Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica

CORSO DI DOTTORATO IN "EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA"

(XX° CICLO)

Titolo della tesi:

Modulazione della risposta cellulare al danno al DNA nelle sindromi ad instabilità genomica

Coordinatore:
Prof. Federico Federici

Tutor:
Dott.ssa Roberta Meschini

Dottorando:
Dott. Andrea Berni

INDICE

RIASSUNTO **pag. 1**

PARTE GENERALE

1. ATASSIA TELANGIECTASIA

Aspetti clinici pag. 2

2. DANNO INDOTTO AL DNA

Introduzione pag. 6

Proprietà delle radiazioni ionizzanti pag. 6

Effetto delle radiazioni sul DNA pag. 8

Specie reattive dell'ossigeno e "stress ossidativo" pag. 9

Tipi di ROS pag. 9

3. MECCANISMI DI DIFESA DAI ROS pag. 11

4. LE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE pag. 13

Intrascambi cromatidici pag. 17

Interscambi cromatidici pag. 19

Intrascambi cromosomici pag. 20

Interscambi cromosomici pag. 21

5. LA PROTEINA CHINASI ATM

Introduzione pag. 22

La risposta al danno al DNA e le sindromi ad instabilità genomica pag. 23

Il modello della risposta cellulare alle DSBs pag. 26

I meccanismi di riparazione delle DSBs pag. 27

La famiglia delle proteine chinasi PI3K-correlate pag. 30

La proteina ATM: al centro della rete di segnalazione delle DSBs pag. 31

Altri membri della famiglia delle proteine PIKK pag. 37

Mutazioni di ATM e cancro pag. 38

Mutazioni di ATM e stress ossidativo pag. 40

6. LA PROTEINA p53

Il mantenimento della stabilità genomica pag. 42

I geni "target" di p53 pag. 42

Struttura e mutazioni della proteina p53 pag. 44

Regolazione dell'attività trascrizionale di p53 pag. 45

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA pag. 48

7. MATERIALI E METODI

Linee cellulari pag. 49

Condizioni di crescita pag. 49

Reagenti chimici pag. 51

Trattamento delle colture cellulari pag. 51

Protocollo sperimentale generale pag. 52

Fissaggio ed allestimento dei preparati per l'analisi citogenetica pag. 54

Analisi del ciclo cellulare al FACS pag. 54

Comet assay alcalino e neutro pag. 55

Western blotting (SDS page) pag. 57

8. RISULTATI pag. 58

9. DISCUSSIONE pag. 79

10. BIBLIOGRAFIA pag. 93

Ringraziamenti pag. 108

RIASSUNTO

La mia tesi di dottorato tratta problematiche inerenti alla risposta cellulare al danno al DNA in linee cellulari di pazienti affetti da Ataxia Telangiectasia (A-T), una sindrome genetica dovuta alla mutazione del gene *ATM* codificante per una proteina essenziale per il mantenimento della stabilità genomica. Questa malattia manifesta aspetti clinici molto gravi come la predisposizione al cancro e la neurodegenerazione. Ho affrontato la questione attraverso due punti di vista analizzando, cioè, la sensibilità di queste cellule sia alle radiazioni che allo stress ossidativo in termini di induzione di danno primario al DNA e formazione di aberrazioni cromosomiche. Nel primo caso ho anche saggiato il ruolo della proteina p53 (un target di ATM nella risposta cellulare al danno al DNA) nella riparazione delle rotture a doppia elica (DSBs). Nel secondo ho comparato l'effetto della L-Carnitina, una molecola coinvolta nel processo di formazione di energia per la cellula, con quella del Mannitolo, un noto scavenger di radicali liberi ossidrilici, nel tentativo di ridurre gli effetti deleteri dello stress ossidativo nelle cellule A-T.

Abbiamo dimostrato che la proteina p53 interviene nel processo di riparazione delle DSBs in cellule A-T, favorendo il processo di "rejoining" delle estremità rotte. Inoltre abbiamo riscontrato che il pre-trattamento con L-Carnitina riduce il livello di stress ossidativo in cellule A-T in modo più marcato rispetto al Mannitolo agendo a tempi precoci dopo la formazione della lesione.

1. ATASSIA-TELANGIECTASIA

Aspetti clinici

La proteina ATM fu identificata come il prodotto del gene che ha subito una mutazione (perduto o inattivo) nella malattia genetica umana **Atassia-Telangiectasia** (A-T). A-T appartiene ad un gruppo di malattie umane collettivamente chiamate "sindromi di instabilità di genomica" le quali risultano da una risposta difettiva ad una specifica lesione al DNA.
L'Atassia Telangiectasia (AT) è una sindrome genetica con eredità autosomica recessiva descritta per la prima volta da Denise Louis-Bar nel 1941 (*Louis-Bar, 1941*).
I sintomi primari di questa malattia sono (vedi anche Figura 1.a.):

1. degenerazione cerebellare che conduce ad ampia e progressiva disfunzione neuromotoria; (*Guiloff et al., 1982*)
2. telangectasie della congiuntiva del bulbo oculare e del volto; (*Waldmann et al, 1983*).
3. atassia del tronco, con inizio osservato da 1 ai 3 anni di età;
4. conversazione confusa e disorganizzata;
5. aprassia oculomotoria e incapacità di seguire un oggetto nel campo visivo;
6. infezioni frequenti, accompagnate da immunodeficienze cellulari e seriche;
7. elevata predisposizione al cancro, in particolare leucemia o linfoma;
8. ipersensibilità a radiazioni ionizzanti, con controindicazione ad usare le dosi convenzionali della radioterapia per il cancro;
9. traslocazioni reciproche che riguardano quasi esclusivamente i cromosomi 7 e 14;

Altri sintomi comprendono invecchiamento prematuro e anormalità del sistema endocrino. La malattia è caratterizzata anche da difetti dei meccanismi difensivi immunitari con caduta delle difese e quindi con infezioni ricorrenti e non a caso una delle caratteristiche di tale sindrome è l'ipoplasia del timo (ghiandola importante nella difesa immunitaria con la produzione di timociti). Un'altra caratteristica è rappresentata da **l'ipersensibilità alle radiazioni ionizzanti** e ad agenti che inducono rotture a doppia elica nel DNA (DSBs)**.**

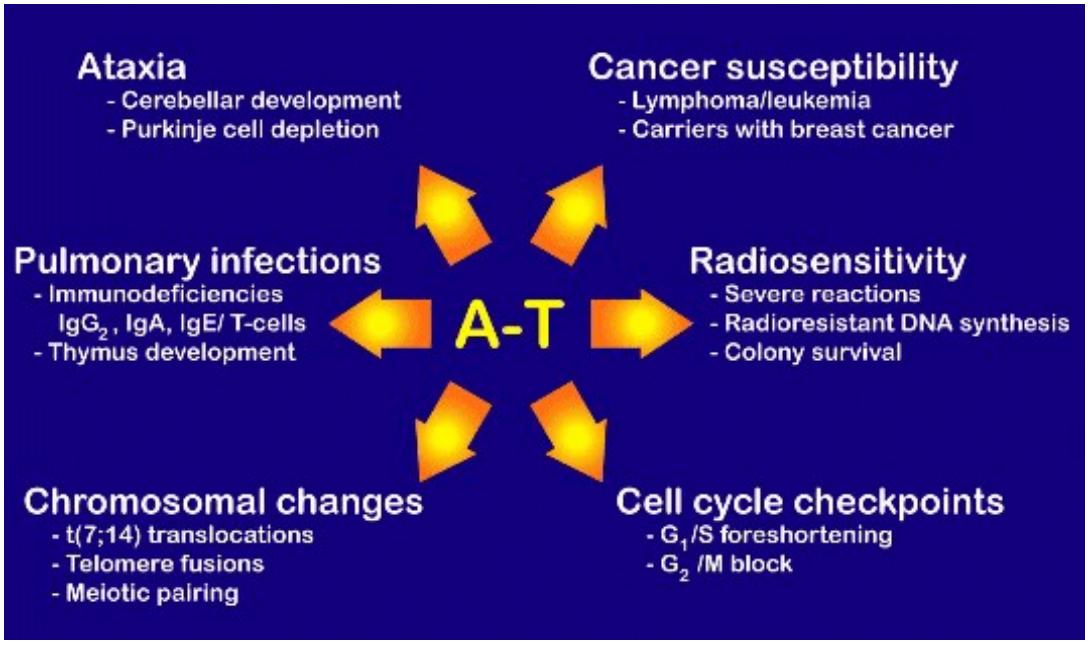


Figura 1.a. Sintomi e caratteristiche della malattia umana Atassia Telangiectasia.

Atassia. Per **atassia** si intende un corteo sintomatologico caratterizzato da alterazioni dei movimenti volontari a carico degli arti superiori, inferiori e tronco che diventano disarmonici, eccessivamente ampi e scoordinati. Poco dopo aver imparato a camminare, bambini A-T cominciano a barcollare verso i dieci anni di età, e sono costretti alla sedia a rotelle per il resto della loro vita. In medicina infatti esistono delle condizioni patologiche che vengono definite col nome di atassia (dal greco = disordine) in cui i movimenti dei segmenti scheletrici appaiono disordinati, poichè alcuni muscoli entrano in azione e cessano di agire, contraendosi e rilassandosi con ritmo inadeguato alla finalità richiesta: il paziente riesce a formulare l'azione motoria, tuttavia non riesce ad eseguirla con la finalità che si è proposto. Infatti nella coordinazione ed efficacia dei movimenti volontari, che sono finalizzati alla vita di relazione intervengono varie strutture: nervi periferici, vie sensitive del midollo e dell'encefalo, cervelletto, corteccia cerebellare, nuclei centrali encefalici e labirinto.
L'atassia può manifestarsi per qualsiasi lesione che interessi una qualunque delle funzioni suddette. Nel nostro caso il disordine è di carattere cerebellare ed a carico anche dei cordoni posteriori del midollo spinale. Le malattie neurologiche che hanno in comune questo aspetto clinico sono moltissime e l'atassia, in medicina, rappresenta non una malattia, ma il sintomo di una lesione neurologica a vario livello. Un esempio di alcune malattie il cui sintomo comune e principale è rappresentato dall'atassia sono: la tabe dorsale, le sclerosi combinanti midollari, l'atassia spinale ereditaria, la sclerosi a placche, l'atassia da lesioni encefaliche, l'atassia labirintica, le atassie

periferiche ecc...

Telangiectasie. **Le telangectasie** sono invece rappresentate da dilatazioni permanenti delle piccole arteriole e dei capillari che compaiono sulla pelle sotto forma di macchie vascolari raggiate, a stella o aracniformi. Per la loro struttura ateriosa, ad una attenta osservazione possono apparire pulsanti. Scompaiono alla pressione digitale per svuotamento vascolare, per ricomparire al termine della compressione. La caratteristica della pulsabilità le distingue dalle ectasie venose, con le quali non vanno confuse.
Sono frequenti sul volto e sul collo, più rare sugli arti, dove invece appaiono più frequenti le ectasie venose. Le telangectasie, oltre che a livello della congiuntiva bulbare ,come nel nostro caso, possono essere presenti sulle mucose: orale, linguale, nasale, bronchiale, tracheale, dove possono essere causa di microemorragie ed emorragie più importanti. Solitamente la telangiectasia non appare prima dei 4-6 anni di età, ossia ben dopo l'avvento dell'atassia. In alcune famiglie, la telangiectasia non appare neanche nei pazienti più vecchi che mostrano tuttavia tutte le altre caratteristiche e tutti gli altri sintomi della malattia.
Dal punto di vista anatomo patologico all'esame istologico del sistema nervoso centrale (SNC), si evidenzia una degenerazione delle cellule della corteccia cerebellare, particolarmente a carico delle cellule di Purkinje. Dal punto di vista epidemiologico, osserviamo che: l'incidenza di AT è di un individuo su 40.000 nati e quindi la frequenza del gene nella popolazione generale è di circa 1/100. I pazienti con AT hanno anche un'incidenza di tumori che è 100 volte superiore a quella della popolazione. Swift ed i suoi collaboratori (*Swift et al, 1991*) hanno esaminato il rischio di cancro negli eterozigoti AT che rappresentano l'1-2% della popolazione. Da i loro studi, condotti su 128 famiglie AT, il tipo di cancro più frequente era quello della mammella con un rischio stimato del 5,1% superiore ai soggetti femminili omozigoti per l'AT. Anche se non sono disponibili dei test affidabili per l'identificazione degli eterozigoti (*McKinnon PJ, 1987*) è stato tuttavia stabilito che sono certamente eterozigoti i genitori dei pazienti AT, mentre sono a rischio di eterozigosi i fratelli sani (67%), gli ascendenti ed i collaterali. Recentemente è stato suggerito (*Djuzenova CS. et al, 1999*) un nuovo approccio in vitro per l'identificazione degli eterozigoti A-T basato sulla valutazione della radiosensibilità e della capacità di riparare il danno indotto al DNA in linfociti di sangue periferico irradiati, utilizzando la tecnica del "single cell gel electrophoresis" (comet assay). La valutazione quantitativa della corsa elettroforetica rivela che negli eterozigoti A-T la percentuale di danno iniziale al DNA è sempre 3 volte superiore che nelle cellule di controllo. In aggiunta, il processo di riparazione del DNA in portatori A-T irradiati risulta 3 volte più lento, e la quantità di DNA non riparato in queste cellule risulta 3 volte più grande che nel controllo. Questo metodo sembra essere un'utile strumento da usare come "prescreening test" per verificare successivamente lo stato mutato

di ATM. L'approccio può inoltre essere utilizzato per predire la radiosensibilità in vivo; ciò potrebbe consentire l'ottimizzazione dei programmi di radioterapia individuale.

2. DANNO INDOTTO AL DNA:

RADIAZIONI IONIZZANTI E STRESS OSSIDATIVO

Introduzione

L'uomo durante tutta la sua vita è continuamente esposto a radiazioni. I raggi UV e le radiazioni ionizzanti sono quelle più importanti e più studiate per i loro effetti sulla materia biologica. Sebbene l'uomo sia esposto a minime dosi di radiazioni ionizzanti (se confrontate alle dosi di UV a cui è sottoposto per la quotidiana esposizione alla luce solare) gli effetti prodotti dall'esposizione possono esprimersi a distanza di mesi o anni dall'irradiazione provocando, soprattutto, cancro nelle cellule somatiche ed alterazioni ereditarie in quelle germinali. È noto da lungo tempo che il DNA sia uno dei "target" principali delle radiazioni ionizzanti. In seguito alla scoperta dell'effetto della colchicina, un veleno del fuso mitotico che provoca l'arresto del ciclo cellulare in metafase, (*Levan, 1938*) è stato possibile effettuare studi dettagliati sull'induzione del danno cromosomico da parte delle radiazioni. L'analisi citogenetica si è quindi rivelata una tecnica fondamentale nello studio degli effetti dell'esposizione alle radiazioni ionizzanti e di altri agenti che danneggiano il DNA. La comprensione degli effetti biologici delle radiazioni è di fondamentale importanza per le misure di radio-protezione. Ben note sono le proprietà carcinogeniche delle radiazioni ionizzanti, il cui spettro dipende dal tessuto esposto, dalle condizioni di esposizione, dal background genetico, dal sesso e da altri fattori. Molte delle informazioni sul cancro indotto dalle radiazioni provengono purtroppo da studi epidemiologici sulle popolazioni umane, tra cui possiamo ricordare il bombardamento atomico in Giappone. Da uno studio effettuato sul cariotipo di persone sopravvissute al bombardamento di Hiroshima è emersa, a distanza di venti anni la presenza di "aberrazioni cromosomiche" (*Sasaki e Miyata, 1968*). Infatti, sebbene i meccanismi di riparazione e i sistemi di difesa che si sono evoluti ed affinati durante l'evoluzione, ci proteggano costantemente dal danno indotto dalle radiazioni ionizzanti, cellule che vengono ampiamente danneggiate non sono in grado di riparare tutto il danno e, se non vanno incontro a morte apoptotica, manterranno nel genoma aberrazioni cromosomiche potenzialmente pericolose.

Proprietà delle radiazioni ionizzanti

Le radiazioni sono i più importanti mutageni fisici, e la loro elevata energia ha la capacità di ionizzare o eccitare gli atomi delle molecole colpite dando inizio ad una serie di eventi che porta al danneggiamento di tutti i componenti molecolari cellulari. Possiamo raggruppare le radiazioni in due classi generali che si distinguono nella velocità di propagazione e per la presenza o assenza di massa a riposo. La prima classe è rappresentata dalle radiazioni elettromagnetiche (Figura 2.a.) che si propagano alla velocità della luce e non hanno massa a riposo; questa classe comprende le onde

radio, scoperte da Hertz nel 1887, gli infrarossi e gli ultravioletti, i raggi X, scoperti da Rontgen nel 1895, e i raggi γ che caratterizzano i processi di decadimento radioattivo. La seconda classe di radiazioni viaggia a velocità inferiore di quella della luce e alcune sono caratterizzate dalla loro natura particellare, sebbene si propaghino come onde. Tali particelle sono rappresentate da elettroni, protoni, neutroni e particelle α. I fotoni delle radiazioni elettromagnetiche ad alta energia (come raggi X e γ) possono eccitare gli atomi fino a far saltare gli elettroni fuori dall'orbitale più esterno trasformando gli atomi in ioni positivi. Gli elettroni eccitati, a loro volta, possono reagire con altri atomi inducendone la ionizzazione. I diversi tipi di radiazioni possono provocare una diversa ionizzazione o eccitazione.

Il LET *(Energia Lineare di Trasferimento)* ci permette di comparare la quantità di energia rilasciata dai differenti tipi di radiazione. Il LET si definisce come l'energia media rilasciata per unità di lunghezza della traccia (KeV/µm). I raggi X e γ sono radiazioni con un basso valore di LET o a ionizzazione sparsa.

Gli effetti fisici e quindi biologici dell'irraggiamento dipendono dall'energia contenuta dalle radiazioni stesse: radiazioni ad alta energia sono caratterizzate da lunghezze d'onda (m) basse ed alte frequenze (Hz); le radiazioni ad energia minore avendo lunghezze d'onda più alte producono una ionizzazione più sparsa. (Figura 2.a.)

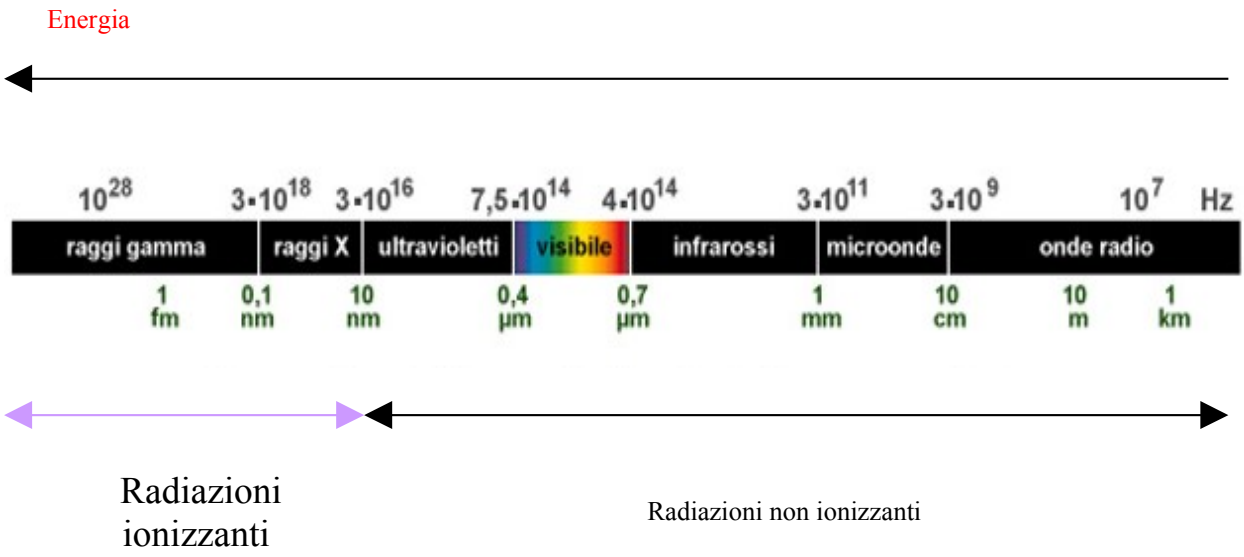


Figura 2.a. Lo spettro elettromagnetico

La differenza tra i raggi X e γ consiste nel modo in cui vengono prodotti, ma non riguarda la loro natura o le loro proprietà. I raggi X vengono prodotti artificialmente accelerando un fascio

di elettroni che vengono poi bloccati bruscamente da un bersaglio: in questo modo l'elevata energia accumulata si converte, in parte, in raggi X. Possiamo definire quindi questo tipo di radiazioni ionizzanti come un prodotto extra-nucleare. I raggi γ al contrario vengono prodotti dal decadimento di isotopi radioattivi e sono quindi di origine nucleare. Anche se i diversi tipi di radiazioni ionizzanti hanno differenti modelli di rilascio di energia e diverso potere di penetrazione, non c'è una proprietà che differenzia le radiazioni ionizzanti prodotte dall'uomo da quelle prodotte da sorgenti naturali. Da questa affermazione si deduce che le sorgenti usate in laboratorio sono altamente comparabili alle sorgenti naturali, carattere questo molto importante sotto l'aspetto della protezione e della prevenzione.

Effetto delle radiazioni sul DNA

Le radiazioni ionizzanti penetrano nella materia vivente, cedono la loro energia attraverso interazioni "random" con atomi e molecole sul loro percorso inducendo la formazione di ioni reattivi e radicali liberi. Le alterazioni molecolari che ne risultano portano all'aumento di vari tipi di danno. Le radiazioni possono interagire direttamente o indirettamente con il bersaglio biologico all'interno della cellula. Se gli atomi della molecola colpita vengono eccitati o ionizzati iniziando una catena di eventi che conduce ad un cambiamento biologico parliamo di azione diretta delle radiazioni. In alternativa la radiazione può interagire con altri atomi causando la formazione di radicali liberi capaci di diffondere a grande distanza e di danneggiare il bersaglio critico (*Goodhead, 1989*). L'importanza dell'azione indiretta si comprende meglio tenendo presente che l'80% della cellula è costituito da H_2O e che gran parte delle interazioni si ha con molecole d'acqua. Tali interazioni portano all'eliminazione di un elettrone e ad una serie di altre reazioni. Il DNA è certamente il bersaglio principale dell'effetto biologico delle radiazioni anche se ricerche su altre componenti sub-cellulari (proteine, membrane, ecc.) indicano che queste non vanno trascurate come possibili molecole "target". Per quanto riguarda il danno al DNA l'azione delle radiazioni può portare alla formazione di basi reattive intermedie, come quando i radicali idrossilici attaccano i doppi legami delle purine e delle pirimidine e si formano dei radicali intermedi che destabilizzano e danneggiano la molecola di DNA. Questo tipo di danno è sicuramente molto frequente. Meno frequente è il danno allo scheletro zucchero-fosfato, ma la sua importanza biologica non è affatto trascurabile perchè può condurre ad un taglio nel filamento del DNA. Da questo tipo di danno si possono originare rotture a singolo filamento (Single-Strand Breaks, SSBs) e rotture a doppio filamento (Double-Strand Breaks, DSBs) che consistono di due SSB pressoché opposte su ciascun filamento dell'elica. La maggior parte degli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti sono dovute alle DSBs (*Natarajan e Obe, 1978; Bryant, 1984*). Un ulteriore tipo di danno prodotto dalle radiazioni ionizzanti è la formazione di legami crociati tra proteine e DNA (*Chiu SM et al, 1984*) che possono causare

l'alterazione di funzioni come la trascrizione e la replicazione. Sebbene l'azione delle radiazioni sul DNA sia pressoché istantaneo se ne può osservare l'effetto quando viene indotta una mutazione genica che causa un cambiamento fenotipico (*Natarajan e Obe, 1984*).

Specie reattive dell'ossigeno e "stress ossidativo"

È stato stimato che, in ogni cellula del nostro corpo, ogni giorno avvengono circa 20000 eventi che inducono danno alla doppia elica del DNA. Una porzione significativa di questi eventi è causata dai cosiddetti ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno). *Conger e Fairchild* nel 1952 dimostrarono che un aumento della pressione dell'ossigeno nell'ambiente poteva provocare aberrazioni cromosomiche. L'effetto dell'eccessiva produzione di ROS o dell'inadeguatezza dei meccanismi di difesa contro questi agenti nella cellula, viene definito "stress ossidativo". I ROS sono costantemente prodotti nell'ambiente cellulare. Le maggiori fonti endogene di ROS sono i processi metabolici, in particolare quelli che avvengono nel mitocondrio e gli stati infiammatori. È importante sottolineare però che i ROS, alle concentrazioni fisiologiche normali, hanno un ruolo nella regolazione genica ed in alcune pathways di segnalazione cellulari e perciò la loro produzione è di vitale importanza. Fonti esogene di ROS, invece, sono l'esposizione a radiazioni ionizzanti ed agenti radiomimetici e le cellule confinanti che rilasciano specie reattive nell'ambiente extracellulare.

Tipi di ROS

O_2: approssimativamente il 90% dell'ossigeno che entra nella cellula è utilizzato nella respirazione mitocondriale per produrre energia. La molecola O_2 è classificata come radicale libero perché contiene 2 elettroni spaiati localizzati su due orbitali differenti. Nei sistemi biologici l'O_2 può accettare un elettrone per formare le seguenti specie reattive: O_2^- (anione superossido), OH^- (ione idrossido) ed H_2O_2 (perossido di idrogeno). Questi radicali posseggono diversi gradi di reattività con le varie molecole biologiche:

O_2^-: la catena respiratoria è la maggiore fonte di questa specie che nella cellula può raggiungere la concentrazione di 10^{-11}M. Di per sé l'O_2^- non è estremamente reattivo verso le molecole biologiche ma va incontro repentinamente a trasformazione per formare H_2O_2. Questa reazione è favorita da una famiglia di enzimi intracellulari chiamati "superossido-dismutasi".

H_2O_2: questa è una delle specie più stabili ed agisce anche come messaggero in alcune pathways di segnalazione cellulare. In condizioni normali è presente ad una concentrazione di 10^{-8}M. Tuttavia, in presenza di metalli come Fe^{2+} e Cu^+, l'H_2O_2 viene convertito in OH^- con la reazione di Fenton. L'eccesso di H_2O_2 è rimosso dalla catalasi e dalla glutatione-perossidasi.

OH: è un ossidante estremamente reattivo. Nonostante la sua breve emivita (10^{-9} secondi a 37°C), è capace di indurre elevate quantità di danno al DNA sia nucleare che mitocondriale. Questo radicale può causare 100 tipi differenti di lesione al DNA. In aggiunta, l'OH- può causare perossidazione dei lipidi e ossidazione di carboidrati e proteine. È anche un prodotto secondario delle radiazioni ionizzanti, poiché si forma in seguito alla dissociazione dell'H_2O indotta dalla radiazione.
NO e NO_3^-: l'NO è sintetizzato dall'arginina per mezzo dell'enzima NO-sintasi. A condizioni normali l'NO ha molte funzioni fisiologiche compresa quella di messaggero neuronale. Tuttavia, quando la sua concentrazione aumenta può reagire con l'O_2^- per formare l'anione perossinitrito NO_3^-. La reattività dell'NO_3^- è pressappoco uguale a quella dell'OH^-. La sua tossicità deriva dalla capacità di attaccare gli anelli aromatici dei residui aminoacidici ed di reagire con lipidi, proteine e DNA.
Radicali perossilici (L-): la perossidazione dei lipidi è il processo durante il quale i lipidi subiscono un'ossidazione e si generano radicali perossilici: questi possono attaccare gli acidi grassi polinsaturi adiacenti e generare così altri radicali.

3. MECCANISMI DI DIFESA DAI ROS

L'ingente quantità di danno provocato dai ROS a tutte le macromolecole cellulari mette la cellula di fronte alla scelta fra due possibilità, le stesse che la cellula deve affrontare quando viene danneggiato il DNA: riparare il danno arrestando il ciclo cellulare o programmare la propria morte. Questa seconda scelta può risultare estremamente deleteria se viene presa in tessuti non proliferanti come quello nervoso.

Le cellule di mammifero sono attrezzate con diversi livelli di difesa contro il danno ossidativo (*k.j.a. Davies 2000*). Il primo livello di difesa si basa sulla diretta interazione e detossificazione dei ROS da parte di molecole antiossidanti a basso peso molecolare o da proteine "scavengers".

Tipici antiossidanti a basso peso molecolare sono la vitamina E, la vitamina C, l'acido urico, il glutatione ed il β-carotene. Una molecola riducente molto importante è il glutatione che nelle cellule è presente in forma ossidata (GSSG) e ridotta (GSH), e può funzionare da solo o in associazione con attività enzimatiche. Esempi di proteine antiossidanti sono la ferritina e la ceruloplasmina che rimuovono dai tessuti metalli di transizione come il ferro ed il rame, responsabili di processi ossidativi.

Il secondo livello di difesa dal danno ossidativo comprende l'attività di enzimi antiossidanti. Una famiglia molto importante di questi enzimi è quella delle "superossido dismutasi" (SODs) che eliminano l'anione superossido tramite la reazione $O_2^- + O_2^- = H_2O_2 + O_2$. Il perossido di idrogeno, invece, viene rimosso dalla catalasi o dalla glutatione-perossidasi che lo riducono ad acqua.

Un'altra classe di enzimi antiossidanti sono le glutatione-S-trasferasi che coniugano il glutatione ridotto (GSH) con i lipidi perossidati, detossificandoli. Enzimi adiuvanti in questi processi sono la glutatione riduttasi (che rigenera il GSH utilizzando NADH), e la deidrogenasi che ricicla il NADPH utilizzando energia del metabolismo cellulare.

Un altro livello di difesa coinvolge la riparazione diretta delle macromolecole lesionate dai ROS. L'enzima tioredoxina, una piccola molecola ubiquitaria, presiede molte reazioni di ossidoriduzione delle proteine. Infine, le proteine ossidate che non possono essere riparate verranno degradate dal proteosoma. Le lesioni al DNA indotte dai ROS includono rotture a singola elica (SSBs), rotture a doppia elica (DSBs), crosslink e modificazioni di basi. Una tipica modificazione è quella che da vita alla 8-oxoguanina, riparata dal "base excision repair".

Complessivamente il bilanciamento tra il livello di ROS e l'attività di tutti questi meccanismi di difesa determinano il grado di stress ossidativo per la cellula.

In particolare, due caratteristiche del fenotipo clinico dell'A-T, la neurodegenerazione e l'invecchiamento prematuro dei tessuti sono state associate all'accumulo di danno ossidativo.

