

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dottorato di ricerca in
Biologia cellulare, molecolare e industriale:
Progetto n° 2 "Biologia funzionale e molecolare"

XXIV CICLO

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
BIO/11 BIOLOGIA MOLECOLARE

RNA non-codificanti indotti da danno al DNA
regolano il fattore di trascrizione HIF-1 α

Presentata da: Davide Bertozzi

Coordinatore Dottorato:

Vincenzo Scarlato

Relatore:

Giovanni Capranico

INDICE

Riassunto	6
Capitolo 1: Introduzione	7
1.1 La topologia del DNA è correlata a diversi processi cellulari	7
1.2 DNA topoisomerasi	8
1.3 Struttura DNA topoisomerasi IB umana	13
1.4 Meccanismo catalitico della DNA topoisomerasi IB umana	16
1.5 Top 1 e espressione genica	17
1.6 Camptotecina: inibitore specifico della DNA topoisomerasi IB	18
1.7 Elongazione della RNA polimerasi II: ruolo dei siti di pausa trascrizionali	25
1.8 Pathways cellulari attivati in risposta al danno al DNA	29
1.9 Effetto della caffeina e dell'afidicolina sulla risposta cellulare al danno al DNA provocato da CPT	32
1.10 Effetti specifici della CPT sull'espressione di HIF-1 α , un fattore di trascrizione correlato alla trasformazione neoplastica	33
1.11 HIF-1 α : fattore di adattamento cellulare a condizioni ipossiche, implicato nella crescita tumorale	35
1.12 ncRNA, danno al DNA e ipossia	38
1.13 Complessità del trascrittoma e RNA non-coding	39

1.14	miRNA	41
1.15	lncRNA	44

Capitolo 2: Obiettivo del lavoro sperimentale 45

Capitolo 3: Materiali e metodi 46

3.1	Linee cellulari e trattamenti	46
3.2	Estrazione dell'RNA e retrotrascrizione	46
3.3	Northern Blot	47
3.4	PCR quantitativa (qPCR)	48
3.5	Estrazione delle proteine e Western Blot	49
3.6	Purificazione dell'RNA con 5'CAP per affinità	49
3.7	Ibridazione dell'RNA <i>in situ</i> (RNA FISH)	50
3.8	RNA FISH associata a immunofluorescenza	51
3.9	Campioni da carcinomi renali umani	51
3.10	Trasfezioni e saggi con luciferasi	52
3.11	Lista dei primer	53

Capitolo 4: Risultati 54

4.1	5'aHIF-1 α : un trascritto antisenso al 5' del gene HIF-1 α attivato da CPT	54
4.2	L'attivazione del trascritto antisenso 5'aHIF-1 α non dipende dal danno al DNA alla forca di replicazione	62
4.3	L'RNA antisenso 5'aHIF-1 α risulta essere poliadenilato ed avere struttura CAP in 5'	64
4.4	Trattamenti con CPT attivano la trascrizione dell'antisenso 3'aHIF-1 α in cellule HCT 116	67
4.5	Gli RNA antisenso 5' e 3'aHIF-1 α sono trascritti nucleari	68

4.6	Gli RNA 5' e 3' aHIF-1 α sono presenti in carcinomi renali umani	74
4.7	Gli RNA antisenso in 5' e 3' ad HIF-1 α vengono attivati in base a tipi e stress cellulari differenti	77
4.8	Basse dosi di CPT non attivano la trascrizione degli RNA antisenso al gene HIF-1 α in condizioni ipossiche	80
4.9	La camptotecina inibisce l'accumulo della proteina HIF-1 α nelle HeLa e nelle HEK 293 in ipossia	82
4.10	Il 3'UTR di HIF-1 α è regolato da DFX e CPT in HeLa e HEK 293	86
4.11	Trattamenti con CPT aumentano i livelli di specifici miR in condizioni ipossi-mimetiche	88
4.12	L'anti-miR-X reverte l'effetto Melillo sulla linea cellulare HeLa	91
	Capitolo 5: Discussione	93
	Capitolo 6: Bibliografia	100

RIASSUNTO

Recenti analisi sull'intero trascrittoma hanno rivelato un'estensiva trascrizione di RNA non codificanti (ncRNA), le quali funzioni sono tuttavia in gran parte sconosciute. In questo lavoro è stato dimostrato che alte dosi di camptotecina (CPT), un farmaco antitumorale inibitore della Top1, aumentano la trascrizione di due ncRNA antisenso in 5' e 3' (5'aHIF-1 α e 3'aHIF-1 α rispettivamente) al locus genico di HIF-1 α e diminuiscono i livelli dell'mRNA di HIF-1 α stesso. Gli effetti del trattamento sono Top1-dipendenti, mentre non dipendono dal danno al DNA alla forca di replicazione o dai *checkpoint* attivati dal danno al DNA. I ncRNA vengono attivati in risposta a diversi tipi di stress, il 5'aHIF-1 α è lungo circa 10 kb e possiede sia il CAP in 5' sia poliadenilazione in 3' (in letteratura è noto che il 3'aHIF-1 α è un trascritto di 1.7 kb, senza 5'CAP né poliadenilazione). Analisi di localizzazione intracellulare hanno dimostrato che entrambi sono trascritti nucleari. In particolare 5'aHIF-1 α co-localizza con proteine del complesso del poro nucleare, suggerendo un suo possibile ruolo come mediatore degli scambi della membrana nucleare. È stata dimostrata inoltre la trascrizione dei due ncRNA in tessuti di tumore umano del rene, evidenziandone possibili ruoli nello sviluppo del cancro. È anche noto in letteratura che basse dosi di CPT in condizioni di ipossia diminuiscono i livelli di proteina di HIF-1 α . Dopo aver dimostrato su diverse linee cellulari che i due ncRNA sopracitati non sono implicati in tale effetto, abbiamo studiato le variazioni dell'intero miRnoma alle nuove condizioni sperimentali. In tal modo abbiamo scoperto che il miR-X sembra essere il mediatore molecolare dell'abbattimento di HIF-1 α dopo trattamento con basse dosi di CPT in ipossia. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che il fattore di trascrizione HIF-1 α sia finemente regolato da RNA non-codificanti indotti da danno al DNA.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 LA TOPOLOGIA DEL DNA È CORRELATA A DIVERSI PROCESSI CELLULARI

Il DNA è mantenuto nelle cellule in uno stato di parziale svolgimento (superavvolgimento negativo) [1] per facilitare l'apertura specifica della doppia elica per permettere l'accesso alle basi del DNA per la replicazione o trascrizione. In entrambi i casi il DNA deve essere denaturato [1, 2]. Molti esempi in natura sottolineano l'importanza biologica dell'essere superavvolti sotto determinate condizioni ambientali. Ad esempio la girasi inversa che è stata ritrovata solamente in organismi ipertermofili, è un enzima che introduce superavvolgimenti positivi nel DNA [3]. Le proteine provenienti da molti archea termofili impaccano il DNA in strutture simili ai nucleosomi [4]. Negli eucarioti la regolazione della topologia del DNA in generale e in specifiche regioni genomiche rimane molto meno chiara. I problemi topologici possono sorgere da molti processi che vedono coinvolti macchinari multi-enzimatici complessi. Durante la replicazione ad esempio la doppia elica del DNA deve essere completamente svolta, e durante la trascrizione il movimento della RNA polimerasi genera superavvolgimenti sia positivi che negativi che devono essere rilassati [5, 6]. L'associazione del DNA con gli istoni o altre proteine introduce ulteriori superavvolgimenti che richiedono rilassamento. In tutte le cellule, i cromosomi completamente replicati devono essere ri-impaccati prima della divisione cellulare. Questi esempi illustrano che la struttura del DNA non solo porta problemi topologici che vanno risolti, ma è anche un fine regolatore per ottimizzare i processi che vedono coinvolti il DNA stesso [3].

In sistemi in vitro è stato visto che la replicazione è attiva solamente su DNA superavvolto negativamente. La DNA polimerasi si blocca prima che la replicazione sia completa, e questo è dovuto all'accumulo di superavvolgimenti positivi innanzi al complesso di replicazione. L'aggiunta al sistema in vitro di enzimi come le DNA topoisomerasi, capaci di risolvere i superavvolgimenti del DNA, permette alle DNA polimerasi di completare la

replicazione [7]. Per risolvere superavvolgimenti del DNA, uno o entrambi i filamenti devono essere tagliati in modo tale da permettere lo svolgimento di un giro d'elica e quindi rilegati. Il meccanismo di svolgimento deve però avvenire senza danneggiare o alterare il genoma, e per questo gli organismi hanno evoluto una classe di enzimi chiamati DNA topoisomerasi.

1.2 DNA TOPOISOMERASI

Le DNA topoisomerasi vengono suddivise in differenti classi in base alla loro sequenza amminoacidica e al meccanismo di reazione (tabella 1.1). Gli enzimi che tagliano solo un filamento di DNA sono definiti di tipo I. In particolare se la proteina lega il filamento rotto nel fosfato in 5' sarà di tipo IA, altrimenti se lega il 3' di tipo IB.

La famiglia di tipo IA include le topoisomerasi I e III batteriche [8], le girasi inverse degli archea e le topoisomerasi III eucariotiche. Questi enzimi sono in grado di rilassare superavvolgimenti negativi (fig. 1.1A). Le girasi inverse sono gli unici enzimi di questa famiglia capaci di superavvolgere positivamente il DNA [9]. La proteina mostra un'omologia con altri enzimi di tipo IA, ma solo per la regione in C terminale. Nella regione N terminale è presente un sito che lega ATP e motivi caratteristici delle elicasi.

Le topoisomerasi di tipo IB includono la topoisomerasi I eucariotica e di poxvirus, e enzimi omologhi ritrovati in batteri [8]. Questi enzimi catalizzano il rilassamento di entrambi i superavvolgimenti positivi e negativi [10]. Si pensa che l'energia necessaria per svolgere il doppio filamento del DNA sia fornita dallo stress torsionale stesso della doppia elica [3].

Le topoisomerasi che tagliano entrambi i filamenti per generare una doppia rottura sul DNA sono raggruppate nella famiglia di tipo II. Questa famiglia di topoisomerasi viene sotto classificata come IIA o IIB in base alla sequenza amminoacidica e alla struttura. Tutti i tipi II sono enzimi multi subunità e formano tagli al DNA legandosi al frammento 5' tagliato. L'enzima catalizza cambi topologici passando un doppio filamento di DNA attraverso il sito di taglio della restante doppia elica in un meccanismo dipendente da ATP e Mg^{2+} [3, 11].

Tabella 1.1. Classificazione delle DNA topoisomerasi.

ORGANISMO	GENE	TIPO IA	TIPO IB	TIPO IIA	TIPO IIB
<i>E. coli</i>	Top A	Top I			
	Top C	Top III			
	GyrA/GyrB			DNA girasi	
	ParC/ParE			Top IV	
<i>S. cerevisiae</i>	TOP III	Top III			
	TOP I		Top I		
	TOP II			Top II	
	SPO 11				Spo 11
Archea		Girasi inversa			
			Top V		Top VI
Mammiferi	TOP 3 α	Top III α			
	TOP 3 β	Top III β			
	TOP 1 TOP 1m		Top I Top I mit		
	TOP 2 α			Top II α	
	TOP 2 β			Top II β	
					Spo 11

La famiglia IIA include le topoisomerasi II eucariotiche (TOP2), virali e fagiche, DNA girasi batteriche e topoisomerasi IV. Le topoisomerasi IV batteriche possono rilassare superavvolgimenti positivi e negativi [12]. Tutti i tipi di topoisomerasi IIA, con l'esclusione delle DNA girasi, sono inoltre in grado di decatenare il DNA (fig. 1.1B).

Le topoisomerasi IIA sono molto più comuni nei diversi organismi rispetto alle IIB che sono confinate solo negli archea, piante e alcuni tipi di alghe. Anche se la distribuzione delle topoisomerasi tra le varie specie è complessa, ogni organismo vivente ha almeno una topoisomerasi di tipo IA e una di tipo II. Questo appare essere il minimo corredo di topoisomerasi per permettere la vita della cellula.

Le DNA topoisomerasi si sono evolute per risolvere i principali problemi topologici del DNA [13]:

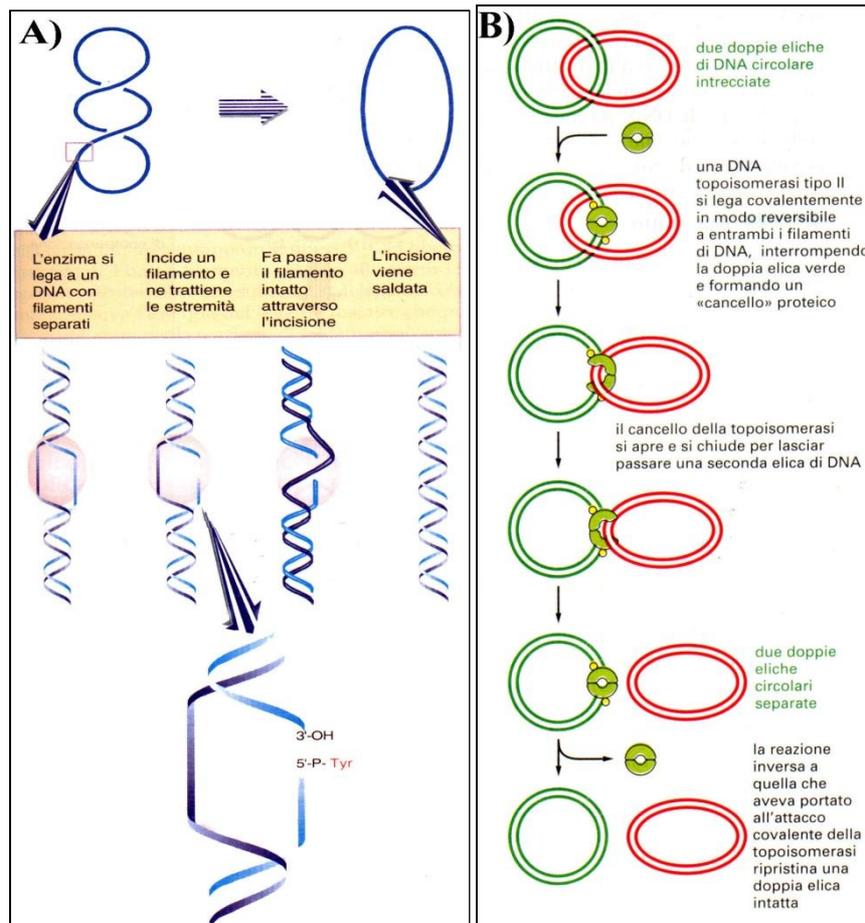


Figura 1.1. Meccanismo d'azione delle DNA topoisomerasi I-A e II-A. A) Meccanismo di rilassamento della topoisomerasi I A. B) Meccanismo di decatenazione della DNA topoisomerasi II. (Figure da Lewin B. , 1999 e da Alberts B., 1998).

- **Replicazione del DNA.** Il complesso multi enzimatico della replicazione avanza ruotando sul filamento di DNA non replicato generando superavvolgimenti. Le conseguenze topologiche di questo processo e il richiamo delle diverse DNA topoisomerasi dipendono dalla possibilità o meno dell'apparato replicativo di ruotare sul DNA. Se la DNA polimerasi non ruota sul filamento di DNA si accumulano superavvolgimenti positivi davanti alla forza replicativa (fig. 1.2), altrimenti la rotazione in se del complesso multi-enzimatico sul filamento da replicare del DNA permette la redistribuzione dei superavvolgimenti positivi e quindi favorisce l'apertura della doppia elica da replicare.

I superavvolgimenti positivi generati possono essere rimossi da una topoisomerasi di tipo IB o II [3]. Se il complesso replicativo può ruotare, un enzima di tipo II può anche risolvere probabili intrecciamenti tra le due neo

sintetizzate doppie eliche.

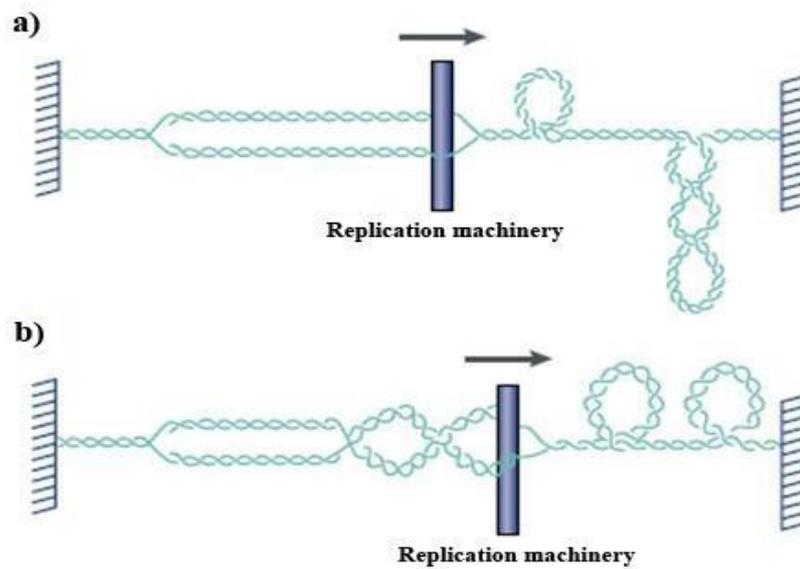


Figura 1.2. Problemi topologici associati ad una forca replicativa in avanzamento

[14]

- **Segregazione dei cromosomi.** Sorgono diversi problemi topologici quando due forche di replicazione convergono. Quando un segmento di DNA non replicato diventa molto corto, la topoisomerasi di tipo IB non può rimuovere gli ultimi intrecci tra i filamenti parentali. Questi intrecci a singolo filamento possono probabilmente essere risolti da un enzima di tipo IA, o essere convertiti in doppio filamento per essere rimossi da un enzima di tipo II. Studi in vivo sulla replicazione eucariotica sono spesso basati su modelli di lievito. I lieviti possono completare la replicazione sia solo con la topoisomerasi I sia solo con la topoisomerasi II. Senza l'attività della topoisomerasi II in vivo i plasmidi nel lievito sono completamente replicati, ma risultano concatenati (fig. 1.1B), così come dovrebbe accadere anche al DNA genomico del lievito. In letteratura è stato inoltre dimostrato che durante la mitosi avvengono rotture nei cromosomi se la replicazione avviene in assenza della topoisomerasi II [15, 16]

- **Trascrizione.** Durante la trascrizione l'RNA polimerasi in avanzamento trasloca lungo la doppia elica. Questo genera superavvolgimenti contrari davanti e dietro l'enzima (fig. 1.3). Quindi è necessario il reclutamento di DNA topoisomerasi per una corretta progressione dell'elongazione trascrizionale. Nei lieviti la delezione della DNA

topoisomerasi I non ha grandi effetti sulla crescita cellulare [14] e questo è dovuto probabilmente alla compensazione ad opera della DNA topoisomerasi II che probabilmente sostituisce il tipo I nel risolvere i problemi topologici della trascrizione. Infatti doppi mutanti temperatura sensibili per Top1 e top2 in lievito, a temperature non permissive, mostrano una riduzione dei livelli di RNA ribosomiale dimostrando il contributo fondamentale di entrambi gli enzimi nel processo della trascrizione [14].

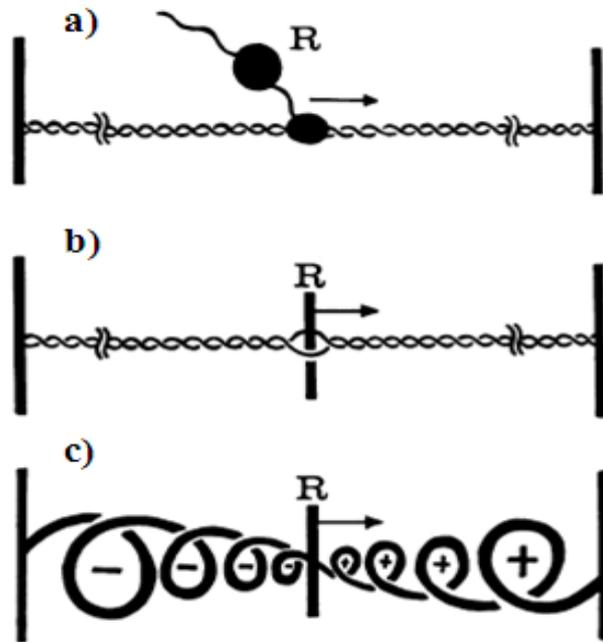


Figura 1.3. Problemi topologici associate alla trascrizione. A: L'apparato replicativo è indicato con una "R" che avanza lungo il filamento di DNA. Le estremità del DNA sono attaccate a ipotetiche strutture immobili. B e C: Se R non può ruotare attorno all'asse della doppia elica di DNA si accumulano superavvolgimenti negativi e positivi rispettivamente dietro e davanti all'apparato replicativo. [6]

Inoltre anche la trascrizione di un template impaccato nella struttura cromatinica pone diversi problemi topologici. Il passaggio di una RNA polimerasi (RNAP) in avanzamento attraverso i nucleosomi può formare *loop* di DNA contenenti sia la polimerasi che il nucleosoma [17]. Una DNA topoisomerasi in questo caso può permettere la traslocazione della polimerasi da questo *loop*.

- **Ricombinazione del DNA.** la presenza di almeno una topoisomerasi di tipo IA in tutti gli organismi indica che questo enzima ha un ruolo fondamentale nella cellula e diversi studi hanno suggerito un ruolo nella ricombinazione e segregazione dei cromosomi. E' stato dimostrato che

l'inattivazione di una delle tre DNA topoisomerasi di lievito aumenta l'instabilità genomica [18]. In aggiunta, per meglio definire in *E. coli* il ruolo delle topoisomerasi di tipo I nel metabolismo del DNA, Zhu *et al.* hanno caratterizzato gli effetti dell'inibizione dell'attività di entrambi i tipi I. Cellule con entrambe le DNA topoisomerasi I inibite mostrano strutture anormali dei nucleoli. Questo difetto è soppresso dalla delezione del gene RecA, suggerendo che questi enzimi possono essere coinvolti nella ricombinazione mediata da RecA e che possono risolvere specificamente gli intermedi di ricombinazione prima della segregazione [19].

In *S. cerevisiae* l'inattivazione della DNA topoisomerasi III (TopIII), un enzima di tipo IA, porta a lenta crescita cellulare e instabilità genomica. Analisi genetiche in *S. cerevisiae* deleti per TopIII hanno portato all'identificazione di mutazioni che mappano sul gene SGS1. Questo gene codifica per un'elicasi che è implicata nella ricombinazione del DNA e nel riparo. Gli autori hanno poi provato che l'inattivazione di SGS1 sopprime la necessità dell'attività di un enzima di tipo IA. Tutto questo suggerisce che la DNA topoisomerasi di tipo IA può essere implicata nel risolvere strutture che si formano durante la ricombinazione o nel riparo [14, 20].

Inoltre diversi lavori forniscono prove sulla correlazione tra la ricombinazione e le topoisomerasi di tipo IIB. Ad esempio Spo11 in *S. cerevisiae*, una proteina strutturalmente omologa alla topoisomerasi di tipo VI degli archea, lega covalentemente l'estremità 5' tagliata della doppia elica del DNA in un *hot-spot* della ricombinazione meiotica, aumentando le possibilità che anche le topoisomerasi di tipo IIB possano avere un ruolo chiave nello stesso processo anche negli archea [14].

- **Condensazione cromosomica.** La struttura della cromatina, la segregazione cromosomica e la topologia del DNA sono correlate. Nei batteri sembra che il superavvolgimento del DNA possa influenzare il compattamento del DNA e la segregazione. L'efficienza della segregazione dei plasmidi, in *E. coli*, aumenta in seguito all'introduzione di un forte sito di legame per la girasi batterica nel plasmide [14], o diminuisce riducendo l'attività intracellulare della DNA topoisomerasi I. Questo suggerisce che un alto grado di superavvolgimento negativo rende le molecole plasmidiche più compatte, e quindi più facilmente segregabili [14, 21].

- **Struttura cromosomica.** Evidenze sperimentali suggeriscono che la topoisomerasi II giochi un ruolo importante nell'organizzazione della struttura cromosomica. Con "scaffold" cromosomico si intende un set di proteine che rimangono dopo la rimozione di DNA e istoni dai cromosomi mitotici. Un esame delle proteine che costituiscono questa frazione ha identificato la topoisomerasi II come uno dei maggiori componenti. In cromosomi metafasici la topoisomerasi II è stata trovata associata con gli elementi del fuso suggerendo che la proteina risiede alla base dei *loop* cromosomici [15, 22].

1.3 STRUTTURA DNA TOPOISOMERASI IB UMANA

La DNA topoisomerasi IB (Top1) è un enzima nucleare che funziona con un meccanismo ATP-indipendente e apparentemente come monomero di 95 kDa. Ha la funzione di rilassare i superavvolgimenti associati a processi come la replicazione o trascrizione.

Basandosi sulla conservazione della sequenza, sensibilità alla proteolisi, proprietà idrodinamiche e esperimenti di ricostituzione di frammenti di proteina, la DNA topoisomerasi I umana è stata suddivisa in quattro domini distinti [23] (fig. 1.4 e 1.5). I 214 amminoacidi del dominio N-terminale non sono necessari per l'attività enzimatica di rilassamento del DNA in vitro e costituiscono una porzione idrofilica, non conservata e non strutturata della proteina [23] (fig. 1.5). Il dominio N-terminale contiene quattro sequenze di localizzazione nucleare e un sito per l'interazione con altre proteine, come ad esempio la nucleolina, l'antigene T dell'SV40, alcuni fattori di trascrizione, p53 e WRN [3]. L'N-terminale è seguito dal dominio core che contiene tutti i residui catalitici implicati nel riconoscimento e legame non covalente con la doppia elica, ad eccezione della tirosina che compie l'attacco nucleofilo al filamento di DNA [3]. Il dominio linker comprende 77 amminoacidi e connette il core con il dominio C-terminale. Il sito attivo composto dalla tirosina catalitica (Tyr723) si trova nel dominio C-terminale. La struttura è stata risolta tramite cristallografia a raggi X su diverse forme dell'enzima umano sia in forma libera sia legato covalentemente al DNA [24, 25]. In tutte

le strutture cristallizzate risolte manca il dominio N-terminale (fig. 1.4).

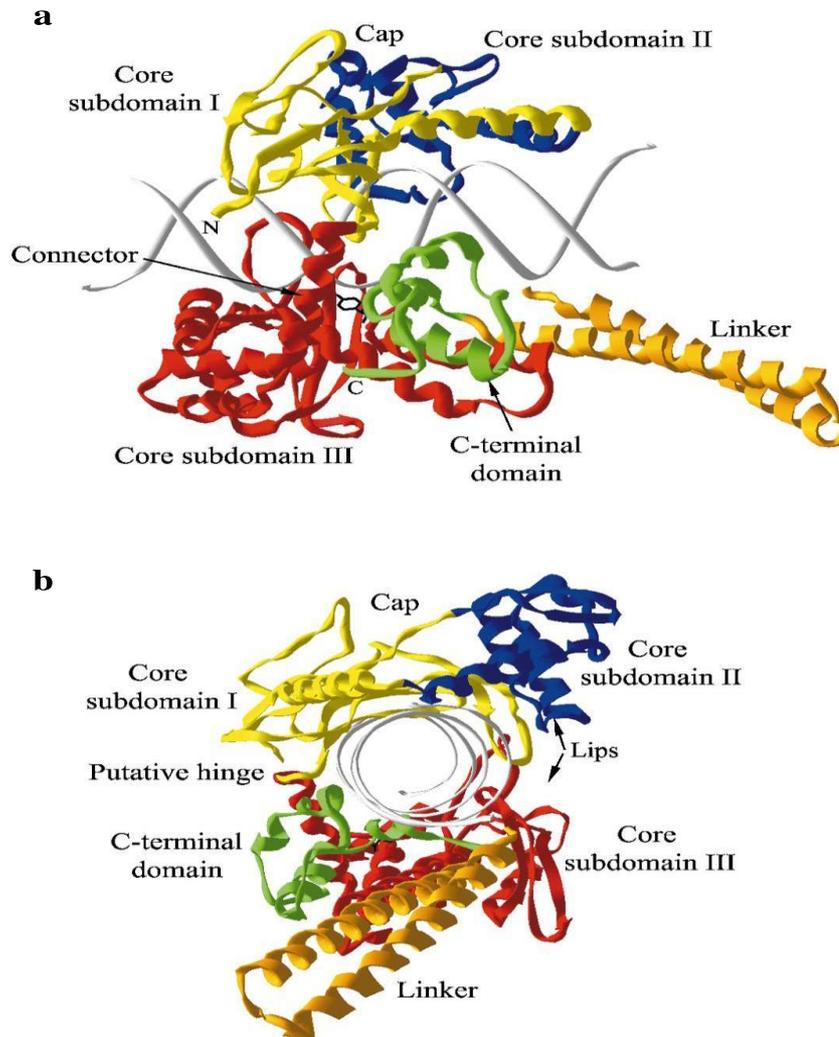


Figura 1.4. Struttura della topoisomerasi I-B umana. Visione frontale (A) e laterale (B). Svolgimento del superavvolgimento. Come indicati in figura i sottodomini del core sono colorati in giallo, blu e rosso; il linker e il C-terminale sono mostrati in arancione e verde rispettivamente. Nel pannello A viene mostrata in nero la tirosina catalitica (nel C-terminale). Nel pannello B viene indicata come “Lips” la regione che si apre ad ogni ciclo catalitico per permettere lo svolgimento di un giro d’elica. Dalla parte opposta viene indicata come “putative hinge” la regione cerniera che permette l’apertura della proteina [3]. (Figura da J J. Champoux . DNA topoisomerase: Structure, Function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369–413, 2001).

Il dominio core è suddiviso nei sottodomini I, II e III come mostrato in figura 1.4. Uno dei lobi che avvolge il DNA (giallo e blu) è formato dai sottodomini I e II [25]. L’altro lobo inferiore consiste nel sottodominio III (rosso) e dal C-terminale (verde), ed è connesso con il lobo superiore da un

connettore formato da una lunga alfa elica (“putative hinge” in figura 1.4B). Nel lato opposto al connettore è presente una coppia di loop chiamati “lips”, essi compiono interazioni non covalenti tra il lobo superiore e quello inferiore del dominio core (fig. 1.4).

La rottura di questi legami permette il distacco dei due lobi e quindi l’apertura della pinza durante il ciclo catalitico. Il dominio linker (arancione) non è indispensabile per l’attività della proteina ed è formato da due alfa eliche che formano un dominio coiled-coil che protrude dall’anello proteico.

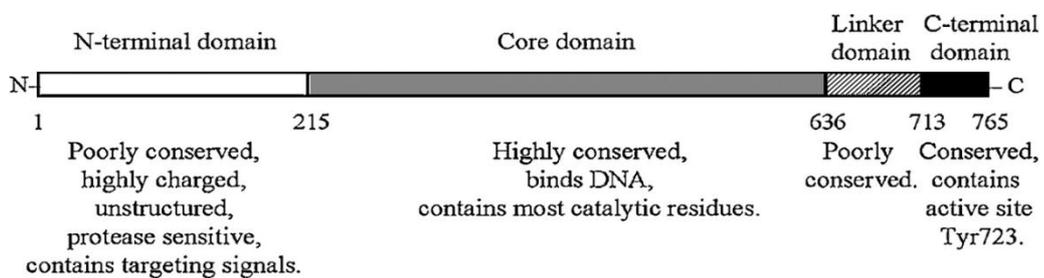


Figura 1.5. Domini della topoisomerasi I umana. La topoisomerasi I umana ha un dominio N-terminale (in bianco), un dominio core (in grigio), un linker (righe diagonali) e un dominio C-terminale (nero). Ogni dominio ha una lunghezza in amminoacidi e proprietà specifiche indicate in basso nella figura [3] (Figura da J J. Champoux . DNA topoisomerase: Structure, Function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369–413, 2001).

La specificità di substrato della TOP1 eucariotica è stata caratterizzata sia come sequenza nucleotidica sia a livello di struttura terziaria del DNA. Nel filamento da tagliare la sequenza preferita dall’enzima è 5’-(A/T)(G/C)(A/T)T-3’ con l’enzima covalentemente legato alla T in posizione -1. Nella struttura cristallizzata è possibile riconoscere solo un contatto specifico non covalente con la timina in posizione -1: il legame a idrogeno tra l’O-2 della base azotata e la Lys532.

Diversi studi hanno indicato che la TOP1 eucariotica lega preferenzialmente DNA superavvolto rispetto alla forma rilassata. L’uso di forme mutanti della proteina aventi una fenilalanina al posto della tirosina catalitica (Y723F) mostrano che l’enzima ha forti preferenze nel legare forme di DNA superavvolto [17].

1.4 MECCANISMO CATALITICO DELLA DNA TOPOISOMERASI IB UMANA

Il meccanismo catalitico mostra un attacco nucleofilo dell'ossigeno in posizione 4 della tirosina catalitica sul fosfato del filamento di DNA (fig. 1.6).

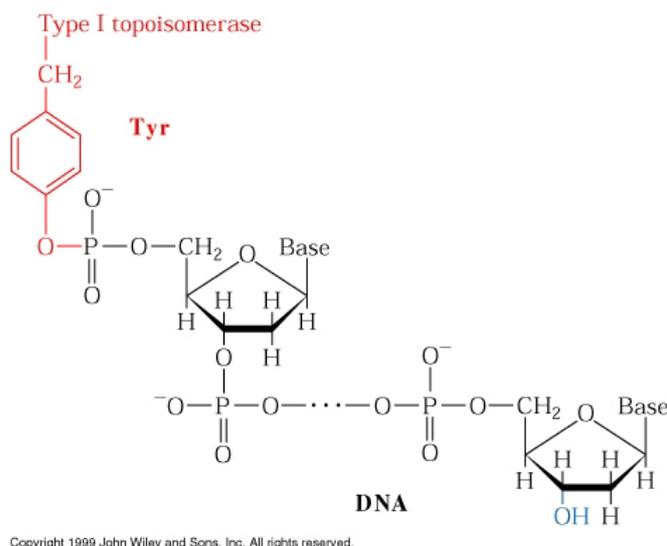


Fig. 1.6. intermedio DNA – enzima (in questo caso Topoisomerasi IB). In rosso è evidenziata la tirosina catalitica della topoisomerasi, in nero è riportato lo scheletro del DNA. (<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Topoisomerases/StructureIB.html>)

Questo genera un transiente legame fosfodiesterico tra la Tyr723 e il 3' fosfato [24]. Quando la reazione parte l'enzima è in modalità aperta, con il lobo superiore e la base catalitica divisi. Appena legato il DNA questi domini si chiudono a pinza intorno alla doppia elica. Quindi avviene l'attacco nucleofilo e l'enzima lega covalentemente un filamento del DNA, permettendo all'altra estremità libera di ruotare intorno al filamento non tagliato, rilassando così superavvolgimenti sia negativi che positivi (fig. 1.7).

Il linker delle TOP1 eucariotiche fornisce ulteriori interazioni tra la proteina e il DNA, aiutando a regolare l'equilibrio tra taglio e rilegazione e aggiungendo un altro livello di controllo sulla velocità di rotazione [8, 23]. La rilegazione necessita che il 5' libero del filamento tagliato del DNA si

riallineati con il filamento legato all'enzima. In normali condizioni l'intermedio DNA-enzima è transiente e la rilegazione è favorita.

