 in lievito, di seguito ho riportato una descrizione dei geni che abbiamo preso in considerazione.

Il gene *MRE11* (Meiotic Recombination), localizzato sul cromosoma 11 nell'uomo, codifica per una proteina che ha un ruolo fondamentale nei processi di ricombinazione omologa, riparazione dei double strand breaks e mantenimento dei telomeri (Petrini et al., 1995).

Questa proteina di 708 amminoacidi si associa nella cellula con RAD50 e NBS1 formando il complesso MRN, in grado di riconoscere le rotture del DNA a doppio filamento.

Grazie alla sua attività nucleasica, inizia il processo di riparazione digerendo il DNA a livello della rottura dall'estremità 3'.

Mutazioni a carico di questo gene sono state associate a situazioni patologiche, in particolare una sua sovraespressione incrementa il rischio di insorgenza di tumore al seno (Yuan et al., 2012).

La sua sovraespressione in linee cellulari di tumore al seno determina anche una maggiore radioresistenza grazie ad un incremento dei processi di riparazione del DNA ed una inibizione dell'apoptosi (Yuan et al., 2012).

E' stata anche dimostrata l'esistenza di due mutazioni germinali a carico di questo gene associate ad una ridotta efficienza del complesso MRN.

L'effetto di tali mutazioni rendono il gene *mre11* un valido candidato come gene di suscettibilità al tumore al seno in famiglie non mutate nei geni BRCA1/2 (Bartkova et al., 2008).

### **1.2.3 IL GENE *RAD50***

Il gene *Rad50*, localizzato sul cromosoma 5, codifica per una proteina anch'essa componente del complesso MRN.

Nello specifico la proteina RAD50 fornisce un controllo ATP dipendente a MRE11 svolgendo e/o riposizionando il DNA nel sito attivo di MRE11 (Trujillo et al., 1998).

Difetti in questo gene sono stati associati all'insorgenza della "Nijmegen breakage syndrome" caratterizzata da instabilità cromosomica, microcefalia e ritardo nella crescita (Waltes et al., 2009).

Diversamente dagli altri geni studiati in questo lavoro, mutazioni a carico di *rad50* sembrano non essere associate con un incremento del rischio di tumore al seno BRCA1/2 dipendenti (He et al., 2012).

### **1.2.4 IL GENE *RAD51***

Il gene *rad51*, localizzato sul cromosoma 15 in uomo, codifica per una proteina ricombinasi di 339 amminoacidi, che legandosi ad altre proteine della stessa famiglia forma un eterodimero in grado di legare il DNA (Galkin et al., 2006) l'omologo nei batteri è la proteina *recA*.

Il meccanismo con cui si forma il filamento non è ancora molto chiaro; sembra però che il filamento ssDNA rad51 raggiunga la lunghezza di circa 2µm (Hilario et al., 2009), e, una volta formatosi, contribuisca alla riparazione per ricombinazione omologa determinando l'invasione del cromatidio fratello dove è presente la lesione.

Per iniziare poi la fase finale della ricombinazione omologa è necessario che l'elicasi BACH1 spiazzi RAD51 dal filamento di DNA (Cantor and Andreassen., 2006).

BRCA1 sembra interagire indirettamente sulla funzione di RAD51 in quanto mantiene sotto controllo l'attività elicastica di BACH1 in modo da prevenire un disclocamento prematuro di RAD51.

La formazione e disassemblamento del filamento sembra sia anche regolato dalla proteina con attività elicastica SRS2, in particolare l'interazione di SRS2 con RAD51 causa un disassemblamento del filamento dal ssDNA causando così un'inibizione della riparazione dei danni al DNA tramite ricombinazione omologa (Karpenshif and Bernstein., 2012).

Sono stati effettuati studi su varianti alleliche del gene RAD51 ed è stato osservato che esistono alcuni polimorfismi presenti più frequentemente in pazienti affetti da tumore al seno, suggerendo che la variabilità allelica di questo gene possa giocare un ruolo nell'insorgenza della malattia (Sassi et al., 2013).

Sembra però che questo incremento del rischio non sia associato a mutazioni a livello di *BRCA1*. Al contrario, soggetti con mutazioni a livello di *brca2* mostrano una maggiore frequenza della patologia anche se non è presente alcuna alterazione del gene *rad51* (Antoniou and Chevenix-Trench., 2010).

Un'altra situazione patogenetica in cui questo gene sembra coinvolto è la Anemia di Fanconi dove una mutazione diallelica del gene *rad51C*, paralogo di *rad51*, determina un aumento della probabilità d'insorgenza della patologia (Somyajit et al., 2010).

### **1.3 IL MISMATCH REPAIR ED IL GENE *MSH6***

E' noto dalla letteratura che BRCA1 interagisce anche con le proteine implicate nel mismatch repair (Gowen et al., 2003), non è ancora totalmente chiaro il meccanismo di questa interazione, probabilmente le proteine del MMR sfruttano il legame con BRCA1 (che interagisce con la RNA polimerasi (Scully et al., 1997) per riconoscere il filamento trascritto da riparare o per impedire la formazione di complessi di trascrizione, in modo che frammenti di DNA danneggiati non vengano trascritti (Wang et al., 2000).

Il pathway del mismatch repair entra in gioco specificatamente nel caso di basi inserite in posizioni sbagliate (mismatch) o in caso di loop che possono verificarsi durante la replicazione, questi loop possono generarsi in seguito alla non corretta replicazione di sequenze ripetitive, dette anche microsatelliti (Vollebergh et al., 2012).

Il meccanismo riportato in figura 3 si divide in diverse fasi: le proteine hMSH formano eterodimeri (hMSH2/hMSH6 e hMSH2/hMSH3) che riconoscono i mismatch o i loop, questi eterodimeri reclutano un complesso formato dagli eterodimeri MLH1/PMS2, MLH1/PMS1 o MLH1/MLH3, questi facilitano l'excisione del DNA mismatch reclutando una esonucleasi.

Sfruttando lo strand complementare, stabilizzato da RPA, la polimerasi  $\delta$  e la PCNA risintetizzano il DNA.

Infine il nick viene riparato dalla ligasi LigI (Jiricny et al., 2006).

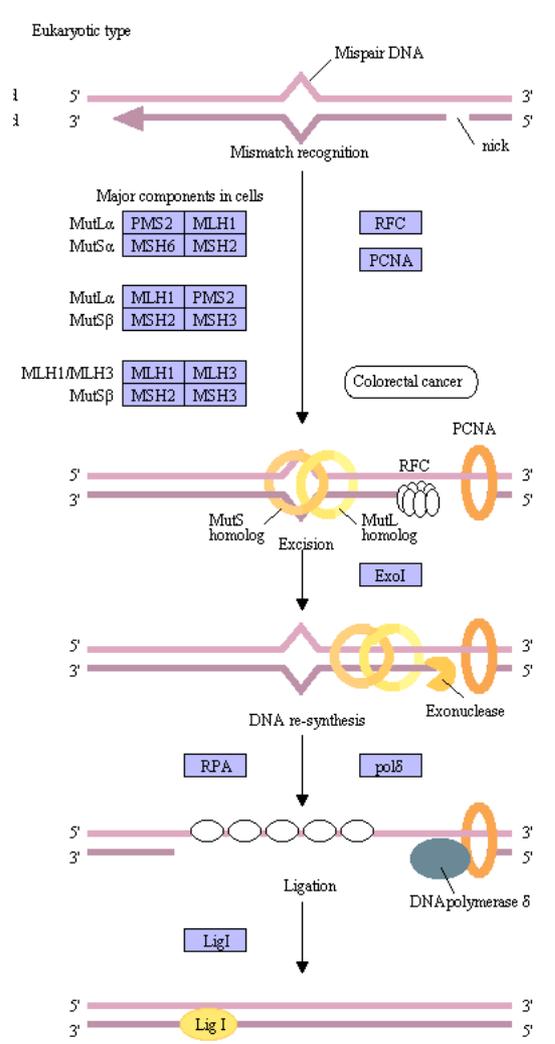


Figura 3: Pathway del mismatch repair negli eucarioti

Il gene *MSH6* è localizzato sul cromosoma 2 e codifica per una proteina che fa parte del sistema di riparazione del DNA post replicativa dei mismatch (MMR).

Dimerizzando con MSH2 forma il complesso MutS $\alpha$ , il quale lega i mismatch sul DNA iniziando così il processo di riparazione. Una volta riconosciuto il mismatch forma un complesso ternario legando MutL $\alpha$ , a questo punto l'attività ATPasica regola il legame il DNA similmente ad un cambiamento conformazionale.

In particolare la presenza del mismatch sulDNA genera una transizione da ADP ad ATP, questa conversione determina un cambiamento nella struttura di MutS $\alpha$  in una pinza scorrevole in grado di scorrere lungo il DNA in maniera idrolisi indipendente (Blackwell et al., 1998) (Gradia et al., 1999).

Forme mutate di questo gene sono state associate all' "hereditary non-polyposis colorectal cancer" (HNPCC) o sindrome di Lynch (Miyaki et al., 1997), tali mutazioni causano la produzione di una forma ridotta e non funzionale della proteina MSH6, di conseguenza si assiste ad un accumulo di danni al DNA non riparati attraverso il pathway del mismatch repair e quindi all'insorgenza della patologia.

Difetti in questo gene sembrano essere anche associati all'insorgenza del cancro al seno, nello specifico è stata studiata la sequenza di questo gene in soggetti HBCC (hereditary breast and colorectal cancer), in soggetti con tumore al seno non-HBCC ed in soggetti di controllo sani.

Da questo studio è risultato evidente la maggiore presenza di varianti molto rare di MSH6 nei due gruppi di soggetti con la patologia rispetto a quello di controllo, suggerendo che varianti mutate di MSH6 rare possono predisporre all'insorgenza del cancro (Wasielewski et al., 2010).

#### 1.4 SAGGI FUNZIONALI PER CARATTERIZZARE LE VARIANTI DI BRCA1

Grazie alle nuove tecniche di sequenziamento e associazione genetica (GWAS, Genome-wide association studies) è stato possibile identificare un gran numero di varianti alleliche di BRCA1.

Queste varianti sono state raccolte in diversi database o consorzi

- ⌚ BIC: Breast Cancer Information Core
- ⌚ CIMBA: Collaborators for the investigation of modifiers of BRCA1/2
- ⌚ ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleses), volto all'identificazione del ruolo delle diverse varianti di BRCA1/2 definite come UV (Unclassified variants) o VUS (Variants of Uncertain Significance) nella predisposizione al tumore al seno ed ovaio, consorzio di cui fa parte anche il nostro laboratorio.

E' possibile poi visualizzare il livello di rischio d'insorgenza di tumore conferito da ogni variante grazie alla classificazione IARC (*Internation Agency for Research on Cancer*), che classifica ogni variante con un numero da 1 a 5, maggiore è il numero e maggiore è la patogenicità della variante (tabella 1).

IARC Classification	
Class 1	Not pathogenic or of no clinical significance
Class 2	Likely not pathogenic or of little clinical significance
Class 3	Uncertain
Class 4	Likely pathogenic
Class 5	Definitely pathogenic

Tabella 1: Classi di patogenicità delle varianti di BRCA1 secondo la classificazione IARC

Vista la grande variabilità di questo gene risulta necessario mettere a punto dei saggi funzionali efficaci e veloci al fine di identificare il livello di pericolosità conferito da tali varianti.

Esistono diversi esempi di saggi funzionali in grado di discriminare le varianti in base alla loro patogenicità classificandole secondo il sistema IARC.

Alcuni di questi saggi sono indirizzati a quelle varianti che interessano un particolare dominio, ad esempio è stato sviluppato un saggio di doppio ibrido per studiare l'effetto delle

diverse varianti localizzate sul ring domain di BRCA1 e di come queste varianti influiscano sulla sua capacità di interagire con BARD1 o UbcH5a ed in ultima analisi di come varia la capacità ubiquitina ligasica (Morris et al., 2006).

I risultati hanno dimostrato che alcune varianti patogenetiche determinavano perdita del legame con UbcH5a, ma non del legame con BARD1, risultando in una diminuzione complessiva della capacità ubiquitina ligasica di BRCA1, l'espressione di una variante non patogenetica, invece, non dava questa diminuzione.

Vallon-Christersson et al., 2001 hanno messo a punto un saggio indirizzato al BRCT domain di BRCA1. E' riportato in letteratura che questo dominio influisce sull'attività trascrizionale (Dapic and Monteiro 2006), in particolare questo dominio, se fuso con un dominio eterologo di legame al DNA, è in grado di fungere d'attivatore trascrizionale attivando la trascrizione di un gene reporter.

E' stato quindi utilizzato il dominio di legame al DNA GAL4 di lievito o il repressore virale LexA fuso al dominio BRCT di BRCA1 in forma wt e con diverse varianti patogenetiche e neutre ed è stato valutata la capacità di trascrivere il gene reporter.

Altri saggi che prendono in considerazione il dominio BRCT sono stati sviluppati andando a studiare come le varianti patogenetiche influiscono sulla capacità di BRCA1 di legare peptidi target (Lee et al., 2010) o la sua sensibilità alle proteasi (Williams et al., 2003).

Esempi di saggi funzionali indipendenti dal dominio preso in considerazione sono, invece, quelli svolti nel lievito. In particolare esistono due saggi: lo "*small colony phenotype assay*" e lo "*yeast localization phenotype assay*".

Il primo saggio si basa sul fatto che BRCA1 nelle sue forme wt e neutre causa una riduzione nella crescita nel lievito, riduzione che non avviene invece nel caso delle varianti patogenetiche (Coyne et al., 2004). La causa di questa inibizione non è stata ancora chiarita ed esistono diverse teorie a riguardo.

Il secondo saggio invece si basa sul fatto che BRCA1 nella sua forma wt e neutra si localizza a livello del nucleo nelle cellule. Questa localizzazione è stata verificata tramite fusione di BRCA1 con la proteina fluorescente mCherry. Forme patogenetiche della proteina falliscono in questa localizzazione e si ritrovano a livello citoplasmatico. Questo test può essere una spiegazione dell'inibizione della crescita determinata dall'espressione di BRCA1 in lievito, infatti è stato proposto che tale inibizione dipenda da un'aggregazione della proteina a livello nucleare, aggregazione che invece non si può verificare nel caso delle varianti patogenetiche (Millot et al., 2011).

Un terzo saggio funzionale che sfrutta il lievito per classificare le varianti di BRCA1 e che è stato sviluppato anche nel nostro laboratorio è lo “yeast recombination assay”. Questo test studio l'effetto che ha BRCA1, nella sua forma wt e nelle sue diverse varianti, a livello della frequenza di ricombinazione omologa intra ed intercromosomica ed a livello della reversione genica. E' stato verificato che mentre l'espressione di BRCA1 wt non ha effetto su tale frequenza, l'espressione di alcune varianti patogenetiche determina un incremento di questa frequenza (Caligo et al., 2009).

Un ultimo esempio di saggio funzionale effettuato però in cellule tumorali di mammifero è quello svolto da Towler et al., 2012, dove vengono analizzate 13 varianti missenso di BRCA1 attraverso un sistema che sfrutta la proteina GFP.

Per la messa a punto di saggi funzionale sono state anche utilizzate le cellule HeLa, cellule tumorali immortalizzate provenienti da cancro della cervice uterina). Nel genoma di queste cellule sono stati integrati, due geni inattivi codificanti per la proteina GFP, uno dei quali possiede un sito di restrizione specifico per la nucleasi mitocondriale I-Sce1.

Esprimendo l'enzima di restrizione un sito viene tagliato e se il processo di ricombinazione omologa ha successo, sfruttando il secondo gene come template, allora si ha la formazione di un gene GFP attivo.

Riducendo la trascrizione di BRCA1 endogeno tramite un SiRNA ed esprimendo BRCA1 con la variante allelica tramite un plasmide, viene visualizzato come la presenza di tale mutazione influisca sull'efficienza della ricombinazione omologa.

Come ci si aspettava l'espressione di varianti classificate come patogenetiche determinano una forte riduzione nell'efficienza della riparazione del DNA.

Questi sono solo alcuni dei diversi test esistenti per classificare le diverse varianti di BRCA1 ancora non classificate. Molti di questi test devono ancora essere standardizzati ed è chiaro che c'è ancora molto lavoro da fare, però possono essere degli utili strumenti per avere un'indicazione sulla pericolosità delle mutazioni nei vari domini della proteina.

Le varianti studiate in questo lavoro di tesi e la loro classificazione in termini di rischio sono rappresentate nella tabella 2. Per uno studio comparativo più completo, oltre ad esprimere nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* 4 varianti neutre e 5 varianti patogenetiche cioè associate con un significativo rischio di tumore, abbiamo anche espresso la proteina BRCA1 wt.

Variante	Classificazione IARC
Y179C	1
N132K	1
N550H	1
S1512I	1
A1708E	5
M1775R	5
A1789T	5
I1766S	5
C61G	5

Tabella 2: Varianti BRCA1 studiate in questo lavoro di tesi

## 1.5 GENI MODIFICATORI DEL RISCHIO

Geni che, in qualche modo, sono in relazione con BRCA1/2, anche se non direttamente associati all'insorgenza della patologia possono fare, se mutati, da “modificatori” di rischio della tumorigenesi in pazienti che portano mutazioni a livello di BRCA1/2; varianti di BRCA1 che non sono considerate patogenetiche possono diventarlo se associate a mutazioni in altri geni implicati in pathway associati.

Studi su larga scala hanno portato all'identificazione di un gran numero di locus genetici che possono modificare il rischio di cancro (Couch et al., 2007)(Spurdle., 2005). Esempi di alcuni di questi geni modificatori del rischio sono elencati nella tabella 3:

GENE	PROTEINA	FUNZIONE
<i>rad51</i>	DNA repair protein RAD51	Ricombinazione omologa
<i>casp8</i>	Caspase 8	Processi apoptotici
<i>fgfr2</i>	Fibroblast growth factor receptor 2	Sviluppo embrionale e riparazione tessuti (ossa e vasi sanguigni)
<i>map3k1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	Network di fosforilazioni di enzimi in seguito a stimoli cellulari

Tabella 3: Esempi di geni modificatori del rischio (Milne and Antoniou., 2011)

Fino a questo momento, però, il numero di geni che possono modificare il rischio di tumore identificati è molto limitato e spiega solo una piccola percentuale dei casi (2,2% in BRCA1 e 5,2% di BRCA2); indice del fatto che esistono ancora diversi elementi da identificare.

Dal momento che, l'effetto svolto da questi modificatori è relativamente basso è necessario un gran numero di dati per ottenere dei risultati statisticamente validi (Antoniou et al., 2010) ed è quindi necessario un continuo accumulo di dati da parte dei diversi database implicati (es: CIMBA). Inoltre, i dati di associazione genetica che hanno permesso su base statistica di identificare queste modificazioni in pazienti portatori di mutazioni BRCA1 o BRCA2, non permettono di identificare eventuali ruoli funzionali fra questi geni “modificatori” e BRCA1.

In questo senso entra in gioco l'utilità del lievito *Saccharomyces cerevisiae* in quanto permette di analizzare separatamente i vari modificatori e permette di ottenere più velocemente dei dati statisticamente validi e che possono dare indicazioni sull'effetto dei vari geni implicati. I risultati ottenuti nel nostro laboratorio in collaborazione con la sezione di Genetica Oncologica dell' Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, indicano che l'espressione di alcune varianti missenso di BRCA1 associate a tumore nel ceppo aploide RSY6 di *Saccharomyces cerevisiae* difettivo nel mismatch repair perchè deleto del gene MSH2, determina un aumento di reversione genica. Inoltre, studi effettuati in pazienti portatori di mutazioni BRCA1 hanno evidenziato un'associazione con alterazioni del gene MSH2; cioa suggerisce che la genetica di lievito può dare indicazioni sul ruolo della riparazione del DNA nella determinazione del rischio di tumore dovuto a BRCA1.

## 1.6 SCOPO DELLA TESI

Il progetto in cui si inserisce il mio lavoro di tesi ha come scopo finale quello di capire se la genetica del lievito *Saccharomyces cerevisiae* può dare un contributo per capire il ruolo funzionale dei geni della riparazione del DNA nella determinazione o modificazione del rischio di tumore dovuto a mutazioni di BRCA1. Dalla letteratura e da studi precedenti svolti nel nostro laboratorio sappiamo che l'espressione di varianti patogenetiche di BRCA1 determina un aumento nella frequenza di ricombinazione e mutazione del lievito, effetto non riscontrato invece con l'espressione delle varianti neutre.