4. LE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

Nell'ambiente sono presenti una grande quantità di sostanze mutagene e cancerogene, molte delle quali sono capaci di causare un danno diretto alla struttura del DNA e quindi il patrimonio genetico, essenziale per una corretta sopravvivenza cellulare, è continuamente sottoposto ad alterazioni strutturali sia endogene che indotte dall'ambiente stesso.
Tutti questi fattori, a cui l'uomo è esposto, possono causare mutazioni somatiche coinvolte anche nei processi di cancerogenesi, ed alterazioni di cellule della linea germinale che potrebbero portare a danni ereditabili dalla progenie.
Gli agenti mutageni e cancerogeni portano all'induzione anche di **aberrazioni cromosomiche** che vengono studiate nella linea somatica ed i sistemi cellulari più usati *in vivo* sono: i linfociti del sangue periferico, il midollo osseo, la milza, i linfonodi, il fegato ecc. In genere nell'uomo i materiali più utilizzati sia *in vivo* che *in vitro* sono i linfociti del sangue periferico mentre, per studi *in vitro* vengono solitamente utilizzate linee cellulari stabilizzate di Hamster cinese o linee cellulari linfoblastoidi umane.
Assai difficile è lo studio delle aberrazioni cromosomiche a livello della linea germinale.
L'importanza dello studio dei meccanismi che portano alla formazione delle aberrazioni cromosomiche è giustificata dall'elevata frequenza di individui (12 su 100) che alla nascita presentano anormalità a livello cromosomico sia strutturali che numeriche (*Jacobs et al., 1974*) e dal 50% di aborti spontanei che presentano anomalie cromosomiche (*Bouè et al, 1973*). L'instabilità cromosomica è inoltre una delle tante caratteristiche di diverse sindromi ereditarie recessive come appunto **l'Atassia Telangiectasia**, trattata in questa tesi, la Sindrome di Bloom, l'Anemia di Fanconi e lo Xeroderma pigmentosum.
Prima di classificare e descrivere i vari tipi di aberrazioni cromosomiche è necessario soffermarsi sulle attuali conoscenze della morfologia del cromosoma eucariote e sui vari fattori che influenzano la formazione di tali aberrazioni.
Il DNA è una macromolecola formata da due catene antiparallele polinucleotidiche avvolte a formare una doppia elica.
I nucleotidi sono costituiti da una base azotata eterociclica purinica o pirimidinica, un monosaccaride a cinque atomi di carbonio (deossiribosio) e da una molecola di acido fosforico. La base eterociclica di un nucleotide si lega mediante un legame N-glicosidico al carbonio 1 del deossiribosio. Le basi puriniche sono l'adenina e la guanina, mentre le basi pirimidiniche sono la timina e la citosina.
Le due catene di DNA sono unite da legami idrogeno che si formano appunto tra le coppie di basi, in modo che la citosina sia sempre legata alla guanina (3 legami idrogeno) e la timina all'adenina (2 legami idrogeno). Un cromatidio è costituito da un'unica doppia elica di DNA al quale sono associate proteine istoniche e non istoniche.
Durante il ciclo cellulare si possono distinguere l'interfase e la mitosi. Nel nucleo intercinetico, alla

fase G_1, il cromosoma si comporta come un'unica doppia elica di DNA che verrà duplicata nella successiva fase di sintesi (fase-S) a sua volta seguita dalla fase G_2 dove i cromosomi si comportano come due doppie eliche di DNA.
I cromosomi possono essere analizzati al microscopio in metafasi colchicinizzate poichè solo in metafase, dove i cromosomi sono al livello massimo di condensazione, si possono distinguere più in dettaglio i vari tipi di aberrazioni cromosomiche.
In questo stadio i cromosomi si presentano costituiti da due cromatidi uniti da un centromero in una regione chiamata appunto centromerica ed a seconda delle posizione di quest'ultima distinguiamo: cromosomi metacentrici, quando il centromero si trova al centro e le due braccia hanno quindi lunghezza uguale; cromosomi acrocentrici quando il centromero è più vicino ad una estremità che all'altra e quindi le due braccia risultano di lunghezza differente ed infine cromosomi telocentrici quando il centromero si trova in prossimità di un'estremità del cromosoma e si può distinguere, quindi, un solo braccio.
Per quanto concerne i fattori che influenzano la formazione delle aberrazioni cromosomiche è in primo luogo importante sottolineare che, tra tutti i tipi di danni indotti dai vari agenti al DNA, le **rotture a doppia elica** della catena del DNA sono le lesioni principalmente responsabili della formazione delle aberrazioni cromosomiche (*Natarajan e Obe, 1978*).
Le lesioni una volta indotte vengono sottoposte ai **processi di riparazione** cellulare che nel caso di una riparazione sbagliata ("misrepair") porta alla formazione di aberrazioni cromosomiche (*Evans, H.J., 1972*).
Gli agenti mutageni si distinguono in **S-dipendenti** ed **S-indipendenti**.
I primi necessitano del passaggio attraverso la fase di sintesi per far esprimere il danno poichè le aberrazioni indotte da questi agenti insorgono come errori che avvengono durante la replicazione del DNA ("misreplication" = replicazione sbagliata). Per quanto detto, se l'esposizione avviene nella fase G_1, tali agenti indurranno solo aberrazioni di tipo cromatidico, mentre nella fase G_2 non produrranno nessun tipo di aberrazione. Esempi di agenti S-dipendenti sono gli UV e la maggior parte degli agenti chimici.
Gli agenti **S-indipendenti** producono direttamente aberrazioni che saranno di tipo cromosomico se l'esposizione avviene nella fase G_1 e di tipo cromatidico se l'esposizione avviene nella fase S o G_2.
Agenti S-indipendenti sono le **radiazioni ionizzanti** ed alcuni agenti chimici. Inoltre esiste una relazione stringente tra induzione di mutazione ed aberrazioni cromosomiche, ovvero quasi tutte le sostanze inducono sia le une che le altre, nonostante ci siano delle differenze inevitabili tra i due processi. Le aberrazioni cromosomiche possono essere classificate a seconda del tipo di mutageno a cui la cellula è sottoposta ed in base allo stadio del ciclo cellulare in cui si trova la cellula al momento dell'esposizione (Figura 4.a.).

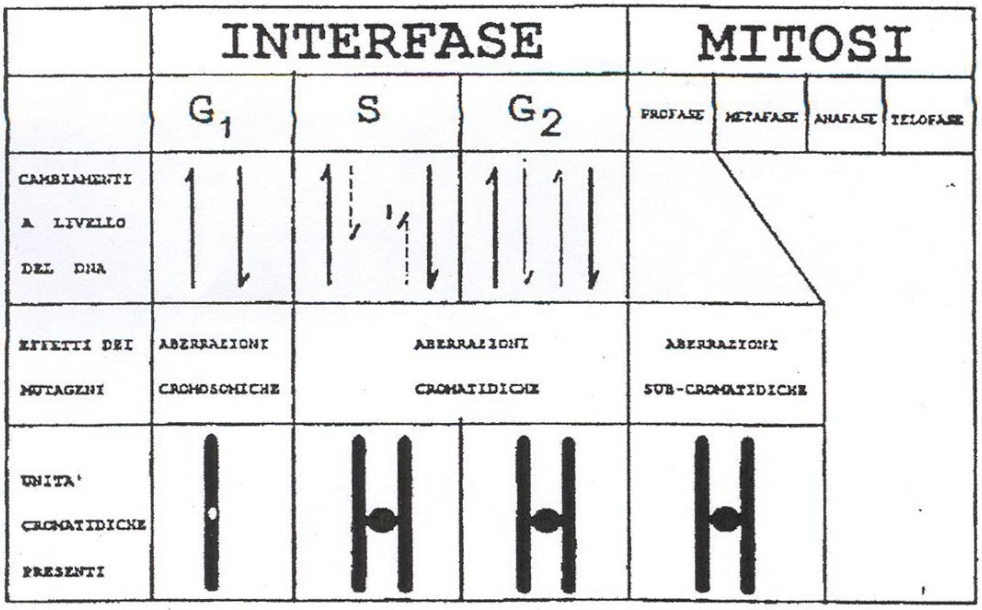


Figura 4.a. Relazione tra il tipo di aberrazione e lo stadio del ciclo cellulare al momento dell'esposizione all'agente mutageno.

Le aberrazioni sia di **tipo cromatidico** che di **tipo cromosomico** appaiono in metafase come rotture e scambi e quest'ultimi possono essere classificati nel modo seguente:
Interscambi ed **intrascambi**: i primi avvengono tra siti localizzati su cromosomi diversi, mentre i secondi avvengono tra siti localizzati nello stesso cromosoma.
Distinguiamo inoltre scambi interbracci, quando lo scambio avviene tra i due bracci dello stesso cromosoma ed intrabracci se lo scambio avviene tra due siti posti sullo stesso braccio cromosomico.
Inoltre gli scambi possono essere completi quando tutti i capi di rottura sono uniti a formare lo scambio, oppure incompleti quando i capi di rottura non interagiscono, rimanendo così liberi.
Ancora possiamo distinguere gli scambi asimmetrici e gli scambi simmetrici. I primi avvengono se entrambi i capi di rottura contenenti il centromero (frammenti centrici) si ricongiungono tra loro lasciando due frammenti privi di centromero (frammenti acentrici) che si congiungono a loro volta. Questi tipi di scambi portano o alla formazione di cromosomi o cromatidi dicentrici (con due centromeri) o alla formazione di cromosomi ad anello centrici. Gli scambi simmetrici (traslocazioni) si formano quando si ricongiunge un frammento centrico di un cromosoma col frammento acentrico di un altro cromosoma ed ugualmente si comportano le altre terminazioni dei due cromosomi coinvolti. Gli scambi asimmetrici sia di tipo cromatidico che cromosomico sono ben riconoscibili al microscopio poiché sono uniti a frammenti acentrici, a differenza degli scambi simmetrici. Questi ultimi, quando sono di tipo cromosomico, non sono riconoscibili tranne nel caso

in cui vi siano scambi incompleti o nel caso in cui ci siano grosse differenze di lunghezza dei bracci cromosomici che vengono scambiati. Invece, gli scambi cromatidici simmetrici per la formazione di strutture a quattro braccia (quadriradiali) causate dall'appaiamento tra i cromatidi fratelli possono essere facilmente riconosciuti. Al momento della divisione cellulare alcune aberrazioni cromosomiche possono essere perse o trasformate causando varie conseguenze ed è quindi facile comprendere l'importanza di analizzare le aberrazioni alla prima mitosi e quindi prima che possano insorgere processi selettivi a carico delle cellule con alcuni tipi di aberrazioni.
Infatti, a causa dell'assenza di centromero, che lega i cromosomi alle fibre del fuso, i frammenti acentrici sono quelli che maggiormente vengono perduti e si possono trovare sotto forma di micronuclei (*Heddle et al, 1983*). Come i frammenti acentrici anche gli stessi scambi asimmetrici possono essere perduti durante la divisione cellulare. Infatti, sia i dicentrici che gli scambi asimmetrici, possedendo due centromeri, possono orientarsi sul fuso mitotico o in modo che i due centromeri siano indirizzati ad un solo polo mitotico non portando a problemi meccanici durante la migrazione del cromosoma dicentrico, oppure in modo che i due centromeri siano orientati in direzioni opposte, verso i due poli, creando un ponte cromosomico o cromatidico che causa la perdita dell'aberrazione. (Figura 4.b.)

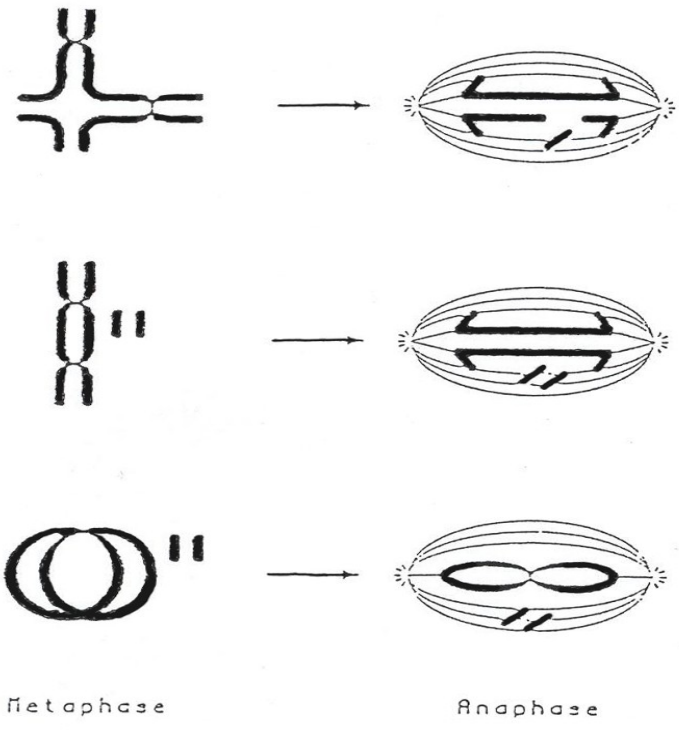


Figura 4.b. Esempi di formazione dei ponti anafasici.

Al contrario il materiale cromosomico non viene perduto nel caso di scambi simmetrici completi poichè questi non risultano associati a frammenti acentrici.
Da quanto appena descritto le aberrazioni possono essere definite di tipo stabile (scambi simmetrici)

o instabile (scambi asimmetrici). Le prime (inversioni o traslocazioni) possono essere trasmesse di generazione in generazione al contrario delle seconde (dicentrici, rings o delezioni) che possono essere perdute al momento della divisione cellulare.
Per quanto riguarda invece la classificazione delle aberrazioni cromosomiche distinguiamo:

- Aberrazioni sub-cromatidiche.

- Aberrazioni cromatidiche.

- Aberrazioni cromosomiche.

Le aberrazioni **sub-cromatidiche** vengono indotte alla fine della fase G_2 o in profase ed appaiono come scambi in cui le unità coinvolte sembrano essere più piccole di un singolo cromatidio.

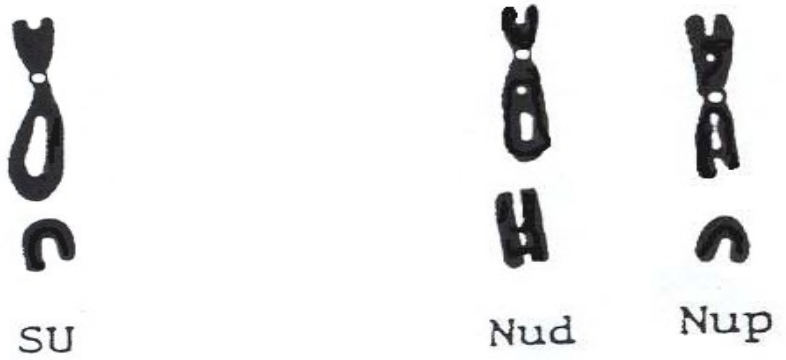
Le aberrazioni **cromatidiche** si formano in fase S o G_2, cioè durante o dopo la replicazione dei cromosomi anche se la lesione al DNA è avvenuta in fase G_1, ed in metafase appaiono come rotture e/o scambi.
Nelle aberrazioni cromatidiche l'unità coinvolta è un solo cromatidio e vengono classificate nel modo seguente:

Intrascambi cromatidici

1) *Rottura cromatidica o delezione terminale.* Avviene quando in un braccio cromatidico è presente una discontinuità ed i capi di rottura non sono allineati. Le delezioni terminali sono dei frammenti acentrici, prodotto di semplici rotture dei cromatidi.

2) *Delezione interstiziale.* Anche detta "minute" cromatidico, con frammento cromatidico appaiato o non.

3*) Rottura isocromatidica.* Consiste in scambi tra cromatidi fratelli (SCE) in cui si forma un frammento ad U chiamato "Sister Union" *(SU)* dato dalla ricongiunzione asimmetrica dei capi di rottura. Quando invece i capi di rottura non si congiungono nel frammento centrico si parla di isocromatidi con unione prossimale *(Nup)*; quando i capi di rottura non si congiungono nel frammento acentrico si parla di isocromatidi con unione distale *(Nud).* Queste ultime possono essere confuse con le delezioni terminali di tipo cromosomico.



4) *Gap cromatidica.* Alcune regioni lungo i cromatidi che non risultano colorate vengono chiamate regioni acromatiche o "gap". Presentandosi di varie dimensioni possono essere confuse con le delezioni terminali

Gap cromatidica

Interscambi cromatidici

5) *Scambi simmetrici*. Sono scambi tra due o più cromosomi. Non portano a cromatidi dicentrici.

6) *Scambi asimmetrici*. Questi possono dar luogo ad un cromatidio dicentrico o policentrico quando avviene uno scambio tra due o più cromosomi. Vengono chiamati quadriradiali.

7) *Interscambi isocromatidici*. Sono un altro tipo di aberrazioni cromatidiche a tre rotture derivanti dall'interazione di un isocromatide con una delezione terminale, e possono essere monocentrici o dicentrici a seconda che l'isocromatide sia centrico
o acentrico. Vengono chiamati triradiali.

Triradiale
monocentrico

Triradiale
dicentrico

Le aberrazioni **cromosomiche** si formano prima della replicazione dei cromosomi in fase G_1 per cui quando si ha la duplicazione del DNA in fase S, il danno viene trasmesso ad entrambi i cromatidi. Queste vengono classificate nel modo seguente:

Intrascambi cromosomici

1) *Delezioni terminali*. Indicate dalla presenza di frammenti acentrici (designati come B"). La regione priva di colore è più grande del diametro del cromatidio.

Frammento allineato

Frammento spiazzato

2) *Delezioni interstiziali*. Chiamate anche "double minute" indicate dalla presenza di piccoli anelli acentrici appaiati.

3) *Anelli centrici (rings)*. Sono in genere accompagnati da un frammento acentrico e sono formati da segmenti appaiati muniti di centromero.

Ring e suo frammento

4) *Gap isocromatidica*. Regione acromatica che coinvolge ambedue i cromatidi nel medesimo sito. La regione priva di colore non è più grande del diametro del cromatidio. Presentandosi di varie dimensioni possono essere confuse con le delezioni terminali.

Gap isocromatidica

Interscambi cromosomici

5) *Dicentrici o policentrici*. Si originano da scambi fra due o più cromosomi formando così cromosomi con due o più centromeri accompagnati da uno o più frammenti acentrici.

Dicentrico e suo frammento

5. LA PROTEINA CHINASI ATM

Introduzione

"Il tumore è una malattia genetica della linea somatica" Questa affermazione acquista sempre più significato in seguito alla scoperta di nuovi oncogeni e di geni onco-soppressori. La strada che porta al cancro è fatta di modificazioni, sia nella sequenza che nell'organizzazione del genoma, che spaziano dalle sostituzioni di un singolo nucleotide alle aberrazioni cromosomiche. Queste modificazioni rappresentano delle deviazioni dal primo requisito necessario per mantenere l'omeostasi cellulare: il mantenimento della stabilità genomica.

Mentre il fenotipo cellulare neoplastico progredisce, la stabilità genomica continua a diminuire, portando ad un circolo vizioso di aberrazioni cromosomiche e al progredire della malattia (*Hahn et al 2002*). Sebbene alcune variazioni nel DNA della linea germinale siano fondamentali per mantenere la variabilità genetica, i cambiamenti nella sequenza del DNA delle cellule somatiche sono di solito indesiderati; per questo le cellule possiedono degli efficienti sistemi di protezione contro tali mutamenti (*Levitt et al. 2002*). Si ritiene che l'evento cruciale che designi l'inizio della malattia sia una singola modifica del genoma, le cui conseguenze potrebbero essere minime come ad esempio, un piccolo cambiamento nella quantità di una proteina, o la sostituzione di un singolo aminoacido. Il verificarsi di tale modificazione e la sua fissazione nel genoma sono il risultato del fallimento del meccanismo che avrebbe dovuto individuare la lesione nel DNA o il "mismatch" che ha causato la mutazione, e avrebbe dovuto produrre la risposta corretta per ripristinare la sequenza originale e mantenere la cellula nel suo stato normale. Le modifiche alla sequenza del DNA possono derivare da spontanei cambiamenti chimici nei composti che costituiscono il DNA stesso, da errori di replicazione oppure da danni inflitti al DNA (*Hoeijmakers et al. 2001*). La più grande minaccia alla stabilità genomica proviene dagli agenti danneggianti il DNA, che possono essere endogeni (ossia che si formano durante il normale metabolismo cellulare) o esogeni (che provengono dall'ambiente esterno). Tra questi ultimi le radiazioni ed i reagenti chimici possono provocare numerose lesioni al DNA. Alcune di queste sono estremamente citotossiche se non vengono riparate velocemente, mentre altre sono mutagene e possono pregiudicare la produzione, la struttura e la funzione delle proteine cellulari, con conseguenze che variano dal malfunzionamento della cellula alla trasformazione maligna. Non è sorprendente perciò che molti agenti mutageni siano anche cancerogeni, e che esista un'alta corrispondenza fra il loro essere cancerogeni e la loro potenzialità mutagenica.

Come fa la cellula a difendersi da questa grave minaccia?

La prima risposta della cellula è quella di riparare il danno, ma il tipo e l'entità della lesione potrebbero superare le sue capacità di recupero, e innescare il processo di morte cellulare programmata (apoptosi) (Figura 5.a.).

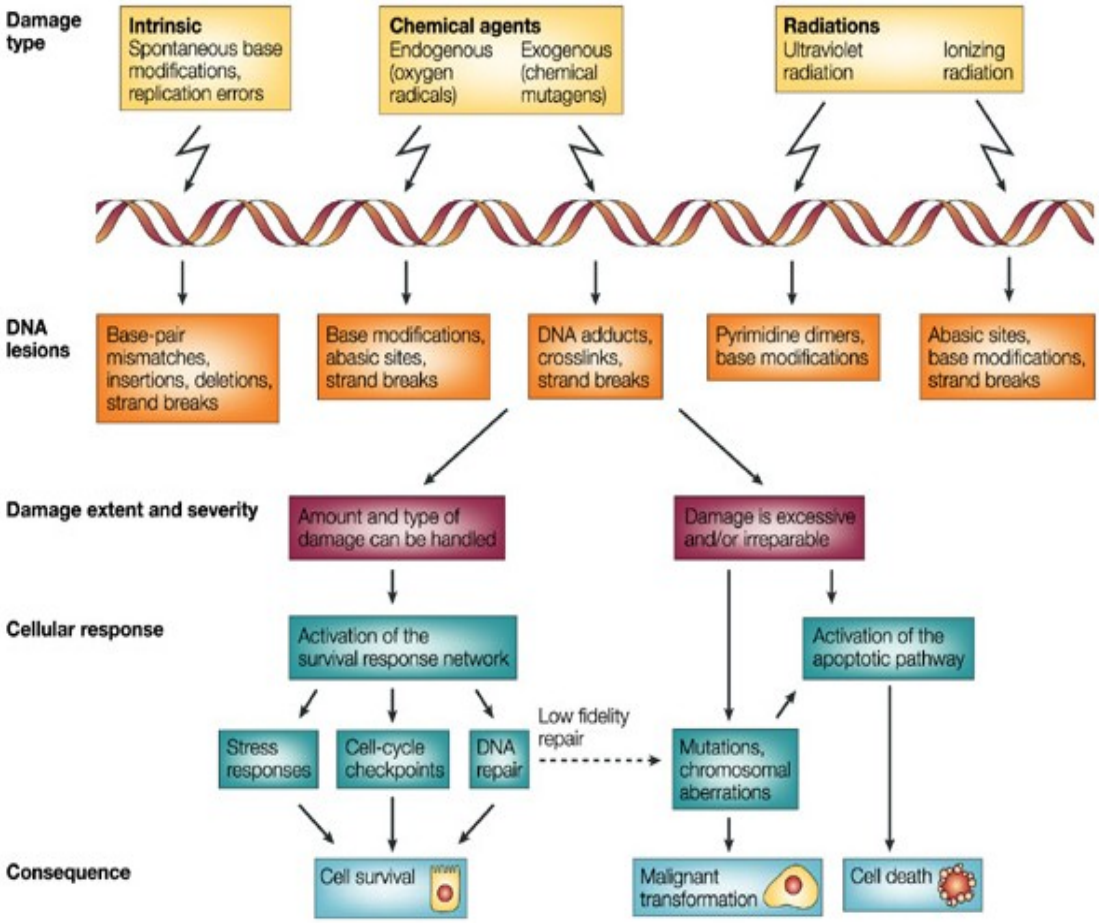


Figura 5.a. Le risposte cellulari al danno del DNA. Tipi diversi di danni al DNA causano tipi diversi di lesioni che vengono gestite dalle cellule in modi diversi. Il risultato può essere la sopravvivenza della cellula e la ripresa del ciclo vitale normale, la morte della cellula o la trasformazione maligna. Il meccanismo che porta la cellula a scegliere tra un tentativo di sopravvivenza e la morte programmata non è ancora del tutto chiaro. Le reazioni per la sopravvivenza è complessa ed include molte pathways di segnalazione.

La risposta al danno al DNA e le sindromi ad instabilità genomica

Un danno al DNA accende una risposta, che va ad attivare vari sistemi di riparazione capaci di riconoscere specifiche lesioni del DNA. Queste lesioni sono riparate (*in situ* o rimosse del tutto) in modo da riportare il DNA alla sua sequenza originale. Da cinquanta anni a questa parte le conoscenze dei meccanismi di riparazione del danno al DNA sono state ampiamente approfondite. Questi meccanismi differiscono a seconda dei diversi tipi di lesione. I difetti genetici che inattivano questi meccanismi causano quasi sempre sindromi gravi, caratterizzate da degenerazione di specifici

tessuti (specialmente quelli del sistema nervoso e immunitario), sensibilità verso specifici agenti danneggianti il DNA e predisposizione al cancro. Oltre all'Ataxia-Telangiectasia trattata in questa tesi, sono note altre sindromi dette ad "instabilità genomica". Le più importanti, elencate qui sotto, sono tutte autosomali recessive e presentano difetti nelle principali vie di risposta al danno, ognuna delle quali è attivata da una diversa classe di agenti danneggianti. Tre malattie (lo Xeroderma Pigmentosum, la Sindrome di Cockayne e la Tricotiodistrofia) sono associate a difetti nella via del Nucleotide-Excision-Repair (NER) che ripara le lesioni voluminose indotte nel DNA, capaci di distorcere la doppia elica, come quelle inflitte dai raggi ultravioletti (UV) e da determinati composti chimici.

Xeroderma Pigmentosum (XP)

I malati di XP sono estremamente sensibili ai componenti UV della luce solare e manifestano un invecchiamento accelerato della pelle ed una particolare predisposizione a sviluppare tumori cutanei. L'XP è geneticamente eterogeneo. La sua forma classica provoca difetti nelle varie proteine che interagiscono nella via del NER. Il NER può effettuare sia la riparazione globale del DNA sia la riparazione associata alla trascrizione e nei pazienti XP uno o entrambi di questi sistemi siano difettosi. Alcune proteine dell'XP sono coinvolte nella riparazione del DNA e fanno anche parte del complesso di trascrizione TFIIH.

Sindrome di Cockayne (CS)

Questa sindrome provoca sensibilità alle radiazioni UV ed è caratterizzata da nanismo e malformazioni scheletriche, gravi ritardi mentali, sordità e fotosensibilità, ma non da un'apparente predisposizione al cancro. Le proteine difettose sono quelle coinvolte nella riparazione del DNA associata alla trascrizione, attivata dai raggi UV e probabilmente dal danno ossidativo.

Tricotiodistrofia (TTD)

Questa malattia rara è caratterizzata da capelli fragili, pelle secca, faccia dismorfica, ritardo mentale ed un certo grado di fotosensibilità. Le mutazioni responsabili di questa malattia hanno luogo in una specifica regione dei geni XPB e XPD che codificano per le DNA elicasi coinvolte nella trascrizione. Altre mutazioni di questi stessi geni provocano l'XP o la Sindrome diCockayne e questo è un esempio interessante di mutazioni diverse che avvengono all'interno dello stesso gene e che conducono a conseguenze fenotipiche diverse.

Sindrome di Bloom (BS)

I pazienti affetti da BS hanno bassa statura, sono sensibili alla luce solare, presentano eritema facciale, immunodeficienza, scarsa fertilità e predisposizione a vari tipi di cancro. Le cellule BS mostrano un'altissima frequenza di scambi spontanei tra cromatidi fratelli, rotture cromosomiche e una leggera sensibilità a vari agenti che danneggiano il DNA. La proteina difettosa, BLM, è una DNA elicasi che assomiglia alla proteina batterica recQ, la quale probabilmente partecipa alla riparazione per ricombinazione omologa e alla riparazione di danni che avvengono alle forcelle di replicazione in stallo.

Sindrome di Werner (WS)

La WS è caratterizzata in primo luogo da un invecchiamento accelerato, da una tendenza al diabete, da uno sviluppo sessuale ritardato, da instabilità cromosomica e da predisposizione a vari tipi di cancro. Le cellule WS mostrano instabilità cromosomica e sono ipersensibili alla camptotecina (un inibitore della DNA topoisomerasi 1) ed a certi agenti alchilanti. È da notare che sia le cellule WS che BS sono ipersensibili alla morte apoptotica indotta da idrossiurea. La proteina difettosa (WRN) è un'altra DNA elicasi della famiglia di recQ con un'unica attività esonucleasica 3'→5'.

Sindrome di Rothmund-Thompson (RTS)

I malati di RTS si riconoscono dalle macchie sulla pelle, dalla crescita ridotta, dalle anormalità scheletriche, e presentano cataratte precoci, invecchiamento accelerato, instabilità cromosomica e predisposizione al cancro. Il gene responsabile (RECQL4) codifica un'altra DNA elicasi simile alla recQ, il cui ruolo nelle reazioni ai danni al DNA è ancora da chiarire.

Anemia di Fanconi (FA)

Le caratteristiche principali della FA sono: la deplezione di midollo osseo che porta all'anemia aplastica (ossia una produzione insufficiente di tutte le cellule del sangue), malformazioni scheletriche, deformità di molti organi interni, fertilità ridotta, anormalità cutanee e spiccata predisposizione a leucemie mieloidi e a carcinoma della cellula squamosa. Le cellule FA mostrano caratteristiche aberrazioni cromosomiche e una sensibilità sia agli agenti che inducono legami crociati che agli agenti capaci di rompere il DNA. La malattia è geneticamente eterogenea con mutazioni che colpiscono otto diversi "geni FA" i prodotti dei quali interagiscono tra loro e con numerosi componenti dei sistemi di risposta al danno, come BRCA1 ed ATM. Recentemente, si è scoperto che l'omozigosità per certe mutazioni di BRCA2 provoca una forma di FA.

Il modello della risposta cellulare alle "Double Strand Breaks" (DSBs)

La risposta cellulare al danno va ben al di là della sola riparazione del DNA e comprende un complicato "network" di eventi (*Rouse et al. 2002*). Questo è vero specialmente per la risposta a lesioni estremamente citotossiche, come le rotture a doppia elica (DSBs) (*Jackson et al. 2002*). Una prerogativa di questa risposta è l'attivazione di checkpoints del ciclo cellulare. L'arresto improvviso del ciclo cellulare comporta delle modifiche in numerosi processi fisiologici. In effetti, i danni al DNA conducono a veri e propri cambiamenti nei profili dell'espressione genica, e presumibilmente anche nella sintesi, nella degradazione e localizzazione delle proteine (*Amundson et al. 2001*). Ciò vuol dire che l'allarme deve essere trasmesso in modo rapido e preciso alle numerose vie di risposta cellulari**.**

Qual'è il segnale generato da una lesione al DNA e come riesce a raggiungere così tante destinazioni? Risultati provengono dallo studio delle sofisticate risposte alle DSBs, il cui processo è rimasto conservato dai lieviti ai mammiferi e che comprende una rete molto ben organizzata di vie di segnalazione che interagiscono per riparare le DSBs, arrestando temporaneamente il ciclo cellulare e bilanciando di conseguenza il metabolismo della cellula. Questa rete complessa è attivata in primo luogo dall'azione di una sola proteina chinasi, ATM.

Modelli recenti (*D'Amours et al 2002*). descrivono la risposta alle DSBs attraverso una serie di fasi (Figura 5.b.). Secondo questi modelli, le DSBs sarebbero prima riconosciute da proteine sensori che riconoscono la lesione stessa o le alterazioni della cromatina che seguono la rottura del DNA. Le estremità rotte sono poi processate: la loro natura chimica è infatti casuale e perciò non possono servire direttamente come substrato per i meccanismi di riparazione. Successivamente entrano in azione i trasduttori che trasmettono il segnale del danno agli effettori a valle. È questo sistema di scambio di informazioni tra trasduttori ed effettori che permette ad un solo trasduttore di controllare l'operato di molte vie. È anche probabile che i trasduttori siano coinvolti nell'assemblaggio dei complessi di riparazione sul sito danneggiato (Figura 5.c.), cosicchè la riparazione delle DSBs e la segnalazione del danno sono probabilmente concomitanti e funzionalmente collegati (Figura 5.b.).

Nel caso delle DSBs, sebbene siano coinvolte anche delle proteine chinasi correlate, il trasduttore iniziale primario è ATM il quale trasmette il messaggio sempre con la stessa modalità: la fosforilazione.

