



UNIVERSITÀ DI PISA

Corso di laurea in Biologia Molecolare e Cellulare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Identificazione di nuovi geni che influenzano
l'espressione e la localizzazione della poli ADP ribosio
polimerasi nel lievito *Saccharomyces cerevisiae***

Relatore: Dott. Alvaro Galli

Candidata: Giulia Rocchi

Anno accademico 2012/2013

Ai miei genitori,

*per esser stati un costante
sostegno durante questo
lungo percorso.*

Alla mia dolce metà,

*per aver camminato al
mio fianco dall'inizio alla
fine.*

INDICE

Riassunto	4
Abstract	7
CAPITOLO 1: Introduzione	10
1.1 L'enzima poli ADP ribosio polimerasi	10
1.2 Meccanismi di riparazione del DNA	15
1.2.1 Riparazione per escissioni di basi (BER) e di nucleotidi (NER)	15
1.2.2 Riparazione per ricombinazione omologa delle rotture a doppio filamento	20
1.3 Il lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.1 Biologia di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.3.2 Il lievito come organismo modello	25
1.4 Inibitori di PARP	29
1.5 Scopo della tesi	36
CAPITOLO 2: Materiali e Metodi	39
2.1 Ceppi di lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.2 Vettore plasmidico pYES2	39
2.3 Terreni di coltura	41
2.3.1 Terreno completo YPAD	41
2.3.2 Terreno selettivo	42
2.3.3 Terreno LB	43
2.4 Estrazione di DNA plasmidico dai batteri	43

2.5 Trasformazione in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con DNA plasmidico	44
2.6 Ceppo RS112	46
2.7 Saggio di ricombinazione	47
2.8 Irradiazione di cellule con raggi UV	49
2.8.1 Determinazione della frequenza di ricombinazione	49
2.9 Crescita in terreno induttivo e d estrazione proteica	49
2.9.1 Quantificazione delle proteine con saggio Bradford	50
2.9.2 Corsa elettroforetica	51
2.9.3 Trasferimento su membrana	52
2.9.4 Ibridazione con anticorpo	54
2.9.4.1 SnapID della Millipore	54
2.9.4.2 Metodo “classico”	55
2.9.5 Sviluppo	55
2.10 Microscopia a fluorescenza	56
2.11 Localizzazione intracellulare di PARP-1	58
CAPITOLO 3: Risultati	60
3.1 Effetto dell’espressione di PARP-1 sulla ricombinazione omologa	60
3.2. Espressione di PARP-1 nel ceppo diploide BY4743 e nei ceppi deleti per HH01, GAL3, NUP210, OTU1, SNT1, HUL4	69
3.3 Localizzazione cellulare di PARP-1	72
CAPITOLO4: Discussione	83
CAPITOLO 5: Conclusioni e prospettive future	87
Bibliografia	88

RIASSUNTO

Nell'uomo, la Poli (ADP-ribosio) polimerasi-1 (PARP-1) è una proteina a localizzazione prevalentemente nucleare molto abbondante nelle cellule che possiede un'attività catalitica NAD⁺ dipendente che sintetizza un polimero carico negativamente chiamato poli (ADP-ribosio) o PAR e lo trasferisce sulle proteine bersaglio. Svolge una serie di attività biochimiche distinte che la rendono ben adattata per i ruoli sia strutturali e regolatori in tutto il genoma. Gioca, infatti, un ruolo chiave in un'ampia varietà di processi che avvengono all'interno del nucleo della cellula, quali la trascrizione e la riparazione del DNA; inoltre, sembra sia coinvolta nel mantenimento della corretta struttura della cromatina. PARP-1 può legarsi a diverse strutture del DNA e ai nucleosomi. Poiché PARP-1 regola la riparazione del DNA, inibitori di PARP-1 sono usati come coadiuvanti nelle terapie antitumorali e antinfiammatorie. In pratica, quando l'attività di PARP è inibita, non si possono più attivare quei pathway che riparano il DNA e quindi, in presenza di danno al DNA la cellula muore per apoptosi. Durante la terapia, è stato osservato che un certo numero di pazienti diventa insensibile a tali inibitori. Alcuni studi hanno proposto vari modelli per spiegare il meccanismo di questa "resistenza", ma il meccanismo molecolare ed i geni coinvolti non sono ancora completamente chiari. Comunque, un aumentato livello proteico intracellulare o un difetto nella localizzazione nucleare di PARP-1 possono essere importanti per l'efficacia degli inibitori di PARP usati in terapia. Uno screening genetico utilizzando un pool di ceppi di lievito deleti per geni non essenziali effettuato nel nostro laboratorio ha permesso di identificare 110 geni che potrebbero interferire con le funzioni di PARP e quindi avere un ruolo nella sensibilità agli inibitori. In questa tesi abbiamo determinato il livello di PARP-1 e la sua localizzazione, nel ceppo diploide BY4743 ed in 6 ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* identificati mediante lo screening come "resistenti" all'effetto inibitorio sulla crescita dovuto all'espressione di PARP-1. Questi ceppi sono tutti derivati dal parentale diploide BY4743 ed ognuno di questi presenta una delezione specifica in uno dei seguenti geni: *GAL3* che codifica

per una proteina che regola il metabolismo del galattosio, *HHO1* che codifica per l'istone H1, *HULA* che codifica per una proteina con attività ubiquitina ligasica, *OTU1* per una proteasi ubiquitina specifica, *POM152* che codifica per una proteina del poro nucleare e *SNT1* per una proteina probabilmente implicata nel legame con il DNA. Queste funzioni potrebbero in qualche modo avere un ruolo nell'attività di PARP e potrebbero influenzare la sua localizzazione e il livello intracellulare. Inoltre, queste proteine presentano il corrispettivo omologo umano. Lo scopo di questa tesi è quello di identificare nuovi geni che possano avere un effetto sulla risposta agli inibitori di PARP. L'obiettivo finale di questo progetto è quello di individuare nuovi target terapeutici per una terapia più personalizzata. Per prima cosa abbiamo determinato il livello di PARP-1 in tutti e 6 ceppi deleti e per confronto nel ceppo parentale. Esperimenti di Western Blot dimostrano che tutti i ceppi portanti la specifica delezione tranne *gal3* esprimono PARP-1. I risultati mostrano inoltre che il livello di PARP-1 nei ceppi deleti è leggermente inferiore a quello determinato nel ceppo parentale wild type. Successivamente, abbiamo trasformato i tutti i ceppi deleti presi in esame con il plasmide pYES2 che permette l'espressione di PARP-1 fuso con GFP, in modo tale da osservare, tramite l'utilizzo del microscopio a fluorescenza, la localizzazione di tale proteina all'interno della cellula, e soprattutto vedere se in presenza di danno al DNA varia la sua posizione intracellulare. E' stato riscontrato soprattutto nei ceppi deleti per *HHO1* e *POM152* un aumento del numero di cellule rispetto al wild type, in cui PARP-1 si localizza nel nucleo, confermando l'ipotesi che tali geni possano interferire con le funzioni di PARP-1 e quindi avere un ruolo nella sensibilità agli inibitori. Tramite l'utilizzo di un anticorpo anti anti-PAR, che permette di visualizzare il polimero di ADP ribosio, sintetizzato da PARP-1 abbiamo dimostrato che i ceppi producono il polimero indicando che le funzioni geniche oggetto di studio non interferiscono sulla attività specifica di PARP. Dalla letteratura è noto che PARP-1 è implicato in modo indiretto nella riparazione dei danni al DNA tramite il pathway del Base Excision Repair (BER). Poiché il ceppo di lievito RS112 contiene un sistema di ricombinazione intercromosomica e intracromosomica, che permette di misurare la frequenza di tali eventi

direttamente su piastra abbiamo determinato se l'espressione di PARP-1 influenzasse tale ricombinazione. I risultati mostrano che l'espressione di PARP non influenza il livello di ricombinazione spontanea in lievito. Per determinare l'effetto di PARP sulla ricombinazione indotta danni al DNA sono stati effettuati esperimenti irradiando in ceppo RS112 con diverse dosi di raggi UV. I risultati preliminari indicano che l'espressione di PARP riduce la frequenza di ricombinazione indotta da UV confermando i dati ottenuti su linee cellulari di mammifero.

In conclusione, questo lavoro di tesi si dimostra ancora una volta che il lievito *Saccharomyces cerevisiae* può essere considerato un sistema genetico modello per caratterizzare il meccanismo ed i fattori coinvolti che possono influenzare la risposta a farmaci usati nella terapia antitumorale.

ABSTRACT

In humans, PARP-1 gene encodes for a nuclear enzyme Poly(ADP-ribose)polymerase-1, that plays a key role in a wide variety of processes that occur inside the nucleus of the cell, such as transcription, genome integrity and it maintains the correct structure of chromatin. This protein has a NAD⁺ dependent catalytic activity which synthesizes a negatively charged polymer called poly (ADP-ribose) or PAR and transfers it to the target proteins.

It has been observed that mutations or alterations of the expression or activity of this protein are often associated with defects in cell differentiation and the onset of tumors. In fact, inhibitors of PARP are used as adjuvants in cancer and anti-inflammatory therapy. The resistance to inhibitors of PARP which manifests in some patients, has not yet been studied in depth.

During therapy, it was observed that a number of patients becomes insensitive to these inhibitors. Some studies have proposed several models to explain the mechanism of this "resistance", but the molecular mechanism and the genes involved are not yet fully clear.

An increased intracellular protein level or a defect in the nuclear localization of PARP1 may be important for the efficacy of PARP inhibitors used in therapy.

A genetic screening conducted in our laboratory using a pool of yeast strains deleted for non-essential gene has allowed us to identify 110 genes that could interfere with the functions of PARP and thus play a role in sensitivity to inhibitors. In this thesis, we determined the level of PARP-1 and its localization, in the diploid strain BY4743 and 6 strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* identified through screening as ' resistant 'to' inhibitory effect on growth due to the expression of PARP-1 .

These strains are all derived from the parental diploid BY4743 and each of these has a specific deletion in one of the following genes : GAL3 that encodes a

protein that regulates the metabolism of galactose , HHO1 encoding histone H1 , HUL4 coding for a protein with ubiquitin ligase activity , OTU1 coding for a ubiquitin specific protease , POM152 coding for a protein of the pore nucleare and SNT1 for a protein probably involved in DNA binding . These functions may play a role in the ' activity of PARP and could affect its localization and the intracellular level. In addition, these proteins have the corresponding human homologue. The purpose of this thesis is to identify new genes that may have an effect on the response to PARP inhibitors . The final aim of this project is to identify new therapeutic targets for personal therapy. We first determined the level of PARP-1 in all 6 -deleted strains and in comparison to the parental strain.

Western blot experiments show that all deleted strains except for gal3 express PARP-1. Subsequently, we have transformed all-deleted strains examined with the plasmid pYES that allows the expression of PARP-1 fused with GFP to observe, through the use of the fluorescence microscope, the intracellular localization of this protein, and especially to see if in the presence of DNA damage change its intracellular localization.

It was found that in the HH01 and POM152 deletion strains an increase in the number of cells compared to wild type, in which PARP1 localizes in the nucleus, confirming the hypothesis that these genes may interfere with the functions of PARP and therefore have a role in sensitivity to inhibitors. Through the use of an antibody to anti-PAR, which allows viewing of the polymer of ADP ribose synthesized by PARP-1, have shown that the deleted strains produce the polymer indicating that these deleted genes do not interfere on the specific activity of PARP . From the literature it is known that PARP-1 is involved in an indirect way in the repair of DNA damage via the base excision repair pathway (BER).

Yeast strain RS112 contains a system of intrachromosomal and interchromosomal recombination , which allows to measure the frequency of these events directly on the plate , we determined how the expression of PARP-1 influenced the recombination. The results show that the expression of PARP not

influence the level of spontaneous recombination in yeast. We also determined the influence Of PARP on recombination in presence of DNA damage induced by different doses of UV rays. Preliminary results indicate that the expression of PARP reduces the frequency of recombination induced by UV confirming the data obtained on mammalian cell lines . In conclusion, this thesis proves once again that the yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be considered a genetic model system to characterize the mechanism involved and the factors that may influence the response to drugs used in cancer therapy .

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 L'enzima poli ADP ribosio polimerasi 1

Il gene PARP-1 codifica per l'enzima poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP-1), proteina altamente conservata di circa 116 kDa molto abbondante nella cellula a localizzazione sia nucleare che citoplasmatica (D'Amours et al., 1999).

Numerosi studi hanno dimostrato che PARP-1 è implicato in un elevato numero di processi cellulari; regola la struttura della cromatina e di conseguenza il processo di trascrizione, la riparazione del DNA, la metilazione del DNA e l'organizzazione dei cromosomi. All'interno della cellula, qualora il gene sia mutato o la sua espressione sia inibita, sensibilizza la cellula stessa al danno al DNA e determina in ultima analisi l'apoptosi (Simbulan-Rosenthal et al., 1999). PARP-1 può legare varie strutture del DNA o nucleosomi, e possiede un'attività NAD⁺ dipendente. È in grado di sintetizzare un polimero carico negativamente chiamato poliADP-ribosio o PAR e trasferirlo su proteine accettrici.

Le reazioni di poli ADP ribosilazione e i geni PARP-like sono stati identificati in una grande varietà di organismi eucarioti unicellulari e pluricellulari, dai funghi ai mammiferi, così come gli *Eubacteria*, *Archaeobacteria* e Virus a DNA a doppio filamento. Sorprendentemente, non è stato rilevato nelle specie di lievito *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Come mostrato in figura 1, PARP-1 presenta una struttura modulare con diversi domini indipendenti.

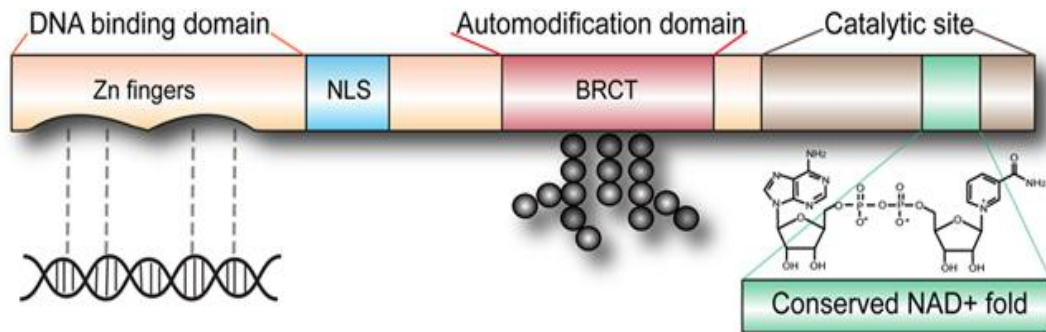


Figura.1 Rappresentazione schematica della struttura della proteina PARP-1. Suddivisione nei tre domini funzionali della proteina: dominio ammino-terminale (DBD); dominio centrale (AMD); Dominio carbossi-terminale (CD)

In particolare, PARP-1 presenta tre domini funzionali:

1. DNA-binding domain (DBD): dominio ammino-terminale implicato nel legame al DNA. Il dominio ammino-terminale contiene due “zinc-finger” costituiti da Cys-Cys-His-Cys (FI/Zn1 eFII/Zn2) i quali mediano il legame al DNA. E’ stato scoperto inoltre un terzo Zn-finger (FIII/Zn3) che media il contatto tra i domini ed è di fondamentale importanza per l’attivazione dell’enzima una volta legato il DNA. (Langelier et al., 2008, 2010).
2. Automodification-domain (AMD): dominio centrale di auto modificazione. Il dominio centrale contiene una sequenza BRCT, che media le interazioni proteine-proteina.
3. Dominio carbossi-terminale (CD) con attività catalitica. Il dominio carbossi-terminale che è il dominio più conservato della famiglia di PARP, contiene un sito specifico nel legare NAD+.

Le funzioni in cui la proteina PARP1- è coinvolta, coprono un range molto esteso di processi cellulari, incluso la riparazione del DNA, trascrizione, segnalazione

cellulare, regolazione del ciclo cellulare e mitosi (Ame et al.,2004; Chang et al., 2004; Hakme et al.,2008; Hassa and Hottiger, 2008; Schreiber et al., 2006) .

PARP1- si lega in specifici siti sul DNA, grazie all'interazione di alcuni dei suoi domini con gli istoni, o altre proteine associate alla cromatina. Inoltre, PARP-1 si lega ad una varietà di strutture di DNA che si possono formare, quali rotture a doppio filamento (DSB), giunzioni di Holliday, come anche a specifiche sequenze di DNA (Kraus, 2008; Kraus and Lis, 2003). Inoltre, PARP-1 può interagire con un'ampia varietà di proteine che agiscono a livello del DNA, quali componenti del macchinario della trascrizione, fattori specifici nel legame di specifiche sequenze sul DNA, e varianti istoniche (Kim et al., 2004; Kraus, 2008; Kraus and Lis, 2003).

Studi di localizzazione hanno mostrato che PARP-1 si lega a promotori di geni che solitamente sono molto trascritti all'interno della cellula (Kim et al., 2004.; Krishnakumar et al., 2008). Il legame di tale proteina con le sequenze promotrici è correlato con l'espressione del gene della DNA Polimerasi II e con una modificazione a livello degli istoni che "marca" i promotori attivi. PARP-1 modifica gli istoni H1, H2A e H2B, che svolgono un ruolo chiave nel mantenere la corretta struttura della cromatina (D'Amours et al., 1999; Kim et al., 2005; Kraus, 2008; Kraus and Lis, 2003).

La modificazione post-traduzionale dovuta all'attività di PARP-1 consiste nell'attacco di un polimero carico negativamente detto Poli(ADP)ribosio o PAR .

PAR è sintetizzato da un'attività catalitica di PARP-1, che catalizza la polimerizzazione di unità di poli ADP ribosio da donatori di molecole NAD⁺ su proteine target (D'Amours et al.,1999) (Figura 2).

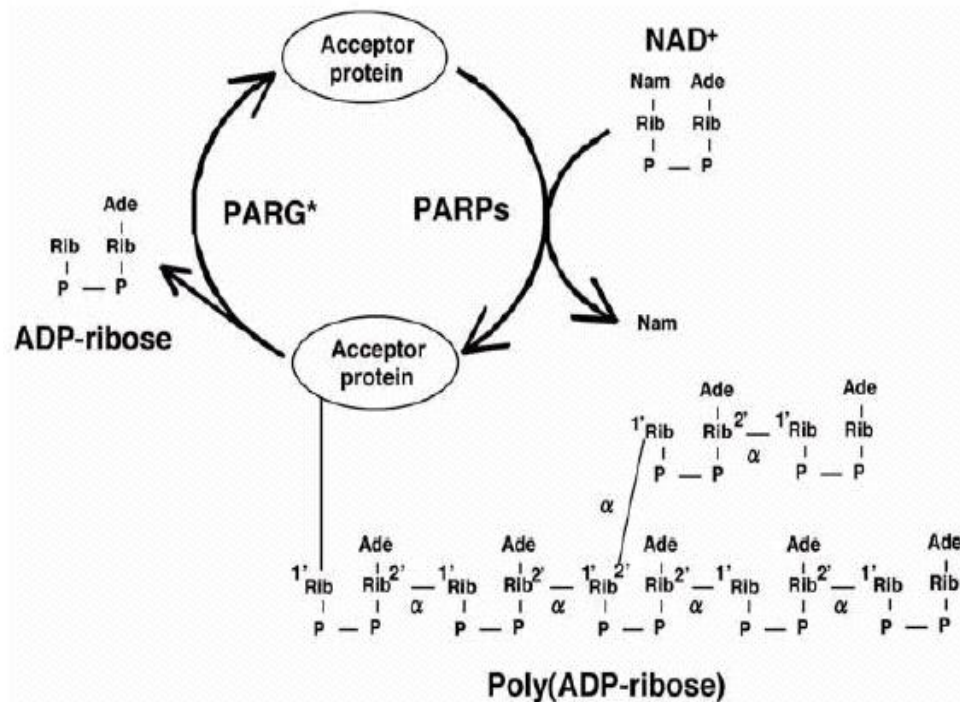


Figura.2: Rappresentazione della reazione necessaria per la produzione del polimero Poli(ADP)ribosio o PAR.

Come si vede in figura 2, le unità di ADP ribosio sono unite l'una alle altre tramite legami ribosio-ribosio, dando origine ad un polimero PAR che può essere lineare o ramificato (D'Amours et al., 1999). Queste molecole possono essere attaccate ai residui di lisina o ai gruppi carbossilici del glutammato e aspartato, presenti sulle proteine target (Gibson et al. 2012). La maggior parte delle molecole PAR libere o associate a proteine sono rapidamente degradate *in vivo* (Matthias Altmeyer and Michael O. Hottiger, 2009).

Il poli(ADP)ribosio viene idrolizzato dagli enzimi noti come *Poli(ADP-ribosio) glicoidrolasi* (PARG), *Fosfodiesterasi* (PDasi) e *Liasi*. Di queste proteine, PARG risulta essere l'enzima più efficiente nell'idrolizzare le catene di poli(ADP-ribosio), compresa la parte ramificata. In seguito alla idrolizzazione, le molecole di mono-ADP-ribosio rilasciate, saranno rimosse dalla *ADP-ribosil proteina liasi-7* (Hassa et al., 2006) o rilasciate spontaneamente a pH neutro.