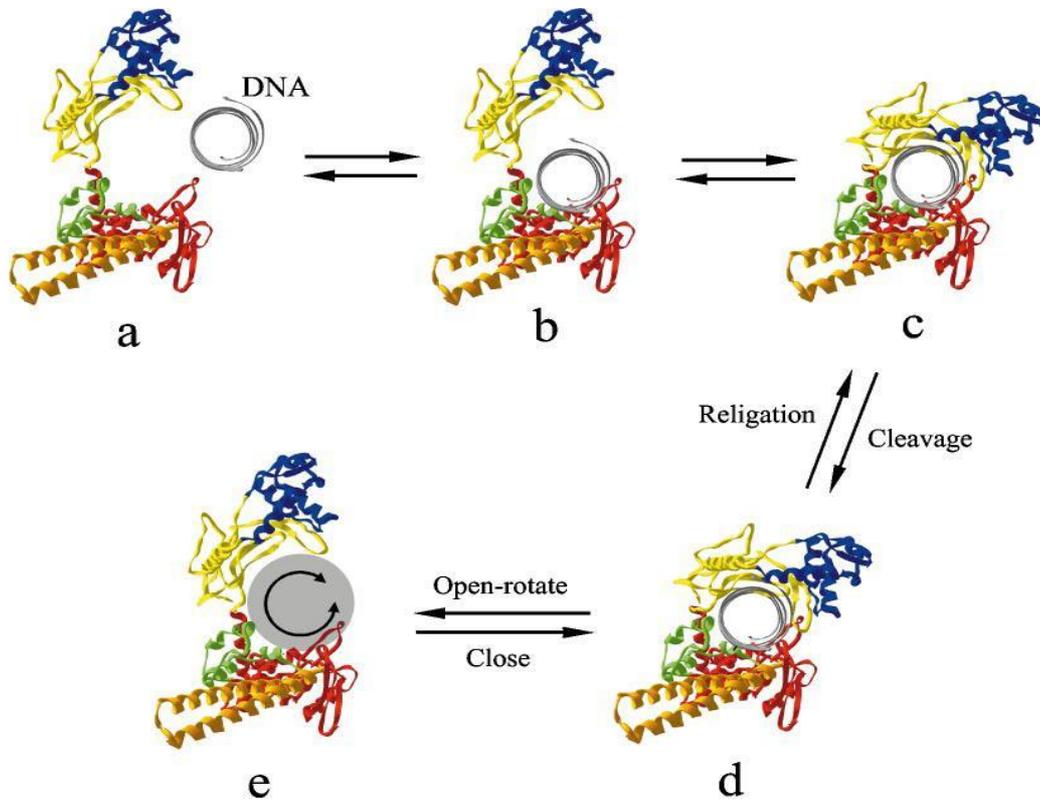


Figura 1.7. Meccanismo della DNA topoisomerasi I-B umana. A: l'enzima è in modalità aperta per legare il DNA. B: legame con il DNA. C e D: rottura del DNA e legame covalente con il filamento tagliato. E: rotazione dell'estremità libera del DNA, questo processo può avvenire diverse volte prima della rilegazione [3] (Figura da J J. Champoux . DNA topoisomerase: Structure, Function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369–413, 2001)..

1.5 TOP 1 E ESPRESSIONE GENICA

La topoisomerasi I di mammifero si trova soprattutto in regioni attivamente trascritte del genoma come stabilito dai siti di taglio studiati sul DNA [3, 14, 26] e analisi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) [27]. La localizzazione della TOP1 sulla cromatina nucleare è probabilmente guidata dal suo dominio N-terminale. Studi effettuati sul lievito *S. cerevisiae* indicano che né la TOP1 né la TOP2 sono essenziali per la trascrizione ad

opera della RNA Pol II [3, 14]. Comunque, vettori che portano geni attivamente trascritti sono stati ritrovati avere forti superavvolgimenti negativi una volta isolati da mutanti deleti sia per TOP1 che per TOP2, e leggermente superavvolti negativamente in mutanti deleti solo per TOP1 [28]. Quindi la principale funzione molecolare della TOP1 sembra essere il rilassamento dei superavvolgimenti del DNA trascrizione dipendenti.

È stato stabilito che i superavvolgimenti positivi e negativi sono generati rispettivamente davanti e dietro all'RNA polimerasi in elongazione se l'apparato trascrizionale non può ruotare intorno alla doppia elica del DNA (Fig. 1.3) [3, 14]. Questo modello di funzionamento è supportato da diversi studi [6], e porta a diverse conseguenze. Innanzitutto un alto grado di superavvolgimento del template potrebbe inibire l'avanzare della trascrizione, in particolar modo per le regioni più trascritte [29]. Come conseguenza la funzione della TOP1 potrebbe essere il rilassamento degli stress torsionali per permettere una normale frequenza di trascrizione.

È stato anche dimostrato che la TOP1 può attivare la trascrizione genica e legare fattori di trascrizione sul promotore [30, 31]. Il ruolo della TOP1 nell'iniziazione della trascrizione è stato esaminato in un sistema in vitro contenente RNAPII e altri fattori purificati [32]. La TOP1 è stata capace di sia di reprimere la trascrizione basale sia di attivare la trascrizione. L'attivazione è stata inizialmente osservata essere dipendente dai fattori TFIID e TFIIA. Esperimenti effettuati utilizzando una TOP1 wt e una catalicamente inattiva mostrano che entrambi i tipi di enzimi sono in grado di stimolare l'attivazione della trascrizione e la formazione di complessi TFIID-TFIIA-DNA. Questo può essere spiegato supponendo che la presenza della TOP1 sia necessaria per passare alla successiva fase di elongazione in previsione dell'accumulo di superavvolgimenti dovuti alla trascrizione [31]. È stato inoltre dimostrato che la TOP1 contatti Rpb1, la subunità maggiore del complesso dell'RNAPII [33].

Tutti questi risultati insieme suggeriscono che la TOP1 può aiutare la formazione di un complesso attivo TFIID-TFIIA sul promotore [32]. Inoltre i superavvolgimenti negativi a livello dei promotori aiutano l'inizio della trascrizione e la TOP1 può modulare la superelicità del DNA sulle regioni

trascritte, intervenendo così sull'iniziazione della trascrizione in cellule umane [34].

Le funzioni biologiche della TOP1 umana non sono state studiate fino in fondo, e questo è dovuto al fatto che mutanti deleti per TOP1 non sono vitali [35]. Sono stati però generate linee cellulari che esprimono stabilmente siRNA contro TOP1, riducendone i livelli del 60-70% (HCT siRNA-Top1) [36]. In tal modo è stata stabilita la natura pleiotropica di TOP1. Infatti essa svolge diversi ruoli nella stabilità genomica, nella trascrizione di determinati geni e nella risposta a numerosi agenti anti tumorali. In queste cellule la funzionalità della TOP1 è stata compensata dalla TOP2. Questo è stato dimostrato anche in mutanti di lievito deleti per TOP1 [14, 36]. Questo indica che la TOP1 può avere innumerevoli ruoli che esulano dal classico modello di taglio e rilegazione del DNA durante la trascrizione.

1.6 CAMPTOTECINA: INIBITORE SPECIFICO DELLA DNA TOPOISOMERASI IB

Oltre alle numerose attività cellulari, le DNA topoisomerasi eucariotiche rivestono una particolare importanza nella terapia farmacologia antitumorale, mentre le DNA girasi e la topoisomerasi IV procariotiche sono i principali bersagli di importanti farmaci antibatterici, quali i chinoloni [37, 38]. Numerosi veleni o inibitori delle DNA topoisomerasi, usati come farmaci, sono composti naturali, prodotti da piante o da microrganismi. Questi composti sono spesso altamente tossici per altri microrganismi, suggerendo che la loro funzione sia in relazione all'autodifesa della specie produttrice. Il fenomeno dell'avvelenamento delle DNA topoisomerasi si è dunque conservato nel corso dell'evoluzione, probabilmente perché è un efficace meccanismo di citotossicità.

Tra gli inibitori della Top1, la camptotecina (CPT) e analoghi, usati prevalentemente nella cura dei tumori solidi, sono inibitori specifici di questo enzima. La CPT, scoperta circa 30 anni fa, è un alcaloide estratto dall'albero *Camptotheca acuminata*, mentre l'identificazione di questa molecola come antitumorale è molto più recente. La camptotecina è un inibitore non-

competitivo della Top1 che agisce intercalandosi nel complesso covalente Top1-DNA in modo reversibile. Il meccanismo d'azione del farmaco e i suoi derivati si esplica stabilizzando tale complesso ternario e prevenendo la ricucitura del filamento di DNA rotto (Fig. 1.8).

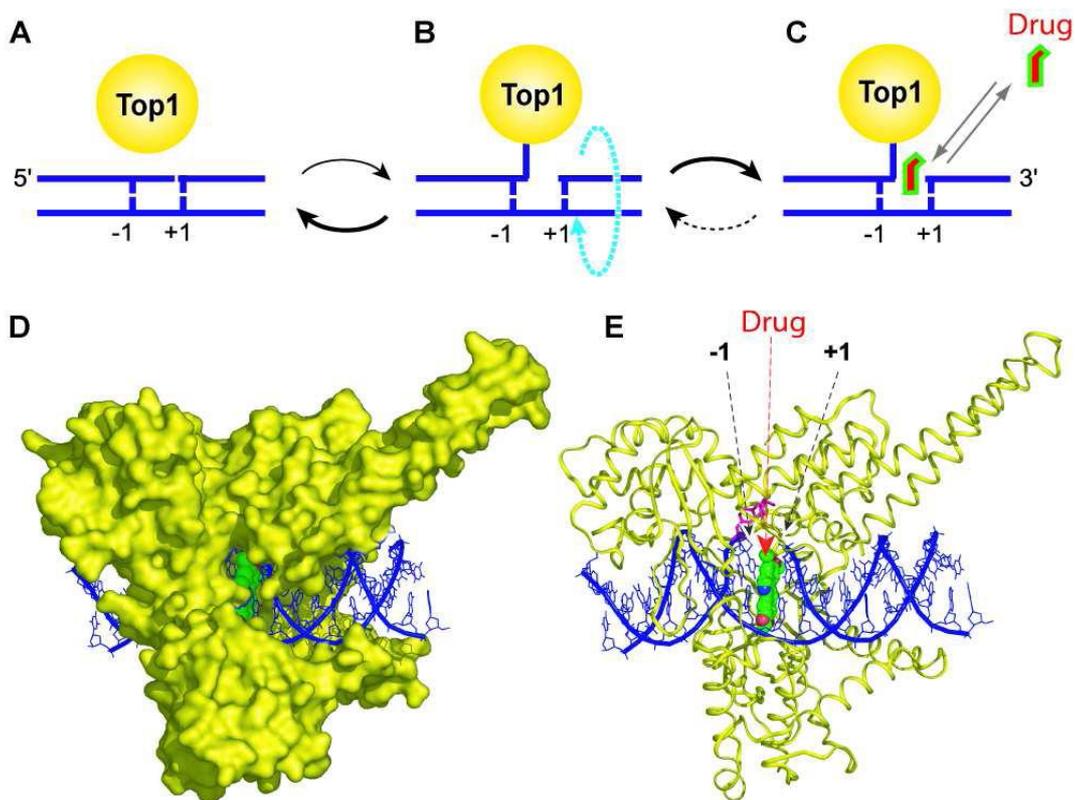


Figura 1.8. Meccanismo d'azione della CPT. La CPT (“drug” in verde) stabilizza il complesso covalente Top1-DNA. La Top1 è indicata in giallo e il DNA in blu. La CPT si inserisce nel taglio sul DNA tra le basi -1 e +1, rendendo difficile la rilegazione dei filamenti. (da Dexheimer & Pommier, Nature protocols, 3, 1736, 2008)

Dalla letteratura è noto che la camptotecina uccide selettivamente le cellule in fase S [39]. Quest'azione si ottiene attraverso un meccanismo che prevede la collisione tra forza replicativa che avanza lungo il DNA, e complesso ternario bloccato sullo stesso filamento (fig. 1.9A). Lo scontro si risolve nella creazione di una rottura a doppio filamento, nell'arresto della forza replicativa e nella formazione di un complesso covalente Top 1-DNA; inoltre, l'effetto della collisione si ripercuote sulla vitalità stessa della cellula che può morire o subire un arresto del ciclo in fase G2. Studi più precoci

hanno dimostrato che la CPT oltre a bloccare la sintesi del DNA inibisce anche quella dell'RNA [40]. Sperimentalmente è stato registrato un rapido arresto della trascrizione dopo esposizione delle cellule al farmaco [41], ed una redistribuzione del complesso d'elongazione (TEC) lungo il gene [42]. Questo suggerisce che il composto inibisce specificamente la fase d'elongazione. Il meccanismo molecolare che sta alla base di tale fenomeno, individuato grazie ad esperimenti *in vitro*, postula la formazione di un complesso ternario covalente sul filamento stampo dell'RNA polimerasi, che costituisce un blocco all'avanzamento dell'enzima e quindi alla trascrizione stessa [43]. La collisione tra TEC e complesso ternario reversibile genera un danno a singolo filamento [41] (fig. 1.9B). L'azione molecolare della CPT quindi risulta nell'aumento delle rotture del DNA nelle cellule esposte al composto. Il complesso covalente della Top 1 può esser visto come una forma di stress per la cellula che eventualmente, viene convertito da alcuni processi cellulari in un danno al DNA irreversibile [44].

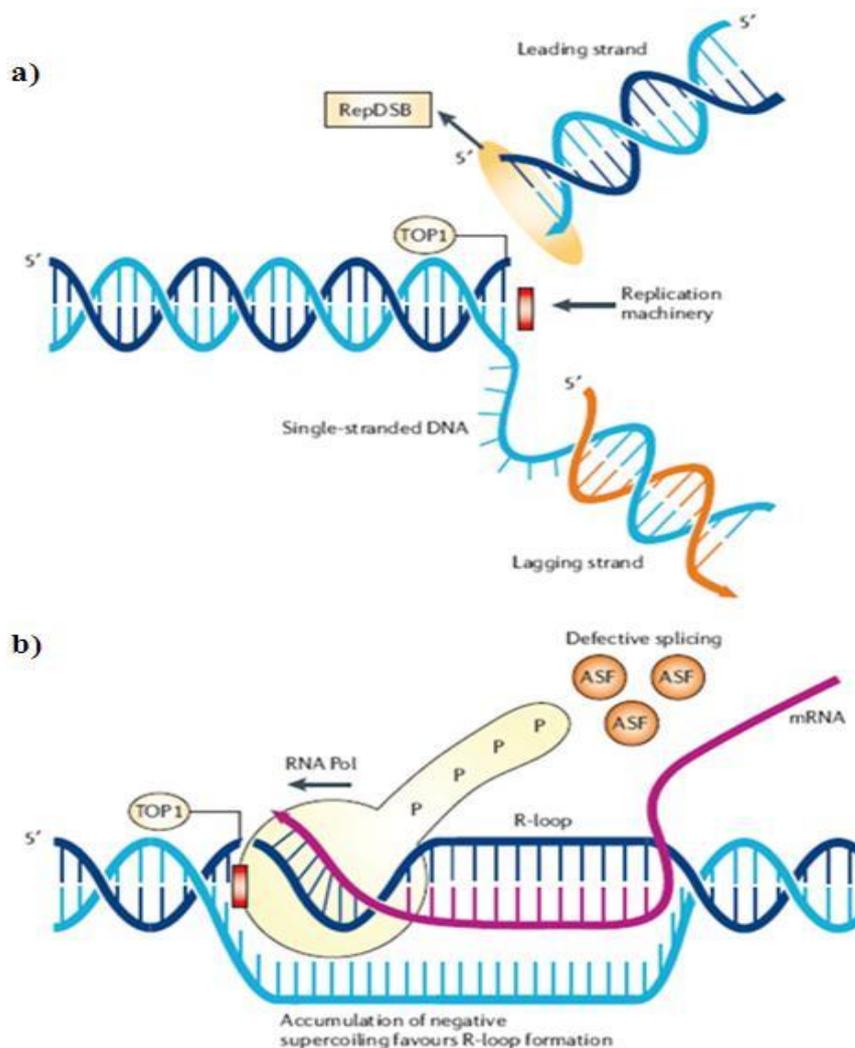


Figura 1.9. Modelli di collisione tra il complesso DNA-Top1-CPT e la forca replicativa (A) o un RNAPII in avanzamento (B) [26] (Pommier, Y., *Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond*. Nat. Rev. Cancer., (2006). **6(10)**: p. 789-802).

La CPT presenta una struttura planare aromatica a 4 anelli a cui si aggiunge un quinto (E) caratterizzato da un gruppo lattonico (fig. 1.10). L'anello lattonico terminale è instabile in soluzioni acquose: avviene una rapida idrolisi pH-dipendente che porta alla formazione di un gruppo carbossilico con l'anello aperto. L'anello lattonico aperto abolisce l'attività del composto di inibizione della DNA topoisomerasi IB. A pH acidi viene favorita la formazione della specie carbossilata, mentre a pH neutri viene mantenuto l'anello lattonico.

Numerosi studi di struttura-attività hanno stabilito le relazioni esistenti tra abilità di stabilizzare il complesso Top1-DNA e la loro capacità di

uccidere le cellule cancerose. È stato osservato che cellule di lievito in cui è stato rimosso l'unico gene (TOP1) codificante per la Top1 sono completamente resistenti all'azione della CPT. Inoltre, anche dati ottenuti in precedenza nel nostro laboratorio, da test citotossici, dimostrano che i ceppi che portano mutazioni del residuo attivo Tyr in Phe sono del tutto resistenti al farmaco [17]. Questi risultati hanno dimostrato in maniera convincente che la CPT è un inibitore altamente specifico della Top1.

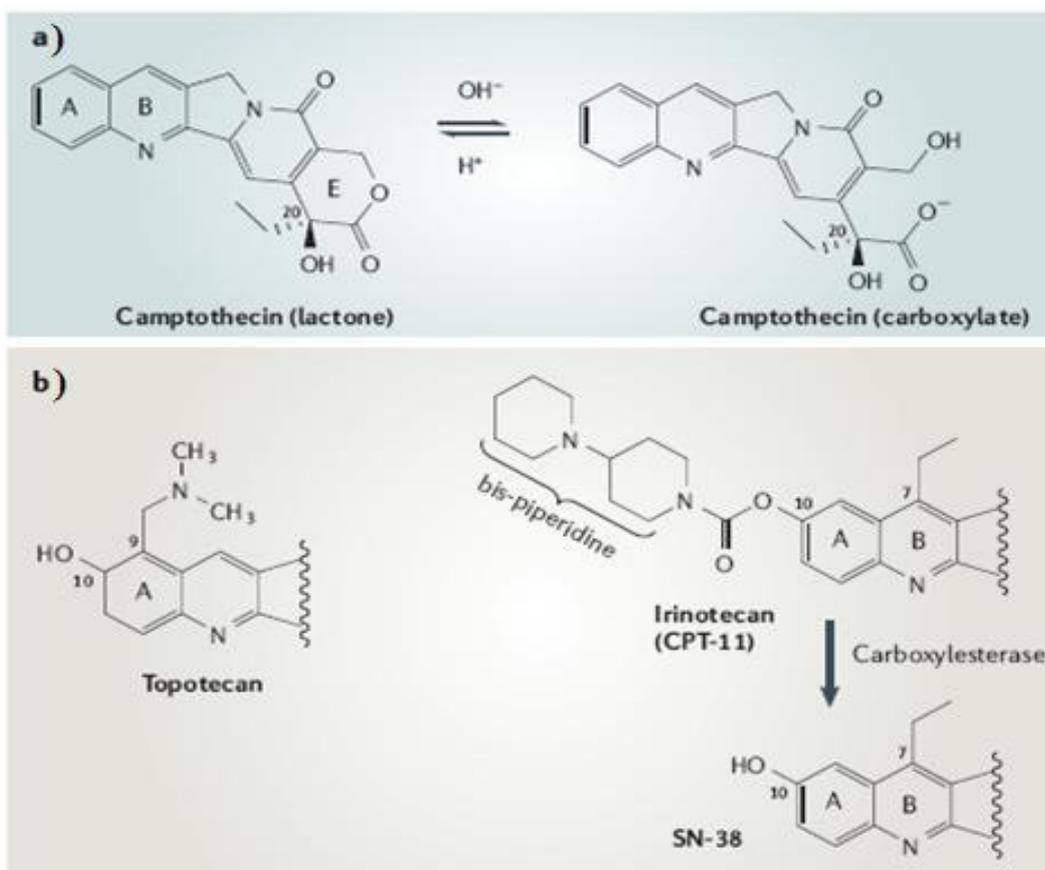


Figura 1.10. Struttura chimica della camptotecina e dei suoi derivati. A: La camptotecina è un alcaloide naturale che contiene un idrossilattone nell'anello E che la rende instabile a pH fisiologici. La figura mostra l'equilibrio tra la forma con il lattone attivo (in grado di inibire Top1) e il derivato carbossilato inattivo. B: Topotecano e Irinotecano, farmaci attualmente in uso per il trattamento di carcinomi umani [26] (Pommier, Y., *Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond*. Nat. Rev. Cancer., (2006). **6(10)**: p. 789-802).

Una peculiarità di tutti gli inibitori delle DNA topoisomerasi è che la loro azione è sequenza specifica [38, 45]. Esperimenti *in vitro* con le

topoisomerasi purificate evidenziano in modo particolarmente chiaro come farmaci appartenenti a classi chimiche diverse in genere stimolino le rotture del DNA in siti differenti, risultando in *patterns* di intensità di rotture farmaco-specifico [38]. Nella cromatina nucleare la situazione è però più complessa in quanto l'accessibilità del DNA alla topoisomerasi è fortemente limitata dalla presenza di altre proteine, soprattutto dei nucleosomi e dell'istone H1 [38, 46]. Quindi, nella cromatina di cellule in coltura la localizzazione delle rotture del DNA prodotte dall'enzima e stimulate dai farmaci è determinata da più fattori, inclusi il farmaco stesso e la struttura locale della cromatina.

Due sono i derivati della CPT maggiormente utilizzati nella pratica clinica: il topotecano (TPT) utilizzato come farmaco di seconda linea per il carcinoma a piccole cellule del polmone (SCLC) [47] o avanzato cancro alle ovaie refrattario o resistente alle terapie con platino; e l'irinotecano (CPT-11), farmaco di seconda linea per cancro del colon-retto (CRC) avanzato [48] (fig. 1.10)

Entrambi sono approvati dalla "U.S. Food and Drug Administration" (FDA) ed in grado di allungare le aspettative di vita in modo significativo rispetto alle migliori terapie di supporto da sole (BSC) [47, 48].

La CPT ha ulteriori effetti trascrizionale che sono state oggetto di studio nel nostro laboratorio. Non solo induce una conformazione cromatinica più aperta, ma l'inibizione della Top1 causa modificazioni post-traduzionali della RNA polimerasi II attraverso l'attivazione delle chinasi ciclina-dipendenti 7 e 9, regolando così la trascrizione in maniera specifica [49].

1.7 ELONGAZIONE DELLA RNA POLIMERASI II: RUOLO DEI SITI DI PAUSA TRASCRIZIONALI

La Top1 è coinvolta nei meccanismi di trascrizione dell'RNA, ove svolge il suo compito di rilassamento degli stress torsionali al DNA, e quindi effettua il suo ruolo in associazione e in concomitanza con i fattori adibiti all'inizio e alla fase di elongazione della trascrizione dell'RNA.

La produzione dell'RNA messaggero è garantita da un ciclo trascrizionale che consta di diverse fasi: pre-inizio, inizio, allontanamento dal promotore, elongazione e terminazione [50]. A ciò si affianca il ciclo di fosforilazione e defosforilazione del dominio carbossi-terminale (CTD) della RNA polimerasi II [33] (fig. 1.11). Il dominio carbossi-terminale della subunità maggiore dell'enzima, possiede ripetizioni multiple di un eptapeptide (YSPTSPS) che si ritrova pienamente conservato negli organismi eucariotici e che aumenta nel numero in relazione alla complessità genomica. Le serine nelle posizioni 2 e 5 (Ser-2 e Ser-5) sono il bersaglio di fosforilazioni e defosforilazioni [33] da parte di attività chinasiche contenute rispettivamente in P-TEFb (ciclina T-cdk9) e in TFIIF (ciclina H-cdk7), nonché delle fosfatasi Ssu72 e FCP1. I differenti stati di fosforilazione di Pol II si associano a momenti diversi della trascrizione genica [51]. Tali modificazioni hanno probabilmente lo scopo di rendere il CTD competente per il reclutamento di appropriati fattori del capping, dell'elongazione o della terminazione sul sito di trascrizione.

Durante la trascrizione, la RNA polimerasi non viaggia lungo il DNA stampo a velocità uniforme. Al contrario, l'inizio della fase di elongazione si caratterizza per una speciale modalità di regolazione che prevede l'accumulo della Pol II su siti prossimi ai promotori; questo fenomeno denominato anche "pausing trascrizionale" è stato dimostrato in numerosi geni cellulari e virali come *hps70* e *hps26* di *Drosophila*, *c-myc*, *c-fos*, *c-myb*, *HIF-1 α* e *DHFR* di cellule di mammifero [52, 53]. Il pausing trascrizionale è un evento reversibile, che ha probabilmente la funzione di assicurare una corretta maturazione del pre-mRNA e di regolazione trascrizionale. Infatti, si ritiene generalmente che l'allontanamento dell'enzima dalle regioni di pausa rappresenti un passaggio limitante per la trascrizione, esso è pertanto regolato da numerosi fattori che intervengono per sfruttare o alleviare il blocco della Pol II.

Alcuni fattori proteici globalmente definiti N-TEFs (*negative elongation factors*) giocano ruoli importanti nella regolazione negativa dell'elongazione [54], in maniera speculare i P-TEFs (*positive elongation factors*) prevengono l'arresto o ripristinano l'elongazione della Pol II quando questa è in uno stato di pausa [55]. Un contributo particolare in tal senso è

fornito da P-TEFb che grazie alla sua attività chinastica conferisce processività al complesso d'elongazione, promuovendo l'uscita dal pausing e contrastando l'effetto negativo del complesso DSIF/NELF [56]. NELF, vero promotore del pausing trascrizionale, è un complesso multiproteico che diventa funzionalmente attivo solo in presenza di DSIF [57] (fig. 1.11).

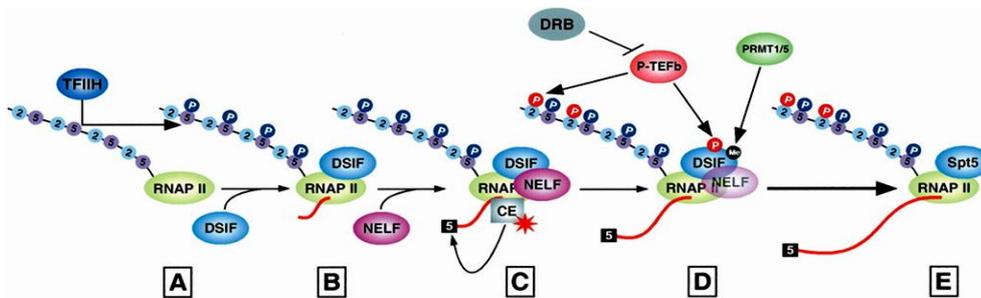


Fig. 1.11. Regolazione dei siti di pausa prossimi ai promotori. [50] (Figura da Sims et al. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, 18:2437-2468, 2004).

Sulla base di evidenze sperimentali, la regolazione dell'elongazione tramite il pausing prevede che DSIF contatti la Pol II elongante nelle primissime fasi del processo; NELF riconosce e lega il complesso DSIF-Pol II favorendo un blocco dell'elongazione all'altezza del sito di pausa. L'arresto di Pol II avviene generalmente a circa 20-50 bp dal punto d'inizio della trascrizione [58] ed è mantenuto grazie all'azione relativamente prolungata di DSIF/NELF che in questo modo facilitano la maturazione del messaggero. Il CTD di Pol II insieme alla subunità Spt5 di DSIF, costituisce un segnale di richiamo per gli enzimi del capping e dello splicing che vengono quindi reclutati sul DNA per modificare correttamente il trascritto. L'attività chinastica di P-TEFb stimola probabilmente il rilascio di NELF e la ripresa dell'elongazione (fig. 1.11).

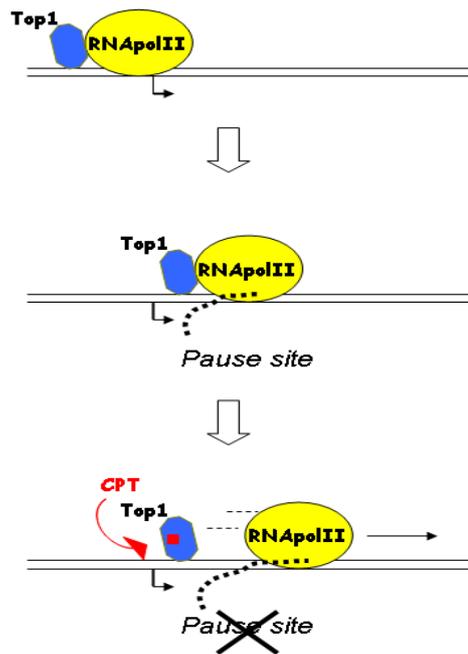


Fig. 1.12. Modello proposto per il controllo dei siti di pausa trascrizionale da parte della Top1. [34] (figura da Capranico et al 2007).

Studi recenti [27] hanno indotto a ipotizzare che la Top1 giochi un ruolo nella regolazione del pausing trascrizionale dell'RNA Pol II a livello delle regioni promotrici. È stato infatti osservato che il trattamento con CPT causi una riduzione dei livelli di Pol II nei pressi dei siti di pausa adiacenti al promotore e un aumento transitorio dei livelli di Pol II nelle regioni interne ai geni analizzati (fig. 1.12). L'uscita dal pausing trascrizionale causata da trattamenti con CPT è risultata essere CDK7-9 dipendente [59]. E' stato anche dimostrato che la redistribuzione della Pol II lungo i geni non è dipendente da una risposta cellulare attivata in seguito a danni al DNA causati alla forza replicativa e non sono osservabili con α -amanitina, un inibitore specifico della RNA polimerasi II [27]. L'accumulo della RNA polimerasi II nelle regioni prossimali al promotore è quindi regolato anche dall'attività della topoisomerasi I (fig. 1.12). Quando la Top1 viene inibita dalla CPT, la RNA polimerasi II inizia la fase di elongazione e quindi si distribuisce lungo il gene [27].

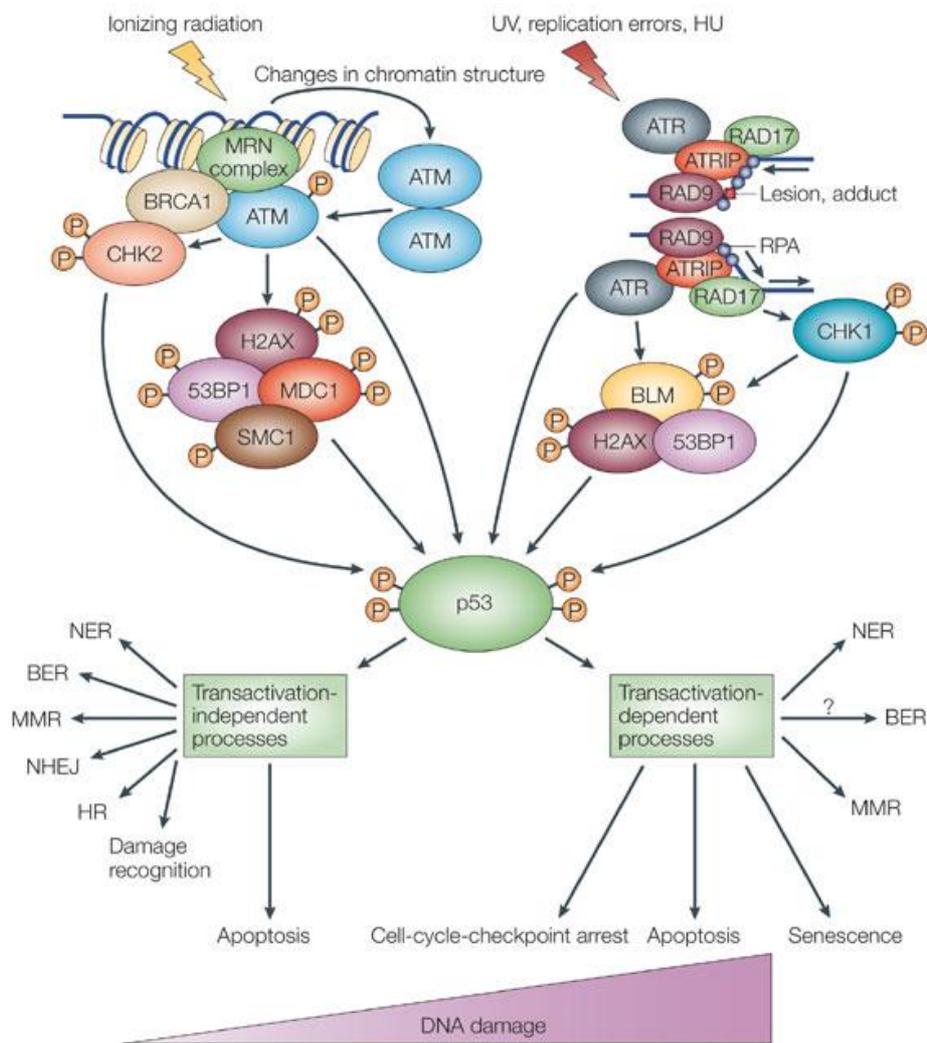
1.8 PATHWAYS CELLULARI ATTIVATI IN RISPOSTA AL DANNO AL DNA

Come già accennato in precedenza, l'azione citotossica del complesso ternario Top1 - CPT - DNA, è dovuta alla formazione di rotture alla forca replicativa del DNA che vengono individuate da appositi complessi proteici che innescano una serie di *pathways* molecolari specifici [60, 61].

La risposta cellulare allo stress genotossico è un processo molto complesso e generalmente comincia con il “*sensing*” del danno al DNA, seguito da una serie di eventi che include la trasduzione del segnale e l'attivazione di fattori di trascrizione che agiscono su specifici bersagli genici [62]. Tali geni sono coinvolti in diverse funzioni cellulari come la riparazione del danno al DNA, l'arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare programmata (fig. 1.13).

Tra gli agenti che causano danno al DNA ricordiamo anche agenti fisici come i raggi ultravioletti (UV), le radiazioni ionizzanti (IR), e agenti chimici che possono indurre la formazione di “*double strand breaks*”.

Membri appartenenti alla superfamiglia delle fosfatidilinositol-3 chinasi (PI-3), che sono attivati nelle prime fasi di risposta al danno al DNA, possono servire anche da sensori; nell'uomo questi includono le proteine ATR ed ATM. ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) è una proteina di 3056 amminoacidi, mentre ATR (*ATM and RAD3-related*), è costituita da 2644 amminoacidi ed entrambe possiedono un dominio catalitico C-terminale. Sebbene non sia del tutto chiaro come le due chinasi rilevino esattamente il danno sul DNA, è noto che entrambe possano essere attivate dal danno stesso. Sperimentalmente è stato dimostrato che ATM risponde a “*double strand breaks*” indotti da radiazioni ionizzanti (IR), mentre ATR reagisce agli UV o alle forche replicative interrotte [62, 63] (fig. 1.13).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Fig. 1.13. Pathways cellulari attivati dal danno al DNA (da www.nature.com, ATR/ATM pathways).

Dati sperimentali supportano l'ipotesi per cui ATM ed ATR leghino direttamente il DNA ed interagiscono allo stesso tempo con numerose proteine co-localizzate sul sito del danno [62]. Tra queste ricordiamo BRCA1 un enorme complesso proteico associato al genoma coinvolto nel riconoscimento e riparazione di strutture aberranti del DNA. Tutto ciò supporta il modello secondo il quale diversi ed indipendenti complessi multiproteici localizzati sul sito di danno al DNA, interagiscono allo scopo di attivare la cascata fosforilativa per la trasduzione del segnale danno-dipendente.

La forma fosforilata della variante istonica H2AX (γ -H2AX) è una delle prime proteine che compaiono in prossimità dei siti di doppia rottura, ed è quindi ritenuta un precoce segnale della presenza di un danno al DNA [64]. Sull'istone H2AX è stato identificato il motivo riconosciuto da fosfatidilinositolo 3-chinasi (SQ) sulla serina 139, bersaglio di entrambe le chinasi ATR ed ATM. Questo viene fosforilato in risposta ad agenti genotossici, UV, radiazioni ionizzanti ed alla frammentazione del DNA che incorre durante il processo apoptotico.

La fosforilazione di H2AX da parte di ATM facilita la formazione di foci sui quali vengono reclutati mediatori dei “*checkpoints*” del danno al DNA, come MDC1 e BRCA1 (fig. 1.13). L'assemblaggio di questi fattori in prossimità delle doppie rotture coincide con l'attivazione dei “*checkpoints*” ed il reclutamento di fattori di riparazione. Ciò indica che l'istone H2AX è necessario per la stabilità genomica e l'efficienza di riparazione del DNA. Comunque l'esatta natura dei segnali molecolari che attivano questi “*checkpoints*” cellulari rimane ancora da determinare.

Tra i bersagli molecolari delle chinasi ATR ed ATM inoltre è possibile annoverare le proteine MAPKs, p53, CHK1 e CHK2, quest'ultime necessarie per indurre l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S. p53, anche conosciuta come proteina tumorale 53 (TP53), è un fattore di trascrizione del peso di 53 kDa che regola il ciclo cellulare, noto soprattutto per la sua funzione di soppressore tumorale [65, 66]. p53 esplica la sua funzione antitumorale attraverso il blocco del ciclo cellulare in G1/S e attivazione dei meccanismi per il riparo del danno sul DNA. Può dare inizio all'apoptosi, la morte cellulare programmata, nel caso in cui il danno al DNA sia irreparabile.