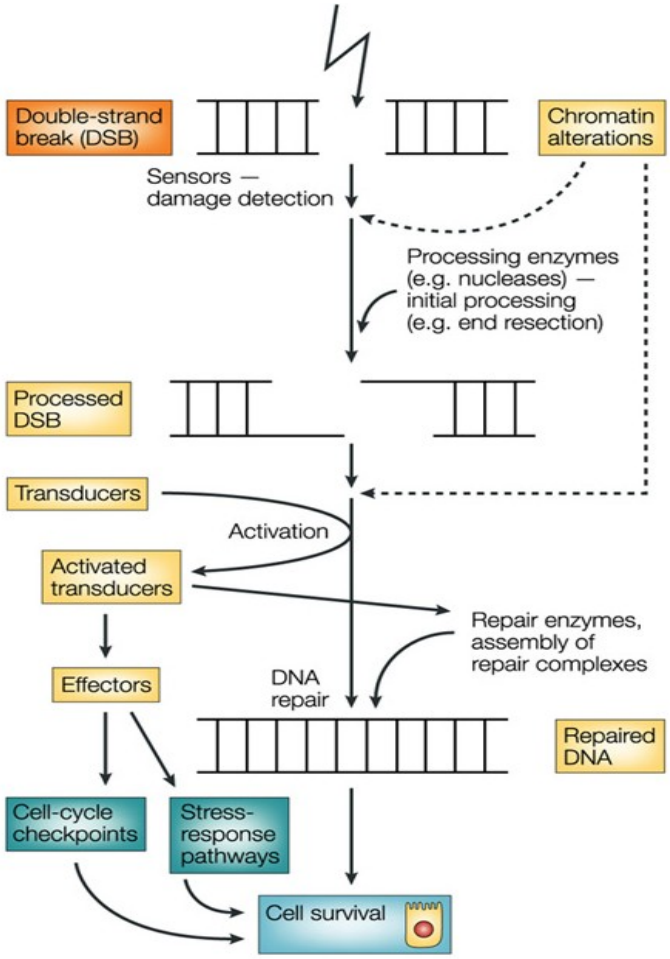


Figura 5.b. Vari stadi delle risposte cellulari alle DSBs, secondo il modello corrente. È probabile che gli stessi sensori del danno percepiscano le lesioni al DNA e/o le alterazioni della struttura della cromatina nell'area a loro circostante. L'attivazione dei trasduttori è presumibilmente mediata da modifiche post-traduzionali.

I meccanismi di riparazione delle DSBs

Le DSBs sono prodotte e sigillate durante processi come la ricombinazione meiotica e l'assemblaggio del recettore delle cellule T e dei geni delle immunoglobuline attraverso il processo di ricombinazione *V(D)J*, rispettivamente nelle cellule T e B. Si può tranquillamente affermare che i meccanismi di riparazione delle DSBs cellulari (Figura 5.c.) mantengono un'attività ridotta ma continua, assicurando che la possibile formazione ed eliminazione di queste rotture, mantenga la cellula nel suo stato normale.

La riparazione delle rotture a doppia elica (DSBs) è effettuata attraverso due diversi meccanismi: un meccanismo rapido, con possibilità di errore, chiamato '*non-homologous end-joining*' (NHEJ) che sigilla rapidamente le rotture con il rischio di creare microdelezioni locali, ed un processo di riparazione ad alta fedeltà basato sulla "*homologous-ricombination*" (HR) tra cromatidi fratelli (*Khanna et al. 2001*). Questi processi si basano sull'azione combinata di diversi complessi multiproteici.

Non-homologous end-joining (NHEJ)

Il principale meccanismo di riparazione nelle cellule dei mammiferi è il NHEJ. Le terminazioni esposte della catena del DNA sono percepite dall'eterodimero KU70-KU80 che recluta la subunità catalitica della proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PKcs). La DNA-PKcs, a sua volta, recluta proteine supplementari verso il sito danneggiato e probabilmente ne fosforila alcune. Infine

l'eterodimero della ligasi IV XRCC4 sigilla le rotture. Nonostante lo svantaggio della sua bassa fedeltà, questa via riparativa agisce rapidamente, come è richiesto da un meccanismo d'emergenza e, diversamente dall'HR, non dipende dalle molecole di DNA del cromatidio fratello, che si trovano nelle cellule solo dopo la replicazione del DNA.
Il NHEJ è importante anche per sigillare le interruzioni che si formano durante la ricombinazione *V(D)J*, con la quale vengono riarrangiati i geni del recettore delle cellule T e i geni delle immunoglobuline. (*Gellert et al. 2002*)

Homologous recombination (HR)

La via di riparazione ad alta fedeltà basata sulla HR è mediata da RAD51 e da proteina ad essa associate quali RAD52, l'elicasi RAD54 e il soppressore di tumori BRCA2 (*Yang et al. 2002*). Dopo che RAD52 ha tagliato e saldato le estremità a singola elica, RAD51 forma un filamento di nucleoproteine sull'elica esposta. Probabilmente questo processo è iniziato da un complesso RAD51-BRCA2 ed è essenziale per il passaggio principale di questo meccanismo: l'invasione del filamento ed il suo dislocamento. Questo processo è mediato da RAD51 e RAD54, e consente l'uso della molecola del cromatidio fratello non danneggiata come stampo per una nuova sintesi delle porzioni mancanti nella molecola rotta.
Il complesso MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) sembra essere essenziale per l'HR (*Tauchi et al. 2002*), probabilmente perché interviene nel processamento iniziale delle estremità DSBs, ed è inoltre coinvolto nella ricombinazione meiotica, nella manutenzione dei telomeri e nella segnalazione ai checkpoints. In seguito alla formazione delle DSBs, il complesso MRN forma rapidamente dei foci nei siti danneggiati. Questi foci includono altri componenti della risposta alle DSBs, come RAD51 e BRCA1. MRE11 è una nucleasi, RAD50 è una ATPasi e la proteina NBS1, essenziale per l'assemblaggio del complesso, interagisce con l'istone H2AX.

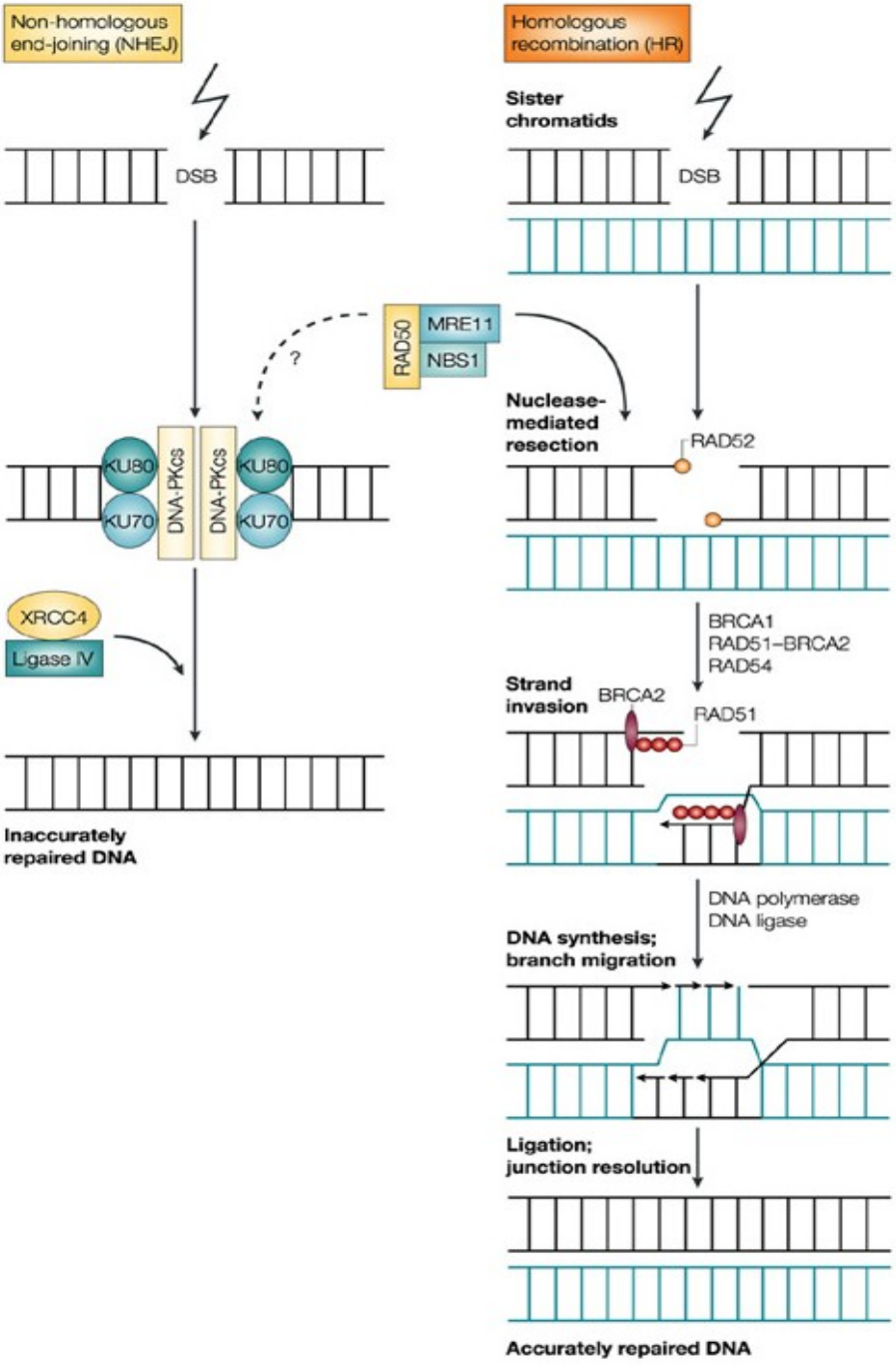


Figura. 5.c. I meccanismi di riparazione delle Double-Strand Breaks**.**

La famiglia delle proteine chinasi PI3K-correlate

ATM appartiene ad una famiglia conservata di proteine, la maggior parte delle quali possiedono un'attività serina/treonina chinasica (*Abraham et al. 2001*). È interessante che tutte queste proteine

contengano un dominio con motivi che sono tipici della chinasi che fosforila i lipidi "fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) (Figura 5.d.) e per questo sono chiamate 'PI3K-like protein kinases" (PIKKs). Il dominio delle PI3K ospita il sito catalitico della proteina chinasi attiva della famiglia PIKK. Nei mammiferi i membri di questa famiglia includono cinque proteine chinasi: ATM, ATR, ATX/SMG-1, mTOR/FRAP e DNA-PKcs (Figura 5.d.) oltre alla TRRAP, un componente dei complessi dell'istone acetil-transferasi.

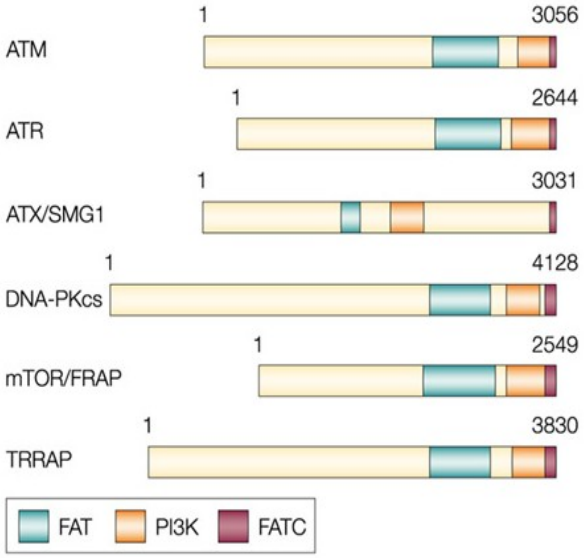


Figura 5.d. Dimensioni e motivi comuni dei membri umani della famiglia PIKK.
Per ogni proteina è indicato il numero dei residui. Questa famiglia comprende sei proteine, tutte (a parte la TRRAP) con attività di proteina chinasi. Queste proteine hanno tre motivi in comune: i domini FAT e FATC hanno una funzione sconosciuta, ma il dominio FAT di ATM contiene la serina1981 (il sito che viene autofosforilato durante l'attivazione di ATM). Il dominio PI3K, che contiene i motivi fosfatidilinositolo 3-chinasi, ospita il sito catalitico nelle chinasi attive della famiglia.

Le proteine chinasi attive della famiglia rispondono ai vari stress fosforilando proteine specifiche nelle corrispondenti vie di risposta cellulari operando perciò su numerosi processi simultaneamente. Nelle reazioni ai danni al DNA sono coinvolte quattro PIKKs presenti nei mammiferi: la proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PK), ATM, ATR e ATX. Mentre ATM e la DNA-PK rispondono soprattutto alle DSBs, ATR e ATX rispondono sia al danno provocato dagli UV (probabilmente dagli UV che inducono l'arresto delle replicazioni) sia alle DSBs; ATR invece risponde anche al blocco delle forcelle di replicazione. mTOR/FRAP è l'unica chinasi attiva di questa famiglia che non viene coinvolta nella risposta ai danni al DNA: risponde ai livelli di nutriente e agli stimoli mitogenici mandando segnali all'apparato di traduzione delle proteine e probabilmente ai sistemi di degradazione delle proteine, ed è coinvolta nel controllo della crescita cellulare.

La proteina ATM: al centro della rete di segnalazione delle DSBs

Attivazione di ATM

Nelle cellule in divisione, ATM risiede prevalentemente nel nucleo, e risponde in modo rapido ed energico all'insorgenza delle DSBs fosforilando numerosi substrati. La fosforilazione mediata da ATM può aumentare o reprimere l'attività dei suoi bersagli, influendo così sui processi in cui queste proteine sono coinvolte. Analogamente alle altre PIKKs attive, ATM ha come bersaglio i residui di serina o treonina seguiti da glutammica, conosciuto come motivo 'SQ/TQ' (*Kim et al. 1999*).
La particolarità della risposta di ATM alle DSBs è un immediato aumento della sua attività chinasica i cui bersagli vengono appunto convertiti in pochi minuti in derivati fosforilati. Un cambiamento marcato nell'attività di ATM inciderebbe in modo significativo su questo articolato processo. Prove iniziali hanno indicato che l'attivazione di ATM potesse coinvolgere un'autofosforilazione (*Kozlov et al. 1998*). Un'evoluzione nella comprensione di questo processo è dovuta al lavoro di *Bakkenist e Kastan (2003)*. Questi due studiosi hanno scoperto che le molecole di ATM sono inattive in cellule non danneggiate, e formano dimeri o polimeri di ordine superiore. In questa conformazione, il dominio chinasico (PI3K) di ogni molecola è bloccato dal dominio FAT dell'altra. In seguito a un danno, ogni molecola di ATM fosforila l'altra su un residuo di serina in posizione 1981 all'interno del dominio FAT: la fosforilazione libera le molecole l'una dall'altra, e le trasforma in monomeri completamente attivi. Entro pochi minuti dopo l'insorgenza di un numero limitato di DSBs nel genoma, la maggior parte delle molecole di ATM diventano molto attive. Bakkenist e Kastan dimostrarono che il segnale per l'attivazione di ATM siano le modificazioni alla struttura della cromatina, invece che il diretto contatto di ATM con il DNA rotto. Tuttavia, è stato precedentemente dimostrato che, subito dopo l'insorgenza del danno, una porzione dell'ATM nucleare viene reclutata nei siti delle DSBs, dove rimane attaccata, facendo da piattaforma per ulteriori reazioni enzimatiche (*Andegeko et al. 2001*). Sia l'ATM legato alla cromatina che quello libero si "autofosforilano" alla serina 1981 (L.Moyal, osservazione non pubblicata). In questo modo, dopo l'induzione delle DSBs, l'ATM attivato sembra dividersi in due parti: una legata alla cromatina, l'altra libera di muoversi in tutto il nucleo (Figura 5.e.)

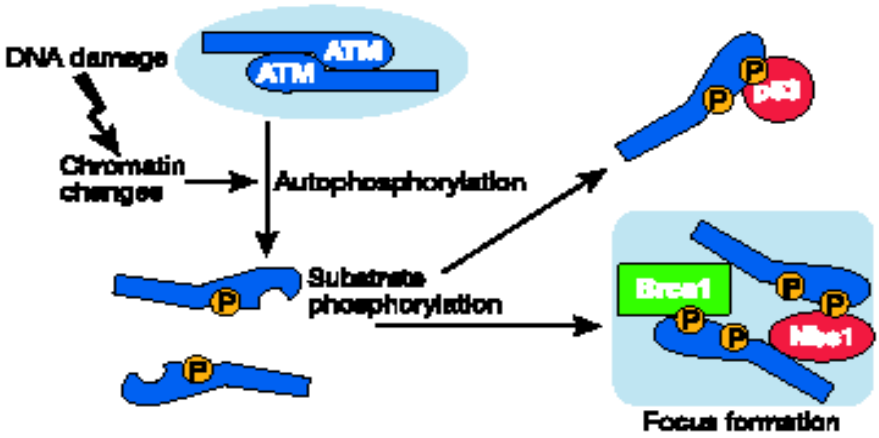

DNA damage
ATM
ATM
Chromatin changes
Autophosphorylation
P
P
p53
P
Substrate phosphorylation
P
Brca1
P
P
P
P
Nbs1
Focus formation

Figura 5.e. Modello schematico dell'attivazione di ATM dopo irradiazione.
Le DSBs portano ad un'alterazione della struttura della cromatina che provoca l'autofosforilazione del dimero di ATM sulla serina1981 e una conseguente dissociazione del dimero. I monomeri attivati di ATM sono allora liberi di migrare e fosforilare i loro substrati (qui: p53, Nbs1 e Brca1)

I substrati di ATM

L'elenco dei substrati dell'ATM fino ad oggi conosciuti (più di una dozzina) è ancora incompleto, e molte reazioni che dipendono da ATM potrebbero coinvolgere dei bersagli attualmente sconosciuti. Col tempo lo studio di queste vie stachiarendo un numero sempre maggiore di risposte cellulari alle DSBs regolate da ATM che utilizza varie strategie sofisticate (Figura 5.f.). La prima strategia è quella di avvicinarsi allo stesso effettore da direzioni diverse. Un componente principale nel checkpoint G_1-S del ciclo cellulare è ottenuto mediante l'attivazione e la stabilizzazione di p53, la quale a sua volta attiva la trascrizione del gene che codifica WAF1 (anche noto come p21 o CIP1), l'inibitore della ciclina CDK2-E, indispensabile per la transizione da G_1 a S. Il target principale di ATM in questa via èp53 che viene fosforilata da ATM sulla serina15 (Banin et al. 1998), contribuendo ad aumentare l'attività di p53 come fattore di trascrizione. ATM fosforila ed attiva anche CHK2, una chinasi del checkpoint che fosforila p53 sulla serina20 (Bartek et al. 2001). Questa fosforilazione interferisce con l'interazione p53-MDM2. La proteina oncogenica MDM2 è un inibitore diretto ed indiretto di p53, in quanto agisce da ubiquitina ligasi nella ubiquitinazione di p53, e provoca la sua degradazione mediata dal proteosoma (Ryan et al. 2001). Oltre a ciò, ATM fosforila anche MDM2 direttamente sulla serina395, e questo interferisce con l'esportazione dal nucleo del complesso p53-MDM2 e con la degradazione di p53 (Maya et al. 2001). Infine, è stato riportato che la fosforilazione di p53 sulla serina9 e sulla serina46, e la defosforilazione della serina376, sono anch'esse dipendenti da ATM, sebbene la funzione di questi cambiamenti sia sconosciuta (Waterman et al. 1998). Questa serie di modificazioni ATM-dipendenti che attivano e stabilizzano p53 (anche se forse non completamente) illustrano il modo elaborato con cui ATM si occupa di un unico effettore, e indica che ATM potrebbe regolare molti effettori all'interno della stessa via. Questo principio è valido anche nell'attivazione mediata da ATM di BRCA1, una proteina soppressore di tumori, in seguito a un danno. BRCA1 è stata trovata all'interno di grandi complessi proteici che contengono, oltre ad ATM, degli enzimi in grado di riparare le DSBs e gli accoppiamenti sbagliati (mismatch), ma il suo ruolo nella riparazione delle DSBs è ancora sconosciuto (Wang et al. 2000). BRCA1 attiva anche alcuni geni di risposta al danno ed è coinvolta nei checkpoints della fase-S e G_2-M. ATM fosforila BRCA1 in diversi siti (Cortez et al. 1999). E' da notare che, mentre la fosforilazione, mediata da ATM, di BRCA1 sulla serina1387 attiva BRCA1 come regolatore del checkpoint interno alla fase-S, la fosforilazione sulla serina1423, sempre mediata da ATM, attiva BRCA1 nel checkpoint G_2-M. Quindi, la fosforilazione su diversi siti può portare un effettore ad agire in diversevie di traduzione del segnale. La chinasi CHK2, attivata da ATM, aggiunge un'altra fosforilazione a BRCA1; nello stesso momento ATM fosforila CtIP (un inibitore di BRCA1) su due residui e

lo inibisce, provocando un'ulteriore stimolazione di BRCA1 (Li et al 2000). L'influenza di ATM sulle pathways a valle è dimostrata non solo dal controllo "multidirezionale" che esercita sulle vie specifiche, ma anche dalla sua abilità di avvicinarsi all'obiettivo finale da molte direzioni diverse. Un esempio degno di nota è, di nuovo, il checkpoint interno alla fase-S: molte vie controllate da ATM convergono per controllare questo processo, visto che è una delle risposte cellulari più importanti alle DSBs (Figura 5.f.). Almeno cinque vie mediate da ATM sembrano essere coinvolte in questo checkpoint. Oltre a BRCA1, ATM fosforila NBS1, un componente del complesso multi-funzionale MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), coinvolto nella riparazione delle DSBs (Figura 5.c.). Dei diversi siti di fosforilazione di ATM su NBS1, la serina343 e la serina278 sembrano essere particolarmente importanti, anche se il suo ruolo in questo checkpoint rimane ancora sconosciuto. Un altro substrato di ATM nel checkpoint interno alla fase-S è la proteina SMC1 (manutenzione strutturale del cromosoma 1). Questa proteina, conosciuta principalmente per il suo coinvolgimento nella coesione dei cromatidi fratelli, è fosforilata da ATM su due residui di serina, e l'impedimento di questa fosforilazione disattiva il checkpoint della fase-S (Kim et al. 2002). Un altro effettore di ATM, identificato di recente nel checkpoint della fase-S, è la proteina FANCD2, che viene fosforilata da ATM sulla serina222 in seguito a DSBs, e subisce una mono-ubiquitinazione mediata da BRCA1 (Taniguchi et al. 2002). La proteina FANCD2 fa parte di un complesso multi-proteico, che se difettoso porta ad una sindrome ad instabilità genomica chiamata Anemia di Fanconi. Contemporaneamente, CHK2 e CHK1 (un'altra chinasi attivata da ATM/ATR), intervengono in diversi checkpoints. Entrambe fosforilano la fosfatasi del checkpoint CDC25A, che viene così marcata per la degradazione (Mailand et al. 2000). Il compito di CDC25A è di defosforilare, e perciò di mantenere in attività, le chinasi ciclina-dipendenti CDK2 e CDK1. CDK2 sorveglia la transizione G_1-S e la fase-S, mentre CDK1 mobilita la fase G_2 verso la mitosi. Quindi, la distruzione di CDC25A contribuisce ai checkpoint G_1-S, intra-S e G_2-M (Figura 5.f.). Da notare è che il componente del checkpoint G_1-S, mediato da CDC25A, è rapido e, al contrario del componente mediato da p53, non è dipendente dall'attivazione di geni ne da sintesi proteica (Falk et al. 2002). In particolare, oltre alla versatilità di ATM come proteina chinasi con numerosi substrati, la ragnatela di ATM contiene delle chinasi capaci esse stesse di colpire simultaneamente numerosi effettori a valle, e controllare allo stesso tempo sottoinsiemi di vie. CHK2, per esempio, di solito fosforila p53, BRCA1, CDC25A e CDC25C (Figura 5.f.). E' stato suggerito che la via CHK2-CDC25C sia simile alla via CHK2-CDC25A menzionata prima, con la sola differenza che agisce nella transizione G_2-M. Si ritiene sia qui che la fosforilazione di CDC25C, per mezzo di CHK2 attivata, causi il sequestro citoplasmatico di CDC25C, evento che previene

l'attivazione di CDK1. La maggior parte di queste vienon sono state spiegate in modo esaustivo, e il coinvolgimento in esse di substrati di ATM è stato dedotto semplicemente dalla difettosa attivazione di checkpoints specifici, che si verificava in seguito all'abrogazione delle fosforilazioni mediate da ATM di queste proteine. Una via interessante è mediata dalla fosforilazione di RAD17 (l'ortologo umano di Rad17 del lievito Schizosaccharomyces pombe). RAD17 viene fosforilato attraverso la mediazione di ATM/ATR su due residui di serina, e questa fosforilazione è stata giudicata importante per i checkpoints G_1-S e G_2-M. Questa proteina è coinvolta in una fase iniziale nella reazione alle DSBs: assembla un complesso trimolecolare sul DNA, che consiste negli ortologhi umani delle proteine del lievito (S. pombe) Rad9, Hus1 e Rad1 ('il complesso 9-1-1'). Questo complesso si comporta come un morsetto scorrevole, e probabilmente è un sensore di danni (Roos-Mattjus et al.

ıto del
fosforilate
points
ıolo: a
onente del
Bs, d'altra

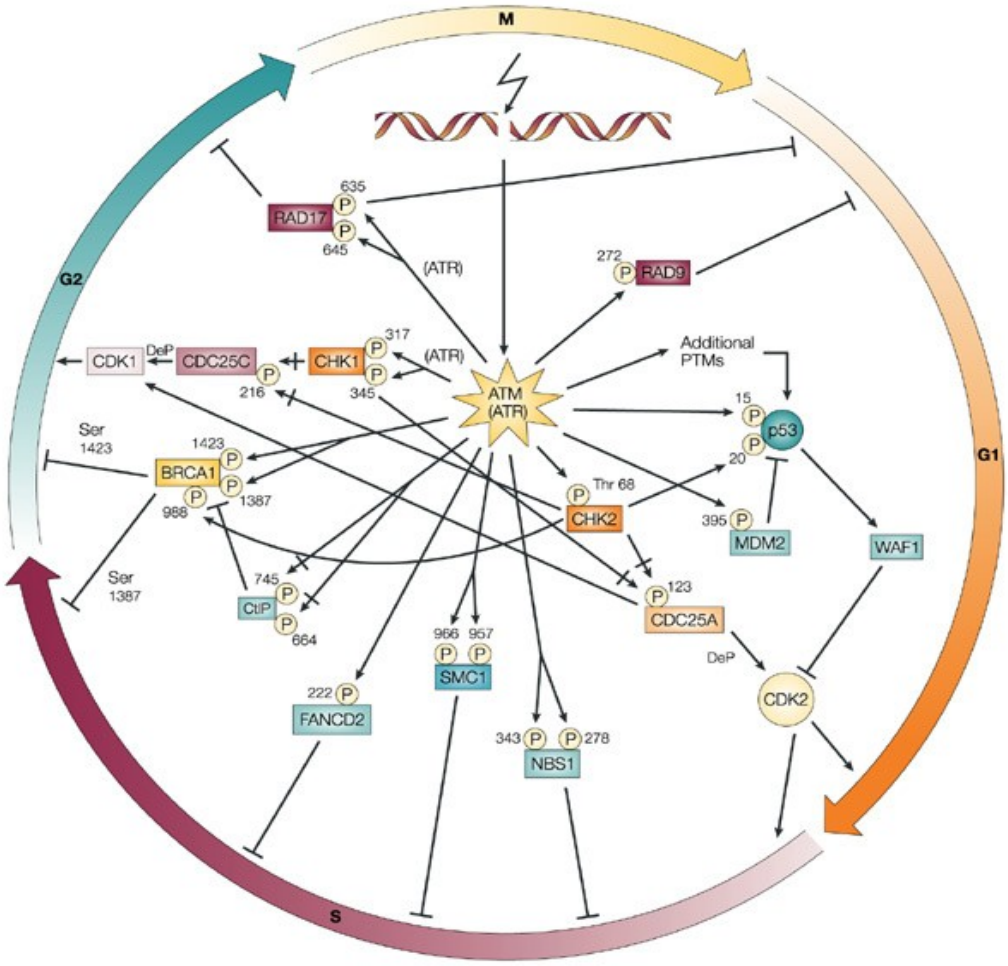


Figura 5.f. L'attivazione mediata dall'ATM dei checkpoints del ciclo cellulare in risposta alle DSBs.
Le frecce indicano attivazione; le linee a forma di T indicano inibizione. Le fosforilazioni inibitorie sono segnalate da una linea all'interno della freccia. Le defosforilazioni sono indicate con "DeP". La posizione dei fosforilati residui è indicata con il loro numero. Nella maggior parte dei casi, i fosforilati residui sono serine, a parte la fosforilazione mediata da ATM di CHK2 che colpisce la treonina68. La maggior parte di queste pathways sono regolate principalmente da ATM, in particolare nella fase iniziale della risposta al danno al DNA, mentre ATR diventa importante nelle fasi successive per mantenere le pathways. Comunque, le pathways mediate da fosforilazione di RAD17 e di CHK1 sono soprattutto controllate da ATR. Il meccanismo che regola alcune di queste pathway non è stato pienamente compreso, ma la fosforilazione mediata da ATM delle proteine indicate è sicuramente importante per questi processi. Si noti che le diverse fosforilazioni di BRCA1 portano questa proteina ad agire in checkpoints differenti.

A monte e a valle di ATM

E' opinione sempre più condivisa che il segnale delle DSBs sia inizialmente amplificato attraverso un processo ciclico piuttosto che da una serie di passaggi a gerarchia lineare. Uno dei primi processi scatenati dalle DSBs è la massiccia fosforilazione della coda di una variante di una proteina istonica chiamata H2AX (*Redon et al. 2002*). Intorno alle DSBs si formano rapidamente dei foci di H2AX fosforilata, ritenuti essenziali per l'ulteriore reclutamento di fattori di riparazione, quali i complessi MRN, RAD51 e BRCA1. Si ritiene che la fosforilazione di H2AX, un evento molto precoce nella cascata attivata dalle DSBs, sia ATM-dipendente in seguito a DSBs, e ATR-dipendente in seguito a stress replicativo. Questo processo potrebbe servire perciò come meccanismo rapido e potente per amplificare il segnale del danno attraverso cicli ripetuti di fosforilazione di H2AX, e per il reclutamento dei fattori di riparazione. Questi facilitano l'ulteriore reclutamento di trasduttori di

danno nei siti danneggiati, oltre che di proteine di riparazione. Un altro processo di amplificazione del segnale potrebbe comportare la fosforilazione di certi substrati di ATM. La proteina NBS1, essa stessa un substrato di ATM, sembra servire come raccordo nella fosforilazione di altri substrati di ATM, quali CHK2 e SMC1, in particolare a livelli di danno bassi (*Yazdi et al. 2002*). Perciò, in questo interessante meccanismo, la fosforilazione di un substrato è necessaria per la fosforilazione di altri. Questo è un ruolo aggiuntivo di NBS1 che va a sommarsi a quello che svolge questa proteina nel complesso di MRN che agisce come primo processore del danno. La continua scoperta di relazioni complesse tra ATM ed i suoi numerosi substrati, aiuta a disegnare nuove mappe per la segnalazione di danni al DNA che deviano da quelle lineari tradizionali, ed assegnano a numerose proteine più di un ruolo negli stadi iniziali e successivi di questa mappa.

ATM - un attivatore diretto della riparazione?

Il ruolo di ATM nella risposta al danno solleva il problema di constatare se esso sia o non sia direttamente coinvolto nel controllo del processo di riparazione (Figura 5.c.). Cellule A-T mostrano un difetto sottile ma distinto nella riparazione delle DSBs, che in passato veniva attribuito all'assemblaggio e al funzionamento non ottimale dei complessi proteici RAD51, associati al meccanismo di riparazione HR (Figura 5.c.). Si pensa che l'attivazione di questa via sia associata alla fosforilazione delle proteine RAD51 e RAD52 da parte della tirosina chinasi ABL (*Kitao et al. 2002*), la quale interagisce fisicamente con ATM e la cui attivazione dipende da ATM. La rapidità nella reazione al danno da una parte, e le numerose interazioni funzionali che questa risposta comporta dall'altra, indicano che le proteine fondamentali rimangono in stretto contatto fisico. Inoltre, nelle cellule umane è stato identificato un grande complesso che contiene BRCA1, ATM e numerose proteine di riparazione (*Wang et al. 2000*). Le interazioni fisiche all'interno di tali complessi sono probabilmente dinamiche e rispondono rapidamente ai danni al DNA. A questo proposito, un esempio recente, è l'interazione tra due interpreti della risposta al danno (BRCA1 ed ABL) che viene rapidamente annullata in seguito al danno al DNA, in maniera ATM-dipendente (*Foray et al. 2002*).