Lo scopo di questa tesi è esprimere queste varianti in ceppi di lievito deleti per particolari pathway di riparazione del DNA in modo da analizzare se queste mutazioni determinano una differenza nella frequenza di ricombinazione e mutazione e che quindi possano, in ultima analisi, fare da modificatori del rischio di tumorigenesi in pazienti che portano tali varianti di BRCA1.

In particolare siamo andati a svolgere questo studio in quattro ceppi di lievito deleti nei geni: *rad51*, *rad50*, *mre11* e *msh6*.

L'espressione di BRCA1 wt inibisce la crescita in lievito (Coyne et al., 2004). Studi condotti nel nostro laboratorio hanno messo in evidenza che l'effetto inibitorio sulla crescita può essere dovuto ad un "blocco" generale della trascrizione con conseguente aumento dei danni al DNA (Bennett et al., 2008). Poiché, il ruolo dei pathway della riparazione del DNA su questo fenotipo non è completamente chiaro, abbiamo determinato se l'effetto sulla crescita determinato dall'espressione di varianti BRCA1 associate a tumore possa essere in qualche modo modulato da questi pathway. Infine, questo lavoro potrebbe anche chiarire alcuni aspetti sulle funzioni di BRCA1 che sono più direttamente coinvolte nella insorgenza del tumore.

## CAPITOLO 2: Materiali e Metodi

### 2.1 CEPPO RSY6

Il ceppo aploide RSY6 è stato costruito da Robert Schiestl tramite integrazione del plasmide pRS6.

Questo plasmide contiene una parte interna del gene HIS3 ed il marcatore LEU2. L'integrazione del plasmide per ricombinazione omologa nel genoma del lievito determina l'interruzione del gene HIS3 e integrazione del gene LEU2, pertanto il ceppo di lievito è in grado di crescere in terreno privo di leucina ma non in terreno privo di istidina.

Tale integrazione determina la formazione di due alleli his3, uno con delezione all'estremità 3' ed uno al 5' e separati dal marcatore LEU2.

I due alleli condividono 400 pb di omologia, quindi possono andare incontro ad un evento di ricombinazione intracromosomica ripristinando così il fenotipo HIS3+ con perdita del gene LEU2, dunque il ceppo acquista così la capacità di crescere in terreno privo di istidina, ma non in quello senza leucina.

Il ceppo RSY6 è stato utilizzato in studi per determinare il meccanismo e il controllo genetico della ricombinazione intracromosomica (Galli et al., 2003) ed è stato dimostrato che questo tipo di eventi avvengono in ogni fase del ciclo cellulare e sono indotti principalmente da rotture a doppio filamento del DNA (Cervelli 2000, Galli 1995, 2009).

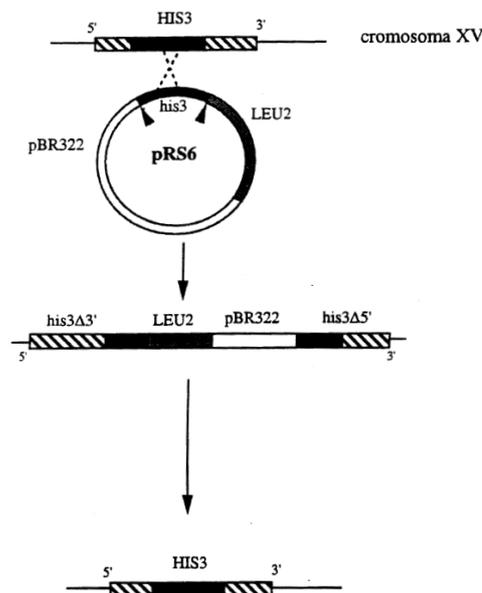


Figura 4: L'integrazione dell'allele LEU2 ed interruzione di HIS3 determina la formazione di un substrato di ricombinazione intracromosomica. Un evento di ricombinazione tra gli alleli *his3* deleti determina il ripristino del gene *HIS3* wild type e perdita del marcatore *LEU2*

Un'altra caratteristica di questo ceppo è la presenza del marcatore di selezione *ilv1-92*, tale mutazione impedisce a questo ceppo di crescere in terreno privo di isoleucina.

È possibile sfruttare questo fenotipo per studiare la reversione genica, ovvero un evento per cui una mutazione a livello di *ilv1-92* reverte il fenotipo da mutante a selvatico permettendo così al lievito di crescere in terreno privo di isoleucina. Questo marcatore è utilizzato generalmente in studi di mutagenesi ambientale ed è presente nel ceppo diploide D7 (Zimmermann and Scheel., 1984). Recentemente, è stato definito che i revertanti ILV1 indotti da agenti mutageni possono essere sia dovuti a reversione vera che a soppressione estragenica (Hoffman et al., 2009).

Studi recenti svolti nel nostro laboratorio hanno verificato che tutti i revertanti hanno una sostituzione di una singola base nel nucleotide 690 da G ad A e si presume, quindi, che l'evento di reversione non si tratti di una reversione vera o di una retro mutazione, ma piuttosto di una reversione estragenica. Ad esempio è possibile che il tRNA legga il codone mutato ed effettui una sostituzione accettabile dell'amminoacido.

Nella tabella 4 sono riportati i ceppi da me utilizzati ed il corrispondente genotipo:

<b>CEPPO</b>	<b>GENOTIPO</b>
<b>RSY6 WT</b>	MATa RAD <i>ura3-52 leu2-3,-112 trp5-27 arg4-3</i> <i>ade2-40 ilv1-92 HIS3::pRS6</i>
<b>RSY6 rad51Δ</b>	MATa <i>rad51::hisG ura3-52 leu2-3,-112 trp5-27 arg4-3</i> <i>ade2-40 ilv1-92 HIS3::pRS6</i>
<b>RSY6 mre11Δ</b>	MATa <i>mre11::hisG ura3-52 leu2-3,-112 trp5-27 arg4-3</i> <i>ade2-40 ilv1-92 HIS3::pRS6</i>
<b>RSY6 rad50Δ</b>	MATa <i>rad50::hisG ura3-52 leu2-3,-112 trp5-27 arg4-3</i> <i>ade2-40 ilv1-92 HIS3::pRS6</i>
<b>RSY6 msh6Δ</b>	MATa <i>msh6:: kanMX4 ura3-52 leu2-3,-112 trp5-27 arg4-3</i> <i>ade2-40 ilv1-92 HIS3::pRS6</i>

Tabella 4: Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* usati in questo lavoro di tesi

## 2.2 IL PLASMIDE pYES

I plasmidi sono frammenti di DNA circolare a doppia elica naturalmente presenti nei batteri. Molti di essi hanno un sistema di replicazione autonomo indipendente da quello del genoma della cellula.

La loro principale funzione in biologia molecolare è quella di fungere da vettori, ovvero vengono trasformati all'interno di cellule (di lievito in questo caso) in modo da trasferire, così, frammenti di DNA non naturalmente presenti all'interno di quelle cellule.

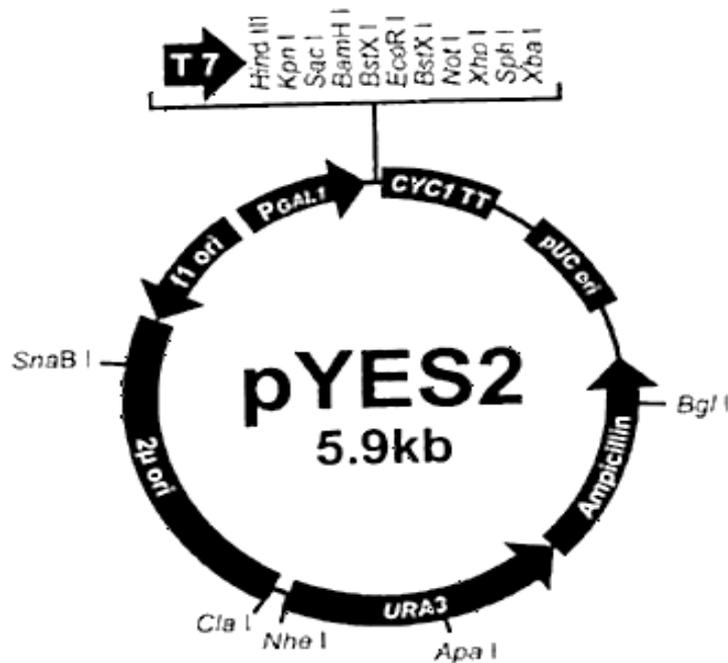


Figura 5: Schema del plasmide pYES2

Il plasmide da noi utilizzato è il plasmide pYES2, è un vettore d'espressione specifico per lievito e le sue caratteristiche sono:

- ⌚ GAL1 promoter: promotore inducibile dal galattosio specifico per l'espressione di proteine in
- ⌚ *S. cerevisiae*
- ⌚ T7 promoter: promotore per l'RNA polimerasi T7
- ⌚ Terminatore della trascrizione del gene CYC1
- ⌚ Origine di replicazione batterica
- ⌚ Gene per resistenza all'ampicillina (per la selezione nei batteri trasformati con questo plasmide)
- ⌚ Gene URA3: per la selezione delle cellule di lievito trasformate

- ⌚ 2μ: origine di replicazione del lievito
- ⌚ Origine fl
- ⌚ Sito multiplo di clonaggio

Nel nostro caso vengono utilizzati 11 diversi plasmidi: uno contenente solo la sequenza del plasmide, uno contenente la sequenza del plasmide più il cDNA di BRCA1 wt e poi altri 9 vettori contenenti ognuno una diversa variante di BRCA1.

### 2.3 TERRENI DI COLTURA

Vengono utilizzati due diversi tipi di terreni ai fini dei nostri esperimenti: terreno completo o terreno selettivo, entrambi possono essere sottoforma liquida o solida con l'aggiunta di agar.

500ml di terreno completo o YPAD è composto da:

- ⌚ 10g di BACTOPEPTONE
- ⌚ 5g di YEAST EXTRACT
- ⌚ 10 g di GLUCOSIO
- ⌚ 500ml di acqua distillata
- ⌚ eventuale aggiunta di 10g di AGAR nel caso della preparazione di terreno solido

Il terreno selettivo è un terreno in cui vengono a mancare una o più fonti di amminoacidi in modo da selezionare quei ceppi che sono in grado di prodursi quegli amminoacidi in maniera autonoma e senza assorbirli dal terreno.

Per 500ml di terreno si usano:

- ⌚ 4g di YEAST NITROGEN BASE
- ⌚ 10g di GLUCOSIO o 25g di GALATTOSIO
- ⌚ 0,4g di mix di amminoacidi privo di uno o più amminoacidi
- ⌚ 500ml di acqua distillata
- ⌚ eventuale aggiunta di 10g di AGAR nel caso di terreni solidi

Nel nostro caso sono stati preparati i seguenti terreni selettivi:

- ⌚ -URA = per selezionare le cellule trasformate con il plasmide Pyes
- ⌚ -URA -LEU = per selezionare le cellule trasformate e che ancora non hanno effettuato ricombinazione omologa con il plasmide
- ⌚ -HIS e -ILE = per calcolare rispettivamente la frequenza di ricombinazione intracromosomica e mutazione
- ⌚ YAPD + G418 = per selezionare le cellule in cui è avvenuto il processo di gene targeting, il G418 viene aggiunto al terreno ad una concentrazione finale di 200µg/ml.

Un ultimo tipo di terreno è il terreno LB sia liquido che solido necessario per la crescita dei batteri.

Per 500ml di terreno sono necessari:

- ⌚ 5g di TRIPTONE
- ⌚ 2,5g di YEAST EXTRACT
- ⌚ 2,5g di NaCl
- ⌚ 0,5ml di NaOH 1N
- ⌚ 500ml di acqua distillata

Successivamente viene aggiunta ampicillina (100mg/ml) diluita 1:1000 per assicurarsi la crescita solo dei nostri batteri, i quali se trasformati con il plasmide pYES2 risultano resistenti all'antibiotico.

Dopo la preparazione e l'aggiunta di H<sub>2</sub>O tutti i terreni vengono sterilizzati in autoclave per 18min a 118° prima del loro utilizzo.

## 2.4 TRASFORMAZIONE BATTERICA CON DNA PLASMIDICO

Tutti i plasmidi utilizzati in questo studio vengono mantenuti in cellule batteriche e conservati a -80°C. Ogni plasmide viene quindi trasformato in cellule competenti di *Escherichia coli* DH5α.

Il protocollo di trasformazione è il seguente:

- ⌚ 100µl di sospensione batterica alla quale vengono aggiunti 5µl di DNA plasmidico ( 20-100ng di DNA)
- ⌚ 100µl di sospensione batterica alla quale vengono aggiunti 5µl di H<sub>2</sub>O, questo sarà il

nostro controllo negativo

- ⌚ incubazione per 30min in ghiaccio
- ⌚ 1min in bagnetto a 42° per indurre lo shock termico e favorire il processo di trasformazione
- ⌚ diluizione delle cellule con 900µl di terreno LB liquido
- ⌚ incubazione per 30-40min a 37° per favorire la proliferazione dei batteri
- ⌚ piastratura di 100µl di ogni aliquota in terreno LB solido contenente l'antibiotico ampicillina (100µg/l)
- ⌚ incubazione delle piastre a 37° per 17-24 ore.

Solo le cellule trasformate esprimeranno la β-lattamasi che degrada l'ampicillina e rende così possibile la crescita dei batteri nelle piastre.

## **2.5 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DA BATTERI**

L'estrazione del DNA plasmidico viene effettuato usando un kit commerciale della Promega© chiamato "*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System*".

Il protocollo è il seguente:

- ⌚ Ottenimento di un pellet da una coltura overnight di 1-10ml di batteri tramite centrifuga a 3000rpm per 5min.
- ⌚ Risospensione del pellet in 250µl di Cell Resuspension Solution
- ⌚ Aggiunta di 250µl di Cell Lysis Solution ad ogni campione ed invertire le eppendorf 4 volte
- ⌚ Aggiunta di 10µl di Alkaline Proteasi Solution, invertire 4 volte
- ⌚ Lasciare 5min a temperatura ambiente
- ⌚ Aggiunta di 350µl di Neutralization Solution, invertire 4 volte
- ⌚ Centrifugare a 13000rpm per 10min
- ⌚ Recuperare il sovrantante e trasferirlo in una Spin Column
- ⌚ Centrifugare a 13000rpm per 1min
- ⌚ Eliminare l'eluito e rimettere la colonnina nel Collection Tube
- ⌚ Aggiunta di 750µl di Wash Solution (con etanolo) e centrifugare a 13000rpm per 1min
- ⌚ Eliminazione dell'eluito e ripetere lo step con 250µl di Wash Solution

- ⌚ Centrifugare a 13000rpm per 2min
- ⌚ Trasferire la Spin Column in una eppendorf da 1,5ml e aggiungere 50µl di acqua distillata
- ⌚ Centrifugare per 1min a 13000rpm e recuperare l'eluato dove sarà presente il nostro plasmide.

Alla fine del procedimento si corrono 5µl di campione su gel di agarosio all'1% per verificare la presenza del plasmide.

## 2.6 TRAFORMAZIONE DI *S. cerevisiae* CON DNA PLASMIDICO

Una volta ottenuto il plasmide questo deve essere trasformato all'interno delle cellule di lievito, per fare questo si usa il protocollo di trasformazione messo a punto da Robert Schiestl (Gietz and Schiestl., 2007):

- ⌚ Inoculo di una colonia di lievito in 10ml di YPAD
- ⌚ Dopo crescita di 17-24 re a 30C, la coltura viene diluita 4 volte mediante aggiunta di 50ml terreno fresco YPAD e incubata a 30°C per 3-4 ore in modo da riportare le cellule alla fase esponenziale di crescitaLe cellule vengono lavate due volte in acqua sterile tramite centrifugazione a 3000rpm per 5min
- ⌚ Risospensione del pellet in volume variabile (0,5-1ml) di acqua distillata in base al numero di trasformazioni da fare
- ⌚ Trasferimento di 0,1ml della crescita in tante eppendorf quante sono le trasformazioni da fare, più un'altra eppendorf che farà da controllo negativo
- ⌚ Ottenimento del pellet in ogni eppendorf tramite centrifuga a 13000rpm per 1min

A questo punto ad ogni eppendorf vengono aggiunti

- ⌚ 240µl di PEG 3500 50%, il PEG causa uno shock osmotico alle cellule favorendo così l'assorbimento di acqua dall'ambiente esterno.
- ⌚ 36µl di Litio Acetato 1M, il litio acetato aumenta la permeabilità della parete
- ⌚ 50µl di DNA a singolo filamento (ssDNA). il ssDNA viene aggiunto in quantità maggiore rispetto al DNA plasmidico in modo da favorire la sua degradazione da parte delle nucleasi cellulari piuttosto che quella del plasmide.

- ⌚ 34µl di H<sub>2</sub>O + DNA plasmidico, il volume di DNA inserito dipende dalla sua concentrazione, nel controllo negativo verranno aggiunti 34µl di sola acqua

Il pellet viene risospeso in questo mix di soluzione tramite vortex e poi viene messo in bagnetto a 42° per 45min.

Infine vengono piastrati 100µl da ogni eppendorf in piastre -URA in modo che riescano a crescere solo le cellule effettivamente trasformate con il plasmide.

## 2.7 GENE TARGETING

Per Gene Targeting si intende un procedimento di trasformazione dove le cellule vengono trasfettate non con DNA plasmidico, ma con un frammento di DNA che dovrà andarsi ad integrare in una regione specifica del genoma del lievito.

Lo scopo è quello di andare ad interrompere un gene specifico sostituendolo con una cassetta di resistenza all'antibiotico G418 in modo che solo le cellule che hanno effettuato l'integrazione saranno in grado di sopravvivere.

Nel nostro caso il gene in questione che andiamo ad interrompere è il gene *msh6* del ceppo di lievito RSY6.

Tale gene codifica per una proteina responsabile del processo di mismatch repair, andiamo così a creare un ceppo delecto per questo particolare pathway che ci sarà utile al fine di studiare il processo di riparazione del DNA.

Il protocollo è identico a quello di trasformazione con la differenza che andiamo a trasformare non con DNA plasmidico ma con un frammento di DNA amplificato per PCR.

Un'altra differenza consiste nel fatto che la selezione delle cellule effettivamente trasformate viene effettuata andando a piastrare 100µl in terreno solido YAPD+G418 con G418 (50mg/ml) diluito 250 volte.

## 2.8 AMPLIFICAZIONE DEL DNA TRAMITE PCR

La PCR (polymerase chain reaction) è una tecnica che ci permette di amplificare una sequenza di DNA. Lo scopo è quello di ottenere tale sequenza in grande quantità in modo da poterla utilizzare per studi successivi, come esperimenti di gene targeting.

La metodica si basa sull'utilizzo di due primers che sono oligonucleotidi complementari a due sequenze poste all'estremità della sequenza da amplificare.

Per avviare la reazione sono necessari:

- ⌚ Buffer, contenete i tamponi necessari per la reazione
- ⌚ dNTPs, nucleotidi privi del gruppo ossidrilico al 3'
- ⌚ Primer forward e primer reverse, oligonucleotidi complementari alle sequenze poste ai lati della cassetta da amplificare
- ⌚ DNA templatò dove si troverà la sequenza da amplificare
- ⌚ Polimerasi estratta da microrganismo termofilo in grado quindi di funzionare ad alte temperature senza denaturarsi

I vari volumi delle componenti dipendono dal kit utilizzato, in generale il volume finale di reazione viene portato a 50µl con acqua sterile.

