



Dipartimento di Scienze della Vita e
dell'Ambiente



TESI DI LAUREA

Scienze Biologiche

**The role of DANCR long non coding RNA in
acute myeloid leukemia**

**Il ruolo del long non coding RNA DANCR
nella leucemia mieloide acuta**

RELATRICE

Prof.ssa Anna La Teana

LAUREANDA

Marzia Marchesani

+
○

Introduzione

Cosa sono i
lncRNA?



Che cos'è
l'AML?



Ruolo del
lncRNA DANCER
in cellule AML



Studi ed
esperimenti

Risultati



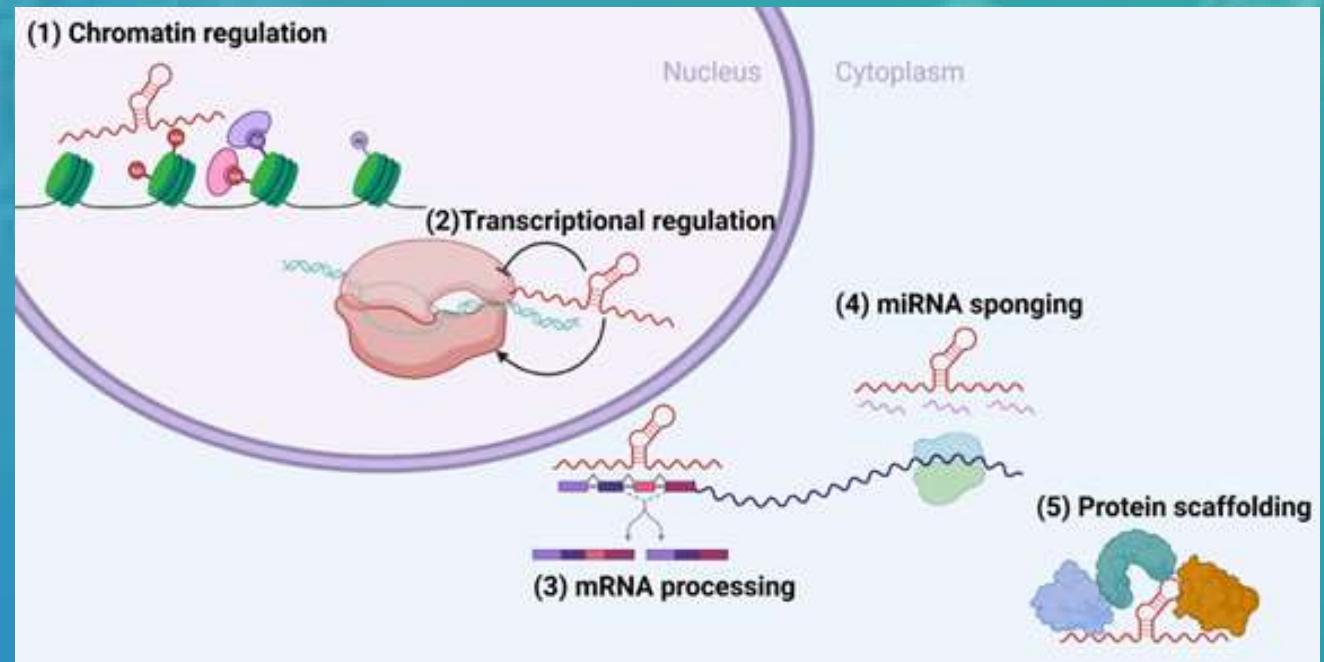
○

Cosa sono i lncRNA?

- RNA non codificanti
- Non presentano sequenza ORF
- Hanno una lunghezza > 200 nt
- Svolgono diverse funzioni in cellule differenti