ATM e stabilità genomica indipendente dal danno: metabolismo del telomero e ricombinazione V(D)J.

ATM oltre a rispondere a DSBs causate da agenti danneggianti aiuta mantenere la normale stabilità genomica coordinando alcuni processi. Le cellule A-T hanno telomeri accorciati e mostrano un'anomala associazione delle terminazioni cromosomiche e un'alterazione delle interazioni tra i telomeri e la matrice nucleare (*Pandita T.K, 2001*). In questo caso, è probabile che ATM risponda in modo continuo ad un processo in corso, piuttosto che in modo improvviso ad un insulto improvviso, come avviene nella risposta alle DSBs. Le relazioni funzionali tra ATM e il sistema di

mantenimento del telomero sono state capite in tempi recenti da un studio che ha generato topi $ATM^{-/-}$, privi anche del componente di RNA della telomerasi (Terc) (*Wong et al. 2003*). Questi animali hanno mostrato un alto livello di instabilità genomica, invecchiamento e morte prematura. Tuttavia, la percentuale di tumori alle cellule T in questi topi era diminuita piuttosto che aumentata. Un substrato di fosforilazione ATM-dipendente nel sistema di mantenimento del telomero è il TRF1. Il TRF1 regola negativamente l'allungamento del telomero e la sua fosforilazione sembra sopprimere l'apoptosi mediata da TRF1 in seguito al danno al DNA. È interessante che l'inibizione del TRF1 nelle cellule A-T evita l'accorciamento del telomero e diminuisce la radiosensibilità di queste cellule, offrendo un'ulteriore prova del collegamento tra metabolismo del telomero e la risposta al danno (*Kishi et al. 2002*).

Un'ulteriore prova dell'attività continua di ATM dove normalmente si verificano rottura e riunione del DNA è data dalla sua presenza nei siti della ricombinazione *V(D)J* (*Perkins et al. 2002*). In questi siti è stata trovata anche p53 fosforilata sul residuo target di ATM, ad indicare che ATM presiede continuamente al processo di ricombinazione *V(D)J*, e può stimolare una risposta al danno se le DSBs non vengono sigillate correttamente. In effetti, pazienti A-T mostrano spesso translocazioni clonali che coinvolgono i siti del recettore della cellula T e i geni per le immunoglobuline, mostrando le conseguenze dell'assenza di questa sorveglianza. Queste translocazioni spesso preannunciano la comparsa di tumori linfatici (*Xu et al. 1999*).

Altri membri della famiglia delle proteine PIKK

ATR

Le vie mediate da ATM dipendono principalmente da ATM stesso nella rapida fase iniziale della risposta al danno che dura per 1-2 ore. Queste vie non sono perciò completamente abolite nelle cellule A-T, ma sono piuttosto attenuate per essere accese più tardi. Questo modello indica che altre proteine chinasi agiscono insieme ad ATM, ma con cinetiche diverse e la loro attività viene rilevata in assenza di ATM. Una di queste proteine chinasi potrebbe essere ATR, visto che divide molti substrati con ATM (*Abraham et al. 2001*). La soppressione dell'attività endogena di ATR usando una sovraespressione di ATR inattivo ricombinante, ha indicato che l'ATR è responsabile della fosforilazione di certi substrati di ATM negli stadi tardivi, in seguito all'insorgenza del danno. Quindi, nella risposta alle DSBs, ATM reagisce per prima, essendo responsabile della risposta nella fase veloce immediata, mentre ATR interviene più tardi e mantiene lo stato fosforilato dei substrati specifici. Questa importante ridondanza aggiunge ulteriore finezza e complessità nella risposta alle DSBs. Prendersi cura dello stadio tardivo della risposta alle DSBs non è, comunque, il ruolo principale di ATR. Essa risponde anche al trattamento con raggi UV, al blocco delle forcelle di replicazione e all'ipossia (le quali non attivano ATM) fosforilando un sottoinsieme dei substrati di

ATM, fra i quali p53 e BRCA1 (*Tibbets et al. 1999, 2000*). Di recente è stato scoperto che ATR si lega di preferenza a DNA danneggiato dai raggi UV. ATR quindi lega la rete mediata da ATM ad altri segnali, non solo alle DSBs. Non tutti gli effettori a valle si dividono equamente tra ATM e ATR. Per esempio, mentre CHK2 è un substrato preferenziale di ATM nelle vie dei checkpoints G_1/S e G_2/M del ciclo cellulare, CHK1 è un target preferenziale di ATR nella via del checkpoint G_2-M (*Zhao et al. 2001*) (Figura 5.f.). Questo potrebbe avere conseguenze significative successivamente: per esempio se ATM, e non ATR, attiva CHK2, in cellule prive di ATM, p53 non potrà essere stabilizzata dalla fosforilazione sulla serina20, nonostante la presenza di ATR. Infatti, un recente lavoro ha dimostrato che ATR non ha un'influenza significativa sulla stabilizzazione di p53 e sull'attivazione del checkpoint G_1-S. Invece ATR è importante per prevenire la condensazione prematura della cromatina in seguito al danno al DNA. Questa osservazione accentua la distinzione funzionale tra le vie ATM-dipendenti e ATR-dipendenti ed indica che la loro relazione non è solo quella di servire allo stesso scopo in tempi diversi, ma è molto più complessa.
Un altro importante substrato di ATR è RAD17 (*Zou et al. 2002*) menzionato prima (Figura 5.f.). La fosforilazione di RAD17 e CHK1 mediata da ATR dipende da HUS1, un membro del complesso '9-1-1' (*Weiss et al. 2002*). Un recente lavoro basato sull'analisi di estratti di uovo di *Xenopus*, indica che ATR potrebbe essere coinvolta nel checkpoint di replicazione, ossia quello che assicura costantemente che la mitosi non inizi prima che sia stata completata la replicazione (*Hekmat et al. 2000*). Il coinvolgimento in un tale processo cruciale spiega perché, al contrario di ATM, la perdita di ATR sia letale per l'embrione dei topi e non è compatibile con la vitalità cellulare in cultura (*Cortez et al. 2001*). È interessante notare come negli estratti di *Xenopus*, l'attivazione del checkpoint del danno ATR-dipendente solleciti l'avvio della replicazione del DNA. Un ulteriore riprova dell'importanza dell'ATR nella risposta allo stress replicativo è venuta da uno studio recente che mostra come la mancanza di ATR, ma non di ATM, destabilizzi in modo marcato i siti più fragili del cromosoma (*Casper et al. 2002*)

Mutazioni di *ATM* e cancro

Come le altre sindromi di instabilità genomica, l'A-T è un disturbo che predispone al cancro. I topi Atm-deficienti mostrano un'impressionante predisposizione ai tumori linfatici, in particolare ai linfomi del timo, a causa dei quali muoiono prima di raggiungere il primo anno di età. Ciononostante, molta della letteratura riguardo le mutazioni di ATM e cancro non riguarda pazienti A-T, ma riguarda invece portatori eterozigoti della mutazione A-T. Per più di vent'anni la proteina ATM ha suscitato l'interesse degli studiosi di tumori in quanto è stata osservata una predisposizione al cancro in portatori di A-T. Questi studi mostrano un'alta incidenza di tumori, in particolare di cancro al seno, fra individui non affetti di famiglie A-T (*Khanna, 2000*). In virtù della frequenza del 1-

2% di portatori A-T nella popolazione mondiale, questa osservazione ha importanti implicazioni per la salute pubblica. Per esempio, le mutazioni di ATM dovrebbero essere considerate un marcatore genetico di predisposizione al cancro? Individui potenzialmente più soggetti di altri a radiazioni dovrebbero sottoporsi a specifici esami per controllare le mutazioni di ATM? Stranamente, studi epidemiologici condotti in comunità diverse al fine di confermare questa importante osservazione hanno dato risultati conflittuali: l'entità della predisposizione al cancro nei portatori A-T è sembrata essere, nella migliore delle ipotesi, bassa. Alla fine, la pubblicazione di importanti scoperte ha contribuito a chiarire questo apparente conflitto. Le mutazioni A-T portano, nella maggior parte dei casi, a prodotti proteici troncati e instabili, e questi alleli di ATM non producono affatto la proteina ATM. I portatori di tali mutazioni hanno solo una quantità ridotta di ATM funzionale. Altre mutazioni A-T portano a sostituzioni aminoacidiche (mutazioni missense = perdita di significato) o a delezioni "in-frame" che portano lo stesso alla produzione di proteina, che però risulta cataliticamente inattiva. Le cellule dei portatori di queste mutazioni dovrebbero contenere molecole di ATM funzionali e molecole di ATM inattive in rapporti quantitativi differenti. Uno studio meticoloso del tipo di mutazioni di ATM nelle famiglie A-T con elevata incidenza di tumori mostra un'alta frequenza di mutazioni missense. L'importanza delle mutazioni missense nel predisporre i portatori al cancro può essere spiegata semplicemente dall'effetto dominante-negativo della versione inattiva della proteina, sulla proteina normale, che porta ad una riduzione della funzionalità di ATM più grande di quella che si verifica nei portatori di mutazioni che causano una proteina troncata (*Gatti et al. 1999*).

Questo modello spiega anche perché questo importante fenomeno, l'elevata incidenza di tumori, non è stato uniformemente osservato negli studi che hanno incluso famiglie con portatori di una mutazione di troncamento. Un'elegante dimostrazione sperimentale di questo principio è stata realizzata da *Scott et al (2002*). i quali hanno fatto esprimere nelle cellule un'ATM ricombinante manipolata in modo da contenere mutazioni missense, trovate in un gruppo di pazienti con sporadici cancri al seno. Alcune di queste proteine ATM mutanti hanno veramente soppresso l'attività chinasica dell'ATM endogeno, altrimenti funzionante, causando radiosensibilità ed instabilità genomica. Una forte riprova a questi dati proviene da uno studio recente che ha usato un animale A-T come modello (*Spring et al. 2002*). Nonostante l'elevata predisposizione al cancro dei topi *Atm-knockout*, animali che portano mutazioni nulle di ATM (ossia l'allele non produce proteina) in stato di eterozigosi, non mostrano nessuna predisposizione al cancro. Un'ulteriore importante prova che le mutazioni missense di ATM causino alterazioni al genoma proviene da una ricerca sulle mutazioni somatiche di ATM nei tumori umani sporadici. Effettivamente, ATM subisce mutazioni somatiche nei tumori linfatici sporadici, comportandosi come un gene oncosoppressore di questi tumori (*Stankovic et al. 2002*). E' importante notare che un numero consistente di mutazioni

somatiche di ATM presenti in questi tumori è del tipo missense, indicando che tali mutazioni siano di fondamentale importanza per la formazione dei tumori. Queste osservazioni sembrano mitigare il dibattito sul ruolo delle mutazioni di ATM nella predisposizione genetica al cancro (*Khanna, 2000*), e pone il gene che codifica la proteina ATM all'interno dell'elenco dei geni coinvolti nelle patologie tumorali.

Mutazioni di ATM e stress ossidativo

Studi recenti hanno dimostrato che, in assenza di ATM, il controllo del livello dei ROS nella cellula è compromesso. Tutti i dati sono supportati da quattro evidenze sperimentali: un'anomala risposta delle cellule A-T agli agenti che inducono danno ossidativo; anomalie nei livelli di espressione o nella funzione dei sistemi antiossidanti in queste cellule; evidenze di un aumentato stress ossidativo nei tessuti di individui A-T; la presenza di una reazione continua allo stress ossidativo, che può essere mitigata dall'impiego di antiossidanti. Tuttavia, mentre è stato ampiamente dimostrato che le cellule A-T soffrono di stress ossidativo costante, e che questa condizione è responsabile di una parte del fenotipo clinico, non è ancora chiaro il meccanismo che sta alla base di questo fenomeno.
Secondo le ultime scoperte la proteina ATM potrebbe agire regolando lo stato "redox" della cellula in modo diretto ed indiretto. ATM potrebbe regolare direttamente l'espressione di geni codificanti proteine che combattono il danno ossidativo o modificare l'attività di queste proteine attraverso modificazioni post-traslazionali (es. fosforilazione). Le modificazioni post-traslazionali potrebbero essere eseguite da ATM stessa o da altri enzimi, in modo ATM-dipendente. ATM stessa, inoltre, potrebbe essere un sensore del livello di ROS nell'ambiente cellulare.
È interessante notare però che la regolazione dello stato "redox" della cellula avviene soprattutto nel citoplasma e che recentemente ATM è stata osservata anche al di fuori del nucleo in cellule di cervelletto (*A.Oka et al. 1998*). Una elevata porzione di questa ATM citoplasmatica è stata ritrovata nei perossisomi (*Watters et al. 1999*). Anche l'attività dell'enzima catalasi risulta difettiva in cellule A-T (*Watters et al. 1999*). Mentre i due meccanismi d'azione proposti anche in Figura 5.g. sembrano plausibili non è stato ancora dimostrato un intervento diretto di ATM sulle pathways di risposta al danno ossidativo. ATM è coinvolta nelle fasi precoci della risposta alle DSBs e potrebbe riconoscere anche altri tipi di segnali, alcuni dei quali non associati con il danno al DNA (*Shiloh Y., 2001*) ma non è stato dimostrato che questa proteina reagisce direttamente a livelli anormali di ROS.
Una spiegazione alternativa è basata sul concetto che la continua presenza di DSBs non riparate sul DNA di cellule A-T potrebbero avere un effetto secondario sul metabolismo intracellulare. Stern et al. (in press) infatti propongono che la continua presenza di danno non riparato sul DNA comporti l'attivazione di pathways di risposta, dipendenti dal consumo di NAD^+. Uno degli enzimi che si attivano immediatamente dopo l'induzione di danno è PARP, responsabile della sintesi di polimeri

ADP-ribosio. Quindi l'attivazione di PARP in seguito al danno provoca la conseguente diminuzione del NAD^+ intracellulare. Potrebbe essere questa carenza di NAD^+ la causa dello stress ossidativo in A-T.

Il modello proposto da Stern et al. potrebbe spiegare la presenza di neuropatologie associate a difetti della riparazione. Il mantenimento della stabilità genomica è cruciale per lo sviluppo della cellula neurale, ed essendo lo stress ossidativo una diretta conseguenza dell'incapacità di riparare lesioni al DNA, potrebbe essere proprio questa condizione di instabilità a provocare neurodegenerazione nelle cellule difettive per la riparazione, come lo sono le A-T.

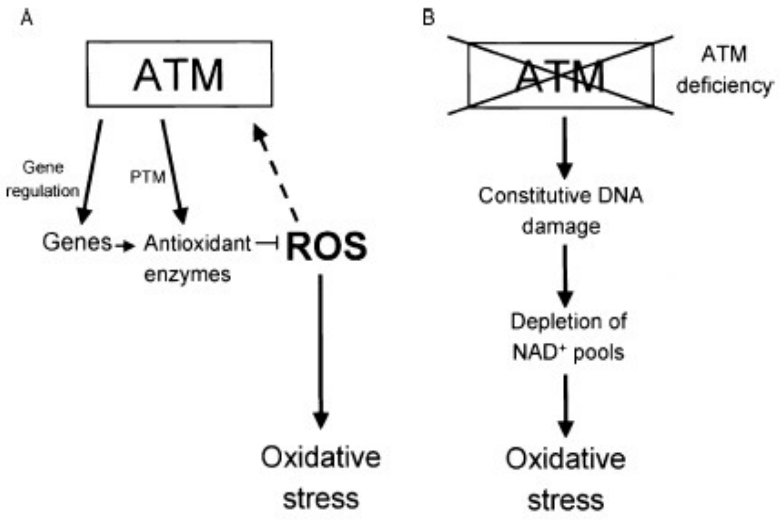


Figura 5.g. Due ipotesi per spiegare come l'assenza di ATM può comportare stress ossidativo

6. LA PROTEINA p53

Il mantenimento della stabilità genomica

Sono molti i progressi compiuti negli ultimi anni sulla conoscenza delle basi molecolari del cancro. Esiste un meccanismo molecolare molto complesso, costituito da una ricca rete di segnali convergenti nel nucleo della cellula, e sulla base dei quali, attraverso dei circuiti definiti come "check-points", viene controllata l'efficienza e la sequenzialità degli eventi che caratterizzano il ciclo cellulare. Il danneggiamento del DNA comporta una miriade di risposte cellulari mediate dai "check-points" tra cui l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'apoptosi. I difetti nelle vie di

risposta al danno al DNA comportano generalmente lo sviluppo dei tumori (*Ljungman et al. 2004*). La proteina p53 è un fattore di trascrizione nucleare coinvolto in importanti funzioni cellulari come la trascrizione, la sintesi e la riparazione del DNA, l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. La caratteristica che accomuna tutte le cellule tumorali consiste nella deregolazione della proliferazione cellulare con la conseguente perdita della capacità di andare incontro ad apoptosi. In questo contesto è fondamentale il ruolo svolto dalla proteina p53 sia nel mantenimento dell'integrità genomica, sia nella soppressione della genesi tumorale. La proteina p53 è codificata dal gene oncosoppressore omologo localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 (*Hollstein et al. 1994*). Quando si parla di cancro nell'uomo occorre tenere presente che il gene *p53* è uno dei geni mutati più frequentemente. Infatti, circa il 50% dei tumori umani presenta mutazioni di *p53* e si ritiene che la restante metà sia caratterizzata da alterazioni nei componenti della via di soppressione tumorale mediata da p53 (*Zhou et al. 2000; Soussi et al. 2001*). In condizioni normali, il livello cellulare di p53 viene mantenuto basso grazie alla sua rapida proteolisi, ma la stabilità della proteina aumenta in seguito al danneggiamento al DNA, mediante una via di segnalazione che include le chinasi ATM e ATR, e tramite delle chinasi effettrici come Chk1 e Chk2 che regolano la trascrizione di tutta una serie di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi (*Meek, 2004*). Poiché un'attivazione aberrante di p53 può avere pesanti conseguenze su un organismo, la sua attività è altamente controllata e regolata a molteplici livelli (*Coutts AS et al. 2005*).

I geni "target" di p53

Da uno studio sulla p53 e sui geni indotti dal danno al DNA sono stati identificati più di 100 geni bersaglio della proteina (*Zhao et al., 2000*). Le funzioni della proteina p53 come attivatore trascrizionale sequenza-specifico sono state molto studiate e sebbene siano molti i geni la cui trascrizione è modulata da promotori che rispondono alla p53, quelli coinvolti nella regolazione dell'apoptosi e nell'arresto del ciclo cellulare, qui di seguito riportati, suscitano sicuramente maggiore interesse.

- Geni che regolano il ciclo cellulare (*p21, Cip1, GADD45, Waf1*, *CDK2*)
- Geni associati all'apoptosi (*BAX, famiglia BCL-2, FAS/APO1*, *KILLER/DR5, DR4, PIG-3*)

Tra i geni regolati da p53 sono comunque inclusi anche una vasta gamma di geni associati con la segnalazione cellulare, con la regolazione della matrice extracellulare e con la struttura cellulare stessa (*Zhao et al., 2000*). Quando l'oncosoppressore p53 induce la trascrizione di *p21/Cip1/Waf1*, questi provocano l'arresto del ciclo cellulare inibendo l'attività del complesso-chinasi ciclina-dipendente. L'apoptosi viene invece indotta da p53 mediante distinte vie; ad esempio tramite la regolazione di

proteine della famiglia di Bcl-2, inducendo la trascrizione dei membri pro-apoptotici come BAX e reprimendo quella dei rappresentanti anti-apoptotici come lo stesso Bcl-2 (o survivina) o anche inducendo GADD45 (*Latonen et al., 2001*) che svolge un ruolo di primaria importanza anche nell'apoptosi indotta tramite danno da raggi-x. I meccanismi con cui la proteina p53 può operare nel monitoraggio della progressione del ciclo cellulare sono molteplici. La p53 è coinvolta sia nella "up-regulation" (*Levine, 1997*) sia nella "down-regulation" (*Ahn et al., 1999*) di differenti "sets" di geni. Tra i geni "down" regolati, *Bcl2* riveste un ruolo di primaria importanza data la sua capacità di bloccare il rilascio del citocromo-c dal mitocondrio, impedendo la formazione di un grande complesso proteico definito "apoptosoma"(caspasi 9, APAF-1, citocromo-c) responsabile dell'attivazione di una importante via apoptotica ("intrinsic pathway") (*Wang, 2001*). La proteina oncosoppressore PUMA, appartenente alla famiglia Bcl2, sembra essere il più importante fattore pro-apoptotico indotto da p53 ed è in grado di inibire la crescita di alcuni tipi di cellule tumorali umane (*Yu et al. 2001*). È stato recentemente dimostrato che PUMA può essere indotta anche da p73, e potrebbe quindi avere un ruolo anche nell'apoptosi indotta da p73 (*Melino et al., 2004*), indicando che tale proteina potrebbe intervenire anche in vie apoptotiche indipendenti da p53.
I geni *DR5/KILLER, DR4* e *FAS/APO1* sono geni bersaglio della proteina p53 e codificano per alcuni recettori che si trovano sulla superficie cellulare ("death receptors") apparteneti alla famiglia TNF-R ("Tumor Necrosis Factor Receptor"). Il legame con il proprio ligando provoca la formazione di un complesso denominato DISC, "Death-Inducing-Signalling-Complex", mediante il quale si ha l'attivazione di una ulteriore via apoptotica (*Ashkenazi et al., 1998*).
Il ruolo del polipeptide p53, sia come attivatore trascrizionale che come soppressore tumorale, dipende soprattutto dalla capacità della proteina di mantenere una conformazione che consenta l'interazione ed il legame del suo dominio centrale con il DNA (*Foster et al., 1999*). Evidenze sperimentali indicano che le modificazioni (fosforilazione, acetilazione, ubiquitinazione etc.) che avvengono in residui specifici della proteina possono modificare, tramite cambiamenti conformazionali, l'affinità di legame di p53 per le regioni promotore dei vari geni "target", determinando così distinte risposte cellulari (*Vousden et al., 2002*).

Struttura e mutazioni della proteina p53

La proteina p53 umana è costituita da 393 amminoacidi e può essere divisa per struttura e funzione in 4 domini (Figura 6.a.):

- un dominio N-terminale con funzione di attivatore trascrizionale (amminoacidi 1-42) (*Lu e Levine, 1995; Thut et al., 1995)*;
- una parte centrale o "core " (amminoacidi 98-292) che si lega a domini specifici del DNA (*Bargonetti et al., 1993*); un largo numero di deboli interazioni amminoacidiche contribuiscono alla

stabilità di uno "scaffold" strutturato che orienta i due "loops" ed il motivo "loop-sheet-helix" nella superficie di legame del DNA (*Cho et al., 1994*).

- un dominio di tetramerizzazione (amminoacidi 324-355); la p53 nativa è infatti costituita, in soluzione, da un tetrametro e soltanto in questa forma può agire come oncosoppressore (*Shaulian et al., 1992; Stenger et al., 1994; Jeffrey et al., 1995*);
- un dominio C-terminale (amminoacidi 363-393) ricco di residui amminoacidici basici, importanti nella regolazione dell'interazione del "core" con il DNA (*Hupp e Lane, 1994; Lee et al., 1995*).

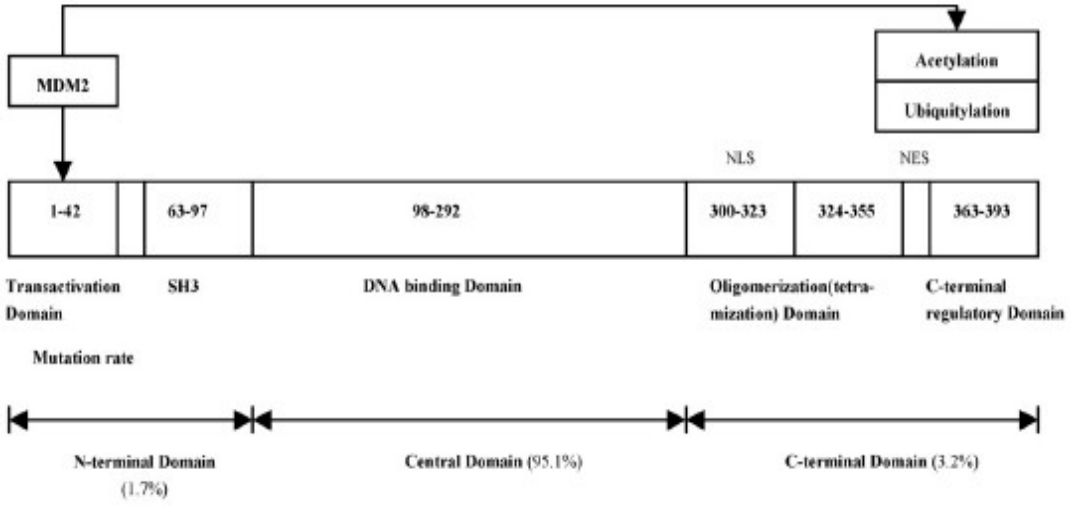


Figura 6.a. Struttura della p53 umana

Mutazioni non senso nel gene codificante il soppressore tumorale p53 comportano la sua disattivazione. La cosa più interessante è che quasi tutte queste mutazioni interessano il dominio centrale di legame al DNA (*Hainaut e Hollstein, 2000*), indicato anche come p53 C (dove C sta per "core"). Le sei mutazioni più frequenti associate al cancro sono raggruppate in "hot-spots" ed interessano le posizioni degli amminoacidi 175, 245, 248, 249, 273 e 282.
Recentemente si è tentato di classificare le mutazioni in base alla stabilità termodinamica del polipeptide mutato ed in base alla sua capacità di legare il DNA (*Bullock et al., 2000; Bullock et al., 2001*). Secondo questi principi sono stati individuati tre tipi di mutazioni:

1. "DNA-contact mutations", con scarso effetto sul ripiegamento della proteina e sulla sua stabilità, comportano la perdita di residui di legame al DNA;
2. mutazioni che causano una distorsione locale della p53, specialmente in prossimità del sito di legame al DNA;
3. mutazioni che comportano un mancato ripiegamento della proteina.

È chiaro che le diverse classi di p53 mutata richiedano differenti strategie di ripristino dell'attività della proteina. Le "DNA-contact mutations" possono essere recuperate mediante l'introduzione di residui amminoacidici che possono favorire un nuovo contatto con il DNA. Se la mutazione comporta l'assenza di ripiegamento, la proteina mutante potrà essere stabilizzata da agenti che ne ripristinano il ripiegamento: in particolare, ogni molecola con la capacità di legare la P53 nativa allo stato non denaturato, sposterà l'equilibrio del polipeptide mutante verso lo stato nativo (*Friedler et al., 2002*). È interessante come alcuni piccoli peptidi e piccole molecole, come CP-31398 e PRIMA, possano riattivare la p53 mutata ripristinando la conformazione strutturale "wild-type" del polipeptide, restituendo alla proteina la capacità di legarsi ai vari geni "target" e di indurre l'apoptosi nelle cellule cancerose (*Foster et al., 1999; Bykov et al., 2002; Wang et al., 2003*).

Regolazione dell'attività trascrizionale di p53

La proteina p53 può essere attivata in risposta a vari tipi di segnale di stress cellulare, tra cui hanno notevole rilevanza il danneggiamento del DNA e l'attivazione di oncogeni (Figura 6.b.). L'attivazione di p53 avviene attraverso una serie di modificazioni post-trascrizionali, molte delle quali ne aumentano la stabilità che di norma viene mantenuta a bassi livelli mediante la degradazione proteosomale nella quale ha un ruolo fondamentale la molecola Mdm2. In condizioni fisiologiche la proteina p53 ha una vita media di circa 10-20 minuti in molti tipi cellulari. Mdm2, "murine double minute 2", gioca un ruolo cruciale regolando negativamente l'attività di p53 (*Montes de Oca Luna et al., 1995*). Si lega, infatti, alla regione N-terminale della proteina e ne reprime l'attività promuovendone la degradazione e bloccandone l'attivazione trascrizionale (*Momand et al., 1992; Haupt et al., 1997*)

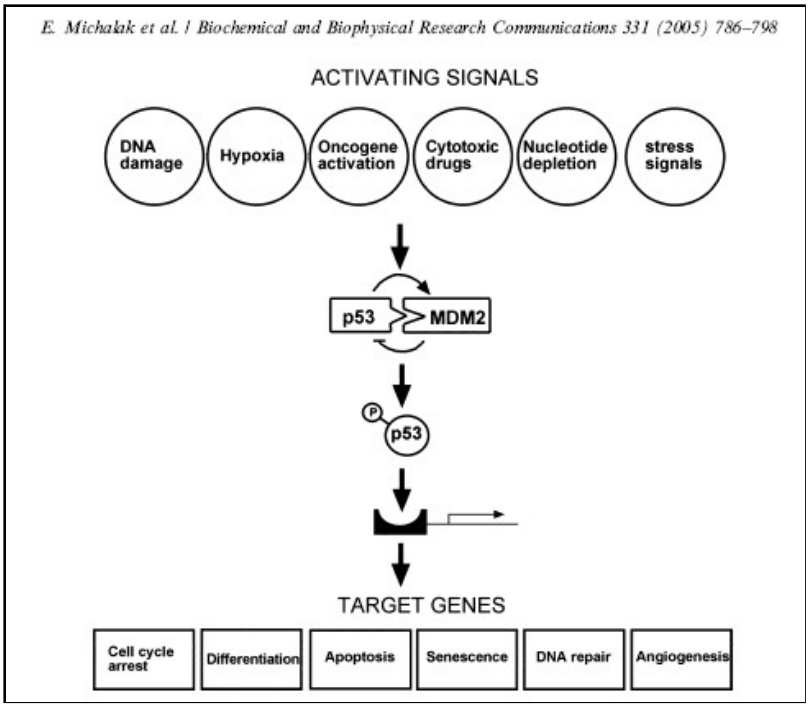


Figura 6.b. Attivazione di p53 in risposta ai vari segnali di stress cellulare.

Mediante un dominio "ring-finger", Mdm2 svolge la propria attività di ubiquitina-ligasi E3 ed agevola la degradazione proteosomale di p53 sia nel nucleo che nel citoplasma (*Joseph et al., 2003*). La trascrizione del gene *Mdm2* è regolata dalla stessa p53 che agisce quindi nella propria regolazione tramite un "feed-back" negativo (*Barak et al., 1993*); in questo modo quando si innalza il livello intranucleare di p53 automaticamente ne viene rafforzata la via di degradazione. L'espressione di oncogeni quali *c-myc, ras* ed *E2F1*, può indurre la trascrizione del gene *arf* (*Kamijo et al., 1998; Honda e Yasuda, 1999*) il cui prodotto genico è un polipeptide capace di legare Mdm2 con un'affinità maggiore rispetto a p53 e quindi agisce bloccando la degradazione della proteina stessa (*Matlashewski, 1999*). Recentemente sono stati identificati altri cofattori che intervengono nella regolazione della proteina p53 che come Arf, sembrano esercitare la loro influenza su p53 agendo su Mdm2. Il cofattore PML, "ProMyelocytic Leukaemia", è il prodotto di un gene oncosoppressore ed è il componente essenziale di particolari strutture nucleari indicate come PML-NBs ("PML Nuclear Bodies") che si formano dopo il danneggiamento del DNA (*Bernardi et al., 2003*). PML forma dei complessi trimerici con Mdm2 prevenendo la degradazione di p53 (*Kurki et al., 2003*), e allo stesso tempo ne favorisce la fosforilazione della Ser20 (*Louria-Hayon et al., 2003*). Il gene *PML* è inoltre un gene "target"di p53, e ciò suggerisce che la stessa p53 possa intervenire mediante un "feedback" positivo nella regolazione di PML (*De Stanchina et al., 2004*). Sembra che l'inibizione della proteina p53 possa avvenire in condizioni fisiologiche anche in maniera indipendente dalla degradazione mediata da Mdm2. È stata infatti purificata e caratterizzata una proteina denominata *Parc* ("p53-associated, parking like cytoplasmatic protein"), presente nel citoplasma come parte di un grande complesso (≅1Mda) e strettamente associata con la proteina p53 (*Nikolaev et al., 2003*). Parc interagisce direttamente, tramite il suo N-terminale, con il C-terminale della p53. L'analisi della sequenza amminoacidica dimostra che Parc contiene alcuni domini comuni anche a proteine con attività di ubiquitina-ligasi. Tuttavia, sembra che la regolazione di p53 tramite questa strategia alternativa sia indipendente dall'ubiquitinazione, e Parc agisca piuttosto promuovendo il sequestro citoplasmatico di p53. È evidente quindi l'importanza di questa proteina come regolatrice della localizzazione intracellulare di p53, anche se resta da verificare la sua possibile interazione con Mdm2.