L'attività catalitica di PARP-1 è inoltre regolata da modifiche post-traduzionali:

- auto-PARilazione: PARP-1 viene modificata mediante l'attacco di un polimero di ADP-ribosio costituito da più di 200 unità di lunghezza. Tale polimero tende a legarsi a livello del dominio BRCT della proteina. Studi biochimici hanno dimostrato che eccessive "PARilazioni" su tale enzima provocano il suo distacco dal legame con la cromatina (Kim et al., 2004).
- Fosforilazione: PARP-1 è fosforilata da ERK1/2 (nei siti Ser372 e Thr 373) e da JNK1, mentre è acetilata dall'enzima acetiltransferasi p300/CBP (Hassa et al. 2003; Zhang et al., 2007).
- SUMOilazione e ubiquitinizzazione: PARP-1 interagisce con PIASy, una proteina SUMO E3, e ciò amplifica la sua azione di regolatrice della trascrizione e della struttura della cromatina (Messner et al., 2009).

Inoltre, PARP-1 può legarsi alla cromatina fuori dalle regioni dei promotori qualora il DNA subisca dei danni dovuti a ogni tipo di stress. Tali danni inducono una rilocalizzazione di PARP-1 dai promotori ai siti dove è avvenuto il danno al DNA, quali rotture del DNA a doppio filamento.

Con la sua attività cerca di riparare il danno in maniera indiretta, poiché tende ad attivare diverse proteine implicate nella riparazione del DNA, inclusa la p53. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che l'aggiunta del polimero PAR, da parte di PARP-1, su specifici siti della p53, possano prevenire la sua esportazione all'esterno del nucleo bloccando la sua interazione con il recettore dell'esportina nucleare Crm1 (Kanai et al., 2007).

In presenza di danni al DNA, PARP-1 promuove la sopravvivenza cellulare e ripara il DNA; tuttavia, nel caso in cui il numero di danni al DNA diventa troppo elevato per essere riparabile, PARP-1 promuove la morte della cellula attraverso due pathway distinti:

1) morte per necrosi a causa di un esaurimento delle scorte del substrato, NAD⁺. Ciò causa la diminuzione della glicolisi e del ciclo di Krebs, del trasporto elettronico mitocondriale e della produzione di ATP.

2) morte per apoptosi della cellula stessa (Bouchard et al., 2003).

Inoltre è noto che PARP-1 interagisce con proteine implicate nel pathway di riparazione del DNA e gioca un ruolo chiave nel reclutare tali proteine nei siti di danno al DNA (Woodhouse and Dianov, 2008).

1.2 Meccanismi di riparazione del DNA

1.2.1 Riparazione per escissione di basi (BER) e di nucleotidi (NER)

L'accumulo di danno ossidativo al DNA causa l'insorgere di mutazioni e destabilizzazioni del genoma, favorendo un processo di invecchiamento e carcinogenesi (Svilar et al., 2011).

Una prima linea di difesa contro i danni ossidativi di base è la sua correzione tramite riparazione per escissione di base (BER). BER svolge un ruolo essenziale nel rimuovere le piccole lesioni che nascono spontaneamente dai processi biochimici cellulari endogeni o da alcuni agenti esogeni come agenti achilanti (Fiedberg et al., 2006). Uno schema della riparazione per BER è rappresentata in figura 3. Il processo di riparazione inizia da una DNA glicosilasi che si lega in prossimità della base danneggiata, e taglia il legame N-glicosidico che lega la base del DNA al fosfato dello zucchero.

Il sito che si genera prende il nome di sito "apurinico" o "apirimidinico" (sito AP), e viene riconosciuto da una AP endonucleasi che taglia in prossimità dell'estremità 5' del sito AP, generando una rottura a singolo filamento nel DNA (SSB), che presenta un gruppo idrossile all'estremità 3' e il fosfato del deossiribosio al 5'.

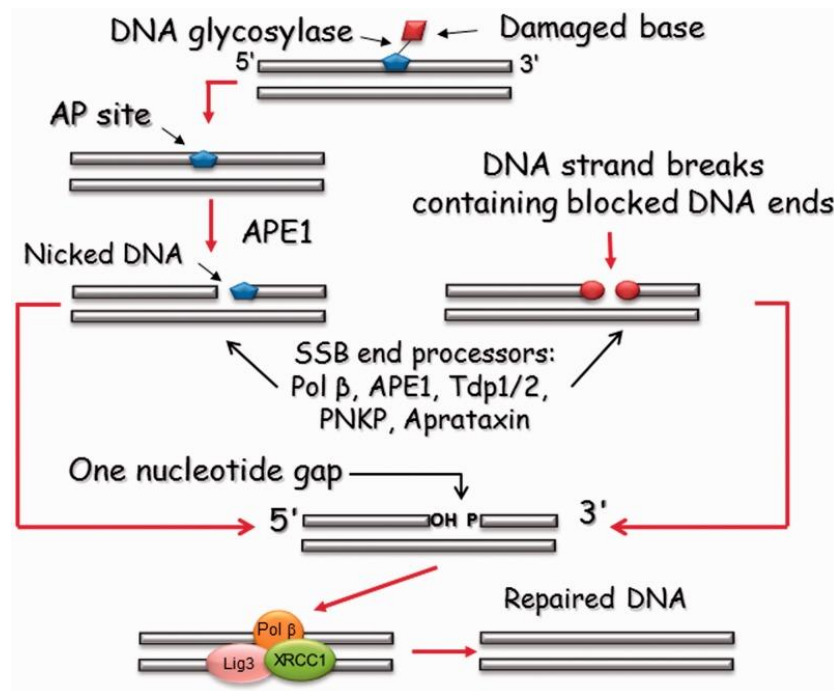


Figura.3: Rappresentazione schematica del processo di riparazione per BER= base excision repair.

A questo punto, la riparazione di base converge con la riparazione del SSB. La presenza del gruppo idrossile all'estremità 3' e del fosfato al 5' permetterà ad una DNA polimerasi di incorporare un nuovo nucleotide e alla DNA ligasi di sigillare il DNA. Nel caso del "classico" BER che prevede l'intervento delle DNA glicosilasi monofunzionali, il legame al SSB è impedito dal fosfato 3' del desossiribosio. Pertanto, la DNA polimerasi β usa la sua attività AP liasi per rimuovere questo gruppo bloccante e contemporaneamente aggiunge un nucleotide al terminale 3' del nick. Per completare questo processo di riparazione del DNA, la ligasi XRCC1 - DNA III α unisce le estremità del DNA. Recentemente è stata confermata l'azione di XRCC1 e PARP-1 nella riparazione dei single strand break (Strom et al., 2010). Il legame di PARP-1 al SSB permette una protezione da danni eccessivi a livello del DNA, sequestrando dei potenziali intermediari tossici fino a quando il danno non viene riparato. Infatti PARP-1 è, attivato dal legame al SSB e la sua auto-modificazione gli permette di distaccarsi dal DNA stesso. Questo permette l'accesso

delle proteine implicate nel BER al SSB e il completamento del processo di riparazione. Se il danno persiste, PARP-1 permane a livello del DNA proteggendo il SSB fino a quando non sono disponibili sufficienti proteine per la riparazione. Questo meccanismo permette di aumentare così la capacità di riparazione delle cellule senza aumentare la formazione di double strand breaks (Bethany et al.,2008).

Il sistema di riparazione “Nucleotide excision repair” (NER) rappresenta il pathway principale per la riparare di danni al DNA indotti da radiazioni UV. Infatti, i raggi UV possono provocare alterazioni di tipo diverso nel DNA, chiamate nell’insieme fotoprodotti.

I due principali tipi di lesioni indotte da UV sono: il dimero ciclobutilico di pirimidina e il foto-prodotto 6-4. Nel caso del dimero ciclobutilico, la luce ultravioletta stimola la formazione di un anello ciclobutilico di quattro atomi tra due pirimidine adiacenti sullo stesso filamento di DNA agendo sui doppi legami 5,6. La struttura del fotoprodotto 6-4 si forma invece tra il carbonio 6 e il carbonio 4 di due pirimidine adiacenti. Tali lesioni influiscono sul normale appaiamento delle basi, ed è per questo che necessitano l’azione di un sistema di riparazione (Friedberg et al., 2006).

Il sistema di riparazione NER è il maggior sistema di difesa contro gli effetti mutagenici indotti dalla luce U.V. e può rimuovere la maggior parte delle foto lesioni indotte. Il NER agisce tramite escissione del danno con un taglio in prossimità del danno sul filamento del DNA. Nelle cellule di mammifero l’escissione del frammento è di circa 24-32 nucleotidi. I substrati del NER sono caratterizzati da una distorsione della doppia elica del DNA e tale distorsione appare come la prima struttura riconosciuta per avviare tale sistema di riparazione. La distorsione iniziale è riconosciuta dal complesso XPC-RAD23B (nel lievito Rad4-Rad23). Il legame di queste proteine a livello della distorsione del DNA permette la formazione di un complesso di pre-incisione.

Durante questo step, l'assemblamento delle proteine causa il srotolamento del DNA attorno alla lesione. Le proteine necessarie per formare un complesso di precisione sono: TFHII, XPA, RPA e XPG. L'attività catalitica è svolta da TFHII, che include due elicasi ATP-dipendenti XPB e XPD (Ssl2 e Rad3 nel lievito). XPG (Rad2 nel lievito) taglia all'estremità 3' del danno e ERCC1-XPF (Rad1-Rad10 nel lievito) taglia all'estremità 5'. Questo permette il rilascio del filamento recante il danno e crea un *gap* di circa 25-30 nucleotidi. La DNA polimerasi si occupa di riempire il gap creatosi, coinvolgendo anche PCNA il fattore di replicazione C (RFC) e RPA. Dopo di che interverrà una DNA ligasi per richiudere il nick rimanente. Nel caso proprio di danno al DNA indotto da U.V. la lesione viene riconosciuta dalla proteina DDB2 (XPE) che prende parte al complesso di ubiquitina ligasi UV-DDB-E3 e localizza la proteina XPC in prossimità del danno (Sugasawa et al., 2005).

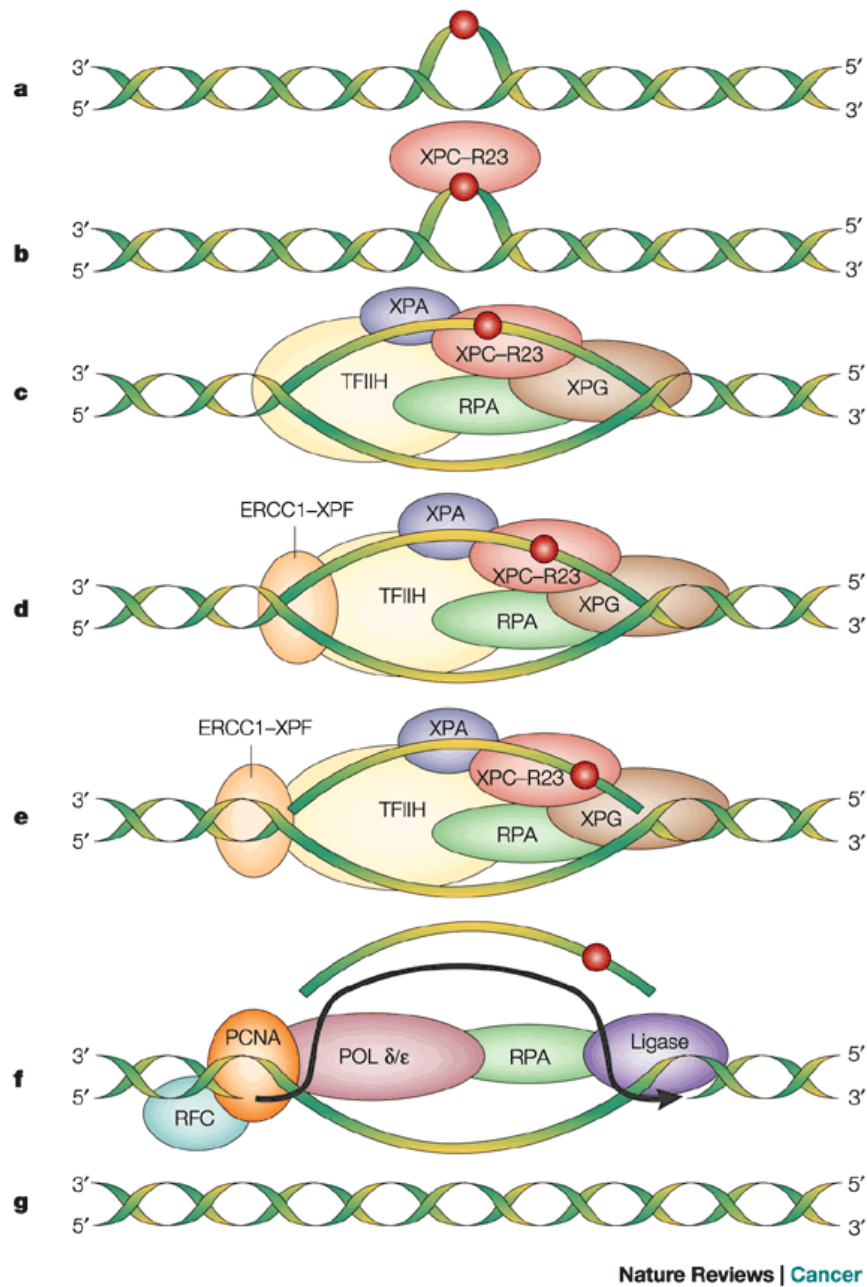


Figura 4: Rappresentazione schematica del processo di riparazione per NER
(Nucleotide excision repair)

E' stato dimostrato che PARP1 può collaborare con DDB per incrementare l'efficienza del NER. Le catene di PARP1 PARilato o del polimero PAR indipendente potrebbero servire da "impalcatura" a DDB per interagire con XPC. Quindi, l'inibizione di PARP potrebbe ridurre la partecipazione di XPC in tale processo di

riparazione. Inoltre, l'attivazione di PARP1 e la successiva PARilazione di DDB potrebbero promuovere un rimodellamento della cromatina; infatti l'utilizzo di inibitori di PARP ha mostrato recentemente un blocco nel rimodellamento della cromatina. A tal proposito è stato dimostrato che il legame di DDB al sito di danno del DNA indotto da UV dipende dal rimodellamento della cromatina; quindi un ritardo di DDB nel legare la lesione in presenza di PARP inibito o deleto conferma la teoria che PARP1 gioca anche un ruolo nel rimodellamento della cromatina mediato da DDB (Robu et al., 2012).

1.2.2 Riparazione per ricombinazione omologa delle rotture a doppio filamento del DNA

Una rottura del DNA a doppio filamento (DSB) è una lesione estremamente tossica per la cellula che può generare riarrangiamenti genetici o addirittura morte cellulare se non viene riparata (Jackson et al., 2009).

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 variabilità genetica; anche in questo caso la rottura è mediata 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 dei DSBs e la scelta, essenziale per mantenere la stabilità genomica, viene fatta in relazione alla fase del ciclo cellulare (Richardson et al., 2000; Pierce et al., 2001).

La ricombinazione omologa è il meccanismo di riparazione dei DSB maggiormente accurato poiché questo processo sfrutta il cromatidio fratello o il cromatidio del cromosoma omologo come template.

Dal momento che, le modalità di riparazione dei DSBs dipendono dalla disponibilità del “template” da utilizzare, questo tipo di riparazione può avvenire con meccanismi leggermente diversi nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Quando una lesione del tipo DSB viene “sentita” e quindi riconosciuta 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 5. 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 molecole 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 5 ; 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).

Nel processo di riparazione per ricombinazione omologa riveste un ruolo importante anche PARP-1; permette infatti in presenza di danno il reclutamento e l'attivazione del complesso MRN per avviare il processo e la formazione del SSB. Questo permette il legame di RAD51 e successivamente il processo di riparazione, seguito dalla riattivazione della replicazione (Bryant et al., 2009). E' stato dimostrato che la mancata espressione di PARP-1 causa un'inibizione di HR; PARP si lega infatti al sito di danno, sintetizza il suo polimero e dopo è rilasciato permettendo alle proteine implicate nel processo di riparazione di legarsi (Sato et al., 1992). Inoltre, la mancanza di PARP-1 causa un aumento della frequenza di ricombinazione spontanea in vivo (Clayton et al., 2010), mentre la sovra-espressione di PARP-1 in linee cellulari di mammifero causa una diminuzione della frequenza di scambi tra cromatidi fratelli indotta da danni al DNA (Meyer et al., 2000).

Inibitori di PARP impediscono il rilascio di PARP a livello del DNA impedendo così al complesso di riparazione di legarsi causando morte cellulare. Inoltre è stato dimostrato che il reclutamento di BRCA1 alla rottura a doppio filamento richiede il legame di BARD1 a PARP. Successivamente il complesso contenente BRCA1 potrà legarsi. Mutazioni a carico di BRCA1 rendono il legame del complesso di riparazione maggiormente dipendente dal legame BARD1-PARP; per cui sensibile alla presenza di inibitori di PARP (Li and Yu, 2013).

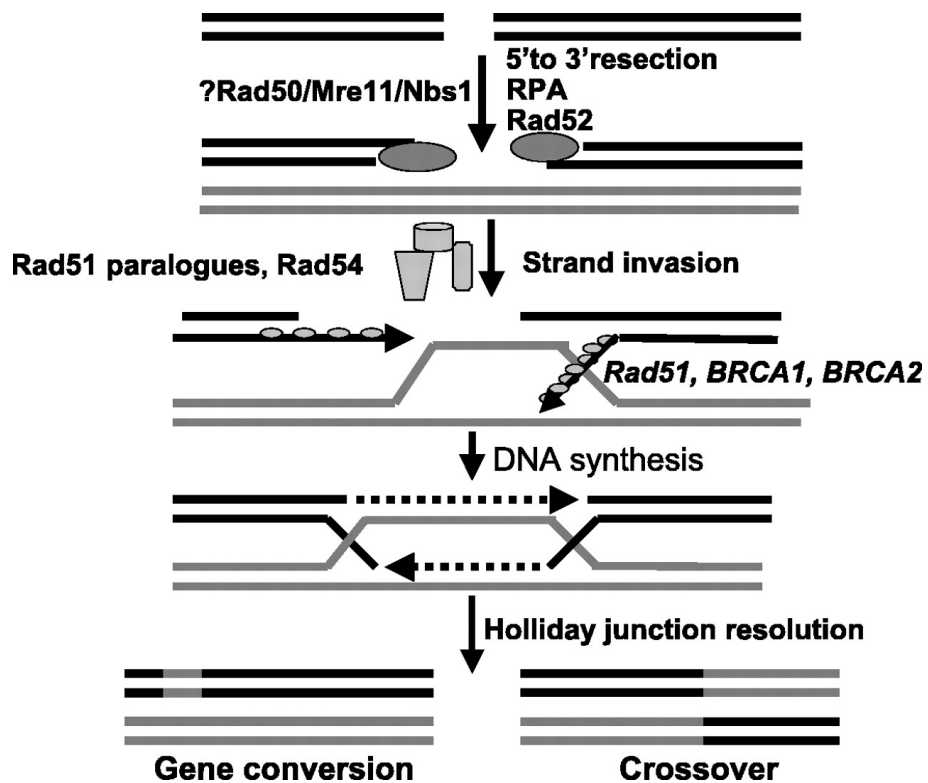


Figura.5: Pathway della ricombinazione omologa, i nomi delle proteine coinvolte e con i due possibili prodotti finali

1.3 Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*

1.3.1 Biologia del lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Lo studio di processi cellulari in eucarioti può risultare particolarmente difficile a causa della loro complessità genetica e molecolare. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* rappresenta uno dei sistemi modello eucariotici più semplici per studi genetici e funzionali di processi fondamentali per la cellula quali, ciclo cellulare, riparazione, trascrizione e replicazione del DNA. È considerato il lievito non patogeno più importante nell'ambito dell'alimentazione umana e il suo utilizzo è noto fin dall'antichità per la panificazione e la produzione di birra e vino. *S.*

cerevisiae è un organismo unicellulare appartenente al regno dei funghi; è molto facile da coltivare in laboratorio in quanto è in grado di crescere

in un semplice mezzo di coltura. Ha una forma ovale/ellittica con diametro di 5-10 μm .

Tuttavia la peculiarità di questo organismo sta nel fatto di possedere un genoma estremamente piccolo, sufficiente però a compiere tutte le funzioni tipiche di una cellula eucariotica. Il suo genoma è composto da 16 cromosomi di 250/2000 kb, 6275 geni, dei quali soltanto 5800 sono ritenuti funzionali, è molto compatto e presenta poche sequenze inter-geniche e introniche. Nel 1996 è stato il primo eucariote il cui DNA è stato interamente sequenziato, e si stima che condivida con l'uomo circa il 23% del suo genoma. Per questo è molto semplice da manipolare geneticamente e da coltivare in laboratorio, inoltre sia la coltivazione e che il mantenimento non richiedono strumentazioni molto costose. La banca dei dati di *S. cerevisiae* è particolarmente ricca e aggiornata per cui molto utile per lo studio e le funzioni della cellula eucariotica in genetica e fisiologia. E' presente in commercio un'ampia collezione di mutanti che copre circa l'85% di tutti i geni del lievito. Per questo, risulta essere un buon modello a livello genico, oltre che metabolico, ed è usato per screening dell'intero genoma per geni che se mutati causano patologie nell'uomo. La piena conoscenza del suo genoma ha permesso di portare a termine studi sul genoma e proteoma. Questo ha reso possibile a un consorzio internazionale, la costruzione di una collezione di 5943 ceppi mutanti per delezione, ognuno dei quali, nel contesto aploide o diploide, ogni specifico gene è stato deletato (Winzeler et al., 1999). Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* esiste sia nella forma aploide " n " che in quella diploide " $2n$ ", caratteristica importante che permette di studiare le mutazioni dominanti e recessive. Il passaggio da una forma all'altra avviene attraverso accoppiamento tra *Mating type* diversi.