La tecnica si divide poi in tre fasi:

- ⌚ fase di separazione, dove la sequenza double strand viene separata aumentando la temperatura
- ⌚ fase di annealing, dove si ha l'appaiamento dei primers con le sequenze complementari sul DNA templatò, la temperatura di annealing dipende dalla composizione in basi dei primers
- ⌚ fase di allungamento, dove la DNA polimerasi polimerizza la sequenza utilizzando i primers come punti di partenza

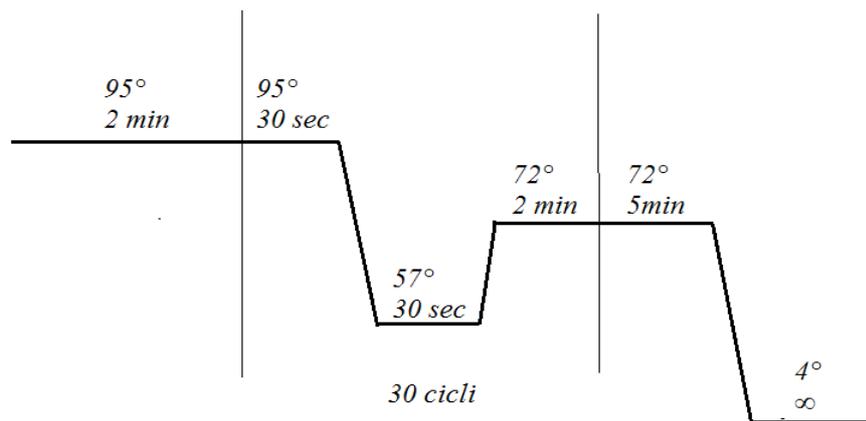


Figura 6: Schema di una procedura di PCR, le tre fasi tra le linee verticali vengono ripetute per 30 volte.

Queste fasi vengono ripetute per 25/30 volte per ottenere una concentrazione abbastanza alta di DNA amplificato.

### 2.8.1 YEAST COLONY PCR

La Yeast Colony PCR è una metodica utilizzata per amplificare un frammento di DNA genomico direttamente da una colonia di lievito.

Il protocollo è il seguente:

- ⌚ Risospensione della colonia in 50µl di acqua distillata
- ⌚ Aggiunta di 0,5µl di enzima Zymoliasi (10000U/ml)
- ⌚ Incubazione a 30° per 1hr
- ⌚ centrifuga a 13000rpm per 30sec
- ⌚ eliminazione del sovrantante ed incubazione del pellet a 100° in bagnetto a secco per 5min
- ⌚ risospensione del pellet in 50µl di acqua distillata
- ⌚ utilizzo di 10µl della risospensione come template per la PCR

### 2.9 ESTRAZIONE DI DNA GENOMICO DA LIEVITO

L'estrazione del DNA genomico da lievito è necessario al fine di effettuare successive PCR per verificare, ad esempio, un corretto gene targeting.

Il protocollo e le soluzioni utilizzate sono fornite dal *MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit*:

- ⌚ inoculo overnight di una colonia o di un pezzetto di striscio di lievito
- ⌚ recuperare il pellet in eppendorf da 1,5ml tramite centrifuga a 13000rpm per 1min
- ⌚ risospendere il pellet in 300µl di Yeast Cell Lysis Solution
- ⌚ incubare a 65 °C per 15min
- ⌚ mettere il campione in ghiaccio per 5min
- ⌚ aggiungere 150µl di MPC Protein Precipitation Reagent e vortexare per 10sec
- ⌚ centrifugare per 10min a 13000rpm
- ⌚ trasferire il sovranatante in una eppendorf nuova ed aggiungere 500µl di isopropanolo
- ⌚ centrifugare per 10min a 13000rpm
- ⌚ rimuovere il sovranatante e lavare il pellet con 500µl di etanolo al 70%
- ⌚ centrifugare a 13000rpm per 1min e rimuovere l'etanolo
- ⌚ lasciare qualche minuto le eppendorf con il tappo aperto in modo che ogni residuo di etanolo evapori
- ⌚ risospendere il pellet in 35µl di acqua sterile
- ⌚ aggiungere 1µl di RNasi A 0,5µg/µl ed incubare a 37° per 30min per rimuovere i residui di RNA

Finiti questi passaggi si verifica l'effettiva estrazione correndo 5µl del campione in gel di agarosio 1%.

## **2.10 SAGGIO DI RICOMBINAZIONE OMOLOGA E REVERSIONE GENICA**

Tramite questo saggio si cerca di valutare la frequenza di ricombinazione intracromosomica e di reversione genica direttamente su piastra.

Viene espresso BRCA1 WT e le sue varianti in ceppi di lievito mutati per determinati pathway ed andando a fare un rapporto tra le colonie presenti nel terreno completo e quelle nei terreni selettivi si vanno a calcolare le frequenze.

Il protocollo è il seguente:

- ⌚ Inoculo dei ceppi con con i diversi plasmidi in 5ml di terreno -URA -LEU glu in modo

che riescano a crescere solo le cellule trasformate con il plasmide ma che ancora non hanno effettuato ricombinazione

- ⌚ il giorno dopo viene sostituito il terreno con 5ml di -URA -LEU gal per indurre l'espressione di BRCA1
- ⌚ il giorno successivo vengono recuperate le cellule, risospese in 1 ml di acqua distillata e piastrate nei diversi terreni a diverse diluizioni
- ⌚ diluizione  $10^{-5}$  in terreno completo YAPD dove riusciranno a crescere tutte le cellule
- ⌚ diluizione  $10^{-2}$  in terreno -HIS dove solo le cellule che hanno effettuato ricombinazione intracromosomica riusciranno a crescere
- ⌚ direttamente dalla coltura madre risospesa in 1ml di acqua in terreno -ILE dove solo le cellule che hanno revertito la mutazione riusciranno a crescere

Partendo da una coltura in fase stazionaria dovremmo avere circa  $10^6/10^7$  cellule/ml

Andando a fare un rapporto tra le colonie contato su terreno completo e quello sui terreni selettivi, ed andando a moltiplicare questo rapporto per i vari fattori di diluizioni, otteniamo dei valori di frequenza di ricombinazione e reversione genica.

Le frequenze base per questi eventi sono di  $1,5 \cdot 10^4$  per quanto riguarda la frequenza di ricombinazione e di  $0,5 \cdot 10^6$  per quanto riguarda quella di mutazione, possiamo quindi valutare quanto le frequenza trovate nei ceppi mutati che esprimono BRCA1 differiscano da quelle base.

FREQUENZA RICOMBINAZIONE	N° colonie in terreno -HIS* $10^{-2}$
	N° colonie in terreno YAPD* $10^{-5}$
FREQUENZA MUTAZIONE	N° colonie in terreno -ILE
	N° colonie in terreno YAPD* $10^{-5}$

## 2.11 WESTERN BLOT

Il Western Blot è una metodica volta a dimostrare l'effettiva espressione di determinate proteine

Nel nostro caso viene sfruttata per verificare che i nostri ceppi esprimano BRCA1.

### *ESTRAZIONE DELLE PROTEINE:*

La prima parte consiste nell'estrazione delle proteina dai nostri campioni:

Partendo da una crescita overnight in 10ml di terreno -URA -LEU glu e successivamente indotta in -URA -LEU gal si recupera il pellet centrifugando a 3000rpm per 5min.

Il pellet viene risospeso in 500µl di Lysis Buffer G composto da:

- ⌚ Sorbitolo 300mM
- ⌚ Tris HCl pH 7,4 10mM
- ⌚ NaCl 500mM
- ⌚ MgCl<sub>2</sub> 5mM
- ⌚ EDTA 5mM

Per ogni 5ml di soluzione finale si aggiungono 120µl di PMSF 100mM (fluoruro di fenilmetansulfonile) per rompere la parete e 1/2 pasticca di Protease inibhitor cocktail della Roche© per ridurre l'effetto delle proteasi.

A questo punto vengono aggiunti 500µl ad ogni campione da estrarre + 1g di glass beads.

Si vortexano tutti i campioni per 1 minuto per 4 volte alternando ad ogni vortexata 1min in ghiaccio.

A questo punto recupero il sovrantante e aggiungo 5µl di triton X-100 all'1%.

Centrifugo per 15min a 4° e conservo i campioni a -20°.

### *QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE CON SAGGIO BRADFORD*

Il reagente *Bradford* è un colorante blue comassie che si lega alle proteine e determina una colorazione blu alla soluzione.

Leggendo l'assorbanza a 595nm e interpolando i valori ad una retta di calibrazione si riesce a ricavare le concentrazioni dei campioni proteici.

La retta di calibrazione si costruisce andando a ricavare i valori di assorbanza di una proteina

a concentrazione nota, nel nostro caso la BSA 2mg/ml.

Il colorante *Bradford* deve essere diluito 1:5, quindi ne mettiamo 40 $\mu$ l in un volume finale di 200 $\mu$ l.

Si misurano diversi valori di assorbanza a concentrazione crescente di BSA in particolare si effettuano 5 misurazioni:

- ⌚ Standard0 160 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford*
- ⌚ Standard1 159 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 1 $\mu$ l di BSA
- ⌚ Standard2 158 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 2 $\mu$ l di BSA
- ⌚ Standard3 156 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 4 $\mu$ l di BSA
- ⌚ Standard4 152 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 8 $\mu$ l di BSA

Per ogni campione si effettuano due diluizioni 1:100 e 1:200:

- ⌚ Diluizione 1:100 : 158 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 2 $\mu$ l di campione
- ⌚ Diluizione 1:200 : 159 $\mu$ l di H<sub>2</sub>O + 40 $\mu$ l di *Bradford* + 1 $\mu$ l di campione

A questo punto si misura l'assorbanza allo *SpectraCount* ottenendo valori compresi tra 1-3 $\mu$ g/ $\mu$ l.

### CORSA ELETTROFORETICA

La corsa elettroforetica ha lo scopo di separare le diverse proteine presenti nel campione in base alle loro dimensioni.

Il gel di corsa è diviso in due parti:

#### SEPARATING GEL

H <sub>2</sub> O	1,9ml
Acrilammide	1,7ml
Tris HCl pH 8,8	1,3ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
APS	50 $\mu$ l
Temed	2 $\mu$ l
Tot	5ml

## STACKING GEL

H <sub>2</sub> O	1,4ml
Acrilammide	330µl
Tris HCl pH 6,8	250µl
SDS 10%	20µl
APS	20µl
Temed	2µl
Tot	2ml

Una volta preparato il gel viene messo nella vaschetta e viene aggiunto il buffer di corsa sia nella vaschetta che nell'apparato di corsa.

Vengono caricati i campioni ed il marker nei pozzetti e viene impostato il macchinario a circa 120/160 volt.

Vedendo le posizioni delle bande del marker posso capire quando interrompere la corsa.

### *TRASFERIMENTO SU MEMBRANA*

Una volta interrotta la corsa viene recuperato il gel e viene posto nel macchinario per il trasferimento detto *sandwich* costituito da:

- ⌚ spugna imbevuta nel liquido di trasferimento
- ⌚ 3 fogli di carta assorbente imbevuta nel liquido di trasferimento
- ⌚ gel
- ⌚ membrana di nitrocellulosa imbevuta nel *transfert*
- ⌚ altri 3 fogli di carta assorbente imbevuti
- ⌚ spugna imbevuta

Fatto questo chiudo il dispositivo per il *sandwich* e metto nella vaschetta per il trasferimento riempita con il *transfert*.

Imposto il macchinario a 250 mA per 1hr e 15min.

Al termine del tempo recupero la membrana dove si saranno trasferite le proteine.

Per visualizzare le proteine posso colorare con ponceau 1X in modo da evidenziare le bande

delle proteine.

### *IBRIDAZIONE CON ANTICORPO*

Per verificare la presenza di BRCA1 tra le proteine estratte e trasferite sulla membrana si effettua un'ibridazione con un anticorpo primario anti-BRCA1 (*Santa-cruz Biotechnology*©) ed un anticorpo secondario anti-mouse IgG-HRP (*Santa-cruz Biotechnology*©) che riconoscerà il primario.

Gli anticorpi vengono diluiti in MILK 0,5%, il primario viene diluito 1:200 ed il secondario 1:2000.

Per l'ibridazione si utilizza lo Snap<sub>ID</sub> della *Millipore*:

La membrana con le proteine trasferite viene posta dentro il blocchetto per lo snap con la superficie con le proteine legate rivolta verso l'alto.

A questo punto viene messo un volume variabile di Blocking Solution (MILK 0,5%) sulla superficie del blocchetto e quindi sulla faccia della membrana con le proteine legate in modo da favorire la successiva ibridazione con gli anticorpi.

La Blocking viene tenuta per 15 minuti ed il volume dipende dalle dimensioni della membrana.

Finiti i 15min viene aperto il vuoto in modo che tutta la blocking venga risucchiata e la membrana risulti asciutta.

Adesso mettiamo nell'ordine:

- ⌚ anticorpo primario per 12 minuti
- ⌚ tre lavaggi con TBST 1X per eliminare gli anticorpi non legati
- ⌚ anticorpo secondario per 12 minuti
- ⌚ tre lavaggi con TBST 1X per eliminare di nuovo gli anticorpi liberi

A questo punto possiamo recuperare la membrana dove se BRCA1 era presente si saranno legati gli anticorpi primari e quindi anche il secondario.

### *SVILUPPO*

Gli anticorpi secondari sono coniugati con l'enzima perossidasi di rafano, che è in grado di reagire con il substrato *SuperSignal West Pico Chemilumnescent* della *Thermo Scientific*, la reazione determina liberazione di fluorescenza che è in grado di impressionare una lastra

fotografica.

Se tutto procede senza problemi avremo quindi una lastra con delle bande in corrispondenza delle posizioni della membrana dove si trova BRCA1.

Il protocollo è il seguente:

- ⌚ La membrana viene bagnata con il SuperSignal diluito 1:2 o puro e viene posta dentro una bustina trasparente
- ⌚ sopra la busta ed in corrispondenza della membrana viene posizionata la lastra fotografica
- ⌚ a questo punto si chiude il tutto dentro una cassetta per un tempo variabile, maggiore è la concentrazione delle proteine legate e minore sarà il tempo necessario affinché la lastra si impressioni
- ⌚ finito il tempo di esposizione si recupera la lastra e si mette prima nel liquido di sviluppo finché non si vedono comparire le bande e poi nel liquido di fissaggio per fissare la lastra in quella situazione

Eventualmente è possibile rimuovere gli anticopri dalla membrana tramite lo stripping, che si effettua ponendo la membrana in acqua scaldata ad 80° per 20 minuti.

Una volta rimossi gli anticorpi è possibile effettuare nuovamente l'ibridazione con l'anticorpo e lo sviluppo.

## **2.12 SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA**

L'espressione di BRCA1 determina una diminuzione nella crescita del lievito, probabilmente a causa di accumulo di danni al DNA.

Lo scopo di questo saggio è di verificare le differenze in questa inibizione in ceppi di lievito con diversi pathway mutati in seguito ad espressione di BRCA1 wt e delle sue varianti.

La procedura del saggio consiste nel fare 5 diversi spot di 20µl ognuno diluito 1:10 rispetto allo spot precedente partendo da 1ml di crescita madre.

Quindi otteniamo cinque diversi spot a diluizione decrescente ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ).

Questi spot vengono fatti su piastre quadrate -URA glu e -URA gal, nel -URA glu non dovrebbero esserci differenze tra le varianti in quanto la proteina non viene espressa, nel -URA gal invece dovremmo trovare differenze.

## CAPITOLO 3: Risultati

### 3.1 COSTRUZIONE DEL CEPPO RSY6 DELETO PER IL GENE DEL MISMATCH REPAIR *MSH6*

In questa tesi, abbiamo determinato l'effetto dell'espressione di BRCA1 wt e di alcune varianti missenso in ceppi di lievito difettivi per la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA e del mismatch repair. Per prima cosa abbiamo costruito un nuovo ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* partendo dal ceppo aploide RSY6 con la delezione del gene MSH6 attraverso un esperimento di gene targeting, che determina la sostituzione del ORF di MSH6 con una cassetta contenente come marcatore il gene per la resistenza al G418.

La cassetta che si va a sostituire al gene endogeno è stata sintetizzata per PCR da DNA genomico di un ceppo di lievito già deleto per quel gene.

Il ceppo in questione, acquistato da EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>), ha il seguente genotipo:

BY4741; *Mat a*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; *YDR097c::kanMX4*

Il gene MSH6 è stato sostituito con kanMX4 che conferisce resistenza al G418, amplificando per PCR la cassetta utilizzando primers che si vanno ad appaiare in locus posti a circa 200bp dal gene kanMX4. Quindi il frammento di PCR contiene, oltre al gene di resistenza al G418, anche una parte di genoma WT del ceppo che fornirà le sequenze di omologia necessarie, affinché si possa avere un evento preciso di gene targeting piuttosto che una integrazione casuale.

In particolare, nel genoma del lievito, il gene WT MSH6 è localizzato nel cromosoma IV dalla posizione 640109 alla 643837 che quindi ha un ORF di 3728 coppie di basi; attraverso un evento di gene targeting questa regione è stata sostituita con la cassetta *kanMX4* (che ha una dimensione minore).

I primers utilizzati, però, sono stati costruiti in modo da amplificare una regione più ampia che va dalla posizione 639500 alla 644500 e sono state prese come locus di appaimento per i primers le regioni che vanno dalla posizione 639781 alla 639801 e dalla 644461 alla 644482.

Primer Forward: 5' CATGCACTCAAGAAATGGAA3' Tm: 56°

Primer Reverse : 5'AACGCTAGATTGACTAAATTG3' Tm: 56°

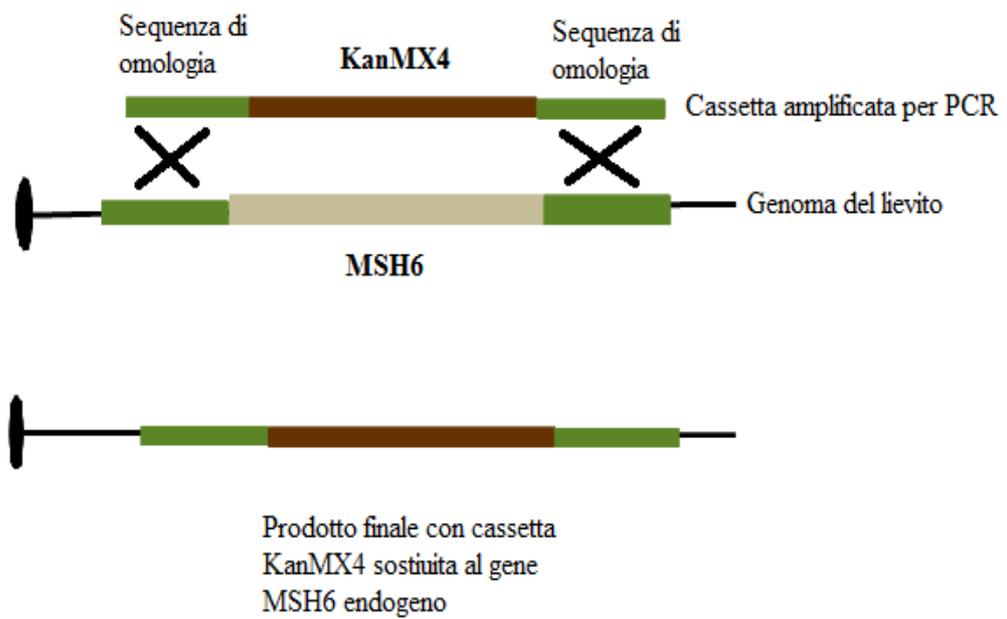


Figura 7: Schema del gene targeting effettuato sul gene MSH6 di lievito con la cassetta KanMX4

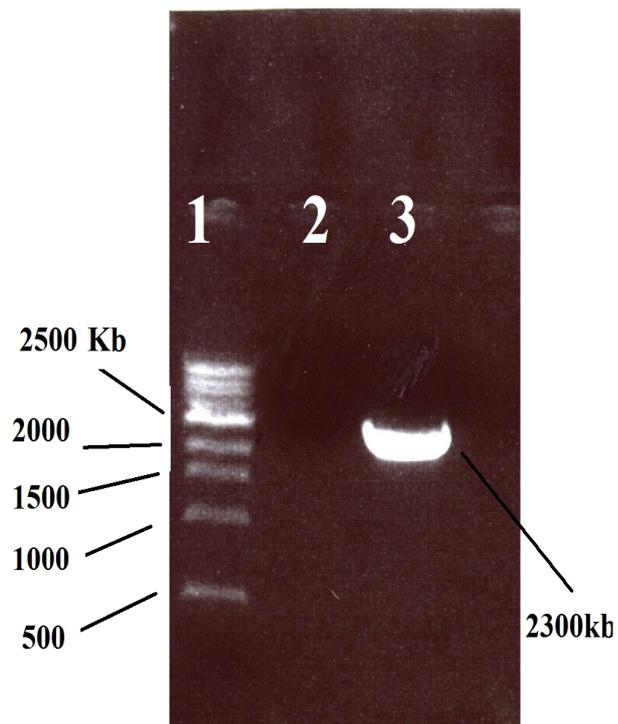


Figura 8: Amplificazione della cassetta *msh6::KanMX*. Elettroforesi su gel d'agarosio del prodotto di PCR: corsia 1, marker; corsia 2 controllo negativo; corsia 3 amplificato di *msh6::KanMX*

Una volta ottenuto l'amplificato lo sfruttiamo per trasformare il genoma del lievito.