Quando una cellula viene sottoposta a stress genotossico, si ha la fosforilazione della p53 nella regione N-terminale e C-terminale e di conseguenza si destabilizza l'interazione tra la proteina e Mdm2. La fosforilazione, delle Ser15, Ser20 e Ser47 (*Wang et al., 2003*), avviene ad opera della chinasi ATM ("Ataxia Telangectasia Mutated") (oltre ad ATR, Chk1, Chk2) fondamentale nella segnalazione al "check-point" del danno indotto. Occorre però tenere presente il fatto che la fosforilazione indotta dal danno al DNA potrebbe non essere la pricipale via di attivazione della proteina p53 in seguito a stress genotossico; a sostegno di questa affermazione si può osservare una significativa riduzione del livello intracellulare di Mdm2, la cui funzione risulterebbe quindi avere un ruolo centrale nell'induzione di p53 in seguito al danneggiamento del DNA. In accordo con tale affermazione si può osservare come nei tumori non compaiano generalmente delle mutazioni nei siti di fosforilazione della proteina, e qualora siano presenti, tali mutazioni non inibiscono comunque la capacità del danno al DNA di attivare la proteina p53 (*Matlashewski, 1999*). Si crede sia possibile una modulazione temporale dell'azione di p53 basata sulla compartecipazione dei diversi meccanismi, che agirebbero quindi senza escludersi mutuamente. Uno stress genotossico, ad esempio, potrebbe indurre una rapida attivazione della p53 tramite fosforilazione seguita poi da una stabilizzazione a lungo termine della proteina mediata dall'espressione del gene *arf*, *PML* ed altri oncogeni.

SCOPO DELLA RICERCA

Il danno al DNA è una delle minacce più pericolose per l'omeostasi cellulare e, quindi, per la vita degli organismi. Difetti genetici che compromettono la risposta cellulare al danno al DNA portano generalmente ad instabilità genomica, ipersensibilità a specifici agenti danneggianti e predisposizione al cancro. Lo studio delle sindromi genetiche che manifestano queste anomalie, come per esempio lo Xeroderma Pigmentoso, l'Anemia di Fanconi e l'Ataxia Telangiectasia, è il sistema utilizzato dal mondo scientifico per cercare di comprendere i numerosi interrogativi che ancora circondano l'origine di queste malattie. Nel nostro studio abbiamo incentrato l'attenzione sulla sindrome Ataxia Telangiectasia (A-T). Gli aspetti clinici più importanti di questa malattia, causata da una mutazione

nel gene che codifica per ATM, sono la radiosensibilità dei tessuti (che comporta la predisposizione al cancro) e la neurodegenerazione. La proteina chinasi ATM gioca un ruolo essenziale nella risposta al danno al DNA perché è responsabile del propagarsi dell'allarme che annuncia la presenza di una delle lesioni al DNA più citotossiche: la rottura a doppia elica. Tuttavia, diverse caratteristiche del fenotipo clinico cellulare dell'A-T indicano che, oltre al conclamato difetto riguardante la risposta alle DSBs, le cellule A-T potrebbero essere continuamente soggette ad una situazione di stress ossidativo. In particolare, due sono i sintomi dell'A-T che suggeriscono una possibilità del genere: la neurodegenerazione e l'invecchiamento prematuro dei tessuti.
Il lavoro di questa tesi si propone di studiare la risposta al danno al DNA in cellule A-T trattando la questione sotto due diversi approcci: uno classico che va ad analizzare la risposta delle cellule A-T alle rotture a doppia elica indotte dalle radiazioni ionizzanti (raggi-x) e l'eventuale ruolo della proteina p53 (che opera sotto il diretto controllo di ATM) nella riparazione di queste lesioni ed un altro più attuale che studia la risposta di queste cellule ad un insulto ossidante. In questo contesto è stato saggiato anche l'effetto di un composto, la L-Carnitina, comparandolo con quello di un noto scavenger di radicali ossidrilici, il Mannitolo. Quali sono le implicazioni cliniche che potremmo trarre dal capire le basi molecolari del difetto che conduce all'Atassia Telangiectasia? Poiché la proteina ATM ha un ruolo centrale nel mantenere l'omeostasi cellulare se si riuscisse a capire bene il meccanismo di azione di questa proteina, otterremo informazioni addizionali riguardo la risposta al danno al DNA in cellule umane e si aprirebbero nuove frontiere per la comprensione ed il trattamento di malattie genetiche associate a difetti nella riparazione e che manifestano il grave sintomo della neurodegenerazione.

7. MATERIALI E METODI

Linee cellulari

Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti sono state ottenute dal Laboratorio di Medicina Sperimentale dell'Università La Sapienza di Roma. Esse sono:

FLEBV - linea di controllo "wild-type"

AT97RM - omozigote per la mutazione ATM (0% di proteina nativa)

AT21RM - omozigote per la mutazione ATM (32% di proteina nativa)

AT28RM - eterozigote composto per la mutazione ATM (0% di proteina nativa)

In Figura 7.a. sono mostrati i relativi siti di mutazione delle linee cellulari utilizzate.

Tutte le linee sono linfoblastoidi, ottenute cioè dalla trasformazione di linfociti con il virus Epstein-Bar (EBV).

Condizioni di crescita

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura in un terreno così costituito:

- terreno RPMI 1640
- 20% di siero fetale bovino inattivato (30 min a 56°C)
- 1% di L-Glutammina (2 mM)
- 1% di Penicillina (50 UI/ml) e Streptomicina (50 mg/ml)
- 1% di Gentamicina

Saltuariamente le colture cellulari vengono passate in terreno arricchito con vitamine, aminoacidi essenziali e aminoacidi non-essenziali. Poste in questi terreni di coltura, le linee cellulari crescono in sospensione e sono mantenute in incubatore a una temperatura di 37°C, in condizioni di saturazione di umidità e al 5% di CO_2. Le colture vengono suddivise regolarmente ogni due giorni alla concentrazione di 400.000 cellule per ml di terreno.

La durata del ciclo cellulare è, per le 3 linee, di circa 20 ore ed il numero modale dei cromosomi è 46.

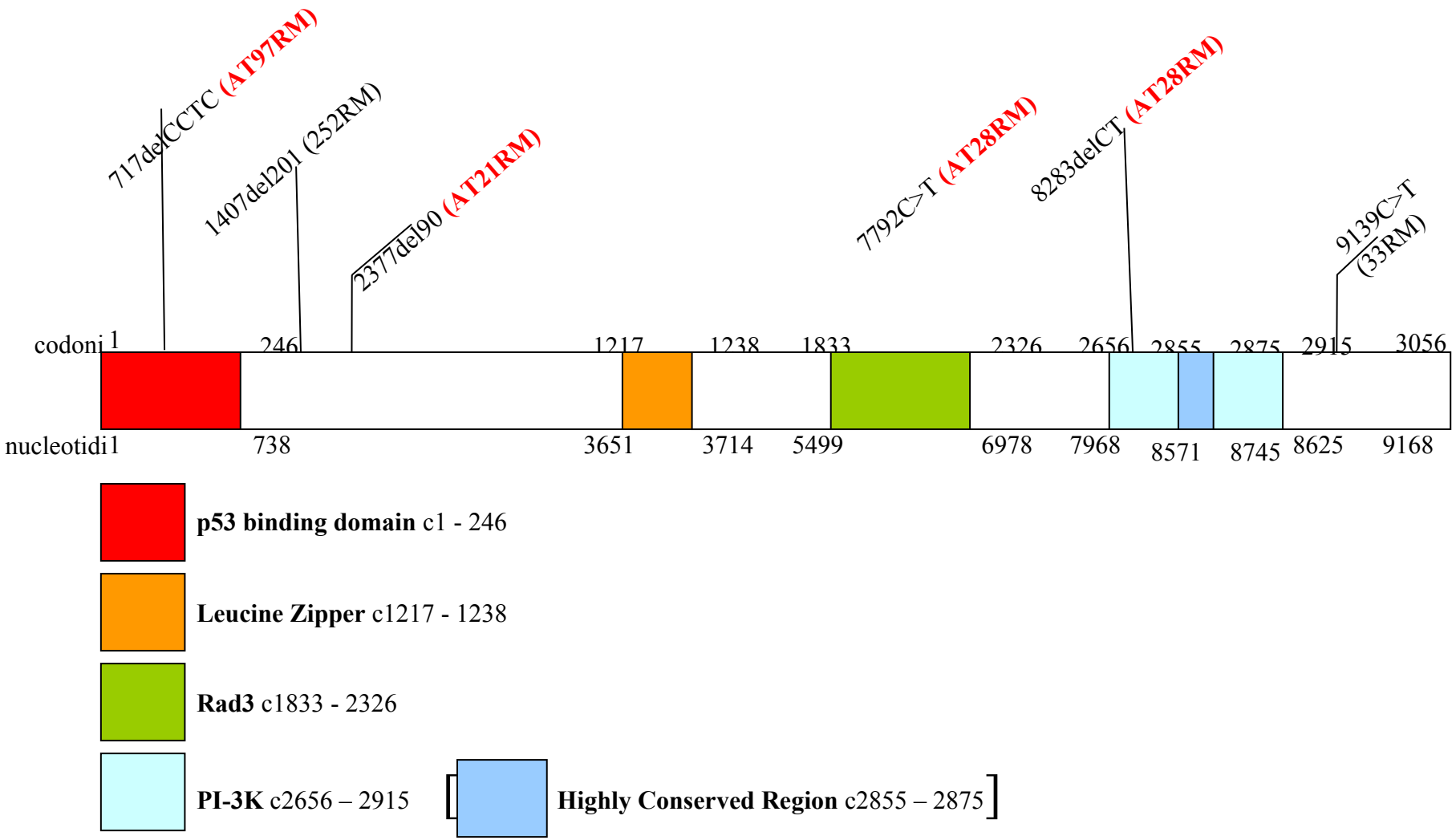


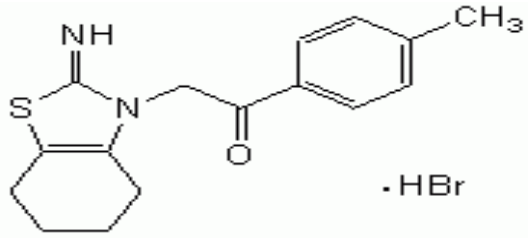
Figura 7.a. Localizzazione dei siti di mutazione delle linee linfoblastoidi A-T utilizzate per gli esperimenti

Reagenti chimici

5-Bromo-2-deossiuridina (BrdUrd) (Sigma) : è un analogo di base della timina. E' stata disciolta in acqua distillata ad una concentrazione di 300 mg/ml. Viene usata alla concentrazione finale di 6 μg/ml ed è conservata a –20° fino al momento dell'uso.

Colcemid (Sigma) : blocca la polimerizzazione della tubulina e quindi inibisce la formazione delle fibre del fuso mitotico. Si aggiunge alle colture cellulari 3/4 ore prima di iniziare il fissaggio. Viene usato alla concentrazione finale di 0.2 μg/ml. È conservato a +4° fino al momento dell'uso.

Pifithrin-a (PFT-a) (Calbiochem) : 2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-*p*-tolylethanone-HBr è un inibitore chimico di p53 permeabile alle cellule. Inibisce in modo reversibile la trans-attivazione p53-dipendente di geni che rispondono a p53 e blocca reversibilmente l'apoptosi p53 dipendente. (*Komarov et al., 1999*). Inibisce l'arresto della proliferazione p53 dipendente in risposta al danno al DNA, e non ha effetto sui fibroblasti deficienti per p53. Protegge i tessuti sani dall'effetto deleterio della chemioterapia. Tale composto è stato disciolto in DMSO alla concentrazione madre di 27,2 mM ed è stato aggiunto alle colture di linfociti alla dose di 30 μM. Nella figura sottostante è riportata la struttura della molecola della PFT-α.



L-Carnitina (L-C) (Sigma) : gentilmente fornita dalla Sigma-Tau. Disciolta in Ham's F10, mantenuta a -20°C fino al momento dell'uso alla concentrazione finale di 5 mM.

Mannitolo (Mann) (Sigma) : disciolto in acqua distillata sterile e mantenuto a -20°C fino al momento dell'uso alla concentrazione finale di 1 mM.

t-Butyl-idroperossido (t-Butyl-OOH) (Sigma) : disciolto in acqua distillata sterile prima dell'uso (per dosi vedi paragrafo seguente).

Trattamento delle colture cellulari

Danno da radiazioni. L'esposizione ai raggi-x è stata eseguita a 37° C con una macchina "Gilardoni MGL 200/8D" operante a 250 Kvp e 6 mA ("dose rate" 60 cGy/min).

Le linee cellulari sono state irradiate alle seguenti dosi:

- linea **FLEBV**: (comet assay) 5 Gy; (ab.cr. G_2) 0.5 Gy; (ab.cr. G_1) 3 Gy.

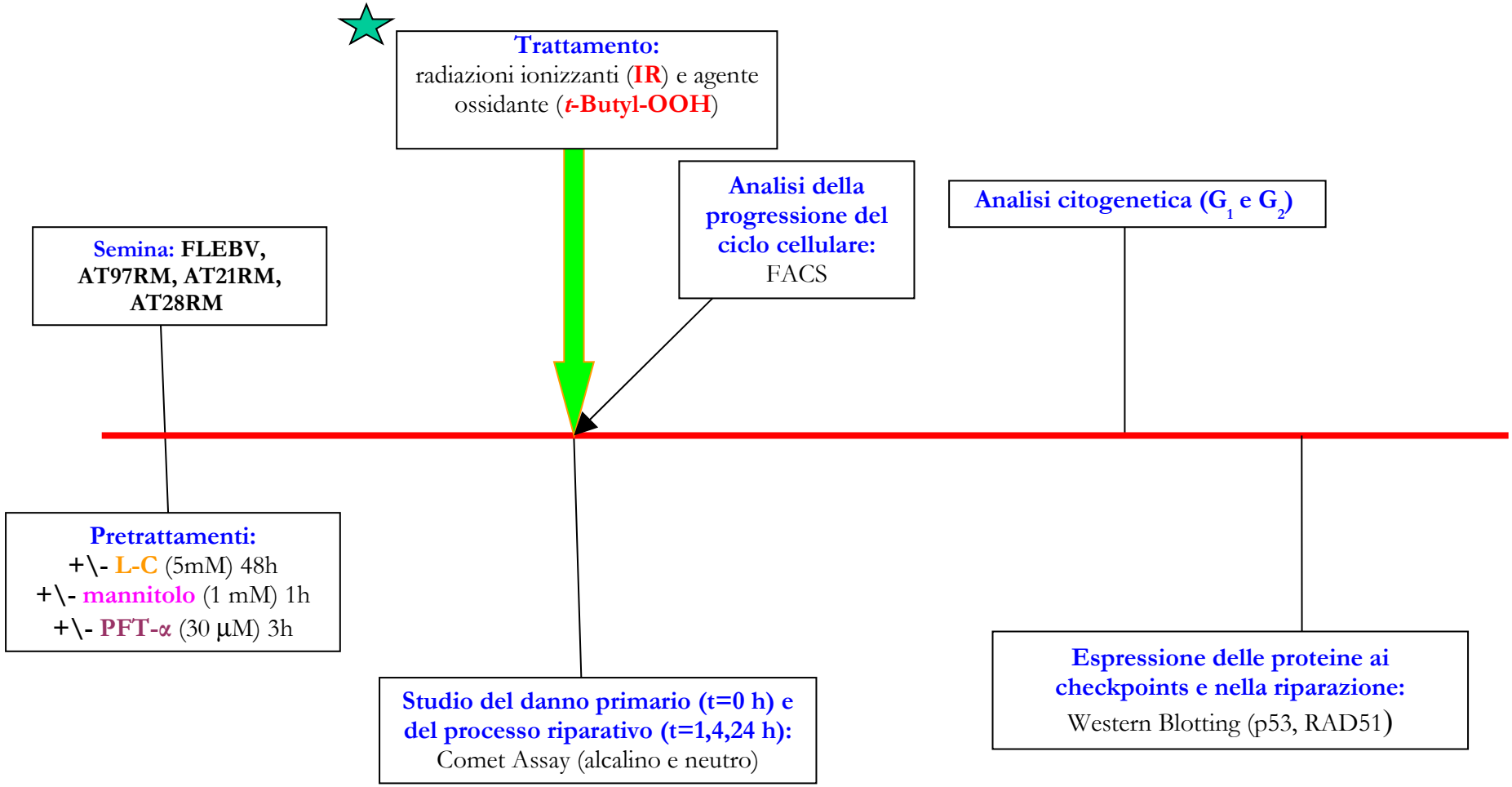
- linee **A-T**: (comet assay) 2.5 Gy; (ab.cr. G_2) 0.25 e 0.5 Gy; (ab.cr. G_1) 1 Gy.

Danno ossidativo. L'agente ossidante (*t*-Butyl-OOH) è stato aggiunto alle colture cellulari (e lasciato nelle stesse per un'ora) alle seguenti concentrazioni finali:

- linea **FLEBV**: (comet assay) 500 μM; (ab.cr. G_2) 200 μM; (ab.cr. G_1) 500 μM.
- linee **A-T**: (comet assay) 500 mM; (ab.cr. G_2) 200 mM; (ab.cr. G_1) 500 mM.

Protocollo sperimentale generale

In Figura 7.b. è raffigurato il protocollo sperimentale seguito per gli esperimenti.
Prima della semina le cellule vengono contate con la camera di Burker e quindi seminate ad una concentrazioni di 500.000/ml per punto sperimentale in 5 ml di terreno di coltura.
Tre ore prima dell'irradiazione con raggi-x ai campioni designati è stata aggiunta la PFT-α. Un'ora prima del trattamento con l'agente ossidante *t*-Butyl-OOH abbiamo aggiunto il Mannitolo nei campioni designati. La L-Carnitina è stata aggiunta 48 ore prima del *t*-Butyl-OOH. Alla fine dei trattamenti con radiazioni e *t*-Butyl-OOH, le colture sono state lavate 2 volte con PBS al fine di rimuovere la presenza di tutte le sostanze aggiunte.
Le cellule sono così trasferite in terreno fresco a cui viene aggiunta 5-bromo-2-deossiuridina, che essendo incorporata nel DNA al posto della timina durante la sintesi e ci permetterà di ottenere, mediante la tecnica di colorazione "Fluorocromo più Giemsa" (*Perry e Wolff, 1974*) una colorazione diversa del filamento di DNA bisostituito rispetto al filamento monosostituito con BrdUrd, grazie alla quale è possibile stabilire il numero di cicli cellulari che intercorrono tra il trattamento e l'analisi dei cromosomi. Nei campioni destinati allo studio delle aberrazioni cromosomiche in fase G_2 il colcemid è stato aggiunto 30 min dopo la fine dei trattamenti con radiazioni o *t*-Butyl-OOH; trascorse 2,5 ore le colture sono state fissate. Nei campioni destinati allo studio delle aberrazioni cromosomiche in fase G_1 il colcemid è stato aggiunto 3 ore prima del fissaggio (24 e 48 ore dalla fine dei trattamenti).
I campioni destinati al "comet assay" sono stati processati a vari tempi di recupero (0, 1, 4, 24 ore) dopo la fine dei trattamenti con radiazioni o *t*-Butyl-OOH.
Per l'analisi del ciclo cellulare al FACS le colture cellulari sono state processate immediatamente dopo la fine dei pre-trattamenti con L-Carnitina e Mannitolo.



***t*-Butyl-OOH**: debolmente idrolizzato dalla catalasi *(Winston et al.,1983)*. Attività della catalasi ridotta in cellule A-T *(Watters et al., 1999)*.

Figura 7.b. PROTOCOLLO SPERIMENTALE GENERALE

Fissaggio ed allestimento dei preparati per l'analisi citogenetica

Le cellule vengono fissate con il seguente protocollo:

Si trasferiscono le colture con una pipetta in tubi da centrifuga e si esegue una centrifugazione a 1200 per 7 minuti. Si aspira il sopranatante e si risospende il "pellet". Si aggiungono 5 ml di soluzione ipotonica (KCl 0.075 M) in ogni tubo, facendo cadere la soluzione goccia a goccia, sul vortex. Ora si trasferiscono i tubi in un bagnetto posto a 37°C e lì si lasciano per circa 10 minuti. Si esegue poi il primo passaggio in 5 ml di fissativo 3:1 (metanolo:acido acetico), aggiunto goccia a goccia direttamente sopra l'ipotonica fino a progressivo riempimento dei tubi. Si tappano e si capovolgono le colture più volte. Le cellule ora vengono poste in frigorifero a +4° e conservate fino al giorno dopo. Il giorno seguente, dopo aver centrifugato (1200 per 8 min), aspirato il sopranatante e risospeso il pellet, si aggiungono 5 ml di fissativo 1:1 (metanolo:acido acetico) e si centrifuga ancora (1200/8 min). Si eseguono ora altri due passaggi in fissativo 3:1 (1200/10 min) e quindi si può procedere per la semina su vetrini preventivamente lavati con acqua corrente e conservati a +4° in una soluzione di acqua distillata:metanolo in rapporto 1:1. Prima della semina si effettua un'altra centrifugazione per eliminare il fissativo in eccesso. Il pellet può ora essere risospeso nel fissativo, in modo da raggiungere in ogni tubo la adeguata concentrazione cellulare per la semina. La sospensione finale di cellule viene fatta cadere dall'alto sui vetrini bagnati, goccia a goccia. I vetrini vanno quindi lasciati asciugare all'aria e fatti invecchiare per 2 giorni prima di procedere alla colorazione.

Colorazione dei vetrini

Per la colorazione dei vetrini viene usata la tecnica del "Fluorocromo più Giemsa". Questa tecnica si basa sulla capacità della BrdUrd di ridurre la fluorescenza del fluorocromo Hoechst 33258 ottenendo quindi la fluorescenza dei cromatidi privi di BrdUrd e l'opacità dei cromatidi che l'hanno incorporata. La metodica consiste nell'immergere orizzontalmente i vetrini in una soluzione acquosa al 2% di Hoechts 33258 per 30 minuti. Subito dopo i vetrini vengono trasferiti in acqua distillata ed esposti per 30 minuti alla luce di una lampada solare Osram (300 Watt). Quindi i vetrini vanno colorati con una soluzione di Giemsa al 3% nella quale vanno immersi e lasciati per 7 minuti. Infine vanno lavati in acqua di fonte per 2-3 volte e lasciati asciugare all'aria.

Analisi: I preparati ora sono pronti per essere esaminati al microscopio ottico. L'analisi consiste nella lettura delle aberrazioni cromosomiche trovate in 100 metafasi per punto sperimentale, utilizzando l'obiettivo 100x ad immersione in olio.

Analisi del ciclo cellulare al FACS

Ai tempi stabiliti si prelevano 1 x 10^6 cellule dalle colture, si ripongono nei tubi e si esegue un lavaggio in PBS (2 ml). Si fissano poi le cellule con una soluzione 1:1 di metanolo freddo e PBS (2 ml) e si ripongono le sospensioni cellulari in frigo a –20° C per una notte. Il giorno dopo si centrifugano i campioni (1800 rpm per 5 min), si permeabilizzano le cellule con una soluzione allo 0,1% di Triton-X-100 in PBS per 1 ora a T_{amb}. Effettuato un altro lavaggio in PBS si aggiunge 1 ml di soluzione di ioduro di propidio (1 mg/ml) e RNAsi (0.5 mg/ml) in PBS e si lasciano incubare i tubi per 30 minuti a +4° C. I campioni sono pronti per l'analisi al FACS.

Comet assay alcalino e neutro

Il comet assay (single-cell gel electrophoresis) è una metodica in cui si applica la tecnica dell'elettroforesi su gel di agarosio alle singole cellule. Il saggio delle comete ci consente di distinguere le cellule sane da quelle che presentano danno primario al DNA.
Come prima cosa si deve trattare la sospensione cellulare con un buffer di lisi per facilitare la fuoriuscita del DNA durante la corsa elettroforetica altrimenti impedita dalle membrane. In questo passaggio le cellule sono già state stratificate su un vetrino e sono protette dall'agarosio che ne impedisce la completa degradazione. Il voltaggio applicato ed i tempi della corsa fanno in modo che il DNA migri dal nucleo verso l'anodo , portando alla conseguente formazione delle "comete" munite di una testa (nucleo contenente frammenti di DNA troppo grandi per migrare nel gel) e di una coda (costituita da DNA rotto e fuoriuscito).
Il saggio consente due varianti:
a) ci consente di osservare code abbastanza grandi con DNA altamente frammentato, questo grazie a condizioni di lisi blanda che insieme alla breve corsa (4 minuti) favoriscono la fuoriuscita di frammenti di basso peso molecolare. In questo modo è possibile osservare anche i corpi apoptotici.
b) l'altra, con tempi di corsa più lunghi (15 minuti) e condizioni di lisi più stringenti, causa non solo la dispersione dei piccoli frammenti, ma anche la fuoriuscita dal nucleo di DNA ad alto peso molecolare.

Procedura

Per ogni punto sperimentale e per ogni tempo di prelievo, sono stati raccolti 20 µl di terreno contenenti circa 2x10^4 cellule e sono stati mescolati a 75 µl di agarosio 0.75% a bassa temperatura di fusione (low-melting). Successivamente, 60 µl della risultante sospensione cellulare vengono stratificati su un vetrino precedentemente ricoperto con agarosio allo 0,3%. Poiché gli studi condotti nel nostro laboratorio vertono

principalmente sulla formazione delle aberrazioni cromosomiche abbiamo utilizzato il metodo b, con il quale escono dal nucleo frammenti di DNA ad alto peso molecolare.Disposti quindi i vetrini su un supporto, si immergono in una "soluzione di lisi" la cui composizione varia come di seguito riportato a seconda se stiamo trattando i campioni per il comet alcalino o neutro:

- *comet alcalino*: 0,5% Natrium lauryl-sarcosinate, 1 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,03 M NaOH, pH 10 (prima dell'immersione aggiungere anche 10% di DMSO e 1% di Triton-X-100)
- *comet neutro*: 1% Natrium lauryl-sarcosinate, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 9,5 (prima dell'immersione aggiungere anche 10% di DMSO e 1% di Triton-X-100)

e vengono quindi incubati a +4°C per 2 ore. Dopo la lisi si dispongono i vetrini nella camera elettroforetica riempita con buffer di corsa così costituito:

- *comet alcalino*: 1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH 13
- *comet neutro*: 300 mM sodium acetate, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3

e si lasciano denaturare per 15 minuti (il DNA si srotola).
Per il comet in condizioni alcaline la corsa viene effettuata per 20 min a 26 V e 300 mA; per il comet neutro la corsa dura 1 ora a 14 V e 12 mA. Terminata la corsa, si neutralizzano i vetrini con una soluzione 0,4 M Tris-HCl (pH 7,5). Si esegue poi un fissaggio con metanolo a temperatura ambiente per 5 minuti e si lasciano asciugare i vetrini all'aria. Quindi si effettua una colorazione dei campioni con bromuro di etidio 10 μg/ml in PBS che ci permette di poter valutare i campioni mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza e di un computer dotato del software "Comet assay III" che quantifica il danno primario al DNA presente nelle singole cellule utilizzando un parametro definito "tail moment". Questo parametro introdotto da *Olive P.L.* nel 1990 mette in relazione la lunghezza della coda e la % di DNA migrato. Il software lo misura effettuando il prodotto tra la distanza percorsa dal DNA (lunghezza della coda) e la quantità di DNA presente nella coda (intensità della coda). In Figura 7.c. è riportato un esempio di cometa visualizzata al computer.

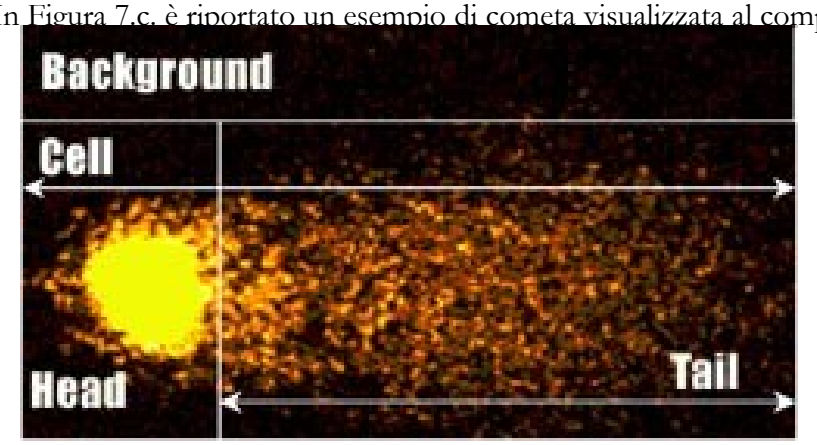


Figura 7.c. Esempio di cellula con DNA altamente danneggiato, visualizzata con il comet assay

Western blotting (SDS page)

Dopo l'irradiazione le cellule processate con il western blotting sono state lavate una volta in PBS e lisate in RIPA buffer (1% Igepal, 1% Na-deossicolato, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Na-fluoride, 100 U/ml aprotinina) per 25-30 minuti in ghiaccio. I campioni vengono poi centrifugati a 11000 rpm per 10 min a +4°C. La concentrazione delle proteine nei campioni, contenute nel sovranatante, è stata misurata mediante la costruzione di una retta di taratura con BSA ottenuta tramite un saggio spettrofotometrico con il metodo Bradford. 40 μg di proteine sono stati caricati nei pozzetti (con loading buffer 4X) di un 4-12% Novex Tris-Glicine gel (Invitrogen). In un pozzetto è stato caricato il marker (Benchmark Prestained protein ladder, Invitrogen). La camera elettroforetica (Sure Lock, Invitrogen) è stata riempita con Tris-Glycine-SDS buffer (250 mM Tris-HCl, 1.92 M Glicina, 1% SDS, pH 8.3). La corsa è stata condotta a 35 mA e 150 V per 2-3 ore. A fine corsa il gel viene montato su un supporto adatto (Blot Module, Invitrogen), e si procede al trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa. Per fare questo la camera elettroforetica viene riempita con Tris-Glycine Transfer buffer (315 mM Tris-HCl, 2.4 Glicina, 20% metanolo) e si esegue l'elettroforesi a 150 mA e 30 V per 2 ore. Si procede ora al bloccaggio delle proteine immergendo la membrana per un'ora nella "blocking solution" (5% di not-fat dried milk in TBST: 1 M Tris-HCl, 5 M NaCl and 0.05% Tween-20, pH 7.6). Si immerge quindi la membrana in una soluzione 1:500 di anticorpo primario in milk e si lascia incubare overnight a +4°C. Per p53 abbiamo usato l'anticorpo "anti-mouse DO-1" (Santa Cruz); per RAD51 abbiamo usato un "anti-rabbit RAD51" (Sigma) Si eseguono 3 lavaggi in TBST e poi si procede all'incubazione per un'ora della membrana con l'anticorpo secondario (1:10000) coniugato con la perossidasi. Si eseguono ancora 2 lavaggi in TBST ed uno in TBS (per eliminare l'eccesso di Tween-20) e si procede con lo sviluppo della lastra fotografica usando il "Western Blotting detection reagents kit" (Amersham). L'avvenuta reazione antigene-anticorpo è segnalata dalla formazione di una banda di colore nero sulla lastra fotografica, dalla cui intensità si ricava la quantità di espressione della proteina in esame.