E' in grado di riprodursi per via asessuata, ovvero per semplice replicazione cellulare o per via sessuata. Due cellule aploidi possono fondersi per dare origine a una cellula diploide. Questa a sua volta può andare incontro a meiosi, originando nuovamente cellule aploidi. Caratteristica del lievito è potersi dividere

indefinitamente sia in fase aploide che diploide, a differenza di cellule animali e vegetali; inoltre il passaggio da uno stato all'altro può essere indotto cambiando le condizioni di crescita.

All'esterno della membrana presenta una parete spessa dai 100 ai 200 nm, costituita da polisaccaridi per l'80-90%, organizzati in miofibrille, e per il 2-4% da chitina (responsabile del mantenimento dell'integrità osmotica e morfologica e maggiore costituente delle cicatrici di gemmazione) e manno-proteine che, insieme alla chitina si trovano sul versante più esterno della parete.

1.3.2 Il lievito come organismo modello

Il lievito *S.cerevisiae* è utilizzato in numerosissimi studi come sistema per studiare la biologia di base, la fisiologia e la patologia degli eucarioti superiori, in particolare dell'uomo. Inoltre, essendo un organismo eucariotico meno complesso, ha già dimostrato di essere un utilissimo sistema modello per lo studio dei virus.

Possiede infatti diversi vantaggi:

- possiede una struttura molto simile a quella delle cellule di eucarioti superiori;
- in quanto organismo unicellulare è in grado di crescere velocemente su terreni semplici, ciò lo rende facilmente coltivabile in laboratorio;
- è semplice da manipolare geneticamente, grazie al completo sequenziamento del suo genoma nel 1996, inoltre la sua manipolazione è piuttosto economica se paragonata ad altri sistemi cellulari;
- esiste sia allo stato aploide che allo stato diploide, con l'evidente vantaggio di studiare l'effetto di mutazioni sia dominanti che recessive.

Inoltre, mediante la costruzione di ceppi emizigoti, cioè diploidi distrutti in uno solo dei due alleli, trasformati con un allele mutato, è possibile determinare la natura della dominanza, in particolare se la dominanza è dovuta ad

un'aploinsufficienza oppure ad un' acquisizione di funzione negativa. Inoltre sono stati sviluppati semplici tool di ingegneria genetica applicabili sul lievito, fra cui la trasformazione con plasmidi monocopia o multicopia ad alta efficienza, e metodi di distruzione genica. In particolare la delezione genica (gene targeting) è facilitata, in *S. cerevisiae*, dall'alta efficienza della ricombinazione omologa, che favorisce l'inserimento della cassetta di distruzione al corretto locus.

- non è patogeno;
- si ha una conoscenza approfondita di quasi tutti i meccanismi biochimici e biologici che lo regolano.

Negli ultimi decenni *S.cerevisiae* è stato ampiamente usato per applicazioni delle biotecnologie moderne in particolare per la produzione di proteine eterologhe di origine umana (insulina, interferone gamma..) e per la produzione di proteine eterologhe di origine animale, fungina e batterica, tutto ciò grazie anche all'ampia disponibilità di plasmidi di espressione contenenti promotori costitutivi di lievito a disposizione delle comunità scientifica. Questo ci permette di avere un controllo molto fine dell'espressione del prodotto desiderato: possiamo così regolarne il "quando" (tramite l'uso, ad esempio, di promotori inducibili), il "dove" (inducendo accumulo cellulare o la secrezione) e il "quanto" (semplicemente aumentando l'espressione).

E' importante notare che almeno il 31% delle proteine codificate dai geni del lievito hanno omologhi umani, e sorprendentemente, quasi il 50 % dei geni umani coinvolti in malattie ereditarie presenta l'omologo nel lievito (Hartwell,2004).

Screening genetici in lievito hanno permesso di identificare e caratterizzare geni che sono coinvolti in un'ampia varietà di disordini neurodegenerativi causati dal missfolding delle proteine, come ad esempio il morbo di Alzheimer, la Chorea di Huntington e malattie dovute a difetti mitocondriali (Tenreiro and Outeiro, 2010; Porzoor and Macreadie, 2013). L'Alzheimer è una malattia neurodegenerativa progressiva caratterizzata da un acuto declino cognitivo. Tuttavia l'esatto meccanismo di disfunzione delle cellule neuronali che porta alla perdita di memoria in soggetti affetti da Alzheimer è poco conosciuto. Numerosi studi hanno

dimostrato che il lievito è un sistema modello adatto per capire i meccanismi molecolari coinvolti in questa patologia (Bharadwaj et al., 2010). Inoltre il lievito è stato utilizzato per l'identificazione e la caratterizzazione di nuovi farmaci. Un esempio è il suo utilizzo per la produzione di medicinali per uso umano, come l'insulina, vaccini impiegati contro l'epatite B e la rapamicina, un immunosoppressore utilizzato come farmaco anti-rigetto in trapianti di tessuto (Heitman et al., 1991).

E' importante notare che, per la genomica funzionale di lievito, è stato sviluppato un set completo di mutanti, sia aploidi che diploidi, che presentano delezioni per geni non essenziali. Questa serie di mutanti nulli ha consentito per la prima volta un'analisi funzionale completa del genoma del lievito (Giaever et al., 2002). Infatti, nel 1996, il "*Saccharomyces Genome Project*" identificò più di 6.000 Open Reading Frame (ORFs) nel genoma di *Saccharomyces cerevisiae*. Il 18,2% di questi geni sembra avere un ruolo "essenziale" per la crescita. Lo scopo di questo progetto è stato quello di generare un insieme più completo possibile di ceppi di lievito deleti per ognuna di queste ORF con l'obiettivo generale di scoprire le funzioni di questi ORF attraverso l'analisi fenotipica dei mutanti.

Per circa un terzo di queste ORF non è ancora stata identificata la funzione molecolare precisa. Il metodo prevede di eliminare ogni ORF tramite PCR. Ogni gene deleto è stato sostituito con un modulo KanMX, che è etichettato con una o due sequenze di 20pb dette "Barcode". Riassumendo, per generare questi ceppi deleti come si vede dalla figura 6 sotto riportata, è stato utilizzato un frammento di DNA sintetico costituito da :

- **45 bp di omologia alle estremità del frammento stesso**, fondamentali per il processo di ricombinazione omologa che è alla base di questo processo di delezione.
- **20 bp di DNA Barcode** che è diverso per ogni clone, poiché contiene la sequenza specifica del gene che è stato deleto. Ai lati di ognuna di queste due sequenze, ci sono 4 sequenze riconoscibili da 2 coppie di primer diversi (U1, Kan B e Kan C, D1)

- **KanMX4 Module** che conferisce la resistenza alla Geneticina (G418) a quei cloni che hanno integrato il frammento.

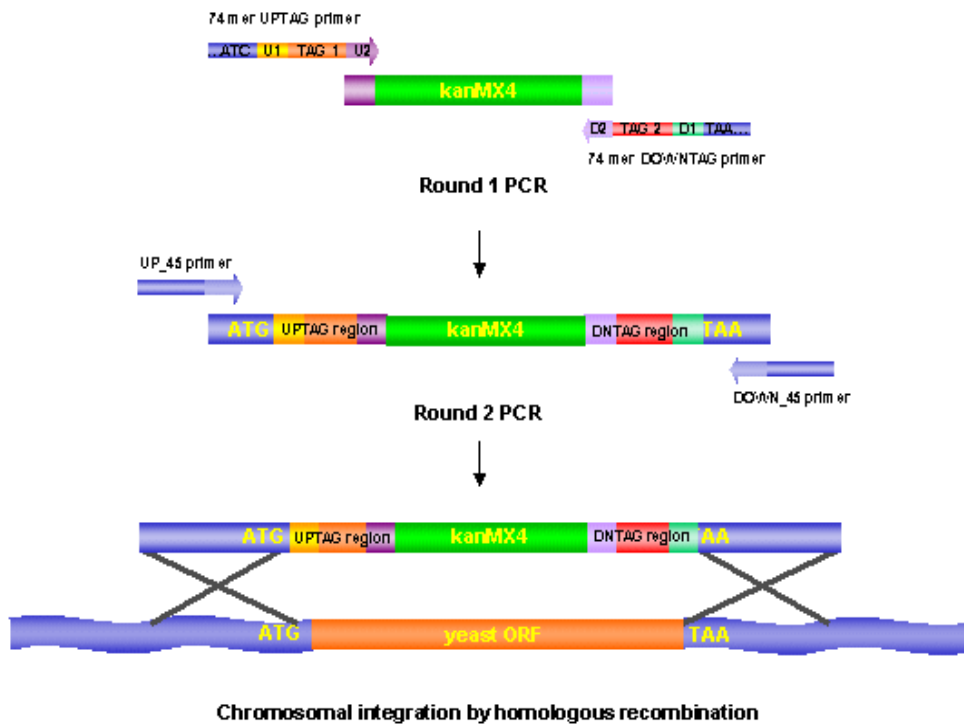


Figura. 6: Costruzione del pool di ceppi di lievito deleti mediante la tecnica della MULTIPLE PCR.

L'utilizzo di tali librerie ha permesso di identificare possibili farmaci o interattori di geni che sono stati trovati mutati nelle cellule tumorali. Infatti, possiamo utilizzare queste librerie per individuare nuovi composti che interferiscono con gli effetti tossici dovuti all'espressione di una proteina nel lievito. Ciò potrebbe portare alla identificazione di nuovi farmaci. Un esempio è l'espressione dei geni umani codificanti per le Poli(ADP-ribosil)polimerasi 1 e 2 (PARP-1 e PARP-2), che causano inibizione della crescita del lievito. Questo fenotipo è stato usato con successo per convalidare l'azione di un inibitore noto di PARP-1 e PARP-2 e di identificare nuovi inibitori di questi enzimi poiché l'esposizione a tali composti ripristina la crescita cellulare (Perkins et al., 2001).

1.4 INIBITORI DI PARP-1

L'utilizzo d'inibitori di PARP-1 si sta dimostrando un buon approccio terapeutico in grado di curare molte patologie umane. Tali inibitori vengono perciò usati come coadiuvanti antitumorali, ma possono essere implicati anche nella cura di malattie associate a stress che manifestano caratteri pro-infiammatori come le malattie cardiovascolari, infarto, diabete e immunitarie (Lord and Ashworth, 2012).

Come detto precedentemente, PARP-1 è una proteina che si lega al SSB tramite un processo che attiva la sua funzione catalitica e facilita la riparazione del DNA tramite il pathway del Base excision Repair (BER). PARP-1 si lega al DNA in prossimità del SSB e recluta la proteina scaffold XRCC1 (Masson et al., 1998). PARP-1 si auto ADP-ribosila, diminuendo la affinità di legame al DNA e permettendo agli altri fattori di legarsi al sito di lesione (Herceg et al., 2001).

Gli inibitori di PARP possono bloccare il meccanismo di BER, determinando la permanenza delle SSB e, di conseguenza, la formazione di rotture a doppio filamento (DBS) determinando il collasso della forca di replicazione. Tuttavia, numerose linee tumorali hanno sviluppato difetti e mutazioni in proteine coinvolte nel controllo e nella riparazione del danno al DNA, come ad esempio p53, ATM, MRE11 e BRCA1-2. Gli studi dimostrano però che queste linee tumorali, se trattate con inibitori di PARP, sono molto più sensibili agli agenti citotossici usati come chemioterapici (Helleday, 2011).

A condizioni normali, PARP-1 non contribuisce direttamente alla riparazione delle rotture a doppio filamento, ma se nella cellula sono presenti difetti in questo pathway, l'inibizione di PARP-1 può portare le cellule a morte. Questo processo prende il nome di letalità sintetica (Helleday, 2011).

Non è ancora del tutto noto come mutazioni a carico di BRCA1/2 e inibitori di PARP-1 si combinino tra loro per dare origine all'effetto della letalità sintetica, ma sono stati proposti molti meccanismi (Helleday, 2011).

Tuttavia sembra chiaro che inibitori di PARP portino ad un collasso della forza di replicazione, causando un accumulo di danni al DNA, particolarmente citotossici in cellule con mutato BRCA1/2.

E' stato, infatti, dimostrato che gli inibitori di PARP-1 non sono tossici per cellule "normali", ma sono letali per cellule presentanti mutazioni a carico dei geni BRCA1-2, che sono deficienti nel processo di riparazione dei DBS tramite ricombinazione omologa (Bryan et al., 2005, Farmer et al., 2005, Helleday et al., 2005).

Inibitori di PARP sono stati usati con successo in pazienti con BRCA mutato nei tumori alla mammella o alle ovaie (Fong et al., 2009, Audhen et al., 2010, Tutte et al., 2010).

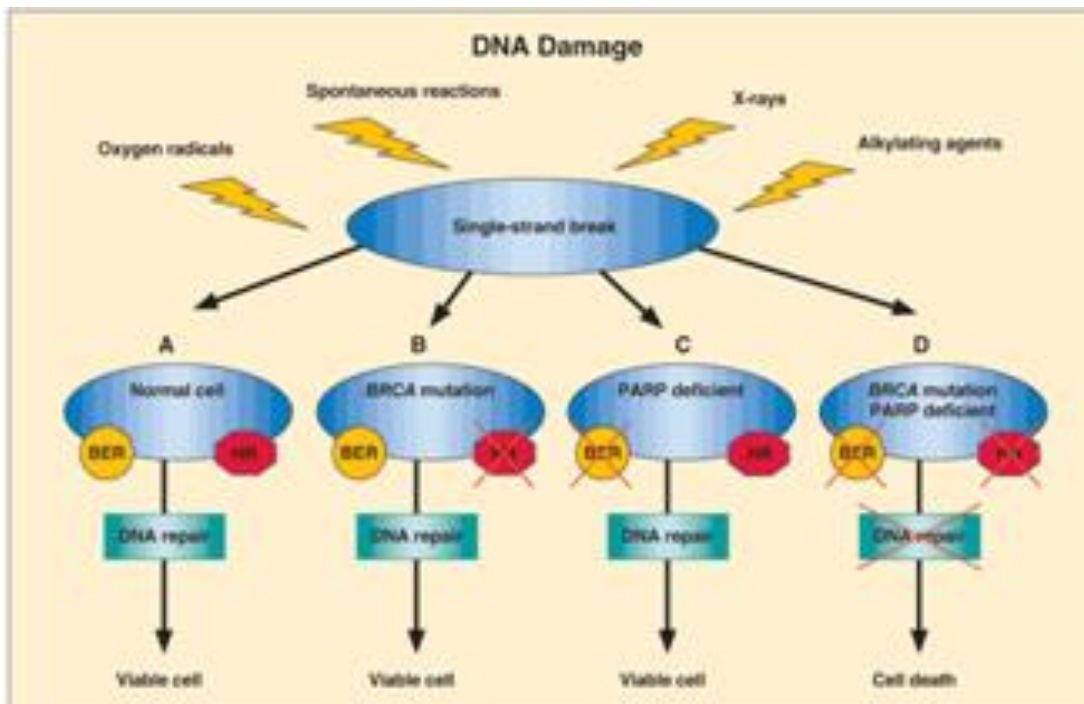


Figura 7: Illustrazione schematica della letalità sintetica- BER= base excision repair, HR= homologous recombination repair

Quindi, in seguito al danno nel DNA si ha la formazione di un SSB. Utilizzando inibitori di PARP-1, persiste la lesione a singolo filamento sul DNA. Se questa persiste fino alla fase S del ciclo cellulare, dove avviene la replicazione, può degenerare in rottura a doppio filamento (DBS). In cellule "normali" in questo caso entra in gioco il meccanismo di riparazione per ricombinazione omologa guidato da BRCA1-2, al contrario in cellule cancerose che presentano mutazioni a carico di tali geni, si verifica un accumulo di danno al DNA. Si crea un accumulo di DBS che inducono apoptosi.

Sembra quindi che l'utilizzo degli inibitori di PARP impedisca la riparazione dei SSB, e che, durante la replicazione, questa lesione causi il collasso della forca di replicazione del DNA, formando substrati per la ricombinazione omologa.

E' stato dimostrato che l'inibizione di PARP diminuisce l'efficienza della riparazione dei SSB, ipotizzando che PARP-1 chimicamente inibita rimanesse legata al DNA impedendo alle altre proteine di riparazione di legarsi al sito di danno (Herceg and Wang, 2001).

Nello stesso studio è stato anche dimostrato che, nonostante PARP-1 fosse inibita tramite RNA-interference, le cellule erano in grado di riparare SSB, tramite una via alternativa, quella della ricombinazione omologa.

In linee cellulari di mammifero è stato dimostrato che la perdita di PARP-1 causa un aumento della frequenza di ricombinazione spontanea (Clayton et al., 2010).

Inoltre, è stato dimostrato che in presenza di danni indotti al DNA la sovra-espressione di PARP-1 in linee cellulari di mammifero causa una diminuzione della frequenza di scambi tra cromatidi fratelli che sono indicatori di instabilità genomica (Meyer et al., 2000).

Tuttavia è noto che le cellule cancerose deficienti per il processo di ricombinazione omologa e con BRCA1/2 mutato o assente sono più sensibili agli inibitori di PARP.

Mutazioni a carico della proteina ATM (ataxia telangectasia), che regola la sensibilità dei danni al DNA e gioca un ruolo importante nella ricombinazione omologa, sono state frequentemente osservate nelle cellule tumorali linfoidi (Wang and Weaver, 2011). ATM mutata determina letalità sintetica in presenza dagli inibitori di PARP-1 (Weston et al., 2010).

La proteina AURORA-1 è frequentemente mutata e sovraespressa nel tumore alla mammella (Staff et al., 2010). In alternativa un sovraespressione di AURORA-1 causa una mancata espressione di BRCA in cellule tumorali pancreatiche causando un errato reclutamento di RAD51, proteina implicata nella ricombinazione omologa, rendendo le cellule più suscettibili agli inibitori di PARP (Sourrisseau et al., 2010).

Cellule cancerose in cui non è espresso PTEN (phosphatase and tensin homolog), difettive per la ricombinazione omologa dovuta ad espressione ridotta e localizzazione nucleare di RAD51 sono sensibili agli inibitori di PARP (Mendes-Pereira et al., 2009).

Al contrario, l'utilizzo di inibitori di PARP comporta dei problemi; è stato riscontrato infatti che molti pazienti che presentano mutazioni a carico di BRCA1-2 non sono sensibili a tali inibitori (Javle and Curtin, 2011).

I motivi di questa forma di resistenza non sono ancora del tutto noti, tuttavia sono state postulate possibili ipotesi:

1. Le cellule acquisiscono resistenza a seguito di una seconda mutazione a livello del gene BRCA2 che favorisce il ripristino della funzione wild type della proteina aumentando l'efficienza di riparazione delle DSB.
2. L'espressione di BRCA1 è regolata negativamente dal micro-RNA miR182, quindi una sovraespressione di quest'ultimo permette la sintesi di cellule

cancerose che non esprimono BRCA1 e sono quindi suscettibili agli inibitori di PARP-1, mentre una down regolazione del miRNA conferisce resistenza a tali inibitori (Moskwa et al., 2008)

3. BRCA1 agisce insieme a 53BP1 (proteina che gioca un ruolo chiave nel processo di riparazione del DNA e nel controllo del checkpoint)(Bunting et al., 2010) nel bilanciare il processo di ricombinazione errore prone (NHEJ) e nella ricombinazione omologa (HR). Infatti, la perdita di BRCA1 causa una diminuzione di HR e un aumento di NHEJ, viceversa la mancata espressione di 53BP1 permette una diminuzione di NHEJ e un aumento di HR. Quindi in cellule con difetti in BRCA1 suscettibili agli inibitori di PARP, che subiscono una perdita addizionale di 53BP1 si ha un parziale ripristino dell' HR ATM dipendente (Aly and Ganesan, 2011), che rende tali cellule resistenti agli inibitori di PARP (Cao et al., 2009; Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010; Brandsma and Gent, 2012; Oplustilova et al., 2012).
4. Fattori che incrementano l'espressione di RAD51, proteina chiave del processo di ricombinazione omologa, possono indurre resistenza agli inibitori di PARP. Sapendo che l'espressione di RAD51 è soppressa da miR69 (Wang et al., 2012) e da AURORA-1 (Sourisseau et al., 2010) e aumentata da PTEN (Dedes et al., 2010) è stato ipotizzato che diminuendo l'espressione di miR96 e di AURORA-1 e aumentando i livelli di PTEN che si ha un incremento dell'espressione di RAD51 e dell'attività HR e si ottiene una resistenza agli inibitori di PARP.
5. Un incremento dell'attività di NHEJ rende le cellule resistenti agli inibitori di PARP in quanto la normale funzione della ricombinazione error-prone e la normale instabilità genomica mediata da NHEJ potrebbero essere la causa della reversione di BRCA1-2 , del ripristino della parziale capacità di HR e quindi sviluppo della resistenza agli inibitori in cellule tumorali (Chiarugi, 2012)
6. L'efficienza degli inibitori di PARP nella terapia antitumorale richiede che il suo target PARP-1 non sia inibito, perché in cellule trattate con inibitori di

PARP, PARP-1 si lega al DNA in prossimità del single strand break, ma non sintetizza il polimero PAR e non prende parte ai processi di riparazione del DNA. Quindi riducendo i livelli di PARP-1 si potrebbe creare una resistenza agli inibitori di PARP stesso (Montoni et al.,2013) .