Nelle cellule normali p53 è solitamente inattiva, legata alla proteina MDM2 che la inibisce e ne promuove la degradazione agendo come un'ubiquitin-ligasi. L'attivazione di p53 è indotta da diversi agenti cancerogeni che provocano danni al DNA. Tali danni vengono rilevati durante particolari “tappe di controllo” del ciclo cellulare che inducono varie proteine (come ATM, Chk1 e Chk2) a fosforilare siti della p53 vicini o all'interno della regione che lega MDM2 inibendone così il legame. La serina 15 ad esempio, è un noto bersaglio di fosforilazione da parte di ATM. ATR ed ATM sono implicate nell'attivazione di ulteriori ed importanti chinasi

rispettivamente CHK1 e CHK2 [67]. L'attivazione di CHK1 in risposta al danno da UV coinvolge la chinasi ATR. Studi in vitro hanno evidenziato che ATR fosforila CHK1 sulle serine 317 e 345; la proteina sembra essere anche il bersaglio di ATM che si attiva invece in risposta al danno da radiazioni ionizzanti. CHK1 ha la funzione di inibire la fosfatasi cdc25 che controlla la fosforilazione del complesso Cdc2/ciclina B, un critico regolatore della transizione G2/M. In cellule di mammifero CHK1 controlla anche la progressione alla fase S, tramite la fosforilazione di Cdc25A che ne induce la degradazione. CHK2 viene fosforilata ed attivata dalla chinasi ATM sul residuo amminoacidico treonina 68; una volta attiva, agisce da chinasi fosforilando numerosi substrati quali Cdc25, BRCA1, p53, E2F ed altre proteine importanti nel controllo dei "checkpoints" del ciclo cellulare, nella riparazione del danno e nell'apoptosi [68]. CHK2 induce l'arresto in fase G2/M tramite l'inibizione della fosfatasi Cdc25c e il blocco del complesso Cdc2/ciclina B che stimola l'entrata in mitosi.

1.9 EFFETTO DELLA CAFFEINA E DELL'AFIDICOLINA SULLA RISPOSTA CELLULARE AL DANNO AL DNA PROVOCATO DA CPT

Per poter determinare se gli effetti della CPT dipendano da un'interazione diretta della Top1 o dalle risposte cellulari in seguito al danneggiamento del DNA, è necessario bloccare i *pathways* cellulari che intervengono in seguito a stress genotossici.

Afidicolina (APH) e caffeina (Caff) sono inibitori specifici della subunità α della DNA Polimerasi e delle chinasi ATM/ATR, rispettivamente [69]. L'afidicolina previene la formazione di rotture doppie del DNA poiché blocca la DNA polimerasi che quindi non può collidere con eventuali Top1 bloccate sul DNA.

La caffeina blocca il complesso ATM/ATR e quindi la cascata fosforilativa attivata dal complesso stesso in seguito al danno del DNA (fig. 1.14).

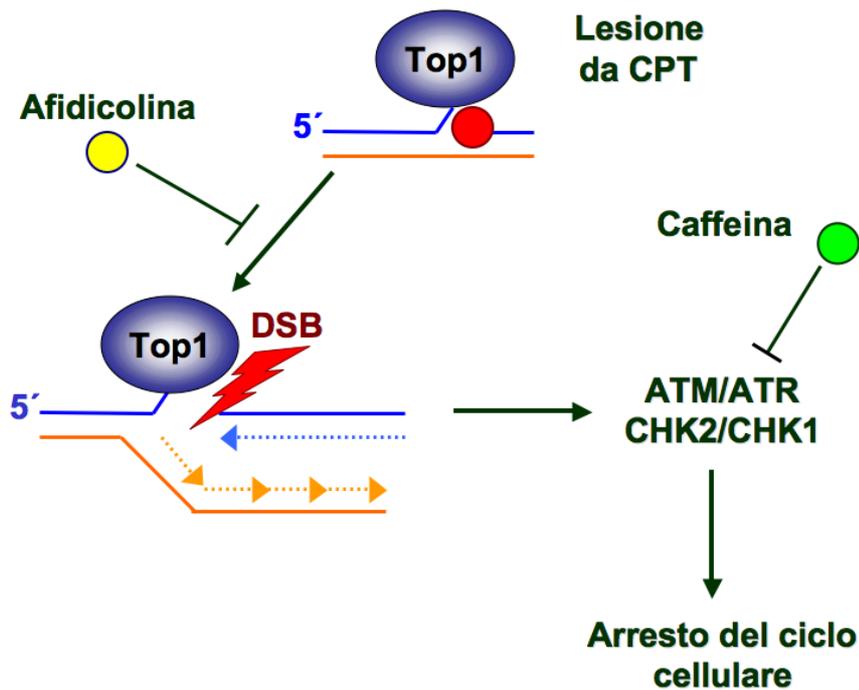


Fig. 1.14. Effetti dell'afidicolina (APH) e della Caffeina sul danno al DNA causato da CPT e nella risposta cellulare al danno stesso.

E' ben noto, ed è stato verificato anche nel nostro laboratorio, che il co-trattamento di cellule con afidicolina [27] o caffeina con la CPT impedisce, rispettivamente, la formazione di rotture doppie del DNA e l'attivazione dei "checkpoints" in risposta al danno del DNA, indotte dalla CPT [59].

1.10 EFFETTI SPECIFICI DELLA CPT SULL'ESPRESSIONE DI HIF-1 α , UN FATTORE DI TRASCRIZIONE CORRELATO ALLA TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA

Rapisarda *et al.* [70] hanno dimostrato che il TPT, inibitore della topoisomerasi 1, inibisce l'accumulo della proteina HIF-1 α in cellule U251 (linea cellulare di glioma) in maniera dose e tempo-dipendente (fig. 1.15).

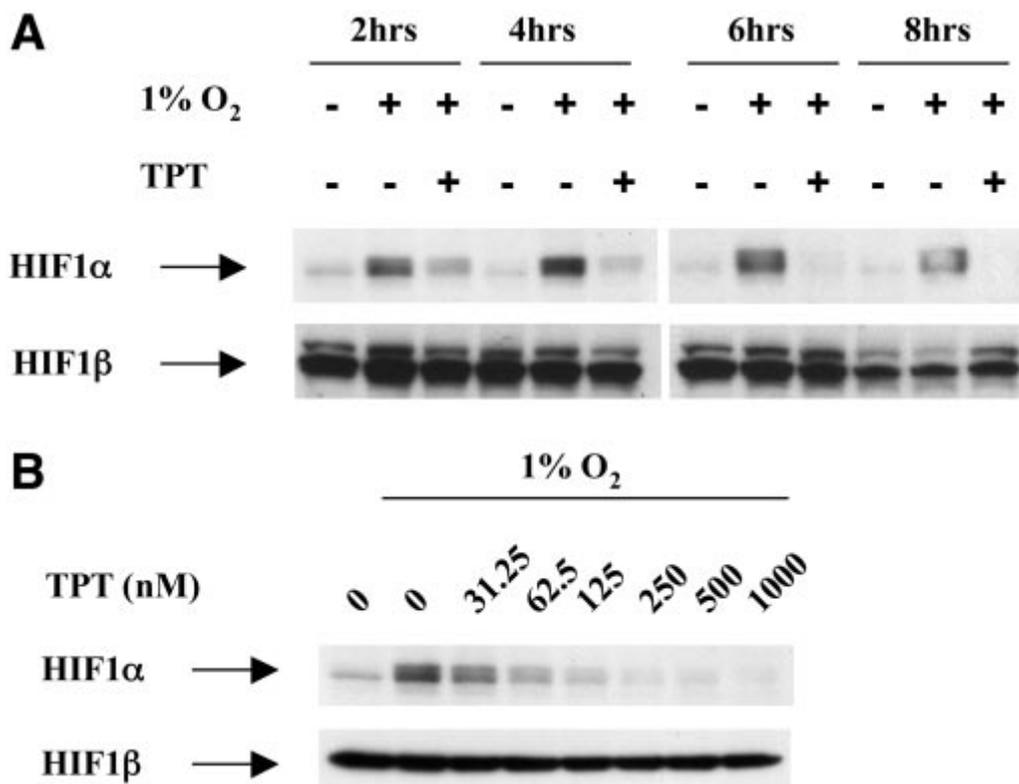


Fig. 1.15 Il topotecano diminuisce i livelli di proteina di HIF-1 α in condizioni ipossiche. A: la linea cellulare U251 è stata trattata con TPT (0,5 μ M) per i tempi indicati in condizioni normossiche (21% O₂) o ipossiche (1% O₂). B: Le cellule U251 sono state trattate per 8 ore in condizioni normossiche (21% O₂) o ipossiche (1% O₂) con TPT alle concentrazioni indicate. (da Rapisarda et al, 2004 [71])

Il farmaco non abbassa invece i livelli dell'mRNA di HIF-1 α (fig. 1.16A), mentre diminuisce i livelli di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), la cui trascrizione è controllata appunto dalla presenza del fattore HIF-1 α (fig. 1.16B). L'effetto è indipendente dalla degradazione proteasomiale e il farmaco non altera l'emivita della proteina (Fig. 1.16C) [70]. In più è stato osservato che glioblastomi da trapianti xenografici trattati con il TPT accrescono in maniera inferiore rispetto a controlli non trattati, associando il farmaco ad una netta inibizione della neo-angiogenesi, uno dei processi regolati da HIF-1 α [70].

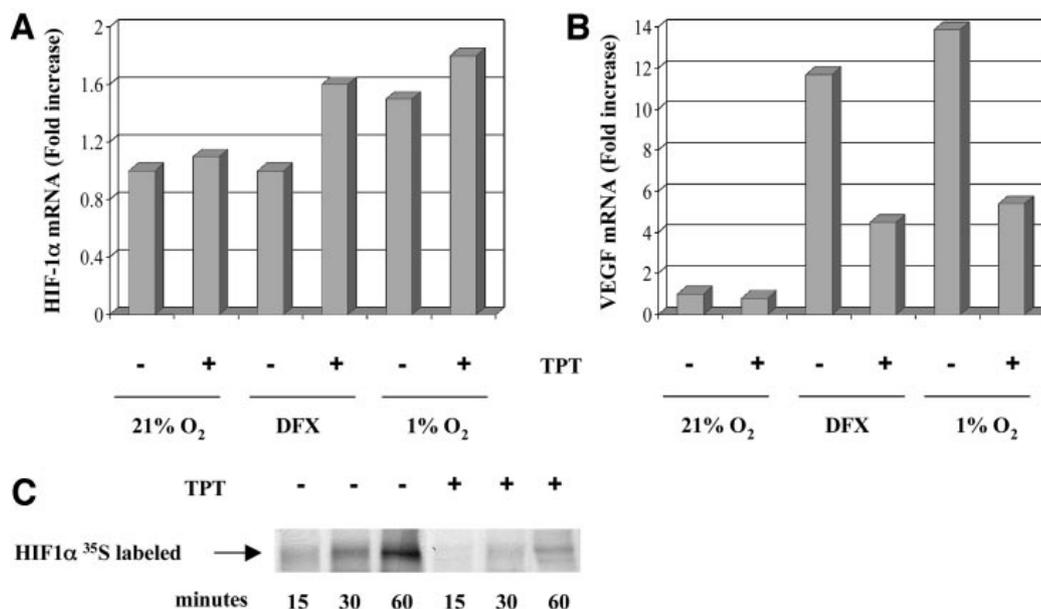


Figura 1.16 – Il topotecano (TPT) non inibisce l’accumulo del trascritto di HIF-1 α , ma inibisce la traduzione della proteina. A e B: Cellule U251 sono state trattate per 24 ore in normossia (21% O₂), con l’ipossi-mimetico DFX (100 μ M) o ipossia (1% O₂), sia in presenza che in assenza di topotecano (TPT). Di HIF-1 α (A) e VEGF (B) sono stati determinate le quantità relative dei trascritti, normalizzate sul trattamento in normossia. C: Cellule della linea U251 sono state trattate per 2 ore in normossia in presenza o assenza di TPT (500 nM) in terreno completo, poi per 2 ore in terreno privo di metionina e cisteina. Dopodiché sono state aggiunte metionina e cisteina marcate con ³⁵S. Estratti proteici sono stati raccolti dopo i tempi indicati, e la proteina Hif-1 α è stata immunoprecipitata. (da Rapisarda et al, 2004 [71])

1.11 HIF-1 α : FATTORE DI ADATTAMENTO CELLULARE A CONDIZIONI IPOSSICHE, IMPLICATO NELLA CRESCITA TUMORALE

HIF-1 (Hypoxia Inducibile Factor 1) è un regolatore trascrizionale generale della risposta all’ipossia in diversi organismi che promuove l’espressione di geni coinvolti in una varietà di processi, come l’angiogenesi (tra cui VEGF), l’eritropoiesi, il metabolismo, la sopravvivenza cellulare e la resistenza ai farmaci [72, 73].

La regolazione del fattore eterodimerico HIF-1 è ben conosciuta a livello proteico: mentre la subunità beta (HIF-1 β o ARNT) è espressa

costitutamente, HIF-1 α è soggetto ad una stretta regolazione in base alla concentrazione di ossigeno intracellulare (fig. 1.17).

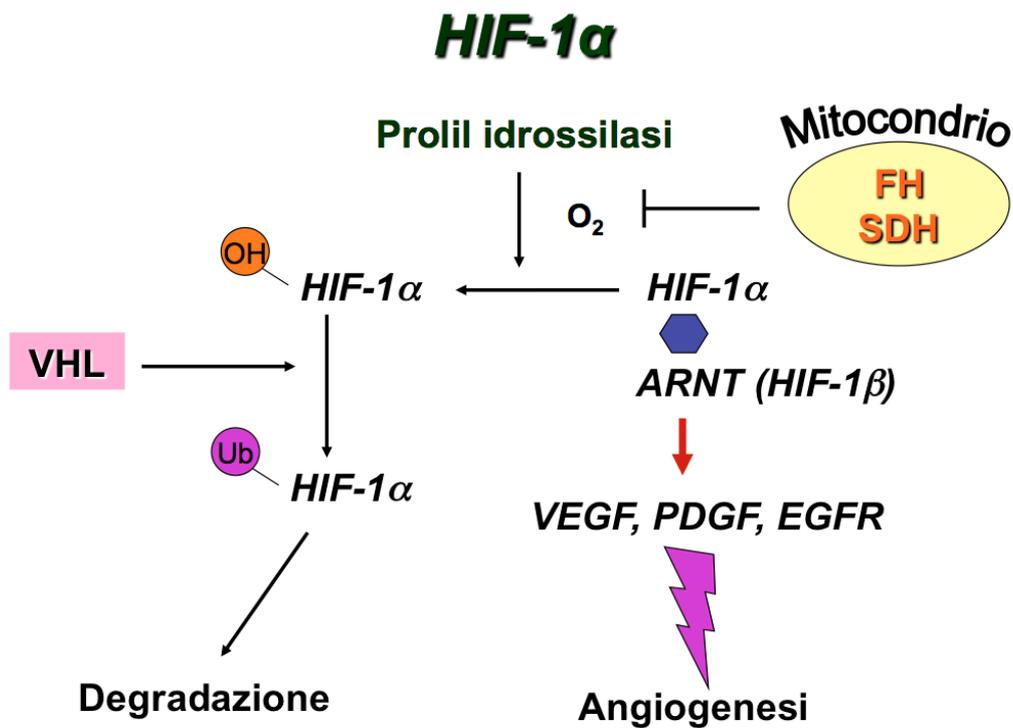


Figura 1.17. Regolazione dei livelli intracellulari del fattore HIF-1 α e ruolo di HIF-1 α nell'attivazione di fattori angiogenici.

HIF-1 α è un fattore codificato dal gene HIF-1 α che mappa sul cromosoma 14q21-q24 umano. La struttura genica di HIF-1 α è stata determinata [74] e codifica per due domini di particolare rilevanza (fig. 1.18): l'estremità ammino-terminale di HIF-1 α consiste in un dominio *basic helix-loop-helix* (bHLH) e un dominio PAS necessario per l'eterodimerizzazione con HIF-1 β ed il legame al DNA.

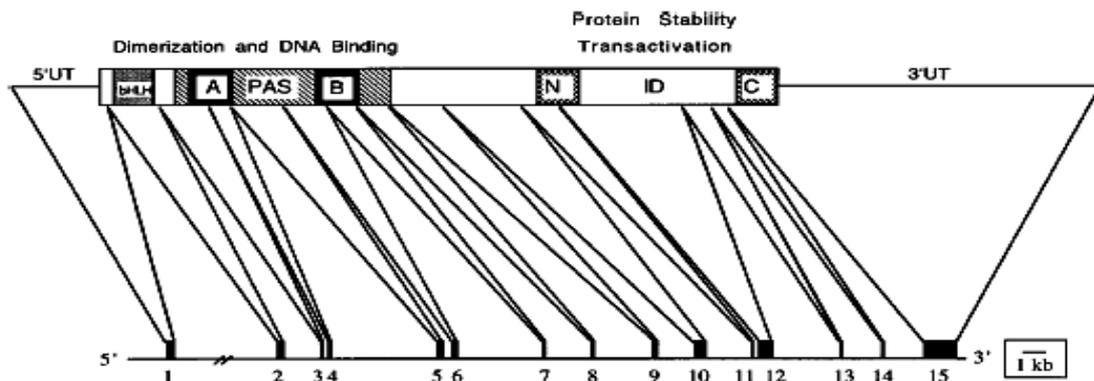


Fig. 1.18: Struttura del fattore HIF-1 α e relativo trascritto [74] (da Narayan V. Iyer, 1998).

In normossia, HIF-1 α può essere idrossilato su residui di prolina, presenti sul C-terminale, da tre prolin idrossilasi (PHD 1-3) in una reazione ossigeno-dipendente. Questa modificazione rende HIF-1 α bersaglio dell'E3 ubiquitin-ligasi VHL (Von Hippel-Lindau), indirizzando la proteina alla degradazione proteasomiale. In condizioni ipossiche, invece, HIF-1 α lega la subunità β e trasloca nel nucleo, dove l'eterodimero lega le sequenze HRE (Hypoxia Responsive Element), e, unito a p300/CPB, stimola la trascrizione dei geni bersaglio [75].

I geni controllati da HRE sono coinvolti in meccanismi importanti come l'angiogenesi, la resistenza a farmaci e la sopravvivenza cellulare. Non sorprende dunque che HIF-1 α venga associata in diversi lavori scientifici allo sviluppo, la malignità e la resistenza ad agenti antitumorali. La sovra espressione di HIF-1 α , ad esempio, è un marcatore prognostico per il cancro del seno ed altri tumori solidi [76, 77] ed è correlata alla resistenza tumorale verso chemio- e radio-terapia [78, 79]. Inoltre HIF-1 α sembra essere necessario per il mantenimento delle cellule staminali tumorali in alcune malattie ematologiche [80] e cruciale nella tumorigenesi in cellule staminali [81].

Molti oncogeni e oncosoppressori che hanno un ruolo diretto o indiretto nell'angiogenesi vengono regolati o regolano essi stessi il fattore di trascrizione HIF-1 (fig. 1.19). La comprensione dell'angiogenesi tumorale, flusso sanguigno, ossigenazione e problemi coinvolti nel rapporto tumore-ospite, diventa essenziale per studi sul cancro o sulla progettazione di forme più efficaci di terapia contro il cancro.

Si intuisce quindi che HIF-1 α è un bersaglio farmacologico molto interessante, ma in commercio non esistono ancora farmaci che riescano a bersagliare la proteina direttamente ed in maniera specifica [77].

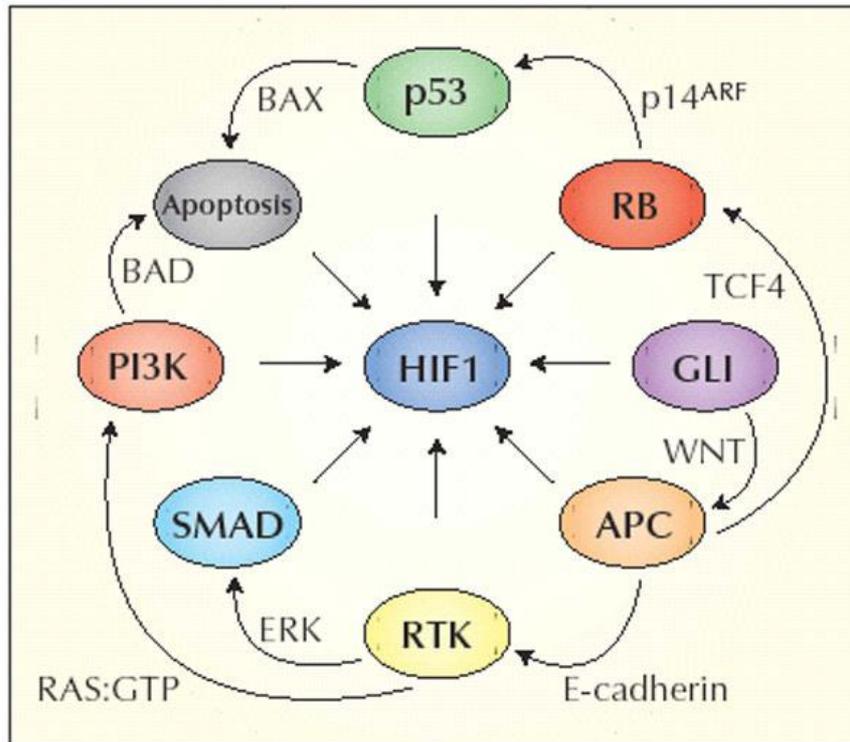


Figura 1.19. Geni correlati al cancro e i pathways che controllano. (da Vogelstein et al (2004) [82])

1.12 ncRNA, DANNO AL DNA E IPOSSIA

Oltre i nostri studi precedenti, altri laboratori hanno di recente riportato che alcuni RNA non codificanti (ncRNA) vengono trascritti in seguito a stress cellulari o danno del DNA in cellule eucariotiche [83]. L'inibizione delle deacetilasi istoniche in *S. pombe.*, che porta ad una conformazione aperta della cromatina nelle regioni codificanti, de-reprime la trascrizione di RNA antisenso [84]. Sempre in *S. pombe* è stato dimostrato che la trascrizione antisenso può essere regolata in risposta al danno al DNA [85]. Presi insieme questi studi suggeriscono un possibile ruolo dei ncRNA nella risposta cellulare al danno al DNA o a stress ambientali. Ad ogni modo rimane da

definire come i ncRNA possono contribuire alla risposta cellulare agli stress genotossici.

I miRNA, la classe più studiata tra i ncRNA, sono coinvolti in una larga gamma di processi fisiologici, e un quadro alterato del “miRnoma” cellulare è stato correlato a diverse patologie e forme di tumori [86, 87]. Negli ultimi anni sono stati identificati anche diversi miRNA indotti dall’ipossia, o anche più specificamente da HIF-1 α stesso, e viceversa sono stati trovati altri miR che bersagliano l’ mRNA di questo gene, VEGF e VHL [88-96].

Recentemente sono emersi anche miR coinvolti nella risposta al danno del DNA. In più p53, p63 e p73 stessi controllano il macchinario che processa i miRNA (in particolare Drosha, DGCR8, Dicer, TARBP2, esportina-5), sia tramite elementi responsivi nei promotori delle singole componenti, sia tramite l’incrementata espressione di miR che le bersagliano [87, 97-99].

È inoltre noto un lncRNA antisenso rispetto alla regione in 3’ del locus genico di HIF-1 α [100]. Questo antisenso è stato nominato aHIF e viene attivamente trascritto in seguito a prolungati periodi di ipossia. Sebbene non sia ancora stato trovato un meccanismo molecolare per questo trascritto, è stato dimostrato che, in seguito alla sua attivazione, si riscontra una diminuzione dei livelli del fattore HIF-1 α insieme con una diminuzione di circa 10 volte nell’emivita dell’ mRNA di HIF-1 α . Inoltre ad una diminuzione dei livelli di proteina della subunità 1 α si associa un incremento dei livelli della subunità 2 α , che compete per la dimerizzazione con il fattore HIF-1 β . Questi risultati insieme fanno ipotizzare un possibile ruolo di questo antisenso nell’inibizione del fattore HIF-1 α per favorire HIF-2 α , e stimolare così l’attivazione di un set di geni differente implicato nella risposta cellulare a prolungati periodi di ipossia [100].

1.13 COMPLESSITÀ DEL TRASCRITTOMA E RNA NON-CODING

Studi recenti hanno rivelato una complessità inaspettata della trascrizione negli eucarioti [101]. Il trascrittoma rappresenta tutto l’insieme

degli RNA espressi in una cellula in un determinato tempo e per una determinata tipologia cellulare. A differenza del genoma, che rimane uguale nel tempo (eccetto mutazioni), il trascrittoma varia largamente a seconda delle condizioni ambientali o dello stadio di sviluppo in cui si trova la cellula. Esso comprende mRNA, tRNA, rRNA e RNA non-codificanti (ncRNA). Lo studio dei trascrittomi si pone pertanto come obiettivo la determinazione dei livelli di espressione degli mRNA in una data popolazione cellulare. Tuttavia gli mRNA codificanti rappresentano solo l'1% circa del genoma, mentre gli RNA non codificanti sono molto più abbondanti ed espressi a livelli largamente variabili. La funzione di questi trascritti è in gran parte sconosciuta e sono necessari studi approfonditi per determinarla [102-104].

I ncRNA si dividono in diverse famiglie: ad esempio gli rRNA formano ribonucleoproteine (RNP), le più importanti delle quali costituiscono i ribosomi. Alcuni ncRNA formano lo spliceosoma, composto da una RNP chiamata snRNP. Gli snoRNA, trascritti localizzati nel nucleolo, hanno anch'essi un ruolo nello splicing alternativo, ma sono anche parte di snoRNP e RNasi che hanno una funzione nella maturazione degli rRNA, dei tRNA e di altri RNA nucleari [105]. Un'altra RNP chiamata SRP riconosce e trasporta le nuove proteine sintetizzate nel reticolo endoplasmatico o nella membrana nucleare.

E' possibile fare una distinzione nei ncRNA in base alla loro natura: small ncRNA (sncRNA) e long ncRNA (lncRNA). Negli sncRNA vi sono tre classi di trascritti ben definite: oltre ai già citati snoRNA, anche i siRNA (Small Interfering RNA) e i miRNA (MicroRNA). Queste ultime due classi sono coinvolte nel silenziamento genico tramite appaiamento di basi specifico con le molecole bersaglio, meccanismo noto come RNA interference (fig. 1.20 e 1.21). Sono implicati in processi quali la crescita cellulare, apoptosi, sviluppo e differenziamento.

I siRNA sono una classe di RNA a doppio filamento lunghi 20-25 nucleotidi. I loro precursori sono duplex più lunghi che vengono processati dall'enzima Dicer, un'endonucleasi appartenente alla famiglia RNasiIII che ha il compito di tagliare RNA a doppio filamento (dsRNA) e pre-miRNA (miRNA), in frammenti più piccoli chiamati small interfering RNA (siRNA)

di circa 20-25 nucleotidi. Il siRNA maturo viene riconosciuto dalle proteine del RISC che ne permettono l'appaiamento sul 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

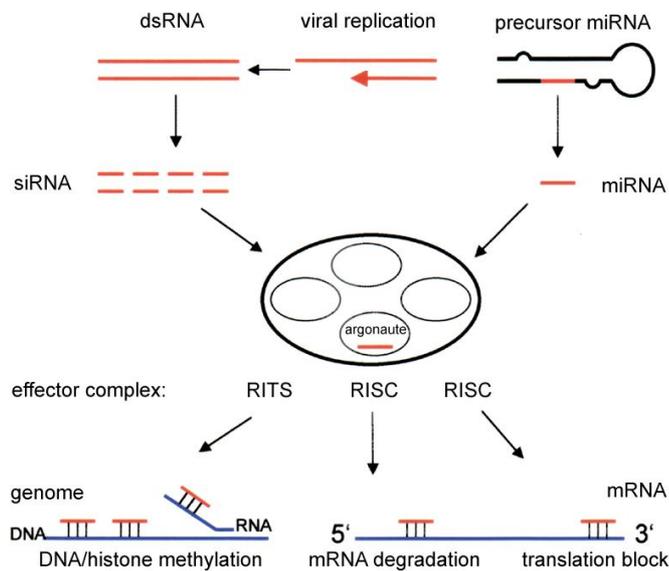


Fig. 1.20: Meccanismo ed effetti dell'RNA interference ([106] da Grosshans et al 2002).

1.14 miRNA

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti, altamente conservati e coinvolti nella regolazione dell'espressione genica tramite repressione traduzionale o degradazione del mRNA bersaglio [107, 108]. Sono stati inizialmente scoperti in *Caenorhabditis elegans* e successivamente nella maggioranza degli eucarioti, incluso l'uomo [109, 110].

Al momento sono conosciuti 1527 miRNA in *Homo sapiens* [111-114] (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Si suppone che circa l'1-2% del genoma umano codifichi per miRNA, e che questi ultimi regolino almeno il 30% dei geni codificanti [115-117].

La biogenesi dei miR e il loro destino sono stati molto studiati. Un modello è stato proposto da *Mac Farlane e Murphy* nel 2010 [118]: i precursori dei miRNA sono trascritti dal genoma o come componente di un pre-mRNA, o da un trascritto policistronico primario [119]. La maturazione

di questi, da parte del microprocessatore (costituito da Drosha e DGCR8) o da parte dello spliceosoma generano uno dei tre possibili precursori dei miRNA a forma di ansa e stelo: miRtroni (derivati da sequenze introniche) o pri-miRNA e pre-miRNA, molecole di circa 60-70 nucleotidi [120, 121]. I pri-miRNA sono poi tagliati a pre-miRNA dal microprocessatore [120, 122]. I pre-miRNA, e probabilmente anche i miRtroni, sono di seguito esportati dal nucleo al citosol tramite la via esportina-5/RanGTP [123].

A livello citoplasmatico, i pre-miRNA possono maturare in duplex di miRNA in due modi diversi: la via diretta prevede un singolo taglio da parte di Dicer, un'endonucleasi di tipo III, associato a TRBP e PACT [109], mentre la via indiretta è un processo di due tagli consecutivi. Il primo dei due è catalizzato da Ago2 (detto anche eIF2C2 o Slicer), generando l'ac-pre-miRNA, che è poi tagliato da Dicer [124] (fig. 1.21).

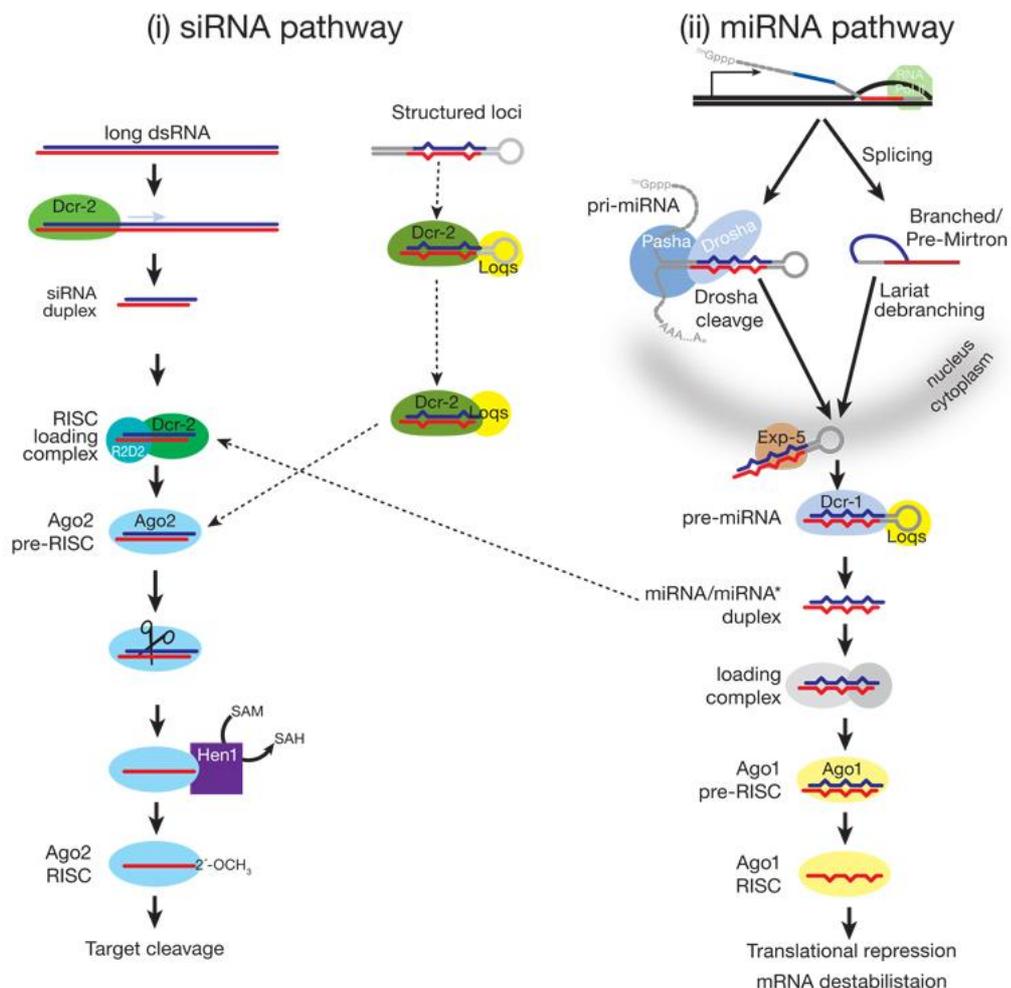


Fig. 1.21: Pathway della biogenesi dei siRNA e dei miRNA ([106] da Grosshans et al 2002).

A questo punto il duplex di miRNA, una doppia elica di approssimativamente 22 nucleotidi, può essere caricato su RISC (RNA-induced silencing complex) legandosi ad una proteina Argonaute [125]. In *H. sapiens* si distinguono otto complessi RISC diversi, distinti dalla loro composizione proteica. Rimane invariata la presenza di una delle quattro proteine Argonaute (Ago1-4) di cui solo Ago2 è capace di tagliare l'mRNA, anche se tutte sembrano coinvolte nel silenziamento genico [126, 127]. Altre componenti chiave del RISC loading complex sembrano Dicer, TRBP e PACT [126, 128].

Esistono diverse ipotesi che tentano di spiegare la separazione del filamento guida, termodinamicamente meno stabile al 5', da quello passeggero, tra tagli endonucleolitici e cambiamenti conformazionali [118]. Lo svolgimento della doppia elica avviene probabilmente grazie all'attività dell'RNA elicasi A, e solo il filamento guida rimarrà legato a RISC [129]. A questo punto si possono legare ulteriori proteine, completando la formazione del complesso miRISC attivo [118].

Il complesso miRISC attivo può legare i suoi bersagli attraverso una parziale o totale complementarità del miR al 3'UTR dell'mRNA bersaglio. Questo riconoscimento è guidato in particolare dai nucleotidi 2-8 a partire del 5' del miRNA, detti "*seed sequence*" [110, 130].

Il miRISC attivo legato all'mRNA bersaglio migrerà poi ai cosiddetti P-bodies, strutture dinamiche, all'interno del citosol, specializzate nel metabolismo degli RNA [131]. Qui, il tipo e l'estensione della complementarità sembrano poi decidere sul destino dell'RNA bersaglio [107, 132]: se l'appaiamento è perfetto o quasi, specialmente all'interno della *seed sequence*, si avrà un silenziamento "Slicer-dipendente" in cui Ago2 taglia l'mRNA, che verrà di seguito degradato [133-135].

Un appaiamento limitato, invece, si ripercuote sulla struttura secondaria del duplex, che impedisce così l'attività endonucleasica di Ago2. Nonostante ciò, la proteina mantiene la capacità di silenziare l'mRNA e il complesso ternario miRNA-mRNA-RISC viene indirizzato al compartimento specifico per il silenziamento Slicer-indipendente [110, 135-137]. Da qui l'mRNA può intraprendere tre vie: può essere associato ad altri fattori che reprimono la traduzione, rilocalizzato ulteriormente all'interno del P-body per essere

immagazzinato per tempi lunghi, o indirizzato a degradazione accelerata [118, 138, 139].