Viene utilizzato il protocollo di trasformazione standard come descritto nei materiali e metodi; la selezione finale delle cellule trasformate viene fatta piastrando le cellule in YAPD+G418 e cresciute a 30°C per 3-5 giorni.

I cloni cresciuti in terreno contenete G418 vengono analizzati mediante colony PCR utilizzando dei primer complementari ad una regione interna al gene che dovrebbe essere stato interrotto, di conseguenza il prodotto della PCR dovrebbe essere vuoto.

I primers usati sono:

Primer forward: 5'-ACGAGTTGGGAAGAGGAGGT-3'

Primer reverse: 5'-ACGCAACATGCATACCAAAA-3'

Viene fatto questo controllo in quanto la semplice selezione su piastra con G418 non dà la certezza che il gene targeting sia avvenuto nel modo desiderato, in quanto, nonostante le sequenze di omologia possono comunque verificarsi degli eventi di intergazione casuale.

Insieme a questa PCR vengono fatte in parallelo altre due amplificazioni, una che con lo stesso DNA genomico, ma diversi primers ed una che utilizza gli stessi primers ma un altro genomico. Queste ultime due PCR servono come controlli positivi per assicurarsi che sia il genomico che i primers non abbiano contaminazioni o falsi positivi. La prima PCR deve risultare negativa perché effettivamente il gene è stato deletato dal gene targeting.

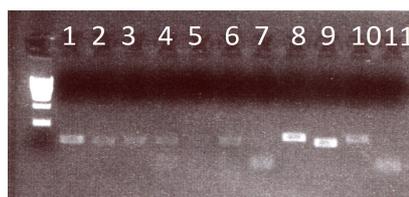


Figura 9: Yeast colony PCR dei cloni cresciuti in terreno selettivo YPAD + G418, (1-6 e 8) falsi positivi selezionati su piastra, (7) clone effettivamente deletato per msh6, (9) controllo positivo del genomico, (10) controllo positivo dei primers, (11) controllo negativo

La colony PCR è considerata solo da test preliminare per un eventuale positività del gene targeting.

Una volta trovato un possibile clone “positivo” (fig 9) viene estratto il DNA genomico da quel clone tramite protocollo di estrazione della *MasterPure<sup>TM</sup>* e viene svolta un'altra PCR

utilizzando nuovamente i primers complementari alle regioni interne del gene.

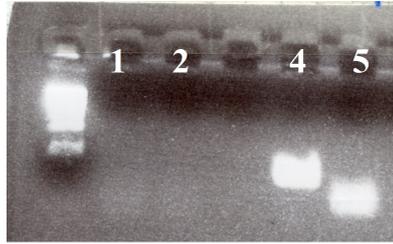


Figura 10: (1 e 2) PCR di regione interna di *msh6*, (4) controllo positivo, (5) controllo negativo

Ottenendo un altro prodotto di PCR negativo siamo sufficientemente sicuri che il gene targeting sia andato a buon fine (fig 10).

Il ceppo RSY6 *msh6* $\Delta$  viene trasformato con i plasmidi contenenti il cDNA di BRCA1 wt e con i plasmidi contenenti le 9 varianti missenso. In parallelo, il ceppo viene anche trasformato con il plasmide pYES2 vuoto; questo ceppo servirà come controllo negativo.

Oltre a questo ceppo trasformiamo altri 3 ceppi già presenti in laboratorio: RSY6 *rad50* $\Delta$ , RSY6 *mre11* $\Delta$  e RSY6 *rad51* $\Delta$ .

Vengono selezionati 3-4 cloni per trasformazione che sono stati successivamente strisciati in piastre -URA -LEU per effettuare una doppia selezione, questi strisci saranno il punto di partenza per i successivi esperimenti.

### 3.2 Espressione di BRCA1 nei ceppi RSY6rad50Δ, RSY6mre11Δ, RSY6rad51Δ e RSY6msh6Δ

Per assicurarsi che i ceppi deleti siano in grado di esprimere BRCA1wt e le varianti prese in considerazione a livelli paragonabili viene effettuato un Western Blot su ognuno di essi. I ceppi contenenti i vettori BRCA1 vengono dapprima cresciuti in glucosio e poi incubati in galattosio al 5% per avere una induzione massimale delle proteina BRCA1wt e delle varianti missenso considerate.

Seguendo le procedure di estrazione delle proteine e di corsa, trasferimento, ibridazione e sviluppo otteniamo delle lastre in cui si notano le bande relative all'espressione della proteina. In parallelo si ibridizza con l'anticorpo anti-PGK (fosfoglicerato chinasi) per avere un controllo sul caricamento delle proteine. I dati ottenuti mostrano in generale che BRCA1 viene espressa in tutti in ceppi in quanto si evidenzia una banda di 220kDa che corrisponde alla dimensione della proteina BRCA1 "full length" (Figure 11-14, corsie 2-11) mentre non si nota nessuna banda nel campione corrispondente al controllo negativo ( Figure 11-14, corsia 1). Oltre alla banda di 220kDa, si osserva un pattern di bande che, come riportato in letteratura, è dovuto a degradazione e non ad aspecificità dell'anticorpo poiché nel controllo negativo non si osserva nessuna banda anche dopo prolungata esposizione (Westmoreland et al. 2003, Millot et al 2011, Caligo et al .2009).

In particolare, nel ceppo RSY6 *rad50Δ*, il livello delle varianti patogenetiche I1766S e C61G sembra leggermente inferiore rispetto a BRCA1 wt ed alle altre varianti (figura 11 corsie 5 e 6).



*Figura 11:* Espressione di BRCA1 nel ceppo RSY6*rad50Δ* Western blot su estratti proteici del ceppo *rad50* dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati 50ug di proteine totali. corsia 1 Estratto proteico del ceppo contenente pYES2vuoto dopo crescita in galattosio (controllo negativo), (2) BRCA1 WT, (3) Y179C, (4) N550H, (5) I1766S, (6) C61G, (7) M1775R, (8) N132K, (9) A1708E, (10) S1512I, (11) A1789T. in basso: PGK come controllo di caricamento in tutti i cloni.

Nel ceppo RSY6 *rad51Δ*, si osserva che le bande corrispondenti a BRCA1wt e alla variante patogenetica A1789T sono leggermente meno intense rispetto alle altre (figura 12, corsia 2 e 11)

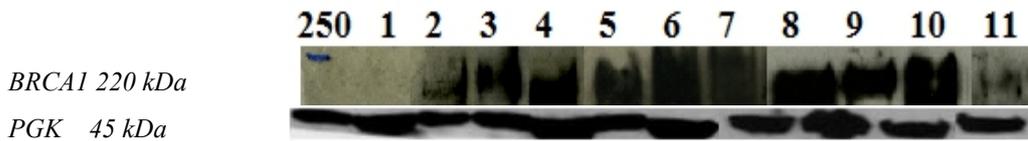


Figura 12: Espressione di BRCA1 nel ceppo *RSY6rad51Δ* Western blot su estratti proteici del ceppo *rad51* dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati 50ug di proteine totali. corsia 1 Estratto proteico del ceppo contenente pYES2vuoto dopo crescita in galattosio (controllo negativo), (2) BRCA1 WT, (3) Y179C, (4) N550H, (5) I1766S, (6) C61G, (7) M1775R, (8) N132K, (9) A1708E, (10) S1512I, (11) A1789T. in basso: PGK come controllo di caricamento in tutti i cloni.

Nel ceppo RSY6 *mre11Δ*, l'intensità delle bande corrispondenti alle varianti patogenetiche C61G, M1775R e A1789T sembra sia leggermente inferiore quella della proteina BRCA1 wt e alle altre varianti (figura 13 , corsie 6, 7 e 11)



Figura 13: Espressione di BRCA1 nel ceppo *RSY6mre11Δ* Western blot su estratti proteici del ceppo *mre11* dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati 50ug di proteine totali. corsia 1 Estratto proteico del ceppo contenente pYES2vuoto dopo crescita in galattosio (controllo negativo), (2) BRCA1 WT, (3) Y179C, (4) N550H, (5) I1766S, (6) C61G, (7) M1775R, (8) N132K, (9) A1708E, (10) S1512I, (11) A1789T. in basso: PGK come controllo di caricamento in tutti i cloni.

Nel ceppo *RSY6msh6Δ*, l'intensità delle bande corrispondenti alla variante neutra Y179C ed a quella patogenetica I1766S sembra siano ad un livello leggermente più basso rispetto alle altre varianti (figura 14, corsie 3 e 5).

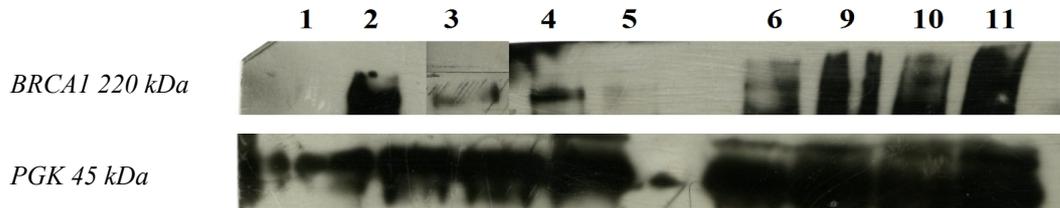


Figura 14: Espressione di BRCA1 nel ceppo *RSY6msh6Δ* Western blot su estratti proteici del ceppo *msh6* dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati 50ug di proteine totali. corsia 1 Estratto proteico del ceppo contenente pYES2vuoto dopo crescita in galattosio (controllo negativo), (2) BRCA1 WT, (3) Y179C, (4) N550H, (5) I1766S, (6) C61G, (9) A1708E, (10) S1512L, (11) A1789T.

in basso: PGK come controllo di caricamento in tutti i cloni.

### **3.3 EFFETTO DELL'ESPRESSIONE DI BRCA1 SULLA RICOMBINAZIONE E MUTAZIONE DEI CEPPI RSY6 $mre11\Delta$ , RSY6 $msh6\Delta$ , RSY6 $rad51\Delta$ e RSY6 $rad50\Delta$**

In questo lavoro di tesi abbiamo determinato l'effetto dell'espressione di BRCA1 WT e delle diverse varianti sulla ricombinazione intracromosomica spontanea e sulla reversione spontanea in ceppi deleti per geni implicati nei pathway di riparazione del DNA. Questi ceppi derivano dal ceppo aploide RSY6 che contiene una duplicazione del gene *his3* che consente di misurare direttamente in piastre prive di istidina il numero dei ricombinanti, come descritto nei Materiali e Metodi. Inoltre, nel genotipo del ceppo RSY6 è presente l'allele *ilv1-92* che permette di misurare gli eventi di reversione mediante piastramento in terreno privo di isoleucina

I ceppi contenenti i plasmidi BRCA1 wt, le varianti e il vettore pYES2 vuoto (controllo negativo) sono stati inoculati in 5ml di terreno liquido contenente glucosio per 24 ore a 30°C in agitazione.

Dopo, i ceppi vengono inoculati in terreno contenente galattosio per 16 ore per permettere l'espressione della proteina.

Una volta terminata la fase di induzione della proteina, le cellule vengono lavate e ripese in 1ml di acqua sterile. Le sospensioni cellulari vengono opportunamente diluite e piastrate in terreno completo per determinare il numero delle cellule vitali e, in terreno privo di isoleucina per determinare il numero dei revertanti e nel terreno privo di istidina per determinare il numero di eventi di ricombinazione intracromosomica. I risultati sono espressi come frequenze di ricombinazione e reversione. La frequenza di ricombinazione viene calcolata come numero di colonie crescite in terreno senza istidina diviso per la frazione di cellule vitali ed espressa su  $10^3$  cellule vitali. Analogamente, la frequenza di reversione genica viene calcolata come numero di colonie crescite in terreno senza isoleucina diviso per la frazione di cellule vitali ed espressa su  $10^6$  cellule vitali.

I risultati sono la media di 3-5 esperimenti  $\pm$  l'errore standard. I risultati sono stati analizzati con il test “*t*” di *Student* per dati non appaiati sfruttando il software *GraphPad Prism 5*. La significatività del dato ottenuto è stata calcolata confrontando il dato in galattosio (proteina espressa) ed il dato con il vettore vuoto. Un aumento statisticamente significativo di almeno due volte della frequenze è considerato biologicamente rilevante (Balía et al. 2011, Galli and

Schiestl 1995, 1996). I dati sono rappresentati tramite istogrammi e tabelle per una comparazione più diretta delle diverse varianti.

### 3.3.1 Ceppo *RSY6mre11Δ*:

Come riportato nel grafico 1 e nella tabella 5, l'espressione di BRCA1wt e delle varianti missenso in studio non determina una variazione significativa .

Per quanto riguarda la mutazione, invece, notiamo dal grafico 2 e dalla tabella 6 che l'espressione della variante neutra BRCA1 S1512I e delle varianti patogenetiche A1789T e I1766S determina incremento della frequenza di mutazione statisticamente significativa rispetto al controllo negativo.

VARIANTE	FREQ. DI RICOMBINAZIONE *10 <sup>-3</sup>
pYES2	0,47 ± 0,11
WT	0,43 ± 0,13
C61G	0,31 ± 0,05
M1775R	0,58 ± 0,14
N132K	0,51 ± 0,12
I1766S	0,48 ± 0,10
Y179C	0,37 ± 0,02
N550H	0,33 ± 0,07
S1512I	0,42 ± 0,06
A1789T	0,48 ± 0,10
A1708E	0,37 ± 0,08

Tabella 5: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6mre11Δ*.

VARIANTE	FREQ. DI MUTAZIONE *10 <sup>-6</sup>
pYES2	0,71 ± 0,11
WT	0,91 ± 0,20
C61G	0,43 ± 0,08
M1775R	0,38 ± 0,09
I1766S	1,23 ± 0,23*
N550H	0,74 ± 0,19
S1512I	3,33 ± 1,14*
A1789T	1,49 ± 0,34*
A1708E	0,84 ± 0,25

Tabella 6: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6mre11Δ*.

### Numero colonie HIS3<sup>+</sup> X 10<sup>-3</sup> cellule vitali

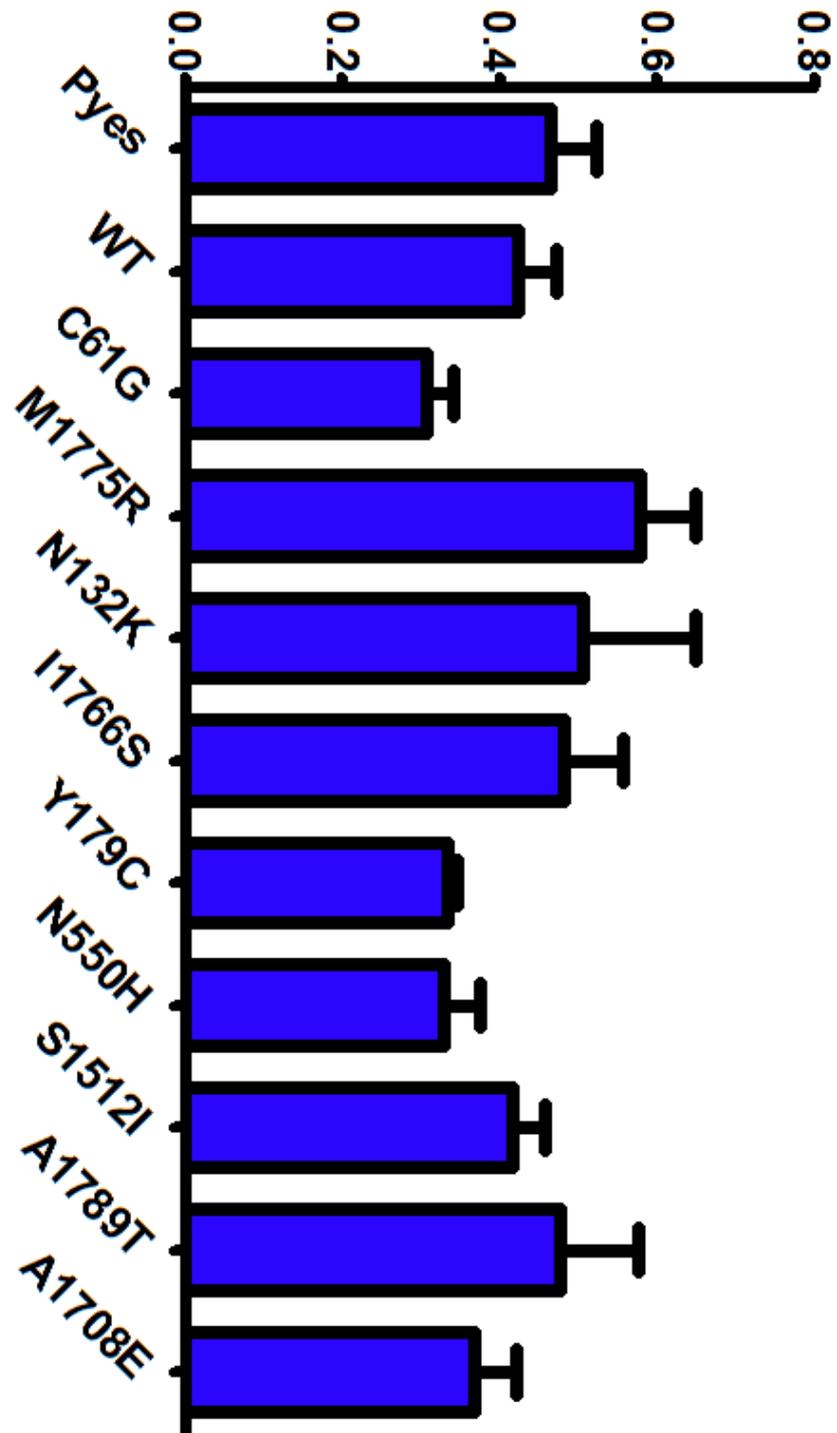


Grafico 1: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6mre11Δ*.