7. Le cellule subiscono una up-regolazione dei geni ABCB1a e ABCB1b, che codificano per pompe ad efflusso del farmaco, conferendo così alla cellula una resistenza nei confronti dei farmaci in uso.

Infine, fattori che determinano una sovraespressione di PARP-1 potrebbero teoricamente rendere la cellula non più sensibile agli inibitori.

Tutte le classi d'inibitori di PARP hanno lo scheletro di base della Nicotinammide, l'inibitore naturale di PARP-1. Questa, infatti, è strutturalmente simile alla molecola di NAD^+ che, come spiegato nel paragrafo precedente, è utilizzata da PARP1 per effettuare la catalisi dei polimeri PAR.

La nicotinammide si lega quindi alla tasca di legame del NAD^+ presente sul dominio catalitico di PARP-1, e blocca così l'accesso del NAD^+ stesso. Così PARP-1 non è più in grado di espletare la sua funzione catalitica (Peralta-Leal et al., 2009; Jones, 2012).

La scoperta di nuovi inibitori si è basata inizialmente su studi empirici seguiti da un'ottimizzazione della struttura da parte di modificazioni chimiche. Le classi correnti di inibitori di PARP, sono frutto di modificazioni chimiche sull'anello della nicotinammide.

Alcuni studi hanno dimostrato che queste modificazioni danno origine a nuovi composti che presentano un'aumentata specificità e affinità nei confronti della tasca di legame del NAD^+ su PARP-1 (Ruf et al., 1998; Narwal et al., 2012).

1.5 SCOPO DELLA TESI

E' noto dalla letteratura che PARP-1 è coinvolto in numerose malattie umane quali diabete, patologie infiammatorie e tumori. Poiché PARP regola la riparazione del DNA, inibitori di PARP-1 sono usati come coadiuvanti nella terapia antitumorale e antinfiammatorie (Javle and Curtin, 2011_).

In pratica, quando l'attività di PARP-1 è inibita, non si possono più attivare quei pathway che riparano il DNA e, quindi, in presenza di danno la cellula muore per apoptosi.

Il mio lavoro di tesi si inserisce in un progetto che utilizza *Saccharomyces cerevisiae* per cercare di individuare nuovi fattori che possono avere un ruolo nella "perdita" di sensibilità agli inibitori di PARP-1. Un aumentato livello proteico intracellulare o un difetto nella localizzazione nucleare di PARP-1 possono essere importanti per l'efficacia degli inibitori di PARP usati in terapia.

In un precedente lavoro di tesi svolto nel nostro laboratorio, è stato effettuato uno screening genetico utilizzando una libreria di ceppi del lievito *Saccharomyces cerevisiae* deleti (yeast deletion pool), per identificare dei geni che potessero avere un ruolo come "regolatori" dell'attività di PARP-1.

In questo modo sono stati isolati 150 cloni resistenti all'espressione di PARP-1. Dopo l'analisi delle sequenze sono stati identificati 110 geni, che, potenzialmente, potrebbero essere coinvolti nella modulazione o regolazione dell'attività di PARP-1. Nel mio progetto di tesi ho ulteriormente caratterizzato i seguenti cloni di lievito con delezione specifica in ognuno dei seguenti geni che sono stati identificati nello screening genetico:

HHO1: che codifica per l'istone H1. Questo istone svolge una serie di funzioni fondamentali all'interno della cellula come controllo della meiosi e della sporulazione; facilita la compattazione della cromatina; sopprime la riparazione del DNA attraverso la ricombinazione omologa. Studi recenti dimostrano che l'istone H1 viene poli-ADP ribosilato da PARP-1 contribuendo così a rilassare la cromatina in

modo tale da favorire la trascrizione genica (Krishnakumar and Kraus, 2010). Nel lievito, la mancanza di questo gene non è letale come nell'uomo; ciò potrebbe essere dovuto alla differente struttura cromatinica tra uomo e lievito. Infatti, la cromatina del lievito, è più rilassata rispetto a quella umana e non viene compattata durante la fase S del ciclo cellulare come invece succede nelle cellule umane (Patterson et al.,1998).

HUL4: che codifica per una proteina con similarità al complesso E3 dell'ubiquitin-proteina chinasi che costituisce il complesso SUMO. L'omologo umano di questo gene codifica per la stessa proteina implicata nel complesso E3. È noto dalla letteratura che, per svolgere la sua attività di regolatore e modulatore della struttura della cromatina e della trascrizione, PARP-1 necessita della ubiquitinizzazione da parte del complesso SUMO (Krishnakumar and Kraus, 2010). La SUMOilazione di PARP-1 nelle cellule di mammifero è necessaria per fare in modo che la proteina attivi la trascrizione di alcuni geni legandosi ai corrispettivi promotori.

OTU1: che codifica per una proteasi ubiquitina specifica. Questo enzima si lega alla chaperone-ATPasi Cdc48p, e può contribuire alla regolazione della degradazione delle proteine. Appartiene alla Famiglia dei geni Ovarian Tumor (OTU); denominate così in quanto presentano un dominio OTU e una proteina in grado di legarsi Ubal. Le proteine appartenenti a questa famiglia presentano residui conservati di cisteina, istidina e aspartato che vanno a definire una presunta triade catalitica delle proteasi a cisteina (Makarova et al., 2000). Inoltre, si ha un aumento di livello delle proteine OTU in risposta allo stress di replicazione del DNA (<http://www.yeastgenome.org>).

POM152: che codifica per una glicoproteina transmembrana del complesso del poro nucleare (NPC), contribuisce al trasporto nucleocitoplasmatico, alla biogenesi del NPC e alla duplicazione dei poli del fuso mitotico (<http://www.yeastgenome.org>).

SNT1: subunità del complesso deacetilasi Set3C che interagisce direttamente con la subunità Set3C e Sif2p; probabilmente questa proteina è in grado di legare il DNA (<http://www.yeastgenome.org>).

GAL3: che codifica per un regolatore trascrizionale coinvolto nell'attivazione dei geni GAL in risposta al galattosio, forma un complesso con Gal80p per diminuire l'inibizione di Gal4p operata da Gal80p; lega galattosio e ATP ma non ha attività galattochinasica (<http://www.yeastgenome.org>).

Questi ceppi sono tutti resistenti all'effetto dell'espressione di PARP-1 che come sappiamo determina una forte inibizione della crescita nel ceppo wild type BY4743. In questa tesi abbiamo voluto caratterizzare meglio l'espressione e l'attività di PARP-1 in questi ceppi allo scopo di valutare se le funzioni svolte da questi geni potrebbero in qualche modo avere un ruolo nell'attività di PARP e influenzare la sua localizzazione a livello intracellulare.

Questi geni o più precisamente il loro omologo umano, potrebbero influenzare l'attività di PARP-1 e quindi potrebbero, in ultima analisi, avere un ruolo nella chemio-resistenza o nella "insensibilità" agli inibitori di PARP-1 stesso.

Quindi, abbiamo espresso il gene umano PARP-1 in lievito, determinato il livello di espressione proteica, abbiamo valutato la sua attività e possibili variazioni nella localizzazione intracellulare di tale proteina anche in presenza di danni al DNA. Poiché è noto che PARP-1 influenza la riparazione del DNA, in questa tesi abbiamo anche determinato l'effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione spontanea e indotta da UV nel ceppo diploide di lievito RS112.

CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae*

In questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato i seguenti ceppi di lievito (genotipo):

- Il ceppo diploide **RS112**: (*MATa/MAT α* ; *ura3-52/ura3-52*; *leu2-3,112/leu2- Δ 98*; *trp5-27/TRP5*; *ade2-40/ade2-101*; *ilv1-92/ilv1-92*; *arg4-3/ARG4*; *HIS3::pRS6/his3- Δ 200*; *LYS2/lys2-801*) ;
- Il ceppo diploide **BY4743**: (*MATa/MAT α* ; *his3 Δ 1/his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0/leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0/MET15*; *LYS2/lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0/ura3 Δ 0*/ *MAT α* ; *his3 Δ 1/his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0/leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0/MET15*; *LYS2/lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0/ura3 Δ 0*)

2.2 Vettore plasmidico pYES2

I plasmidi sono elementi genetici di DNA, circolari ed extracromosomici, che si replicano in maniera autonoma rispetto al cromosoma della cellula in cui si trovano. Tali vettori vengono utilizzati nelle tecnologie molecolari di clonaggio.

Tale plasmide sarà poi inserito all'interno di una cellula di nostro interesse, normalmente cellule batteriche quali *Escherichia coli*, la quale sarà in grado di produrre centinaia di copie del frammento di DNA clonato.

Nel nostro studio, per poter esprimere PARP-1 in lievito, abbiamo utilizzato un vettore derivante dal pYES2.

Il plasmide **pYES2** è costituito da 5.856 nucleotidi e contiene:

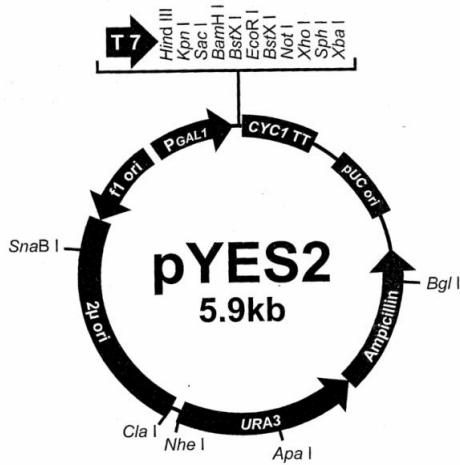


Figura8:Rappresentazione schematica del plasmide pYES 2

- GAL1 promoter: un promotore inducibile dal galattosio specifico per *Saccharomyces cerevisiae*.
- T7 promoter: è il promotore per la RNA polimerasi T7, che viene utilizzato per la trascrizione in vitro.
- Sito multiplo di clonaggio: dove sono presenti i siti di taglio per i seguenti enzimi: *HindIII*, *KpnI*, *SacI*, *BamHI*, *BstXI*, *EcoRI*, *BstXI*, *NotI*, *SphI*, *XbaI*.

- Il terminatore di trascrizione del gene CYC1.
- Origine di replicazione batterica del pUC.
- Gene che conferisce ai batteri la resistenza all'ampicillina.
- Gene URA3 : permette di selezionare le cellule che contengono questo vettore.
- 2μ: origine di replicazione del lievito.
- Origine di replicazione del fago f1.

Nel nostro studio abbiamo trasformato cellule di lievito *S. cerevisiae* con il plasmide pYES2 vuoto, con il plasmide pYES2 contenente il gene umano PARP-1 e con il plasmide pYES2-PARP-1-GFP.

2.3 Terreni di coltura

Per coltivare un microrganismo in laboratorio si cerca di riprodurre un ambiente che sia in grado di soddisfare tutte le sue esigenze metaboliche. Proprio per questo si preparano dei terreni artificiali ideali in base alle esigenze nutrizionali, alla temperatura e al pH necessari per la crescita del microrganismo in analisi. Questi terreni possono essere di due tipi: liquidi, cioè brodi di crescita senza agar, e solidi, contenenti agar. L'agar è un polisaccaride contenente zolfo estratto da un'alga marina, non è un nutriente, ma è utilizzato come agente solidificante nei terreni di coltura per la preparazione di piastre Petri; si trova allo stato liquido a 100°C mentre si solidifica intorno ai 45°C. I terreni usati per la crescita e la selezione dei ceppi di lievito sono stati: il terreno completo YAPD e i terreni sintetici, cioè mezzi di coltura di cui si conosce l'esatta formulazione chimica di ogni ingrediente.

2.3.1 Terreno completo (YAPD)

Il terreno completo YAPD viene utilizzato in piastra per mantenere i ceppi che vengono utilizzati per gli esperimenti, e come mezzo liquido di crescita per le cellule da trasformare.

Preparazione per 1L di volume finale:

- 20 g glucosio
- 10 g yeast extract
- 20 g bacto peptone
- 0,2 g solfato di adenina
- 20 g agar (SOLO per i terreni solidi)
- H₂O distillata per portare a volume finale.

2.3.2 Terreno selettivo

I terreni selettivi sono utilizzati sia per valutare la sopravvivenza o l'efficienza di formazione delle colonie, sia per la selezione di trasformanti e ricombinanti. Possono essere completi, cioè contenere tutti gli amminoacidi e le basi azotate necessarie (SC), o "drop out", cioè mancanti di quel fattore nutrizionale per il quale si vuole selezionare.

Queste miscele sono importanti perché in questo modo cresceranno in questi terreni solamente quei lieviti contenenti il gene codificante per il fattore nutrizionale che manca nel terreno.

Preparazione per 500 ml di volume finale:

- 4 g *Yeast nitrogen base* senza amminoacidi
- 0,4 g miscela di fattori nutrizionali (amminoacidi e basi azotate)
- 10 g glucosio o 25 g galattosio
- 10 g agar (SOLO per i terreni solidi)
- H₂O distillata per portare a volume finale

Nel nostro caso sono stati preparati i seguenti terreni selettivi:

- SC-URA = per selezionare le cellule trasformate con il plasmide pYES2
- SC-HIS e SC-ADE = per calcolare rispettivamente la frequenza di ricombinazione intracromosomica e intercromosomica
- YAPD + G418 = per selezionare i cloni ricombinanti; il G418 viene aggiunto il terreno ad una concentrazione finale di 200µg/ml.

2.3.3 Terreno LB

Il terreno LB sia liquido che solido è necessario per la crescita dei batteri.

Per 500 ml 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

Dopo la preparazione e l'aggiunta di H₂O ogni terreno viene sterilizzato in autoclave a 118°C per 18 minuti a 0,5 atm. Successivamente, quando la temperatura del mezzo raggiunge i 50°C circa, viene aggiunta ampicillina (100 µg/ml) per la selezione solo dei batteri che portano il plasmide pYES2.

Nel caso si stia preparando un terreno solido, si versa il terreno, fatto un po' raffreddare, in piastre Petri (Ø 9 cm) sterili e si lascia solidificare.

2.4 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 3000 rpm per 5 minuti.
- Risospendere il pellet in 250 µl di Cell Resuspension Solution.
- Aggiungere 250 µl di Cell Lysis Solution ad ogni campione ed invertire le eppendorf 4 volte.
- Aggiungere 10 µl di Alkaline Proteasi Solution, invertire 4 volte

- Lasciare 5 minuti a temperatura ambiente
- Aggiunta di 350 µl di Neutralization Solution, invertire 4 volte
- Centrifugare a 13000 rpm per 10 minuti
- Recuperare il sovrantante e trasferirlo in una Spin Column
- Centrifugare a 13000 rpm per 1 minuto
- Eliminare l'eluito e rimettere la colonnina nel Collection Tube
- Aggiunta di 750 µl di Wash Solution (con etanolo) e centrifugare a 13000 rpm per 1min
- Eliminazione dell'eluito e ripetere lo step con 250 µl di Wash Solution
- Centrifugare a 13000 rpm per 2min
- Trasferire la Spin Column in una eppendorf da 1,5 ml e aggiungere 50 µl di acqua distillata
- Centrifugare per 1min a 13000 rpm e recuperare l'eluito 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.

2.5 Trasformazione in *s. cerevisiae* con DNA plasmidico

Per trasformare i plasmidi di interesse nel nostro ceppo di lievito abbiamo seguito il protocollo di Gietz e Schiestl (2007) che prevede l'uso di Polietilen glicole, Acetato di litio e DNA a singolo filamento detto "*carrier*".

Protocollo di trasformazione:

- inoculare una colonia in 5-10 ml di brodo di coltura (YAPD) e incubare a 30°C in agitazione per 17-24 ore
- aggiungere YPAD e incubare a 30°C in agitazione per riportare le cellule in fase esponenziale, per 3-4 ore

- denaturare il "carrier" DNA a 100°C per 5 minuti (DNA di sperma di salmone 2mg/ml), ad alto peso molecolare)

- centrifugare a 3000 rpm a temperatura ambiente (20-25°C) ed eliminare il sovrinatante

- lavare per 2 volte in H₂O distillata

- risospendere in 1 ml di H₂O distillata e trasferire in una nuova eppendorf

- centrifugare 30 secondi ed eliminare il sovrinatante

- risospendere il pellet di cellule in 0,5 ml di H₂O distillata

- preparare un tubo per ogni trasformazione più uno per il controllo negativo (dove si trasforma solamente il lievito senza il DNA plasmidico) : in ogni tubo aggiungere 100 µl di sospensione, centrifugare ed eliminare il sovrinatante.

Preparare la mix di trasformazione:

- PEG 50%, 240 µl per ogni trasformazione
- LiAc 1 M, 36 µl per ogni trasformazione
- Single strand DNA, (2 mg/ml) 50 µl per ogni trasformazione

- aggiungere 326 µl di mix di trasformazione in ciascun tubo

- aggiungere il plasmide con cui si vuole trasformare (2-10 µg) e H₂O distillata per un totale di 34 µl mescolando bene

- incubare a 42°C nel bagnetto per 40/60 minuti

- centrifugare alla massima velocità per 1 minuto ed eliminare il sovrinatante

- risospendere il pellet in 0,5 – 1 ml di H₂O distillata e piastrare un adeguato volume (100µl/50µl)

- incubare le piastre a 30°C per 3-5 giorni, fino a che non si formano le colonie.

Per determinare l'avvenuta trasformazione e per effettuare la selezione delle cellule contenenti i plasmidi desiderati, si piastrano le trasformazioni in appropriati terreni selettivi.

2.6 CEPPO RS112

L'effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione spontanea e indotta da UV viene determinato sul ceppo diploide RS112. Tale ceppo è stato costruito a partire dal ceppo aploide RSY6 e di conseguenza porta lo stesso substrato di ricombinazione intracromosomica di RSY6. Questo substrato presenta due alleli *his3*; uno con la delezione all'estremità 3' e l'altro con la delezione all'estremità 5', che condividono 400 pb di omologia. Questi due alleli sono separati da il marker *LEU2* e dalla sequenza del DNA plasmidico. Una ricombinazione intracromosomica conduce ad una reversione di *HIS3* e perdita di *LEU2*.

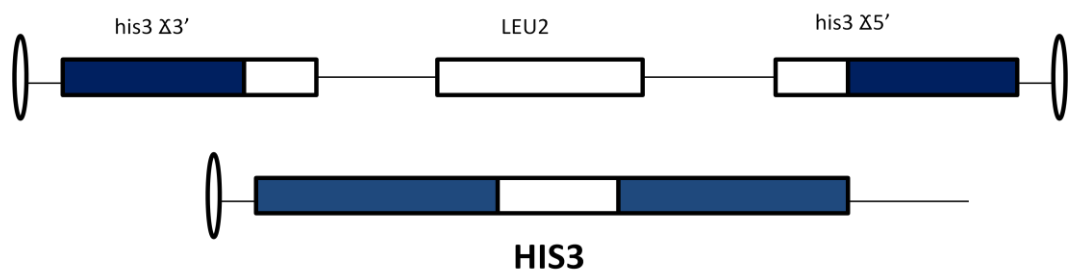


Figura.9: Un evento di ricombinazione tra gli alleli *his3* deleti determina il ripristino del gene *HIS3* wild type e perdita del marcatore *LEU2*.

Il ceppo diploide RS112 contiene inoltre due alleli *ade2-40* e *ade2-101*, situati su due cromosomi omologhi che consentono la misura della ricombinazione intercromosomica.

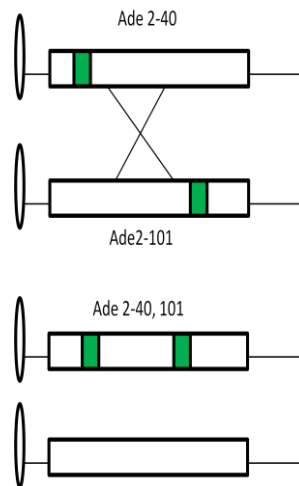


Figura.10: Un evento di ricombinazione tra gli alleli *ade2-40* e *ade2-101* comporta la comparsa del fenotipo wild type *ADE2*

2.7 SAGGIO DI RICOMBINAZIONE

L'effetto di PARP-1 viene determinato nel ceppo RS112 contenenti il plasmide pYES-PARP-1 che come detto in precedenza esprimono PARP-1 in presenza di galattosio. In parallelo, il livello di ricombinazione viene determinato nel ceppo RS112 che contiene il pYES2 dopo crescita in glucosio e galattosio.

Protocollo sperimentale:

Singole colonie del ceppo RS112-pYES2 e RS112-PARP vengono inoculate in 5 ml di terreno SC-URA con glucosio in modo che riescano a crescere solo le cellule contenenti il plasmide. Dopo 17-24 ore di crescita a 30°C in agitazione, le colture vengono lavate in acqua sterile risospese in 1ml di acqua e diluite 1:100. Per indurre l'espressione di PARP-1, le colture vengono incubate per 20 ore in 10 ml di SC-URA con galattosio.