1.15 lncRNA

Negli ultimi anni l'importanza dei ruoli giocati dai ncRNA sulla regolazione dell'espressione genica è stata incrementata da innumerevoli lavori [140-146]. La ricerca si è focalizzata soprattutto su small ncRNA, mentre le funzioni dei lncRNA sono state molto meno studiate [140, 147, 148]. Mentre gli small ncRNA sono molto conservati fra le diverse specie, i long ncRNA spesso non presentano un elevato tasso di conservazione. Questo significa che hanno subito una differente pressione selettiva. Infatti le sole regioni ben conservate sono quelle che formano una struttura particolare o hanno interazioni sequenza-specifiche con altri acidi nucleici. Pertanto i long ncRNA hanno avuto un'evoluzione maggiore degli RNA codificanti [101], permettendogli di acquisire nuove funzioni e stabilire nuovi e complessi network molecolari.

Alcuni lncRNA sono conosciuti per il loro importante ruolo nella regolazione di processi cellulari, come ad esempio Xist che ha un ruolo nel silenziamento della cromatina del cromosoma X [140]. Grazie alla recente espansione di tecniche di analisi dell'intero trascrittoma, sono stati scoperti migliaia di lncRNA [147, 148]. Per definizione i lncRNA sono trascritti di almeno 200 nt, e spesso vengono indicati come TUF (Transcript of Unknown Function) proprio per la difficoltà che ha la ricerca nel definire delle funzioni o meccanismi d'azione ad essi associati. Diversi lavori dimostrano che essi possono essere coinvolti in diversi tipi di processi cellulari come modificazioni dello stato della cromatina (Xist [140], HOTAIR [142]), o regolazione trascrizionale tramite il reclutamento di RBP (RNA Binding Protein) capaci di attivare o silenziare l'espressione genica (Evf2) [149]. Inoltre, è stato mostrato che i lncRNA possono essere in grado di interagire direttamente con l'apparato trascrizionale della RNAPII [144], o regolare l'espressione in modo post-trascrizionale grazie alla loro capacità di riconoscere sequenze complementari influenzando di conseguenza i

meccanismi di maturazione dell'mRNA [143, 145, 146]. Infine essi possono essere processati in small ncRNA e portare così alla degradazione e/o blocco della traduzione del target [150].

Capitolo 2

OBIETTIVO DEL LAVORO

SPERIMENTALE

Una linea di ricerca del nostro laboratorio è focalizzata sull'identificazione del ruolo della Topoisomerasi I sulla regolazione della trascrizione. In questo ambito abbiamo indagato gli effetti della CPT sulla trascrizione nel locus genico di HIF-1 α , un gene associato a sviluppo, malignità e farmaco-resistenza dei tumori umani.

Esperimenti effettuati sulla linea cellulare HCT 116, utilizzando la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), hanno determinato la distribuzione della Pol II lungo il gene HIF-1 α , dopo trattamento con CPT in modo Top1 dipendente [59]. I risultati hanno suggerito che la CPT regola la fase di elongazione della trascrizione.

Inoltre è noto dalla letteratura che la CPT inibisce l'accumulo della proteina HIF-1 α in cellule umane trattate in condizioni di ipossia [71], suggerendo la presenza di un meccanismo di regolazione post-trascrizionale dell'attività di HIF-1 α .

Pertanto, il lavoro di tesi si è inserito all'interno di questa linea di ricerca del laboratorio, ed ha ricercato i seguenti obiettivi: A) definire il ruolo di Top1 nella regolazione della RNA Pol II; B) definire l'effetto di CPT sulla struttura della cromatina.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 LINEE CELLULARI E TRATTAMENTI

La linea cellulare HCT 116 (carcinoma del colon) HeLa (carcinoma di cervice uterina) è stata coltivata in terreno DMEM (Euroclone) ad alto contenuto di glucosio (M-Medical) addizionato di L-glutammina (2mM, Invitrogen) e siero fetale bovino (Invitrogen) al 10%. Le cellule HCT116(top1 siRNA) [36] sono state coltivate nello stesso terreno con l'aggiunta di 500 µg/ml di igromicina B. Le cellule HEK 293 (rene embrionale umano) sono state cresciute in terreno MEM (minimal essential medium, M-Medical) con 10% di siero fetale bovino. La linea cellulare Jurkat 6 (di leucemia umana) è stata coltivata in terreno RPMI 1640 con 10% di siero fetale bovino. Tutte le cellule sono state mantenute a 37°C in un incubatore umidificato contenente aria arricchita con 5% di CO₂. Trattamenti in ipossia sono stati effettuati a 37°C utilizzando un incubatore ad atmosfera controllata (HERAcellR150, Kendro Laboratory Products) con un mix di 1% O₂, 5% CO₂, e 94% N₂, o trattando le cellule con il composto deferoxamina (DFX) (250 µM). DFX . Questo farmaco è un agente chelante di ioni ferro ed alluminio, e perciò usato a livello clinico contro l'emocromatosi o intossicazioni da ferro. Interferisce con il metabolismo ossigenico, poiché il ferro, necessario a trasportatori di enzimi, è lo ione principale usato per legare l'ossigeno molecolare. Tutti i trattamenti sono stati effettuati in fase esponenziale. Nel caso di co-trattamento, prima dell'aggiunta di CPT (ai tempi e dosi indicate), le cellule sono state incubate con afidicolina (3 µM per 15 minuti) o caffeina (5 mM) per 30 minuti. Tutti i farmaci sono stati comprati da Sigma.

3.2 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE

Dopo il trattamento, $5 \cdot 10^7$ cellule sono state lavate due volte con PBS freddo e precipitate in centrifuga. Il pellet è stato risospeso in 3,6 mL di

buffer AE [50 mM NaOAc (pH 5.2), 10 mM EDTA] contenente 240 µl di SDS 25% e 3,6 mL di fenolo acido (pH 4,5) e quindi miscelato vigorosamente ogni minuto per 10 minuti a 65°C. Dopo una breve incubazione in ghiaccio, i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 g. E' stato prelevato il surnatante al quale si aggiungono 3,9 mL di cloroformio/alcol isoamilico (25:1), e quindi miscelato e centrifugato per 10 minuti a 1800 g. Il surnatante è stato precipitato con isopropanolo. Il DNA viene poi digerito con DNase I per 15 minuti a 37°C. Si estrae l'RNA con il metodo fenolo e quindi viene precipitato con etanolo. Nel caso di frazionamento nucleo/citoplasma l'RNA è stato preparato lisando il pellet cellulare in 100 µl di buffer di lisi (10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris, pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 10 mM vanadyl ribonuclease complex) [151]. Le cellule vengono quindi vortexate velocemente e centrifugate a 20000 g per 2 minuti. L'RNA viene quindi estratto dal surnatante (citoplasma) o dal pellet (nuclei) con il protocollo descritto in precedenza. L'RNA poliadenilato è stato isolato usando il kit "Oligotex RNA" (Qiagen) seguendo le istruzioni della ditta. Dopo aver verificato la qualità dell'RNA in un gel d'agarosio all'1%, si quantifica l'RNA tramite nanodrop (Thermo) e se ne usa 1 µg per la retrotrascrizione con SuperScript III (invitrogen) seguendo le indicazioni del produttore. Per la retrotrascrizione totale dell'RNA si utilizzano primer random (N6) e poli(T). La reazione include un pre-annealing di 25°C per 5 minuti, dopodiché la retrotrascrizione procederà a 50°C per 50 minuti. Singoli primer vengono utilizzati per la retrotrascrizione filamento specifica (tabella 2.1). In questo caso la reazione è stata effettuata a 55°C per 50 minuti senza il passaggio di pre-annealing. Per le analisi effettuate sui miR sono stati retrotrascritti 150 ng di RNA totale con il kit "TaqMan MicroRNA RT" (Applied Biosystem) utilizzando i primer specifici e le procedure indicate dal produttore.

3.3 NORTHERN BLOT

Per le analisi di Northern blot, è stata utilizzata la procedura indicata da Kapranov et al. [147] con le seguenti modifiche: su gel d'agarosio (1,5%) e

formaldeide in tampone MOPS [20 mM MOPS (pH 7.0), 2 mM NaOAC, 1 mM EDTA (pH 8.0), in acqua DEPC] sono stati separati 20 µg di RNA totale per pozzetto. Quindi l'RNA è stato trasferito su una membrana N-Hybrid (Amersham) in 20X di tampone SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate) e successivamente bloccato alla membrana tramite UV-crosslinking ed un'ora di incubazione a 80°C. Sono state disegnate per l'antisenso 5' aHIF-1α sonde filamento specifiche di 40 nt, sintetizzate da "Integrated DNA Technologies (IDT) con l'estensione "StarFire" in 3'(5'- CAG CCC CAA TTC TAA ATA AGC TCT TAG ATT TTC CTC AGC C/NNNNN/ -3'). La sonda è stata marcata con P32 ad alta attività specifica con il kit IDT StarFire (IDT) usando i protocolli forniti dalla ditta. L'ibridazione con la sonda è avvenuta per 16 ore nel tampone di ibridazione [7% SDS, 500 mM sodio fosfato (pH 7.0), 1 mM EDTA, 25% formammide] a 42°C, dopodiché sono stati fatti due lavaggi in 2X SSC e 0,5% di SDS a 25°C per 20 minuti. L'esone 2 di HIF-1α (25 kb) è stato clonato tramite PCR nel vettore TOPO-TA (Invitrogen). Il plasmide è stato isolato da batteri tramite kit Qiagen, seguendo i protocolli forniti dalla ditta, e digerito con EcoRI (New England Biolabs). L'esone 2 di HIF-1α inserito è stato poi purificato tramite gel elettroforesi ed elettroeluzione. La sonda è stata marcata con P³² usando il kit "Ready-To-Go DNA labelling Beads" (GE Healthcare) usando le indicazioni della ditta. L'ibridazione con la sonda è avvenuta per 16 ore nel tampone di ibridazione [7% SDS, 500 mM sodio fosfato (pH 7.0), 1 mM EDTA] a 65°C seguita da due lavaggi [1% SDS, 40 mM Sodium Phosphate (pH 7.0)], a temperatura ambiente per 30 minuti e 65°C per 45 minuti.

Le membrane sono state poi esposte tramite "phospho screen" (Bioscience Amersham) per 1-2 giorni e sviluppate usando lo Storm 860 (Biosciences Amersham).

3.4 PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Le analisi di qPCR, su cDNA retrotrascritto in modo primer-specifico o totale, sono state effettuate usando lo strumento LightCycler e il kit "FastStart DNA Master SYBR Green I" (Roche Diagnostics). La quantificazione e le

curve di “melting” sono state fatte usando il software fornito da Roche come indicato dalla ditta. Le reazioni di PCR contengono 1x FastStart DNA SYBR Green I Master Mix, 2,08 mM MgCl₂ e 350 nM di ogni primer. I prodotti specifici vengono controllati tramite curva di melting e gel d’agarosio. Le analisi di qPCR, per analizzare l’espressione dei miR, sui cDNA ottenuti con il kit “TaqMan MicroRNA RT” (Applied Biosystem) sono state effettuate qPCR con il kit “TaqMan microRNA assays” (Applied Biosystem) utilizzando lo strumento StepOne (Applied Biosystem). Ogni reazione da 20 µL contiene 1x TaqMan Universal Master PCR Mix, 1x TaqMan MicroRNA Assay Mix (primer, specifici per il miR da analizzare) e 1,33 µL del prodotto della retrotrascrizione. Tutte le quantificazioni sono state effettuate seguendo il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [152].

3.5 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE E WESTERN BLOT

Per gli estratti totali, le cellule sono state lisate con tampone RIPA (TrisCL pH 8.0 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 0.5 mM, NaCl 50 mM, Triton X-100 1%, Sodio deossicolato 0.1%, SDS 0.1%), sonicate leggermente e quindi centrifugate. 80 µg di proteine sono state tramite SDS-PAGE al 6,5%, e quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa “Hybond ECL” (Amersham). Il controllo di caricamento è stato effettuato tramite colorazione con rosso Ponceau. Quindi la membrana è stata incubata con anticorpi specifici Anticorpi primari anti HIF-1 α e anti HIF-1 β (Santa Cruz, CA) sono stati utilizzati alle diluizioni 1:600 e 1:800 rispettivamente. Le membrane sono state incubate con anticorpi secondari per anti HIF-1 α e anti HIF-1 β alle diluizioni 1:1000. Il segnale delle bande specifiche è stato rilevato con il sistema “ECL Plus Western Blot Imaging System” (GE Healthcare).

3.6 PURIFICAZIONE DELL’RNA CON 5’CAP PER AFFINITÀ

È stato espresso il fattore eIF4E (“murine eukariotic initiation factor 4E”) chimerico, legato a GST utilizzando un vettore d’espressione. La

proteina è stata preparata come descritto da Choi et al. [153]. Le frazioni di RNA con o senza 5'CAP sono state separate usando la colonna d'affinità per GST "Glutathione-Sepharose 4FF" (GE Healthcare). L'RNA con 5'CAP è stato eluito utilizzando m7GDP. L'RNA isolato è stato retrotrascritto come sopra descritto. Tramite RT-qPCR sono state analizzate le frazioni che hanno legato (bound) o meno (unbound) la colonna, e si riferiscono rispettivamente alle frazioni di RNA con 5'CAP e senza.

3.7 IBRIDAZIONE DELL'RNA *IN SITU* (RNA FISH)

I prodotti di PCR (0.1 kb e 45 kb) ottenuti su DNA genomico sono stati clonati nel vettore pCR2.1 tramite tecnica Topo-TA Cloning (Invitrogen) in orientamento senso e antisenso. Tramite questo vettore sono stati prodotte sonde a ssRNA utilizzando la polimerasi T7 e UTP marcati con digoxigenina (Roche Diagnostics). Le cellule sono state piastrate su vetrini Lab-Tek™ II CC2™ (Nalge Nunc Int.) un giorno prima rispetto a trattamenti con 10 µM CPT per i tempi indicati. Le cellule sono state lavate con PBS per 5 minuti e quindi permeabilizzate tramite successive incubazioni di un minuto per ognuno dei seguenti tamponi: cytoskeletal buffer (CB) (100 mM NaCl, 300 mM saccarosio, 3 mM MgCl₂, 10 mM PIPES pH 6.8), CB più 0.5% Triton X-100, "vanadyl ribonucleoside complex", e CB. I vetrini sono stati fissati con 3,7% di formaldeide per 10 minuti e mantenuti in etanolo al 70% a 4°C per due settimane. I vetrini sono stati deidratati tramite passaggi in etanolo (80-90-100%) e asciugati per 16 ore a 37°C prima dell'ibridazione con la sonda. Abbiamo usato due protocolli differenti di ibridazione: 1- il tampone di ibridazione (HB) (HB) (25% formamide, 2x SCC, 5x Denhardt solution, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 µg/µl salmon sperm DNA, 3 µg/µl human Cot1 DNA). è stato denaturato a 95°C per 10 minuti e pre-ibridato per 30 minuti a 37°C su ogni vetrino; 2- stesso protocollo precedente senza passaggio di pre-ibridazione. Le sonde a DIG-RNA sono state precipitate con etanolo, risospese in HB (30-100 ng), denaturate a 95°C per 10 minuti e quindi sono stati presi 10 µl e aggiunti su ogni vetrino. I vetrini sono stati coperti e l'ibridazione è stata effettuata per 16 ore in un incubatore umidificato a 37°C.

La rilevazione è stata fatta in 4X SSC e 8% di BSA (bovine serum albumin) con un anticorpo anti-DIG FITC (1:500, Sigma). Il DNA totale è stato marcato con DAPI. Le immagini digitali e il segnale fluorescente sono state acquisite con un microscopio Nikon Eclipse equipaggiato con un obiettivo 60x e sistema confocale. Le immagini sono state analizzate usando il programma Image J e Adobe Photoshop CS4.

3.8 RNA FISH ASSOCIATA A IMMUNOFLUORESCENZA

Le tecniche di FISH sono state effettuate come sopra descritto, associate a immunofluorescenza utilizzando anticorpi anti lamina B1 (Abcam) o anti nucleoporina (H-122) (Santa Cruz Biotechnology). Le cellule sono state incubate con anticorpo (mouse) anti DIG-FITC (Roche) diluito 1:500 nella “block solution” (4xSSC, 8% BSA) e anticorpo (rabbit) anti lamina B1 o anti nucleoporina P62 diluiti 1:500 nella “block solution” per un ora a temperatura ambiente. I vetrini sono stati lavati tre volte con 2x SSC e 0,05% Triton X-100 per 10 minuti e il segnale è stato rilevato usando Alexa 568 utilizzando anticorpi IgG anti-mouse e anti-rabbit (Invitrogen).

3.9 CAMPIONI DA CARCINOMI RENALI UMANI

Le biopsie dei carcinomi umani sono stati ottenuti da 26 pazienti adulti che sono stati operati nell’Istituto Nazionale Tumori di Milano (INTM) dal febbraio 1991 a giugno 1997. I campioni sono stati prelevati in modo consecutivo secondo la disponibilità di tessuti congelati. I tessuti sono stati prelevati da un patologo al momento dell’operazione chirurgica, passati in azoto liquido e mantenuti a -80°C. Le diagnosi e il campionamento, tramite analisi molecolari su vetrini incubati con ematossilina ed eosina, sono state confermate dal patologo al momento della raccolta dei campioni. Questi studi sono stati approvati dall’INTM e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato per la donazione dei tessuti per tutto il tempo delle procedure

diagnostiche. L'RNA totale è stato estratto dai tessuti congelati utilizzando il TRIzol reagent (Invitrogen) seguendo le istruzioni del produttore.

3.10 TRASFEZIONI E SAGGI CON LUCIFERASI

Saggi funzionali per il 3'UTR-HIF-1 α : In multiwell da 24 pozzetti (Sarsted) sono state piastrate 80.000 cellule a pozzetto in 500 μ L del rispettivo terreno completo. Dopo 24 ore, le cellule sono state trasfettate con pRL (0,5 μ g) e pGL3-3'UTR-HIF-1 α o pGL3-StiI (0,5 μ g). La trasfezione è stata effettuata con 2 μ L Lipofectamine 2000 (Invitrogen) seguendo i protocolli della ditta. Dopo 5 ore si sostituisce il mezzo con terreno completo. I trattamenti sono stati fatti con DFX (250 μ M) e/o CPT (0,5 μ M) 24 ore dopo la trasfezione per i tempi indicati. Quindi le cellule sono state lavate con 200 μ L di PBS (Invitrogen) a pozzetto e lisate in 100 μ L Lysis Buffer 1x (Promega), sotto agitazione per 15 minuti.

Saggi funzionali per l'attività di HIF-1 α : In multiwell da 24 pozzetti (Sarsted) sono state piastrate 60.000 cellule a pozzetto in 500 μ L del rispettivo terreno completo. Dopo 24 ore, le cellule sono state trasfettate con pRL (0,04 μ M), pGL3-HRE-Luc (0,2 μ M) e, quando indicato, con 55 pmol di anti-miR specifico ("taqman anti-miR inhibitor"). La trasfezione è stata effettuata con 1 μ L RNAiMAX (Invitrogen) seguendo i protocolli della ditta. Dopo 24 ore si sostituisce il mezzo con terreno completo addizionato con DFX (250 μ M) e/o CPT (0,5 μ M). Quindi le cellule sono state lavate con 200 μ L di PBS (Invitrogen) a pozzetto e lisate in 100 μ L Lysis Buffer 1x (Promega), sotto agitazione per 15 minuti.

Per la lettura al luminometro si aggiungono 100 μ L di Luciferase Assay Reagent II (Promega) a 20 μ L di lisato cellulare. Dopo la prima lettura si aggiungono 100 μ L di Stop & Glo[®] Reagent (Promega) e si legge la luminescenza della luciferasi di Renilla.

3.11 LISTA DEI PRIMER

Nome	Sequenza
HIF-1 α -0.5 kb* fw	5'-TGAACAGAGAGCCCAGCAGAG-3'
HIF-1 α -0.5 kb rv	5'-CCTGGTCCCAAACATGCATC-3'
HIF-1 α 0.05 kb fw	5'-AGCTCCTCAGTGCACAGTGC-3'
HIF-1 α 0.05 kb rv	5'-AGACTAGAGAGAAGCGGGCG-3'
HIF-1 α 0.1 kb fw	5'-AGGATCACCTCTTCGTCGC-3'
HIF-1 α 0.1 kb rv	5'-AAGGCAAGTCCAGAGGTGGG-3'
HIF-1 α 0.2 kb fw	5'-AGGATCACCTCTTCGTCGC-3'
HIF-1 α 0.2 kb rv	5'-CCGAGGGAATGGGCTTACTT-3'
HIF-1 α 2.1 kb fw	5'-CTCTTAGATTTTCCTCAGCC-3'
HIF-1 α 2.1 kb rv	5'-GCTGAGTAACCACCACTTAT-3'
HIF-1 α 7.9 kb fw	5'-GAGGGGAAAATGTAGTCATTGGC-3'
HIF-1 α 7.9 kb rv	5'-CGTCCTCTTCCACACCATAACAGA-3'
HIF-1 α 9 kb fw	5'-TTGGGATGTAAAGGAGGGG-3'
HIF-1 α 9 kb rv	5'-CCCTTCATCCATTCACAGTG-3'
HIF-1 α 15 kb fw	5'-TGTTCCATAAGATAACCTCC-3'
HIF-1 α 15 kb rv	5'-AGGATACCCACATGTTAGAG-3'
HIF-1 α 21 kb fw	5'-CTGATCTACATATCTTCTGTTGTG-3'
HIF-1 α 21 kb rv	5'-GAAGTTCCTTGTGAGTTTCAG-3'
HIF-1 α 24.7 kb fw	5'-TCTCTCCAATTACATATGCTGG-3'
HIF-1 α 24.7 kb rv	5'-TCTCGAGACTTTTCTTTTCG-3'
HIF-1 α 25 kb fw	5'-AGCCAGATCTCGGCGAAGTA-3'
HIF-1 α 25 kb rv	5'-CCAGAAGTTTCCTCACACGC-3'
HIF-1 α 45 kb fw	5'-CCAGTTACGTTCCCTTCGATCAGT-3'
HIF-1 α 45 kb rv	5'-TTTGAGGACTTGCGCTTTCA-3'
3'a HIF-1 α fw	5'-TTTGTGTTTGAGCATTTTAATAGGC-3'
3'a HIF-1 α rv	5'-CCAGGCCCTTTGATCAGCTT-3'
CitB fw	5'-AACTTACTATCCGCCATCCCATAC-3'
CitB rv	5'-GTTAGAATGAGGAGGTCTGCGG-3'
c-myc fw	5'-TAGCTTCACCAACAGGAACT-3'
c-myc rv	5'-AGCTCGAATTTCTTCCAGAT-3'
VEGF fw	5'-TACCTCCACCATGCCAAGGT-3'
VEGF rv	5'-ATGATTCTGCCCTCCTCCTTC-3'
rRNA 18s fw	5'-GTGCCCTTCCGTCAATT-3'
rRNA 18s rv	5'-TAGAGGTGAAATTCT-3'
α -sat fw	5'-CTTTTTTCATCATAGGCCTCAA-3'
α -sat rv	5'-AGCTCACAGAGCTGAAACATT-3'

*I numeri si riferiscono alla distanza media tra l'amplicone e il TSS (Transcription Start Site) di HIF-1 α

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 5'aHIF-1 α : UN TRASCritto ANTISENSO AL 5' DEL GENE HIF-1 α ATTIVATO DA CPT

Inizialmente il lavoro era focalizzato sulla comprensione degli effetti dell'inibizione della TOP1 sulla trascrizione e sulla corretta maturazione dell'RNA messaggero. Poiché i risultati di ChIP effettuati nel nostro laboratorio [27] indicano che la CPT favorisce apparentemente l'allontanamento della RNA Pol II dal sito di pausa prossimo al promotore del gene HIF-1 α , abbiamo voluto indagare se a ciò corrispondesse un'aumentata trascrizione a valle del sito di pausa. HIF-1 α è un gene lungo circa 50 kb ed ha la peculiarità di possedere un primo introne di circa 25 kb (fig. 4.1) che può essere sede di vari tipi di regolazione. Pertanto abbiamo inizialmente pensato di studiare i livelli di trascrizione all'interno del primo introne di HIF-1 α estraendo e retrotrascrivendo l'RNA estratto dalla linea cellulare umana HCT 116 dopo 4 ore di trattamento con 10 μ M di CPT.

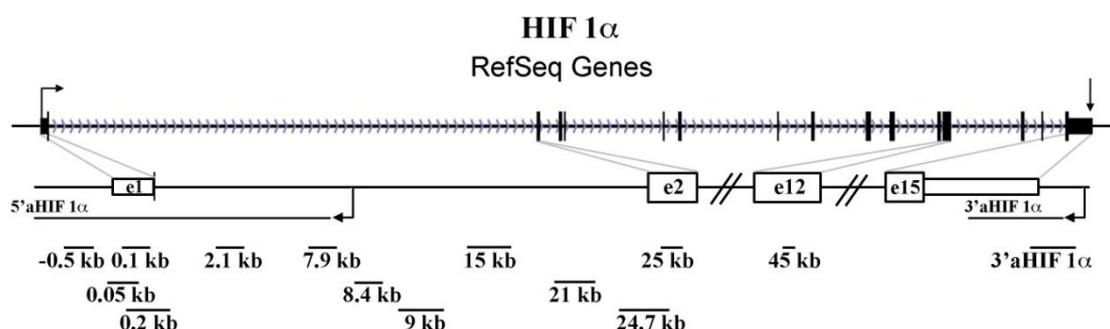


Figure 4.1.

Il locus genico di HIF-1 α da "RefSeq Genes" viene mostrata con esoni (rettangoli) e introni (linee). Nella mappa di RefSeq vengono anche indicati i siti i inizio e di fine della trascrizione del gene HIF-1 α . Nella mappa inferiore vengono indicati i siti di inizio ipotetici della trascrizione dei 2 antisensi 5' e 3'aHIF-1 α . Le linee spezzate e i numeri mostrano gli ampliconi utilizzati espressi come distanza in basi dal TSS di HIF-1 α . Solo la mappa superiore è in scala.

Per questo, abbiamo disegnato una serie di primer/ampliconi distribuiti uniformemente lungo le 25 kb del primo introne di HIF-1 α (fig. 4.1). Quindi è stata fatta una scansione del primo introne utilizzando tecniche di RT-qPCR su campioni non trattati, e trattati per 4 ore ad una concentrazione di CPT pari a 10 μ M (fig. 4.2). La figura 4.2 mostra la scansione in maggior dettaglio del primo introne; le regioni analizzate vanno dal primo esone (0.1 kb), riguardano la regione esone 1 – introne 1 (0.2 kb), tutto il primo introne (da 2.1 e 24.7 kb) e gli esoni 2 e 12 (25 e 45 kb rispettivamente).

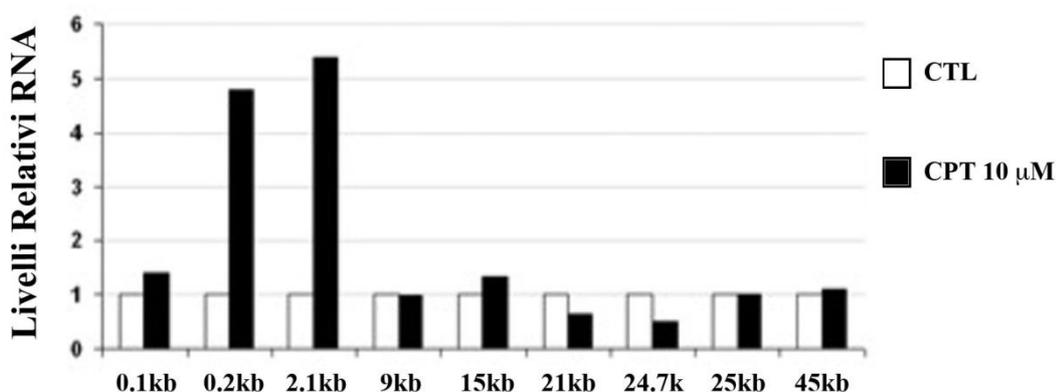


Figura 4.2.

Il grafico mostra i livelli di trascritto lungo il primo introne del gene HIF-1 α . Le misure sono state effettuate tramite RT-qPCR su campioni di RNA totali in cellule trattate con 10 μ M CPT per 4 ore. I risultati sono stati normalizzati rispetto al controllo (non trattato) e alla regione corrispondente all'esone 2 di HIF-1 α (25 kb). In bianco sono mostrati i controlli, in nero i campioni trattati con CPT. I numeri sull'asse delle ascisse corrispondono alle distanze dal sito di inizio della trascrizione. La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. L'esperimento mostrato è rappresentativo.

Si nota un forte aumento di trascrizione solo nella prima porzione dell'introne 1 e soprattutto nella regione 2.1 kb, le altre regioni dell'introne rimangono costanti o presentano, verso la fine dell'introne, livelli ridotti rispetto ai campioni corrispettivi non trattati con il farmaco. Quindi, questi risultati dimostrano che in seguito a trattamenti con CPT i livelli di trascrizione lungo il gene HIF-1 α sono alterati. In particolare, si notano

aumenti di trascrizione al 5' del gene, comprendente il primo esone e la prima porzione del primo introne.

Per stabilire meglio la dipendenza di questo fenomeno dal trattamento con CPT, sono stati effettuati trattamenti contro-dose e contro-tempo con il farmaco su HCT 116 (fig. 4.3). RT-qPCR sui cDNA retrotrascritti da RNA totale hanno evidenziato che l'aumento della regione 2.1 kb è specifico e CPT-dipendente nelle HCT 116 (varia linearmente con il tempo ed la concentrazione).

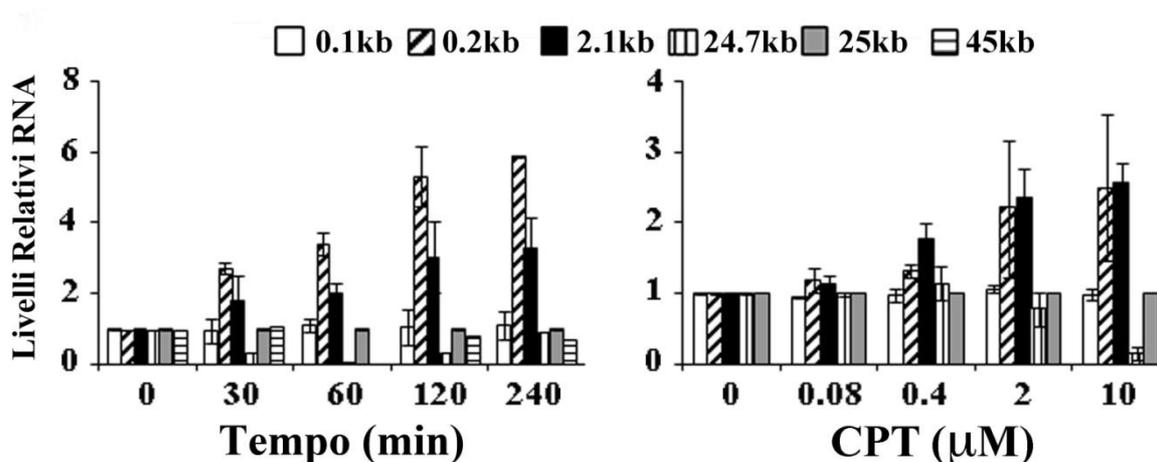


Figura 4.3

Livelli di trascritti misurati tramite RT-qPCR in seguito a trattamenti con CPT per i tempi e le dosi indicate. I risultati sono stati normalizzati rispetto al controllo (non trattato) e alla regione corrispondente all'esone 2 di HIF-1 α (25 kb). Tutte le cinetiche sono state fatte utilizzando una concentrazione di CPT di 10 μ M. La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti. [59]

Arrivati a questo punto si è cercato di identificare quale fosse il trascritto che aumenta dopo trattamento con CPT o quale meccanismo potesse spiegare un aumento selettivo delle regioni trascritte. Gli ultimi esperimenti hanno mostrato che l'alterazione della trascrizione di HIF-1 α interessa soprattutto la regione iniziale del primo introne (figure 4.2 e 4.3). Dato che un'alterazione della regolazione del "pausing" trascrizionale di HIF-1 α , in seguito a trattamento con CPT, potrebbe comportare una errata maturazione del trascritto di HIF-1 α [58], abbiamo considerato un primo modello che

ipotizzava un errato splicing del primo introne, con conseguente “shift” del sito donatore dalla fine dell’esone 1 ad una regione interna al primo introne. Per verificare una tale ipotesi sono state fatte una serie di PCR utilizzando, uno alla volta, tutti i primer “forward” o “reverse” usati per la scansione dell’introne 1 in concomitanza con il primer sull’esone 2 (“reverse”) o sull’esone 1 (“forward”) rispettivamente. Tutti i risultati ottenuti con questo tipo di analisi sono stati negativi, dimostrando che l’ipotesi di errato splicing non è corretta (successivamente analisi di Northern blot hanno confermato che non ci sono alterazioni evidenti di splicing).

Il successivo modello ipotizzato propone la sintesi di un secondo trascritto indipendente dall’mRNA di HIF-1 α , che aumenta in seguito al trattamento con CPT secondo un meccanismo da definire. Questa ipotesi è supportata dal fatto che è già noto un trascritto antisenso in 3’ rispetto al gene HIF-1 α . Questo antisenso viene riconosciuto in letteratura come aHIF, è lungo circa 1.7 kb, non possiede il CAP in 5’ né la poliadenilazione in 3’ ed è localizzato in 3’ rispetto alla ORF di HIF-1 α , sovrapposto al sito di terminazione dell’ mRNA [100].

Per verificare questa ipotesi sono state fatte retrotrascrizioni primer-specifiche, utilizzando primer complementari ad eventuali trascritti senso e antisenso nelle regioni che presentavano alterati livelli di trascrizione. Quindi, dato che i primer “forward” (Fw) appaierebbero solo su un eventuale antisenso, mentre i primer “reverse” (Rv) solo sul trascritto senso, sono state fatte PCR non quantitative sui prodotti di retrotrascrizione per identificare la presenza cDNA filamento-specifico. Successivamente i prodotti di PCR sono stati fatti correre su gel d’agarosio. Tramite questa analisi abbiamo riscontrato la presenza di un trascritto antisenso nella regione 5’ del gene HIF-1 α (figura 4.4) solo dopo trattamento con CPT.

Per dimostrare che i cDNA prodotti sono primer-specifici, in PCR sono state utilizzati anche coppie di primer di controllo relative al secondo esone di HIF-1 α e al gene c-Myc. In questo caso la coppia di primer in questione produrrebbe un amplificato in una regione che non viene retrotrascritta e

infatti non è stato ottenuto nessun prodotto di PCR, né nel controllo né nel trattato.

In accordo con i dati ottenuti nella scansione dell'introne 1 (fig. 4.2) si nota innanzitutto che l'aumento di trascrizione in tali regioni è dovuto ad un trascritto antisenso che d'ora in poi chiameremo 5'aHIF-1 α , e che quest'ultimo viene trascritto in una regione che va dalle prime 8 kb all'interno dell'introne 1 a meno 0,5 kb a monte del sito di inizio della trascrizione di HIF-1 α .

Le analisi effettuate sul trascritto senso invece (primer Rv) rivelano la presenza del pre-mRNA di HIF-1 α a livello dell'esone 1 e dell'introne 1 (rispettivamente ampliconi 0.1 e 2.1 kb), i livelli di trascrizione di queste due regioni non variano in seguito a trattamento con CPT.

In accordo con l'ipotesi che lo splicing sia un meccanismo co-trascrizionale [154] si può notare che retrotrascrivendo con il primer 2.1 kb Rv (specifico per l'mRNA di HIF-1 α) non viene rilevata alcuna banda nella regione dell'esone 1 (0.1 kb).

Analisi di PCR su cDNA retrotrascritti con random primer (N6) mostrano un aumento di trascrizione delle regioni in cui viene trascritto 5'aHIF-1 α e una diminuzione dell'amplicone relativo all'esone 2 di HIF-1 α (25 kb) in seguito a trattamenti di 4 ore con 10 μ M di CPT.

La concordanza dei risultati ottenuti, nelle analisi sui cDNA retrotrascritti in modo filamento-specifico e non, dimostra che l'aumento nella regione 2.1 kb riscontrata su entrambi i tipi di template sia attribuibile all'aumento dell'antisenso in 5'. Pertanto d'ora in avanti l'amplicone 2.1 kb verrà anche indicato come 5'aHIF-1 α . Al contrario dato che dalle analisi effettuate non risulta essere presente trascrizione antisenso nella regione dell'esone 2 di HIF-1 α (25 kb), questo amplicone potrà essere mostrato come indicatore dei livelli dell'mRNA di HIF-1 α .