8. RISULTATI

Abbiamo scelto di presentare i risultati ottenuti dividendoli in due sezioni che rispecchiano rispettivamente gli approcci usati in questa tesi per cercare di comprendere le basi molecolari e cellulari del difetto che conduce all'Atassia Telangiectasia (A-T). Il sistema cellulare da noi utilizzato è costituito da quattro linee cellulari linfoblastoidi: tre linee A-T (caratterizzate da diverse mutazioni nel gene *ATM*) ed una linea wild-type di controllo. E' noto che cellule derivanti da pazienti affetti da A-T sono difettive nella risposta alle rotture a doppia elica (DSBs) *(Rotman e Shiloh, 1999)*. **Nella prima parte** *(a)* presentiamo quindi i risultati ottenuti effettuando esperimenti con radiazioni ionizzanti (IR) per analizzare la correlazione tra rotture a doppia elica indotte al DNA, velocità di riparazione di queste lesioni, formazione di aberrazioni cromosomiche nelle fasi G_2 e G_1, ed espressione di proteine implicate nel processo di riparazione e nei checkpoints del ciclo cellulare. Per decifrare il ruolo della proteina p53 in questi processi in linee A-T, abbiamo utilizzato un inibitore sintetico della proteina p53, la pifitrina-α (PFT-α) e ne abbiamo analizzato l'effetto anche tramite western blotting. Tuttavia, le IR e gli agenti radiomimetici, oltre ad indurre danno primario alla doppia elica sotto forma di DSBs, generano radicali liberi dell'ossigeno e loro sottoprodotti collettivamente chiamati ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno). Le specie reattive più conosciute sono l'anione superossido (O_2^-), il radicale ossidrilico (OH^-) e l'acqua ossigenata (H_2O_2). I ROS danneggiano il DNA dando vita soprattutto a SSBs (rotture a singola elica) e all'ossidazione dei residui di guanosina. Recentemente *Rotman* e *Shiloh*, due ricercatori impegnati a cercare di risolvere i numerosi interrogativi che ancora riguardano la funzione della proteina ATM, si chiesero se essa, in qualche modo, potesse intervenire in risposta a situazioni di stress ossidativo per la cellula. Questi ricercatori arrivarono alla conclusione che ATM agisce da sensore di danno ossidativo. Eseguendo esperimenti usando degli antiossidanti si potrebbe arrivare a chiarire il contributo che hanno i ROS nella attivazione delle pathways di risposta al danno ossidativo in cellule A-T. In questa problematica si inserisce il **secondo set di esperimenti** *(b)* in cui abbiamo saggiato la risposta delle cellule A-T ad un agente ossidante il *tert*-Butyl-idroperossido (*t*-Butyl-OOH) sempre in termini di velocità di riparazione delle lesioni e di induzione di aberrazioni cromosomiche nelle fasi G_2 e G_1 del ciclo cellulare. Per ognuno di questi parametri è stato saggiato l'effetto della L-Carnitina *(β-hydroxy-γ-trimethyl-ammoniumbutyric acid)* comparandolo con quello del Mannitolo, un noto scavenger di radicali liberi ossidrilici *(Regoli e Winston, 1999)*. Poiché in cellule difettive per ATM l'attività catalasica sembra non essere perfettamente funzionante *(Watters et al. 1999)*, abbiamo scelto come sorgente di danno ossidativo il *t*-Butyl-OOH che, essendo debolmente idrolizzato dalla catalasi *(Winston et al. 1983)*, ci

permette di evitare l'introduzione di errori sperimentali dovuti a questa differenza tra cellule normali e cellule A-T.

a.1.) Analisi della riparazione delle rotture a doppia elica in cellule A-T mediante comet neutro.

La tecnica del comet assay in condizioni di pH neutro ci permette di rilevare le DSBs indotte dalla radiazione analizzando al microscopio a fluorescenza singole cellule sottoposte ad elettroforesi. Le SSBs non vengono rilevate con questa tecnica, perciò non influenzano la misurazione del danno al DNA (espresso dal mean tail moment).
Nel Grafico 8.a. sono riportati i dati relativi allo studio del mean tail moment (mtm) in seguito ad irradiazione con raggi-x nelle tre linee difettive per ATM e nella linea wild-type. In particolare abbiamo analizzato la riparazione delle lesioni esprimendola come "percentuale di riduzione del mean tail moment". Questo parametro è stato calcolato sottraendo il valore del mtm ottenuto ai tempi di recupero successivi (1h, 4h, 24h) dal valore del mtm ottenuto al tempo di recupero 0h, e dividendo il risultato per il valore del mtm ottenuto al tempo 0h. Dal Grafico si può vedere come, nelle linee A-T, la percentuale di riduzione del mtm rimane bassa anche a tempi mediamente lunghi dopo l'irradiazione (4 ore) mentre nella linea di controllo, allo stesso tempo di recupero, questa percentuale raggiunge già il 91% pur essendo stata irradiata con una dose di raggi-x doppiamente efficace. Due delle tre linee cellulari A-T, mostrano una riduzione del mean tail moment vicina al 60-70% soltanto passate 24 ore dal trattamento. Invece, la linea cellulare AT97RM (recante una mutazione nel dominio di legame di ATM con p53) mostra una percentuale di riduzione del mean tail moment inferiore al 35% anche dopo 24 ore dal trattamento.

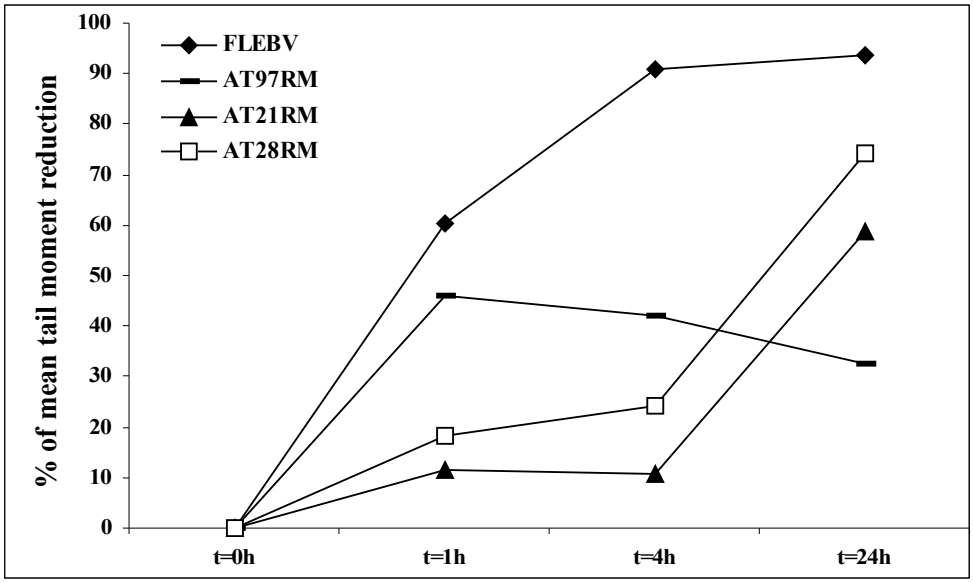


Grafico 8.a. Capacità riparativa delle lesioni indotte dai raggi-x, espressa come percentuale di riduzione del mean tail moment , nel wild-type e nelle tre linee A-T

a.2.) Effetto della PFT-a sulla riparazione delle rotture a doppia elica in cellule A-T.

Nella Tabella 8.b. ed in Figura 8.c. sono riportati i risultati relativi allo studio del tail moment dopo irradiazione con raggi-x in presenza ed in assenza della PFT-α (un' inibitore sintetico della proteina p53) nelle 3 linee difettive per ATM e nella linea wild-type. Appare evidente che il pre-trattamento con la PFT-α da solo non influenza i valori basali del mean tail moment poiché questi appaiono molto simili a quelli di controllo (k). Nella linea di controllo (FLEBV) abbiamo riscontrato che i valori dei mean tail moment dei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni sono risultati essere sempre maggiori dei valori dei mean tail moment osservati nei campioni solo irradiati. Questo fenomeno è risultato statisticamente significativo ($p<0.01$) prendendo in considerazione tutti i tempi di recupero analizzati (t=0, 1, 4, 24 ore). Nelle linee A-T, abbiamo osservato due risultati differenti in seguito a co-trattamento con PFT-α e radiazioni. Le linee AT21RM ed AT28RM mostrano un andamento del mean tail moment simile a quello riscontrato nella linea di controllo (ossia il mean tail moment risulta maggiore nei campioni co-trattati con l'inibitore della p53 a tutti i tempi di recupero), ma l'aumento del mean tail moment nei campioni co-trattati con PFT-α diventa significativo a tempi di recupero successivi al t=1. Nella linea AT97RM, invece, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa in termini di mtm tra i campioni co-trattati con l'inibitore della p53 rispetto ai campioni solamente irradiati a nessun tempo di recupero. Nei campioni recuperati 24 ore dopo l'irradiazione la significatività viene addirittura invertita rispetto a quella osservata per tutte le altre linee cellulari: il mean tail moment dei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni risulta minore di quello dei campioni solamente irradiati ($p<0.01$).

Cell line	Treatment	Recovery time	Mean tail moment ±SE	t^sp	Cell line	Treatment	Recovery time	Mean tail moment ±SE	t^sp
FLEBV	***k***	t=0h	0.63 ±0.07		**AT97RM**	***k***	t=0h	0.85 ±0.1	
	PFT-α		0.6 ±0.06			**PFT-α**		1.03 ±0.15	
	5 Gy-X-rays	t=0h	9.78 ±0.57	**[1]		**2.5 Gy-X-rays**	t=0h	9.71 ±0.49	**[1]
	5 Gy+PFT- α		14.24 ±0.45	**[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		8.88 ±0.84	
	5 Gy-X-rays	t=1h	3.87 ±0.4			**2.5 Gy-X-rays**	t=1h	5.24 ±0.53	
	5 Gy+PFT- α		7.43 ±0.77	**[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		4.36 ±0.44	
	5 Gy-X-rays	t=4h	0.88 ±0.09			**2.5 Gy-X-rays**	t=4h	5.62 ±1.45	
	5 Gy+PFT- α		4.05 ±0.8	**[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		4.32 ±0.75	
	5 Gy-X-rays	t=24h	0.61 ±0.09			**2.5 Gy-X-rays**	t=24h	6.53 ±0.52	
	5 Gy+PFT- α		4.32 ±0.46	**[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		2.77 ±0.24	**[§]
AT21RM	***k***	t=0h	1.39 ±0.15		**AT28RM**	***k***	t=0h	0.62 ±0.08	
	PFT-α		1.28 ±0.16			**PFT-α**		1.10 ±0.13	
	2.5 Gy-X-rays	t=0h	6.02 ±0.35	**[1]		**2.5 Gy-X-rays**	t=0h	8.38 ±0.4	**[1]
	2.5 Gy+PFT- α		7.24 ±0.43			**2.5 Gy+PFT- α**		9.19 ±0.41	
	2.5 Gy-X-rays	t=1h	5.32 ±0.31			**2.5 Gy-X-rays**	t=1h	6.85 ±0.56	
	2.5 Gy+PFT- α		8.02 ±0.52	*[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		12.98 ±0.46	**[§]
	2.5 Gy-X-rays	t=4h	5.38 ±0.32			**2.5 Gy-X-rays**	t=4h	6.34 ±0.45	
	2.5 Gy+PFT- α		10.80 ±0.54	**[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		8.53 ±0.63	*[§]
	2.5 Gy-X-rays	t=24h	2.49 ±0.18			**2.5 Gy-X-rays**	t=24h	2.16 ±0.17	
	2.5 Gy+PFT- α		3.94 ±0.23	*[§]		**2.5 Gy+PFT- α**		3.80 ±0.19	*[§]

Tabella 8.b. Effetto del pre-trattamento con PFT-α sui valori del mean tail moment ottenuti a differenti tempi di recupero dopo l'irradiazione nella linea wild-type e nelle linee A-T. 100 cellule sono state analizzate in ciascuno dei due esperimenti eseguiti. k=controllo; t^sp=test t-student; [1]=significatività Gy vs. controllo; [§]=significatività Gy+PFT-α vs. Gy; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard.

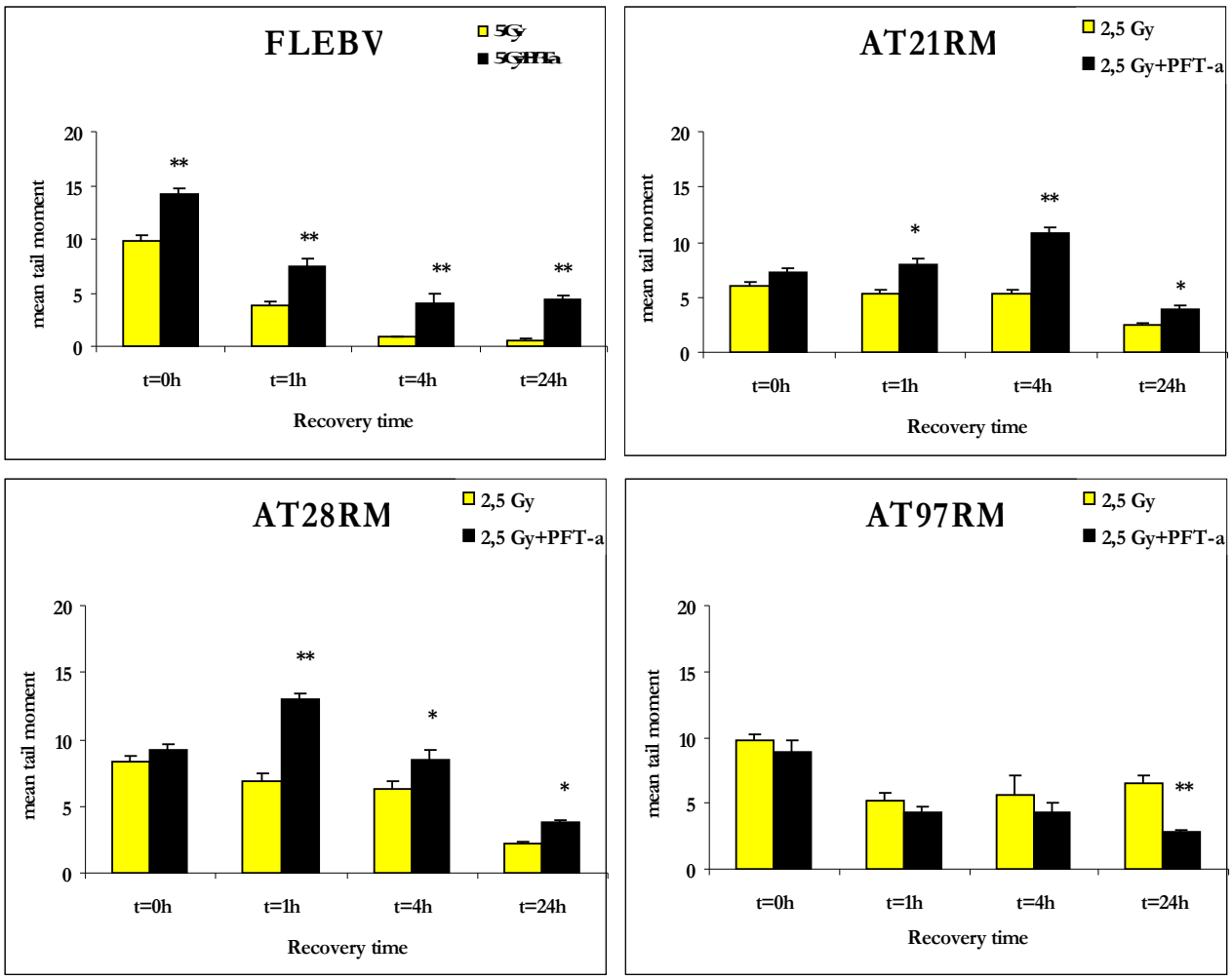


Figura 8.c. Effetto della PFT-α sulla riparazione delle DSBs indotte dalle radiazioni nel wild-type e nelle linee A-T. *=p<0.05; **=p<0.01 t-student test

a.3.) Analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_2 del ciclo cellulare dopo irradiazione in presenza ed in assenza della PFT-a. Analisi dell'indice mitotico.

In Tabella 8.d. sono riportati i risultati ottenuti dallo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_2 del ciclo cellulare dalla radiazione ionizzante in presenza ed in assenza dell'inibitore della p53, PFT-α. La presenza di delezioni cromatidiche è risultata preponderante rispetto agli altri tipi di aberrazione, come era da aspettarsi da uno studio sull'induzione di aberrazioni nella fase G_2 del ciclo, sia nella linea wild-type che nelle 3 linee difettive per ATM. Come nel caso dello studio del mean tail moment, anche in questo caso appare evidente che il pre-trattamento con la PFT-α da solo non influenza i valori basali né della percentuale di cellule aberrate né della presenza di aberrazioni per cellula poiché questi appaiono molto simili a quelli di controllo (k). Le linee difettive per ATM

hanno mostrato un danno citogenetico maggiore rispetto alla linea wild-type anche ad una dose di raggi-x meno efficace. Infatti a 0.25 Gy le linee A-T mostrano sia una percentuale di cellule aberrate che una frequenza di aberrazioni per cellula più alta rispetto alla linea wild-type irradiata ad una dose di 0.5 Gy. Inoltre, tra le linee A-T, la linea AT97RM è risultata la più sensibile alla radiazione, mostrando una frequenza di aberrazioni per cellula di 1.65 a 0.25 Gy e di 2.54 a 0.5 Gy. In questa linea, la percentuale di cellule aberrate dopo irradiazione con 0.5 Gy si avvicina al 90% e l'induzione di rotture è 5 volte maggiore rispetto al wild-type.

In seguito a co-trattamento con PFT-α e radiazioni abbiamo riscontrato un aumento significativo delle rotture cromatidiche in tutte le linee analizzate tranne che nella linea AT97RM dove abbiamo osservato una diminuzione significativa delle delezioni. Ossia, nei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni, le linee AT21RM e AT28RM mostrano un andamento simile a quello della linea di controllo (FLEBV), mentre la linea AT97RM mostra un andamento inverso ma, allo stesso modo, significativo.

I valori dell'indice mitotico osservati allo stesso tempo di recupero mostrano che l'irradiazione con raggi-x ha diminuito la percentuale (%) di mitosi rispetto alle interfasi nel campione irradiato soltanto nella linea wild-type. Non si osservano cambiamenti nella % di mitosi nei campioni irradiati e co-trattati con PFT-α. In tutte le linee A-T, invece, non si osservano variazioni significative dell'indice mitotico in seguito a radiazione rispetto ai valori di controllo. Anche nelle linee A-T la percentuale di mitosi non cambia significativamente in seguito a co-trattamento con PFT-α

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	MI+SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.			
FLEBV	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	8.8±0.9
	200	PFT-α	1±0	/	1±0	0	0	0	1±0	/	7.7±0.1
	200	0.5 Gy-X-rays	41.5±1.5	**[1]	42±2	3.5±0.5	3.5±1.5	0	49±4	**[1]	2.2±0.8
	200	0.5 Gy+PFT- α	57±2	*[§]	81.5±1.5	2.5±0.5	8.5±1.5	0	92.5±3.5	**[§]	2.3±0.9
AT97RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	8.6±0.3
	200	PFT-α	2.5±0.5	/	2.5±0.5	0	0	0	2.5±0.5	/	7.9±0.4
	200	0.25 Gy-X-rays	85.4±2.5	**[1]	163.5±1.5	1.5±0.5	1.5±0.5	0	166±0.5	**[1]	6.65±1.2
	200	0.25 Gy+PFT- α	75.5±1.5	/	122±7	0	0	0	122±7	**[§]	8.3±0.7
	200	0.5 Gy-X-rays	88±1	**[1]	246.5±4.5	3±2	5.5±1.5	0	250±0	**[1]	5.8±0.9
	200	0.5 Gy+PFT- α	82.5±2.5	/	178±5	4.5±0.5	5.5±1.5	0	188±4	**[§]	5.1±0.9
AT21RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	9.1±0.5
	200	PFT-α	1±0	/	0	0	1±0	0	1±0	/	8.1±0.7
	200	0.25 Gy-X-rays	60.5±2.5	**[1]	61±3	0	2.5±0.5	0	63.5±3.5	**[1]	8.3±0.4
	200	0.25 Gy+PFT- α	61.5±0.5	/	97.5±4.5	0	0.5±0.5	0	98±5	**[§]	7.1±0.9
	200	0.5 Gy-X-rays	62.5±2.5	**[1]	109.5±9.5	0.5±0.5	3±1	0	118±0.04	**[1]	9.4±0.2
	200	0.5 Gy+PFT- α	70.5±6.5	/	135±3	0	1.5±0.5	0	136.5±3.5	*[§]	8±0.4
AT28RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	10.5±0.8
	200	PFT-α	3±0	/	2±0	0	1±0	0	3±0	/	7.5±0.1
	200	0.25 Gy-X-rays	60±1	**[1]	75±4	0	1.5±0.5	0	76.5±4.5	**[1]	6.89±1.1
	200	0.25 Gy+PFT- α	76±3	*[§]	136.5±4.5	0	0	0	136.5±4.5	**[§]	8.1±0.7
	200	0.5 Gy-X-rays	80.5±4.5	**[1]	106.5±3.5	0	2.5±1.5	0	109±2	**[1]	5.8±0.4
	200	0.5 Gy+PFT- α	89.5±0.5	/	197.5±7.5	0	0	0	197.5±7.5	**[§]	6±0.3

Tabella 8.d. Effetto del pre-trattamento con PFT-α sulle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni nella fase G_2 del ciclo cellulare nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; [1]=significatività Gy vs. controllo; [§]=significatività Gy+PFT-α vs. Gy; *=p<0.05; **=p<0.01; Bks.=breaks; Exch.=exchanges; SE=errore standard; MI=indice mitotico.

a.4.) Analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_1 del ciclo cellulare dopo irradiazione in presenza ed in assenza della PFT-a.

Lo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_1 del ciclo cellulare è stato condotto fissando i campioni 24 e 48 ore dopo l'irradiazione.
In Tabella 8.e. sono riportati i risultati delle aberrazioni cromosomiche ottenuti a 24 ore dall'irradiazione in presenza ed in assenza di PFT-α. Le tre linee difettive per ATM hanno mostrato un danno citogenetico maggiore rispetto alla linea wild-type, pur avendo ricevuto una dose di raggi-x tre volte minore. Infatti ad 1 Gy le linee A-T mostrano sia una percentuale di cellule aberrate che una frequenza di aberrazioni per cellula più alta rispetto alla linea wild-type irradiata ad una dose di 3 Gy. Nella linea wild-type abbiamo riscontrato prevalentemente l'insorgenza di aberrazioni di tipo cromatidico, prevalentemente scambi, mentre nelle tre linee A-T si osserva, già a questo tempo di fissaggio, la presenza di dicentrici e rotture cromosomiche unitamente alle aberrazioni cromatidiche. Nella linea AT97RM, il co-trattamento con l'inibitore della p53 non provoca cambiamenti né della percentuale di cellule aberrate né della frequenza di aberrazioni per cellula. La linea wild-type e le linee AT21RM ed AT28RM, invece, mostrano un aumento congiunto delle aberrazioni totali e della percentuale di cellule aberrate nei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni rispetto ai campioni solamente irradiati. Tuttavia, mentre nella linea wild-type l'aumento delle aberrazioni totali è determinato dall'aumento dei soli scambi, nelle linee AT21RM e AT28RM, l'aumento delle aberrazioni totali nei campioni co-trattati con PFT-α deriva dall'incremento delle sole rotture (sia cromatidiche che cromosomiche).
In Tabella 8.f. sono riportati i risultati delle aberrazioni cromosomiche ottenuti a 48 ore dall'irradiazione in presenza ed in assenza di PFT-α. Anche a questo tempo di recupero, nelle linee A-T abbiamo riscontrato più danno cromosomico rispetto alla linea wild-type. Nella linea wild-type, nei campioni solo irradiati, si osserva l'insorgenza di aberrazioni di tipo cromosomico, in particolare dicentrici, mentre scompaiono quasi le aberrazioni cromatidiche. Sempre nel wild-type, nei campioni co-trattati con raggi-x e PFT-α si osserva un ingente aumento degli scambi cromosomici e, di conseguenza, delle aberrazioni totali. Il numero delle rotture invece, rimane invariato. Le linee A-T, a 48 ore dall'irradiazione, mostrano un incremento delle aberrazioni sia cromatidiche che cromosomiche. Nelle linee AT21RM ed AT28RM, nei campioni co-trattati con inibitore e radiazioni, abbiamo riscontrato un aumento significativo delle aberrazioni totali rispetto ai campioni solo irradiati, ma in questo caso l'incremento è dovuto soltanto al numero delle rotture poiché il numero degli scambi rimane invariato o diminuisce. Nella linea AT97RM, il co-trattamento con l'inibitore della p53 non influenza l'induzione di danno cromosomico nè in termini di percentuale di cellule aberrate né in termini di frequenza di aberrazioni per cellula.

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	PI±SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.			
FLEBV	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.01±0.01
	200	PFT-α	1±0	/	0	1±0	0	0	1±0	/	1.00±0
	200	3 Gy-X-rays	39±1	**[1]	5.5±1.5	30.5±2.5	4.5±0.5	2.5±2.5	43±7	**[1]	1.00±0
	200	3 Gy+PFT- α	60.5±1.5	**[§]	7.5±1.5	49±3	7±2	15.5±1.5	79±8	**[§]	1.00±0
AT97RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.05±0.02
	200	PFT-α	0	/	0	0	0	0	0	/	1.05±0.02
	200	1 Gy-X-rays	55.5±1.5	**[1]	31±2	34.5±3.5	15.5±0.5	24.5±2.5	105±8.5	**[1]	1.00±0
	200	1 Gy+PFT- α	54±2	/	29±1	29.5±1.5	11.5±1.5	23±2	93±6	/	1.00±0
AT21RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.01±0.01
	200	PFT-α	2±0	/	2±0	0	0	0	2±0	/	1.00±0
	200	1 Gy-X-rays	48±3	**[1]	26.5±1.5	7.5±0.5	18.5±2.5	20±2	72.5±0.5	**[1]	1.00±0
	200	1 Gy+PFT- α	70.5±0.5	**[§]	57.5±2.5	9.5±1.5	44±1	17±1	128±6	**[§]	1.00±0
AT28RM	200	k	1±0	/	1±0	0	0	0	0	/	1.09±0.03
	200	PFT-α	3±0	/	1±0	0	2±0	0	3±0	/	1.05±0.02
	200	1 Gy-X-rays	65.5±2.5	**[1]	22.5±2.5	24±3	14.5±1.5	62.5±3.5	123.5±7.5	**[1]	1.00±0
	200	1 Gy+PFT- α	82.5±2.5	**[§]	50±1	25.5±1.5	43±3	51.5±2.5	170±5	**[§]	1.00±0

Tabella 8.e. Effetto del pre-trattamento con PFT-α sulle aberrazioni cromosomiche indotte a 24 ore dall'irradiazione nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; [1]=significatività Gy vs. controllo; [§]=significatività Gy+PFT-α vs. Gy; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard; PI=indice di proliferazione.

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	PI±SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.			
FLEBV	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.89±0.05
	200	PFT-α	2±0	/	2±0	0	0	0	2±0	/	1.87±0.05
	200	3 Gy-X-rays	47±1	**[1]	5.5±1.5	1±0	12.5±2.5	69.5±1.5	88.5±2.5	**[1]	1.30±0.05
	200	3 Gy+PFT- α	65±4	*[§]	5.5±0.5	10±1	17.5±4.5	119.5±8.5	142.5±4.5	**[§]	1.25±0.03
AT97RM	200	k	1±0	/	0	0	1±0	0	1±0	/	1.79±0.06
	200	PFT-α	2±0	/	0	0	2±0	0	2±0	/	1.81±0.06
	200	1 Gy-X-rays	64.5±1.5	**[1]	30±2	26.5±2.5	20±1	50.5±1.5	127±5	**[1]	1.35±0.04
	200	1 Gy+PFT- α	68.5±0.5	/	22±2	34.5±3.5	22±1	45.5±4.5	124±9	/	1.30±0.04
AT21RM	200	k	1±0	/	0	0	1±0	0	1±0	/	1.51±0.05
	200	PFT-α	2±0	/	1±0	1±0	0	0	2±0	/	1.49±0.05
	200	1 Gy-X-rays	59.5±4.5	**[1]	15.5±1.5	16±0	14±2	48.5±7.5	94±4	**[1]	1.32±0.04
	200	1 Gy+PFT- α	76±1	*[§]	40.5±0.5	8.5±1.5	46±4	36.5±2.5	131.5±5.5	*[§]	1.21±0.04
AT28RM	200	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.68±0.05
	200	PFT-α	1±0	/	0	1±0	0	0	1±0	/	1.61±0.05
	200	1 Gy-X-rays	75.5±3.5	**[1]	26±1	16±4	31.5±3.5	92.5±5.5	166±6	**[1]	1.27±0.04
	200	1 Gy+PFT- α	91±1	*[§]	63±2	15±5	55.5±3.5	81±1	214.5±7.5	**[§]	1.24±0.04

Tabella 8.f. Effetto del pre-trattamento con PFT-α sulle aberrazioni cromosomiche indotte a 48 ore dall'irradiazione nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; [1]=significatività Gy vs. controllo; [§]=significatività Gy+PFT-α vs. Gy; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard; PI=indice di proliferazione.

a.5.) Effetto della PFT-a sugli SCE's indotti dalla mitomicina-C in linee CHO difettive per la riparazione

Le frequenze degli SCE's indotti dalla mitomicina-C (agente "cross-linkante", potente induttore di SCE's) in presenza ed in assenza di PFT-α sono mostrati nel Grafico 8.g. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una linea wild-type (AA8), una linea (irs1SF) difettiva per l'Homologous Recombination (HR) ed una (V3-3) deficiente nel Non-Homologous End-Joining (NHEJ). 50 cellule sono state esaminate per ogni campione. Le tre linee hanno mostrato frequenze di SCE's spontanei in linea con i valori riportati in letteratura. In seguito a trattamento con mitomicina-C abbiamo osservato un aumento della frequenza degli SCE's indotti in tutte le linee cellulari, sebbene questo aumento risulti molto meno ingente nella linea irs1SF, difettiva per l'HR (e sottoposta ad una dose di mitomicina-C dieci volte più bassa) rispetto alle altre due linee proficienti per questo meccanismo di riparazione. Nei campioni co-trattati con mitomicina e PFT-α abbiamo riscontrato un aumento significativo della frequenza di SCE's unicamente nella linea V3-3 difettiva per il NHEJ. Nelle altre due linee (AA8 e irs1SF) non vi è un incremento significativo degli SCE's indotti nei campioni co-trattati.