Successivamente le cellule vengono recuperate e risospese in 1 ml di H₂O distillata e piastrate nei diversi terreni a diverse diluizioni.

Diluizioni 10^{-5} in YPAD dove riusciranno a crescere tutte le cellule vitali.

Diluizioni 10^{-2} in SC-HIS dove cresceranno soltanto le cellule che hanno effettuato una ricombinazione intracromosomica.

Diluizioni 10^{-1} in SC-ADE dove cresceranno solo le cellule che hanno effettuato una ricombinazione intercromosomica.

Le piastre vengono incubate a 30°C per 3-5 giorni fino alla comparsa delle colonie.

Considerando il fattore di diluizione, le frequenze di ricombinazione vengono calcolate come riportato in tabella.

FREQUENZA DI RICOMBINAZIONE INTRACROMOSOMICA	$\text{N}^{\circ} \text{colonie HIS3+ } 10^{-2} /$ $\text{N}^{\circ} \text{colonie in terreno YAPD} * 10^{-5}$
FREQUENZA DI RICOMBINAZIONE INTERCROMOSOMICA	$\text{N}^{\circ} \text{colonie ADE2+ } 10^{-1} /$ $\text{N}^{\circ} \text{colonie in terreno YAPD} * 10^{-5}$

2.8 Irradiazione di cellule con raggi UV

2.8.1 Determinazione della frequenza di ricombinazione

L'esposizione ai raggi UV viene effettuata ponendo le cellule sotto la lampada germicida a 365 nm per diversi tempi. La dose espressa in J/m^2 viene determinata con un dosimetro.

Protocollo:

- Inoculare i ceppi di interesse a 30°C per 17 ore in agitazione in 5 ml di SC-URA
- Indurre per 20 ore a 30°C in agitazione, in 10 ml di SC-URA contenente 5% galattosio
- Versare il terreno di coltura contenente le cellule in una piastra Petri vuota
- Irradiare le cellule a dosi diverse di U.V: 100 J/m^2 , 200 J/m^2 , 400 J/m^2
- Risospendere le cellule irradiate in 10 ml di terreno privo di uracile con galattosio per 3 ore a 30°C in agitazione al buio
- Il pellet viene risospeso in 1 ml di acqua distillata e le cellule piastrate nei diversi terreni a diverse diluizioni.
- Le piastre vengono incubate a 30°C per 3-5 giorni fino alla comparsa delle colonie.

2.9 Crescita in terreno induttivo ed estrazione proteica

Il Western Blot è una tecnica volta a dimostrare l'effettiva espressione di proteine.

Nel nostro caso abbiamo utilizzato tale metodo per dimostrare l'espressione di PARP-1 nei nostri ceppi.

La prima parte prevede l'estrazione delle proteine dalle cellule dei ceppi di lievito contenenti il vettore pYES2-PARP-1.

Si parte da un'incubazione di 17-20 ore a 30°C del ceppo considerato in 10 ml di terreno liquido SC-URA con glucosio; la mattina dopo si recuperano le cellule e si inducono per 4 ore sempre a 30°C in 20 ml di terreno SC-URA con galattosio. Dopo una centrifuga a 4000 rpm per 5 minuti, il pellet viene risospeso in 500µl di Lysis Buffer G composto da:

- Sorbitolo 300mM
- Tris HCl pH 7,4 10mM
- NaCl 500mM
- MgCl₂ 5mM
- EDTA 5mM

Per ogni 5ml di soluzione finale si aggiungono:

- 120µl di PMSF 100mM (fluoruro difenilmetansulfonile) necessario per inibire le proteasi
- 1/2 pasticca di Protease inhibitor cocktail della *Roche*®

A questo punto si aggiungono 500µl di lysis buffer ad ogni campione + 1g di glass beads.

Si agita con vortex tutti i campioni per 1 minuto per 4 volte, alternando ad ogni agitazione 1 minuto in ghiaccio.

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

Centrifugo per 15 minuti a 4°C . A questo punto gli estratti possono essere conservati a 20°C.

2.9.1 Quantificazione delle proteine con saggio Bradford

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

Leggendo l'assorbanza a 595 nm e interpolando i valori ad una retta di calibrazione si riesce a determinare 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 Albumina sierica bovina (BSA) 2mg/ml.

Per la determinazione delle proteine totali, nella miscela di reazione, il colorante *Bradford* deve essere diluito 1:5.

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

- Standard0 160µl di H₂O + 40µl di *Bradford* Standard1 159µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 1µl di BSA
- Standard2 158µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 2µl di BSA
- Standard3 156µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 4µl di BSA
- Standard4 152µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 8µl di BSA

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

- Diluizione 1:100 : 158µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 2µl di campione
- Diluizione 1:200 : 159µl di H₂O + 40µl di *Bradford* + 1µl di campione

A questo punto si misura l'assorbanza allo *SpectraCount* ottenendo valori compresi tra 1-3µg/µl.

2.9.2 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 e diviso in due parti:

SEPARATING GEL

- H₂O: 1,9ml
- Acrilammide/bis acrilammide (30%): 1,7ml
- Tris HCl (1 M) pH 8,8: 1,3ml
- SDS 10%: 50µl

- APS (10%): 50 μ l
- TEMED: 2 μ l

Totale 5ml

STACKING GEL

- H₂O: 1,4ml
- Acrilammide(30%): 330 μ l
- Tris HCl pH 6,8 (1,5M): 250 μ l
- SDS (10%): 20 μ l
- APS(10%): 20 μ l
- TEMED :2 μ l

Totale 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.

I campioni ed il marker vengono caricati nei pozzetti. Si imposta la corsa elettroforetica a voltaggio costante di 120 volt.

In genere, la corsa elettroforetica dura 40-60 minuti.

2.9.3 Trasferimento su membrana

Terminata la separazione elettroforetica, il gel e viene posto nel trans blot per il trasferimento sulla membrana di nitrocellulosa. Come mostrato in figura 10, si prepara quindi una specie di "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 si chiude il sandwich e si pone nella vaschetta riempita con il tampone di trasferimento. Il trasferimento viene effettuato a 250 mA per 75 minuti.

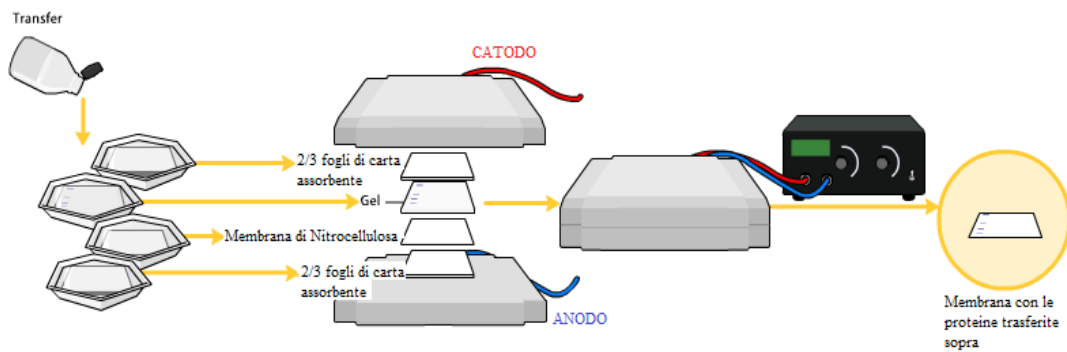


Figura. 11: Schema rappresentativo dei passaggi necessari per effettuare il trasferimento delle proteine su membrana (Sandwich)

Si preleva la membrana e, per vedere se è avvenuto il trasferimento si colora con il ponceau 1X in modo da evidenziare le bande delle proteine sulla membrana di nitrocellulosa. La membrana poi viene decolorata mediante lavaggi in TBST .

2.9.4 Ibridazione con anticorpo

2.9.4.1 SnapID della *Millipore*

Per verificare la presenza di PARP-1 tra le proteine estratte e trasferite sulla membrana si effettua un'ibridazione con un anticorpo primario anti-PARP1 (*Santa-cruz Biotechnology*®) ed un anticorpo secondario anti-mouse IgG-HRP (*Santa-cruz Biotechnology*®) che riconoscerà il primario.

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

Per l'ibridazione si utilizza lo SnapID della *Millipore*.

Dopo il trasferimento, la membrana viene posta dentro il blocchetto con la superficie con le proteine legate rivolta verso l'alto.

A questo punto viene messo un volume variabile di "Blocking Solution" (latte 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.

Si incuba per 15 minuti. Dopo si aspira tutta la soluzione e si procede nell'ordine:

- aggiunta di anticorpo primario e incubazione per 12 minuti
- tre lavaggi con TBST 1X per eliminare l'anticorpo in eccesso
- 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 PARP1 è presente si saranno legati gli anticorpi primari e quindi anche il secondario.

2.9.4.2 Metodo "classico"

In alternativa all'utilizzo dello SNAPid si può mantenere la membrana in Blocking Solution (TBST1X Trizima Base, NaCl, Tween20, HCl per portare a pH7.4 + milk 5%) per 1 ora a temperatura ambiente, in agitazione. Con questa soluzione si "bloccano" i siti aspecifici.

- incubazione con anticorpi primari; l'anticorpo utilizzato per verificare l'attività di PARP-1 è un anticorpo policlonale diluito 1:1000 specifico per i polimeri di poli (ADP) ribosio. Tale anticorpo è stato utilizzato in queste condizioni:

TBST 1X latte 5% incubazione per 17 ore a 4°C in rotazione

- effettuare 7 lavaggi di 5 minuti cadauno in TBST 1x su agitatore
- incubazione con anticorpo secondario:

anti-IgG rabbit 1:2000, latte 5% in soluzione TBST 1x per 1 ora a temperatura ambiente in rotazione

- effettuare 7 lavaggi di 5 minuti cadauno in TBST 1x su agitatore

2.9.5 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.

A questo punto si visualizzeranno delle bande in corrispondenza delle posizioni della membrana dove si trova PARP1.

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
- 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 fino a quando non si vedono comparire le bande e poi nel liquido di fissaggio per fissare la lastra in quella situazione

Eventualmente è possibile rimuovere gli anticorpi 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.

2.10 Microscopia a fluorescenza

Il campione preso in esame contiene una sostanza detta fluoroforo (o fluorocromo), la quale può essere già presente nel campione stesso (possono fare da fluorofori delle proteine oppure dei neurotrasmettitori), oppure venire immessa dall'esterno; nel nostro caso abbiamo costruito dei ceppi in grado di esprimere PARP-GFP.

Il campione contenente le cellule che esprimono PARP-1 GFP viene quindi eccitato con un fascio di luce, generalmente generato da una lampada ad arco allo xeno o ai vapori di mercurio. Volendo eccitare il fluoroforo con una data lunghezza d'onda sono presenti dei filtri di eccitazione che fanno passare un range di

lunghezza d'onde più ristretto di quello emesso dalla lampada. A questo punto, la luce arriva ad uno specchio dicroico. Questi specchi particolari che possono riflettere la luce o farla passare a seconda della lunghezza d'onda. Il campione viene quindi eccitato e, nell'esempio, emette luce verde che passa nuovamente attraverso l'obiettivo ed arriva allo specchio dicroico. Lo specchio questa volta fa passare la luce verde che può quindi arrivare al detector (es. una telecamera oppure semplicemente all'occhio dell'osservatore).

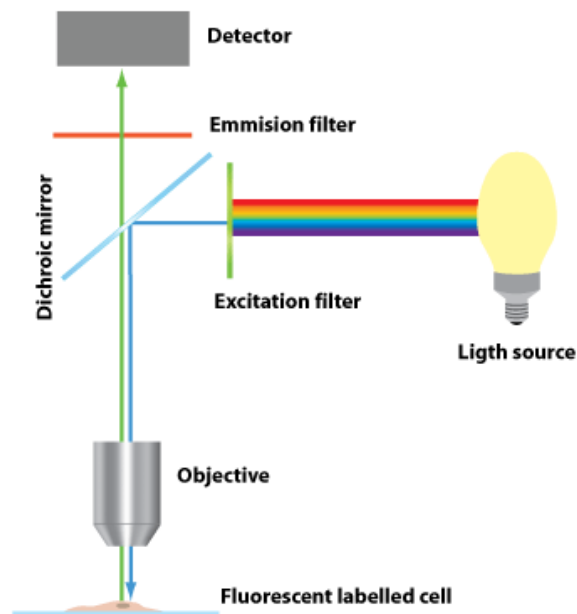


Figura12: Illustrazioni schematica del funzionamento del microscopio a fluorescenza

- Ceppi che esprimono PARP-GFP sono cresciuti per 17 ore a 30°C in 5 ml di terreno SC-URA con glucosio.
- Induzione dei ceppi in terreno SC-URA con galattosio in modo da far esprimere PARP-GFP.
- Prelevo 1 ml dalla coltura e lo trasferisco in un tubo eppendorf.

- Si aggiunge 1µl di soluzione hoechst, colorante specifico per il DNA necessario per visualizzare il nucleo.
- Incubare per 30 minuti a 30°C in agitazione, in modo da permettere l'entrata dell'hoechst all'interno delle cellule.
- Centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente
- Risospendere il pellet in 50µl di acqua distillata
- Disporre 20 µl di sospensione sul vetrino e coprire con il vetrino copri oggetti.
- Osservare al microscopio utilizzando il filtro a 404-527nm

2.11 Localizzazione intracellulare di PARP-1

- Inoculare i ceppi di lievito contenenti il plasmide pYES2PAR-1-GFPper 17-20 ore in 5 ml di terreno SC-URA con glucosio a 30°C in agitazione
- Indurre per 20 ore in 10 ml di terreno SC-URA in galattosio a 30°C in agitazione
- Versare il terreno di coltura contenente le cellule in una piastra Petri vuota
- Irradiare le cellule alla dose di 400 J/m²
- Risospendere le cellule irradiate in 10 ml di terreno SC-URA con galattosio, per 3 ore in agitazione al buio.
- Prelevare 1 ml dalla coltura e lo trasferisco in un tubo eppendorf.
- In ogni tubo eppendorf inserisco 0,5 µl di hoechst, necessario per indicare una possibile localizzazione nucleare di PARP.
- Incubare per 30 minuti a 30°C in agitazione, in modo da permettere l'entrata dell'hoechst all'interno delle cellule.
- Centrifugare per 1 min a 13000 rpm a temperatura ambiente
- Risospendere il pellet in 1 ml di acqua distillata e centrifugare per 1 minuto a 13000 rpm (ripetere 4 volte)
- Risospendere il pellet in 50µl di acqua distillata

- Disporre 20 μ l sul vetrino e coprire con il copri oggetti.
- Osservare al microscopio utilizzando il filtro a 404-527nm

CAPITOLO 3: RISULTATI

In questo studio abbiamo determinato l'espressione, la localizzazione e l'attività di PARP-1 nei ceppi di *S. cerevisiae* identificati in uno "screening" genetico. Poiché, l'espressione di PARP-1 sopprime la crescita in lievito è possibile che il gene deleto in questi ceppi abbia un ruolo nella modulazione e regolazione dell'espressione o attività di PARP-1 e quindi essere coinvolto nella sensibilità agli inibitori di PARP che sono utilizzati come coadiuvanti nella terapia antitumorale. Dato che PARP-1, come detto nell'introduzione, regola o influenza la riparazione del DNA, per prima cosa abbiamo valutato l'effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione omologa spontanea e indotta da differenti dosi di UV nel ceppo RS112 di *Saccharomyces cerevisiae*. La ricombinazione mitotica negli eucarioti, come ampiamente riportato in letteratura, ha lo scopo di riparare DSB che avvengono spontaneamente oppure determinati dall'esposizione ad agenti che danneggiano il DNA (Galli and Schiestl, 1995)

3.1 Effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione omologa

Come già descritto in precedenza, il genotipo del ceppo diploide RS112 presenta due substrati di ricombinazione omologa che permettono di misurare la frequenza di ricombinazione intercromosomica e intracromosomica direttamente su piastra. Come prima cosa abbiamo perciò trasformato il ceppo RS112 con il plasmide pYES-PARP1 e pYES2, selezionato i trasformanti in SC-URA e determinato l'espressione di PARP-1 dopo induzione in galattosio. Campioni corrispondenti a 40 µg di proteine totali sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di acrilammide e analizzati per Western blot. I risultati riportati in figura 13 mostrano che il ceppo RS112 esprime PARP-1. Infatti, si osserva che nella corsia del controllo negativo (corsia 2) non è presente alcuna banda mentre ritroviamo la presenza delle bande a livello della corsie 1 e 3 in cui sono stati caricati i campioni relativi al ceppo RS112

PYES PARP dopo crescita in galattosio per 20 ore. Nella parte più bassa della figura 13 viene riportato il livello della proteina fosfo glicerato chinasi (PGK) che, come detto nei materiali e metodi, viene utilizzato come controllo di caricamento.

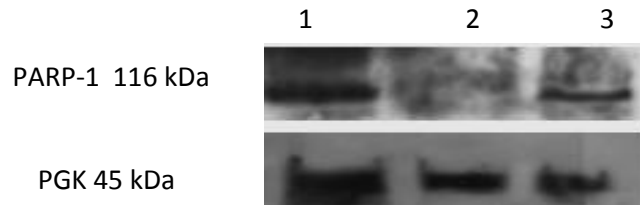


Figura.13 Espressione di PARP-1 nel ceppo wild type RS112 dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati circa 30 µg totali. Corsia (1) ceppo diploide RS112 PYES PARP (2) estratto proteico del ceppo RS112 PYES PARP cresciuto in glucosio (controllo negativo) (3) ceppo diploide RS112 PYES PARP.

In basso, PGK come controllo di caricamento

Per determinare l'effetto di PARP-1 sulla ricombinazione spontanea, le cellule del ceppo RS112-PARP1 provenienti da una coltura in glucosio, sono state incubate per 20 ore in galattosio. In parallelo, si allestiscono colture con il ceppo RS112 sia in glucosio che in galattosio come controlli del nostro esperimento. Dopo gli opportuni lavaggi, le sospensioni cellulari sono state diluite e piastrate in terreno completo YPAD per determinare il numero di cellule vitali, in terreno SC-HIS e SC-ADE per determinare rispettivamente il numero di eventi di ricombinazione intra- e inter-cromosomica. La frequenza di ricombinazione intracromosomica viene espressa come numero di colonie HIS3⁺ su 10⁴ cellule vitali; analogamente, la frequenza di ricombinazione intercromosomica viene espressa come numero di colonie ADE2⁺ su 10⁵ cellule vitali.

I risultati ottenuti, riportati in tabella 1, rappresentano la media di 3-5 esperimenti indipendenti ± l'errore standard.

Come si può osservare in tabella 1, l'espressione di PARP-1 non induce alcun effetto sulla ricombinazione spontanea in lievito. Un leggero aumento di ricombinazione intracromosomica è stato osservato dopo incubazione in galattosio. Questo può essere dovuto ad uno shift metabolico.

	NUMERO DI COLONIE ADE ⁺ / 10 ⁵ CELLULE VITALI	NUMERO COLONIE HIS ⁺ / 10 ⁴ CELLULE VITALI
RS112 pYES2 cresciuto in glucosio	0,31 ± 0,09	0,64 ± 0,19
RS112 PARP cresciuto in glucosio	0,26 ± 0,04	0,50 ± 0,04
RS112 pYES cresciuto in galattosio	0,30 ± 0,04	1,28 ± 0,29
RS112 pYES PARP cresciuto in galattosio	0,34 ± 0,07	1,26 ± 0,33

Tabella.1 Effetto della espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intracromosomica e intercromosomica spontanea nel ceppo diploide RS112. I dati sono la media di 5 esperimenti indipendenti ± errore standard

Ulteriore scopo di questa tesi è quello di determinare se l'espressione di PARP-1 influenzi la ricombinazione indotta da varie dosi di UV. I ceppi RS112-PARP e RS112pYES2 vengono incubati per 20 ore in galattosio dopo crescita in glucosio, come descritto precedentemente. In seguito, dopo gli opportuni lavaggi, le cellule vengono irradiate a differenti dosi di UV (0 J/m², 100 J/m², 200 J/m² e 400 J/m²), post-incubate in galattosio e piastrate come descritto.

Abbiamo anche determinato l'effetto di PARP-1 sulla sopravvivenza calcolata come rapporto e percentuale tra numero di colonie cresciute in terreno completo

dopo trattamento con UV con il numero di colonie cresciute nelle piastre di controllo (dose 0).

SOPRAVVIVENZA				
<i>Dose U.V. J/m²</i>	0	100	200	400
<i>RS112 pYES glucosio</i>	100	55,00 ± 4,35	22,30 ± 6,72	3,27 ± 1,82
<i>RS112 pYES galattosio</i>	100	24,75 ± 6,75	5,13 ± 0,81	2,34 ± 1,01
<i>RS112 pYES Parp glucosio</i>	100	37,5 ± 1,54	10,5 ± 1,34	2,91 ± 0,62
<i>RS112 pYES Parp galattosio</i>	100	46,60 ± 1,97	8 ± 2,43	2,7 ± 0,52

Tabella 2.: Effetto dell' espressione di PARP sulla sopravvivenza in seguito a trattamento con UV nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae*. I dati sono la media di 3-5 esperimenti indipendenti ± errore standard.