○

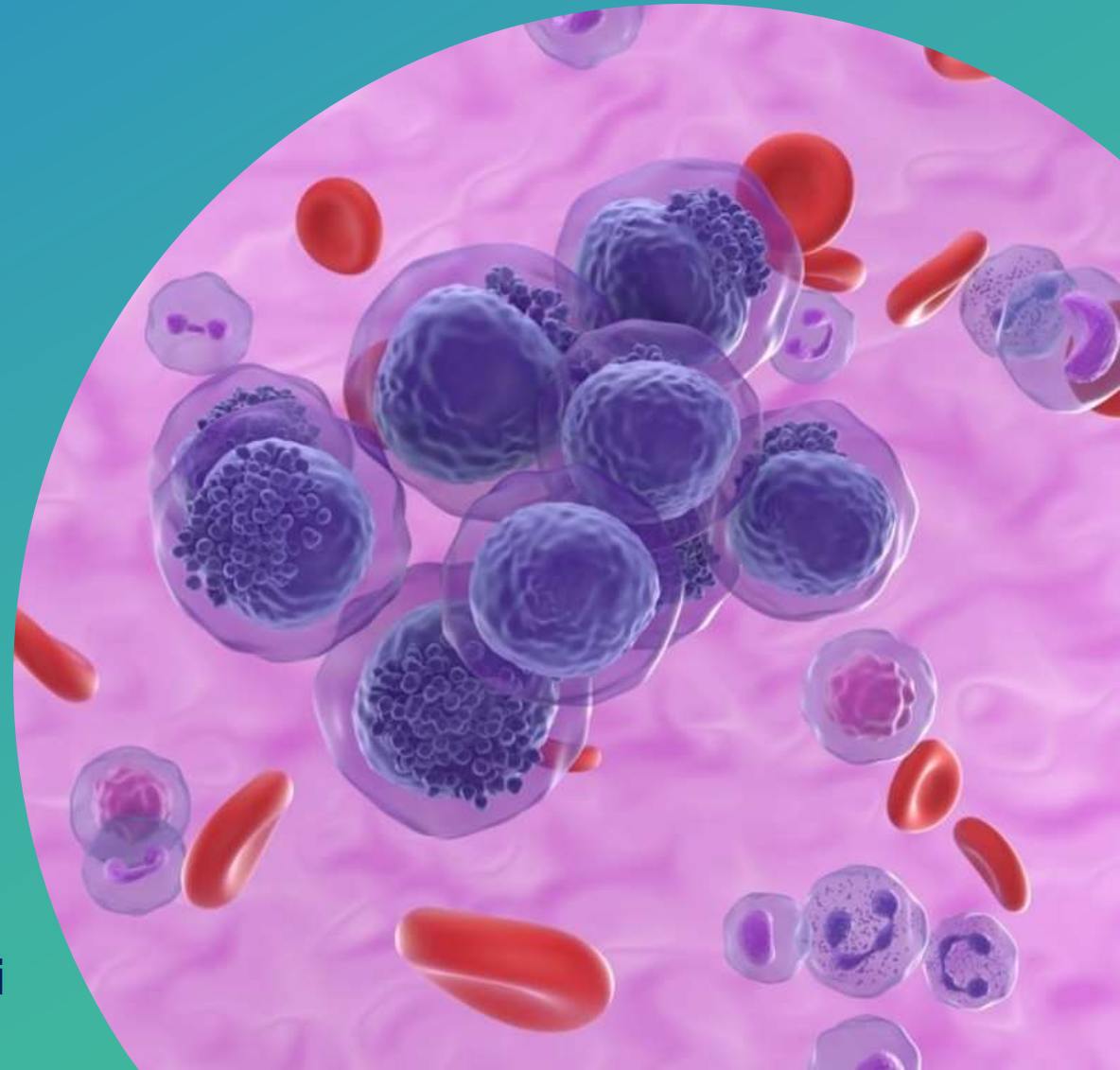
- Controllano diversi processi biologici
- Sono coinvolti in diversi tumori
- lncRNA DANCR causa resistenza alla terapia in cellule AML



Leucemia mieloide acuta (AML)

E' una delle neoplasie ematologiche più letali:

- **E' causata da errori e mutazioni genetiche**
- **E' caratterizzata da proliferazione incontrollata**
- **Tasso di sopravvivenza pari al 30% negli adulti**
- **Chemioterapia e trapianto di midollo**
- **Resistenza ai farmaci indotta da alcuni lncRNA**



Qual è il ruolo del lncRNA DANCR in AML?

Causa resistenza al farmaco Citarabina (Ara-C)

L'espressione di DANCR in cellule AML sottoposte ad Ara-c aumenta in maniera dose dipendente

DANCR promuove l'autofagia regolata dall'asse MIR-874-3P/ATG16L1 per conferire resistenza ad Ara-C nelle cellule umane di AML

Cos'è +
l'autofagia?