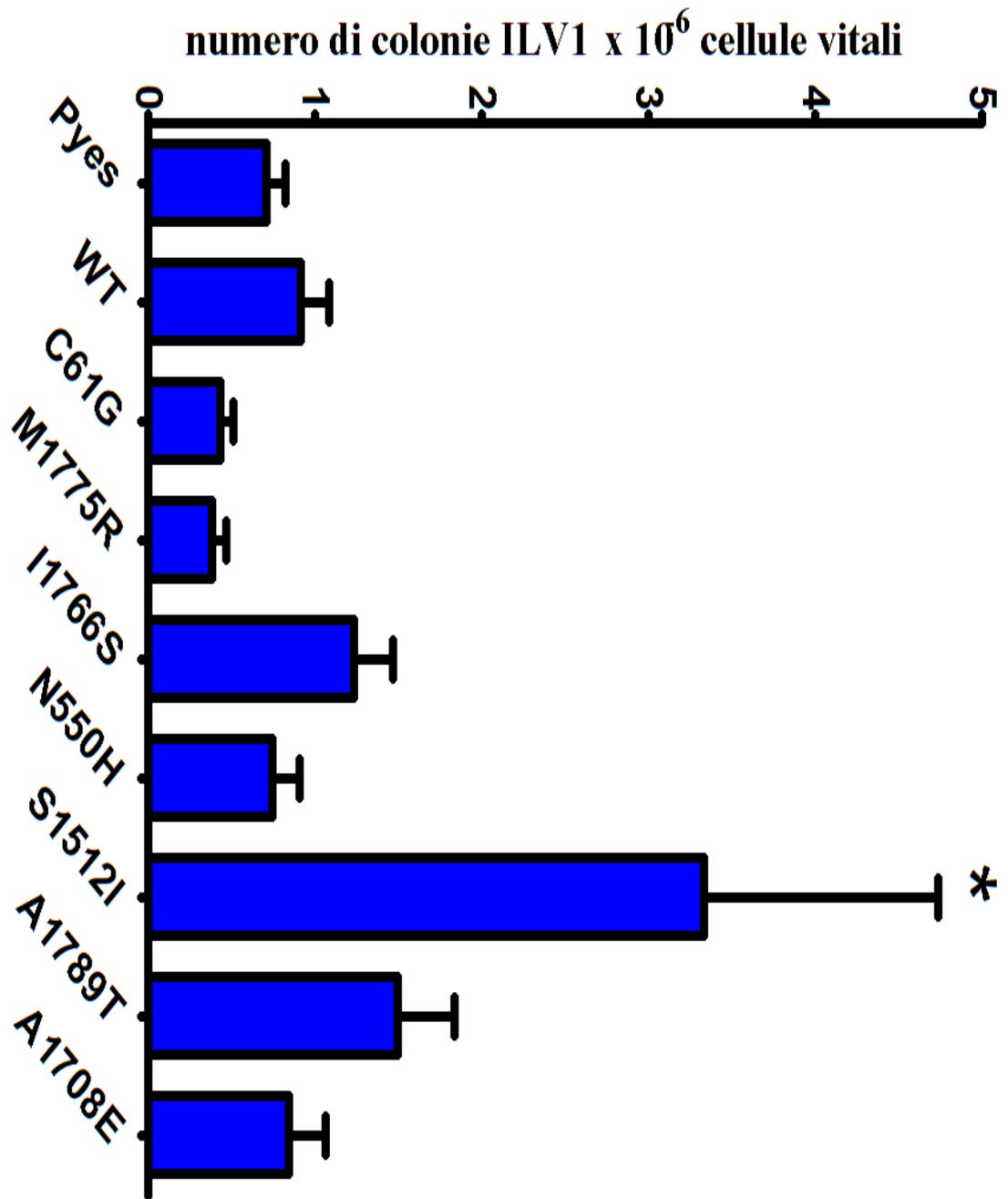


Grafico 2: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6mre11Δ*. \*:  $p < 0,05$

### 3.3.2 Ceppo RSY6msh6Δ

Come nel ceppo *mre11Δ* anche in quello *msh6Δ* l'espressione di BRCA1wt e delle diverse varianti non influisce in maniera statisticamente significativa la frequenza di ricombinazione come si può vedere dal grafico 3 e dalla tabella 7.

Al contrario, l'espressione della variante patogenetica I1766S induce un aumento statisticamente significativo della reverzione dell'allele *ilv1-92* rispetto al controllo (grafico 4 e tabella 8)

VARIANTE	FREQ. DI RICOMBINAZIONE *10 <sup>-3</sup>
pYES2	0,61 ± 0,04
WT	0,45 ± 0,1
C61G	0,39 ± 0,02
I1766S	0,36 ± 0,05
Y179C	0,48 ± 0,09
N550H	0,33 ± 0,06
S1512I	0,70 ± 0,08
A1789T	0,52 ± 0,01
A1708E	0,36 ± 0,08

Tabella 7: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo RSY6msh6Δ.

VARIANTE	FREQ. DI MUTAZIONE *10 <sup>-6</sup>
pYES2	1,62 ± 0,06
WT	0,9 ± 0,13
C61G	1,98 ± 0,11
I1766S	5,14 ± 0,46**
Y179C	1,2 ± 0,22
N550H	0,96 ± 0,07
S1512I	0,51 ± 0,07
A1789T	2,18 ± 0,61
A1708E	1,32 ± 0,33

Tabella 8: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo RSY6msh6Δ.

### Numero colonie HIS3<sup>+</sup> X 10<sup>-3</sup> cellule vitali

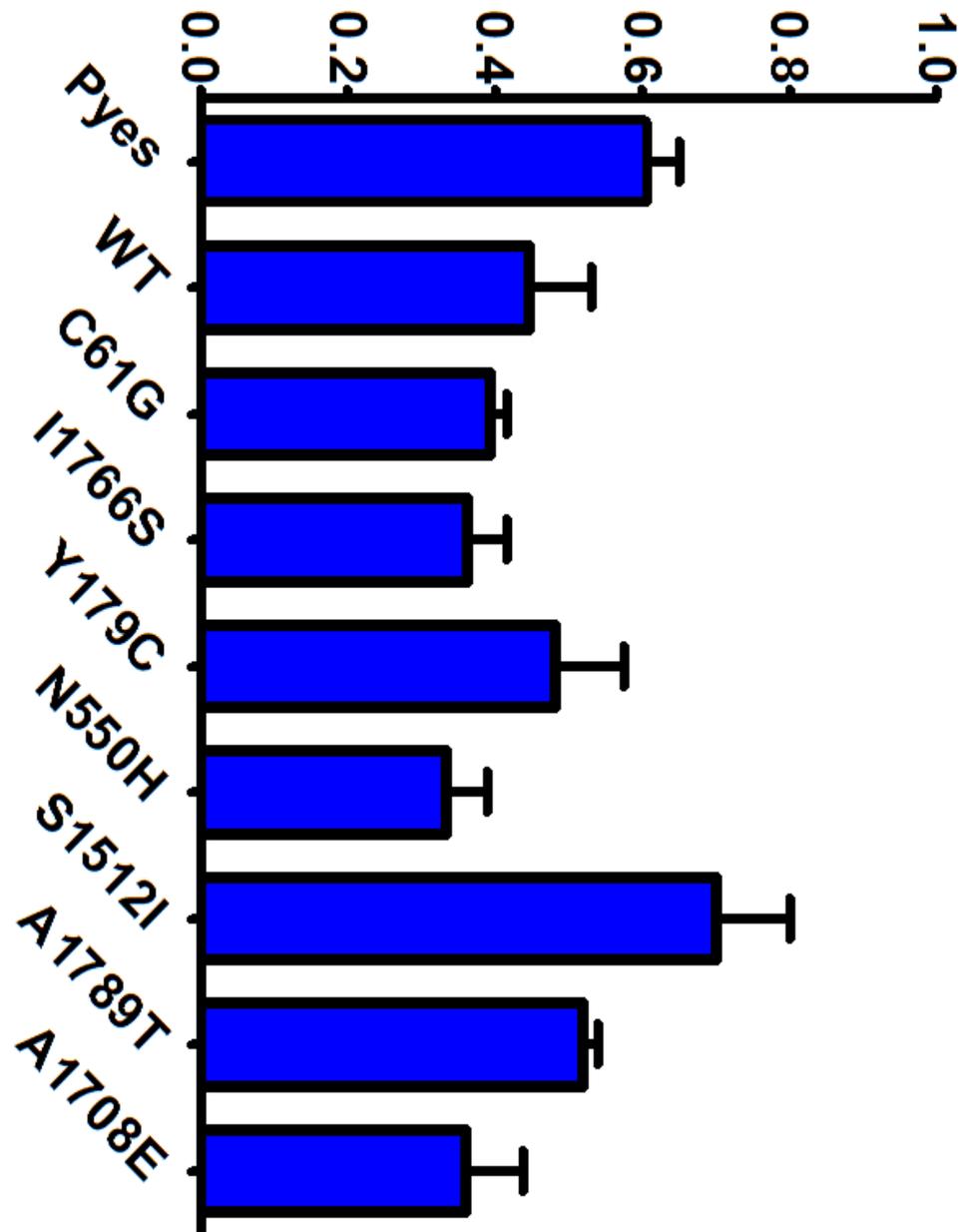


Grafico 3: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6msh6A*.

numero di colonie ILV1 x 10<sup>-6</sup> cellule vitali

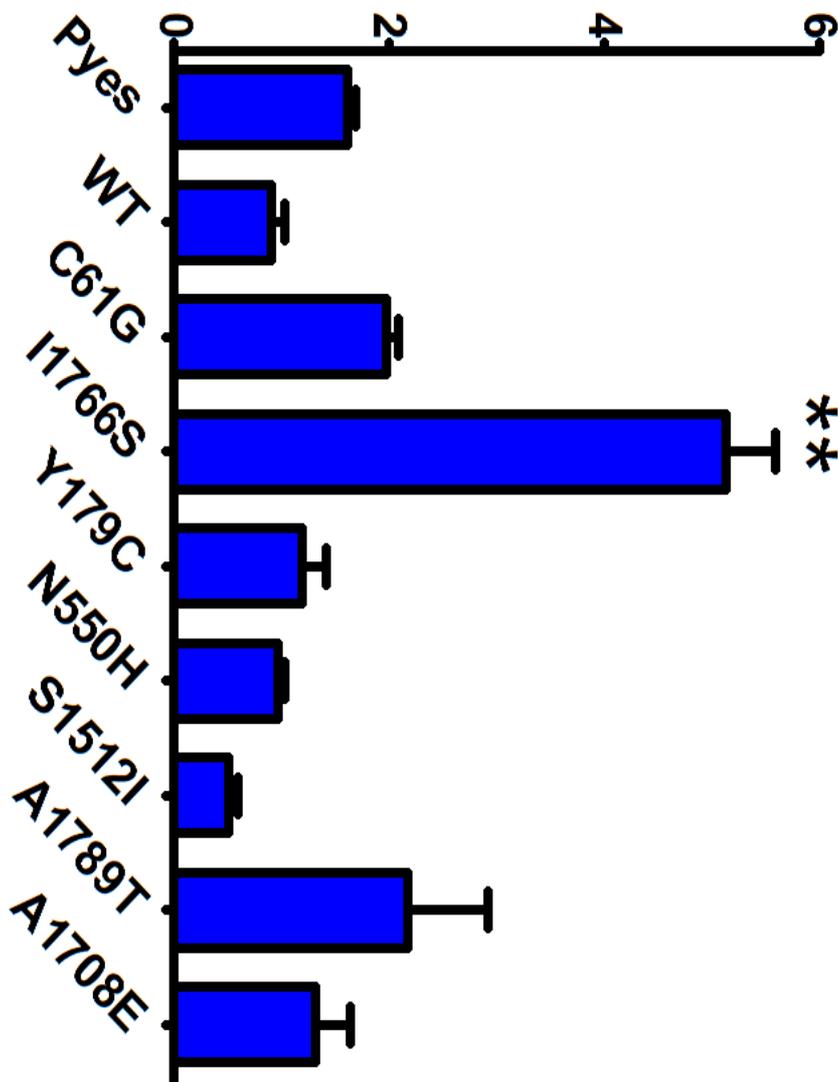


Grafico 4 Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6msh6Δ*. \*\*: 0,01 < p < 0,05

### 3.3.3 Ceppo RSY6rad51Δ

Nel ceppo *rad51Δ*, l'effetto dell'espressione di BRCA1 e di tutte le varianti non induce un aumento di ricombinazione significativo (grafico 5 e tabella9). Al contrario, l'espressione delle varianti patogentiche C61G, M1775R e A1708E induce un incremento statisticamente significativo della reversione genica rispetto al controllo (grafico 6 e tabella 10)

VARIANTE	FREQ. DI RICOMBINAZIONE *10 <sup>-3</sup>
pYES2	0,80 ± 0,06
WT	0,90 ± 0,06
C61G	0,76 ± 0,08
M1775R	0,88 ± 0,09
N132K	0,57± 0,06
I1766S	0,83 ± 0,07
Y179C	0,52 ± 0,07
N550H	0,74 ± 0,07
S1512I	0,65 ± 0,09
A1789T	0,61 ± 0,04
A1708E	0,54 ± 0,06

Tabella 9: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo RSY6rad51Δ.

VARIANTE	FREQ. DI MUTAZIONE *10 <sup>-6</sup>
pYES2	1,82 ± 0,53
WT	5,10 ± 2,64
C61G	4,83 ± 1,00**
M1775R	3,86 ± 0,38**
N132K	3,00 ± 0,72
I1766S	3,12 ± 1,24
Y179C	2,42 ± 0,44
N550H	3,15 ± 0,81
S1512I	3,18 ± 0,17
A1789T	3,40 ± 0,50
A1708E	4,04 ± 1,19*

Tabella 10: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo RSY6rad51Δ.

Numero colonie HIS3<sup>+</sup> X 10<sup>-3</sup> cellule vitali

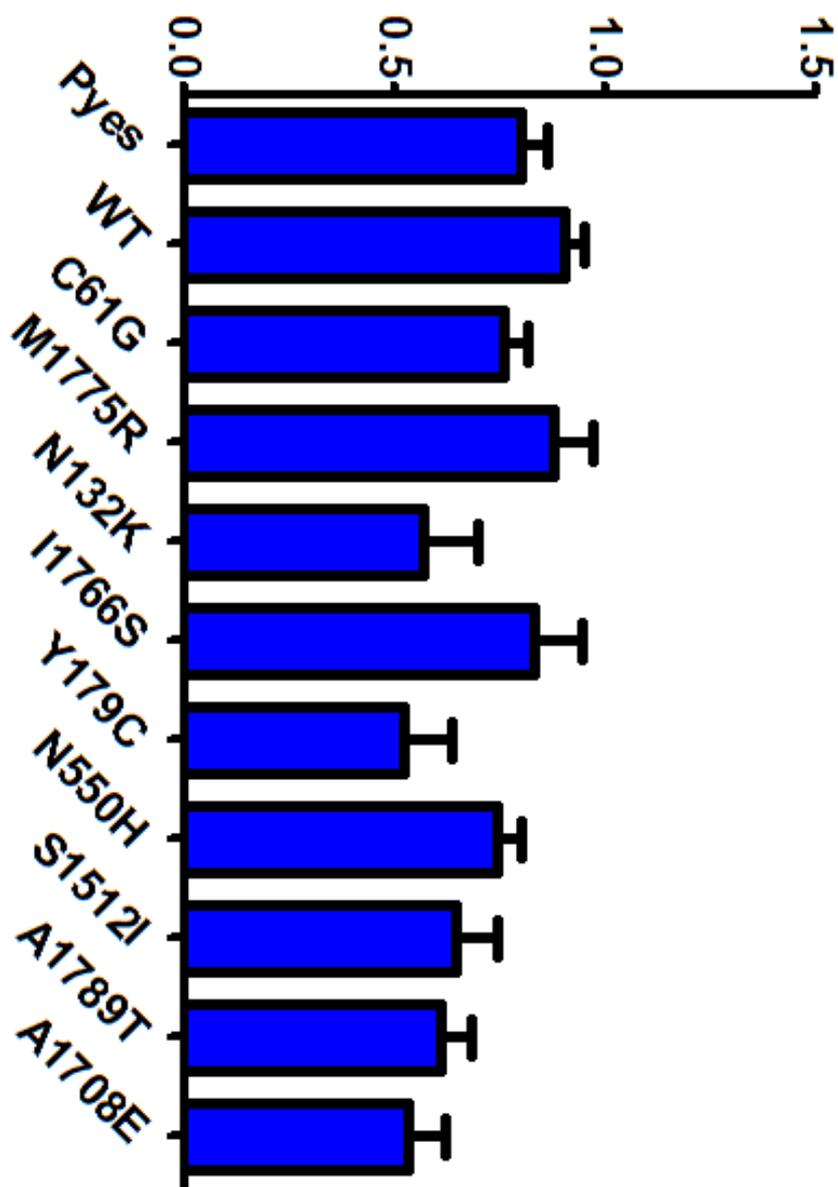


Grafico 5: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6rad51Δ*.

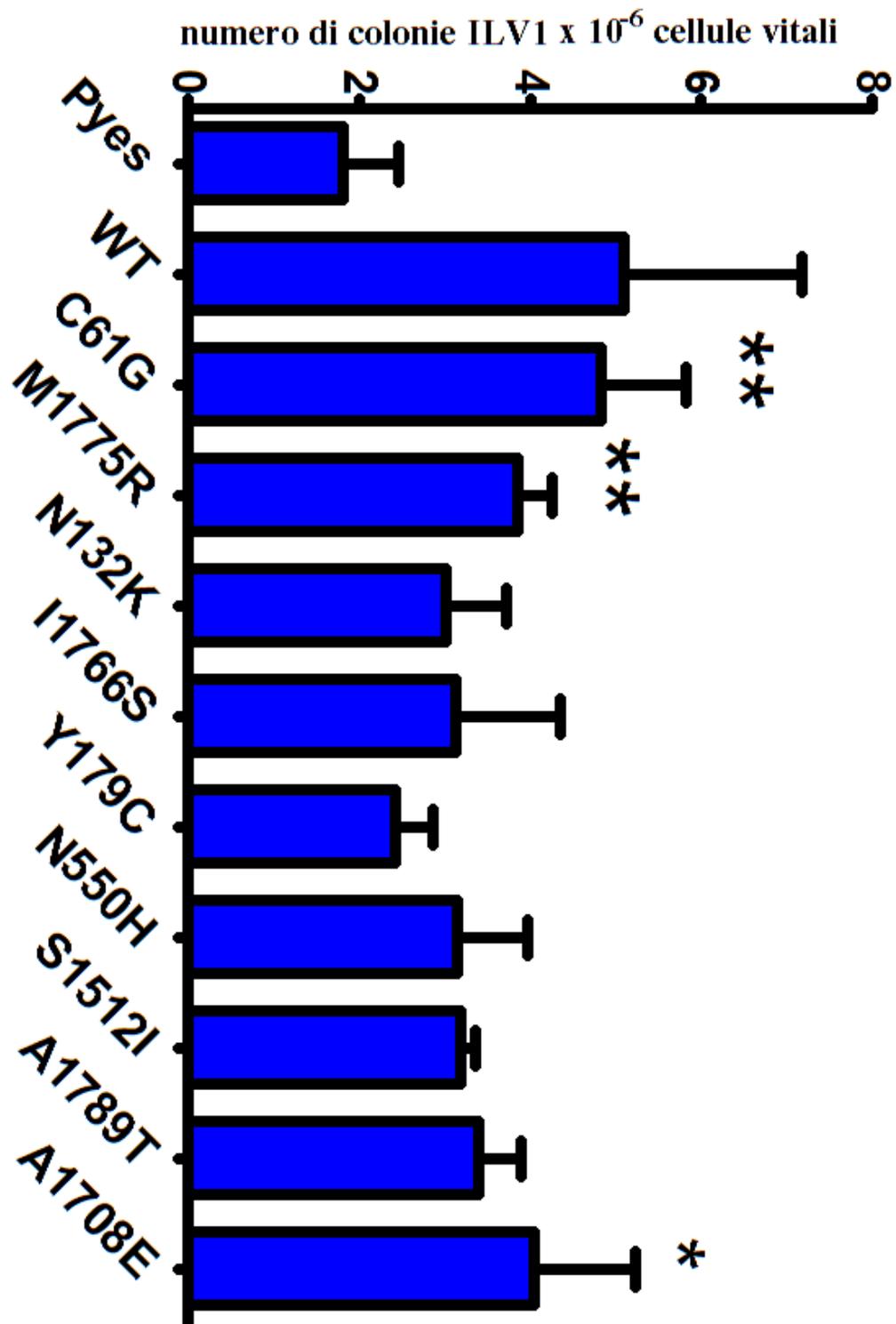


Grafico 6: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6rad51Δ*. \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $0,01 < p < 0,05$

### 3.3.4 Ceppo RSY6rad50A

Nel ceppo *rad50A*, l'espressione delle varianti patogenetiche C61G e A1708E e della variante neutra Y179C determina un debole ma statisticamente significativo decremento della frequenza di ricombinazione rispetto al controllo negativo.(grafico 7 e tabella11).

L'espressione dei BRCA1 wt e delle varianti M1775R, I1766S, N550H, A1789T e A1708E induce un aumento statisticamente significativo di reversione genica. In generale, l'espressione di tutte le varianti di BRCA1 incrementa la reversione dell'allele *ilv1-92* in questo ceppo, ma, data l'elevata variabilità sperimentale, l'analisi statistica ha evidenziato la significatività solo per le varianti suddette. Sono necessari altri esperimenti da effettuare in colture indipendenti per valutare la riproducibilità di questi risultati e per poter dimostrare effettivamente questo effetto (grafico 8 e tabella 12).

VARIANTE	FREQ. DI RICOMBINAZIONE *10 <sup>-3</sup>
pYES2	0,14 ± 0,02
WT	0,12 ± 0,01
C61G	0,07 ± 0,01
M1775R	0,11 ± 0,02
N132K	0,11± 0,03
I1766S	0,11 ± 0,02
Y179C	0,06 ± 0,01
N550H	0,10 ± 0,02
S1512I	0,09 ± 0,03
A1789T	0,09 ± 0,03
A1708E	0,06 ± 0,001

Tabella 11: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6rad50A*.