SOPRAVVIVENZA

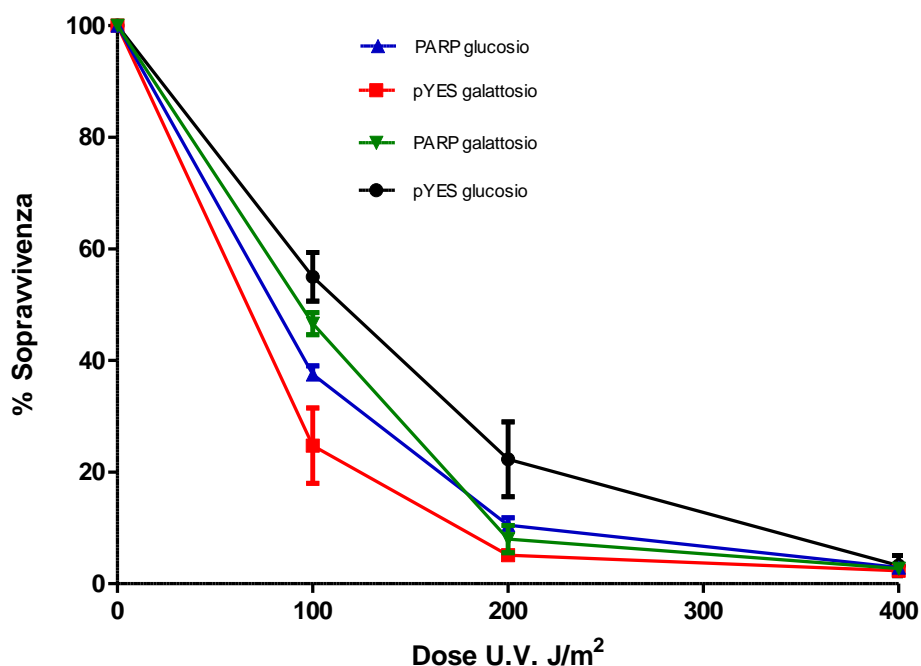


Grafico 1 : Effetto dell' espressione di PARP-1 sulla sopravvivenza in seguito a trattamento con UV nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae*. I dati sono la media di almeno 3-5 esperimenti indipendenti \pm errore standard.

Analizzando i dati riportati in tabella 2 e nel grafico 1, si osserva un decremento della sopravvivenza all'aumentare delle dosi di radiazioni U.V. I dati mostrano che le cellule cresciute in glucosio sono leggermente più resistenti di quelle incubate in galattosio. Inoltre, non si nota alcuna differenza tra la percentuale di sopravvivenza del ceppo in cui è espressa la proteina PARP-1 e quello di controllo.

I risultati riportati in tabella 3 e nel grafico 2 sono relativi all'effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intercromosomica tra gli alleli *ade2* del ceppo RS112. Tra parentesi viene riportato l'incremento di ricombinazione calcolato come detto nella didascalia della tabella. Per confrontare meglio i risultati abbiamo analizzato i dati mediante il "t" di Student confrontando le medie e gli ES dei trattati con i rispettivi controlli non trattati; in accordo con altri studi già condotti nel nostro laboratorio (Galli et al., 2003).

NUMERO COLONIE ADE ⁺ / 10 ⁵ CELLULE VITALI				
Dose U.V. J/m ²	0	100	200	400
RS112 pYES glucosio	0,41 ± 0,21	33,82 ± 4,55** (82)	51,23 ± 3,40*** (125)	72,94 ± 17,41* (177)
RS112 pYES galattosio	0,50 ± 0,13	20,04 ± 5,82* (40)	32,43 ± 3,73** (75)	37,59 ± 12,79*** (75)
RS112 pYES Parp glucosio	0,54 ± 0,08	16,25 ± 0,91*** (30)	22,36 ± 6,84 (41)	32,88 ± 5,29* (61)
RS112 pYES Parp galattosio	0,67 ± 0,42	12,82 ± 4,80 (19)	13,94 ± 4,03* (21)	13,30 ± 2,28** (20)

Tabella 3. Effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intercromosomica nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae* dopo trattamento con UV. I dati sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti ± errore standard. Tra parentesi viene riportato l'incremento di ricombinazione calcolato dividendo la frequenza di ricombinazione indotta con quella spontanea. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

RICOMBINAZIONE INTERCROMOSOMICA

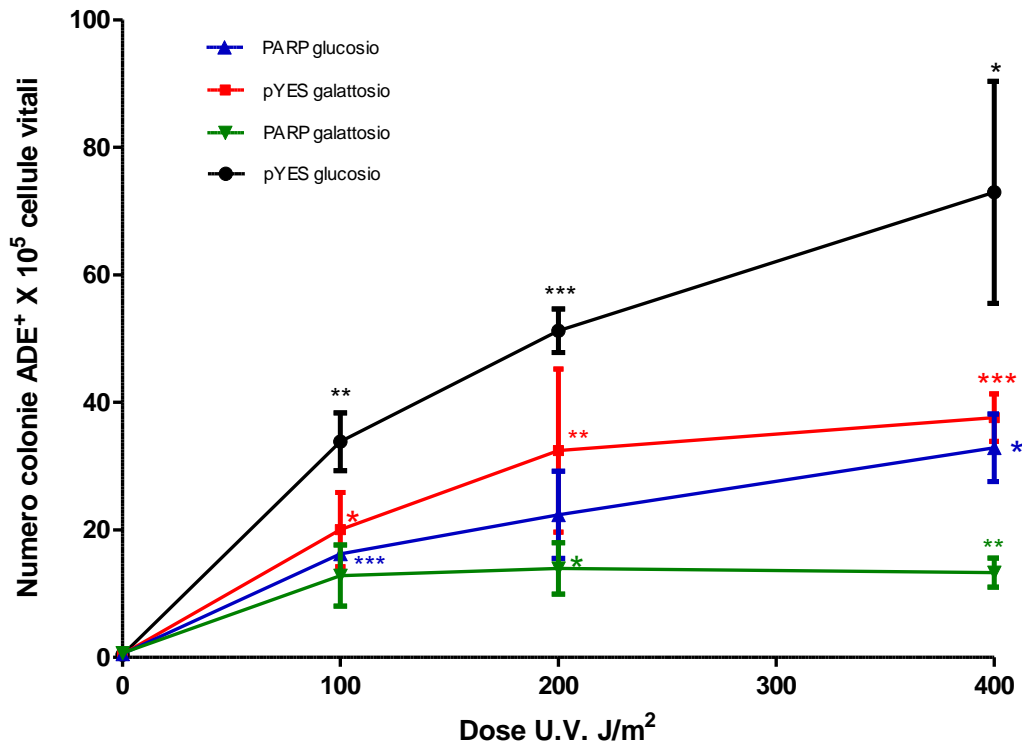


Grafico 2: Effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intercromosomica nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae* dopo trattamento con UV. I dati sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti \pm errore standard.

Analizzando i dati riportati in tabella 3 possiamo osservare che alla dose di 100 J/m², in tutti i ceppi che non esprimono PARP-1 si ha un aumento di ricombinazione di 40-82 volte rispetto al non trattato. Tale aumento è statisticamente significativo ($p \leq 0,01$). Nel ceppo che esprime PARP-1 invece la ricombinazione intercromosomica aumenta di 19 volte. Tale tendenza è confermata anche alla dose di 200 J/m². Alla dose più alta (400 J/m²) l'espressione di PARP-1 induce un aumento di 20 volte ($p < 0,01$). Tale aumento è decisamente più basso di quello osservato in glucosio (177 volte $p < 0,05$) e nel ceppo RS112 pYES2 galattosio (75 volte $p < 0,001$).

I risultati riportati in tabella 4 sono relativi all'effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intracromosomica tra gli alleli *his3* del ceppo RS112. Tra parentesi, viene riportato l'incremento di ricombinazione calcolato come detto nella didascalia della tabella.

NUMERO COLONIE HIS⁺ / 10⁴ CELLULE VITALI				
<i>Dose U.V. J/m²</i>	<i>0</i>	<i>100</i>	<i>200</i>	<i>400</i>
<i>RS112 pYES glucosio</i>	0,81 ± 0,06	2,31 ± 0,21** (3)	6,54 ± 2,85 (5)	10,50 ± 3,33* (13)
<i>RS112 pYES galattosio</i>	2,31 ± 0,81	3,34 ± 1,47 (1)	5,22 ± 0,61* (2)	9,52 ± 1,91* (4)
<i>RS112 pYES Parp glucosio</i>	0,74 ± 0,57	3,48 ± 1,85 (5)	5,06 ± 1,93 (7)	10,95 ± 0,80*** (15)
<i>RS112 pYES Parp galattosio</i>	1,45 ± 0,03	2,86 ± 0,55 (2)	1,60 ± 0,27 (1)	1,41 ± 0,62 (1)

Tabella .4: Effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intercromosomica nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae* dopo trattamento con UV. I dati sono la media di almeno 3 esperimenti indipendenti ± errore standard. Tra parentesi viene riportato l'incremento di ricombinazione calcolato dividendo la frequenza di ricombinazione indotta con quella spontanea. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001

RICOMBINAZIONE INTRACROMOSOMICA

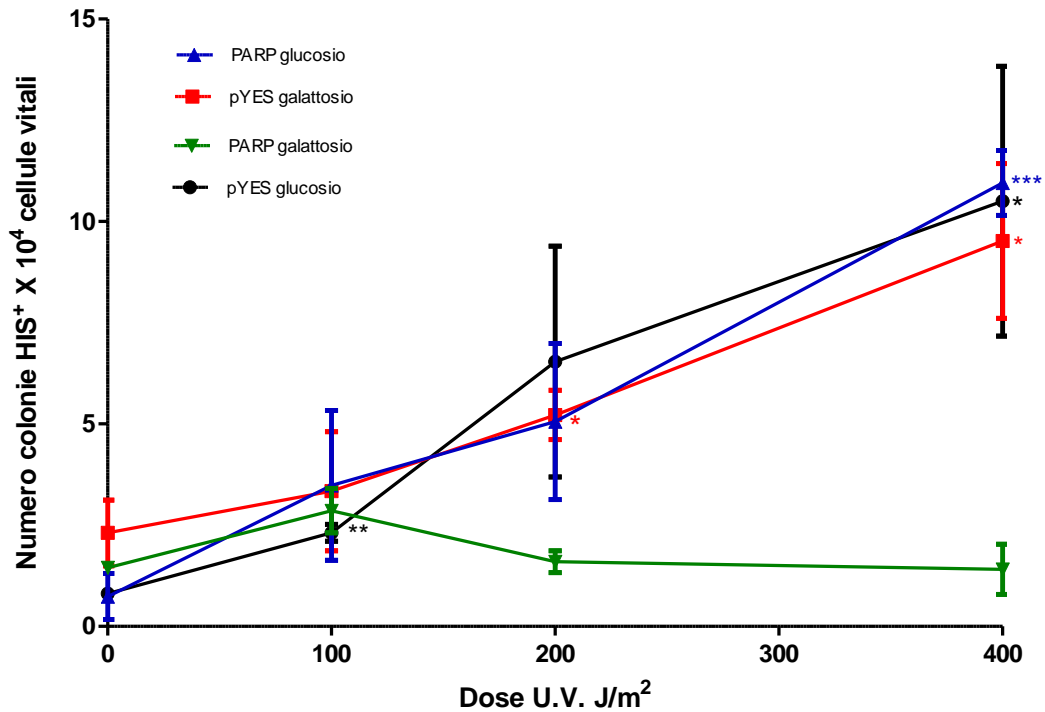


Grafico 3: Effetto dell'espressione di PARP-1 sulla ricombinazione intercromosomica nel ceppo RS112 di *S. cerevisiae* dopo trattamento con UV. I dati sono la media di 3-5 esperimenti indipendenti \pm errore standard.

Analogamente a quanto osservato precedentemente, nei ceppi cresciuti in glucosio dove PARP-1 non viene espressa la frequenza di ricombinazione intracromosomica aumenta fino a 15 volte (400 J/m², RS112 PARP glucosio). Tali aumenti risultano altamente significativi. Inoltre, nel ceppo esprime la proteina PARP-1 si osserva un debole aumento di ricombinazione intracromosomica di 2 volte solo alla dose più bassa. La ricombinazione intracromosomica indotta da 200 e 400 J/m² non viene influenzata dall'espressione di PARP-1. Infatti tali aumenti non sono statisticamente significativi. In conclusione, l'espressione di PARP-1 diminuisce in maniera statisticamente significativa la ricombinazione omologa indotta da UV in lievito.

Ci siamo chiesti se, nelle condizioni in cui abbiamo determinato l'effetto di PARP-1 sulla ricombinazione, il ceppo RS112 esprimesse PARP-1. A tale scopo, abbiamo eseguito un'analisi tramite Western Blot.

Osservando la figura 14 si evidenzia la presenza di una banda nelle corsie 1 e 2 riferita agli estratti proteici dei ceppi RS112 PYES PARP-1 cresciuti in galattosio. Non si osserva nessuna banda nel ceppo di controllo (corsia 3). Come controllo di caricamento, viene mostrato il livello di PGK che è paragonabile in tutti e tre gli estratti proteici.

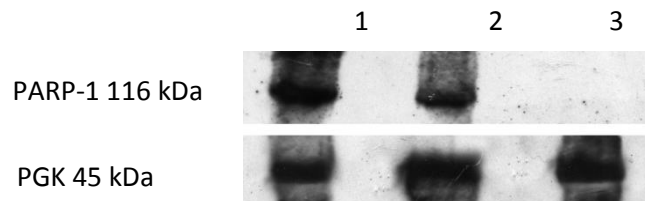


Figura 14. Espressione di PARP-1 nel ceppo wild type RS112 dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati circa 30 μ g totali. Corsia (1) RS112 PYES PARP (2) RS112 PYES PARP (3) estratto proteico del ceppo RS112 trasformato con il plasmide vuoto PYES (controllo negativo).

In basso PGK come controllo di caricamento

3.2 Espressione di PARP-1 nel ceppo diploide BY4743 e nei ceppi deleti per HH01, GAL3, POM152, OTU1, SNT1, HUL4.

Per poter determinare se la delezione presente nei ceppi “resistenti” a PARP-1 avesse un effetto sul livello dell’espressione della proteina stessa, viene effettuata un’analisi tramite Western Blot in ogni ceppo e per confronto anche nel ceppo BY4743 wild type.

Dopo pre-crescita in glucosio e induzione in galattosio le proteine totali, vengono estratte, separate per SDS-PAGE ed analizzate per Western blot con un anticorpo specifico anti-PARP-1.

In parallelo, si ibridizza con l’anticorpo anti-PGK (fosfoglicerato chinasi) per avere un controllo sul caricamento delle proteine.

I dati ottenuti, riportati nelle figure 15 e 16, mostrano che l’intensità della banda di PARP-1 nel wild type e in tutti i ceppi tranne che nel gal3 deleto è paragonabile. Infatti si evidenzia la presenza di una banda di 116 kDa che corrisponde alla dimensione della proteina PARP-1, mentre non si nota la presenza di alcuna banda a livello del controllo negativo e in corrispondenza del ceppo gal3 deleto(figura 16 corsia 2).

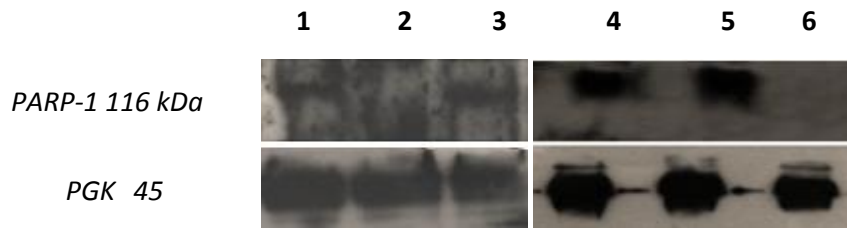


Figura15: Espressione di PARP-1 nel ceppo wildi type ed in alcuni ceppi deleti dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati circa 30 μ g totali. Corsia (1) ceppo deleto per HH01,(2) estratto proteico del ceppo contenente pYES2 vuoto dopo crescita in galattosio (controllo negativo), (3) ceppo diploide BY4743 PYES PARP (controllo positivo). (4)ceppo deleto per POM152 (5) RS112 PYES PARP (controllo positivo) (6) estratto proteico del ceppo BY4743 PYES PARP cresciuto in glucosio (controllo negativo).

In basso PGK come controllo di caricamento.

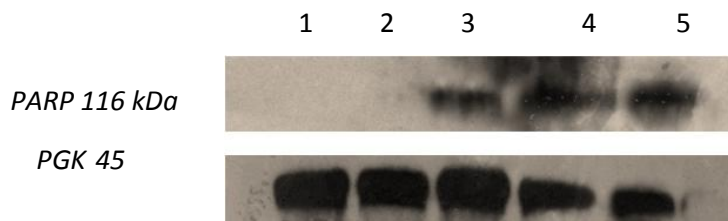


Figura 16: Espressione di PARP-1 nel ceppo wildi type ed in alcuni ceppi deleti dopo crescita in galattosio. Nelle corsie sono stati caricati circa 30 μ g totali. Corsia (1) estratto proteico del ceppo BY4743 PYES PARP cresciuto in glucosio (controllo negativo),(2)ceppo deleto per GAL3, (3) ceppo deleto per HH01, (4) ceppo diploide BY4743 PYES PARP (controllo positivo) (6) ceppo deleto per OTU1. In basso PGK come controllo di caricamento.

In basso PGK come controllo di caricamento

Per verificare l'attività di PARP-1, abbiamo determinato la presenza del poli(ADP)ribosio, polimero prodotto da PARP1, tramite l'utilizzo di un anticorpo anti-PAR (Trevigen).

Come, riportato in letteratura, PAR è evidenziato da uno "smear" corrispondente alle proteine che sono PARilate e che corrispondono ad un peso molecolare compreso tra 100 a 240 kDa.

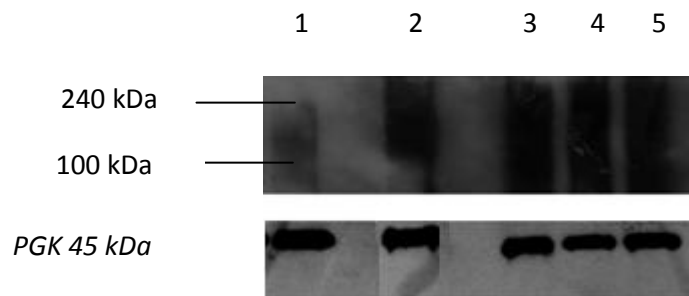


Figura 17: Espressione dell'attività di PARP-1 tramite utilizzo di anticorpo anti-PAR. Corsia (1) ceppo delecto per GAL3 (4)ceppo diploide BY4743 PYES PARP indotto in galattosio (controllo positivo) (5) ceppo delecto per OTU1 (6) ceppo delecto per HH01 (7) ceppo delecto per HUL4.

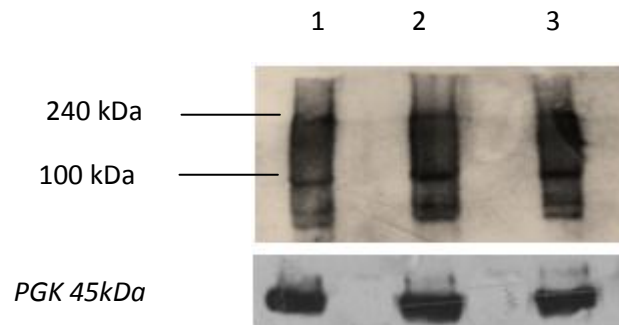


Figura.18 Espressione dell'attività di PARP tramite utilizzo di anticorpo anti-PAR.Corsia (1) ceppo wild type BY4743 trasformato con il plasmide vuoto pYES (controllo negativo) (2) ceppo delecto per POM152 (3) cepp delecto per SNT1.

Osservando la figura 17 e 18 notiamo però che la quantità di proteine modificate è pressochè paragonabile in tutti i ceppi anche in quelli non esprimenti PARP-1. Quindi, l'attività di PARilazione è presente non solo nei ceppi deleti presi in esame ma anche a livello dei controlli negativi. In figura17 infatti riscontriamo lo "smear" caratteristico anche nella corsia 1 che corrisponde agli estratti dei ceppi che non esprimono PARP1.

3.3 Localizzazione cellulare di PARP

Abbiamo infine determinato se la delezione dei geni identificati dallo screening potesse influenzare la localizzazione intracellulare di PARP-1 nel ceppo wild type BY4743 PARP-1 e nei ceppi deleti per geni non essenziali: *GAL3*, *OTU1*, *HHO1*, *HUL4*, *SNT1*, *POM155*.

Prima di trasformare i nostri ceppi con il plasmide pYES2 PARP-1-GFP abbiamo fatto crescere le cellule per 24 ore in terreno completo, piastrate sempre in terreno completo e replicate in SC-URA.

E' noto infatti che molte cellule hanno la probabilità del 15-20% di perdere il plasmide se cresciute in terreno completo.

Sarà possibile identificare quei cloni che hanno perso il plasmide e che quindi non sono capaci di crescere in terreno SC-URA.