Studi ed esperimenti

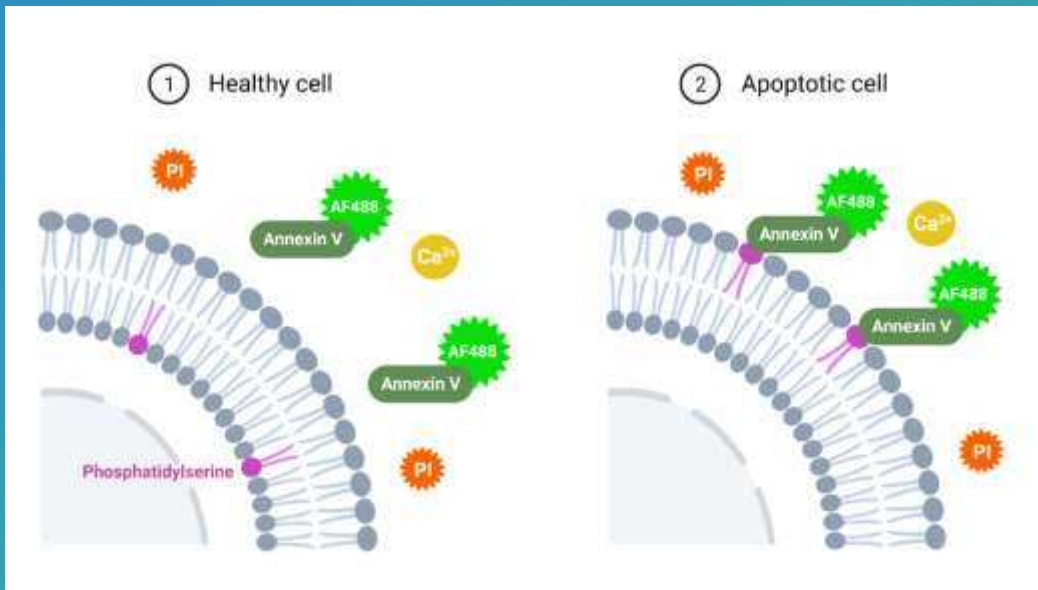


➤ **Cellule AML isolate e coltivate in un terreno di coltura RPMI 1640 completo**

➤ **Trattamento con Ara-C a diverse concentrazioni e trasfezione con diversi costrutti**

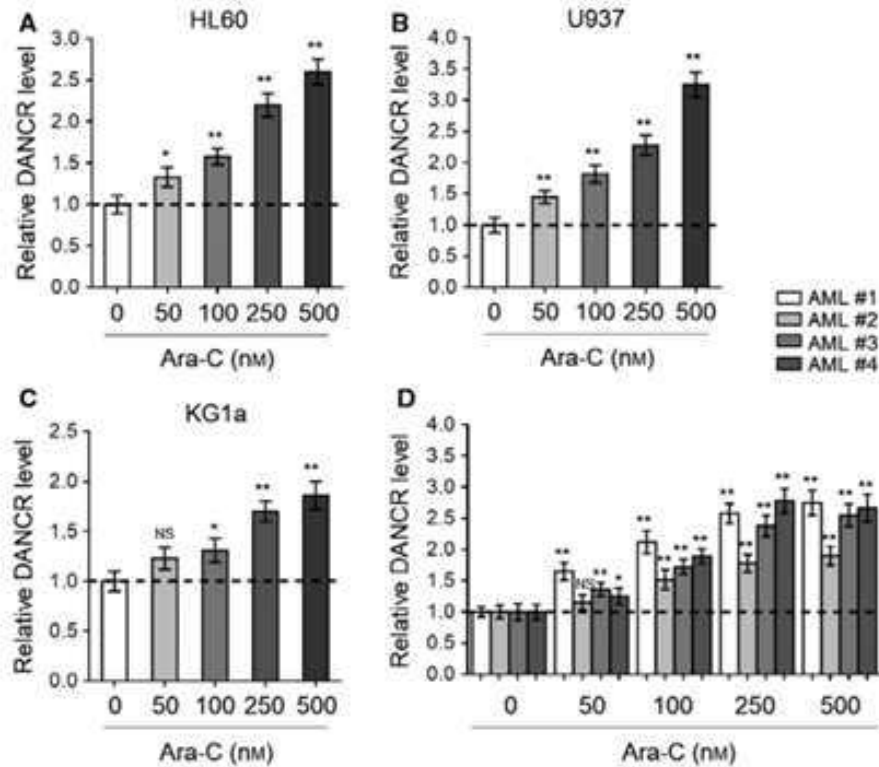
➤ **Rilevamento dell'attività cellulare e dell'apoptosi attraverso doppia colorazione con ioduro di propidio e annassina V-FITC**