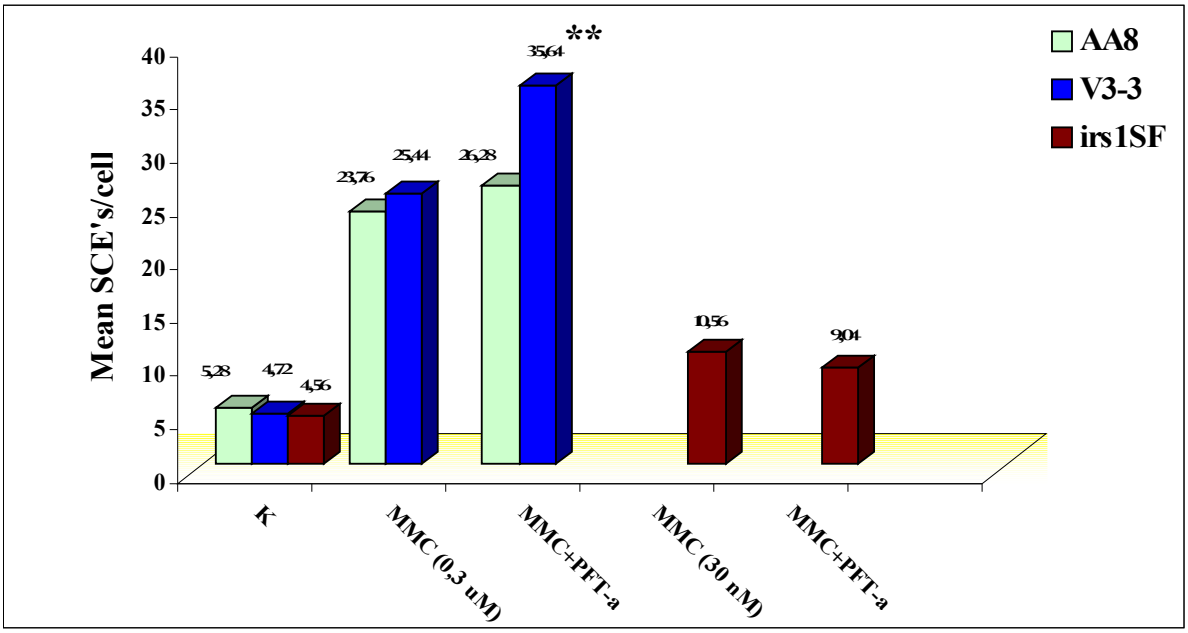


Grafico 8.g. Effetto della PFT-α sull'induzione di SCE's indotti dalla mitomicina-C in linee CHO wild-type (AA8) e difettive nell'HR (irs1SF) o nel NHEJ (V3-3). MMC=mitomicina-C; **=p<0,01 t-student test significatività MMC+PFT-α vs. MMC.

a.6.) Espressione delle proteine dei checkpoints e della riparazione: p53 e RAD51.

Le bande di chemioluminescenza relative all'espressione delle proteine p53 e RAD51 a tre ore dall'irradiazione in presenza ed in assenza di PFT-α ottenute tramite western blotting sono mostrate in Figura 8.h. ***(p53)*** Nella linea wild-type (FLEBV) e nella linea AT21RM si osserva una aumento nell'espressione della p53 nei campioni irradiati (B) rispetto ai campioni di controllo (A). Nelle stesse linee, l'intensità delle bande relative ai campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni (C) subisce una diminuzione. Nelle linee AT28RM e AT97RM in seguito ad irradiazione (B), non si osserva un aumento nell'induzione della proteina p53 rispetto ai valori di controllo (A). In queste stesse linee, nei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni (C), l'intensità delle bande rimane invariata rispetto a quelle dei campioni solo irradiati (B).
(RAD51) In nessuna linea analizzata si osserva induzione della proteina RAD51 in seguito ad irradiazione (B). L'intensità delle bande relative ai campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni (C) rimane inalterata rispetto a quella dei campioni solamente irradiati (B), in tutte le linee analizzate.

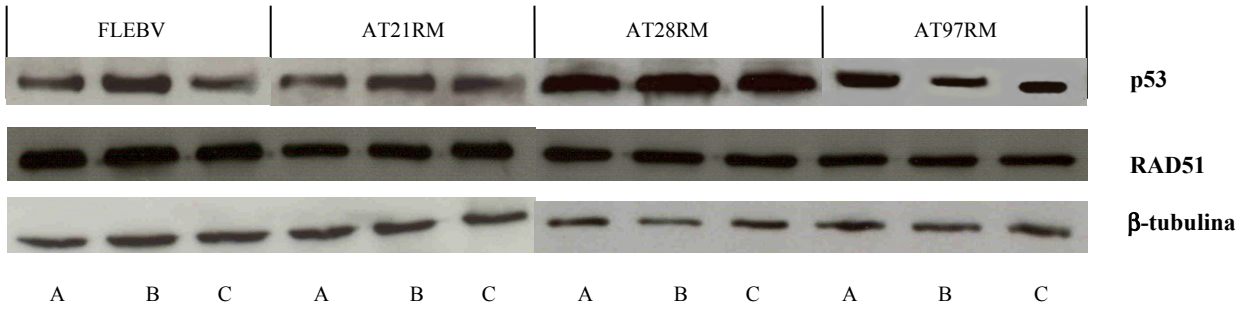


Figura 8.h. Espressione delle proteine p53 e RAD51 a tre ore dall'irradiazione con raggi-x in presenza ed in assenza di PFT-α nel wild-type e nelle linee A-T. A=controllo; B=raggi-x; C=raggi-x+PFT-α.

b.1.) Saggio citofluorimetrico della progressione del ciclo cellulare nei campioni trattati con Mannitolo (1h) e L-Carnitina (48h).

La modificazione della normale progressione del ciclo cellulare potrebbe portare ad una interpretazione errata dei risultati sia del comet assay che delle aberrazioni cromosomiche. Per assicurarci che i pre-trattamenti con L-Carnitina (L-C) e Mannitolo (Mann) non interferissero con la normale progressione del ciclo cellulare abbiamo effettuato un saggio citofluorimetrico immediatamente prima del trattamento con l'agente ossidante (t-Butyl-OOH) in tutte le linee cellulari. In Figura 8.i. sono riportati i profili citofluorimetrici dei campioni di controllo e dei campioni trattati con L-C o Mann. I risultati indicano che non vi è nessuna variazione nella progressione del ciclo cellulare sia nella linea wild-type che nelle tre linee A-T.

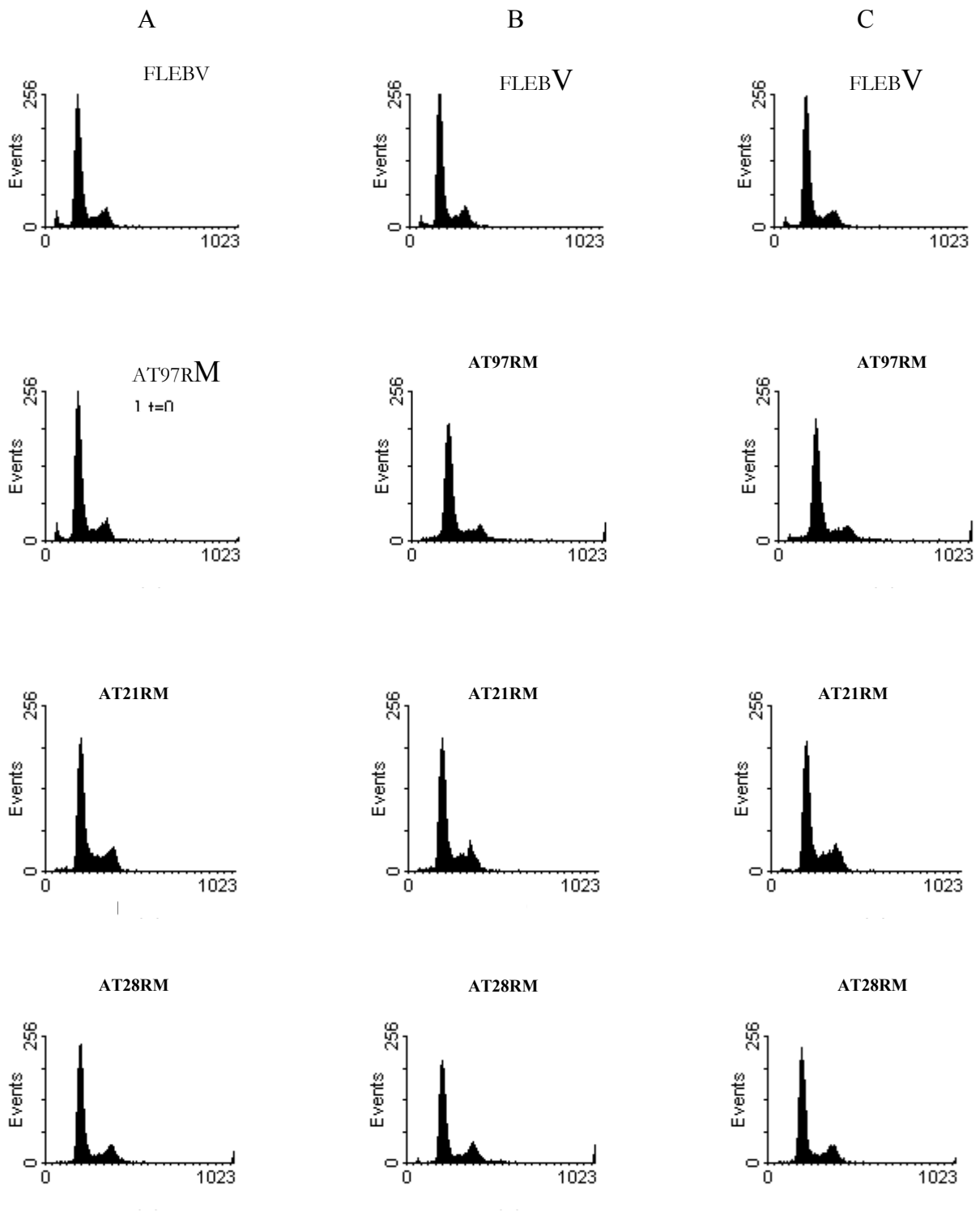


Figura 8.i. Analisi citofluorimetrica della progressione del ciclo cellulare della linea wild-type e delle linee A-T. A=controllo; B=pre-trattamento (1h) con Mann; C=pre-trattamento (48h) con L-C.

b.2.) Analisi della riparazione delle lesioni indotte dal t-Butyl-OOH in cellule A-T mediante comet alcalino. Effetto della L-Carnitina.

L'induzione e la rimozione delle "Single-Strand Breaks" (SSBs) provocate dal trattamento con t-Butyl-OOH sono state analizzate mediante comet assay in condizioni alcaline. Questa tecnica rivela sia le SSBs sia le altre modificazioni al DNA provocate dagli agenti ossidanti denominate "siti alcalino labili". Queste vengono rivelate come SSBs in seguito a denaturazione in un ambiente alcalino. Siccome utilizzando questa tecnica non si possono distinguere le vere SSBs dai siti alcalino labili, tutto il danno riscontrato è stato classificato come SSBs. I valori dei mean tail moment (mtm) ottenuti nei campioni di controllo e nei campioni trattati con t-Butyl-OOH in presenza ed in assenza di L-C o Mann sono presentati in Tabella 8.l. Il pre-trattamento con i soli L-C o Mann non provoca aumento del mean tail moment rispetto ai campioni di controllo (k) in tutte le linee analizzate. Il trattamento con l'agente ossidante, invece, aumenta la frequenza di induzione di SSBs in modo significativo ($p<0.01$) in tutte le linee analizzate, sebbene le varie linee A-T mostrino una diversa sensibilità al trattamento (t=0). La cinetica di riparazione delle lesioni è stata analizzata 1, 4 e 24 ore dopo il trattamento con t-Butyl-OOH ed espressa in termini di "percentuale di riduzione del mean tail moment". Questo parametro è stato calcolato sottraendo il valore del mtm ottenuto ai tempi di recupero successivi (1h, 4h, 24h) dal valore del mtm ottenuto al tempo di recupero 0h, e dividendo il risultato per il valore del mtm ottenuto al tempo 0h. Dal Grafico 8.m. si evince che, mentre la linea wild-type mostra già dopo un'ora dal trattamento, un'elevata % di riduzione del mtm (circa il 60%), le tre linee A-T manifestano, stesso tempo di recupero, una % di riduzione del mtm inalterata ed il loro mtm rimane quasi invariato rispetto a quello riscontrato al t=0. Addirittura, nella linea AT21RM, ad un'ora dal trattamento il mtm aumenta e la % di riduzione del mtm viene negativa. Infine, la linea AT97RM ha mostrato una % di riduzione del mtm inferiore al 10% anche dopo 24 ore dal trattamento.

Per cercare di stabilire se il pre-trattamento con L-C fosse più o meno efficace del pre-trattamento con Mannitolo (noto scavenger di radicali liberi ossidrilici) nel ridurre il danno ossidativo in cellule A-T, abbiamo determinato un "fattore di riduzione del mean tail moment" (F_{tm}) sia per l'L-C che per il Mann con la seguente formula:

$$F_{tm}[\text{L-C (or Mann)}]_t = \frac{tm_{\text{B-OOH}}(\mathbf{A\text{-}T})_t - tm_{\text{B-OOH+L-C (or Mann)}}(\mathbf{A\text{-}T})_t}{tm_{\text{B-OOH}}(\mathbf{WT})_t - tm_{\text{B-OOH+L-C (or Mann)}}(\mathbf{WT})_t}$$

ed abbiamo calcolato il rapporto tra i due fattori (Grafico 8.n.). Per valori del rapporto $F_{tm[L-C]}/F_{tm[Mann]}$ >1 abbiamo considerato il pre-trattamento con L-C più efficace di quello con il Mann. I risultati mostrano che l'L-C si rivela più efficace del Mann nel contrastare gli effetti del danno ossidativo soltanto a tempi di recupero precoci (1h) dopo il trattamento con *t*-Butyl-OOH in tutte le linee A-T. Questo effetto è più pronunciato nella linea AT97RM. A tempi più tardivi (4h, 24h) non si manifesta più la maggiore efficacia della L-C rispetto al Mann nel ridurre il mean tail moment dei campioni trattati con l'agente ossidante.

Cell line	Treatment	Recovery time	Mean tail moment±SE	t^sp	Cell line	Treatment	Recovery time	Mean tail moment±SE	t^sp
FLEBV	***k***	t=0h	0.87+0.2		**AT97RM**	***k***	t=0h	1.71+0.3	
	Mann		1.02+0.12			**Mann**		1.12+0.15	
	L-C		0.77+0.13			**L-C**		1.21+0.13	
	***t*-B-OOH**	t=0h	29.45+1.87	**[1]		***t*-B-OOH**	t=0h	16.33+0.86	**[1]
	***t*-B-OOH+Mann**		18.42+2.07	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		10.62+0.61	**[#]
	***t*-B-OOH+L-C**		18.72+1.01	**[§]		***t*-B-OOH+L-C**		9.71+0.46	**[§]
	***t*-B-OOH**	t=1h	13.54+1.29			***t*-B-OOH**	t=1h	15.35+0.77	
	***t*-B-OOH+Mann**		9.13+0.95	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		14.56+0.77	
	***t*-B-OOH+L-C**		11.1+0.74	*[§]		***t*-B-OOH+L-C**		8.47+0.61	**[§]
	***t*-B-OOH**	t=4h	8.14+1.18			***t*-B-OOH**	t=4h	11.91+0.75	
	***t*-B-OOH+Mann**		5.74+0.72	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		7.19+0.68	**[#]
	***t*-B-OOH+L-C**		4.57+0.44	**[§]		***t*-B-OOH+L-C**		5.11+0.68	**[§]
AT21RM	***k***	t=0h	1.32+0.21		**AT28RM**	***k***	t=0h	1.6+0.1	
	Mann		0.99+0.18			**Mann**		1.19+0.2	
	L-C		1.1+0.2			**L-C**		0.88+0.19	
	***t*-B-OOH**	t=0h	29.5+0.5	**[1]		***t*-B-OOH**	t=0h	15.02+0.95	**[1]
	***t*-B-OOH+Mann**		12.5+0.6	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		9.52+0.58	**[#]
	***t*-B-OOH+L-C**		14.8+0.8	**[§]		***t*-B-OOH+L-C**		10.25+0.77	**[§]
	***t*-B-OOH**	t=1h	33.7+1.8			***t*-B-OOH**	t=1h	11.68+0.88	
	***t*-B-OOH+Mann**		12.1+0.4	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		6.68+0.5	**[#]
	***t*-B-OOH+L-C**		12.9+0.5	**[§]		***t*-B-OOH+L-C**		6.09+0.48	**[§]
	***t*-B-OOH**	t=4h	20.2+1.7			***t*-B-OOH**	t=4h	4.03+0.25	
	***t*-B-OOH+Mann**		4.1+0.3	**[#]		***t*-B-OOH+Mann**		2.16+0.5	**[#]
	***t*-B-OOH+L-C**		4.7+0.9	**[§]		***t*-B-OOH+L-C**		2.06+0.11	**[§]

Tabella 8.1. Effetto del pre-trattamento con L-Carnitina o Mannitolo sui valori del mean tail moment ottenuti a differenti tempi di recupero dopo trattamento con *t*-Butyl-OOH nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; t^sp=test t-student; [1]=significatività *t*-BOOH vs. controllo; [#]=significatività *t*-BOOH+Mann vs. *t*-BOOH; [§]=significatività *t*-BOOH+L-C vs. *t*-BOOH; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard.

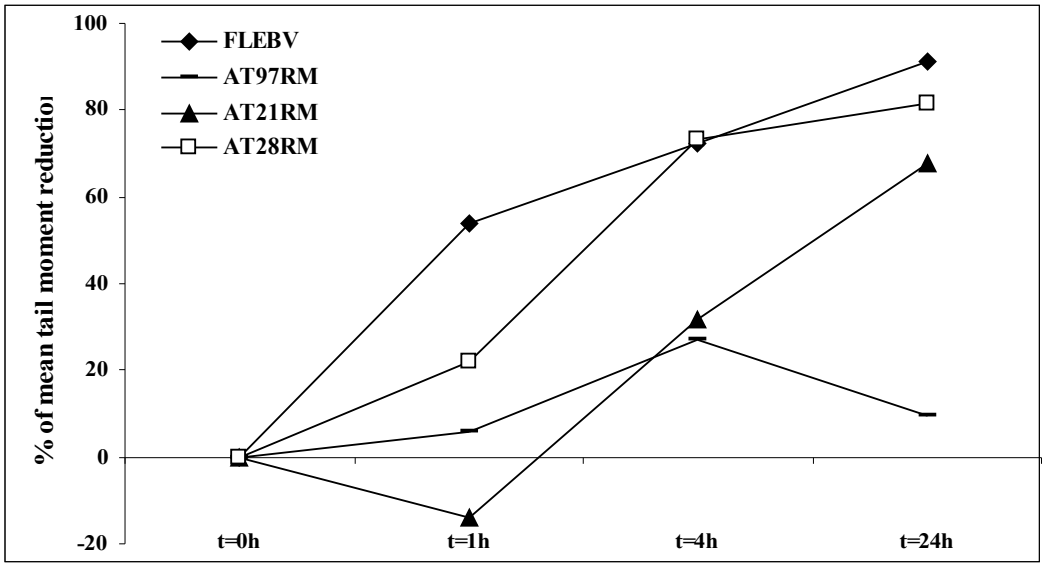


Grafico 8.m. Capacità riparativa delle lesioni indotte dal *t*-Butyl-OOH, espressa come percentuale di riduzione del mean tail moment , nel wild-type e nelle tre linee A-T

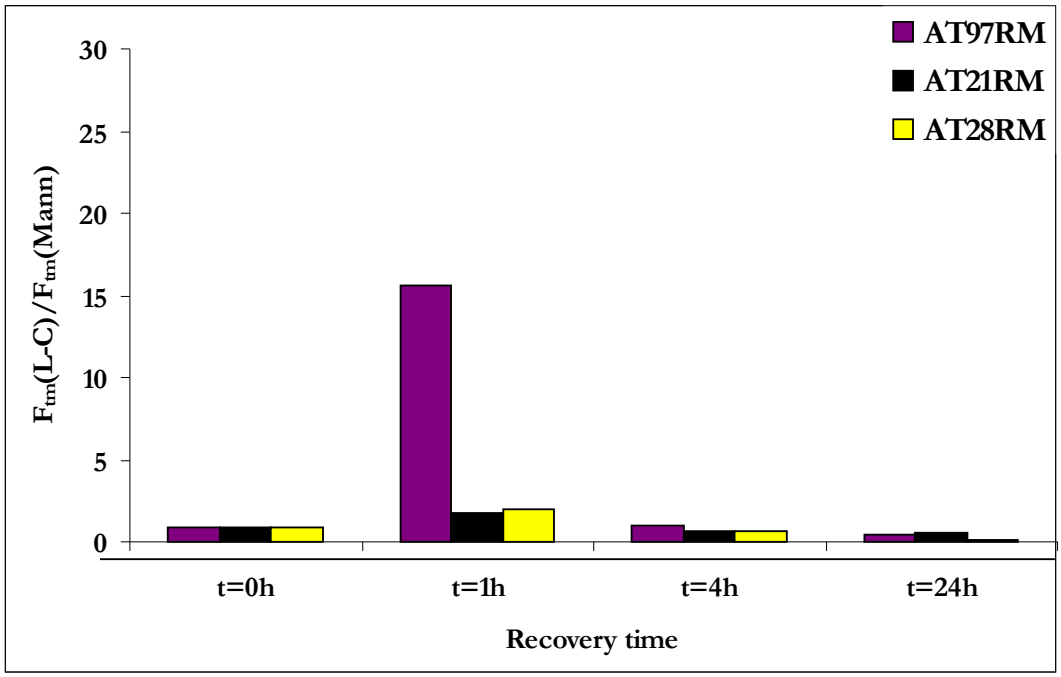


Grafico 8.n. Rapporto tra l'F_{tm}(L-C) e F_{tm}(Mann) a vari tempi di recupero dopo trattamento con *t*-Butyl-OOH. Per dettagli sull'F_{tm} vedi il paragrafo b.2.

b.3.) Studio delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_2 del ciclo cellulare dal t-Butyl-OOH. Effetto della L-Carnitina. Analisi dell'indice mitotico.

In Tabella 8.o. sono riportati i risultati dello studio delle aberrazioni cromosomiche indotte dal *t*-Butyl-OOH nella fase G_2 del ciclo cellulare in presenza ed in assenza di L-C o Mann. I pre-trattamenti con L-C e Mann da soli non alterano i valori basali né delle aberrazioni per cellula né della percentuale di cellule aberrate. Il trattamento con l'agente ossidante invece, provoca un incremento significativo ($p<0.01$) sia della percentuale di cellule aberrate che del numero di aberrazioni per cellula sia nel wild-type che nelle tre linee A-T. La frequenza di induzione di aberrazioni è risultata circa 5 volte maggiore nelle tre linee A-T rispetto alla linea wild-type. Il tipo di aberrazione più frequente è risultata la delezione cromatidica. La linea AT28RM ha mostrato la frequenza di induzione di aberrazioni maggiore con 233 ± 2.8 aberrazioni ogni 100 cellule. In tutte le linee cellulari analizzate, nei campioni pre-trattati con L-C e trattati poi con l'agente ossidante, abbiamo osservato una forte riduzione del danno citogenetico indotto rispetto ai campioni trattati solamente con il *t*-Butyl-OOH. Lo stesso fenomeno di riduzione si riscontra in tutte le linee anche nei campioni pre-trattati con il Mann, sebbene in modo molto meno marcato. L'analisi dell'indice mitotico dei campioni recuperati a 3 ore dal trattamento ci rivela che nel wild-type, né il pre-trattamento con Mann né quello con L-C modificano la percentuale di mitosi rispetto alle interfasi del campione trattato con il solo agente ossidante. D'altra parte, nelle linee A-T, il pre-trattamento con L-C produce un leggero incremento dell'indice mitotico mentre il pre-trattamento con Mann non ha effetto.

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	MI±SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.			
FLEBV	**300**	**k**	**0**	**/**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**/**	**4.2±0.1**
	300	**k+Mann**	**1.6±0.5**	**/**	**1.6±0.5**	**0**	**0**	**0**	**1.6±0.5**	**/**	**4.4±0.2**
	300	**k+L-C**	**2.6±0.3**	**/**	**0**	**0**	**2.6±0.3**	**0**	**2.6±0.3**	**/**	**3.9±0.1**
	300	***t*-B-OOH**	**23.6±2.9**	**$**^1$**	**24.3±2**	**0**	**0**	**0**	**24.3±2**	**$**^1$**	**1.8±0.2**
	300	***t*-B-OOH+Mann**	**7.3±0.3**	**$**^\#$**	**8.3±0.3**	**0**	**0**	**0**	**8.3±0.3**	**$**^\#$**	**2±0.4**
	300	***t*-B-OOH+L-C**	**5.6±0.8**	**$**^\S$**	**6.3±0.6**	**0**	**0**	**0**	**6.3±0.6**	**$**^\S$**	**1.91±0.2**
AT97RM	**300**	**k**	**1.3±0.3**	**/**	**1.3±0.3**	**0**	**1.6±0.3**	**0**	**3±0**	**/**	**5.3±0.2**
	300	**k+Mann**	**1.6±0.3**	**/**	**1.6±0.3**	**0**	**0**	**0**	**1.6±0.3**	**/**	**4.7±0.2**
	300	**k+L-C**	**3.3±0.6**	**/**	**2.6±0.3**	**0**	**0**	**2.3±0.3**	**5±0.5**	**/**	**3.8±0.9**
	300	***t*-B-OOH**	**88.6±1.8**	**$**^1$**	**210.6±7.2**	**7.6±0.3**	**4.6±0.3**	**0**	**223±6.9**	**$**^1$**	**3.1±0.7**
	300	***t*-B-OOH+Mann**	**71±1.2**	**$**^\#$**	**145.6±3.1**	**4.6±1.7**	**0**	**0**	**150.3±4.9**	**$**^\#$**	**2.7±0.5**
	300	***t*-B-OOH+L-C**	**63±1.1**	**$**^\S$**	**108.3±3.8**	**4±0**	**0**	**0**	**112.3±3.8**	**$**^\S$**	**3.8±0.1**
AT21RM	**300**	**k**	**2.3±0.3**	**/**	**3.3±0.3**	**0**	**0.6±0.3**	**0**	**4±0**	**/**	**5.6±0.4**
	300	**k+Mann**	**2.6±0.3**	**/**	**2.6±0.3**	**0**	**0**	**0**	**2.6±0.3**	**/**	**4±0.4**
	300	**k+L-C**	**5±1.5**	**/**	**2.6±0.8**	**0**	**2±0.5**	**1.3±0.3**	**6±1.5**	**/**	**4.6±0.5**
	300	***t*-B-OOH**	**72.3±0.8**	**$**^1$**	**173.6±4**	**5.3±0.8**	**0**	**0**	**179±4.3**	**$**^1$**	**3.1±0.2**
	300	***t*-B-OOH+Mann**	**70±0.5**	**/**	**155±2.8**	**0.6±0.3**	**0**	**0**	**155.6±3.1**	**/**	**2.8±0.3**
	300	***t*-B-OOH+L-C**	**58±1.1**	**$**^\S$**	**129±3.7**	**0**	**0**	**0**	**129±3.7**	**$**^\S$**	**3.7±0.1**
AT28RM	**300**	**k**	**0**	**/**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**/**	**5.3±0.6**
	300	**k+Mann**	**1.3±0.3**	**/**	**0**	**0**	**1.3±0.3**	**0**	**1.3±0.3**	**/**	**4.8±0.7**
	300	**k+L-C**	**0**	**/**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**/**	**4.8±0.6**
	300	***t*-B-OOH**	**91.6±1.2**	**$**^1$**	**231.3±2.9**	**1.6±0.3**	**0**	**0**	**233±2.8**	**$**^1$**	**2.9±0.1**
	300	***t*-B-OOH+Mann**	**83.3±1.6**	**$**^\#$**	**191.3±2.3**	**0**	**0**	**0**	**191.3±2.3**	**$*^\#$**	**2.2±0.4**
	300	***t*-B-OOH+L-C**	**74±0.5**	**$**^\S$**	**139.6±1.2**	**0**	**0**	**0**	**139.6±1.2**	**$**^\S$**	**3.5±0.2**

Tabella 8.o. Effetto del pre-trattamento con L-Carnitina o Mannitolo sulle aberrazioni cromosomiche indotte dal *t*-Butyl-OOH nella fase G_2 del ciclo cellulare nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; ^{1}=significatività *t*-BOOH vs. controllo; $^\#$=significatività *t*-BOOH+Mann vs. *t*-BOOH; §=significatività *t*-BOOH+L-C vs. *t*-BOOH; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard; MI=indice mitotico.

10) Studio delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_1 del ciclo cellulare dal t-Butyl-OOH. Effetto della L-Carnitina.

Lo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G_1 del ciclo cellulare è stato condotto recuperando i campioni 24 e 48 ore dopo il trattamento con *t*-Butyl-OOH in presenza ed in assenza di L-C o Mann. In Tabella 8.p. sono mostrati i risultati ottenuti a 24 ore. Le linee A-T hanno mostrato un danno citogenetico da 6 (AT28RM) a 8 (AT97RM) volte superiore rispetto alla linea wild-type in seguito al trattamento con il *t*-Butyl-OOH. Inoltre, nelle tre linee A-T, già a questo tempo di fissaggio, abbiamo riscontrato la presenza di cromosomi dicentrici sebbene la stragrande maggioranza delle aberrazioni sia di tipo cromatidico. Nella linea wild-type, invece, non si formano dicentrici e le aberrazioni sono tutte cromatidiche. In tutte le linee cellulari analizzate, nei campioni pre-trattati con L-C e trattati poi con l'agente ossidante, abbiamo osservato una forte riduzione del danno citogenetico indotto rispetto ai campioni trattati solamente con il *t*-Butyl-OOH. Lo stesso fenomeno di riduzione si riscontra in tutte le linee anche nei campioni pre-trattati con il Mann, sebbene in modo molto meno marcato. In Tabella 8.q. sono presentati i risultati relativi alle 48 ore di recupero dopo trattamento con *t*-Butyl-OOH in presenza ed in assenza di L-C o Mann. Le linee A-T, dopo trattamento con *t*-Butyl-OOH, continuano a mostrare una maggiore insorgenza di danno citogenetico rispetto al selvatico (fino a 7 volte di più) e solo in queste linee difettive si rileva una elevata presenza di cromosomi dicentrici (misti ad aberrazioni cromatidiche). Nella linea wild-type scompaiono gli scambi cromatidici osservati a 24 ore e compaiono poche rotture cromosomiche. Nei campioni co-trattati con L-C o Mann e *t*-Butyl-OOH si verifica il medesimo andamento riscontrato agli altri tempi di recupero in tutte le linee cellulari: la L-C diminuisce sia la frequenza di aberrazioni per cellula che la percentuale di cellule aberrate in maniera più efficiente del Mann.

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	PI±SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.			
FLEBV	300	k	0	/	0	0	0	0	0	/	1.02±0.01
	300	k+Mann	1.6±0.6	/	1.6±0.6	0	0	0	1.6±0.6	/	1.05±0.01
	300	k+L-C	2±0.5	/	2±0.5	0	0	0	2±0.5	/	1.01±0.01
	300	*t*-B-OOH	16.6±1.2	**[1]	15±1	3.6±0.8	2.3±0.3	0	21±1.5	**[1]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+Mann	6±1.1	**[#]	2.3±0.6	4.3±1.2	0	0	6.6±1.2	**[#]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+L-C	2.3±0.3	**[§]	2.3±0.3	0	0	0	2.3±0.3	**[§]	1.00±0
AT97RM	300	k	1±0	/	0.6±0.3	0	1.3±0.3	0	2±0	/	1.09±0.02
	300	k+Mann	1±0	/	1.3±0.3	0	0	0	1.3+0.3	/	1.05±0.02
	300	k+L-C	2.6±1.2	/	4.3±0.8	0	0	0.3±0.3	4.6±1.2	/	1.02±0.01
	300	*t*-B-OOH	57.3±1.7	**[1]	65.3±2.9	63.6±2.3	26.3±1.7	10.6±1.7	166±3	**[1]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+Mann	47±1.7	*[#]	20.6±2	33.6±1.4	11±0.5	3.3±0.3	67.6±2.3	**[#]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+L-C	42.6±0.3	**[§]	21.6±1.4	22.3±2.1	8±0.5	2.3±0.6	54.3±3.8	**[§]	1.00±0
AT21RM	300	k	4.3±1.2	/	4.3±1.2	0	0	0	4.3±1.2	/	1.00±0
	300	k+Mann	3.6±0.8	/	3.6±0.8	0	0	0	3.6±0.8	/	1.02±0.02
	300	k+L-C	1.6±0.6	/	1.6±0.6	0	0	0	1.6±0.6	/	1.05±0.01
	300	*t*-B-OOH	54.6±2.9	**[1]	75.3±4.6	45.3±0.8	2.3±0.6	10.6±2.3	132.6±6.9	**[1]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+Mann	47±1.7	/	42.3±1.7	42±1.5	2.3±0.6	5.6±0.6	91±4	**[#]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+L-C	39±1.1	**[§]	34±2.8	21.3±1.3	3.3±0.6	0	58.6±2.2	**[§]	1.00±0
AT28RM	300	k	1±0	/	1±0	0	0	0	1±0	/	1.01±0.01
	300	k+Mann	1±0	/	0	0	1±0	0	1±0	/	1.05±0.02
	300	k+L-C	2±0.5	/	2±0.5	0	0	0	2±0.5	/	1.09±0.03
	300	*t*-B-OOH	66±3.4	**[1]	57.3±1.2	35.6±2.9	12±0.5	13±1.1	118±2	**[1]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+Mann	51.3±1.4	**[#]	46.3±3.3	19.6±1.8	13.6±0.6	11.6±0.6	91.3±5.9	**[#]	1.00±0
	300	*t*-B-OOH+L-C	41.3±1.2	**[§]	37.6±1.4	18±1.1	10.3±0.6	4.3±1.3	70.3±4.3	**[§]	1.00±0

Tabella 8.p. Effetto del pre-trattamento con L-Carnitina o Mannitolo sulle aberrazioni cromosomiche indotte a 24 ore dal trattamento con *t*-Butyl-OOH nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; [1]=significatività *t*-BOOH vs. controllo; [#]=significatività *t*-BOOH+Mann vs. *t*-BOOH; [§]=significatività *t*-BOOH+L-C vs. *t*-BOOH; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard; PI=indice di proliferazione.