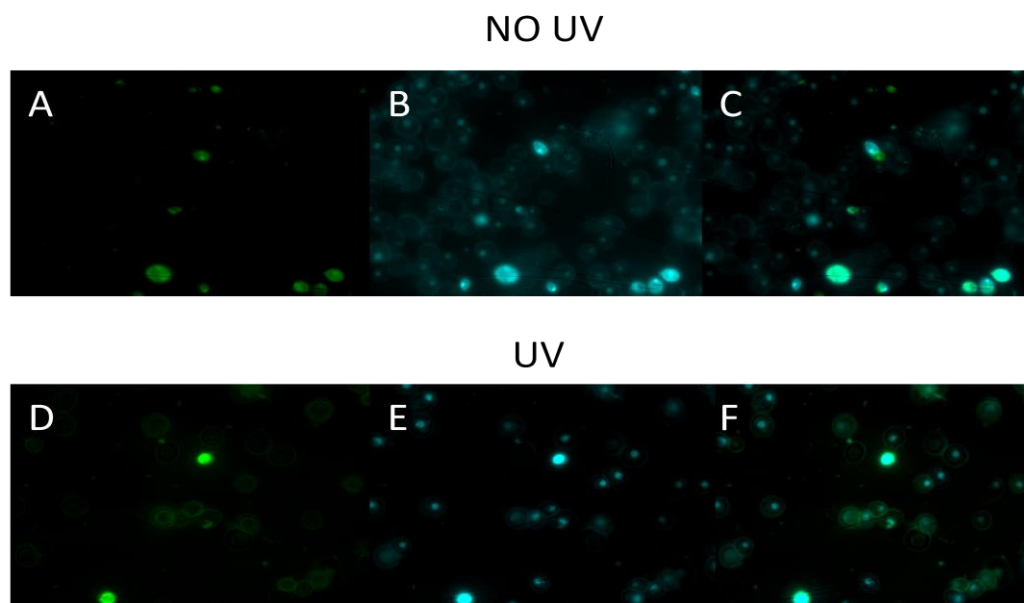
Per essere sicuri della perdita del plasmide, i cloni vengono di nuovo strisciati in terreno SC-URA. Questi nuovi ceppi portanti la delezione specifica vengono trasformati con pYES2-PARP-1-GFP e selezionati in SC-URA come descritto in precedenza.

I ceppi contenenti pYES2PARP-1-GFP vengono dapprima cresciuti in 5 ml di terreno con glucosio e poi per 20 ore in 10 ml di terreno con galattosio.

Successivamente, abbiamo prelevato 1 ml dalla coltura e aggiunto il colorante di hoechst per visualizzare il nucleo della cellula.

In parallelo, abbiamo determinato la localizzazione di PARP in presenza di danni indotti da 400 J/m^2 di radiazione UV. Quindi, dopo aver centrifugato e lavato le cellule, abbiamo risospeso il pellet in H_2O distillata e abbiamo posto 20 μl su vetrino e coperto con vetrino coprioggetti. A questo punto è possibile osservare i nostri ceppi al microscopio a fluorescenza utilizzando due filtri; uno per la GFP che emette ad una lunghezza d'onda di circa 509 nm e uno per l'hoechst che emette a 461 nm. Abbiamo eseguito la conta su 3 campi diversi del vetrino e ripetuto l'esperimento tre volte. Inoltre, per valutare la localizzazione nucleare di PARP1 è stata fatta la sovrapposizione (merge) tra l'immagine nel verde (GFP) e quella del hoechst.

Per effettuare un confronto tra ceppo irradiato e non, abbiamo contato su un totale di 300 cellule, quelle GFP positive, e tra quest'ultime quelle aventi la proteina PARP-1 localizzata nel nucleo. I dati ottenuti sono riportati nelle tabelle sotto alle immagini, e sono il risultato della media di 3 esperimenti \pm l'errore standard. In tabella viene riportato il numero totale delle cellule osservate (900).

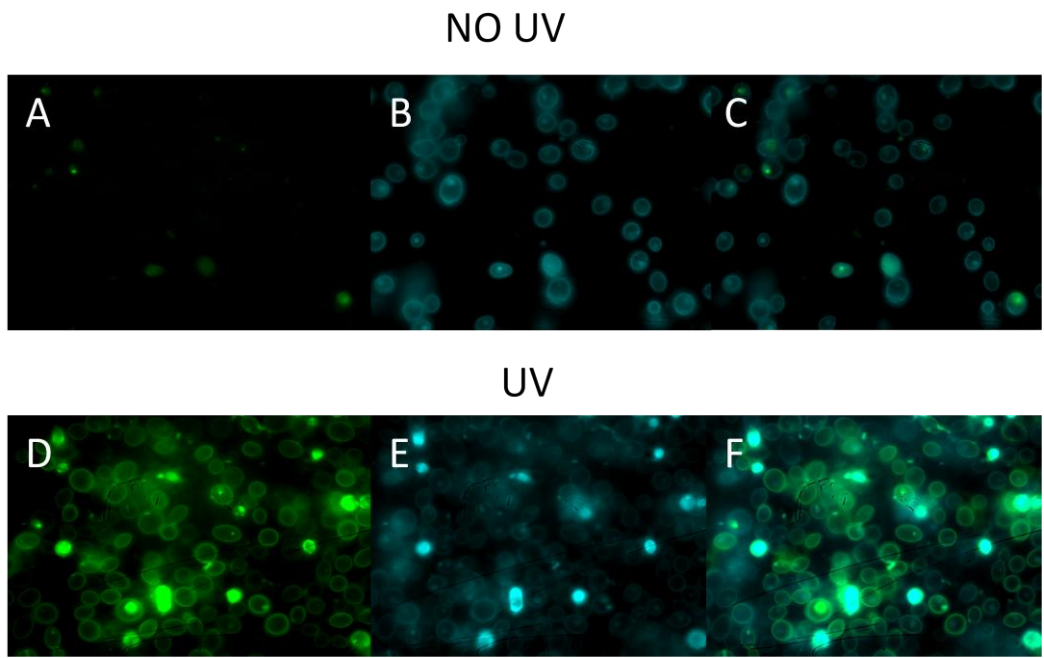


NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	51,5 ± 2,9	1,8 ± 1,1

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	30,1 ± 2,8	1,7 ± 0,9

Figura19: Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo diploide BY4743 trasformato con pyes PARP GFP. (A) BY4743 PYES-PARP GFP non irradiato (B) BY4743 PYES-PARP HOECHST non irradiato (C) BY4743 PYES-PARP MERGE non irradiato. (D) BY4743 PYES-PARP GFP irradiato (E) BY4743 PYES-PARP HOECHST irradiato (F) BY4743 PYES-PARP MERGE irradiato.

Nel ceppo wild type BY4743, si osserva che circa la metà di cellule (51%) sono GFP positive e solo in una cellula su 100 PARP-1 si localizza nel nucleo. In seguito al trattamento con UV, non cambia il numero di cellule con localizzazione nucleare e il 30% delle cellule sono GFP positive (figura 19).

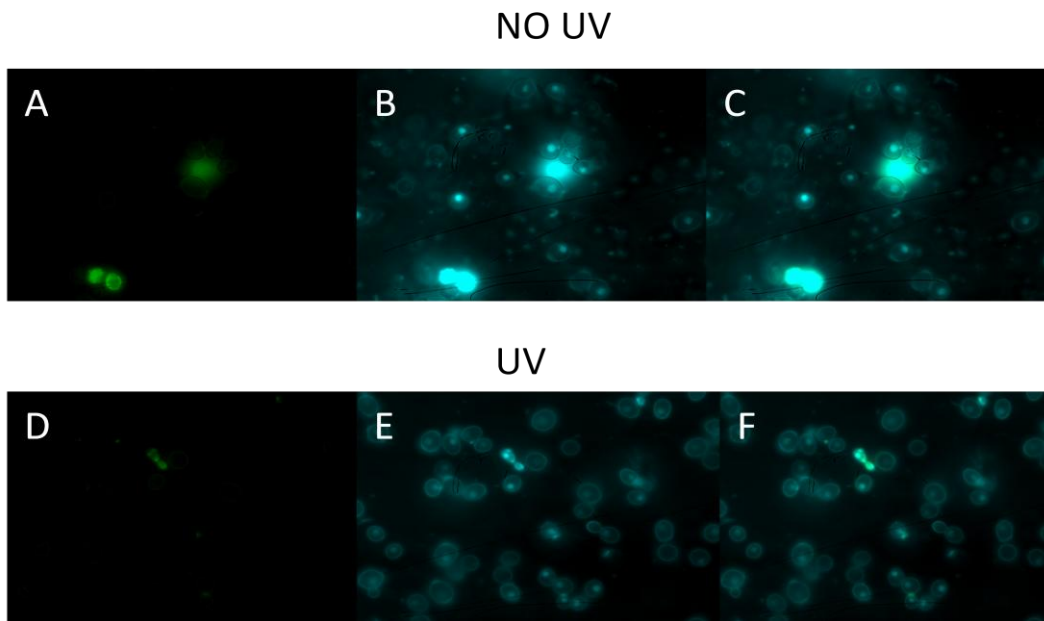


NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	45,6 ± 2,3	4,3 ± 1,1

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	48,1 ± 2,5	4,8 ± 1,5

Figura 20 Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 deleto per HUL4. (A) HUL4 Δ GFP non irradiato (B) HUL4 Δ HOECHST non irradiato (C) HUL4 Δ MERGE non irradiato. (D) HUL4 Δ GFP irradiato (E) HUL4 Δ HOECHST irradiato (F) HUL4Δ MERGE irradiato.

Nel ceppo BY4743 *hul4⁻*, non si nota una forte differenza in termini di espressione e localizzazione di PARP-1 tra il ceppo irradiato e non. Infatti, il numero di cellule GFP positive varia tra 45-48%, mentre il numero delle cellule che presentano una localizzazione nucleare è 4-5%.

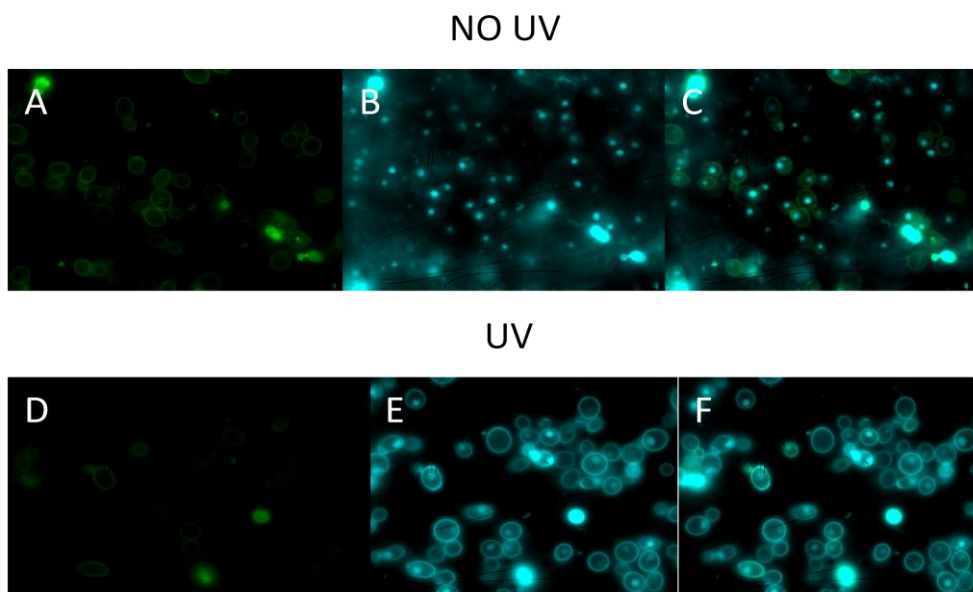


NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	26,5 ± 2,6	0

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	16,5 ± 2,5	0

Figura 21: Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 delecto per *GAL3*. (A) *GAL3* Δ GFP non irradiato (B) *GAL3* Δ HOECHST non irradiato (C) *GAL3* Δ MERGE non irradiato. (D) *GAL3* Δ GFP irradiato (E) *GAL3* Δ HOECHST irradiato (F) *GAL3* Δ MERGE irradiato.

Nel ceppo delecto per il gene *GAL3* le cellule GFP positive sono il 26% che scende al 16% in seguito a trattamento con UV. In questo ceppo, PARP- 1 non ha localizzazione nucleare.



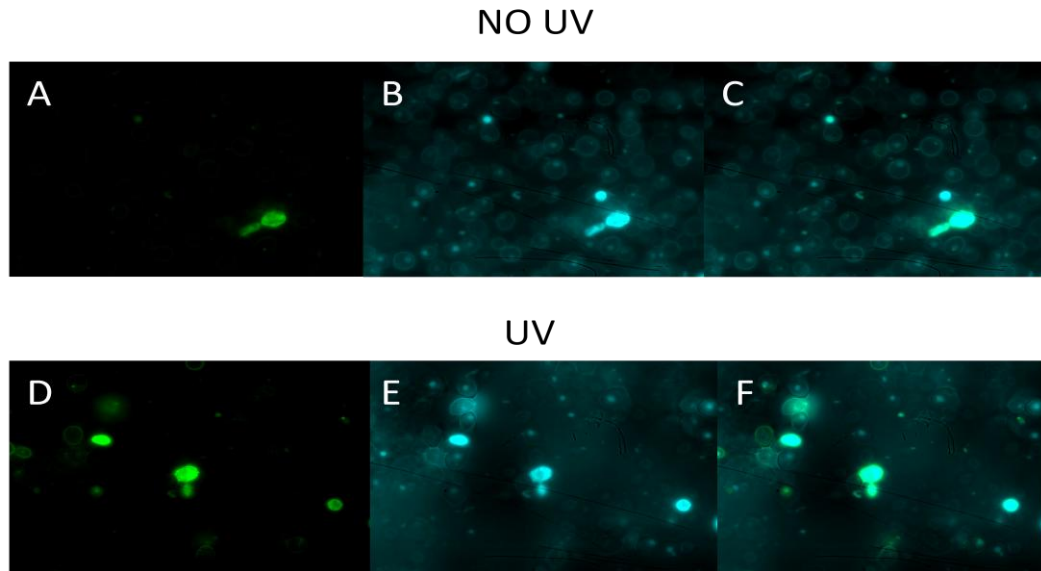
NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	46,3 ± 1,9	2,8 ± 1,9

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	47,3 ± 2,3	1,5 ± 0,7

Figura 22: Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 delemo per OTU1. (A) OTU1Δ GFP non irradiato (B) OTU1Δ HOECHST non irradiato (C) OTU1Δ MERGE non irradiato. (D) OTU1Δ GFP irradiato (E) OTU1Δ HOECHST irradiato (F) OTU1Δ MERGE irradiato.

Anche nel ceppo BY4743 delemo per OTU1, il trattamento con UV non determina nessun effetto sull'espressione e sulla localizzazione di PARP1. Infatti, il numero di

cellule GFP positive è 46/47%, mentre nel 2-3% delle cellule PARP1 è nel nucleo (figura 22

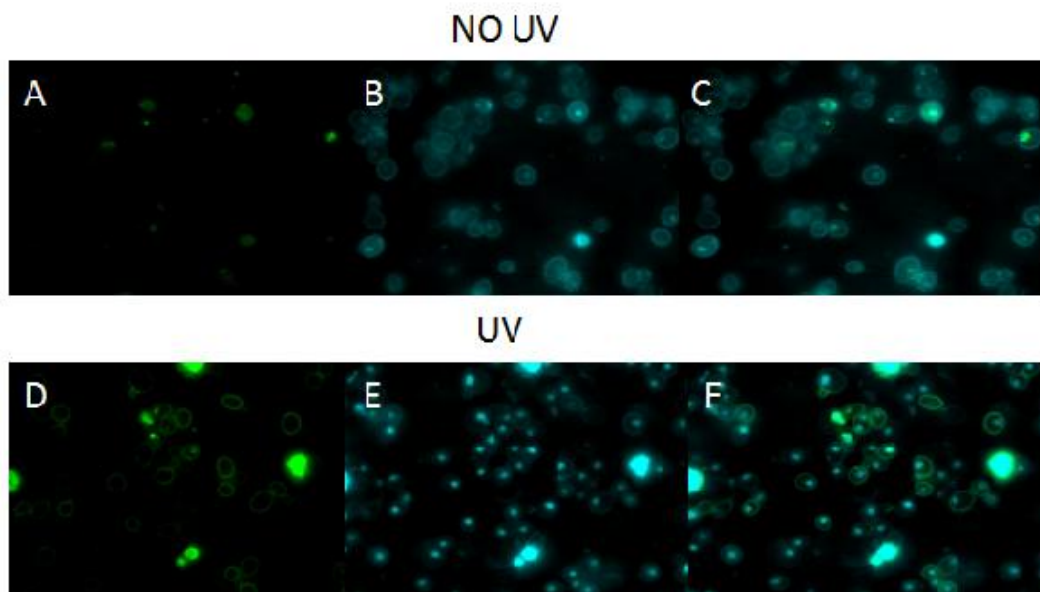


NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	49,1 ± 3,0	6,1 ± 1,8

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	43,6 ± 2,3	9,6 ± 1,5

Figura 23. Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 deleto per SNT1. (A) SNT1 Δ non irradiato (B) SNT1Δ HOECHST non irradiato (C) SNT1Δ MERGE non irradiato. (D) SNT1 Δ GFP irradiato (E) SNT1Δ HOECHST irradiato (F) SNT1Δ MERGE irradiato.

In maniera molto simile, anche nel ceppo deleto per il gene SNT1, non si osservano differenze tra le cellule irradiate e non (figura 23) . Infatti, il 49-46% di cellule sono GFP positive e quindi esprimono PARP-1 mentre nel 6-9% delle cellule PARP-1 si localizza nel nucleo

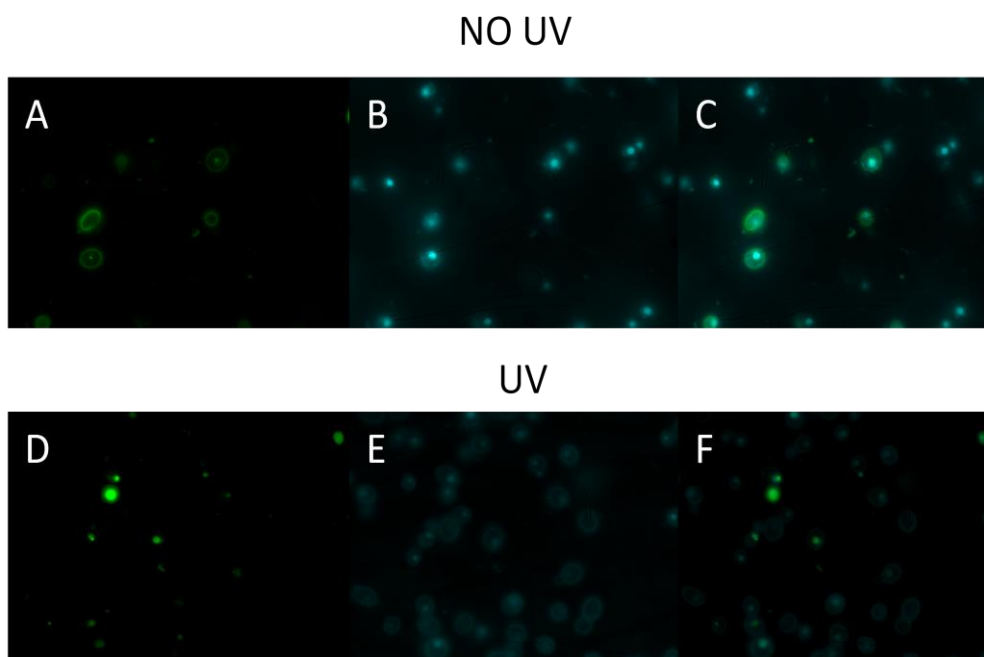


NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	54,8 ± 2,9	4,5 ± 1,7

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	52,3 ± 6,2	11,1 ± 1,6

Figura. 24: Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 deleto per *HH01*. (A) *HH01Δ* non irradiato (B) *HH01Δ* HOECHST non irradiato (C) *HH01Δ* MERGE non irradiato. (D) *HH01Δ* GFP irradiato (E) *HH01Δ* HOECHST irradiato (F) *HH01Δ* MERGE irradiato.

Anche nel ceppo deleto per *HH01* la percentuale di cellule GFP positive non è influenzata dal danno al DNA, ma il trattamento con UV determina in questo ceppo un aumento di cellule dove PARP-1 si localizza nel nucleo dal 4,5% al 11%.



NO UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	46,1 ± 3,1	0

UV	Cellule totali	% Cellule GFP+	% PARP nucleare
	900	47,5 ± 3,2	3,1 ± 0,9

Figura25 Espressione e localizzazione di PARP-1 nel ceppo BY4743 delecto per POM155. (A) POM152Δ non irradiato (B) POM152Δ HOECHST non irradiato (C) POM152Δ MERGE non irradiato. (D) POM152 Δ GFP irradiato (E) POM152Δ HOECHST irradiato (F) POM152Δ MERGE irradiato.

Una situazione simile si può osservare nel ceppo BY4743 delecto per NUP210. Infatti, il trattamento UV non influenza il numero di cellule GFP positive (46-47%) ma ha un effetto sulla localizzazione (0-3%)

CAPITOLO 4: DISCUSSIONE

In un precedente lavoro di tesi svolto nel nostro laboratorio è stato effettuato uno screening genetico in una libreria di ceppi di lievito *Saccharomyces cerevisiae* deleti (yeast deletion pool), per identificare dei geni che potessero avere un ruolo come “regolatori” dell’attività di PARP-1. In questo modo sono stati isolati 150 cloni resistenti all’espressione di PARP-1. Dopo l’analisi delle sequenze sono stati identificati 110 geni, che potenzialmente potrebbero essere coinvolti nella modulazione o regolazione dell’attività di PARP-1.