➤ **Immunoblotting e immunofluorescenza**

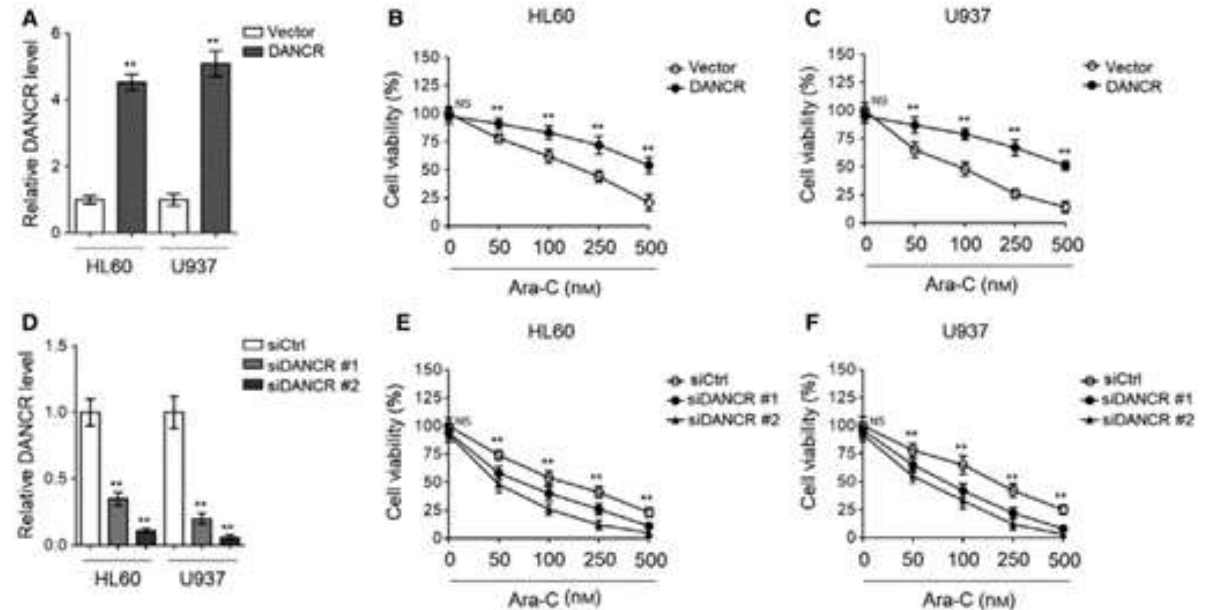


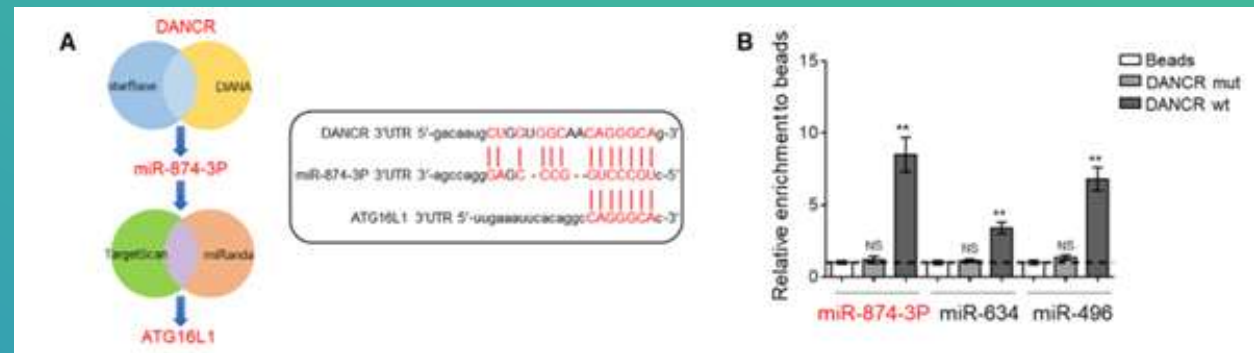
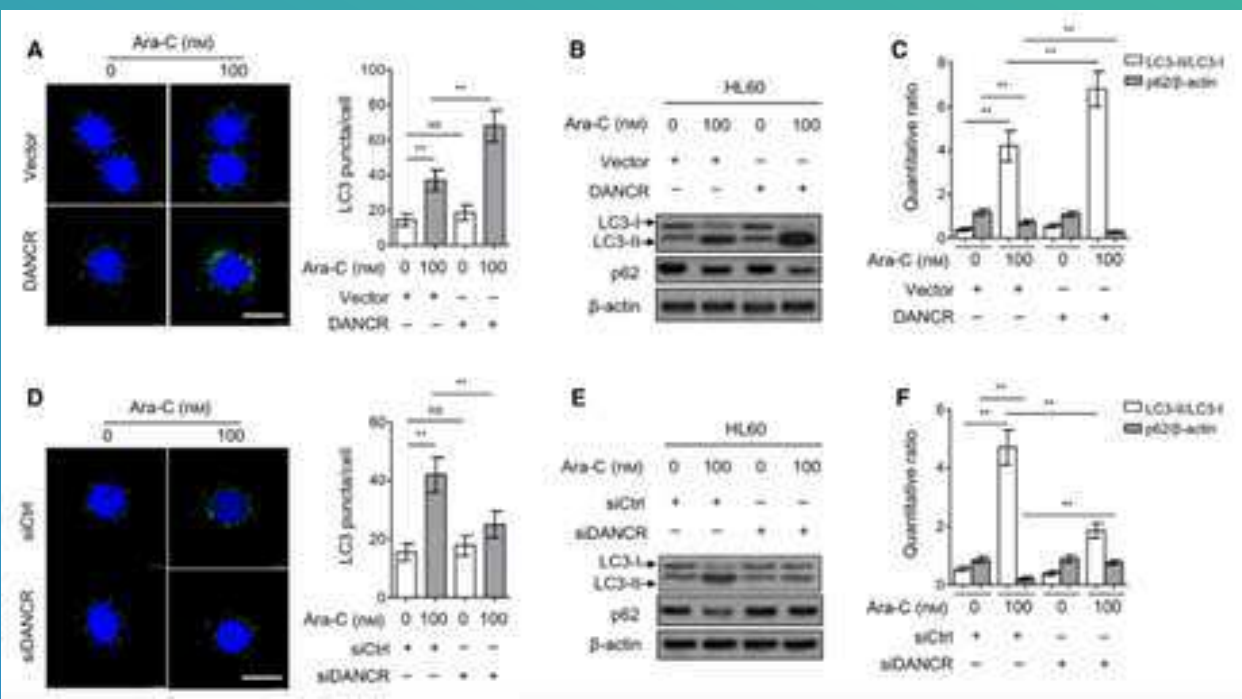
Risultati