VARIANTE	FREQ. DI MUTAZIONE *10 <sup>-6</sup>
pYES2	1,87 ± 1,38
WT	12,54 ± 4,63 *
C61G	8,19 ± 4,06
M1775R	27,44 ± 3,97**
N132K	6,45 ± 2,09*
I1766S	12,57 ± 2,00**
Y179C	5,74 ± 2,31
N550H	15,31 ± 3,83*
S1512I	8,54 ± 4,99
A1789T	13,88 ± 1,24**
A1708E	8,76 ± 1,01**

Tabella 12: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6rad50A*.

## Numero colonie HIS3<sup>+</sup> X 10<sup>-3</sup> cellule vitali

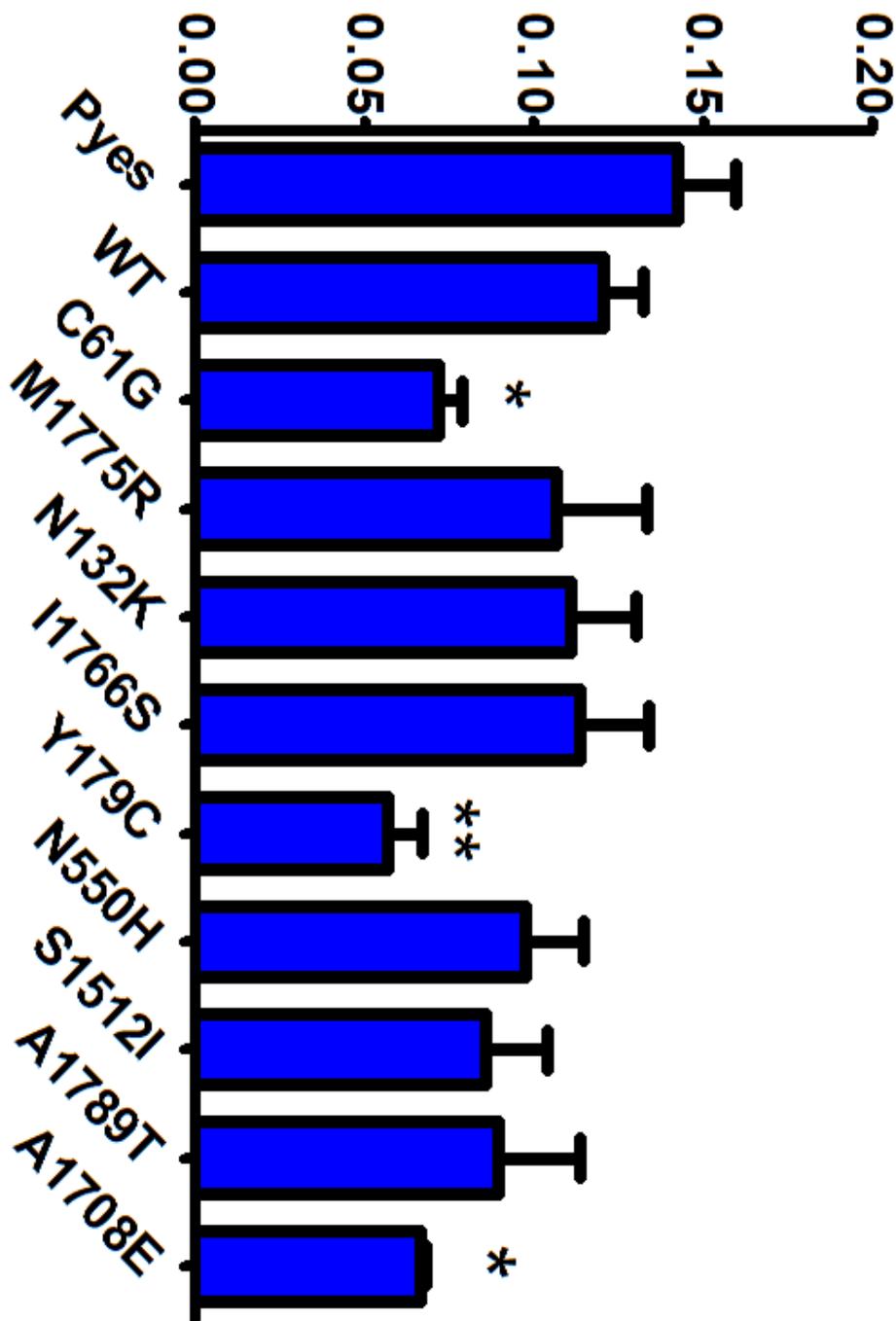


Grafico 7: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo *RSY6rad50Δ*. \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $0,01 < p < 0,05$

numero di colonie ILV1 + x 10<sup>6</sup> cellule vitali

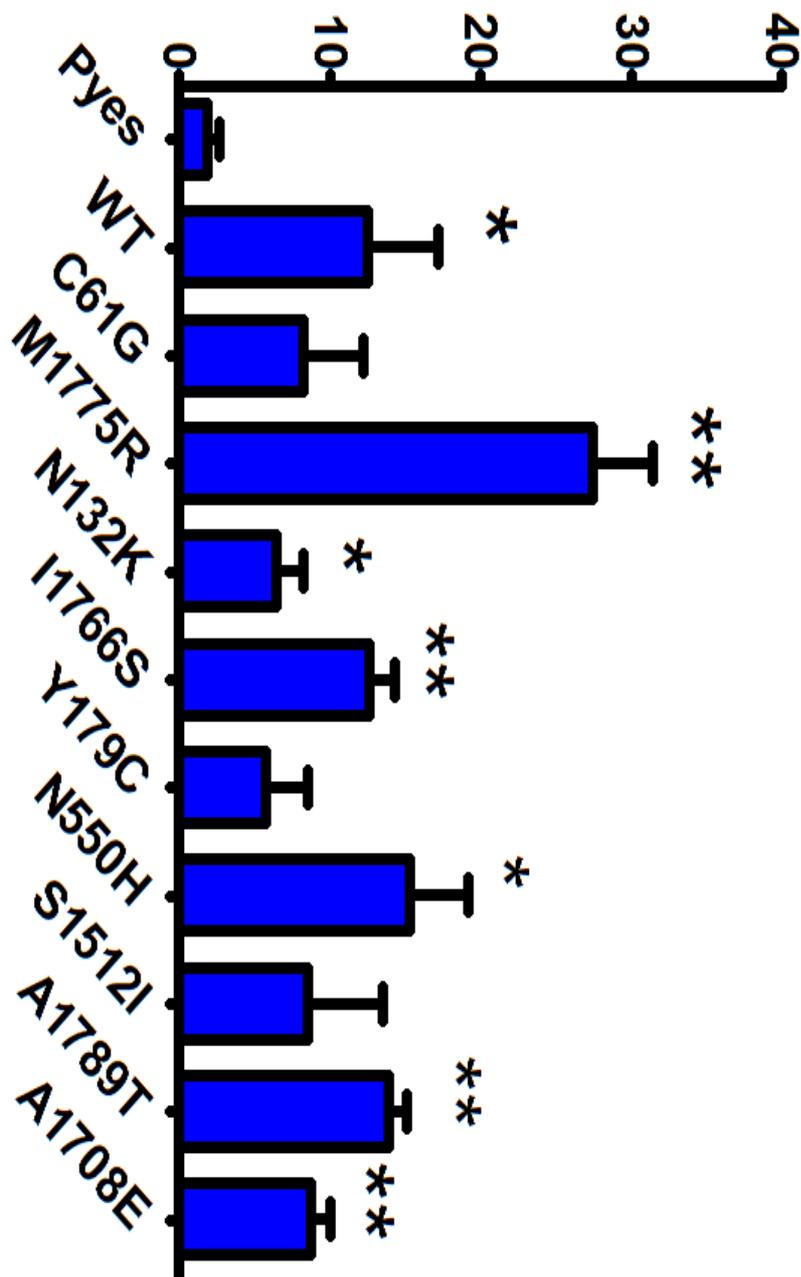


Grafico 8: Effetto della espressione delle varianti di BRCA1 sulla Reversione genica dell'allele *ilv1-92* del ceppo *RSY6rad50Δ*. \*:  $p < 0,05$  \*\*:  $0,01 < p < 0,05$

### 3.4 Effetto dell'espressione di BRCA1 e delle varianti sulla crescita nel ceppo aploide RSY6, RSY6*mre11Δ*, RSY6*msh6Δ*, RSY6*rad50Δ* e RSY6*rad51Δ* di *Saccharomyces cerevisiae*.

Da studi precedenti svolti anche nel nostro laboratorio è stato dimostrato che l'espressione di BRCA1 in lievito causa un'inibizione della crescita (Caligo et al., 2009).

L'effetto inibitorio è simile a quello osservato in seguito all'irradiamento con radiazioni ionizzanti, quindi ad un accumulo di danni al DNA.

Tale inibizione sembra essere dipendente dal dominio BRCT di BRCA1, infatti forme mutate di BRCA1 che sono prive di questo dominio non causano il fenotipo inibitorio (Jeffrey et al., 1997). Dal momento che non è chiaro come i geni che controllano la riparazione del DNA siano implicati nell'insorgenza di questo fenotipo, è stato messo a punto questo saggio in cui andiamo a "spottare" su piastre -URA contenente galattosio al 5%, i diversi ceppi sperimentali le varianti di BRCA1 ed andiamo a valutare come varia la capacità di crescita del lievito. I ceppi sono stati cresciuti per 24 ore in glucosio, diluiti come descritto nei materiali e metodi e "spottati" in piastre contenenti glucosio e galattosio. Una diminuzione della crescita in galattosio rispetto al glucosio è dovuta all'espressione della proteina.

Con questo esperimento vogliamo determinare se i ceppi mutati in questi pathway di riparazione hanno un effetto il fenotipo d'inibizione riscontrato nel ceppo WT e che quindi riesce ad annullare o ridurre l'effetto tossico indotto da BRCA1.

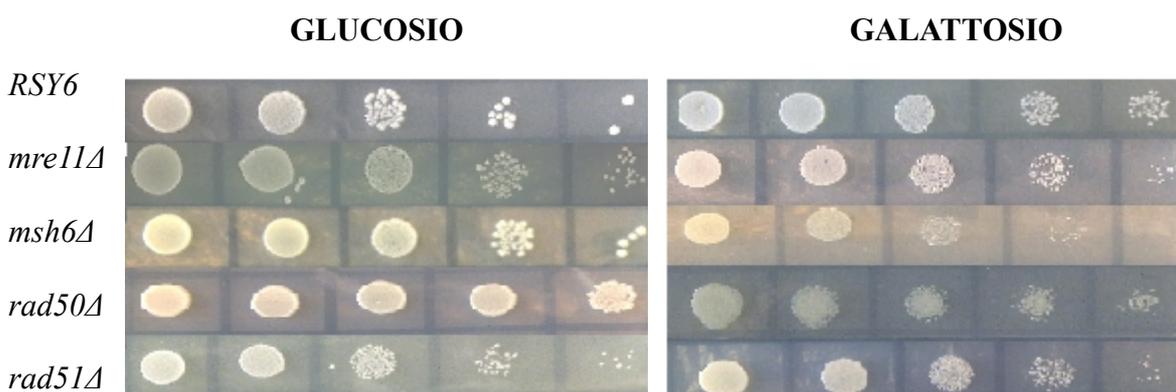


Figura 15: Determinazione della crescita del ceppo RSY6 e dei ceppi difettivi della riparazione delle DNA trasformati con il plasmide vuoto pYES2. Gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

Come si vede dalla figura 15, i ceppi contenenti il vettore pYES2 che non esprimono quindi BRCA1 crescono a livelli comparabili sia in galattosio che in glucosio.

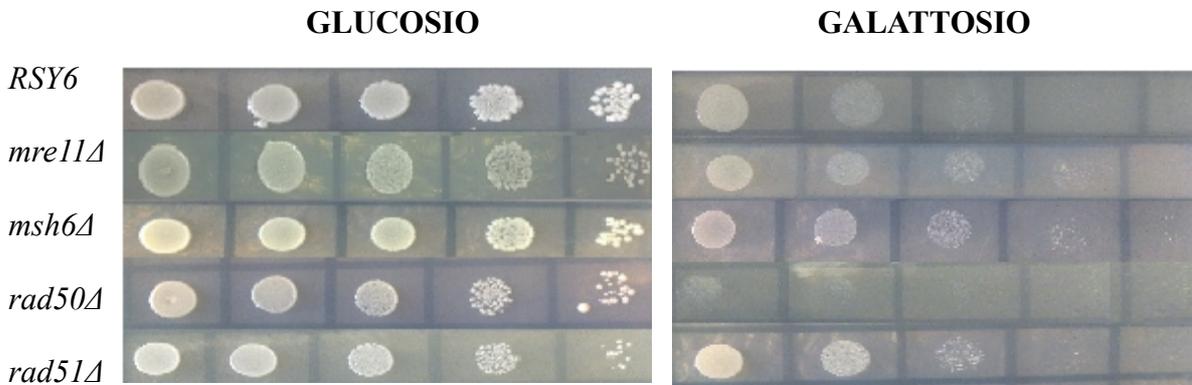


Figura 16: Effetto dell'espressione di BRCA1 WT nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. Gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

Come dimostrato dagli studi precedenti, l'espressione di BRCA1 WT inibisce la crescita sia nel ceppo RSY6 che nei ceppi *mre11Δ*, *msh6Δ*, *rad50Δ* e *rad51Δ* i ceppi (figura 16). Dalla figura si osserva che nel ceppo *rad50Δ*, l'espressione di BRCA1 ha un effetto inibitorio sulla crescita più elevato rispetto agli altri ceppi.

Dalla figura 17 e dalla figura 18, si osserva che l'espressione delle varianti neutre Y179C e N550H hanno un effetto inibitorio sulla crescita più marcato nel ceppo *RSY6rad50Δ* rispetto agli altri ceppi.

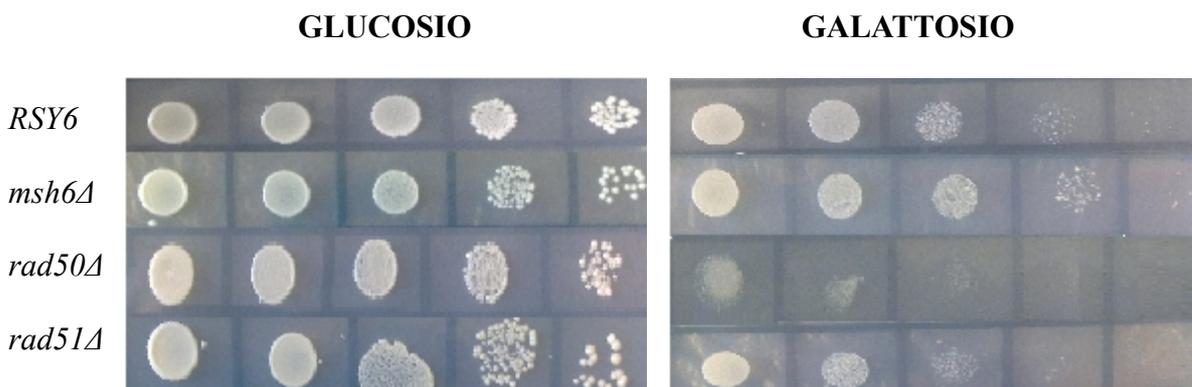


Figura 17: Effetto dell'espressione di BRCA1 Y179C nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. Gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

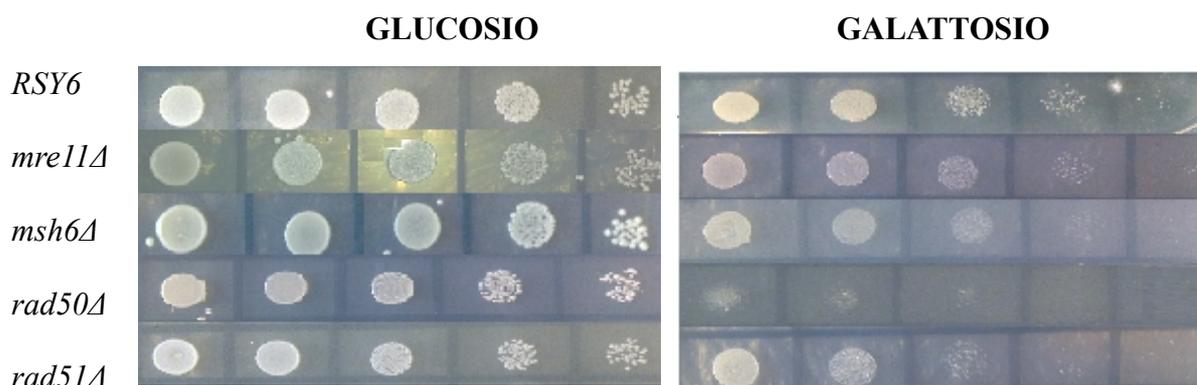


Figura 18: Effetto dell'espressione di **BRCA1 N550H** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. Gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

L'espressione delle varianti patogenetiche I1766S e C61G ha un effetto inibitorio sulla crescita paragonabile su tutti i ceppi (Figura 19 e 20).

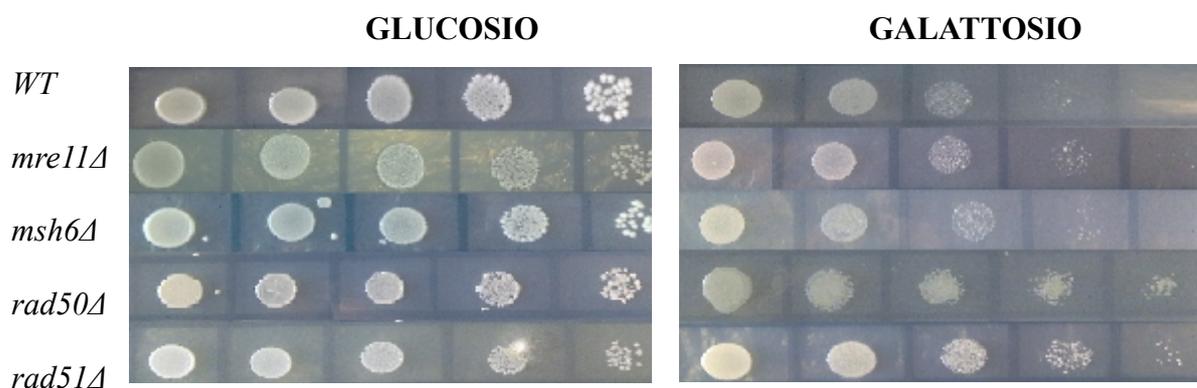


Figura 19: Effetto dell'espressione di **BRCA1 I1766S** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

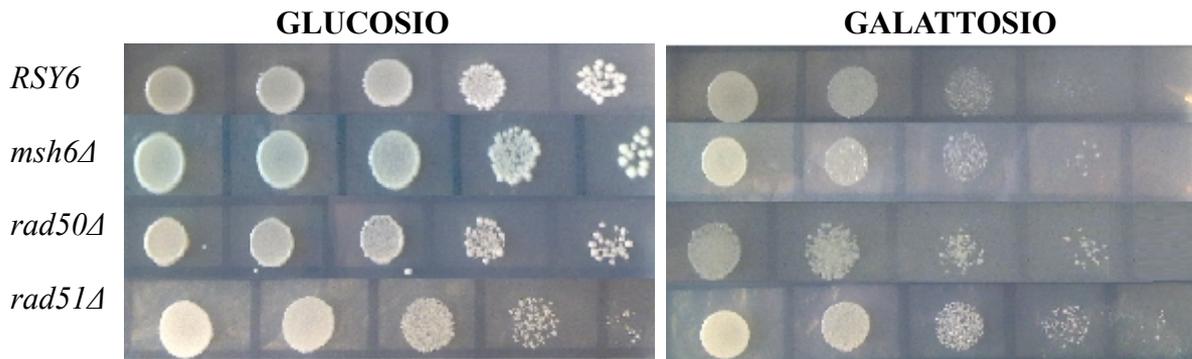


Figura 20: Effetto dell'espressione di **BRCA1 C61G** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente

L'espressione della variante patogenetica M1775R ha un effetto inibitorio sulla crescita più nel ceppo RSY6 -, rispetto al ceppo RSY6*mre11Δ* e *rad51Δ*. Più precisamente, il ceppo RSY6*rad51Δ* sembra essere leggermente più resistente all'espressione di BRCA1 M1775R rispetto al ceppo RSY6. (figura 21).