In base a questi presupposti, nel mio lavoro di tesi che si inserisce in un progetto che utilizza *Saccharomyces cerevisiae* per cercare di individuare nuovi fattori che possono avere un ruolo nella “perdita” di sensibilità agli inibitori di PARP-1, ho ulteriormente caratterizzato alcuni di questi ceppi. Un aumentato livello proteico intracellulare o un difetto nella localizzazione nucleare di PARP-1 possono essere fattori importanti per testare l’efficacia degli inibitori di PARP usati in terapia. Inoltre, i geni omologhi a quelli trovati in lievito possono avere un ruolo nella modulazione dell’attività di PARP e quindi essere importanti per la “sensibilità” agli inibitori di PARP.

E’ noto dalla letteratura che PARP-1 ha un ruolo fondamentale nei pathway di riparazione e nella regolazione della ricombinazione omologa; siccome il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un ottimo modello per studiare la ricombinazione omologa indotta da agenti chimici e fisici (Galli and Shiestl, 1995) e, come ampiamente riportato in letteratura, la ricombinazione mitotica ha un ruolo primario nella riparazione del DNA (Spugnesi et al., 2013), abbiamo determinato se PARP-1 avesse un effetto sulla ricombinazione indotta da UV. I risultati mostrano chiaramente che l’espressione di PARP-1 riduce la frequenza di ricombinazione inter- e, soprattutto intracromosomica. I nostri dati confermano dati in letteratura in cui si dimostra che la sovraespressione di PARP-1 riduce la frequenza di scambi fra cromatidi fratelli indotti da agenti alchilati (Meyer et al., 2000). E’ importante sottolineare che gli scambi fra cromatidi fratelli rappresentano eventi di

ricombinazione intracromosomica che di fatto è quella che si riduce maggiormente in lievito. I nostri risultati indicano che, nonostante il lievito non abbia l'omologo strutturale di PARP-1, abbia comunque i target che determinano l'effetto sulla ricombinazione. Infatti, in un lavoro precedente è stato dimostrato nel nostro laboratorio che l'effetto inibitorio che esercita PARP-1 sulla crescita in lievito viene parzialmente soppresso quando si tratta il lievito con un inibitore specifico di PARP-1. Questo conferma che il fenotipo indotto da PARP-1 in lievito è dovuto alla attività di parilazione di PARP-1. Tale osservazione dà ancora più forza alla potenzialità del sistema genetico utilizzato in questo studio.

Inoltre con la dimostrazione che PARP-1 riesca a modulare la ricombinazione del DNA in lievito come nei mammiferi e nell'uomo, conferma ancora una volta che questo organismo è un'ottimo modello per studiare le funzioni di proteine umane. Inoltre, poichè non abbiamo osservato nessun effetto di PARP-1 sulla ricombinazione spontanea, si può ipotizzare che PARP-1 non influenzi la riparazione per ricombinazione omologa di danni al DNA che avvengono spontaneamente nella cellula.

Nel mio progetto di tesi ho determinato il livello intracellulare di PARP-1 e la sua localizzazione in seguito a trattamento con UV in ceppi di lievito con una delezione specifica in alcuni dei geni identificati nello screening genetico: *HHO1*, *GAL3*, *HUL4*, *SNT1*, *OTU1*, *POM152* e come controllo nel ceppo wild type BY4743. È stato dimostrato che in cellule di lievito *Saccharomyces cerevisiae* PARP-1 si localizza nel nucleo come un aggregato detto "focus" (Tau et al., 2009). Alla luce di questa premessa osservando tramite microscopio a fluorescenza il ceppo BY4743 PARP-1-GFP e i ceppi deleti presi in esame si dovrebbe osservare una localizzazione nucleare di PARP. Gli esperimenti di localizzazione dimostrano che in tutti i ceppi tranne nel *gal3* deleto, dopo 20 ore di induzione in galattosio il 45-51% di cellule sono GFP positive. L'irraggiamento con UV non produce nessun effetto sull'espressione in tutti i ceppi compreso il wild type. La più bassa espressione di PARP-1 nel ceppo *gal3* deleto che presumibilmente determina negatività nel

western blot può essere dovuta al fatto che questo gene è coinvolto nel metabolismo del galattosio e quindi ci può essere un difetto nel processo di induzione (Diep et al., 2008). Questo potrebbe spiegare l'assenza di localizzazione nucleare nel ceppo *gal3-*.

Negli altri ceppi deleti si riscontra un numero di cellule con PARP nucleare più elevato rispetto al ceppo wild type. Questo probabilmente è giustificato dal fatto che i ceppi deleti riescono a sopravvivere quando PARP-1 è espresso meglio rispetto al wild type. Come detto in precedenza, PARP-1 influenza la riparazione del DNA e quindi il danno al DNA potrebbe avere un effetto sulla localizzazione. I risultati ottenuti indicano che il trattamento con UV determina un aumento di cellule con "focus" nucleare solo nei ceppi deleti per l'istone H1 e per POM152 (subunità del poro nucleare).

L'istone H1 svolge numerose funzioni all'interno della cellula, prima tra tutte è quella di favorire la compattazione della cromatina. Nel nostro ceppo deleto per tale gene, probabilmente la cromatina assumerà una struttura più rilassata. Questa caratteristica rende presumibilmente più facile l'entrata di PARP1 nel nucleo. L'aumento di localizzazione nucleare nel caso di danno indotto con UV può essere anche giustificato perciò da un'attivazione dei pathway di riparazione del DNA. Come già descritto nell'introduzione, POM152 è una proteina che fa parte del complesso del poro nucleare, ed è coinvolta anche nel trasporto di proteine dal nucleo al citoplasma. I nostri dati indicano che questa funzione influenza la localizzazione di PARP a livello nucleare. Nel ceppo deleto per tale gene infatti, PARP1 potrebbe riuscire a collocarsi nel nucleo in presenza di danno al DNA per attivare i processi di riparazione indotti da UV, ma a causa della delezione nel gene coinvolto nel processo di esportazione di proteine dal nucleo PARP potrebbe rimanere "imprigionato" all'interno del nucleo stesso.

Per quanto riguarda gli altri ceppi possiamo concludere che mutazioni a loro carico non influenzano la localizzazione nucleare di PARP1, ma probabilmente la

loro interazione con la proteina avviene ad altri livelli, dato che comunque riescono a permettere la sopravvivenza del lievito su piastra.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è proprio quello di riuscire ad identificare fattori che possano avere un ruolo nella “perdita” di sensibilità agli inibitori; dai dati ottenuti riguardanti la variazione della localizzazione nucleare dei ceppi deleti, si potrebbe ipotizzare che la delezione di HH01 e POM152 sembrano favorire i processi di riparazione, in quanto in presenza di danno al DNA, permettono una maggiore localizzazione nucleare di PARP.

In questo lavoro di tesi, abbiamo dimostrato che in lievito i geni che codificano per l’istone H1 e per la subunità POM152 del poro nucleare influenzano la localizzazione nucleare di PARP-1. Gli omologhi umani potrebbero avere un ruolo nella attività della proteina PARP-1 e quindi nella sensibilità agli inibitori di PARP-1 che vengono utilizzati come coadiuvanti nella terapia antitumorale.

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE

Nel mio lavoro di tesi ho dimostrato che PARP-1 influenza la ricombinazione omologa indotta da danni al DNA confermando dati ottenuti su cellule di mammifero, dove è stato osservato che l'overespressione di PARP-1 determina una diminuzione dell'instabilità genomica.

Questo dimostra ancora una volta che anche se il lievito non possiede l'omologo di PARP-1, il livello di conservazione tra uomo e lievito dei pathway di riparazione è tale che PARP-1 interagisce con questi pathway, sembra infatti che nel lievito siano presenti i target che determinano l'effetto sulla ricombinazione.

La mancanza delle funzioni svolte dai geni HHO1 (istone H1), HUL4 (subunità E3 di SUMO), POM152 (subunità del poro nucleare NUP210), SNT1 (proteina con attività "DNA binding"), OTU1 (ubiquitinasi) e GAL3 (galattochinasi) non influenza il livello intracellulare di PARP-1 sia in presenza che in assenza di danno al DNA.

La mancanza di HHO1 e POM152 ha un effetto sulla localizzazione in presenza di danno al DNA.

Quindi questo studio potrebbe aver individuato nuove funzioni che modulano l'attività di PARP nel nucleo, questo dimostra che screening in lievito possono dare indicazioni su eventuali target terapeutici usati in terapia antitumorale.

Sarebbe interessante investigare in maniera più approfondita l'interazione tra PARP-1 e la riparazione del DNA in lievito sfruttando la genetica di questo organismo. Esprimere PARP-1 in mutanti difettivi per specifici pathway della riparazione del DNA potrebbe permettere l'identificazione di nuovi "geni" che potrebbero determinare letalità sintetica in presenza di danno al DNA.

Partendo dai risultati ottenuti in questo lavoro sarebbe interessante valutare la frequenza di ricombinazione spontanea e indotta da danni al DNA in cellule di

Saccharomyces cerevisiae trattate con inibitori di PARP-1. Anche se il lievito non ha l'omologo di PARP-1, determinare l'effetto di inibitori specifici di PARP-1 sulla ricombinazione in lievito potrebbe aiutare a capire se esiste un'attività endogena PARP-1 like in lievito e se regola la riparazione/ricombinazione del DNA.

Come già detto nell'introduzione il lievito non presenta l'ortologo di PARP-1 però non possiamo escludere la presenza di una proteina con funzione paragonabile a quella di PARP. Nel caso in cui tale proteina sia espressa dovremmo osservare delle differenze nei pathway di ricombinazione omologa quando trattiamo le cellule con l'inibitore.

Questo lavoro di tesi rappresenta un punto di partenza per poter condurre ulteriori studi; in particolare potrebbe essere interessante valutare la presenza di polimorfismi nei geni studiati a livello di cellule tumorali dove PARP-1 è mutato.

BIBLIOGRAFIA

- Altmeyer M, Hottiger MO. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging. *Aging (Albany NY)*. 2009 May 20;1(5):458-69.
- Aly A, Ganesan S. BRCA1, PARP, and 53BP1: conditional synthetic lethality and synthetic viability. *J Mol Cell Biol*. 2011 Feb;3(1):66-74.
- Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays*. 2004 Aug;26(8):882-93.
- Bharadwaj P., Martins R., and Macreadie I. (2010), "Yeast as a model for studying Alzheimer's disease", *FEMS Yeast Research* (2010 December); 10(8): 961-969
- Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol*. 2003 Jun;31(6):446-54. Review.
- Brandsma I, Gent DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr*. 2012 Nov 27;3(1):9.
- Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, Johansson F, Fernandez S, McGlynn P, Helleday T. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination.
- Bunting SF, Callén E, Wong N, Chen HT, Polato F, Gunn A, Bothmer A, Feldhahn N, Fernandez-Capetillo O, Cao L, Xu X, Deng CX, Finkel T, Nussenzweig M, Stark JM, Nussenzweig A. 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell*. 2010 Apr 16;141(2):243-54.

Cao L, Xu X, Bunting SF, Liu J, Wang RH, Cao LL, Wu JJ, Peng TN, Chen J, Nussenzweig A, Deng CX, Finkel T. A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol Cell*. 2009 Aug 28;35(4):534-41.

Chang W, Dynek JN, Smith S. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem J*. 2005 Oct 15;391(Pt 2):177-84.

Chiarugi A. A snapshot of chemoresistance to PARP inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Jan;33(1):42-8.

Clayton A, Karia B, Bruce C, Bishop AJ. PARP1 suppresses homologous recombination events in mice in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov;38(21):7538-45.

College of Medicine, Hershey, Pennsylvania 17033 Manuscript received April 19, 2007.

Cuong Q. Diep,¹ Xiaorong Tao,² Vepkhia Pilauri,³ Mandy Losiewicz, T. Eric Blank⁴ and James E. Hopper⁵. Genetic Evidence for Sites of Interaction Between the Gal3 and Gal80 Proteins of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL Gene Switch. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Pennsylvania State University, College of Medicine, Hershey, Pennsylvania 17033 Manuscript received April 19, 2007. Accepted for publication November 17, 2007

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 1999 Sep 1;342 (Pt 2):249-68. Review.

Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS. PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. *Sci Transl Med*. 2010 Oct 13;2(53)

- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):917-21.
- Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009 Jul 9;361(2):123-34.
- Friedberg, Walker Siede, Wood Schultz, Ellenberg. DNA repair and mutagenesis.(2006)
- 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.
- Giaever G. et al. (2002), "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome", *Nature* (2002 July 25); 418(6896): 387-391.
- Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jun 20;13(7):411-24.
- Hakmé A, Huber A, Dollé P, Schreiber V. The macroPARP genes Parp-9 and Parp-14 are developmentally and differentially regulated in mouse tissues. *Dev Dyn*. 2008 Jan;237(1):209-15.
- Hartwell L.H. (2004), "Yeast and Cancer", *Bioscience Reports* (2004); 24: 523-544
- Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45145-53. Epub 2003 Sep 5.

- Hassa PO, Hottiger MO. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:3046-82. Review.
- Heitman J., Movva N.R., and Hall M.N. (1991), "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast", *Science* (1991); 253: 905-909
- Helleday T, Bryant HE, Schultz N . Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle.* 2005 Sep;4(9):1176-8. Epub 2005 Sep 12. Review.
- Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings. *Mol Oncol.* 2011 Aug;5(4):387-93.
- Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res.* 2001 Jun 2;477(1-2):97-110. Review.
- Jackson SP. The DNA-damage response: new molecular insights and new approaches to cancer therapy. *Biochem Soc Trans.* 2009 Jun;37(Pt 3):483-94.
- Javle M, Curtin NJ. The potential for poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer therapy.
- Jones P. (2012). Profiling PARP inhibitors. *Nature Biotechnology* (2012 March 7); 30(3): 249-250
- Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, Fukasawa K. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation). *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1175-83. Epub 2007 Sep 23.

- Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):803-14.
- Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*. 2005 Sep 1;19(17):1951-67. Review.
- 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.
- Kraus WL, Lis JT. PARP goes transcription. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):677-83.
- Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Jun;20(3):294-302.
- Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell*. 2010 Jul 9;39(1):8-24.
- Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science*. 2008 Feb 8;319(5864):819-21.
- Langelier MF, Ruhl DD, Planck JL, Kraus WL, Pascal JM. The Zn³ domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *J Biol Chem*. 2010 Jun 11;285(24):18877-87.

- Langelier MF, Servent KM, Rogers EE, Pascal JM. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4105-14. Epub 2007 Nov 30.
- Li M, Yu X. Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation. *Cancer Cell*. 2013 May 13;23(5):693-704.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):287-94.
- Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem Sci*. 2000 Feb;25(2):50-2.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol*. 1998 Jun;18(6):3563-71.
- Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, Ashworth A. Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2009 Sep;1(6-7):315-22.
- Messner S, Schuermann D, Altmeyer M, Kassner I, Schmidt D, Schär P, Müller S, Hottiger MO. Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *FASEB J*. 2009 Nov;23(11):3978-89.
- Meyer R¹, Müller M, Beneke S, Küpper JH, Bürkle A. Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *Int J Cancer*. 2000 Nov 1;88(3):351-5.
- Montoni A, Robu M, Pouliot E, Shah GM. Resistance to PARP-Inhibitors in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2013 Feb 27;4:18.

- Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, Panchakshari R, Gottipati P, Muschel RJ, Beech J, Kulshrestha R, Abdelmohsen K, Weinstock DM, Gorospe M, Harris AL, Helleday T, Chowdhury D. miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*. 2011 Jan 21;41(2):210-20.
- Narwal M, Venkannagari H, Lehtiö L. Structural basis of selective inhibition of human tankyrases. *J Med Chem*. 2012 Feb 9;55(3):1360-7. Epub 2012 Jan 25.
- Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, Lukas J, Bartek J. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle*. 2012 Oct 15;11(20):3837-50.
- Pardo B, Gomez-Gonzalez 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
- Peralta-Leal A., Rodríguez-Vargas J.M., Aguilar-Quesada R., Rodríguez M.I., Linares J.L., de Almodóvar M.R., and Oliver F.J. (2009). PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radical Biology & Medicine* (2009 July 1); 47(1): 13-26
- Perkins E., Sun D., Nguyen A., Tulac S., Francesco M., Tavana H., Nguyen H., Tugendreich S., Barthmaier P., Couto J., Yeh E., Thode S., Jarnagin K., Jain A., Morgans D., and Melese T. (2001), "Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast", *Cancer Research* (2001 May 15); 61(10): 4175-4183
- Petermann E, Helleday T. Pathways of mammalian replication fork restart. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Oct;11(10):683-7.

- Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 2001 Dec 15;15(24):3237-42.
- 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.
- Robu M, Shah RG, Petitclerc N, Brind'Amour J, Kandan-Kulangara F, Shah GM. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 29;110(5):1658-63.
- 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.
- Ruf A., de Murcia G. and Schulz G.E. (1998). Inhibitor and NAD⁺ binding to poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* (1998 March 17); 37(11): 3893-3900
- Sato MS, Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature.* 1992 Mar 26;356(6367):356-8.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul;7(7):517-28. Review.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem.* 1999 Mar;193(1-2):137-48.
- Sourisseau T, Maniotis D, McCarthy A, Tang C, Lord CJ, Ashworth A, Linardopoulos S. Aurora-A expressing tumour cells are deficient for homology-directed DNA

- double strand-break repair and sensitive to PARP inhibition. *EMBO Mol Med*. 2010 Apr;2(4):130-42.
- Spugnesi L, Balia C, Collavoli A, Falaschi E, Quercioli V, Caligo MA, Galli A. Effect of the expression of BRCA2 on spontaneous homologous recombination and DNA damage-induced nuclear foci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*. 2013 Mar;28(2):187-95.
- Ström CE, Johansson F, Uhlén M, Szigyarto CA, Erixon K, Helleday T. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res*. 2011 Apr;39(8):3166-75.
- Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jun 15;14(12):2491-507.
- Tenreiro S., and Outeiro T.F. (2010), "Simple is good: yeast models of neurodegeneration", *FEMS yeast research* (2010 December); 10(8): 970-979.
- Wang X, Weaver DT. The ups and downs of DNA repair biomarkers for PARP inhibitor therapies. *Am J Cancer Res*. 2011;1(3):301-327. Epub 2010 Jan 3.
- Winzeler EA, et al., Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science*. 1999 Aug 6;285(5429):901-6.
- Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2008 Jun 1;7(6):932-40.
- Woodhouse BC, Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery.

Zhang Y, Li Y, Yang DQ. Phosphorylation of eIF-4E positively regulates formation of the eIF-4F translation initiation complex following DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Feb 29;367(1):54-9.

Ringraziamenti

Dopo 5 anni (quasi sei) più significativi e più dolcemente difficili della mia vita mi ritrovo anch' io alla fine di questo percorso.

La sensazione che si prova in questo momento è molto piacevole, perchè questo segna la fine di un percorso e forse l'inizio di qualcosa di nuovo e stimolante.

In queste pagine colgo l'occasione per ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine e mi hanno aiutato nel raggiungere questo importante traguardo.

Primo tra tutti ringrazio il Prof. Alvaro Galli per la cordialità e il calore con cui mi ha accolto in laboratorio, ma soprattutto per aver sempre trovato il tempo per ascoltarmi e consigliarmi, per indirizzare il mio lavoro di tesi e per fornirmi insegnamenti preziosi che porterò sempre con me.

La mia famiglia, che ha cercato di supportarmi in ogni momento di difficoltà con consigli e tanti abbracci....ma soprattutto grazie per avermi sopportato durante le mie crisi isteriche, per avere ignorato le mie rispostacce e aver provato a trasformare ogni mio "broncio" in un sorriso.

Grazie mamma e babbo!!!

Come scordarmi dei miei compagni di viaggio, i miei piccoli boss..abbiamo iniziato come perfetti sconosciuti ma poi vi ho scoperto essere la mia seconda famiglia. Mi avete fatto ridere e distrarre in ogni momento pesante durante quest'anno, abbiamo passato delle bellissime giornate insieme, e anche se abbiamo "lavorato"penso che ci siamo divertiti un sacco. Sono felice di essere giunta al termine di questa tesi..ma sempre però con un briciolo di tristezza, spero perciò che ovunque le nostre strade andranno rimarremo sempre in contatto.

Un grazie particolare va però a te...J...che davvero non so come hai fatto a sopportarmi...mi sei sempre stai stato vicino, mi hai aiutato sia per quanto riguarda gli esperimenti ma soprattutto sul lato umano..mi sono trovata benissimo a lavorare con te e chissà forse continueremo a farlo....!!!

I miei amici che anche se non hanno partecipato in prima persona a questo viaggio mi hanno regalato magnifiche serate...ringrazio in particolar modo Paola e Martina, ci conosciamo da una vita e insieme ne abbiamo passate tante...ci siamo sempre supportate in tutti i modi possibili e spero che la nostra amicizia rimanga sempre così forte.

In ultimo ma non meno importante ringrazio te...amore mio...che hai camminato al mio fianco per tutto questo lungo cammino, dandomi la forza necessaria per affrontare ogni problema. Hai cercato di farti sorridere anche nei momenti più bui..e grazie alla tua vicinanza è stato tutto più facile. Grazie di non avermi lasciata sola e di avermi sopportato soprattutto in quest'ultimo periodo pieno di ansie!!!!