DANCR conferisce resistenza ad Ara-C nelle cellule AML umane



L'espressione di DANCR è aumentata in maniera dose-dipendente nelle cellule AML umane trattate con Ara-C





DANCR promuove l'autofagia nelle cellule AML trattate con Ara-C

- aumento del numero di LC3 puncta, proteina marker coinvolta nella formazione degli autofagosomi
- DANCR promuove l'autofagia in presenza di Ara-C

DANCR prende di mira direttamente miR-874-3P nelle cellule AML

- DANCR e ATG16L1 condividono una sequenza di legame in comune nel sito 3' UTR di miR-874-3P, suggerendo che DANCR potrebbe legarsi a miR-874-3P

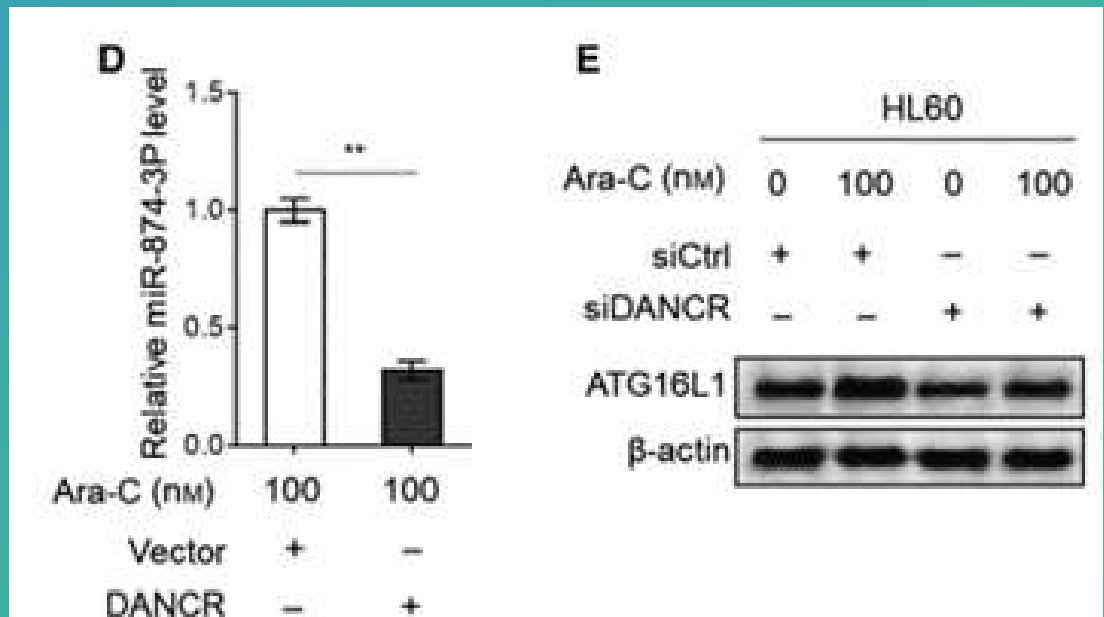
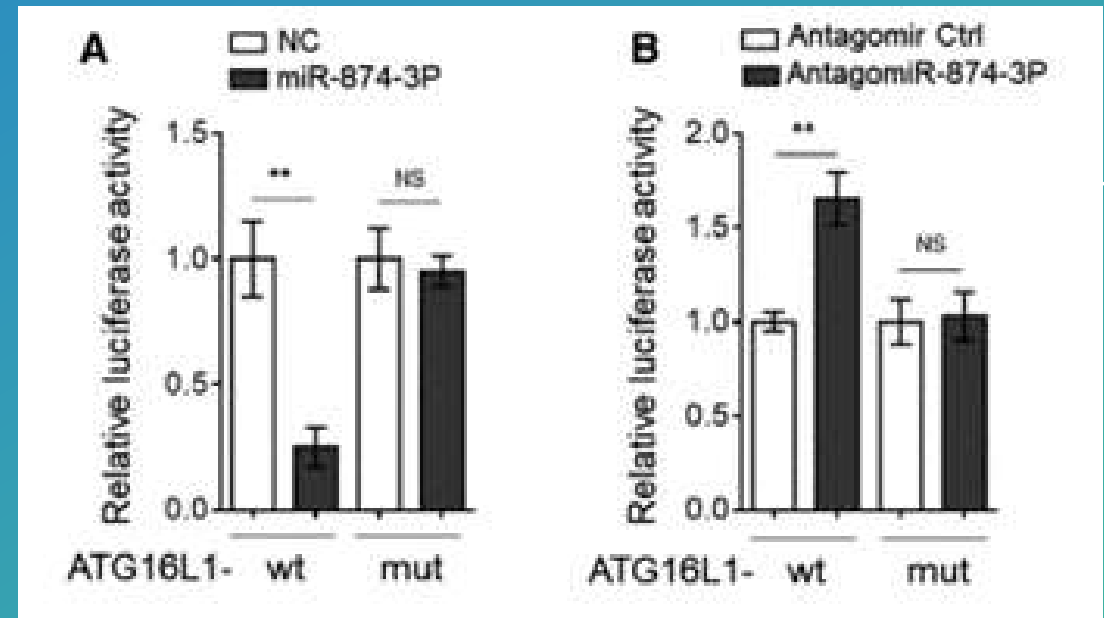
DANCR induce l'espressione di ATG16L1 "sequestrando" miR-874-3P nelle cellule AML