Infine per stabilire che non vi sia presenza di DNA genomico nei nostri campioni, abbiamo indagato la presenza di α -satellite tramite primer specifici. Non è stato individuato nessun prodotto di PCR relativo a questa coppia di primer.

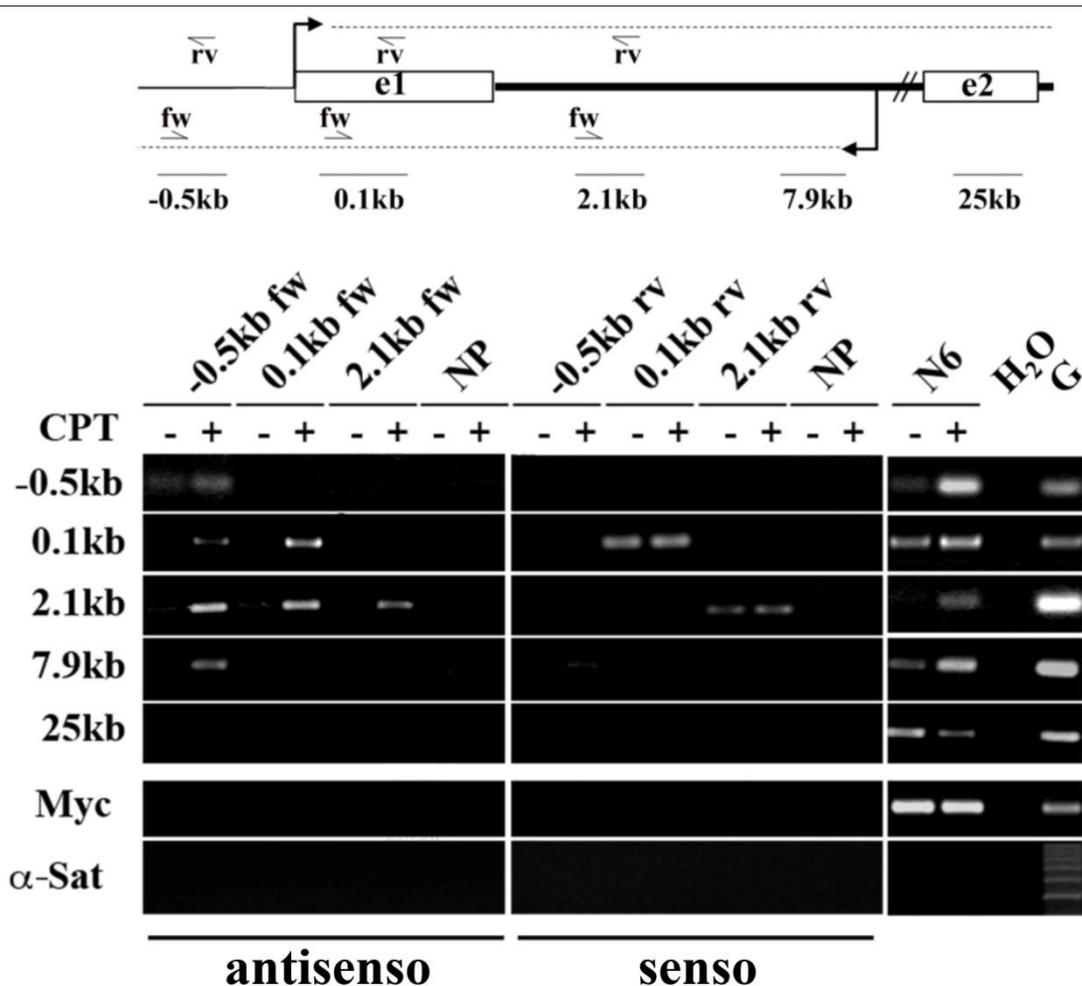


Figura 4.4

In alto viene riportata una mappa delle regioni analizzate sul gene HIF-1 α . Le linee tratteggiate mostrano il trascritto antisenso 5' a HIF-1 α e l'mRNA del gene HIF-1 α . Le frecce indicano i primer specifici utilizzati per la retrotrascrizione. Le linee spezzate e i numeri mostrano gli ampliconi utilizzati in qPCR ed indicano la distanza media dal sito di inizio della trascrizione di HIF-1 α . La mappa non è in scala. In basso vengono riportati i gel d'agarosio relativi ad analisi di PCR su cDNA retrotrascritti in modo primer-specifico da RNA di cellule HCT 116. I primer "Rv" sono stati disegnati per appaiare l'mRNA di HIF-1 α , mentre i primer "Fw" appaiano l'RNA antisenso ad HIF-1 α . L'RNA totale è stato estratto da cellule trattate (+) o meno (-) con 10 μ M di CPT per 4 ore. I primer utilizzati per la retrotrascrizione sono indicati sopra il gel, mentre le coppie di primer utilizzate per la qPCR sono indicate a lato. I controlli negativi e positivi per la retrotrascrizione sono rispettivamente "nessun primer" (NP) e random primer (N6). I controlli negativi e positivi della PCR sono l'acqua (H₂O) e il DNA genomico (G) utilizzati come template. Il DNA α -satellite (α -sat) evidenzia che non è presente contaminazione da genomico. L'esperimento mostrato è rappresentativo. [59]

Per caratterizzare meglio l'RNA antisense, sono state effettuate analisi di Northern blot sull'RNA totale estratto da HCT 116 in seguito a diversi trattamenti con CPT. Per rilevare il 5' aHIF-1 α è stata utilizzata una sonda di 40 nt di DNA a singolo filamento, complementare all'antisense. In figura 4.5A vengono mostrati i northern blot sull'RNA totale; la sonda utilizzata è stata disegnata nella regione 2.1 kb. Una banda di circa 10 kb basi (peso molecolare stimato tramite interpolazione con curva di taratura calcolata sulle distanze note degli rRNA) compare in seguito a trattamento con CPT, coerentemente con l'andamento della cinetica del trattamento stesso. Per verificare se l'attivazione dell'antisense dipendesse dalla presenza di Top1, è stata utilizzata una linea di HCT 116 trasfettata stabilmente con un vettore che esprime un siRNA contro Top1. In questo modo si ha una riduzione della proteina di circa il 70%.

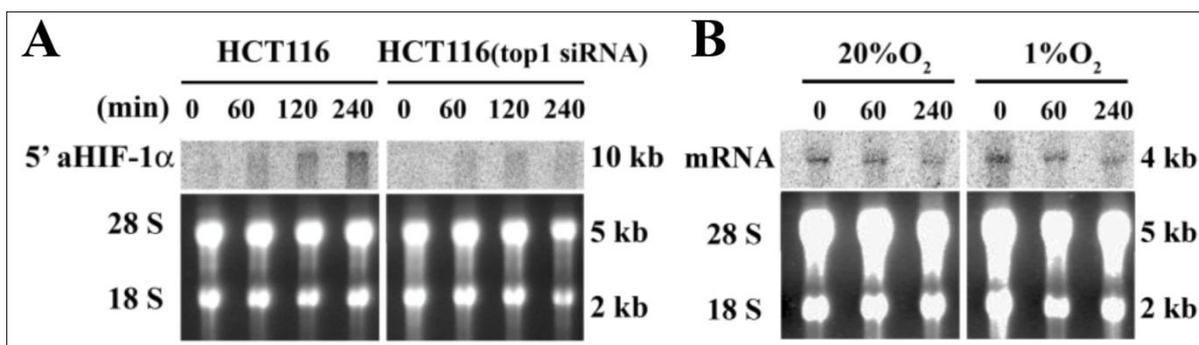


Figura 4.5

A: Northern Blot su campioni di RNA estratti da linee HCT 116 con o senza il vettore per silenziare Top1. Sono stati caricati 20 μ g di RNA totale per pozzetto. La sonda utilizzata è un oligomero di 40 nt studiato sulla regione 2.1 kb e complementare all'RNA antisense. In basso sono mostrati i gel d'agarosio utilizzati per il trasferimento su membrana, che riportano la porzione relativa all'rRNA come controllo di isocaricamento. A destra sono riportati i pesi molecolari delle bande mostrate. I campioni sono stati trattati con 10 μ M di CPT ai tempi indicati. B: Northern Blot su campioni di RNA estratti da linee Jurkat 6 trattate con 10 μ M CPT in condizioni normossiche e ipossiche. Sono stati caricati 20 μ g di RNA totale per pozzetto. La sonda utilizzata è un dsDNA studiato sulla regione interna all'esone 2 (25 kb). In basso sono mostrati i gel d'agarosio utilizzati per il trasferimento su membrana, che riportano la porzione relativa all'rRNA come controllo di isocaricamento. A destra sono riportati i pesi molecolari delle bande mostrate. [59]

Dalle analisi di Northern blot effettuate su campioni di RNA estratti da linee HCT 116 (top1 siRNA) si nota un aumento di antisenso molto più lieve rispetto a quello registrato per la linea wt.

Questi dati sono coerenti con quelli precedenti relativi agli alterati livelli di trascrizione lungo il gene HIF-1 α in seguito al trattamento con CPT.

Sono state inoltre fatte analisi di RT-qPCR su RNA totale estratto dalla linea cellulare Jurkat 6 (leucemia umana) trattate o meno con 10 μ M di CPT in ipossia (1% O₂) o normossia (21% O₂) (fig. 4.6). Si può notare che anche in questa linea cellulare vi è un aumento dell'antisenso rispetto all'mRNA di HIF-1 α dipendente dalla cinetica di trattamento con CPT, simile a quello riscontrato nella linea cellulare HCT 116.

Sono state valutate tramite northern blot anche differenze nei livelli di espressione dell'mRNA di HIF-1 α su cellule HCT 116 (dati non mostrati) e Jurkat 6 in ipossia o normossia, utilizzando come sonda l'amplicone della coppia di primer studiati sull'esone 2 (25 kb) (figura 4.5B). Vi è un calo del trascritto dopo 4 ore di trattamento con 10 μ M di CPT in Jurkat 6 sia in condizioni normossiche sia ipossiche, dipendentemente dalla cinetica del trattamento. Dati non mostrati su HCT 116 mostrano che i livelli di mRNA di HIF-1 α calano del 30% solo in linee dove la Top1 non è silenziata, dimostrando che l'effetto è Top1 dipendente.

Analizzando la banda corrispondente all'mRNA di HIF-1 α in figura 4.5B si nota inoltre che nel campione non trattato in condizioni ipossiche la quantità di trascritto di HIF-1 α è maggiore rispetto a quella registrata in condizioni normossiche, inoltre in condizioni ipossiche c'è una diminuzione maggiore di trascritto all'aumentare del tempo di trattamento con CPT (fig. 4.5B).

Inoltre, osservando i risultati (fig. 4.5 e 4.6) si nota che, all'aumentare del tempo di trattamento con il farmaco CPT, esiste una corrispondenza tra l'aumento dell'antisenso e una diminuzione del trascritto di HIF-1 α .

I dati ottenuti permettono di concludere che l'aumento dell'antisenso in 5' e la diminuzione del mRNA del gene HIF-1 α sono CPT- e Top1-dipendenti, e indipendenti dal tipo cellulare.

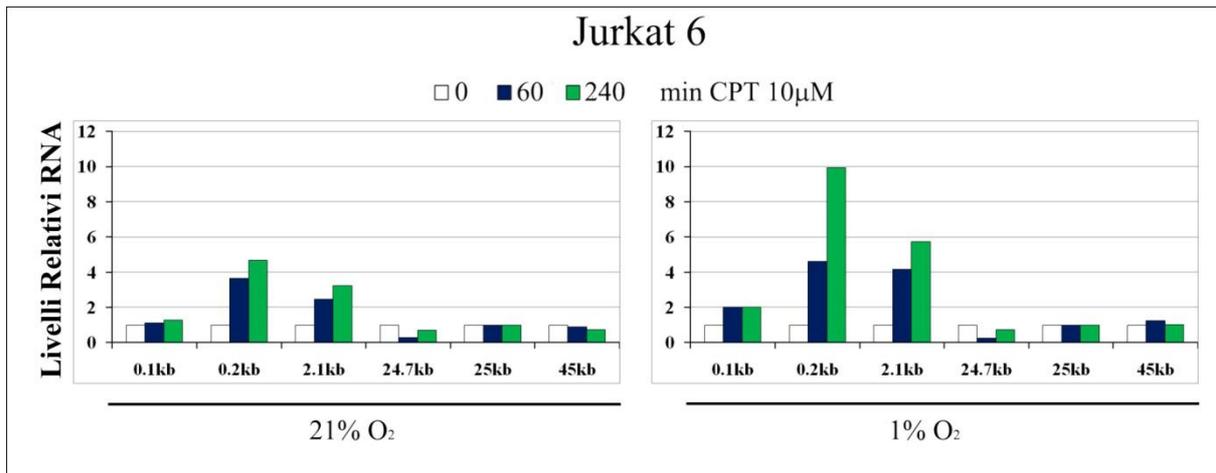


Figura 4.6

Livelli di trascritti misurati tramite RT-qPCR in seguito a trattamenti con 10 μ M CPT per i tempi indicati in normossia (21% O₂ grafico di sinistra) o ipossia (1% O₂ grafico di sinistra) su cellule Jurkat 6. I risultati sono stati normalizzati rispetto al controllo (non trattato) e alla regione corrispondente all'esone 2 di HIF-1 α (25 kb). In ascissa sono indicati gli ampliconi utilizzati espressi come distanza in basi dal TSS di HIF-1 α (vedi fig. 4.1). La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. L'esperimento mostrato è rappresentativo.

4.2 L'ATTIVAZIONE DEL TRASCritto ANTISENso 5'aHIF-1 α NON DIPENDE DAL DANNO AL DNA ALLA FORCA DI REPLICAZIONE

È noto che il trattamento con CPT ha un effetto citotossico dovuto alle rotture a doppio filamento che occorrono quando la TOP1 bloccata dal farmaco sul DNA viene a collidere con una forca replicativa in avanzamento [155]. Questo porta appunto ad attivazione dei *checkpoint* di riparazione del danno ed eventualmente a morte cellulare [26].

Per stabilire se l'attivazione dell'antisense in seguito a trattamento con CPT sia dovuto al danno al DNA dipendente da replicazione, sono stati utilizzati composti che inibiscono le DNA polimerasi replicative, come afidicolina (APH), o le chinasi ATM ("Ataxia-Telangiectasia Mutated") e ATR ("ATM-RAD3 Related"), come caffeina (Caff), che controllano i checkpoint della risposta cellulare al danno sul DNA. Esperimenti effettuati nel nostro laboratorio indicano che il co-trattamento con APH/Caff e CPT

diminuiscono la presenza dell'istone H2AX fosforilato (marcatore di doppie rotture sul DNA) rispetto al trattamento con sola CPT [59]. Entrambi i composti sono stati utilizzati per trattare le HCT 116 per 2 ore con o senza CPT. Quindi sono state effettuate analisi di RT-qPCR sull'RNA totale estratto. Come detto in precedenza gli ampliconi utilizzati "2.1 kb" e "25 kb" saranno indicati in figura 4.7 come "5'aHIF-1 α " e "HIF-1 α " rispettivamente.

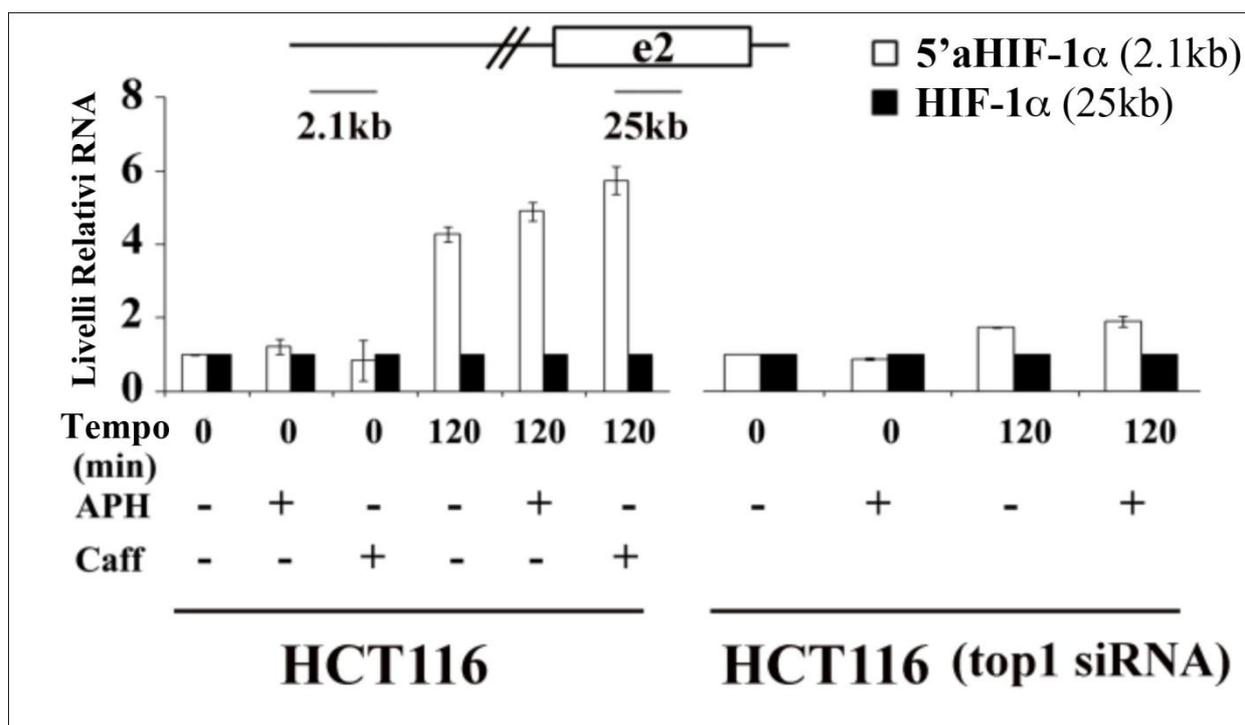


Figura 4.7.

I livelli di 5'aHIF-1 α (2.1 kb) sono stati determinati tramite qPCR e normalizzati sui livelli del controllo non trattato e dell'mRNA dell'esone 2 (25 kb). L'RNA totale è stato estratto da cellule non trattate (0) o trattate con 10 μ M di CPT per 2 ore con o senza 5 μ M di afidicolina (APH) o 5mM di caffeina (Caff). I grafici a destra e a sinistra mostrano i risultati ottenuti da cellule HCT 116 e HCT 116 con top1 silenziata (top1 siRNA) rispettivamente. La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti. [59]

La figura 4.7 mostra che la CPT attiva la trascrizione antisense sia in assenza che in presenza di APH o Caff, dimostrando che si tratta di un meccanismo indipendente dalle rotture al DNA che avvengono in seguito allo scontro tra la TOP1 bloccata sul DNA e la forza replicativa e dalla risposta

cellulare alle doppie rotture sul DNA. Al contrario, co-trattando o meno con APH e CPT la linea HCT 116 (top1-siRNA) non c'è più aumento dell'antisenso in entrambi i casi, confermando ancora una volta la dipendenza del fenomeno dalla presenza della topoisomerasi I nella cellula.

4.3 L'RNA ANTISENSO 5'aHIF-1 α RISULTA ESSERE POLIADENILATO ED AVERE STRUTTURA CAP IN 5'

Dato che le proprietà strutturali di un trascritto possono essere utili per definire il meccanismo di funzionamento dell'RNA in questione [156-159], abbiamo deciso di controllare l'eventuale presenza di CAP in 5' e lo stato di poliadenilazione del trascritto.

Pertanto è stata estratta la frazione di RNA poliadenilato da cellule HCT 116 trattate con 10 μ M di CPT. Successivamente l'RNA è stato sottoposto ad analisi di RT-qPCR per valutare la presenza o meno dell'antisenso 5'aHIF-1 α (fig. 4.8A). I livelli di trascrizione sono stati normalizzati sui campioni non trattati e sui livelli dell'mRNA di HIF-1 α (esone 2, in Fig. 4.8A). Le determinazioni dei livelli di RNA ribosomiale 18s e DNA α -satellite hanno confermato l'arricchimento della frazione di RNA poliadenilato nei campioni e l'assenza di contaminazioni da DNA genomico (Fig. 4.9A).

In figura 4.8A si nota che il 5'aHIF-1 α aumenta in seguito a trattamenti con CPT a livelli simili, se non superiori, rispetto allo stesso tipo di analisi effettuate sull'RNA totale della cellula (fig. 4.3). Questo indica che l'antisenso in 5' rispetto al gene HIF-1 α è nella frazione arricchita e dunque è un trascritto poliadenilato.

Per determinare la presenza di CAP in 5' nel trascritto antisenso, la frazione di RNA con CAP è stata separata dal resto tramite colonna d'affinità utilizzando il fattore eIF4E murino ("murine CAP-binder translation initiation factor 4E"). I livelli dell'mRNA di HIF-1 α e del 5'aHIF-1 α sono stati determinati tramite RT-qPCR come rapporto tra la frazione "bound" (RNA che si sono legati al fattore eIF4E e quindi aventi CAP in 5') e la frazione "unbound" (RNA eluiti in colonna quindi senza CAP in 5') (fig. 4.8B).

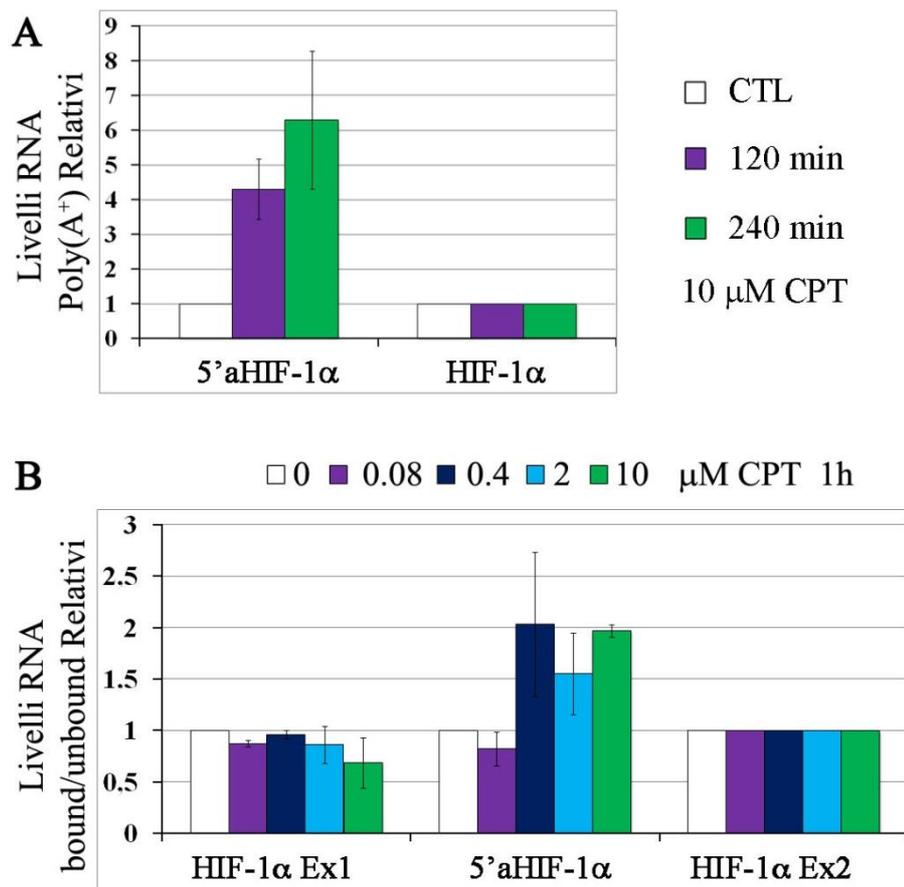


Figura 4.8

A: La frazione di RNA Poly(A⁺) è stata isolata da cellule HCT 116 trattate o meno con 10 μM di CPT per i tempi indicati. I livelli di RNA delle differenti regioni del locus genico di HIF-1α sono state rilevate con RT-qPCR e normalizzate per il controllo non trattato e per la regione dell'esone 2 di HIF-1α (25 kb). La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α-satellite. Tutti i valori sono medie ± S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti. B: In seguito all'estrazione di RNA da cellule HCT 116 trattate alle concentrazioni indicate di CPT per 1 ora, le frazioni di RNA con CAP ("bound") o senza ("unbound") sono state isolate attraverso l'uso di una colonna di affinità (vedi materiali e metodi). I livelli di RNA sono stati quantificati in RT-qPCR. Il grafico esprime i valori come rapporto tra la frazione legata (bound) e non (unbound) alla colonna d'affinità. I valori sono stati poi normalizzati per il controllo non trattato e per la regione relativa all'esone 2 di HIF-1α Ex2 (25 kb). La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α-satellite. Tutti i valori sono medie ± S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

I bassi livelli ottenuti tramite qPCR delle regioni dell'α-satellite e RNA ribosomiale 28S confermano l'assenza di contaminazioni da DNA genomico e l'arricchimento della frazione di RNA con CAP (fig. 4.9B).

Anche in questo caso si notano (figura 4.8B) aumenti del trascritto antisenso nella frazione di RNA con CAP molto simili agli aumenti riscontrati sull'RNA totale (fig. 4.3), indice del fatto che l'antisenso 5'aHIF-1 α sia un trascritto avente CAP in 5'.

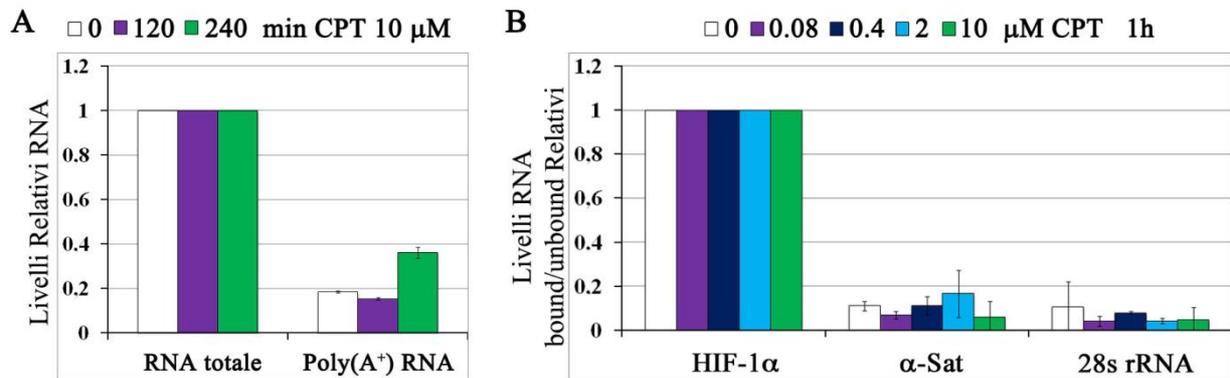


Figura 4.9

A: La frazione di RNA Poly(A⁺) è stata isolata da cellule HCT 116 trattate o meno con 10 μ M di CPT per i tempi indicati. I livelli di RNA delle differenti regioni del locus genico di HIF-1 α sono state rilevate con RT-qPCR e normalizzate per la regione relativa all'rRNA 18s (RNA totale). La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti. B: In seguito all'estrazione di RNA da cellule HCT 116 trattate alle concentrazioni indicate di CPT per 1 ora, le frazioni di RNA con CAP ("bound") o senza ("unbound") sono state isolate attraverso l'uso di una colonna di affinità (vedi materiali e metodi). I livelli di RNA sono stati quantificati in RT-qPCR. Il grafico esprime i valori come rapporto tra la frazione legata (bound) e non (unbound) alla colonna d'affinità. I valori sono stati poi normalizzati per la regione relativa all'esone 2 di HIF-1 α (HIF-1 α). La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

Quindi i nostri dati indicano che il 5'aHIF-1 α possiede una coda di poliA⁺ e una struttura 5'CAP, a differenza dell'altro antisenso aHIF in 3' (che d'ora in poi chiameremo "3'aHIF-1 α ") che non possiede nessuna delle due modificazioni sopra citate [100]. Analisi non riportate, effettuate nel nostro laboratorio, rivelano la presenza dell'antisenso 5'aHIF-1 α , ma non del 3'aHIF-1 α , in esperimenti di RIP ("RNA-Chromatin Immuno-Precipitation") su RNA immunoprecipitato utilizzando un anticorpo contro l'RNA polimerasi II [59]. Questo suggerisce che il 5'aHIF-1 α venga trascritto dalla RNA Pol II al

contrario del 3'aHIF-1 α ; ciò potrebbe essere correlato a differenze nella maturazione e nel processamento post-trascrizionale dei due trascritti. Infine, analisi effettuate sulla sequenza dell'antisenso 5'aHIF-1 α non hanno rilevato alcuna evidente ORF, tuttavia sarà necessario ripetere l'analisi dopo aver definito il sito di inizio della trascrizione.

4.4 TRATTAMENTI CON CPT ATTIVANO LA TRASCRIZIONE DELL'ANTISENDO 3'aHIF-1 α IN CELLULE HCT 116

È noto che l'antisenso 3'aHIF-1 α venga trascritto in seguito a prolungati periodi di ipossia [100, 160], e quindi abbiamo voluto verificare se anche i livelli di questo trascritto antisenso potessero essere influenzati da trattamento con CPT. Quindi sono state effettuate analisi di PCR su cDNA retrotrascritti specificamente per il filamento senso o antisenso. La coppia di primer utilizzata per analizzare il trascritto antisenso in 3' cade a cavallo della sequenza di terminazione/poliadenilazione del gene HIF-1 α . Dato che la trascrizione dei geni procede oltre il sito di poliadenilazione, è stata rilevata una debole banda su gel d'agarosio su campioni retrotrascritti sul filamento senso (fig. 4.10). Questa banda, che corrisponde appunto all'mRNA di HIF-1 α , svanisce in seguito a trattamento con 10 μ M di CPT per 4 ore, confermando i dati che sostengono una diminuzione del trascritto di HIF-1 α dopo trattamento con CPT.

Al contrario il segnale corrispondente all'antisenso 3'aHIF-1 α è stato rilevato solamente dopo trattamento con CPT alle condizioni sopra citate (fig. 4.10).

Anche sui campioni retrotrascritti con random primer risulta un segnale solo dopo trattamento con CPT, che sta a significare che il trascritto 3'aHIF-1 α è presente in modo più abbondante rispetto alla coda dell'mRNA di HIF-1 α che verrà processata. Quindi l'aumento del segnale ritrovato su cDNA totale è da imputare ad un aumento della trascrizione antisenso e non il contrario.

Concludiamo che sia l'antisense 5'aHIF-1 α che il 3'aHIF-1 α vengono attivati in seguito a trattamento con CPT nella linea cellulare HCT 116.

Analisi di RIP effettuate parallelamente nel nostro laboratorio dimostrano che in seguito a trattamento con CPT i due ncRNA vengono attivamente trascritti e che l'inibizione della trascrizione inibisce anche il loro accumulo [59].

Inoltre analisi di ChIP su HCT 116 trattate o meno con 10 μ M di CPT per 4 ore mostrano una maggior apertura cromatinica nelle regioni trascritte antisense, dato che concorda con l'ipotesi che il farmaco stimoli la trascrizione di questi trascritti [59].

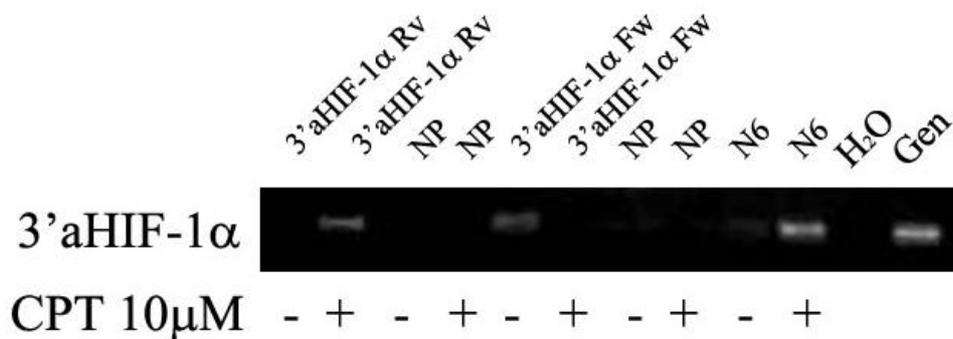


Figura 4.10

Analisi di PCR su cDNA retrotrascritti in modo primer-specifico da RNA di cellule HCT 116. I primer “Fw” sono stati disegnati per appaiare l’ mRNA di HIF-1 α , mentre i primer “Rv” appaiano l’RNA antisense ad HIF-1 α . L’RNA totale è stato estratto da cellule trattate (+) o meno (-) con 10 μ M di CPT per 4 ore. I primer utilizzati per la retrotrascrizione sono indicati sopra il gel, mentre la coppia di primer utilizzata per la qPCR è indicata a lato. I controlli negativi e positivi per la retrotrascrizione sono rispettivamente “nessun primer” (NP) e random primer (N6). I controlli negativi e positivi della PCR sono l’acqua (H₂O) e il DNA genomico (G) utilizzati come template. La contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite (non mostrato). [161]

4.5 GLI RNA ANTISENDO 5’ e 3’aHIF-1 α SONO TRASCritti NUCLEARI

Per poter determinare l’eventuale meccanismo che vede coinvolti il 5’ ed il 3’aHIF-1 α nella regolazione di HIF-1 α abbiamo studiato la loro

localizzazione all'interno della cellula tramite analisi di FISH e RT-qPCR su RNA nucleare o citoplasmatico.

Il frazionamento cellulare dimostra che i due lncRNA sono trascritti principalmente nel nucleo, mentre l'mRNA di HIF-1 α è stato ritrovato in entrambe le frazioni cellulari con prevalenza citoplasmatica (fig. 4.11). Come controllo del corretto frazionamento abbiamo utilizzato in RT-qPCR due ampliconi per trascritti prevalentemente citoplasmatici (citocromo B trascritto nel mitocondrio) o nucleari (parte finale dell'introne 1 di HIF-1 α , dato che lo splicing è un meccanismo co-trascrizionale, le regioni introniche rimangono nel nucleo [154]).

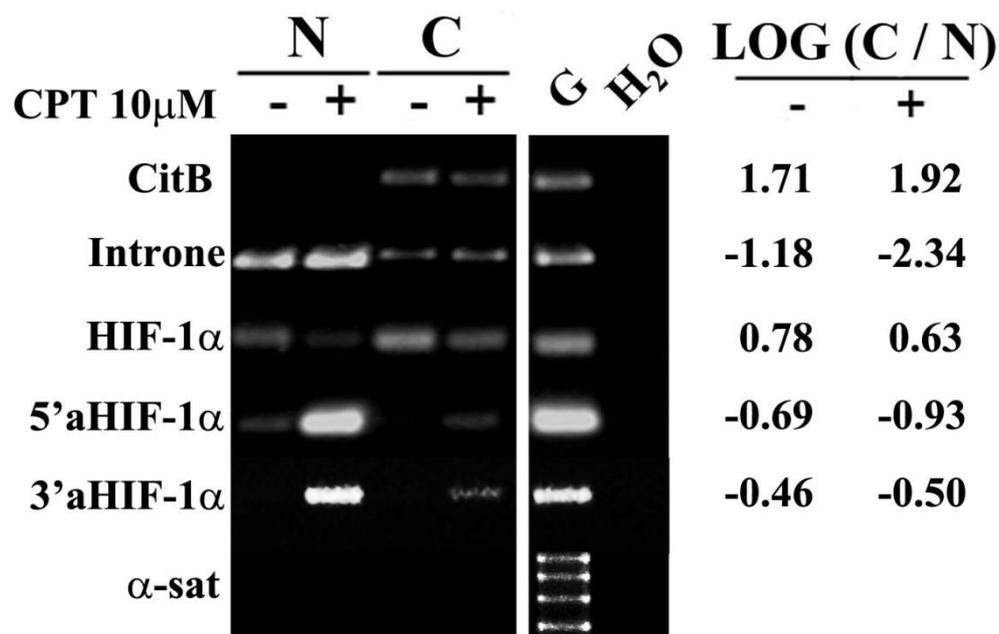


Figura 4.11

L'RNA totale è stato estratto dal frazionamento nucleare (N) e citoplasmatico (C) di cellule HCT 116 trattate (+) o meno (-) con 10 μ M di CPT per 4 ore. Primer specifici per il trascritto della citocromo B ossidasi mitocondriale (CitB) o per una regione intronica di HIF-1 α (Introne, 24.7 kb) sono stati usati come controllo del corretto frazionamento citoplasmatico o nucleare rispettivamente. I controlli negativi e positivi della PCR sono l'acqua (H₂O) e il DNA genomico (G) utilizzati come template. L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite (α -sat). I numeri riportati sulla destra del gel mostrano la tendenza dei trascritti ad essere più citoplasmatici (>1) o nucleari (<1) e sono espressi come Log(C/N). [161]

La localizzazione del 5'aHIF-1 α è stata inoltre analizzata con tecniche di RNA-FISH, utilizzando come sonde filamento specifiche composte da ssRNA retrotrascritto *in vitro*. Le immagini di FISH mostrano che sia l'mRNA di HIF-1 α sia l'antisenso 5'aHIF-1 α si accumulano nella regione perinucleare della cellula (fig. 4.12A). Anche se questa tecnica non è sensibile come una qPCR, questi esperimenti confermano che la CPT diminuisce il segnale relativo all'mRNA di HIF-1 α mentre aumenta quello relativo all'antisenso 5'aHIF-1 α (fig. 4.12A). Sono state quindi eseguite analisi di RNA FISH su HCT 116 in seguito ad una cinetica di trattamenti con CPT. Dalla figura 4.12B si può notare che l'antisenso 5'aHIF-1 α aumenta dopo esposizione alla CPT tra le 8 e le 15 ore, dopodiché il suo segnale specifico diminuisce alle 18 ore. Probabilmente ciò è dovuto ad apoptosi cellulare dato trattamenti di 10 μ M CPT prolungati sono altamente tossici.