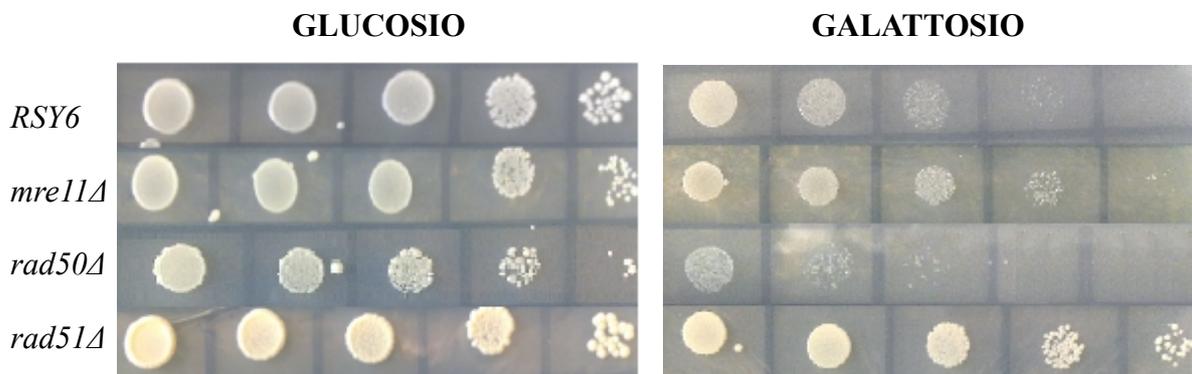


Figura 21: Effetto dell'espressione di **BRCA1 M1775R** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

Come si vede in figura 22 l'espressione della variante neutra N132K causa una forte inibizione della crescita nel ceppo RSY6 proficiente per la riparazione del DNA e nel ceppo *rad50Δ*; nei ceppi *mre11Δ* e *rad51Δ* l'espressione di tale variante non ha alcun effetto sulla crescita.

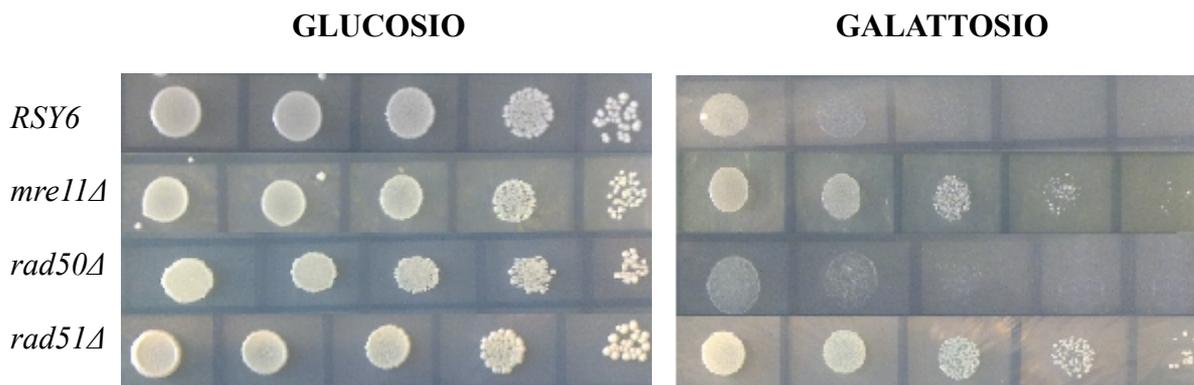


Figura 22: Effetto dell'espressione di **BRCA1 N132K** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente

Come riportato in figura 23, l'espressione della variante patogenetica di BRCA1 A1708E non causa nessun effetto inibitorio visibile in nessun ceppo.

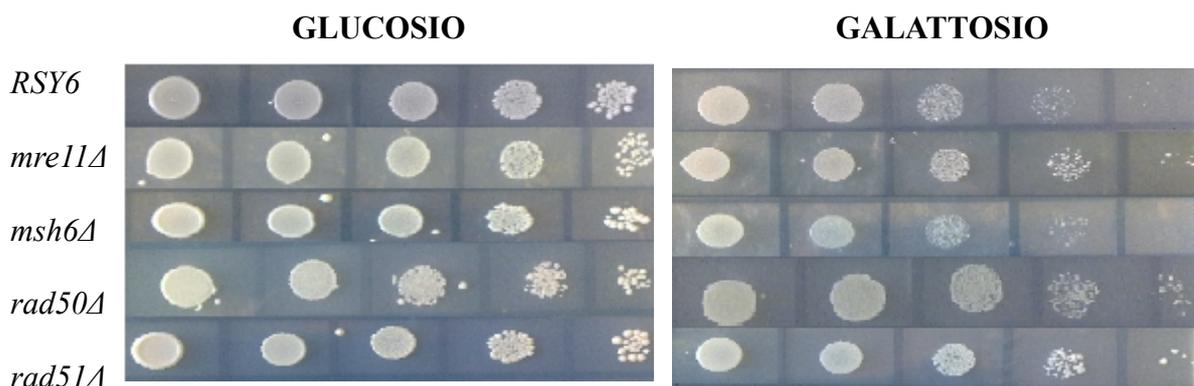


Figura 23: Effetto dell'espressione di **BRCA1 A1708E** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

L'espressione della variante neutra S1512I determina una inibizione della crescita nel ceppo RSY6 e RSY6*rad50Δ* (figura 24).

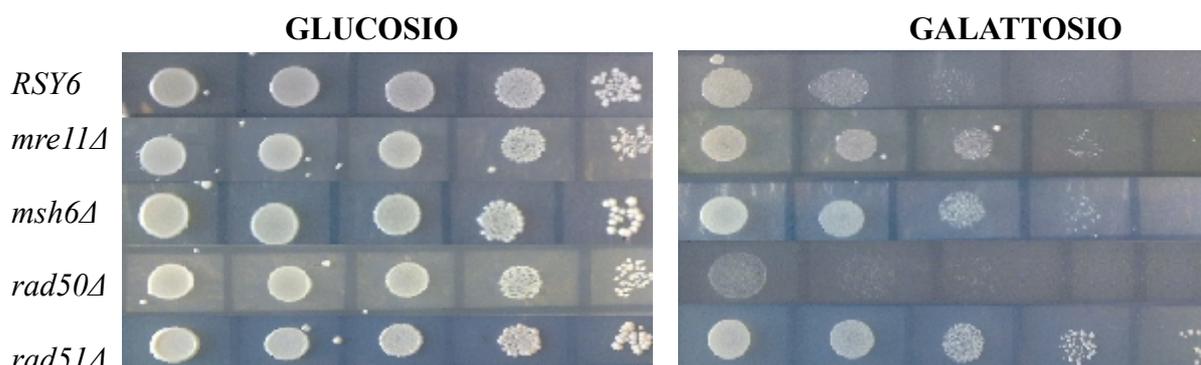


Figura 24: Effetto dell'espressione di **BRCA1 S1512I** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente.

Come si vede nella figura 25, l'espressione della variante patogenetica A1789T non causa inibizione della crescita in nessuno dei ceppi studiati.

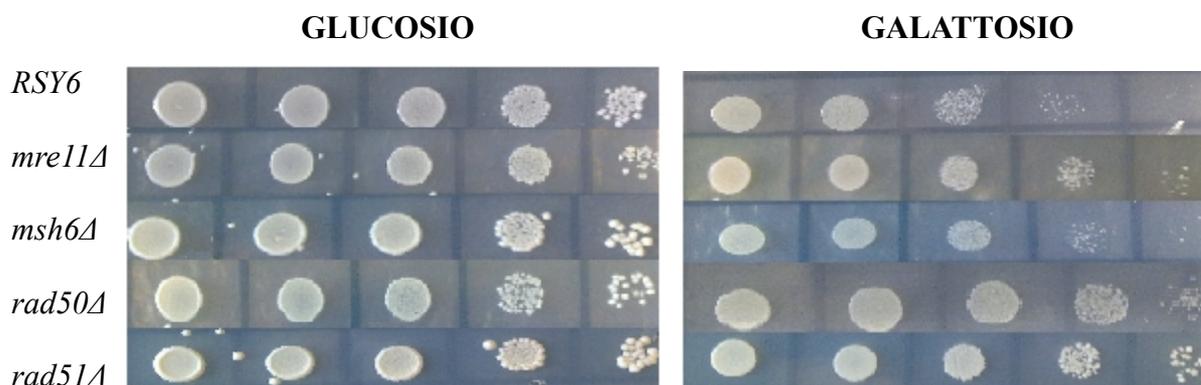


Figura 25: Effetto dell'espressione di **BRCA1 A1789T** nel ceppo RSY6 e in ceppi difettivi per la riparazione del DNA. Gli spots sulla sinistra sono stati effettuati in terreno con glucosio e quelli sulla destra in terreno con galattosio, il primo spot sulla sinistra corrisponde alla diluizione della coltura madre  $10^{-1}$ , ogni spot è diluito 1:10 rispetto al precedente

## CAPITOLO 4: Discussione

L'obiettivo finale di questo progetto è quello di utilizzare la genetica del lievito per capire quali geni implicati nei pathway di riparazione del DNA, possono determinare, se deleti, cambiamenti nella frequenza di ricombinazione e reversione genica in ceppi che esprimono BRCA1 wt e le sue diverse varianti. In questo lavoro, abbiamo espresso nei vari ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* difettivi per la ricombinazione e il mismatch repair 4 varianti missenso di BRCA1 neutre cioè che non sono associate con l'insorgenza di tumore e 5 varianti missenso di BRCA1 patogenetiche che possono essere associate al tumore al seno e quindi se presenti in una famiglia, possono aumentare il rischio di tumore al seno

Il fine ultimo è quello di capire se questi geni possono fare da modificatori del rischio in pazienti che portano queste variazioni di BRCA1 e che quindi possano, in ultima analisi, essere implicati nell'insorgenza dei tumore al seno.

Risultati precedentemente pubblicati hanno dimostrato che nel ceppo diploide RS112 di *Saccharomyces cerevisiae* l'espressione delle varianti associate a tumore induce un significativo aumento di ricombinazione intracromosomica e intercromosomica (Caligo et al., 2009). Questo ci sta ad indicare che le varianti patogenetiche di BRCA1 se espresse in un ceppo diploide di lievito inducono un livello di “ danno” al DNA che in qualche modo determina un aumento di ricombinazione. Poiché i ceppi utilizzati in questo studio sono aploidi, abbiamo determinato l'effetto di BRCA1 wt e delle varianti in ceppi aploidi. Dai dati ottenuti in questa tesi per quanto riguarda l'evento di ricombinazione risulta che l'espressione di BRCA1 nelle sue diverse varianti non influenza questo evento nei ceppi aploidi confermando i risultati riportati in una tesi precedente. Questo dimostra che in caso di aploidia, dove l'unico evento di ricombinazione misurabile è quella intracromosomica, tali eventi non sono molto “inducibili” . Questo può essere anche vantaggioso per le cellule in quanto, mancando il cromosoma omologo, i riarrangiamenti provocati da eventi intracromosomici che molto più frequentemente porterebbero a delezioni o duplicazioni geniche, potrebbero avere conseguenze molto più gravi.

I dati ottenuti sulla frequenza di ricombinazione intracromosomica nei ceppi aploidi e deficienti per la riparazione del DNA sono riassunti nella tabella 13.

L'unico caso in cui abbiamo ottenuto ad una differenza ed in particolare ad una diminuzione di questo evento è nel ceppo *RSY6rad50Δ*. Tale differenza viene riscontrata nella variante neutra Y179C e nelle varianti patogenetiche C61G e A1789T. Questo potrebbe essere

giustificato dal fatto che RAD50 è una proteina conservata ed estremamente importante nelle prime fasi della ricombinazione, infatti, come spiegato nell'introduzione, RAD50 è attivo nella fase di riconoscimento e legame della rottura a doppio filamento ed inoltre posiziona il ssDNA nel sito attivo di MRE11. L'assenza di questo evento, associata alla mutazione sulla sequenza di BRCA1 probabilmente potrebbe essere causa della diminuzione nella frequenza della ricombinazione omologa.

Ceppo / Variante	<i>mre11Δ</i>	<i>msh6Δ</i>	<i>rad50Δ</i>	<i>rad51Δ</i>
<b>BRCA1 WT</b>	-	-	-	-
<b>Y179C</b>	-	-	+++	-
<b>N550H</b>	-	-	-	-
<b>N132K</b>	-	nd	-	-
<b>S151I</b>	-	-	-	-
<b>A1708E</b>	-	-	-	-
<b>I1766S</b>	-	-	-	-
<b>C61G</b>	-	-	+	-
<b>M1775R</b>	-	nd	-	-
<b>A1789T</b>	-	-	+	-

Tabella 13: Confronto tra i ceppi *RSY6mre11Δ*, *RSY6msh6Δ*, *RSY6rad50Δ* e *RSY6rad51Δ* sull'influenza sulla ricombinazione delle varianti patogenetiche e non di BRCA1.

 Variante neutra  Variante patogenetica  
 : non significativa +\*: p < 0,05 +++: 0,01 < p < 0,05 nd: non determinato

Dati più significativi sono stati invece ottenuti invece per quanto riguarda l'effetto dell'espressione di BRCA1 sulla reversione genica dell'allele *ilv1-92* che comunque sta ad indicare danno al DNA ed instabilità genomica. E' noto che la mutazione spontanea avviene attraverso una varietà di meccanismi che vanno da errori di replicazione a danno endogeno al DNA (Friedberg et al 2006). Recentemente, è stato dimostrato anche che esiste un'associazione tra livello di trascrizione genica e mutagenesi spontanea (Alexander et al 2013, Garcia Rubio and Aguilera 2012). Poiché è stato osservato che BRCA1 interferisce con il macchinario della trascrizione in lievito, questo può determinare un più elevato livello di danno endogeno che potrebbe generare instabilità genomica ed aumento di reversione (Bennett et al 2008).

I dati riferiti all'effetto dell'espressione delle varianti sulla reversione sono riassunti nella

tabella 14.

Si può osservare che l'espressione di BRCA1wt induce reversione solo nel ceppo *rad50Δ*. Ciò dimostra che se le rotture a doppio filamento del DNA di origine endogena non vengono segnalate o processate dal complesso MRX possono determinare un aumento di mutazione spontanea. Questo effetto non si osserva nel ceppo *RSY6mre11Δ* dove l'espressione della variante neutra S1512I causa un aumento di questo evento. Nonostante non sia stata riportata un'associazione tra la variante BRCA1 S1512I e tumore al seno, è noto che mutazioni in questa regione di BRCA1 hanno una riduzione nell'efficienza del checkpoint nelle fasi G2/M e S, riduzione che causa una maggiore suscettibilità alle radiazioni ionizzanti, è possibile, quindi, che questa mutazione solitamente non patogenetica, possa diventarlo se associato ad una delezione anche a livello del gene *mre11*, a causa di un'eccessiva instabilità genomica.

Per quanto riguarda il ceppo *RSY6msh6Δ* si nota un incremento nella reversione nel caso dell'espressione della variante patogenetica I1766S, questa variante è localizzata al livello del BRCT domain, è possibile che nel pathway del mismatch repair questa regione svolga un ruolo importante nell'interazione con le proteine del mismatch e se abbiamo una delezione in entrambi i fattori implicati in questa relazione allora si assiste ad un incremento dell'instabilità genomica.

Nel ceppo *RSY6rad51Δ* l'espressione delle varianti patogenetiche C61G, M1775R e A1708E determina un aumento significativo della reversione genica. Quindi è probabile che la delezione di RAD51 che è un gene fondamentale per la riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA determini un accumulo di danni che incrementano il fenotipo di instabilità genomica già indotto da queste varianti di BRCA1.

L'effetto più forte lo vediamo nel ceppo *rad50Δ* in cui l'espressione di tutte le varianti genera un forte incremento di reversione spontanea. Come spiegato in precedenza RAD50 svolge un ruolo importante nelle prime fasi della ricombinazione omologa, infatti è parte del complesso che effettua il primo legame con le rotture a doppio filamento e permette l'avvio del processo di riparazione. Inoltre RAD50 svolge anche un importante ruolo nel mantenimento della stabilità dei telomeri (O'Connor et al., 2004).

L'assenza di questi processi è già fonte d'instabilità genomica, se associamo questa mutazione all'espressione di BRCA1 nelle sue varianti la frequenza di reversione aumenta notevolmente indicando un'evidente interazione tra BRCA1 ed il pathway in cui RAD50 è implicato. Quindi il gene *RAD50* può essere un forte modificatore del rischio in pazienti che portano le diverse mutazioni di BRCA1.

Ceppo / Variante	<i>mre11Δ</i>	<i>msh6Δ</i>	<i>rad50Δ</i>	<i>rad51Δ</i>
<b>BRCA1 WT</b>	-	-	+*	-
<b>Y179C</b>	-	-	-	-
<b>N550H</b>	-	-	+*	-
<b>N132K</b>	-	nd	-	-
<b>S1512I</b>	+*	-	-	-
<b>A1708E</b>	-	-	+*	+***
<b>I1766S</b>	-	+***	+***	-
<b>C61G</b>	-	-	-	+***
<b>M1775R</b>	-	nd	+***	+***
<b>A1789T</b>	-	-	+***	-

Tabella 14: Confronto tra i ceppi *RSY6mre11Δ*, *RSY6msh6Δ*, *RSY6rad50Δ* e *RSY6rad51Δ* sull'influenza sulla reversione delle varianti patogenetiche e non di BRCA1.

Variante neutra  Variante patogenetica

- : aumento non significativo +\* aumento significativo:  $p < 0,05$  +\*\* :  $0,01 < p < 0,05$

Una seconda parte di questo lavoro di tesi consiste nell'avere un quadro più chiaro sull'effetto inibitorio sulla crescita causato da BRCA1 in lievito. Più precisamente, abbiamo determinato se i geni della riparazione del DNA avessero un effetto su questo fenotipo, dato che è stato riportato che BRCA1 induce un danno al DNA e che l'efficienza di riparazione del DNA è direttamente correlata con il livello di instabilità genomica (Bennett et al 2008, Caligo et al 2009, Balia et al. 2011)

Questi dati sono riassunti nella tabella 15.

In generale si osserva che l'espressione delle diverse varianti nei diversi ceppi determina effetti differenti sulla crescita, quindi, in qualche modo i geni della riparazione oggetto di questo studio modulano questo fenotipo.

Appurato che nei terreni con glucosio i diversi ceppi crescono allo stesso livello, la minore crescita riscontrata in terreno con galattosio è indice che tale inibizione dipende dall'espressione di BRCA1 (infatti i ceppi con il plasmide pYES2 vuoto in galattosio

cregono come nel glucosio).

L'espressione delle varianti neutre BRCA1 N132K e N550H causa una minore inibizione della crescita nei ceppi *RSY6*, *RSY6mre11Δ* e *RSY6rad51Δ*; al contrario, si osserva un'inibizione più forte della crescita nel ceppo *RSY6rad50Δ*. Questo dato è in correlazione con i risultati ottenuti nello stesso ceppo nel saggio di reversione genica, in cui la variante N550H causa un aumento di tale reversione e determina quindi una maggiore instabilità genomica; ciò potrebbe indicare che tali varianti possono risultare maggiormente tossiche quando viene a mancare questo pathway.

L'espressione della variante patogenetica M1775R invece determina un'inibizione nei diversi ceppi eccetto che in *RSY6rad51Δ* che invece risulta maggiormente resistente, è possibile quindi che tale inibizione sia dipendente dall'interazione con RAD51 e quindi con il pathway in cui questa proteina è implicata.

Un fenotipo simile si riscontra nelle varianti neutre N132K e S1512I la cui espressione inibisce fortemente la crescita nel ceppo *RSY6* e nel ceppo *RSY6rad50Δ*, ma non nei ceppi *RSY6mre11Δ* e *RSY6rad51Δ* i quali, al contrario, risultano resistenti.

La variante patogenetica A1789T invece sembra revertire il fenotipo inibitorio in tutti i ceppi studiati, è possibile che BRCA1 non riuscendo a svolgere a pieno la sua funzione in seguito a questa delezione importante nei suoi domini BRCT, non riesca nemmeno, in ultima analisi, ad inibire la crescita del lievito.