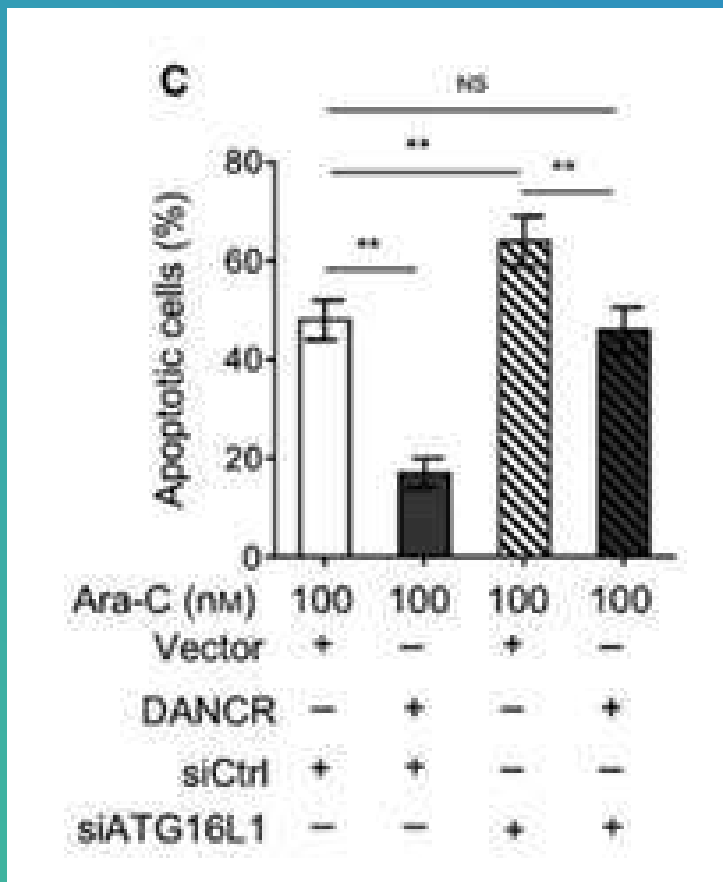
miR-874-3P: fattore antitumorale
 ATG16L1: componente dell'autofagia