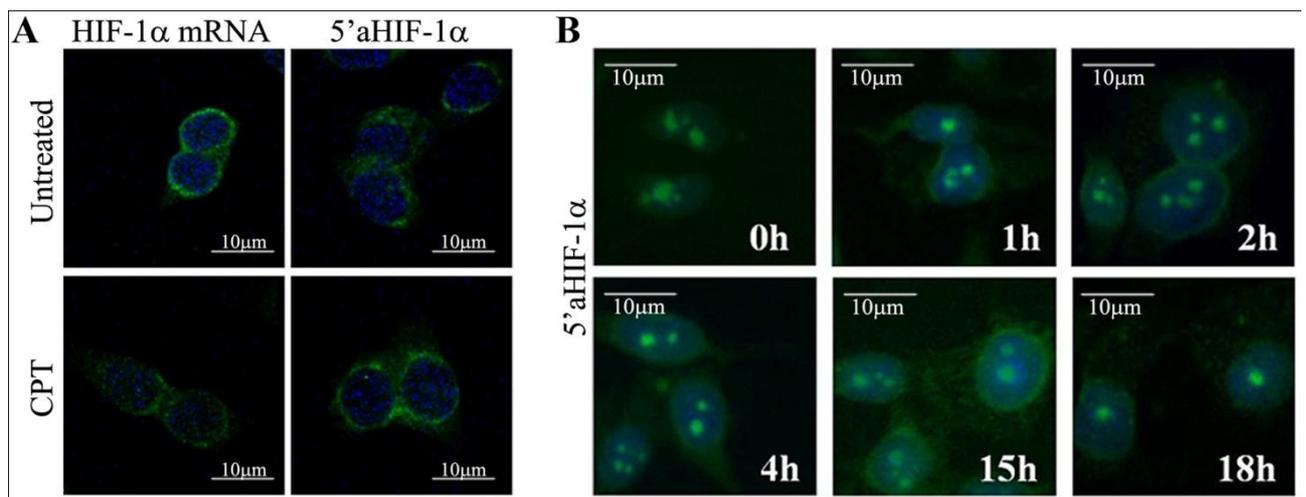


Figura 4.12

A: localizzazione cellulare del trascritto senso ed antisenso di HIF-1 α tramite tecnica di RNA FISH. Le cellule HCT 116 sono state trattate per 4 ore con 10 μ M di CPT. I trascritti senso ed antisenso sono mostrati in verde utilizzando sonde a ssRNA antisenso o senso rispettivamente (corrispondenti alla regione 0.05 kb di HIF-1 α) marcate con digoxigenina. Successivamente le cellule sono state incubate con anticorpo anti digoxigenina (Ab anti-FITC in verde). Il DNA è stato contrastato con DAPI (in blu). Le cellule mostrate sono rappresentative. B: RNA FISH su cellule HCT 116 trattate per i tempi indicati con 10 μ M di CPT. L'antisenso 5'aHIF-1 α è visualizzato in verde utilizzando una sonda a ssRNA specifica (sulla regione 0.05 kb). L'esperimento mostrato è rappresentativo. [161]

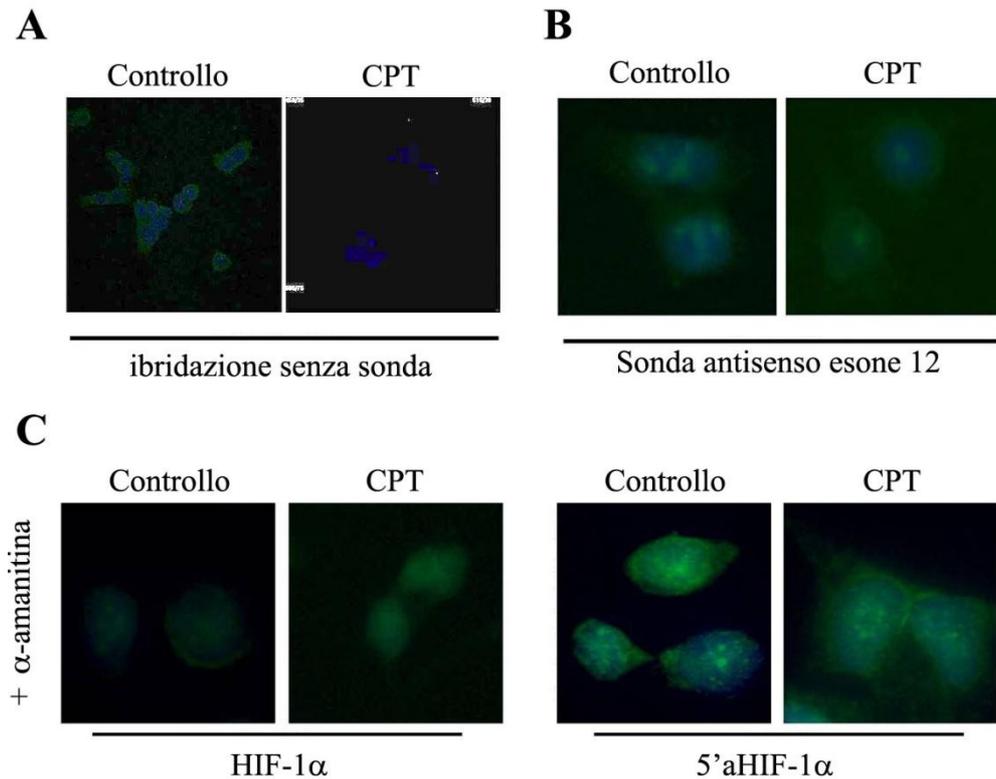


Figura 4.13

A: Le HCT 116 sono state trattate o meno con 10 μ M di CPT per 4 ore, quindi incubate con anticorpo anti-digoxigenina (Ab-FITC). In questo esperimento di controllo non è stata utilizzata alcuna sonda a RNA marcata con digoxigenina. Il DNA è stato marcato con DAPI (in blu). B: Localizzazione cellulare di RNA antisenso ad HIF-1 α tramite esperimenti di FISH con sonda a ssRNA filamento specifica in seguito a trattamenti con CPT. La sonda è stata studiata per legare un eventuale trascritto antisenso nella regione dell'esone 12 di HIF-1 α (45 kb). Il DNA è stato contrastato con DAPI (in blu). C: localizzazione cellulare di RNA senso ed antisenso tramite FISH filamento specifica in risposta a trattamenti con CPT su HCT 116. Le cellule sono state pre-trattate o meno con 10 μ M di α -amanitina (inibitore della trascrizione) per 17 ore. RNA senso ed antisenso sono stati rilevati utilizzando una sonda a ssRNA marcata con digoxigenina studiata per appaiare la regione del primo esone di HIF-1 α (0.05 kb). Il DNA è stato contrastato con DAPI (in blu). Tutti gli esperimenti mostrati in figura 4.13 sono rappresentativi.

Controlli negativi effettuati senza l'utilizzo della sonda o usando una sonda che appaia una porzione dell'esone 12 di HIF-1 α (regione in cui non è mai stata rilevata trascrizione antisenso) non hanno mostrato alcun segnale (fig. 4.13A-B). Trattamenti con un inibitore dell'RNA Pol II (α -amanitina) abolisce completamente il segnale del 5'aHIF-1 α indotto da trattamento con

CPT (fig. 4.13C), suggerendo ancora una volta la possibilità che il trascritto sia sintetizzato dalla RNA Pol II.

Analisi sulle intensità di fluorescenza rilevata nelle regioni nucleari e perinucleari, in una media di 50 cellule per ogni ora di trattamento studiata, confermano l'accumulo di 5'aHIF-1 α nella zona perinucleare dopo trattamento con CPT (fig. 4.14).

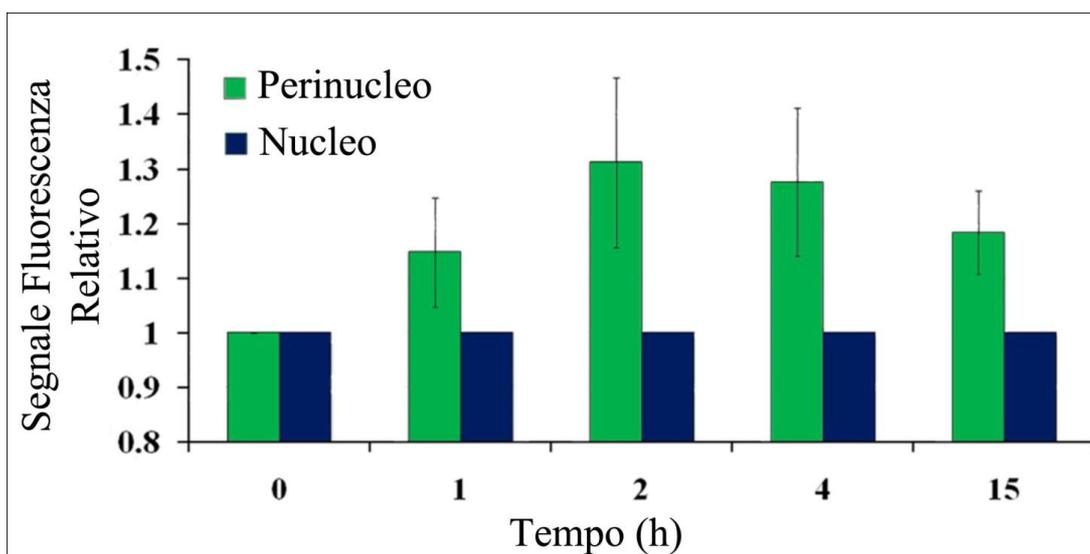


Figura 4.14

Analisi quantitative dell'intensità nucleare (blu) e perinucleare (verde) dell'RNA antisenso ad HIF-1 α . Le cellule HCT 116 sono state sottoposte a trattamenti con 10 μ M di CPT per i tempi indicati. L'RNA antisenso è stato rilevato utilizzando una sonda a ssRNA filamento specifica corrispondente alla regione dell'esone 1 di HIF-1 α (0.05 kb). Il programma usato per misurare il segnale della fluorescenza è "Image J". Successivamente i valori sono stati normalizzati per il controllo non trattato (0) e per il segnale nucleare. I valori corrispondono alle medie \pm S.D. di almeno 50 determinazioni per tempo di trattamento. [161]

Sono stati utilizzati due protocolli di RNA-FISH che differiscono per il passaggio di pre-ibridazione per l'uso o meno di DNA aspecifico che legni strutture cellulari per aumentare la stringenza (vedi materiali e metodi). Questo passaggio riduce il legame aspecifico della sonda con le strutture nucleolari (confronto fig. 4.15A e B). Anche in quest'ultimo caso comunque, il 5'aHIF-1 α è stato ritrovato sulla membrana nucleare.

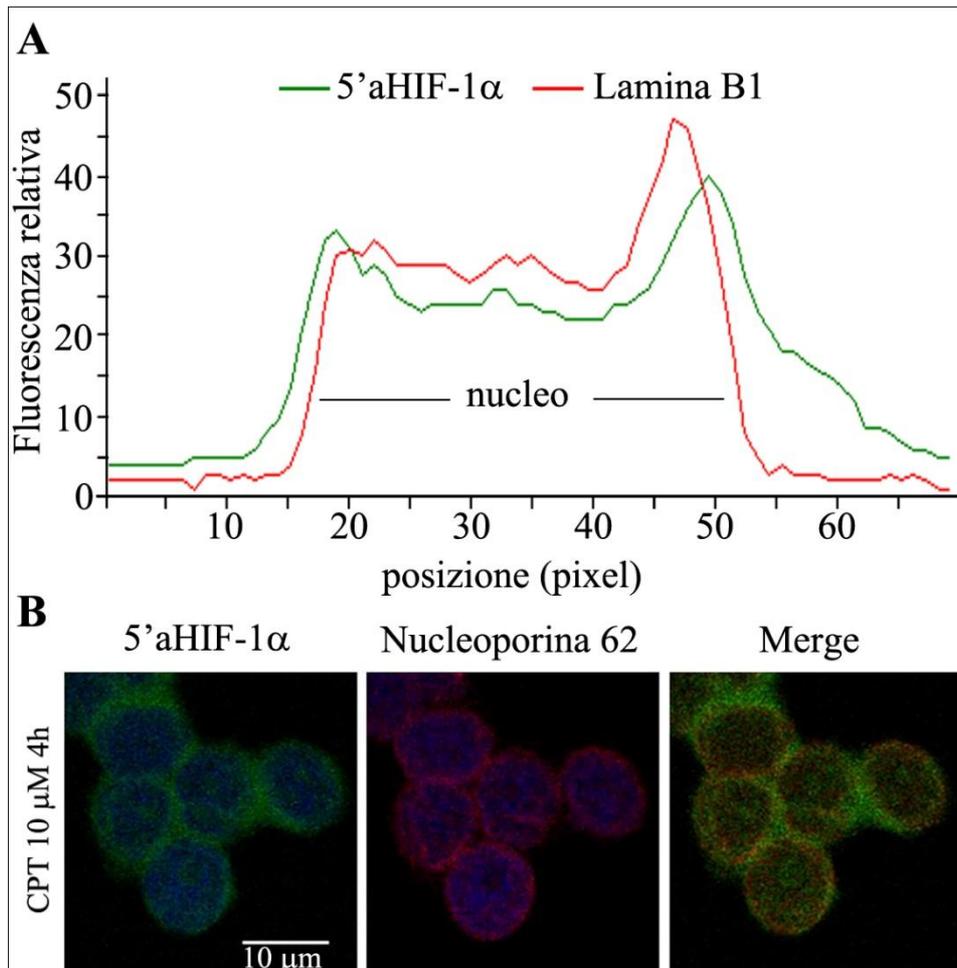


Figura 4.15

A: Co-localizzazione dell'RNA 5'aHIF-1 α e dei fattori del poro nucleare tramite RNA FISH filamento specifica accoppiata con analisi di immunofluorescenza in risposta a trattamenti con CPT. Le cellule HCT 116 sono state trattate con 10 μ M di CPT per 4 ore. L'RNA antisense rilevato con sonda a ssRNA studiata sul primo esone di HIF-1 α (0.05 kb) è mostrato in verde. La lamina B1 rilevata tramite anticorpo specifico è mostrata in rosso. B: Esperimenti di co-localizzazione del 5'aHIF-1 α (verde) e la proteina Nup62 (rosso) tramite RNA FISH filamento specifica accoppiata con analisi di immunofluorescenza in risposta a trattamenti con CPT. Le cellule HCT 116 sono state trattate con 10 μ M di CPT per 4 ore. Il DNA è stato contrastato con DAPI (blu). Le cellule mostrate nell'esperimento sono rappresentative. [161]

Per meglio definire l'accumulo perinucleare sono stati effettuati esperimenti di RNA FISH accoppiati con analisi di immunofluorescenza sulla lamina B1 e nucleoporina 62 (Nup62) (fig. 4.15A-B). La lamina B1 è una

componente della lamina nucleare, uno strato fibroso che risiede sul lato interno della membrana nucleare; mentre la Nup62 è una componente del complesso del poro nucleare (NPC) coinvolto nell'importazione nucleare delle proteine e nel trasporto dell'mRNA fuori dal nucleo.

I risultati mostrano che l'accumulo dell'RNA antisenso risiede in una regione del perinucleo molto vicina alla posizione della lamina B1 (fig. 4.15A). Come conferma, della sua posizione perinucleare, il segnale dell'RNA del 5'aHIF-1 α è stato rilevato in sovrapposizione al segnale della Nup62 (fig. 4.15B). Queste ultime analisi indicano dunque che l'RNA dell'antisenso 5'aHIF-1 α in seguito a trattamenti con CPT si accumula sulla membrana nucleare o in una posizione adiacente ad essa.

4.6 GLI RNA 5' e 3'aHIF-1 α SONO PRESENTI IN CARCINOMI RENALI UMANI

Per capire se i due antisenso di HIF-1 α potessero avere un ruolo nello sviluppo del cancro nei pazienti, abbiamo studiato i livelli di RNA antisenso in campioni di carcinomi renali umani (Tabella 4.1). I trascritti antisenso sono stati rilevati con retrotrascrizione primer-specifica e qPCR in 12 campioni (Fig. 4.16) confermando la loro presenza non solo in linee cellulari tumorali trattate con CPT ma anche in tessuti umani di cancro del rene.

Abbiamo poi determinato e confrontato livelli di espressione degli RNA antisenso tramite analisi di qPCR su RNA totale (Tabella 4.1 e fig. 4.17). I risultati hanno dimostrato che gli RNA 5'aHIF-1 α e 3'aHIF-1 α sono espressi in 21 e 13 campioni, rispettivamente, su un totale di 26. Inoltre l'mRNA di HIF-1 α è risultato ampiamente espresso. Sebbene il numero dei pazienti sia limitato, dal nostro studio emerge che i ncRNAs sono espressi maggiormente in tumori con basso grado e di tipo "non chiaro" (Tabella 4.1).

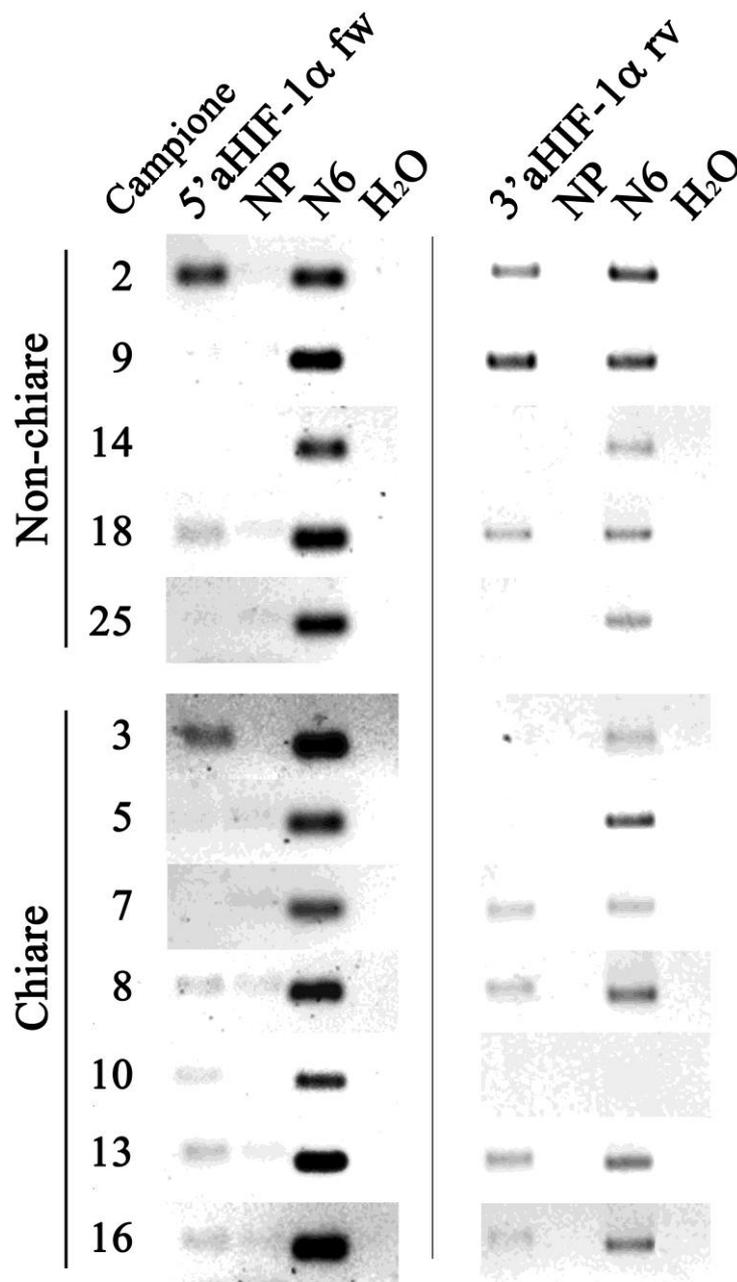


Figura 4.16

Analisi di PCR su RNA retrotrascritti in modo primer-specifico da tessuti umani di cancro renale. Primer specifici usati per la retrotrascrizione del 5'aHIF-1α (2.1 kb Fw) e 3'aHIF-1α (3'aHIF-1α Rv vedi tabella primer) sono indicati in alto sul gel. Su ogni campione indicato a sinistra (inizialmente numerati da 1 a 26) è stata effettuata una qPCR analizzando l'amplicone che amplifica la regione per l'antisense in 5' (colonna di sinistra) o in 3' (colonna di destra). I controlli negativi e positivi della retrotrascrizione sono no primer (NP) e random primer (N6) rispettivamente. Come controllo negativo per la PCR è stata utilizzata l'acqua come template (H2O). La legenda "chiare" e "non chiare" si riferisce all'istologia tumorale di cui le cellule dei campioni fanno parte. I gel mostrano esperimenti rappresentativi di almeno 4 ripetizioni per ogni campione. [161]

In accordo con risultati riportati in letteratura [100], un'alta espressione di 3'aHIF-1 α è associata maggiormente a tumori umani non papillari renali, infatti, sono stati rilevati bassi livelli di presenza del 3'aHIF-1 α in campioni papillari (fig. 4.17 campioni 23 e 25). I risultati indicano che i ncRNAs associati al locus genico di HIF-1 α sono presenti anche in tumori umani ed entrambi potrebbero essere correlati a specifiche caratteristiche del tumore.

Tabella 4.1

Caratteristiche dei tumori ed espressione degli RNA del locus genico di HIF-1 α

Grado Tumorale	N (%)	5'aHIF-1 α			3'aHIF-1 α			HIF-1 α mRNA		
		HIGH	LOW	Null	HIGH	LOW	Null	HIGH	LOW	Null
G1	4 (15.4)	2	2	0	0	3	1	3	1	0
G2	13 (50.0)	4	8	1	1	5	7	4	8	1
G3	6 (23.1)	1	5	0	1	1	4	2	3	1
G4	1 (3.8)	0	1	0	0	1	0	0	1	0
N.D.	2 (7.7)	0	2	0	0	1	1	1	1	0
Istologia	N (%)	HIGH	LOW	Null	HIGH	LOW	Null	HIGH	LOW	Null
Chiare	20 (76.9)	5	14	1	-	9	11	7	12	1
Non chiare	6 (23.1)	2	4	0	2	2	2	3	2	1
TOTALE	26 (100)	7	18	1	2	11	13	10	14	2

Sono stati analizzati un totale di 26 campioni di cancro renale umano: 14 (53,8%) e 12 (46,2%) derivano da pazienti femminili e maschili rispettivamente. 23 tumori derivano da pazienti che non sono stati trattati con alcuna terapia. High, low e null si riferiscono ai valori di PCR che sono >30%, tra il 30% e l'1% e <1% rispettivamente, rispetto al valore più alto. I valori di qPCR che sono stati utilizzati per compilare la tabella sono medie di 4 determinazioni da almeno 2 esperimenti indipendenti (fig. 4.17) [161]

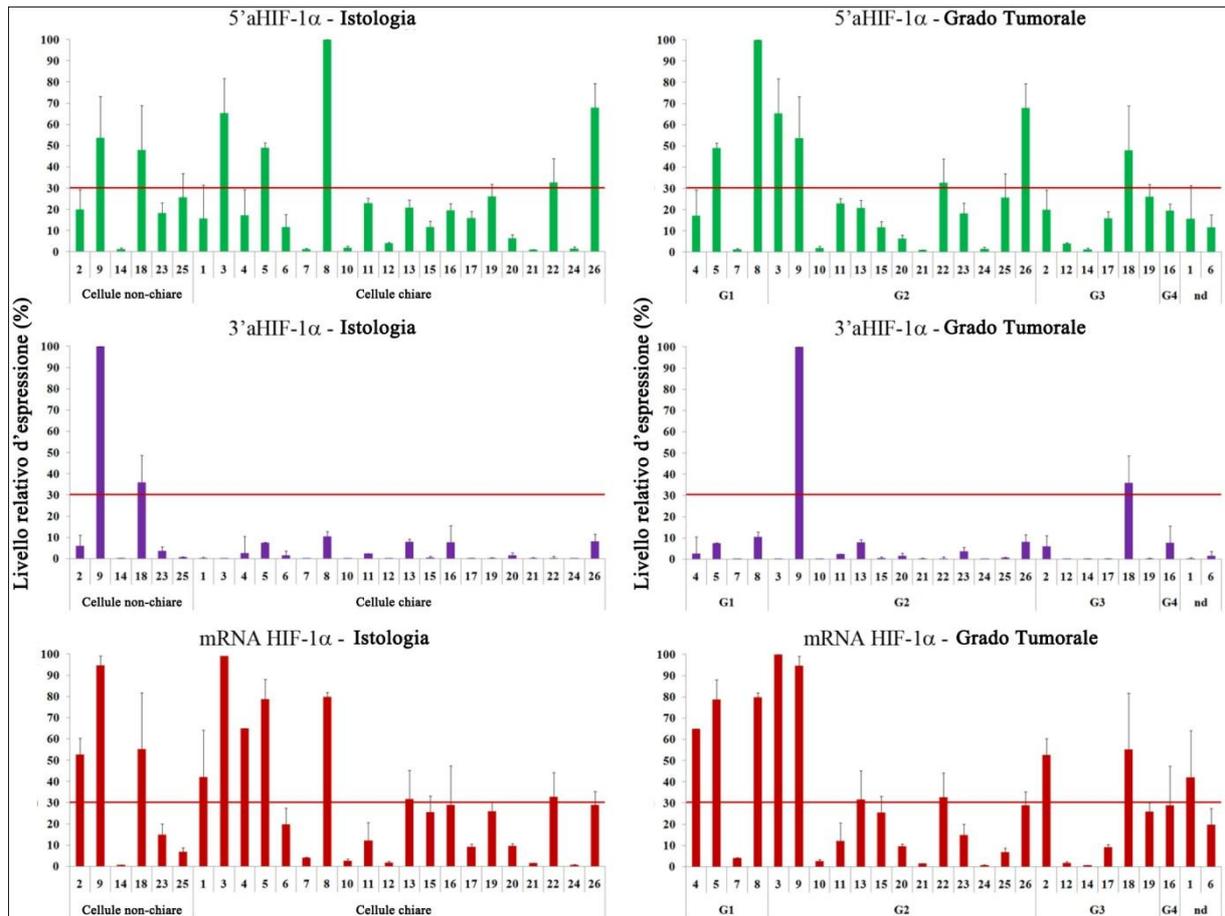


Figura 4.17

Analisi di RT-qPCR su RNA estratto da 26 tumori umani del rene. Sono evidenziati i livelli dell'antisense 5'aHIF-1 α (in verde, amplicone 2.1 kb), 3'aHIF-1 α (in viola, amplicone 3'aHIF-1 α) e dell'mRNA di HIF-1 α (in rosso, amplicone 25 kb). I dati sono stati normalizzati per il valore più alto. I campioni sono divisi per istologia (sinistra) o grado tumorale (destra). La linea rossa in ogni grafico evidenzia il valore 30%, utilizzato per compilare la tabella 4.1. L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

4.7 GLI RNA ANTISENTO IN 5' E 3' AD HIF-1 α VENGONO ATTIVATI IN BASE A TIPI E STRESS CELLULARI DIFFERENTI

È stato trovato in precedenza che i due RNA antisense vengono attivati da trattamenti 10 μ M di CPT al 5' e 3' rispetto al locus genico del gene umano di HIF-1 α nella linea cellulare umana HCT 116 [59]. Per acquisire ulteriori informazioni utili per stabilire la loro funzione cellulare sono state

analizzate le loro proprietà strutturali e funzionali da noi e da altri laboratori [100]. In letteratura è noto che l'RNA antisenso 3'aHIF-1 α viene trascritto in cellule A549 in seguito a prolungati periodi di ipossia come possibile inibitore del gene HIF-1 α [100]. Sembra infatti che in seguito alla sua attivazione l'emivita dell'mRNA di HIF-1 α si riduca di 10 volte circa, favorendo così la diminuzione nei livelli di proteina a favore dell'entrata in scena del fattore HIF-2 α .

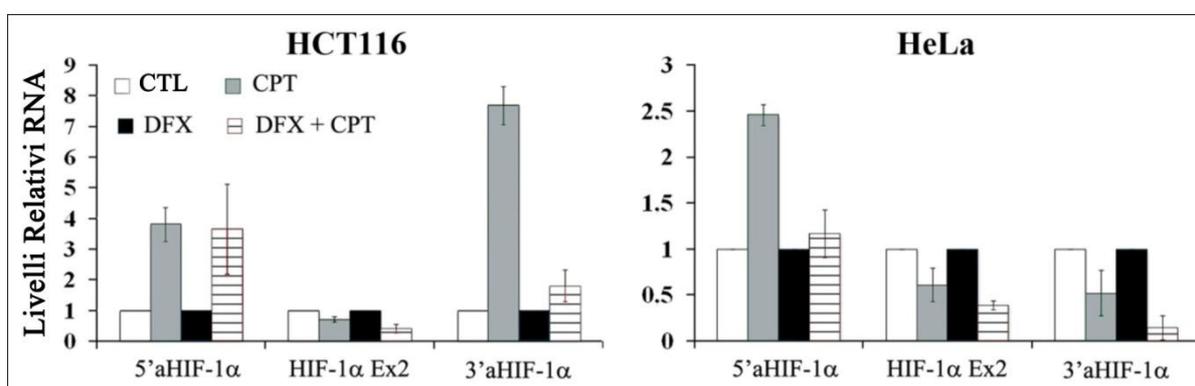


Figura 4.18

Livelli di trascrizione in cellule HCT 116 (sinistra) e HeLa (destra) trattate con DFX (250 μ M) e/o CPT (10 μ M) per 4 ore. I valori ottenuti sono stati normalizzati per i valori dell'amplicone relativo al CitB (vedi tabella primer). I campioni trattati con sola CPT sono stati successivamente normalizzati per i valori del controllo non trattato, mentre i valori co-trattati con DFX e CPT sono stati normalizzati per i valori dei trattati con sola DFX. 5'aHIF-1 α si riferisce all'amplicone 2.1 kb, 3'aHIF-1 α all'amplicone 3'aHIF-1 α e HIF-1 α Ex2 alla coppia di primer 25 kb. L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti [161]

Perciò abbiamo voluto verificare se e quanto le condizioni ipossiche possano influire sull'attivazione dei trascritti antisenso in 5' e 3' rispetto ad HIF-1 α nelle nostre condizioni sperimentali e sulle linee cellulari a nostra disposizione.

È stato fatto quindi un co-trattamento con 10 μ M di CPT e/o 250 μ M di desferrioxamina (DFX), un composto che mima la condizione ipossica

nella cellula [162], e analizzato tramite RT-qPCR i livelli di trascritto senso e antisenso rispetto all'mRNA di HIF-1 α (fig. 4.18) su HCT 116 e HeLa.

Come atteso [26, 49], la CPT diminuisce i livelli dell'mRNA di HIF-1 α sia in normossia che in condizioni ipossi-mimetiche dopo 4 ore di trattamento con 10 μ M di CPT, in entrambe le linee cellulari di tumore umano studiate (fig. 4.18).

L'RNA 5'aHIF-1 α viene attivato da CPT in entrambe le linee cellulari studiate, mentre co-trattando con CPT e DFX l'aumento si registra solo nella linea HCT 116. È stato comunque mostrato in precedenza (fig. 4.5B) che la CPT è in grado di aumentare i livelli dell'antisenso 5'aHIF-1 α anche nella linea cellulare Jurkat 6 in condizioni ipossiche (1% O₂).

La CPT aumenta anche i livelli del 3'aHIF-1 α nelle HCT 116, soprattutto in normossia rispetto a condizioni ipossi-mimetiche (fig. 4.18). Quest'ultimo risultato nelle HCT 116 è probabilmente dovuto al fatto che già con sola DFX è stato ottenuto un grande aumento dell'antisenso in 3' (fig. 4.19), e questo aumento nasconde l'effetto dovuto alla CPT nel caso del co-trattamento. Al contrario, nelle cellule HeLa la CPT diminuisce i livelli del 3'aHIF-1 α (fig. 4.18), così come risulta minore l'aumento dovuto al trattamento con sola DFX (fig. 4.19). Questi dati insieme suggeriscono l'esistenza di un meccanismo di regolazione degli RNA antisenso in 5' e 3' rispetto al locus genico di HIF-1 α che dipende dal tipo cellulare.

Analizzando i grafici delle RT-qPCR ottenuti trattando con sola DFX diverse linee tumorali umane, si nota subito che le condizioni ipossi-mimetiche causano una forte attivazione del 3'aHIF-1 α in tutte le linee studiate con eccezione delle cellule HeLa. Al contrario la DFX non influisce né sui livelli dell'RNA 5'aHIF-1 α né sui livelli di mRNA di HIF-1 α .

Questi risultati mostrano che i trascritti 5'aHIF-1 α e 3'aHIF-1 α sono attivati in risposta a stress cellulari differenti.

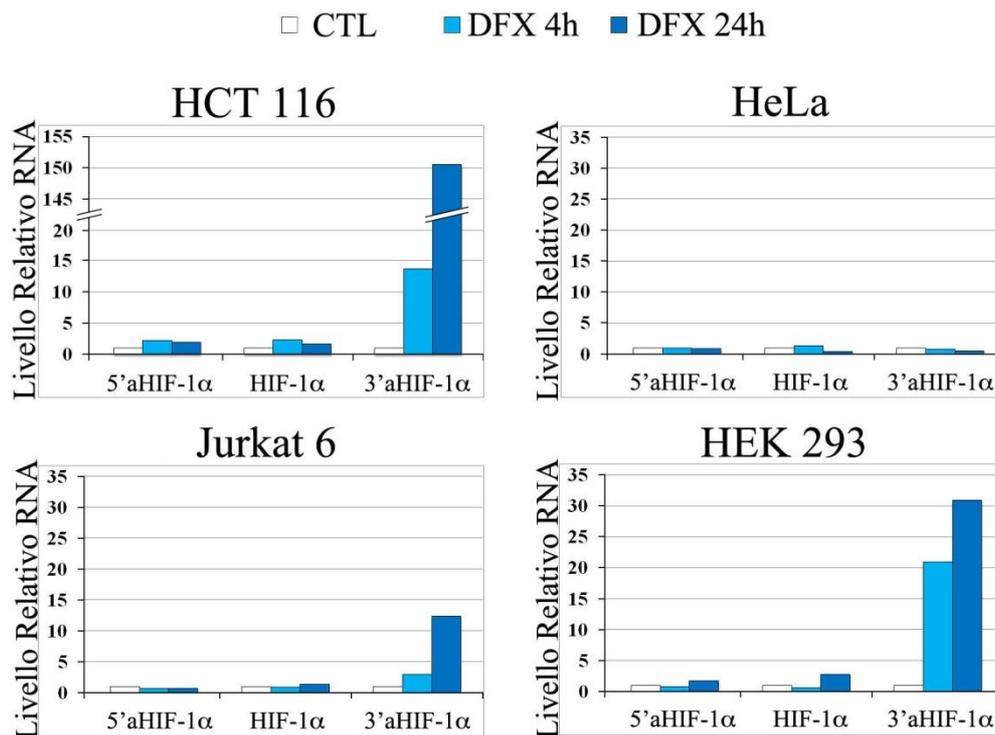


Figura 4.19

Livelli di trascrizione rilevati nelle diverse linee cellulari trattate con 250 μM di DFX per i tempi indicati. I valori ottenuti sono stati normalizzati per i valori dell'amplicone relativo al CitB (non mostrato). 5'aHIF-1 α si riferisce all'amplicone 2.1 kb, 3'aHIF-1 α all'amplicone 3'aHIF-1 α e HIF-1 α Ex2 alla coppia di primer 25 kb. L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

4.8 BASSE DOSI DI CPT NON ATTIVANO LA TRASCRIZIONE DEGLI RNA ANTISENSO AL GENE HIF-1 α IN CONDIZIONI IPOSSICHE

Come è stato già riportato in precedenza, è noto che trattamenti prolungati fino a 24 ore con 0,5 μM di CPT in condizioni ipossiche hanno l'effetto di diminuire specificamente i livelli di proteina HIF-1 α in cellule U251, apparentemente in assenza di una diminuzione del suo trascritto [71]. Questo effetto è stato rinominato dal nostro gruppo di lavoro "effetto Melillo".