I risultati ottenuti nel ceppo *RAD50* sono molto interessanti; la crescita sembra essere maggiormente inibita quando vengono espresse le varianti di BRCA1 neutre e meno inibita dall'espressione delle varianti patogenetiche. Questo può in parte correlare con i risultati ottenuti da altri saggi di questo tipo in cui BRCA1, non riuscendo a svolgere a pieno la sua funzione a causa di variazioni in domini importanti della sua sequenza, non riesce nemmeno ad indurre un'effetto apprezzabile sulla crescita nel lievito (Coyne et al., 2004)

Ceppo / Variante	<i>WT</i>	<i>mre11Δ</i>	<i>msh6Δ</i>	<i>rad50Δ</i>	<i>rad51Δ</i>
<b>BRCA1 WT</b>	i	i	i	i	i
<b>Y179C</b>	i	nd	i	mi	i
<b>N550H</b>	i	i	i	mi	i
<b>N132K</b>	mi	pi	nd	mi	pi
<b>S1512I</b>	mi	i	i	mi	i
<b>A1708E</b>	i	i	i	i	i
<b>I1766S</b>	i	i	i	i	i
<b>C61G</b>	i	i	i	i	i
<b>M1775R</b>	i	i	nd	i	pi
<b>A1789T</b>	pi	pi	pi	pi	pi

Tabella 15: Effetto d'inibizione della crescita di BRCA1 wt e delle sue varianti nei ceppi di lievito *RSY6*, *RSY6mre11Δ*, *RSY6msh6Δ*, *RSY6rad50Δ* e *RSY6rad51Δ*.

 Variante neutra  Variante patogenetica  
i: inibito mi: molto inibito pi: poco inibito nd: non definito

Nell'insieme i dati ottenuti in questa tesi dimostrano che l'espressione di BRCA1 determina effetto sulla crescita e sull'instabilità genomica e che i pathway di riparazione del DNA modulano questi effetti. In certi casi abbiamo visto degli effetti diversi indotti in ceppi defettivi per la riparazione del DNA, dall'espressione varianti patogenetiche rispetto a quelle neutre. E' molto difficile stabilire se questi pathway possano avere un ruolo nella modificazione del rischio di tumore in pazienti che portano mutazioni BRCA1 poiché solo uno studio comparativo sulla presenza di polimorfismi o mutazioni in questi geni nei pazienti potrà confermare i nostri risultati ottenuto in un sistema genetico modello.

## CAPITOLO 5: Conclusioni e prospettive

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto che utilizza la genetica del lievito *Saccharomyces cerevisiae* per determinare il meccanismo e le basi genetiche dei tumori derivati da mutazioni o varianti missenso del gene BRCA1. In generale i risultati ottenuti dimostrano che i geni della riparazione del DNA RAD50, RAD51, MRE11 e MSH6 influenzano l'effetto indotto dall'espressione di varianti missenso di BRCA1 sia neutre che patogenetiche. Questo dimostra ancora una volta che anche se il lievito non possiede l'omologo di BRCA1, il livello di conservazione tra uomo e lievito dei pathway di riparazione è talmente elevato che BRCA1 interagisce con questi pathway.

Anche se manca come detto nella discussione un riscontro dei nostri risultati nei pazienti per poter concludere che il nostro approccio sperimentale consente di identificare delle interazioni funzionali tra varianti di BRCA1 e possibili "modificatori" del rischio di tumore, si può confermare che questo sistema modello potrebbe essere utile per identificare dei possibili nuovi geni che potrebbero predisporre al tumore al seno.

In prospettiva, verranno effettuati studi per determinare la localizzazione intracellulare di BRCA1 e delle varianti sia in ceppi di lievito wt che difettivi per la riparazione del DNA anche in seguito ad induzione di danno al DNA per vedere se le varianti patogenetiche si comportano in maniera diversa da quelle neutre.

Ci proponiamo anche di costruire dei ceppi diploidi difettivi nella riparazione del DNA per capire meglio il ruolo della ploidia sulla ricombinazione indotta dall'espressione di varianti missenso BRCA1.

## BIBLIOGRAFIA

Alexander MP, Begins KJ, Crall WC, Holmes MP, Lippert MJ. High levels of transcription stimulate transversions at GC base pairs in yeast. *Environ Mol Mutagen*. 2013 Jan;54(1):44-53.

Antoniou AC, Beesley J, McGuffog L, Sinilnikova OM, Healey S, Neuhausen SL, Ding YC, Rebbeck TR, Weitzel JN, Lynch HT, Isaacs C, Ganz PA, Tomlinson G, Olopade OI, Couch FJ, Wang X, Lindor NM, Pankratz VS, Radice P, Manoukian S, Peissel B, Zaffaroni D, Barile M, Viel A, Allavena A, Dall'Olio V, Peterlongo P, Szabo CI, Zikan M, Claes K, Poppe B, Foretova L, Mai PL, Greene MH, Rennert G, Lejbkowitz F, Glendon G, Ozcelik H, Andrulis IL; Ontario Cancer Genetics Network, Thomassen M, Gerdes AM, Sunde L, Cruger D, Birk Jensen U, Caligo M, Friedman E, Kaufman B, Laitman Y, Milgrom R, Dubrovsky M, Cohen S, Borg A, Jernström H, Lindblom A, Rantala J, Stenmark-Askmal M, Melin B; SWE-BRCA, Nathanson K, Domchek S, Jakubowska A, Lubinski J, Huzarski T, Osorio A, Lasa A, Durán M, Tejada MI, Godino J, Benitez J, Hamann U, Kriege M, Hoogerbrugge N, van der Luijt RB, van Asperen CJ, Devilee P, Meijers-Heijboer EJ, Blok MJ, Aalfs CM, Hogervorst F, Rookus M; HEBON, Cook M, Oliver C, Frost D, Conroy D, Evans DG, Lalloo F, Pichert G, Davidson R, Cole T, Cook J, Paterson J, Hodgson S, Morrison PJ, Porteous ME, Walker L, Kennedy MJ, Dorkins H, Peock S; EMBRACE, Godwin AK, Stoppa-Lyonnet D, de Pauw A, Mazoyer S, Bonadona V, Lasset C, Dreyfus H, Leroux D, Hardouin A, Berthet P, Faivre L; GEMO, Loustalot C, Noguchi T, Sobol H, Rouleau E, Nogues C, Frénay M, Vénat-Bouvet L; GEMO, Hopper JL, Daly MB, Terry MB, John EM, Buys SS, Yassin Y, Miron A, Goldgar D; Breast Cancer Family Registry, Singer CF, Dressler AC, Gschwantler-Kaulich D, Pfeiler G, Hansen TV, Jønson L, Agnarsson BA, Kirchhoff T, Offit K, Devlin V, Dutra-Clarke A, Piedmonte M, Rodriguez GC, Wakeley K, Boggess JF, Basil J, Schwartz PE, Blank SV, Toland AE, Montagna M, Casella C, Imyanitov E, Tihomirova L, Blanco I, Lazaro C, Ramus SJ, Sucheston L, Karlan BY, Gross J, Schmutzler R, Wappenschmidt B, Engel C, Meindl A, Lochmann M, Arnold N, Heidemann S, Varon-Mateeva R, Niederacher D, Sutter C, Deissler H, Gadzicki D, Preisler-Adams S, Kast K, Schönbuchner I, Caldes T, de la Hoya M, Aittomäki K, Nevanlinna H, Simard J, Spurdle AB, Holland H, Chen X; kConFab, Platte R,

Chenevix-Trench G, Easton DF; CIMBA. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9742-54.

Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene.* 2006 Sep 25;25(43):5898-905.

Antoniou AC, Chenevix-Trench G. Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndromes. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Jun;20(3):299-307. doi: 10.1016/j.gde.2010.03.010.

Balia C, Galli A, Caligo MA. Effect of the overexpression of BRCA2 unclassified missense variants on spontaneous homologous recombination in human cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Oct;129(3):1001-9.

Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L, Aaltonen K, Tamminen A, Heikkinen T, Mistrik M, Aittomäki K, Blomqvist C, Heikkilä P, Lukas J, Nevanlinna H, Bartek J. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol.* 2008 Dec;2(4):296-316.

Bennett CB, Westmoreland TJ, Verrier CS, Blanchette CA, Sabin TL, Phatnani HP, Mishina YV, Huper G, Selim AL, Madison ER, Bailey DD, Falae AI, Galli A, Olson JA, Greenleaf AL, Marks JR. Yeast screens identify the RNA polymerase II CTD and SPT5 as relevant targets of BRCA1 interaction. *PLoS One.* 2008 Jan 16;3(1):e1448.

Blackwell LJ, Bjornson KP, Modrich P. DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32049-54.

Caligo MA, Bonatti F, Guidugli L, Aretini P, Galli A. A yeast recombination assay to characterize human BRCA1 missense variants of unknown pathological significance. *Hum Mutat.* 2009 Jan;30(1):123-33.

- Cantor SB, Andreassen PR. Assessing the link between BACH1 and BRCA1 in the FA pathway. *Cell Cycle*. 2006 Jan;5(2):164-7.
- Cervelli T, Galli A. Effects of HDF1 (Ku70) and HDF2 (Ku80) on spontaneous and DNA damage-induced intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 2000 Sep;264(1-2):56-63.
- Couch FJ, Sinilnikova O, Vierkant RA, Pankratz VS, Fredericksen ZS, Stoppa-Lyonnet D, Coupier I, Hughes D, Hardouin A, Berthet P, Peock S, Cook M, Baynes C, Hodgson S, Morrison PJ, Porteous ME, Jakubowska A, Lubinski J, Gronwald J, Spurdle AB; kConFab, Schmutzler R, Versmold B, Engel C, Meindl A, Sutter C, Horst J, Schaefer D, Offit K, Kirchhoff T, Andrulis IL, Ilyushik E, Glendon G, Devilee P, Vreeswijk MP, Vasen HF, Borg A, Backenhorn K, Struewing JP, Greene MH, Neuhausen SL, Rebbeck TR, Nathanson K, Domchek S, Wagner T, Garber JE, Szabo C, Zikan M, Foretova L, Olson JE, Sellers TA, Lindor N, Nevanlinna H, Tommiska J, Aittomaki K, Hamann U, Rashid MU, Torres D, Simard J, Durocher F, Guenard F, Lynch HT, Isaacs C, Weitzel J, Olopade OI, Narod S, Daly MB, Godwin AK, Tomlinson G, Easton DF, Chenevix-Trench G, Antoniou AC; Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. AURKA F31I polymorphism and breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jul;16(7):1416-21.
- Coyne RS, McDonald HB, Edgemon K, Brody LC. Functional characterization of BRCA1 sequence variants using a yeast small colony phenotype assay. *Cancer Biol Ther*. 2004 May;3(5):453-7.
- Dapić V, Monteiro AN. Functional implications of BRCA1 for early detection, prevention, and treatment of breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2006;16(3):233-52.
- Erkko H, Xia B, Nikkilä J, Schleutker J, Syrjäkoski K, Mannermaa A, Kallioniemi A, Pylkäs K, Karppinen SM, Rapakko K, Miron A, Sheng Q, Li G, Mattila H, Bell DW, Haber DA, Grip M, Reiman M, Jukkola-Vuorinen A, Mustonen A, Kere J, Aaltonen LA, Kosma VM, Kataja V, Soini Y, Drapkin RI, Livingston DM, Winqvist R. A recurrent

mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*. 2007 Mar 15;446(7133):316-9.

Fanale D, Amodeo V, Corsini LR, Rizzo S, Bazan V, Russo A. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene*. 2012 Apr 26;31(17):2121-8.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T. 2006. *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press. 1118 p.

Galkin VE, Wu Y, Zhang XP, Qian X, He Y, Yu X, Heyer WD, Luo Y, Egelman EH. The Rad51/RadA N-terminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity. *Structure*. 2006 Jun;14(6):983-92.

Galli A, Cervelli T, Schiestl RH. Characterization of the hyperrecombination phenotype of the pol3-t mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2003 May;164(1):65-79.

Galli A, Hafer K, Cervelli T, Schiestl RH. The pol3-t hyperrecombination phenotype and DNA damage-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae* is RAD50 dependent. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:312710.

Galli A, Schiestl RH. Effects of Salmonella assay negative and positive carcinogens on intrachromosomal recombination in G1-arrested yeast cells. *Mutat Res*. 1996 Oct 1;370(3-4):209-21.

Galli A, Schiestl RH. On the mechanism of UV and gamma-ray-induced intrachromosomal recombination in yeast cells synchronized in different stages of the cell cycle. *Mol Gen Genet*. 1995 Aug 21;248(3):301-10.

Garcia-Rubio M, Huertas P, Gonzalez-Barrera S, Aguilera A. 2003. Recombinogenic effects of DNA-damaging agents are synergistically increased by transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. New insights into transcription-associated recombination. *Genetics* 165: 457–466.

Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*. 2007;2(1):31-4.

- Golub EI, Kovalenko OV, Gupta RC, Ward DC, Radding CM. Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res.* 1997 Oct 15;25(20):4106-10.
- Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA. *Science.* 2003 Jun 13;300(5626):1657.
- Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, Fishel R. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell.* 1999 Feb;3(2):255-61.
- He M, Di GH, Cao AY, Hu Z, Jin W, Shen ZZ, Shao ZM. RAD50 and NBS1 are not likely to be susceptibility genes in Chinese non-BRCA1/2 hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 May;133(1):111-6.
- Hilario J, Amitani I, Baskin RJ, Kowalczykowski SC. Direct imaging of human Rad51 nucleoprotein dynamics on individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan 13;106(2):361-8.
- Hoffmann GR, Ronan MV, Sylvia KE, Tartaglione JP. Enhancement of the recombinogenic and mutagenic activities of bleomycin in yeast by intercalation of acridine compounds into DNA. *Mutagenesis.* 2009 Jul;24(4):317-29.
- Humphrey JS, Salim A, Erdos MR, Collins FS, Brody LC, Klausner RD. Human BRCA1 inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5820-5.
- Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5):335-46.
- Karpenshif Y, Bernstein KA. From yeast to mammals: recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 2012 Oct 1;11(10):781-8.

- Kitao H, Yuan ZM. Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002 Dec 13;277(50):48944-8.
- Laloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet*. 2012 Aug;82(2):105-14.
- Lee MS, Green R, Marsillac SM, Coquelle N, Williams RS, Yeung T, Foo D, Hau DD, Hui B, Monteiro AN, Glover JN. Comprehensive analysis of missense variations in the BRCT domain of BRCA1 by structural and functional assays. *Cancer Res*. 2010 Jun 15;70(12):4880-90.
- Millot GA, Berger A, Lejour V, Boulé JB, Bobo C, Cullin C, Lopes J, Stoppa-Lyonnet D, Nicolas A. Assessment of human Nter and Cter BRCA1 mutations using growth and localization assays in yeast. *Hum Mutat*. 2011 Dec;32(12):1470-80.
- Millot GA, Berger A, Lejour V, Boulé JB, Bobo C, Cullin C, Lopes J, Stoppa-Lyonnet D, Nicolas A. Assessment of human Nter and Cter BRCA1 mutations using growth and localization assays in yeast. *Hum Mutat*. 2011 Dec;32(12):1470-80.
- Milne RL, Antoniou AC. Genetic modifiers of cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Ann Oncol*. 2011 Jan;22 Suppl 1:i11-7.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 1997 Nov;17(3):271-2.
- Morris JR, Pagon L, Boutell C, Katagiri T, Keep NH, Solomon E. Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2006 Feb 15;15(4):599-606.
- O'Connor MS, Safari A, Liu D, Qin J, Songyang Z (July 2004). "The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length". *J. Biol. Chem*. 279 (27): 28585–91.

- Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Mar;66(6):1039-56.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell.* 2010 Feb 26;37(4):492-502.
- Petrini JH, Walsh ME, DiMare C, Chen XN, Korenberg JR, Weaver DT. Isolation and characterization of the human MRE11 homologue. *Genomics.* 1995 Sep 1;29(1):80-6.
- Pierce AJ, Stark JM, Araujo FD, Moynahan ME, Berwick M, Jasin M. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 2001 Nov;11(11):S52-9.
- Poumpouridou N, Kroupis C. Hereditary breast cancer: beyond BRCA genetic analysis; PALB2 emerges. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Dec 23;50(3):423-34.
- Richardson C, Jasin M. Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(23):9068-75.
- Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 2011 Dec 23;12(1):68-78.
- Sassi A, Popielarski M, Synowiec E, Morawiec Z, Wozniak K. BLM and RAD51 Genes Polymorphism and Susceptibility to Breast Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2013 Feb 13.
- Scully R, Anderson SF, Chao DM, Wei W, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5605-10.

- Shakya R, Reid LJ, Reczek CR, Cole F, Egli D, Lin CS, deRooy DG, Hirsch S, Ravi K, Hicks JB, Szabolcs M, Jasin M, Baer R, Ludwig T. BRCA1 tumor suppression depends on BRCT phosphoprotein binding, but not its E3 ligase activity. *Science*. 2011 Oct 28;334(6055):525-8.
- Siciliano PD, Parker AL, Lawrence LM. Effect of dietary vitamin E supplementation on the integrity of skeletal muscle in exercised horses. *J Anim Sci*. 1997 Jun;75(6):1553-60.
- Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Dec;31(12):2031-8.
- Spurdle AB, Antoniou AC, Duffy DL, Pandeya N, Kelemen L, Chen X, Peock S, Cook MR, Smith PL, Purdie DM, Newman B, Dite GS, Apicella C, Southey MC, Giles GG, Hopper JL, Chenevix-Trench G, Easton DF; EMBRACE Study Collaborators. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and modification of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res*. 2005;7(2):R176-83.
- Towler WI, Zhang J, Ransburgh DJ, Toland AE, Ishioka C, Chiba N, Parvin JD. Analysis of BRCA1 Variants in Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination and Single-Strand Annealing. *Hum Mutat*. 2013 Mar;34(3):439-45.
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem*. 1998 Aug 21;273(34):21447-50.
- Vallon-Christersson J, Cayan C, Haraldsson K, Loman N, Bergthorsson JT, Brøndum-Nielsen K, Gerdes AM, Møller P, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A, Monteiro AN. Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*. 2001 Feb 15;10(4):353-60.
- Vollebergh MA, Jonkers J, Linn SC. Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jan;69(2):223-45.

- Walters R, Kalb R, Gatei M, Kijas AW, Stumm M, Sobock A, Wieland B, Varon R, Lerenthal Y, Lavin MF, Schindler D, Dörk T. Human RAD50 deficiency in a Nijmegen breakage syndrome-like disorder. *Am J Hum Genet.* 2009 May;84(5):605-16.
- Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, Elledge SJ. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science.* 2007 May 25;316(5828):1194-8.
- Wang H, Shao Z, Shi LZ, Hwang PY, Truong LN, Berns MW, Chen DJ, Wu X. CtIP protein dimerization is critical for its recruitment to chromosomal DNA double-stranded breaks. *J Biol Chem.* 2012 Jun 15;287(25):21471-80.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* 2000 Apr 15;14(8):927-39.
- Wasielowski M, Riaz M, Vermeulen J, van den Ouweland A, Labrijn-Marks I, Olmer R, van der Spaa L, Klijn JG, Meijers-Heijboer H, Dooijes D, Schutte M. Association of rare MSH6 variants with familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Sep;123(2):315-20.
- Westmoreland TJ, Olson JA, Saito WY, Huper G, Marks JR, Bennett CB. Dhh1 regulates the G1/S-checkpoint following DNA damage or BRCA1 expression in yeast. *J Surg Res.* 2003 Jul;113(1):62-73.
- Williams RS, Chasman DI, Hau DD, Hui B, Lau AY, Glover JN. Detection of protein folding defects caused by BRCA1-BRCT truncation and missense mutations. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):53007-16.
- Yuan SS, Hou MF, Hsieh YC, Huang CY, Lee YC, Chen YJ, Lo S. Role of MRE11 in cell proliferation, tumor invasion, and DNA repair in breast cancer. *Natl Cancer Inst.* 2012 Oct 3;104(19):1485-502.

Zimmermann FK, Scheel I. Genetic effects of 5-azacytidine in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Mutat Res. 1984 Jan;139(1):21-4.