ATG16L1 è un diretto bersaglio di miR-874-3P nelle cellule HL60

La sovraespressione di DANCR aumenta l'espressione di ATG16L1 indotta da Ara-C



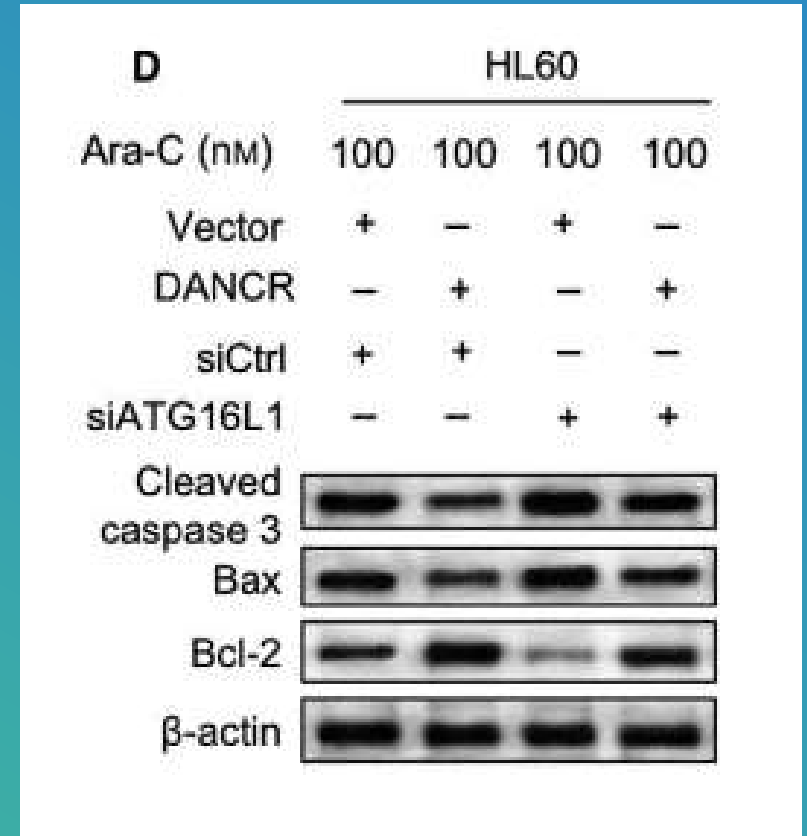


+

•

La sovraespressione di DANCR ha diminuito il livello di caspasi-3 clivata e ha aumentato il rapporto Bcl2/Bax (due indicatori antiapoptotici)

Questi risultati mostrano che l'autofagia mediata da ATG16L1 ha un ruolo antiapoptotico contro la citotossicità di Ara-C