A questo punto abbiamo voluto verificare se gli RNA antisenso ad HIF-1 α studiati finora potessero essere attivati anche a basse dosi di CPT in ipossia, e quindi essere implicati nel meccanismo dell'effetto Melillo.

Per far ciò abbiamo analizzato i livelli dei trascritti senso ed antisenso di HIF-1 α in seguito a trattamento con basse dosi di CPT (0,5 μ M) in condizioni ipossi-mimetiche su HCT 116 (dati non mostrati), HeLa ed HEK 293.

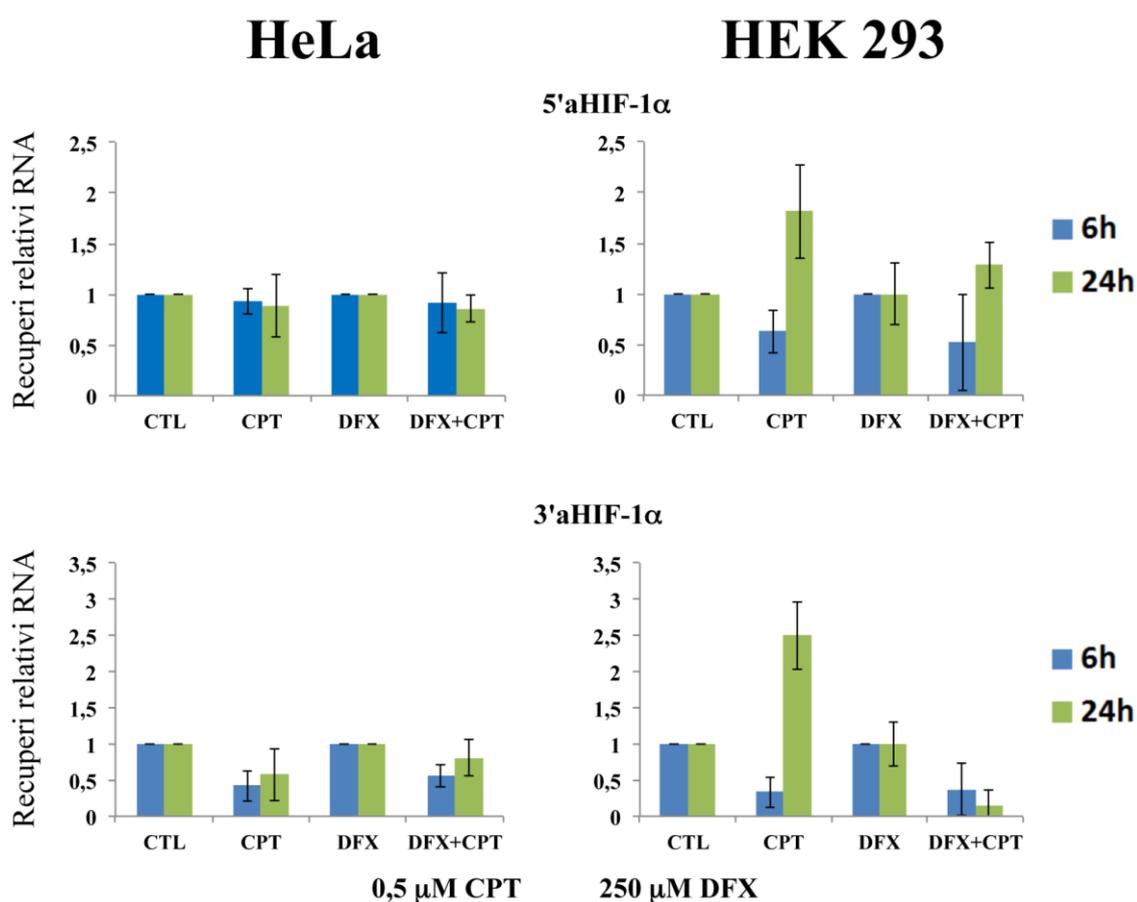


Figura 4.20

Livelli di trascrizione in cellule HeLa (sinistra) e HEK 293 (destra) trattate con DFX (250 μ M) e/o CPT (0,5 μ M) per i tempi indicati. I valori ottenuti sono stati normalizzati per i valori dell'amplicone relativo al CitB (non mostrato). I campioni trattati con sola CPT sono stati successivamente normalizzati per i valori del controllo non trattato, mentre i valori co-trattati con DFX e CPT sono stati normalizzati per i valori dei trattati con sola DFX. I grafici in alto riportano i livelli del 5'aHIF-1 α (regione 2.1 kb), mentre i grafici sottostanti riportano i livelli del 3'aHIF-1 α (amplicone 3'aHIF-1 α). L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α -satellite. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

Diversamente da quanto atteso in tutte le linee cellulari analizzate non è stato riscontrato alcun aumento significativo dei 2 RNA antisenso co-trattando con CPT e DFX per 6 e 24 ore (fig. 4.20). Utilizzando basse dosi di CPT sono stati ottenuti aumenti di entrambi gli antisenso solo nella linea HEK 293 dopo 24 ore di trattamento.

4.9 LA CAMPTOTECINA INIBISCE L'ACCUMULO DELLA PROTEINA HIF-1 α NELLE HeLa E NELLE HEK 293 IN IPOSSIA

A questo punto abbiamo voluto verificare se anche nelle linee cellulari da noi utilizzate si presentasse la diminuzione della proteina HIF-1 α in seguito a trattamenti in ipossia con basse dosi di CPT. Quindi abbiamo studiato i livelli del fattore HIF-1 α tramite tecniche di Western blot e saggi funzionali.

Nel Western blot effettuato con estratti proteici da cellule HeLa in figura 4.21 è possibile osservare come variano i livelli di proteina nei tempi indicati in seguito a trattamento con DFX (250 μ M) e CPT (0,2 μ M). I livelli di proteina HIF-1 α rimangono costanti in assenza di CPT e in condizioni di ipossia, ma diminuiscono in seguito a co-trattamento con CPT.

E' possibile notare inoltre, come la presenza della subunita HIF-1 β sia espressa costitutivamente nelle condizioni sopracitate, costituendo un controllo di isocaricamento e mostrando che l'effetto della CPT è specifico solo per la subunità 1 α .

HeLa

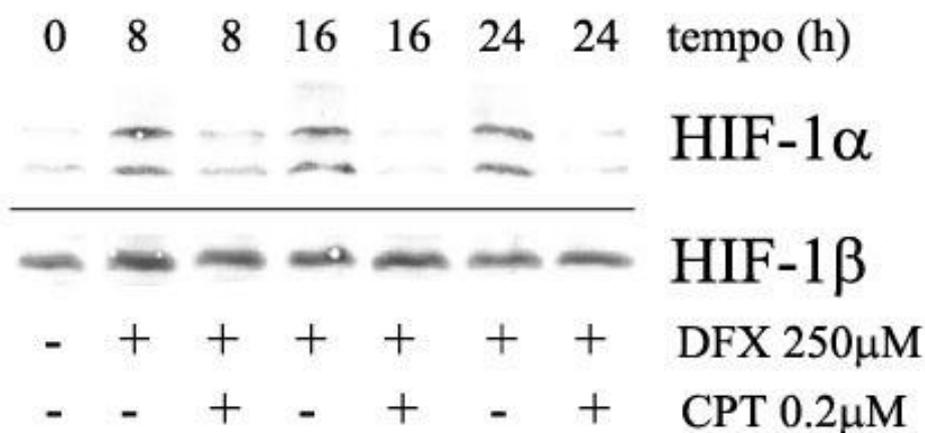


Figura 4.21

Livelli di HIF-1α in cellule HeLa trattate con (+) o meno (-) con DFX (250 μM) e/o CPT (0,2 μM) per i tempi indicati. Gli estratti proteici totali sono stati incubati con anticorpo anti-HIF-1α. La proteina HIF-1β, rilevata con anticorpo specifico, non mostra significativi variazioni nelle condizioni studiate, ed è quindi utile per valutare l'isocarcamento delle proteine nel gel.

Sono state inoltre condotte analisi funzionali sulle linee cellulari HeLa ed HEK293 (fig. 4.22); le cellule sono state trasfettate con un vettore (pGL3-HRE-Luc) esprimente luciferasi di *P. pyralis* (FF) regolata da sequenze HRE, ed un vettore (pRL) esprimete luciferasi di Renilla (RF) sotto il controllo del promotore di SV40. RF essa catalizza una reazione di bioluminescenza diversa dalla FF in quanto le due molecole utilizzano substrati differenti. Il rapporto tra le due letture permette di ottenere un valore normalizzato dell'attività della luciferasi espressa dalle cellule, e per questo viene utilizzata come controllo dell'avvenuta trasfezione. Trattando le cellule con DFX (250 μM) ed in presenza o assenza di CPT o TPT, risulta evidente che HIF-1α è indotta in condizioni di ipossia, mentre diminuisce in presenza di CPT o TPT sia nelle HeLa che nelle HEK 293, rispettivamente del 30% e del 50% circa. I risultati osservati dipendono dal legame del fattore HIF-1 alle sequenze HRE che attivano la luciferasi. Probabilmente l'attività del fattore HIF-1 viene mantenuta, anche se non a livelli ottimali, grazie alla presenza

del fattore HIF-2 α che sostituisce il fattore 1 α nella formazione del dimero. Quindi la diminuzione dell'attività della luciferasi riscontrata nei saggi funzionali è da imputarsi alla diminuzione di HIF-1 α . Questi dati dimostrano che la CPT in condizioni di ipossia inibisce l'accumulo della proteina HIF-1 α anche nelle linee cellulari utilizzate nel nostro laboratorio.

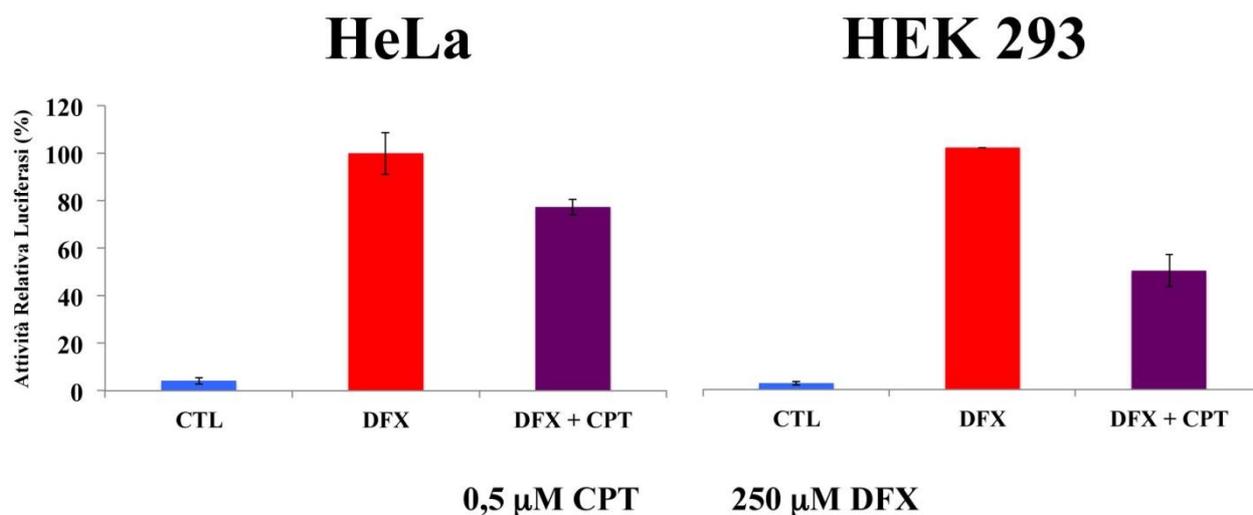


Figura 4.22

Le linee cellulari HeLa (sinistra) e HEK 293 sono state trasfettate con i vettori pRL (esprime RF utilizzato come controllo per la trasfezione) e pGL3-HRE-Luc (che esprime FF sotto controllo degli elementi HRE). HRE (Hypoxia Responsive Elements) è una sequenza sul DNA riconosciuta dal fattore di trascrizione HIF-1. Successivamente le cellule sono state trattate con DFX (250 μ M) e CPT (0,5 μ M) per 24 ore. I valori ottenuti stati dapprima normalizzati per pRL, successivamente per i valori dei campioni trattati con sola DFX. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di almeno 3 esperimenti indipendenti.

Come ulteriore prova della diminuzione della funzionalità della subunità 1 α , abbiamo studiato i livelli d'espressione dell'mRNA di HIF-1 α stesso e di VEGF, la cui trascrizione è controllata direttamente dal fattore di trascrizione HIF-1.

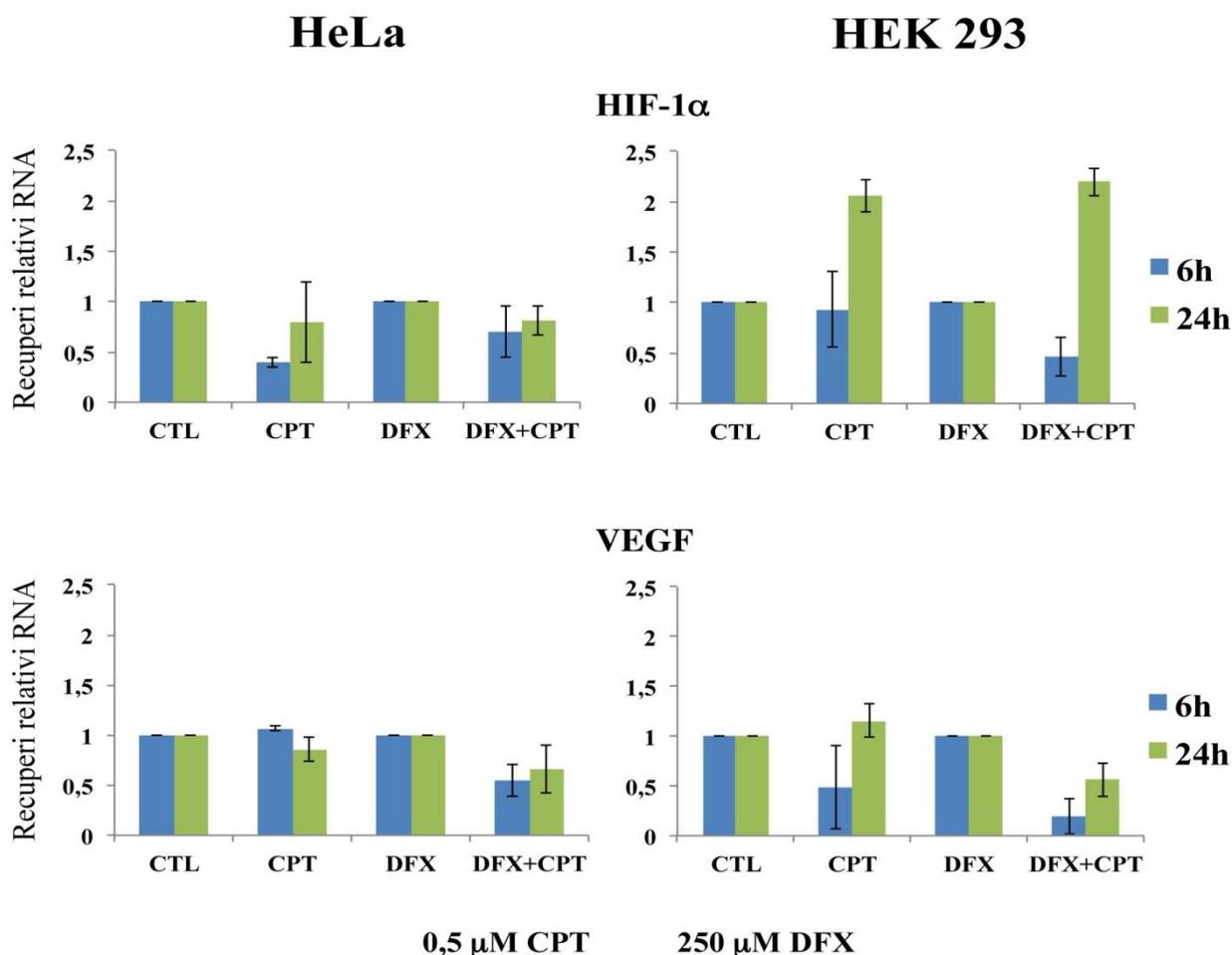


Figura 4.23

Livelli di trascrizione in cellule HeLa (sinistra) e HEK 293 (destra) trattate con DFX (250 μM) e/o CPT (0,5 μM) per i tempi indicati. I valori ottenuti sono stati normalizzati per i valori dell'amplicone relativo al CitB (non mostrato). I campioni trattati con sola CPT sono stati successivamente normalizzati per i valori del controllo non trattato, mentre i valori co-trattati con DFX e CPT sono stati normalizzati per i valori dei trattati con sola DFX. I grafici in alto riportano i livelli dell'mRNA di HIF-1α (regione 25 kb), mentre i grafici sottostanti riportano i livelli dell'mRNA di VEGF. L'assenza di contaminazione da DNA genomico è stata valutata studiando i livelli di DNA α-satellite. Tutti i valori sono medie ± S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

Per questo sono stati analizzati tramite RT-qPCR gli estratti di RNA totali da cellule HeLa ed HEK 293 trattati con basse dosi di CPT (0,5 μM) in normossia o condizioni ipossi-mimetiche. Utilizzando queste condizioni si può affermare che l'mRNA di HIF-1α diminuisce significativamente solo dopo 6 ore di trattamento in normossia (nelle HeLa) e in condizioni ipossiche (nelle HEK 293). Addirittura nelle HEK 293 dopo 24 ore di trattamento si ottiene un aumento sostanziale dei livelli di trascritto di HIF-1α in presenza o

meno di DFX (fig. 4.23). Per quanto riguarda l'espressione di VEGF i grafici dimostrano la diminuzione della funzionalità di HIF-1 α in seguito a trattamento con CPT. Infatti co-trattando con CPT e DFX per 6 e 24 si nota in entrambe le linee cellulari una significativa diminuzione del fattore di crescita VEGF, indice di una ridotta funzionalità di HIF.

4.10 IL 3'UTR DI HIF-1 α È REGOLATO DA DFX E CPT IN HeLa E HEK 293

Tutti i precedenti dati insieme contribuiscono all'idea che la diminuzione dei livelli di proteina di HIF-1 α in seguito a trattamenti con CPT in ipossia sia dovuta ad un meccanismo comune a vari tipi cellulari.

Le variazioni dell'mRNA di HIF-1 α non spiegano l'abbattimento quasi completo della proteina osservato in Western blot e nei saggi funzionali (fig. 4.21). Nelle linee HEK 293 (fig. 4.23) e U251 [70] si nota addirittura un incremento della quantità di trascritto in ipossia dopo trattamento con CPT, e in cellule U251 è stato dimostrato che il fenomeno non è dovuto ad alterazioni dell'emivita della proteina [70].

L'effetto Melillo quindi non può essere mediato dagli RNA antisenso 5' e 3'aHIF-1 α , in quanto hanno mostrato avere attivazioni differenti in base al tipo cellulare ed al tipo di stress a cui viene sottoposta la cellula. Inoltre è stato dimostrato che trattamenti con basse dosi di CPT (0,5 μ M) in condizioni ipossi-mimetiche non sono sufficienti ad attivare la trascrizione degli RNA antisenso ad HIF-1 α nella maggior parte delle linee cellulari analizzate.

Quindi abbiamo considerato che altri meccanismi post-trascrizionali di regolazione dell'espressione genica e, nello specifico, meccanismi di regolazione della traduzione di HIF-1 α che dipendono dal 3'UTR del mRNA. Per verificarlo abbiamo allestito un saggio con la luciferasi FF come gene reporter e RF, entrambi sotto il controllo del promotore di SV40. Nel vettore utilizzato il gene della luciferasi FF è legato alla sequenza del 3'UTR di HIF-1 α . In seguito abbiamo transfettato le linee cellulari HeLa ed HEK 293 e trattato con CPT (0,5 μ M) e/o DFX (250 μ M). I grafici riportati mostrano l'attività enzimatica della FF normalizzata per l'attività della RL.

Nelle HeLa i trattamenti con sola CPT non inducono variazioni dell'accumulo proteico legato al 3'UTR alle 4 e 16 ore, mentre alle 24 ore di trattamento si osserva un aumento del 90% (fig. 4.24). Il co-trattamento con CPT e DFX, rispetto al trattamento con DFX sola, provoca una brusca diminuzione dell'attività proteica dopo 16 ore, per poi aumentare dopo 24 ore di trattamento, similmente a quanto accade per il rapporto CPT sola su controllo non trattato. Dopo 24 ore di trattamento con 0,5 μ M di CPT sembra che ci sia una sorta di feed-back positivo sul 3'UTR di HIF-1 α per aumentare i livelli di HIF-1 α stessa (fig. 4.24).

Per quanto riguarda le HEK 293, tutti i trattamenti determinano un simile andamento, ovvero una diminuzione dell'espressione proteica legata al 3'UTR di HIF-1 α in seguito a trattamento con CPT sia in condizioni normossiche che ipossi-mimetiche (fig. 4.24).

Questi dati indicano complessivamente che il trascritto di HIF-1 α è regolato nella sua traduzione quando trattiamo con basse dosi di CPT, soprattutto in ipossia, in accordo con un coinvolgimento del 3'UTR del gene HIF-1 α nell'effetto Melillo.

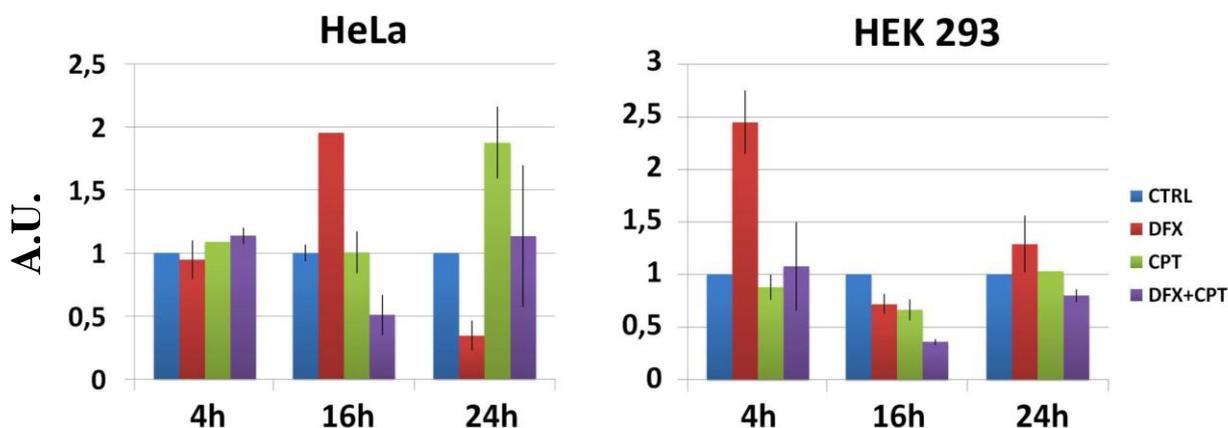


Figura 4.24

Le linee cellulari HeLa (sinistra) e HEK 293 sono state trasfettate con i vettori pGL3-3'UTR-HIF-1 α (esprime FF con 3'UTR di HIF-1 α), pGL3-StiI (uguale al precedente senza il 3'UTR di HIF-1 α) e pRL (esprime RF utilizzato come controllo per la trasfezione). Successivamente sono state trattate con DFX (250 μ M) e CPT (0,5 μ M) per i tempi indicati. I valori ottenuti stati dapprima normalizzati per pRL, successivamente per i valori di pGL3-StiI/pRL ed infine per i valori dei campioni non trattati (CTRL). Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di almeno 3 esperimenti indipendenti.

4.11 TRATTAMENTI CON CPT AUMENTANO I LIVELLI DI SPECIFICI miR IN CONDIZIONI IPOSSI-MIMETICHE

I saggi di luciferasi hanno dimostrato che il 3'UTR di HIF-1 α è bersaglio di regolazione in seguito a trattamenti con DFX e/o CPT nelle cellule umane analizzate. Poiché i dati suggeriscono come probabile meccanismo di regolazione un silenziamento da RNA interference, abbiamo cercato di identificare possibili miRNA coinvolti mediante analisi di microarray su RNA totale estratto da HeLa trattate per 6 e 24 ore con DFX e/o CPT. Per spiegare il fenomeno esaminato ci siamo concentrati sui miRNA che bersagliano il 3'UTR di HIF-1 α e che in condizioni d'ipossia sono più espressi dopo trattamento con CPT. L'individuazione di miRNA che soddisfino questo criterio è stata fatta tramite analisi *in silico* usando quattro diverse banche dati: PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de>), Diana Lab (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org>) e miRanda (<http://www.microna.org/microna/home.do>). Nella figura 4.25 sono riportati i valori di microarray su HeLa dopo 6 ore di trattamento dei miRNA (indicati con nomi fittizi) che variano e bersagliano HIF-1 α . Tra tutti i microRNA analizzati, solo tre aumentano significativamente dopo co-trattamento con i due farmaci rispetto a incubazione con sola DFX: miR-X, miR-Y e miR-Z (fig. 4.25A-C). Anche se l'aumento relativo degli ultimi due sembra minore rispetto a miR-X, si deve considerare che sono espressi a livelli molto diversi (fig. 4.25A-B). Basandoci sui dati ottenuti, abbiamo deciso di analizzare più approfonditamente questi miR. Per studiare le loro variazioni abbiamo eseguito RT-qPCR su ciascun miR nelle linee cellulari HeLa ed HEK 293 dopo 6 e 24 ore di trattamento con CPT (0,5 μ M) e/o DFX (250 μ M) (fig. 4.26).

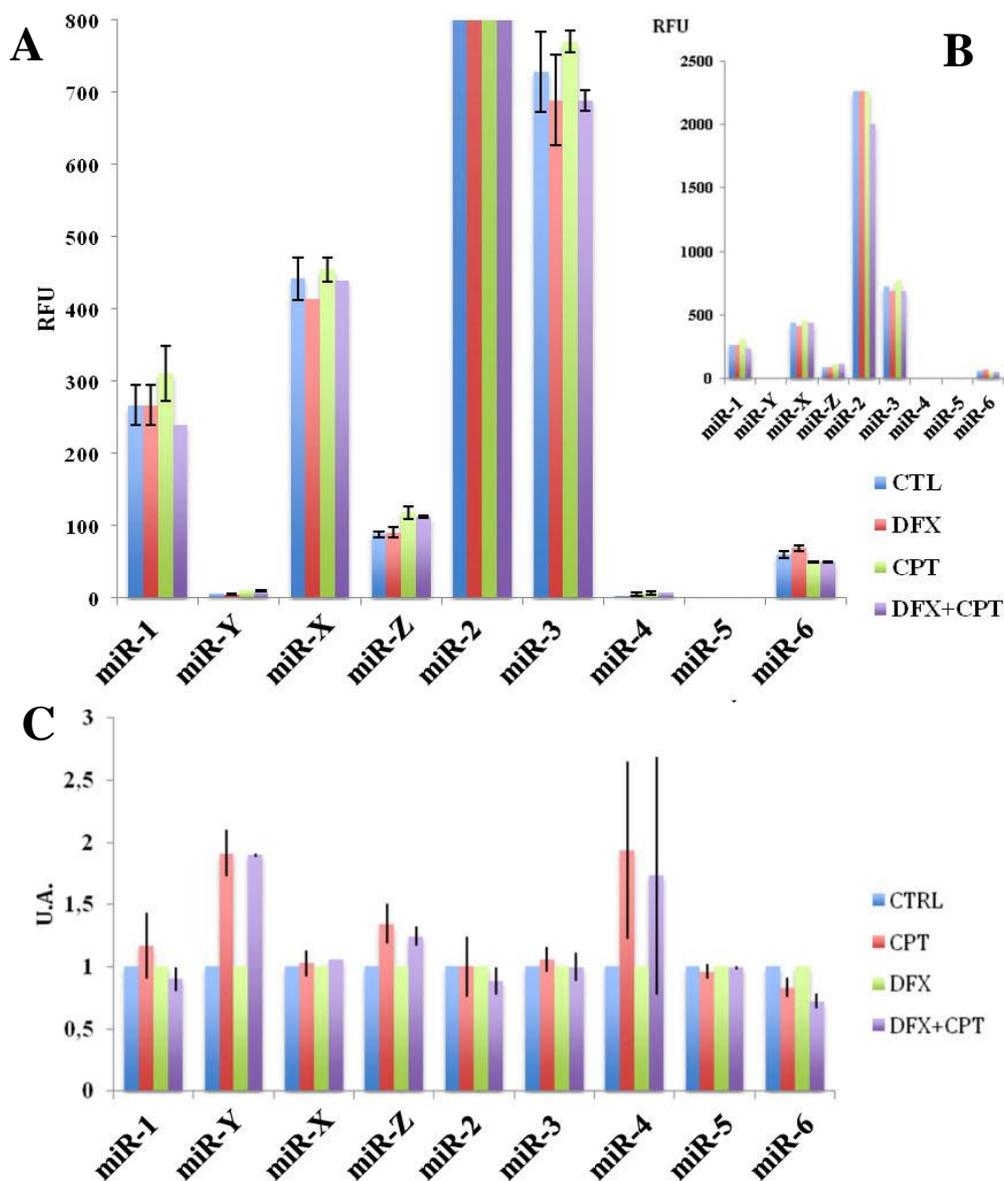


Figura 4.25

Dati di microarray sull'intero miRnoma umano effettuato su RNA estratto da HeLa trattate per 6 ore con DFX (250 μ M) e/o CPT (0,5 μ M). A e B: I grafici mostrano i valori delle analisi di microarray espressi in RFU (fluorescenza relativa) normalizzati dallo strumento per il background. In ascissa sono riportati con nomi fittizi, i miR che aumentano dopo co-trattamento con DFX e CPT rispetto alla sola DFX e colpiscono il 3'UTR di HIF-1 α . C: I campioni trattati con sola CPT sono stati in seguito normalizzati per i valori del controllo non trattato, mentre i valori co-trattati con DFX e CPT sono stati normalizzati per i valori dei trattati con sola DFX. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 2 determinazioni da 2 esperimenti indipendenti.

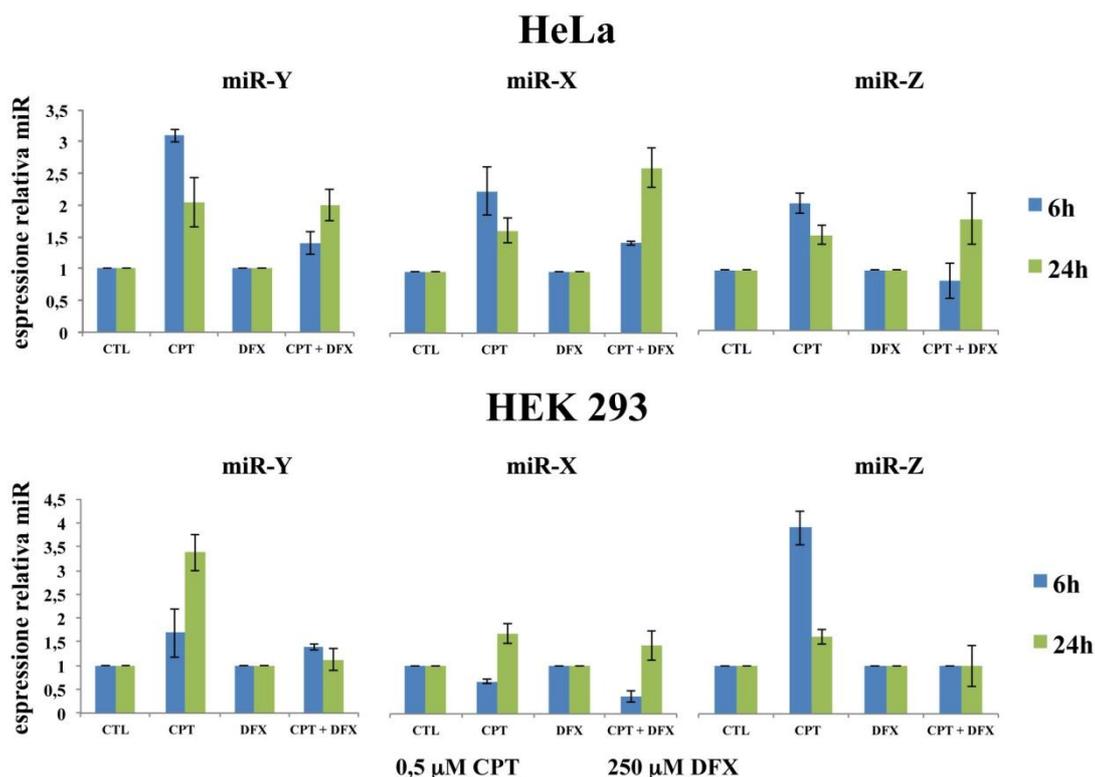


Figura 4.26

Livelli di espressione dei miR indicati in cellule HeLa (in alto) e HEK 293 (in basso) trattate con DFX (250 μ M) e/o CPT (0,5 μ M) per i tempi indicati. I valori ottenuti sono stati normalizzati per i valori dell'amplicone relativo all'RNA U6RNA. I campioni trattati con sola CPT sono stati successivamente normalizzati per i valori del controllo non trattato, mentre i valori co-trattati con DFX e CPT sono stati normalizzati per i valori dei trattati con sola DFX. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di 2 esperimenti indipendenti.

La CPT sola induce un incremento dell'espressione di tutti e tre i miRNA in entrambe le linee cellulari dopo 6 e 24 ore rispetto al controllo non trattato. Nelle HeLa in condizioni ipossi-mimetiche si evidenzia una tendenza dei tre miR analizzati ad aumentare nella cinetica di trattamento per arrivare ad una espressione massima dopo 24 ore di trattamento con CPT. Per quanto riguarda la linea HEK 293 invece dopo co-trattamento con DFX si notano aumenti significativi solo per quanto riguarda il miR-X dopo 24 ore e per il miR-Y dopo 6 ore di trattamento, entrambi gli aumenti comunque risultano di intensità minore rispetto a quelli rilevati studiando la linea cellulare HeLa (fig. 4.26).

4.12 L'ANTI-miR-X REVERTE L'EFFETTO MELILLO SULLA LINEA CELLULARE HeLa

I dati ottenuti fino ad ora hanno dimostrato che il 3'UTR di HIF-1 α è soggetto ad un meccanismo di regolazione in seguito a trattamenti con basse dosi di CPT in condizioni ipossi-mimetiche. Tramite uno studio sulle variazioni del miRnoma sulle linee cellulari analizzate abbiamo selezionato tre possibili miR che possono essere coinvolti nel meccanismo che sta alla base dell'effetto Melillo. Arrivati a questo punto, abbiamo deciso di ripetere i saggi funzionali co-trasfettando con il vettore che porta la luciferasi FF sotto controllo degli elementi HRE e con anti-miR. Se è vera l'ipotesi che uno o più dei miR da noi selezionati siano coinvolti nella diminuzione di HIF-1 α dopo trattamento con CPT in ipossia, abbattendo la loro espressione con specifici anti-miR noteremo la reversione dell'effetto Melillo.