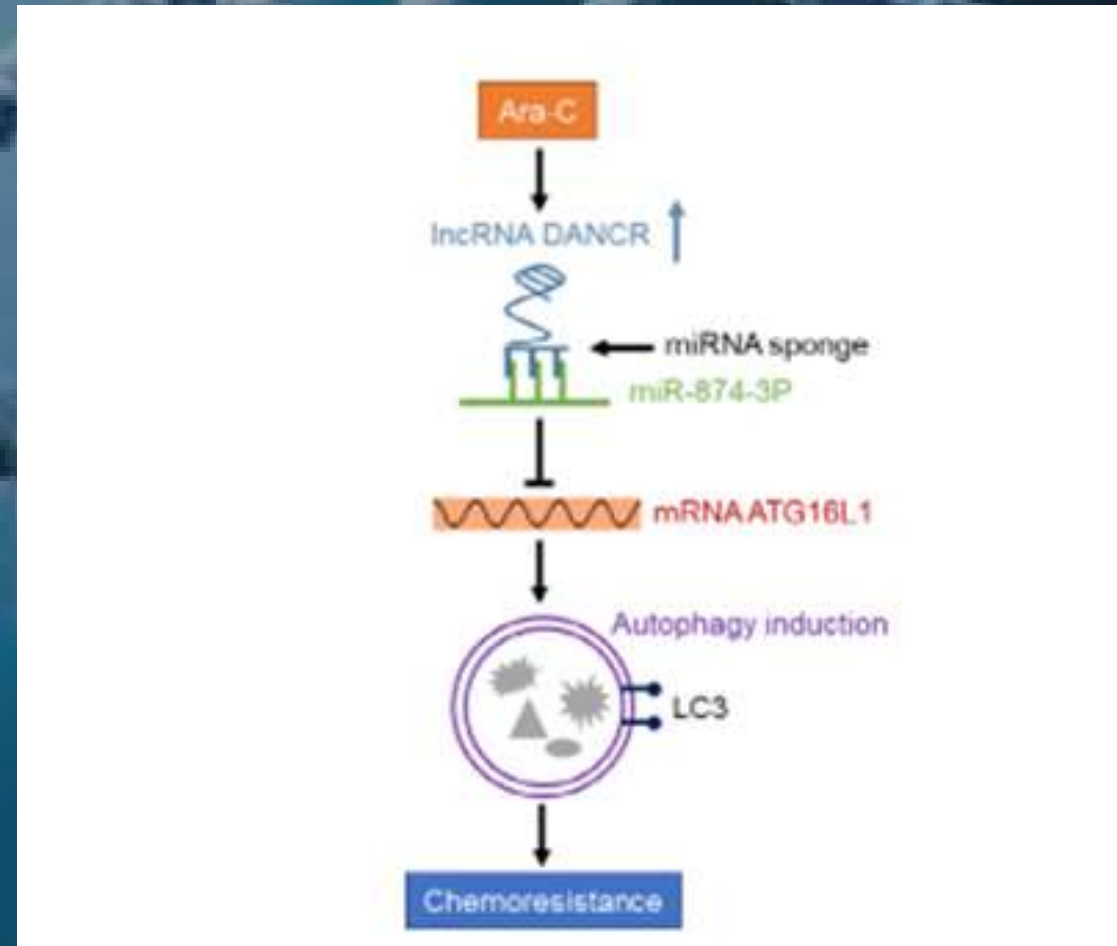


CONCLUSIONI

Il lncRNA DANCR induce resistenza alla Citarabina (Ara-C) in cellule AML secondo l'asse miR-874-3P/ATG16L1.

L'espressione di DANCR aumenta in maniera dose-dipendente in cellule trattate con Ara-C, inducendo il processo dell'autofagia come meccanismo di sopravvivenza della AML.

Di conseguenza DANCR viene identificato come un potenziale bersaglio per superare la resistenza alla Citarabina nella chemioterapia dell'AML.



ABSTRACT

○
Gli lncRNA sono lunghi RNA (> 200 nt) non codificanti, non presentano la sequenza ORF, regolano numerosi processi biologici e sono coinvolti in differenti patologie tumorali tra cui la leucemia mieloide acuta (AML). L'AML è una delle neoplasie ematologiche più gravi, ha origine da mutazioni genetiche ed è caratterizzata da proliferazione incontrollata. Viene trattata con chemioterapia e trapianto di midollo osseo.

LncRNA DANCR è coinvolto nella resistenza al farmaco Citarabina Ara-C. L'espressione di DANCR in cellule AML sottoposte ad Ara-C aumenta in maniera dose-dipendente dimostrando che DANCR regola positivamente la chemioresistenza. DANCR conferisce resistenza ad Ara-C nell'AML, promuovendo l'autofagia tramite l'asse MIR-874-3P/ATG16L1.

Sono stati effettuati diversi studi ed esperimenti, come coltivazione in terreno di coltura RPMI, trattamento a diverse concentrazioni di Ara-C con successiva trasfezione, doppia colorazione con ioduro di propidio e annexina V-FITC per rilevare la vitalità cellulare e l'apoptosi, immunoblotting e immunofluorescenza.

I risultati ottenuti affermano che l'espressione di DANCR aumenta in maniera dose-dipendente in cellule AML trattate con Ara-C e che causa resistenza a tale farmaco. Dimostrano inoltre che DANCR promuove l'autofagia in cellule AML trattate con Ara-C prendendo di mira direttamente il miR-874-3P. DANCR induce l'espressione di ATG16L1 attraverso l'assorbimento di miR-874-3P nelle cellule AML, mentre, il silenziamento di ATG16L1 annulla l'autofagia e diminuisce la resistenza ad Ara-C. Questi risultati mostrano che l'autofagia mediata da ATG16L1 ha un ruolo antiapoptotico contro la citotossicità di Ara-C. L'asse miR-874-3P/ATG16L1 viene descritto quindi come un meccanismo sottostante l'autofagia regolata da DANCR che media la resistenza ad Ara-C nelle cellule AML.

BIBLIOGRAFIA

Kantarjian et al. 2021; Kirk et al., 2018; Dahariya et al., 2019; Mattick et al., 2023; Yao et al., 2019; Connerty et al., 2021; Smith et al., 2019; Yi et al., 2020; Yu et al., 2020; Rashidi et al., 2018; Bill et al., 2019; H. Zhang et al., 2021; Dohner et al., 2015; Roboz, 2011; Schenk et al., 2012; Dohner et al., 2015; Krug et al., 2011; Sujobert et al., 2015; Wang et al., 2011; Tanida et al., 2005; Tay et al., 2014; Frankel e Lund, 2012; Cadwell et al., 2008; Lu et al., 2018; Xu et al., 2018; Levine e Klionsky, 2004; Ishibashi et al., 2012; Salem et al., 2015);
https://it.wikipedia.org/wiki/RNA_non_codificante;
https://it.wikipedia.org/wiki/Autofagia_cellulare; <https://www.jove.com/it/v/5650/annexin-v-and-propidium-iodide-labeling?language=Italian#:~:text=L'annessina%20V%20coniugata%20con,apoptotiche%20legandosi%20alla%20PS%20esternalizzata>; <https://www.ildiabeteonline.it/autofagia-e-diabete-una-prospettiva-traslazionale/>; <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/leucemia-mieloide-acuta>; <https://www.galileonet.it/autofagia-studio-cancro/>;
<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers/rpmi-1640-media>;
https://it.wikipedia.org/wiki/Saggio_MTT;
<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/applications/genomics/qpcr>;
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23482084/>