Nella figura 4.27 vengono mostrati gli esperimenti di co-trasfezione. In seguito al trattamento con DFX si nota in tutti i campioni un brusco innalzamento dell'attività relativa della luciferasi, indice che HIF-1 α non viene più degradato e quindi attiva la trascrizione della FF. Come atteso (vedi fig. 4.22), co-trattando con 0,5 μ M di CPT l'attività relativa della FF diminuisce del 25% circa sia nel campione trasfettato con sola FF, sia nel campione trasfettato con un anti-miR scramble (controllo negativo). Sorprendentemente si nota una reversione totale dell'effetto Melillo nei campioni trasfettati con l'anti-miR-X e una reversione parziale quando si utilizza l'anti-miR-Y. Utilizzando tutti e tre gli anti-miR insieme si osserva nuovamente una totale reversione dell'effetto che pare essere la somma algebrica di quella riscontrata utilizzando l'anti-miR-X e l'anti-miR-Y (fig. 4.27).

Dunque i dati mostrati validano fortemente l'ipotesi che il miR-X sia il mediatore molecolare dell'effetto Melillo. Ma, dato che è noto che i microRNA regolano i geni bersaglio in modo estremamente fine e cooperando in sofisticati network che vedono implicati più miR per uno stesso 3'UTR, è possibile che entrambi i miR-X e Y siano coinvolti nella diminuzione di HIF-1 α . Ad ogni modo, dato che il miR-Y è espresso a livelli

molto bassi e che la reversione mostrata in seguito al suo abbattimento è solo parziale, i dati a nostra disposizione sono ancora pochi per stabilire che il miR-Y sia veramente co-responsabile dell'effetto Melillo.

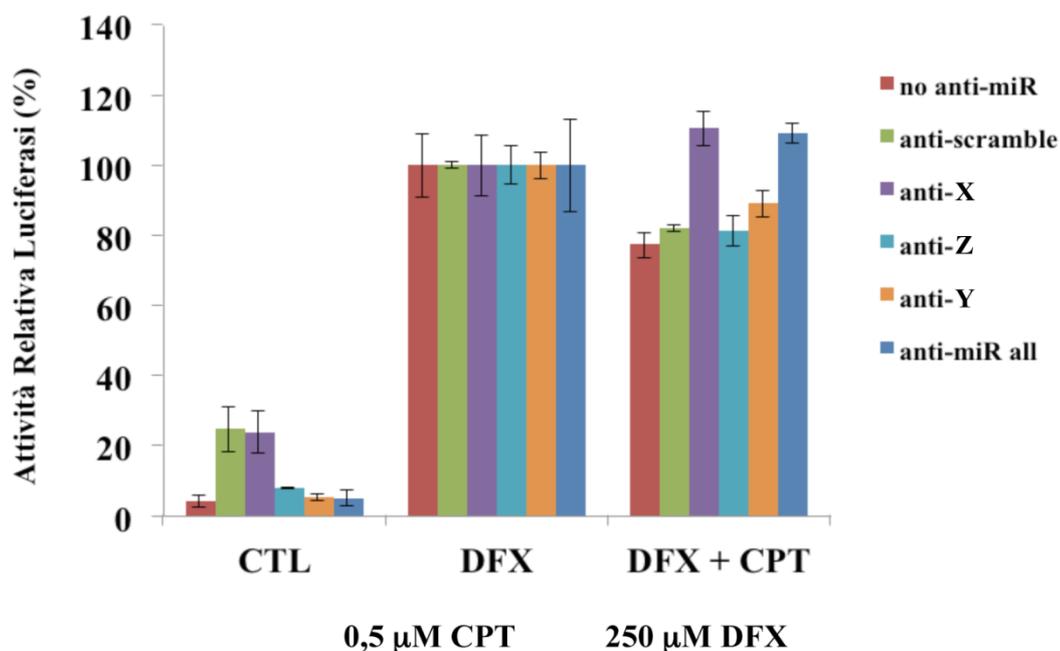


Figura 4.27

La linea cellulare HeLa è stata trasfettata con i vettori pRL (esprime RF utilizzato come controllo per la trasfezione), pGL3-HRE-Luc (che esprime FF sotto controllo degli elementi HRE) e con diversi anti-miR (elencati in legenda). Successivamente le cellule sono state trattate con DFX (250 μ M) e CPT (0,5 μ M) per 24 ore. I valori ottenuti stati dapprima normalizzati per pRL, successivamente per i valori dei campioni trattati con sola DFX. Tutti i valori sono medie \pm S.D. di 4 determinazioni di almeno 3 esperimenti indipendenti.

Capitolo 5

DISCUSSIONE

CPT è un veleno specifico di Top1 [26, 49] e interagisce con Top1 per impedire la religazione del DNA tagliato [26, 49]. Qualora la Top1 bloccata covalentemente dalla CPT sul DNA venga a scontrarsi con una RNAPII in attiva trascrizione o una forca replicativa in avanzamento si formano, rispettivamente, danni a singolo filamento reversibili e a doppio filamento irreversibili. Questo è il meccanismo che sta alla base dell'effetto citotossico del farmaco. Infatti l'accumulo di danni irreversibili alla doppia elica del DNA porta all'apoptosi, e questo avviene soprattutto in cellule in divisione. Si intuisce quindi il motivo per cui i derivati della CPT siano considerati dei chemioterapici e vengano utilizzati nella pratica clinica. Quello che rimane da capire è, dato che il meccanismo d'azione colpisce generalmente tutte le cellule replicative, come mai CPT e derivati funzionino bene solo nel trattamento di determinati tipi di tumore, soprattutto solidi (www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/alphalist), e non diano risultati su altri. Rimangono quindi alcuni nodi da sciogliere riguardo il completo meccanismo d'azione del farmaco, soprattutto per quanto riguarda gli effetti sulla trascrizione e regolazione genica.

L'inibizione specifica di Top1 da parte della CPT sembra provocare la de-regolazione dei siti di pausa trascrizionale [27]. Nel nostro laboratorio è stata precedentemente analizzata la distribuzione dell'enzima RNA Pol II su geni regolati da meccanismi di pausa trascrizionale, attraverso esperimenti di ChIP su cellule umane trattate o meno con CPT [27]. Sembra che il blocco sul DNA della Top1 ad opera del farmaco CPT, favorisca l'allontanamento della RNA Pol II dai siti di pausa causando una successiva redistribuzione della polimerasi lungo il gene (fig. 1.12). Successivamente, tramite ChIP è stato identificato un sito di pausa trascrizionale in prossimità del promotore del gene HIF-1 α . È interessante ricordare che in letteratura è riportato che il TPT, un analogo della CPT, inibisce l'accumulo della proteina HIF-1 α , in

cellule umane trattate in condizioni di ipossia [71], con un meccanismo non noto, anche se dipendente dalla presenza di Top1 nella cellula.

HIF-1 α è una subunità del meglio noto fattore di trascrizione HIF-1, il principale regolatore della risposta cellulare a basse concentrazioni intracellulari di ossigeno. Esso regola la trascrizione di più di 100 geni essenziali per l'adattamento all'ipossia come l'angiogenesi, invasione, e la progressione tumorale [163, 164]. HIF-1 α è la subunità che viene regolata in maniera post-traduzionale dalla concentrazione intracellulare di ossigeno, è sovra-espressa in una grande frazione di tumori umani, ed è utilizzata come marcatore prognostico e di chemioresistenza. Quindi, l'inibizione di HIF-1 α rimane interessante per la terapia antitumorale ed è un settore di ricerca molto attivo.

Innanzitutto, indagando sul locus genico di HIF-1 α gli effetti della CPT sulla trascrizione generale, sono state approntate analisi di RT-PCR su estratti di RNA totale della linea cellulare HCT 116. I risultati dimostrano che trattamenti con 10 μ M di CPT causano alterazione dei livelli di trascrizione lungo il gene HIF1 α , in particolare sono stati registrati forti aumenti di trascritto nella regione 2.1 kb del primo introne (fig. 4.2). Le alterazioni di trascrizione riscontrate hanno un andamento CPT-dipendente, infatti la trascrizione delle regioni analizzate varia linearmente con la cinetica e la dose di somministrazione del farmaco (fig. 4.3). A questo punto abbiamo cercato di identificare quale fosse il trascritto che aumenta dopo trattamento con CPT e quale meccanismo potesse spiegare un aumento selettivo delle regioni trascritte. Inizialmente è stato preso in considerazione la possibilità di un errato splicing dell'introne 1, ma l'ipotesi è stata scartata in seguito ai risultati negativi di molti tentativi sperimentali (dati non mostrati). Dalla letteratura sono note altre proteine appartenenti alla superfamiglia di HIF- α : HIF-2 α e HIF-3 α , contraddistinte da "pattern" di espressione ristretti rispetto ad HIF-1 α [165]. Esperimenti effettuati da altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che i livelli di HIF-1 α , registrati in cellule esposte a condizioni prolungate di ipossia, diminuiscono contestualmente ad un aumento di HIF-2 α . Questo fenomeno è dovuto alla produzione di un RNA antisenso, complementare alla regione 3'UTR di HIF-1 α (3'aHIF-1 α), che destabilizza il messaggero di

HIF-1 α e ciò risulta in un calo dei livelli della proteina [100]. Dalla letteratura si apprende quindi che l'espressione di HIF-1 α , risulta essere finemente regolata, tale regolazione avviene attraverso eventi multipli che coinvolgono meccanismi post-trascrizionali e post-traduzionali. Quindi, abbiamo preso in considerazione la possibilità che ci fossero altri trascritti nella regione 5' del gene che fossero differenzialmente influenzati dalla CPT. Innanzitutto sono state effettuate ricerche in banche dati genomiche che hanno portato alla luce diversi trascritti in orientazione antisenso rispetto al gene HIF-1 α . Sommando tutte le EST ritrovate dai vari sequenziamenti da analisi su vari tessuti (embryonic stem cells, uterus, ovary, thalam, brain, thyroid, kidney, lung, liver, lymph node, heart [142, 158, 166]) risulta che quasi l'80% del locus genico di HIF-1 α sia trascritto in orientazione antisenso, sottolineando un possibile importante regolazione, magari tessuto [158, 166] o sviluppo specifica [142, 167], effettuata da trascritti non coding. Quindi per spiegare i dati ottenuti nelle prime analisi sperimentali abbiamo deciso di effettuare retrotrascrizioni con primer specifici per il filamento senso ed antisenso per determinare l'eventuale coinvolgimento di trascritti non noti. I risultati di questa tesi dimostrano infatti l'esistenza di un RNA antisenso in 5' rispetto al trascritto di HIF-1 α (fig. 4.4). Analisi di northern blot, utilizzando una sonda specifica per ibridare un eventuale antisenso in 5', mostrano l'aumento CPT-dipendente di un antisenso di 10 kb circa, solo in linee cellulari che esprimono normali livelli di Top1 contemporaneamente ad una diminuzione del trascritto di HIF-1 α riscontrato su RNA da Jurkat 6 (fig. 4.5 e 4.6) trattate con CPT in condizioni normossiche (20% O₂) o ipossiche (< 1% O₂). Per stabilire se l'attivazione dell'antisenso in seguito a trattamento con CPT sia dovuto al danno al DNA dipendente da replicazione, sono stati utilizzati farmaci che inibiscono la replicazione (APH) o che bloccano i *checkpoint* della risposta cellulare al danno sul DNA (Caff). I risultati dimostrano che gli effetti sulla trascrizione di HIF-1 α non sono dovuti ad un possibile danno al DNA alla forca di replicazione o alla risposta cellulare al danno stesso (fig. 4.7). Poiché le proprietà strutturali di un ncRNA possono fornire spunti importanti nella comprensione della sua funzione [141, 156, 157], abbiamo deciso in un primo momento di stabilire lo stato di poliadenilazione e presenza di 5' CAP sul 5'aHIF-1 α . Abbiamo rilevato la

presenza di 5'aHIF-1 α in RT-qPCR effettuate su frazioni di RNA arricchite in poli(A⁺) e 5' CAP su HCT 116 (Fig. 4.8 e 4.9). Questi dati suggeriscono che il 5'aHIF-1 α sia trascritto dalla RNA polimerasi II, in contrasto con quel che è noto per 3'aHIF-1 α che non ha né 5' CAP né poliadenilazione [100]. Questa è una prova che i due ncRNAs possano avere ruoli diversi all'interno della cellula e nella possibile regolazione di HIF-1 α . È già noto che l'antisenso 3'aHIF-1 α venga trascritto in seguito a prolungati periodi di ipossia [100], e noi abbiamo confermato che anche i livelli di questo trascritto aumentano dopo trattamento con 10 μ M di CPT in HCT 116 (fig. 4.10). La funzione di un RNA dipende dalla sua localizzazione intra-cellulare [158, 159], a tal scopo abbiamo studiato la sub-localizzazione dei ncRNA utilizzando due diversi metodi: esperimenti di RT-qPCR su RNA estratti dalla frazione nucleare o citoplasmatica (fig. 4.11) e analisi di RNA FISH (solo per 5'aHIF-1 α , fig. 4.12-4.15). In questo modo abbiamo scoperto che entrambi i trascritti sono situati nel nucleo. Queste analisi sembrano collocare spazialmente 5'aHIF-1 α nella regione perinucleare (fig. 4.14), come è stato poi confermato tramite studi di co-localizzazione del ncRNA antisenso con lamina B1 e nucleoporina 62 (fig. 4.15). Il complesso del poro nucleare funziona come un cancello selettivo che consente il passaggio di certe molecole dentro e fuori del nucleo. La nucleoporina 62 è una glicoproteina del poro nucleare ed è coinvolta nell'importazione nucleare delle proteine, ma anche le esportazioni degli mRNA nascenti. Inoltre sono noti ncRNA che bloccano il trasporto transmembrana di fattori importanti per la regolazione genica [146]. L'RNA antisenso ad HIF-1 α in 5' potrebbe quindi svolgere il suo ruolo legando l'mRNA antagonista con specifici interazioni senso-antisenso che bloccano il trascritto nel perinucleo, favorendo così la sua degradazione, o magari mediando legami tra mRNA e proteine dell'involucro nucleare. Infine, abbiamo ricercato la loro presenza ed espressione in tessuti umani provenienti da biopsie di carcinomi renali umani (fig. 4.16 e Tabella 1). Precedenti lavori hanno mostrato una sovraespressione del 3'aHIF-1 α in carcinoma renale non-papillari [100], associando la sovraespressione dell'antisenso con il fatto che tali cellule non-papillari sono prive di fattore VHL [168, 169]. Inoltre era già stata sottolineata la presenza del 3'aHIF-1 α in diversi tessuti tumorali [160]. Abbiamo scoperto che entrambi gli RNA

antisense ad HIF-1 α sono presenti in carcinomi renali umani (fig. 4.16), trascritti ad alti livelli in tumori con basso grado e in cellule con istologia “non-chiara” (tab. 4.1 e fig. 4.17). Comunque in accordo con la letteratura [100], non sono stati evidenziati livelli consistenti di 3’aHIF-1 α in campioni papillari (fig. 4.17 campioni 23 e 25). L’aver ritrovato in biopsie di tumori umani la presenza degli antisense di HIF-1 α allontana le ipotesi che essi siano artefatti da culture cellulari e sottolinea l’importanza che questi trascritti possono avere nello sviluppo o meno della malattia nell’uomo. È stato trovato in precedenza che i due RNA antisense vengono attivati da trattamenti 10 μ M di CPT. In letteratura è inoltre noto che l’RNA antisense 3’aHIF-1 α viene trascritto in cellule A549 in seguito a prolungati periodi di ipossia come possibile inibitore del gene HIF-1 α [100, 160, 165]. Quindi, per meglio definire i meccanismi di attivazione dei due RNA antisense ad HIF-1 α , abbiamo voluto verificare se le condizioni ipossiche possano influire sulla loro attivazione sulle linee cellulari a nostra disposizione (fig. 4.18). I risultati mostrano che i due RNA antisense vengono attivati in risposta a stress cellulari parzialmente differenti e che possono essere trascritti da RNA polimerasi differenti, suggerendo che essi possano influenzare l’espressione di HIF-1 α attraverso meccanismi diversi.

E’ noto come la CPT sia efficace maggiormente nel trattamento di tumori solidi che necessitano vascolarizzazione, *pathways* di cui HIF-1 α è il protagonista principale. Quindi l’aumento del trascritto appena scoperto 5’aHIF-1 α e dell’antisense 3’aHIF-1 α (già suggerito come antagonista dell’mRNA di HIF-1 α) ad opera di alte dosi del farmaco in determinati tipi di tumori possono suggerire questo *pathway* come uno dei meccanismi implicati nel successo del farmaco stesso. Come accennato in precedenza in letteratura è stato riportato un importante effetto causato da basse dosi di CPT (0,5 μ M) in condizioni di ipossia su cellule U251, e cioè l’abbattimento della proteina di HIF-1 α tramite un meccanismo post-trascrizionale; questo effetto è stato rinominato dal nostro gruppo di lavoro “effetto Melillo. A questo punto abbiamo voluto verificare se gli RNA antisense ad HIF-1 α studiati finora potessero essere attivati anche a basse dosi di CPT in ipossia, e quindi essere implicati nel meccanismo dell’effetto Melillo. Per far ciò abbiamo analizzato i livelli dei trascritti senso ed antisense di HIF-1 α in seguito a

trattamento con basse dosi di CPT (0,5 μ M) in condizioni ipossi-mimetiche su HCT 116 (dati non mostrati), HeLa ed HEK 293. Diversamente da quanto atteso in tutte le linee cellulari analizzate non è stato riscontrato alcun aumento significativo dei due ncRNA antisenso co-trattando con CPT e DFX (fig. 4.20).

Tramite tecniche di western blot (fig. 4.21) e saggi funzionali (fig. 4.22) abbiamo dimostrato che la CPT in condizioni di ipossia inibisce l'accumulo di HIF-1 α anche in HeLa ed HEK 293. Come ulteriore prova della diminuzione della funzionalità della subunità 1 α , abbiamo studiato i livelli dell'mRNA di HIF-1 α e VEGF, la cui trascrizione è controllata direttamente dal fattore di trascrizione HIF-1. L'mRNA di HIF-1 α non diminuisce, al contrario dell'mRNA di VEGF che diminuisce in entrambe le linee cellulari, indicando una ridotta funzionalità di HIF-1 (fig. 4.23).

Diminuzioni della proteina in assenza di variazioni significative della trascrizione e dell'abbondanza di trascritto fanno pensare ad un meccanismo che vede coinvolti miR endogeni. Saggi funzionali studiando il 3'UTR di HIF-1 α suggeriscono complessivamente che la CPT altera i livelli dei trascritti ad esso associati (fig. 4.24). Per individuare miRNA specifici che potrebbero essere coinvolti nel fenomeno sotto esame, è stato analizzato tramite microarray e RT-qPCR tutto il miRnoma delle cellule HeLa trattate con basse dosi di CPT. L'analisi ha evidenziato diversi miRNA che variano nel trattamento o meno con DFX e/o CPT. Tra questi sono stati poi ricercati tutti i miR che bersagliano l'mRNA di HIF-1 α e che sono caratterizzati da un'aumentata espressione in ipossia dopo trattamento con CPT (fig. 4.25 e 4.26). Da questa ricerca sono emersi tre miRNA: miR-X, miR-Y e miR-Z.

Le cellule HeLa sono state infine trasfettate mediante un vettore esprimente luciferasi regolata da sequenze HRE (fig. 4.22), e con anti-miR contro i miR studiati (fig. 4.27). Si ottiene una parziale reversione dell'effetto Melillo se si co-trasfetta con anti-miR-Z e totale se co-trasfettiamo con anti-miR-X. Dunque i dati validano fortemente l'ipotesi che il miR-X sia il mediatore molecolare dell'effetto Melillo.

Se si dovesse confermare questa ipotesi, il meccanismo potrebbe avere importanti risvolti terapeutici. Innanzitutto permetterebbe di comprendere meglio l'attività antitumorale della CPT e gli effetti trascrizionali e post-

trascrizionali dell'inibizione della Top1, migliorandone potenzialmente l'uso clinico. Inoltre, l'evidenza di un coinvolgimento diretto di questo miR potrebbe permettere lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici più specifici ed efficaci, e perciò con una minore tossicità per il paziente.

Capitolo 6

BIBLIOGRAFIA

1. Fogg, J.M., et al., *Differences Between Positively and Negatively Supercoiled DNA that Topoisomerases May Distinguish*, in *Mathematics of DNA Structure, Function and Interactions*. Springer New York 2009. p. 73-121.
2. Zechiedrich, E.L., et al., *Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8103-13.
3. Champoux, J.J., *DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 369-413.
4. Musgrave, D.R., K.M. Sandman, and J.N. Reeve, *DNA binding by the archaeal histone HMf results in positive supercoiling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10397-401.
5. Wang, J.C., *Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine*. Q Rev Biophys, 1998. **31**(2): p. 107-44.
6. Liu, L.F. and J.C. Wang, *Supercoiling of the DNA template during transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7024-7.
7. Hiasa, H. and K.J. Marians, *Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21529-35.
8. Schoeffler, A.J. and J.M. Berger, *DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology*. Q Rev Biophys, 2008. **41**(1): p. 41-101.
9. Bouthier de la Tour, C., et al., *Reverse gyrase in thermophilic eubacteria*. J Bacteriol, 1991. **173**(12): p. 3921-3.
10. Koster, D.A., et al., *Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 671-4.

11. Liu, L.F., et al., *Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II*. J Biol Chem, 1983. **258**(24): p. 15365-70.
12. Crisona, N.J., et al., *Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by E. coli topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements*. Genes Dev, 2000. **14**(22): p. 2881-92.
13. Wang, J.C., *DNA topoisomerases*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 635-92.
14. Wang, J.C., *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 430-40.
15. Nitiss, J.L., *Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1400**(1-3): p. 63-81.
16. Spell, R.M. and C. Holm, *Nature and distribution of chromosomal intertwinings in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1465-76.
17. Shaiu, W.L. and T.S. Hsieh, *Targeting to transcriptionally active loci by the hydrophilic N-terminal domain of Drosophila DNA topoisomerase I*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4358-67.
18. Wang, J.C., P.R. Caron, and R.A. Kim, *The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword?* Cell, 1990. **62**(3): p. 403-6.
19. Zhu, Q., P. Pongpech, and R.J. DiGate, *Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9766-71.
20. Gangloff, S., et al., *The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8391-8.
21. Castano, I.B., et al., *A novel family of TRF (DNA topoisomerase I-related function) genes required for proper nuclear segregation*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(12): p. 2404-10.
22. Mirkovitch, J., S.M. Gasser, and U.K. Laemmli, *Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes*. J Mol Biol, 1988. **200**(1): p. 101-9.

23. Stewart, L., G.C. Ireton, and J.J. Champoux, *The domain organization of human topoisomerase I*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7602-8.
24. Redinbo, M.R., et al., *Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1504-13.
25. Redinbo, M.R., J.J. Champoux, and W.G. Hol, *Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA*. Biochemistry, 2000. **39**(23): p. 6832-40.
26. Pommier, Y., *Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(10): p. 789-802.
27. Khobta, A., et al., *Early effects of topoisomerase I inhibition on RNA polymerase II along transcribed genes in human cells*. J Mol Biol, 2006. **357**(1): p. 127-38.
28. Brill, S.J. and R. Sternglanz, *Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants*. Cell, 1988. **54**(3): p. 403-11.
29. Drolet, M., *Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology*. Mol Microbiol, 2006. **59**(3): p. 723-30.
30. Kretschmar, M., M. Meisterernst, and R.G. Roeder, *Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11508-12.
31. Merino, A., et al., *DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription*. Nature, 1993. **365**(6443): p. 227-32.
32. Shykind, B.M., et al., *Topoisomerase I enhances TFIID-TFIIA complex assembly during activation of transcription*. Genes Dev, 1997. **11**(3): p. 397-407.
33. Carty, S.M. and A.L. Greenleaf, *Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(8): p. 598-610.

34. Capranico, G., et al., *The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: roles of DNA topoisomerase I*. *Biochimie*, 2007. **89**(4): p. 482-9.
35. Morham, S.G., et al., *Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(12): p. 6804-9.
36. Miao, Z.H., et al., *Nonclassic functions of human topoisomerase I: genome-wide and pharmacologic analyses*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8752-61.
37. Pommier, Y., et al., *Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in Chinese hamster cells*. *Cancer Res*, 1985. **45**(7): p. 3143-9.
38. Capranico, G., et al., *A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons*. *Trends Pharmacol Sci*, 1997. **18**(9): p. 323-9.
39. D'Arpa, P., C. Beardmore, and L.F. Liu, *Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase poisons*. *Cancer Res*, 1990. **50**(21): p. 6919-24.
40. Kessel, D., *Effects of camptothecin on RNA synthesis in leukemia L1210 cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1971. **246**(2): p. 225-32.
41. Wu, J. and L.F. Liu, *Processing of topoisomerase I cleavable complexes into DNA damage by transcription*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(21): p. 4181-6.
42. Zhang, H., J.C. Wang, and L.F. Liu, *Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(4): p. 1060-4.
43. Bendixen, C., et al., *Camptothecin-stabilized topoisomerase I-DNA adducts cause premature termination of transcription*. *Biochemistry*, 1990. **29**(23): p. 5613-9.
44. Li, T.K. and L.F. Liu, *Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 53-77.
45. Sperry, A.O., V.C. Blasquez, and W.T. Garrard, *Dysfunction of chromosomal loop attachment sites: illegitimate recombination linked*

- to matrix association regions and topoisomerase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(14): p. 5497-501.
46. Kas, E., et al., *A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin*. EMBO J, 1993. **12**(1): p. 115-26.
 47. Riemsma, R., et al., *Systematic Review of topotecan (Hycamtin) in relapsed small cell lung cancer*. BMC Cancer. **10**: p. 436.
 48. Cunningham, D. and B. Glimelius, *A phase III study of irinotecan (CPT-11) versus best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer who have failed 5-fluorouracil therapy. V301 Study Group*. Semin Oncol, 1999. **26**(1 Suppl 5): p. 6-12.
 49. Capranico, G., J. Marinello, and L. Baranello, *Dissecting the transcriptional functions of human DNA topoisomerase I by selective inhibitors: implications for physiological and therapeutic modulation of enzyme activity*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1806**(2): p. 240-50.
 50. Sims, R.J., 3rd, R. Belotserkovskaya, and D. Reinberg, *Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2437-68.
 51. Komarnitsky, P., E.J. Cho, and S. Buratowski, *Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2452-60.
 52. Andrulis, E.D., et al., *High-resolution localization of Drosophila Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation*. Genes Dev, 2000. **14**(20): p. 2635-49.
 53. Cheng, C. and P.A. Sharp, *RNA polymerase II accumulation in the promoter-proximal region of the dihydrofolate reductase and gamma-actin genes*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1961-7.
 54. Gu, W., M. Wind, and D. Reines, *Increased accommodation of nascent RNA in a product site on RNA polymerase II during arrest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 6935-40.
 55. Kim, D.K., et al., *The regulation of elongation by eukaryotic RNA polymerase II: a recent view*. Mol Cells, 2001. **11**(3): p. 267-74.

56. Wada, T., et al., *DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 343-56.
57. Renner, D.B., et al., *A highly purified RNA polymerase II elongation control system*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42601-9.
58. Lis, J., *Promoter-associated pausing in promoter architecture and postinitiation transcriptional regulation*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1998. **63**: p. 347-56.
59. Baranello, L., et al., *DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1alpha gene locus*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(1): p. 159-71.
60. Svejstrup, J.Q., *Mechanisms of transcription-coupled DNA repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(1): p. 21-9.
61. Niida, H. and M. Nakanishi, *DNA damage checkpoints in mammals*. Mutagenesis, 2006. **21**(1): p. 3-9.
62. Yang, J., et al., *ATM and ATR: sensing DNA damage*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(2): p. 155-60.
63. Luciani, M.G., C. Campregher, and C. Gasche, *Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM*. Carcinogenesis, 2007. **28**(10): p. 2207-17.
64. Furuta, T., et al., *Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20303-12.
65. Hammond, E.M., et al., *Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(6): p. 1834-43.
66. Matsuoka, S., M. Huang, and S.J. Elledge, *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. Science, 1998. **282**(5395): p. 1893-7.
67. Buscemi, G., et al., *DNA damage-induced cell cycle regulation and function of novel Chk2 phosphoresidues*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 7832-45.

68. Wang, X.Q., et al., *ATR dependent activation of Chk2*. J Cell Physiol, 2006. **208**(3): p. 613-9.
69. Recolin, B., S. Van Der Laan, and D. Maiorano, *Role of replication protein A as sensor in activation of the S-phase checkpoint in Xenopus egg extracts*. Nucleic Acids Res.
70. Rapisarda, A., et al., *Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6845-8.
71. Rapisarda, A., et al., *Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1475-82.
72. Semenza, G.L., *HIF-1 and human disease: one highly involved factor*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 1983-91.
73. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Activation of the HIF pathway in cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(3): p. 293-9.
74. Iyer, N.V., S.W. Leung, and G.L. Semenza, *The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation*. Genomics, 1998. **52**(2): p. 159-65.
75. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
76. van der Groep, P., et al., *High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **111**(3): p. 475-80.
77. Clottes, E., *[Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]*. Bull Cancer, 2005. **92**(2): p. 119-27.
78. Nakai, H., et al., *Hypoxia inducible factor 1-alpha expression as a factor predictive of efficacy of taxane/platinum chemotherapy in advanced primary epithelial ovarian cancer*. Cancer Lett, 2007. **251**(1): p. 164-7.
79. Staab, A., et al., *Small interfering RNA targeting HIF-1alpha reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080*

- human fibrosarcoma cells in vitro*. *Strahlenther Onkol*, 2011. **187**(4): p. 252-9.
80. Wang, Y., et al., *Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(4): p. 399-411.
 81. Tang, N., et al., *Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(5): p. 485-95.
 82. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 789-99.
 83. Wang, X., et al., *Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 126-30.
 84. Nicolas, E., et al., *Distinct roles of HDAC complexes in promoter silencing, antisense suppression and DNA damage protection*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(5): p. 372-80.
 85. Dutrow, N., et al., *Dynamic transcriptome of Schizosaccharomyces pombe shown by RNA-DNA hybrid mapping*. *Nat Genet*, 2008. **40**(8): p. 977-86.
 86. Kulshreshtha, R., et al., *Regulation of microRNA expression: the hypoxic component*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(12): p. 1426-31.
 87. Wouters, M.D., et al., *MicroRNAs, the DNA damage response and cancer*. *Mutat Res*, 2011.
 88. Kulshreshtha, R., et al., *A microRNA signature of hypoxia*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(5): p. 1859-67.
 89. Hua, Z., et al., *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. *PLoS One*, 2006. **1**: p. e116.
 90. Hebert, C., et al., *High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma*. *Mol Cancer*, 2007. **6**: p. 5.
 91. Donker, R.B., et al., *The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts*. *Mol Hum Reprod*, 2007. **13**(4): p. 273-9.
 92. Lei, Z., et al., *Regulation of HIF-1alpha and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7629.

93. Ghosh, G., et al., *Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 4141-54.
94. Rane, S., et al., *Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes*. Circ Res, 2009. **104**(7): p. 879-86.
95. Neal, C.S., et al., *The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer*. BMC Med, 2010. **8**: p. 64.
96. Loscalzo, J., *The cellular response to hypoxia: tuning the system with microRNAs*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3815-7.
97. Hu, H. and R.A. Gatti, *MicroRNAs: new players in the DNA damage response*. J Mol Cell Biol, 2011. **3**(3): p. 151-8.
98. Zhang, X., et al., *The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response*. Mol Cell, 2011. **41**(4): p. 371-83.
99. Boominathan, L., *The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10615.
100. Thrash-Bingham, C.A. and K.D. Tartof, *aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(2): p. 143-51.
101. Carninci, P., et al., *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1559-63.
102. Gingeras, T.R., *Origin of phenotypes: genes and transcripts*. Genome Res, 2007. **17**(6): p. 682-90.
103. Huttenhofer, A., P. Schattner, and N. Polacek, *Non-coding RNAs: hope or hype?* Trends Genet, 2005. **21**(5): p. 289-97.
104. Dinger, M.E., et al., *Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities*. PLoS Comput Biol, 2008. **4**(11): p. e1000176.
105. Bachellerie, J.P., J. Cavaille, and A. Huttenhofer, *The expanding snoRNA world*. Biochimie, 2002. **84**(8): p. 775-90.
106. Grosshans, H. and F.J. Slack, *Micro-RNAs: small is plentiful*. J Cell Biol, 2002. **156**(1): p. 17-21.

107. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
108. Rana, T.M., *Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 23-36.
109. Perron, M.P. and P. Provost, *Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2537-47.
110. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans**. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
111. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
112. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D154-8.
113. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
114. Griffiths-Jones, S., *The microRNA Registry*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D109-11.
115. Rajewsky, N., *L(ou)sy miRNA targets?* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 754-5.
116. Rajewsky, N., *microRNA target predictions in animals*. Nat Genet, 2006. **38 Suppl**: p. S8-13.
117. Berezikov, E., et al., *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*. Cell, 2005. **120**(1): p. 21-4.
118. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. Curr Genomics, 2010. **11**(7): p. 537-61.
119. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
120. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.

121. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
122. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
123. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
124. Cifuentes, D., et al., *A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1694-8.
125. Guimbellot, J.S., et al., *Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis*. BMC Med Genomics, 2009. **2**: p. 15.
126. MacRae, I.J., et al., *In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 512-7.
127. Diederichs, S. and D.A. Haber, *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1097-108.
128. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 522-32.
129. Robb, G.B. and T.M. Rana, *RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 523-37.
130. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol, 2005. **3**(3): p. e85.
131. Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin, *Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 31-40.
132. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
133. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
134. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. Mol Cell, 2004. **15**(2): p. 185-97.

135. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
136. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* RNA, 2005. **11**(12): p. 1753-61.
137. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
138. Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker, *Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies*. Science, 2005. **310**(5747): p. 486-9.
139. Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4034-9.
140. Ogawa, Y., B.K. Sun, and J.T. Lee, *Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways*. Science, 2008. **320**(5881): p. 1336-41.
141. Fejes-Toth K, et al., *Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1028-32.
142. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
143. He, Y., et al., *The antisense transcriptomes of human cells*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1855-7.
144. Mariner, P.D., et al., *Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock*. Mol Cell, 2008. **29**(4): p. 499-509.
145. Beltran, M., et al., *A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 756-69.
146. Willingham, A.T., et al., *A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1570-3.

147. Kapranov, P., et al., *RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription*. Science, 2007. **316**(5830): p. 1484-8.
148. Okazaki, Y., et al., *Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 563-73.
149. Feng, J., et al., *The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator*. Genes Dev, 2006. **20**(11): p. 1470-84.
150. Wilusz, J.E., H. Sunwoo, and D.L. Spector, *Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world*. Genes Dev, 2009. **23**(13): p. 1494-504.
151. Das, M., et al., *Full-length cDNAs: more than just reaching the ends*. Physiol Genomics, 2001. **6**(2): p. 57-80.
152. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
153. Choi, Y.H. and C.H. Hagedorn, *Purifying mRNAs with a high-affinity eIF4E mutant identifies the short 3' poly(A) end phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 7033-8.
154. Lynch, K.W., *Cotranscriptional splicing regulation: it's not just about speed*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(11): p. 952-3.
155. Hsiang, Y.H., M.G. Lihou, and L.F. Liu, *Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin*. Cancer Res, 1989. **49**(18): p. 5077-82.
156. Clemson, C.M., et al., *An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles*. Mol Cell, 2009. **33**(6): p. 717-26.
157. Sunwoo, H., et al., *MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles*. Genome Res, 2009. **19**(3): p. 347-59.
158. Mercer, T.R., et al., *Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 716-21.

159. Wilusz, J.E., S.M. Freier, and D.L. Spector, *3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA*. Cell, 2008. **135**(5): p. 919-32.
160. Rossignol, F., C. Vache, and E. Clottes, *Natural antisense transcripts of hypoxia-inducible factor 1alpha are detected in different normal and tumour human tissues*. Gene, 2002. **299**(1-2): p. 135-40.
161. Bertozzi, D., et al., *Characterization of novel antisense HIF-1alpha transcripts in human cancers*. Cell Cycle, 2011 **10**(18): p. 3189-97.
162. Gleadle, J.M. and P.J. Ratcliffe, *Hypoxia and the regulation of gene expression*. Mol Med Today, 1998. **4**(3): p. 122-9.
163. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
164. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
165. Uchida, T., et al., *Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14871-8.
166. Ravasi, T., et al., *Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome*. Genome Res, 2006. **16**(1): p. 11-9.
167. Dinger, M.E., et al., *Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation*. Genome Res, 2008. **18**(9): p. 1433-45.
168. Gnarr, J.R., et al., *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 85-90.
169. Zbar, B., et al., *Hereditary papillary renal cell carcinoma: clinical studies in 10 families*. J Urol, 1995. **153**(3 Pt 2): p. 907-12.