Cell line	N°Metaph. analysed	Treatment	% Abnormal cells±SE	X^2p	Chromatid/100 cells		Chromosomal/100 cells		Total AB /100 cells±SE	t^sp	MI±SE	PI±SE
					Bks.	Exch.	Bks.	Exch.				
FLEBV	300	k	0	/	0	0	0	0	0	/	3.5±0.2	1.82±0.04
	300	k+Mann	0	/	0	0	0	0	0	/	3±0.1	1.82±0.04
	300	k+L-C	2.6±1.2	/	0	0	2.6±1.2	0	2.6±1.2	/	2.5±0.3	1.77±0.04
	300	*t*-B-OOH	23.3±1.2	**[1]	13.3±1.2	0	11.6±0.8	3.6±0.3	28.6±0.6	**[1]	1.1±0.1	1.28±0.05
	300	*t*-B-OOH+Mann	16.3±0.3	*[#]	11.3±1.4	0	10.6±1.2	2.3±0.6	26.3±3.6	/	1.88±0.1	1.21±0.04
	300	*t*-B-OOH+L-C	7.3±0.3	**[§]	5.3±1.2	0	2.6±0.3	1.3±0.8	9.3±2.1	**[§]	2.31±0.2	1.4±0.05
AT97RM	300	k	1±0	/	1±0	0	0	0	1±0	/	6.1±0.5	1.77±0.04
	300	k+Mann	1±0	/	1±0	0	0	0	1±0	/	5.4±0.6	1.69±0.05
	300	k+L-C	1.3±0.3	/	1.3±0.3	0	0	0	1.3±0.3	/	5.5±0.5	1.7±0.05
	300	*t*-B-OOH	63±2.3	**[1]	25.6±1.4	11.3±0.8	66.3±3.7	37.6±1.7	141±5	**[1]	3.1±0.2	1.52±0.05
	300	*t*-B-OOH+Mann	60.6±1.6	/	14.6±1.2	0.6±0.3	36.3±1.8	32.6±0.8	84.3±2.4	**[#]	4.2±0.3	1.41±0.05
	300	*t*-B-OOH+L-C	35.3±0.8	**[§]	7.6±1.2	0.6±0.3	14±1	39.6±0.8	60.6±0.8	**[§]	4±0.1	1.51±0.05
AT21RM	300	k	1.6±0.3	/	1.6±0.3	0	0	0	1.6±0.3	/	4.8±0.1	1.79±0.04
	300	k+Mann	0.6±0.3	/	0.6±0.3	0	0	0	0.6±0.3	/	4.2±0.2	1.75±0.04
	300	k+L-C	0.3±0.3	/	0.3±0.3	0	0	0	0.3±0.3	/	5±0.5	1.69±0.05
	300	*t*-B-OOH	66±2	**[1]	35±1.7	1.3±0.3	42.3±2.9	50.3±2.3	129±2.5	**[1]	3.17±0.8	1.5±0.05
	300	*t*-B-OOH+Mann	47.3±0.8	**[#]	15.6±0.6	3.6±0.3	19.3±0.8	32.3±1.8	71±3	**[#]	4.1±0.4	1.39±0.05
	300	*t*-B-OOH+L-C	32±1.1	**[§]	9.3±0.6	0	14.3±1.2	14.6±2	40.3±2.6	**[§]	4.46±0.2	1.42±0.05
AT28RM	300	k	0	/	0	0	0	0	0	/	4.9±0.8	1.67±0.05
	300	k+Mann	0	/	0	0	0	0	0	/	4.1±0.9	1.6±0.05
	300	k+L-C	1.3±0.3	/	0	0	1.3±0.3	0	1.3±0.3	/	4.3±0.7	1.65±0.05
	300	*t*-B-OOH	82.3±1.3	**[1]	54.3±4.6	25±0.5	64±3	72.6±1.2	216±5.2	**[1]	2.29±0.4	1.45±0.05
	300	*t*-B-OOH+Mann	66±1.1	**[#]	36.3±2.6	10.6±0.3	56.3±2.3	47±1.5	150.3±2.1	**[#]	6.5±0.5	1.38±0.05
	300	*t*-B-OOH+L-C	54.6±0.8	**[§]	12.3±1.8	2±0.5	42.6±2.1	41.3±0.6	98.3±2.8	**[§]	6.2±0.5	1.45±0.05

Tabella 8.q. Effetto del pre-trattamento con L-Carnitina o Mannitolo sulle aberrazioni cromosomiche indotte a 48 ore dal trattamento con *t*-Butyl-OOH nella linea wild-type e nelle linee A-T. k=controllo; X^2p=test chi-quadro; t^sp=test t-student; [1]=significatività *t*-BOOH vs. controllo; [#]=significatività *t*-BOOH+Mann vs. *t*-BOOH; [§]=significatività *t*-BOOH+L-C vs. *t*-BOOH; *=p<0.05; **=p<0.01; SE=errore standard; PI=indice di proliferazione.

9. DISCUSSIONE

Il danno al DNA è una delle minacce più pericolose per l'omeostasi cellulare e, quindi, per la vita degli organismi. Per questo motivo la risposta cellulare al danno al DNA è immediata, vigorosa e generalizzata e va ad abbracciare numerosi aspetti del metabolismo cellulare. Difetti genetici che compromettono la risposta cellulare al danno al DNA portano generalmente ad instabilità genomica, ipersensibilità a specifici agenti danneggianti e predisposizione al cancro. Lo studio di queste anomalie e delle sindromi genetiche che ne derivano come per esempio lo Xeroderma Pigmentoso, l'Anemia di Fanconi e l'Ataxia Telangiectasia focalizza l'attenzione sulla risposta delle cellule e dei tessuti che manifestano questi difetti. I fenotipi clinici e cellulari di queste malattie sono caratterizzati da lenta degenerazione di specifici tessuti e, qualche volta, da segni di invecchiamento prematuro. Un possibile contributo al verificarsi di questi processi, che si manifestano anche in varie malattie degenerative, è dato dallo "stress ossidativo", una condizione caratterizzata dalla presenza di elevati livelli delle cosiddette "Specie Reattive dell'Ossigeno" (ROS). Si fa sempre più fondata l'ipotesi che uno stato di "stress ossidativo" per la cellula sia accompagnato da difetti nella riparazione di diversi tipi di lesioni al DNA.
Qual è la natura della connessione tra difetti nella riparazione e stress ossidativo? La questione è stata trattata recentemente con speciale attenzione nella sindrome ad instabilità genomica Ataxia Telangiectasia (A-T), causata dalla mancanza o dall'inattivazione della proteina ATM. Questa proteina chinasi gioca un ruolo essenziale nella risposta al danno al DNA perché è responsabile del propagarsi dell'allarme che annuncia la presenza di una delle lesioni al DNA più citotossiche: la rottura a doppia elica (DSB). Tuttavia, diverse caratteristiche del fenotipo clinico cellulare dell'A-T indicano che, oltre al conclamato difetto riguardante la risposta alle DSBs, le cellule A-T potrebbero essere continuamente soggette ad una situazione di stress ossidativo. In particolare, due sono i sintomi dell'A-T che suggeriscono una possibilità del genere: la neurodegenerazione e l'invecchiamento prematuro dei tessuti.

Il processo di degenerazione del tessuto nervoso provocato da una lesione alla doppia elica deve essere ancora decifrato. L'unica informazione certa che abbiamo è che la capacità di riparare il danno al DNA è di critica importanza durante lo sviluppo di un organismo. Nel caso dell'A-T, dove le cellule danneggiate possono sfuggire all'apoptosi ed essere impropriamente incorporate nel sistema nervoso, la neurodegenerazione è probabilmente provocata dalla perdita di funzionalità di queste cellule nel tessuto maturo. Un altro aspetto che ancora rimane ambiguo è l'effetto del danno provocato direttamente nel tessuto nervoso maturo. Inoltre, un interrogativo da chiarire è: quale

livello di danno spontaneo un neurone è capace di tollerare prima di essere eliminato dal tessuto?....e se è così, con quale meccanismo viene eliminato?
Il lavoro di questa tesi si propone di studiare la risposta al danno al DNA in cellule A-T trattando la questione sotto due diversi approcci: uno classico che va ad analizzare la risposta delle cellule A-T alle rotture a doppia elica indotte dalle radiazioni ionizzanti (raggi-x) e l'eventuale ruolo della proteina p53 (che opera sotto il diretto controllo di ATM) nella riparazione di queste lesioni ed un altro più attuale che studia la risposta di queste cellule ad un insulto ossidante. In questo contesto è stato saggiato anche l'effetto di un composto, la L-Carnitina, comparandolo con quello di un noto scavenger, il Mannitolo.

(Danno da radiazioni) Il comet assay condotto in condizioni di pH neutro è uno strumento molto usato per rilevare la migrazione delle rotture a doppia elica (DSBs) indotte dalla radiazione ionizzante (*Wojewodzka et al. 2002*). Nel nostro studio sono state irradiate cellule linfoblastoidi provenienti da pazienti A-T e cellule wild-type di controllo. Le cellule A-T si sono rivelate due volte più sensibili all'induzione di DSBs rispetto alla linea wild-type poiché al t=0 hanno mostrato valori di mean tail moment simili a quelli della linea wild-type pur essendo state irradiate con una dose ridotta della metà. Dai risultati del comet (Grafico 8.a.) si evince anche che la riparazione delle DSBs procede in modo molto più lento nelle linee A-T rispetto alla linea wild-type. Infatti nelle linee A-T la quantità di danno riparato è sempre minore rispetto a quella della linea di controllo a tutti i tempi di recupero. Tuttavia abbiamo riscontrato che le linee AT21RM ed AT28RM iniziano a riparare le lesioni a tempi mediamente lunghi poiché, in queste linee, la quantità di danno riparato comincia ad aumentare a 4 ore dal trattamento per risultare quasi simile a quella della linea wild-type a 24 ore dal trattamento. La linea AT97RM, invece, (recante una mutazione nel dominio di legame di ATM con p53) sembra essere proprio incapace di rimuovere le lesioni dal DNA poiché queste rimangono visibili sulla doppia elica anche 24 ore dopo la loro formazione. Questo risultato conferma i dati provenienti dalla letteratura: la mancanza della proteina ATM provoca un disequilibrio nei meccanismi di segnalazione e rimozione della rottura a doppia elica (*Morrison et al. 2000; Rotman e Shiloh, 1999*).
Djuzenova et al. nel 1999 infatti, tramite l'utilizzo del comet assay, dimostrarono che linfociti di pazienti A-T irradiati con raggi-x, manifestano un danno iniziale 3 volte maggiore, una velocità di riparazione 3 volte minore ed una quantità di danno non riparato 3 volte maggiore rispetto a linfociti di individui sani.
Le rotture a doppia elica possono essere introdotte sul DNA dalle radiazioni, dai farmaci chemioterapici, dal complesso di taglio che presiede la ricombinazione V(D)J, durante la ricombinazione meiotica e dal collasso della forca replicativa. La DSB è la più tossica tra le forme di

danno al DNA perché minaccia in modo grave la stabilità del genoma facilitando la formazione di delezioni e traslocazioni cromosomiche. A causa della natura così nociva delle DSBs, la cellula si è attrezzata opportunamente per contrastare la loro propagazione. Esistono in natura infatti, due distinti ma complementari meccanismi di riparazione delle DSBs: il "Non-Homologous End-Joining" (NHEJ) e "l'Homologous Recombination" (HR). I due meccanismi di riparazione competono l'uno con l'altro nella riparazione delle DSBs: la predominanza dell'uno o dell'altro meccanismo dipende dal tipo cellulare, dalla fase del ciclo in cui il danno deve essere processato e dalla velocità di reclutamento delle proteine di segnalazione del danno appartenenti alle due pathways. Generalmente, nelle fasi S e G_2, quando è disponibile una copia identica di DNA costituita dal cromatidio fratello, prevale l'HR, mentre il NHEJ sembra essere il meccanismo preminente nelle fasi G_1 ed S precoce. Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che il caso dell'HR e del NHEJ è un esempio relativamente semplice che spiega il modo in cui i differenti meccanismi di riparazione sono alternativamente impiegati, competendo ed anche collaborando per riparare le stesse lesioni *(Kim et al 2005)*

Nell'HR le due estremità del DNA vengono inizialmente resettate in direzione 5' – 3' da una nucleasi. Le code 3' risultanti invadono la doppia elica della molecola di DNA omologa (cromatidio fratello) e vengono completate da una DNA polimerasi usando come stampo l'informazione della molecola partner. Dopo la migrazione delle eliche la risultante "Giunzione di Holliday" viene risolta in due molecole di DNA intatte. Con questo meccanismo di riparazione si ottiene la completa conservazione dell'informazione genetica poiché le due molecole riparate sono esattamente uguali alle originali. D'altro canto però questo meccanismo di riparazione può provocare una perdita di "eterozigosi" ugualmente deleteria per la variabilità del genoma.
Al contrario, il ricongiungimento di due estremità di DNA tramite il NHEJ non prevede l'uso di una molecola di DNA partner come stampo e non dipende da una omologia di sequenza tra le due estremità ricombinanti. In questo processo le due estremità vengono semplicemente legate l'una con l'altra, talvolta dopo una piccola degradazione di nucleotidi. Per questo motivo il NHEJ è un meccanismo definito "error prone" poiché spesso introduce piccole delezioni nella sequenza nucleotidica.
Recenti scoperte (*Lin and Waldman, 2001*) hanno suggerito l'esistenza di una terza pathway di riparazione delle rotture a doppia elica chiamata "Precise Ligation" (PL). Il PL è un metodo accurato di riparazione che determina la completa ricostruzione dell'informazione contenuta nella sequenza nucleotidica (*Lin et al, 1999 e 2003*). Non è ancora ben chiaro con quale meccanismo la riparazione delle DSBs sia portata a termine da un semplice "Precise Ligation" delle estremità interrotte senza nessuna alterazione nella sequenza di informazioni. Si sa soltanto che in questo processo è coinvolta

l'endonucleasi I-SceI (*Rauet et al, 1994*). Dai risultati sperimentali è emerso che le micro-omologie terminali della sequenza di DNA possono giocare un ruolo nella riparazione delle DSBs, mentre la degradazione del filamento non è richiesta per esporre le sequenze complementari. Sembra che sia un processo semplice ed efficiente per prevenire riarrangiamenti non desiderati durante la riparazione. Si ipotizza che il meccanismo alla sua base sia simile a quello che porta all'addizione di nuove sequenze telomeriche alla fine di un cromosoma senza la perdita di un singolo nucleotide (*Sprung et al, 1999*).

L'oncosoppressore p53 gioca una ruolo essenziale nella risposta cellulare al danno al DNA e nel mantenimento della stabilità genomica nelle cellule di mammifero (*Liu et al, 2001*). L'osservazione che una mutazione nel gene *p53* è stata riscontrata in più della metà dei tumori umani sottolinea l'importanza della p53 nel preservare l'integrità del genoma. La complessa pathway a cui appartiene p53 può rispondere alle DSBs comportando l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del danno e l'apoptosi. P53 agisce in questa pathway regolando la trascrizione di numerosi geni specifici.

In cellule normali la proteina p53 viene fosforilata dalle chinasi del ciclo cellulare ATM, ATR e DNA-PK quando si introduce una lesione sulla doppia elica. Nonostante sia ben chiaro il rapporto tra la fosforilazione di p53 e le varie chinasi del ciclo cellulare nel controllo dei checkpoints, la biologia e la localizzazione sub-cellulare delle fosfoforme di p53 durante l'iniziale percezione del danno al DNA non sono ancora ben conosciute. È stato visto che la fosforilazione di p53 alla serina-15 indebolisce il legame di quest'ultima con MDM2 e permette alla p53 stessa di accumularsi nel nucleo e di esercitare le sue funzioni (*Shieh et al, 1997*).

Inoltre, Al Rashid e collaboratori (*Al Rashid et al. 2005*) hanno scoperto che foci di p53 fosforilata alla serina-15 si accumulano nei siti di formazione di una DSB. L'accumulo di questi foci è dipendente da ATM e colocalizza con i foci di γH2AX. Questi stessi ricercatori, utilizzando linee isogeniche umane che esprimevano una p53 mutata alla serina-15 hanno osservato una difettiva formazione di foci p53 nel nucleo, una ridotta associazione dei foci di p53 con i foci di γH2AX ed una cinetica di riparazione delle DSBs alterata. Questi risultati dimostrano che la fosfoforma $p53^{serina-15}$ è una porzione della p53 cellulare totale che si associa alla cromatina durante lo step iniziale della risposta cellulare al danno al DNA, ed indicano una interazione tra ATM e $p53^{serina-15}$ nei siti di induzione di DSBs.

Bishop et al. (2003) hanno osservato un incremento nell'efficienza dell'HR in topi con p53 mutata o assente ed ipotizzarono quindi che la p53 regolasse negativamente l'HR. Recentemente, queste osservazioni sono state confermate da altri lavori che hanno dimostrato la diretta interazione di p53 con proteine coinvolte nell'HR come RPA (*Romanova et al, 2005*) e RAD51 (*Orre et al, 2006*).

Studi sulla regolazione del NHEJ da parte della p53 hanno sempre dato risultati contrastanti.

Dahm-Daphi et al, (2005) hanno dimostrato che l'espressione di una p53 wild-type diminuisce di 250 volte la frequenza di micro-delezioni nucleotidiche associate alla riparazione se comparata con una p53 mutata. La p53 perciò sembra preservare la cellula da un "error-prone rejoining" delle due estremità. Il ruolo della p53 nel NHEJ sembra coinvolgere un meccanismo diretto (differente dalla trans-attivazione) che facilita l'appaiamento di estremità di DNA con sequenze di micro-omologia. *Okorokov et. al, (2002*) ottennero un drammatico incremento del "DNA end-joining" in cellule $p53^{-/-}$ e scoprirono che la p53 si legava *in vitro* alle estremità delle DSBs proteggendole dall'attacco dell'esonucleasi e quindi dall'intervento della ligasi IV.
Inoltre, *Lin e collaboratori (2003*) riscontrarono, su fibroblasti di topo, che il trattamento con PFT-α (un inibitore sintetico di p53) riduceva di circa 10 volte l'efficienza del "Precise Ligation" concludendo che la p53 potrebbe facilitare il reclutamento di questo meccanismo di riparo ad alta fedeltà.
Facilitando il PL e regolando l'HR ed il NHEJ la proteina p53 può assicurare la massima protezione contro le alterazioni indotte dalle DSBs.
Tuttavia, è stato ampiamente dimostrato che in cellule A-T la fosforilazione della p53 è difettiva o non si verifica affatto (*Shieh et al, 1997*).
In questo contesto già così complesso, abbiamo saggiato l'effetto di un inibitore sintetico della proteina p53, la PFT-α, per investigare sul ruolo di questa proteina nella risposta cellulare al danno da radiazioni in linee cellulari con diverse mutazioni nel gene *ATM*. Ci siamo proposti di chiarire se mutazioni nel gene *ATM* differenti comportino alterazioni diverse nella cinetica di riparo delle DSBs. Inoltre, il nostro scopo è stato quello di verificare se la proteina p53 sia coinvolta nella riparazione delle DSBs in assenza di ATM ed eventualmente in quale meccanismo di riparazione intervenga.
Dai risultati ottenuti con il comet assay emerge un quadro contrastante riguardo il coinvolgimento della p53 nella riparazione delle DSBs nelle cellule A-T (vedi Tabella 8.b.). L'aumento del mean tail moment riscontrato nei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni sia nella linea wild-type che nelle due linee AT21RM ed AT28RM, ci porta ad ipotizzare che la p53 sia coinvolta in qualche modo nella riparazione delle DSBs in queste linee; riparazione che nelle linee difettive per ATM risulta essere molto ritardata nel tempo rispetto alla linea wild-type. Comunque, essendo difettiva in queste linee la fosforilazione di p53 da parte di ATM, rimane da stabilire se siano coinvolte in questo caso altre proteine chinasi nella fosforilazione/stabilizzazione della p53 in assenza di ATM.
La fosforilazione di p53 è mediata in vivo ed in vitro dalle chinasi ATM ed ATR, la cui attività è stimolata dal trattamento delle cellule con agenti danneggianti (*Banin et al, 1998*). Ma, mentre ATM agisce nei tempi immediatamente successivi l'induzione del danno, la chinasi ATR si attiva con ritardo e la sua azione è meno vigorosa.

Dai dati provenienti dal comet assay si evince indirettamente che sebbene l'irradiazione provochi induzione della p53 in tutte le linee analizzate, l'attivazione è molto meno repentina nelle linee A-T rispetto al wild-type.
L'aumento statisticamente significativo del mean tail moment anche a tempi di recupero successivi al t=0 nei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni, ci suggerisce che il pre-trattamento di 3 ore con la PFT-α rende la cellula incapace di procurarsi nuova p53 funzionante una volta che l'inibitore è entrato nella cellula. Ossia, in presenza di PFT-α, la funzionalità della p53 non viene restaurata neanche 24 ore dopo il trattamento sia nel wild-type che nelle due linee A-T.
È interessante notare che la PFT-α manifesta il suo effetto inibitore sulla p53 sia in presenza di ATM funzionante e quindi di una risposta pronta della cellula alla lesione sul DNA (nel wild-type), sia in sua assenza e cioè quando il processo riparativo prende il via con ritardo (nelle linee A-T).
Delle conclusioni possono essere tratte da queste prime osservazioni: la prima è che la quantità (32%) sub-ottimale di proteina ATM espressa dalla linea AT21RM può essere intrinsecamente difettiva e comunque non basta per provocare una normale regolazione della risposta cellulare p53-dipendente. La seconda, basandosi sull'effetto inibitorio della PFT-α sulla p53 nelle linee AT21RM ed AT28RM, rafforza l'ipotesi dell'intervento in vivo di una chinasi addizionale, probabilmente ATR, nella fosforilazione di p53 in cellule A-T (*Canman et al, 1998*). La terza è che la p53, anche se attivata con ritardo, sembra intervenire nel processo di riparazione delle DSBs in cellule A-T.
Il comportamento della linea AT97RM in presenza di PFT-α è risultato, invece, del tutto differente dalle altre. In questa linea, infatti, il mean tail moment dei campioni co-trattati con PFT-α e radiazioni appare identico o comunque non significativamente alterato rispetto a quello dei campioni solamente irradiati a tutti i tempi di recupero analizzati, eccetto al tempo di 24 ore dove si osserva una riduzione del mean tail moment in presenza di PFT-α. Una prima riflessione ci ha portato a concludere che questo mancato effetto della PFT-α derivi da una mancata induzione della proteina p53 in questa linea. A parziale conferma di ciò il fatto che, nella linea AT97RM, la riparazione delle DSBs (espressa come percentuale di riduzione del mean tail moment) è risultata essere completamente assente dato che il valore del mean tail moment ottenuto al t=0 non si riduce neanche dopo 24 ore dal trattamento con raggi-x. In questa linea, la risposta cellulare al danno al DNA risulta altamente squilibrata: si manifestano infatti contemporaneamente la mancanza di ATM funzionante ed una mancata induzione della proteina p53. Perciò, in questa linea, sembra essere difettivo anche l'intervento di chinasi dei checkpoints addizionali che attivano p53, tipo ATR e DNA-PK.
I risultati del comet assay acquistano più valore se integrati con quelli delle aberrazioni cromosomiche ottenuti nella fase G_2 del ciclo cellulare dopo irradiazione delle linee in presenza ed in assenza di PFT-α. Anche in termini di aberrazioni cromosomiche le 3 linee A-T sono risultate molto

più sensibili della linea wild-type confermando che la mancanza della proteina ATM funzionante provoca un disequilibrio nei meccanismi di segnalazione e rimozione della rottura a doppia elica (*Morrison et al, 2000; Rotman e Shiloh 1999*). La più elevata induzione di rotture cromatidiche si presenta comunque nella linea AT97RM ad ambedue le dosi di irradiazione utilizzate. Perciò la contemporanea assenza di ATM funzionale e l'ipotizzata mancata attivazione della p53 rendono questo tipo cellulare il più instabile e maggiormente soggetto ad insorgenza di danno citogenetico.
L'aumento significativo delle aberrazioni per cellula riscontrato nella linea wild-type e nelle linee AT21RM ed AT28RM nei campioni irradiati in presenza di PFT-α, concorda con i risultati ottenuti con il comet assay, dove avevamo trovato un corrispondente aumento del mean tail moment negli stessi campioni. L'inibizione della funzione di p53 provoca, in queste cellule, una disfunzione nel processo riparativo delle DSBs che si manifesta in una elevata formazione di rotture cromosomiche una volta che la cellula transita nella fase G_2 del ciclo cellulare. Tuttavia nel wild-type, non possiamo chiarire se l'aumento delle aberrazioni cromatidiche riscontrato in presenza di PFT-α sia dovuto al mancato intervento della p53 nel processo riparativo oppure al fatto che, inibendo p53, potrebbe essere stato inattivato anche il checkpoint G_2, provocando un arrivo precoce della cellula in mitosi, riducendo il tempo per riparare le rotture. Infatti, *Pantelias et al, (2005*) dimostrarono che la disattivazione del checkpoint G_2 porta alla prematura condensazione della cromatina ed alla conversione della DSB non riparata in una rottura durante la transizione G_2/M.
Lo stesso discorso può essere applicato all'induzione di apoptosi p53 dipendente. Infatti, l'aumento del danno citogenetico riscontrato nei campioni co-trattati con PFT-α potrebbe essere una conseguenza del mancato innesco dell'apoptosi p53 dipendente nella linea wild type.
Diversa è la questione nelle linee A-T nelle quali il checkpoint G_2 non esiste di per sé (*Iliakis et al, 2003*) e la via apoptotica è già compromessa (*Meijer et al. 1999*). In questo caso l'aumento delle rotture osservato nei campioni co-trattati con PFT-α può essere dovuto soltanto al mancato intervento della p53 nella segnalazione/riparazione delle DSBs indotte.
Non è chiaro però in quale meccanismo di riparazione intervenga la p53 anche se, come abbiamo detto, è soprattutto l'HR che opera nella fase G_2.
Inoltre è stato dimostrato già ampiamente (*Ward et al, 1994 e Nygren et al, 1995*) che sia la conformazione strutturale della cromatina sia la presenza di proteine legate al DNA offrono protezione alla doppia elica contro le radiazioni. Possiamo quindi speculare che l'aumento della radiosensibilità osservato in presenza di PFT-α potrebbe essere dovuto ad un "mancato scudo protettivo" offerto dalla p53 alla doppia elica. La PFT-α infatti, interferendo sul processo di "import-export" della p53, potrebbe diminuire la concentrazione di p53 disponibile nel nucleo per formare questo "scudo protettivo". Nella linea AT97RM, dove la p53 sembra non attivarsi affatto, in presenza di PFT-α si verifica invece una diminuzione significativa ($p<0.01$) delle aberrazioni per

cellula. La diminuzione di aberrazioni osservata in presenza di PFT-α potrebbe essere dovuta alla stimolazione dell'Homologous Recombination" (HR), il processo riparativo per "ricombinazione omologa" operante durante le fasi S e G_2 del ciclo cellulare per rimuovere le DSBs (*Sonoda et al. 2006*). Per dare maggiore significato a questa ipotesi abbiamo esaminato l'induzione di SCE's (scambi tra cromatidi fratelli) su linee cellulari di ovario di hamster cinese difettive per la riparazione. In particolare abbiamo utilizzato una linea difettiva per l'HR (irs1SF) ed una per il NHEJ (V3-3). L'aumento significativo della presenza di SCE's nei campioni co-trattati con PFT-α e mitomicina-C riscontrato nella sola linea V3-3, difettiva per il NHEJ ma proficiente per l'HR, (vedi Grafico 8.g.) ci suggerisce che la PFT-α potrebbe interferire con il processo di riparazione per ricombinazione omologa migliorandone in qualche modo l'efficacia. Infatti, essendo la formazione di un SCE un processo controllato direttamente dall'HR, l'aumento della presenza di SCE's in campioni co-trattati con PFT-α è il risultato citogenetico della stimolazione dell'HR.
È interessante notare che la PFT-α non manifesta lo stesso effetto in una linea wild-type (AA8) in cui sono operanti ambedue i meccanismi di riparazione HR e NHEJ.
Rimane da stabilire quale, o quali siano i meccanismi con cui si verifica la stimolazione dell'HR e verso quali "target" si indirizza l'attività della PFT-α.
Lo studio "step by step" dell'induzione e della localizzazione di proteine coinvolte nei due processi di riparazione delle DSBs in presenza di PFT-α pensiamo sia l'approccio adatto per svelare questo interrogativo.
In questa tesi ci siamo occupati di esaminare, tramite western blotting a tre ore dall'irradiazione in presenza ed in assenza di PFT-α, l'induzione della p53 e di RAD51, una proteina direttamente coinvolta nella pathway di riparazione per ricombinazione omologa.
L'induzione dell'espressione della proteina p53 nei campioni irradiati e la sua inibizione da parte della PFT-α è confermata dai risultati del western blotting soltanto per la linea wild-type e per la linea AT21RM. In queste due linee perciò l'aumento del mean tail moment e delle aberrazioni per cellula può essere correlato con l'effetto inibitorio della PFT-α sulla p53. Nella linea AT28RM non si riscontra attivazione di p53 dopo irradiazione con il western blotting ma l'aumento sia del mean tail moment che delle aberrazioni per cellula riscontrato nei campioni co-trattati con PFT-α suggerisce che, in qualche modo, l'intervento della p53 venga modulato dalla PFT-α anche in questa linea. Invece, la mancata attivazione della p53 in seguito a radiazione nella linea AT97RM osservata col western blotting sembra sostenere la nostra ipotesi che spiega il mancato effetto inibitorio della PFT-α sulla p53 con la mancata induzione della proteina stessa. Per questa linea abbiamo supposto un "target alternativo" per la PFT-α in assenza di espressione di p53.
RAD51 è una proteina direttamente coinvolta nella pathway di riparazione per ricombinazione omologa. Essa agisce legandosi alle sequenze di omologia presenti nella sequenza di DNA

favorendo l'appaiamento dei filamenti durante il processo riparativo. Dai risultati del western blotting non possiamo concludere che la PFT-α moduli l'espressione di questa proteina poiché non abbiamo riscontrato differenze nei profili delle bande di espressione di RAD51 in seguito ad irradiazione e co-trattamento con PFT-α in nessuna delle linee analizzate. Tuttavia, nel caso in cui avessimo trovato una differenza nell'espressione di RAD51 nei nostri campioni dopo irradiazione o co-trattamento con PFT-α, il risultato doveva essere integrato con uno studio di induzione di foci di questa proteina, per essere sicuri che la ri-localizzazione di RAD51 avvenga effettivamente ai siti di riparazione.

Inoltre, uno studio concernente l'espressione di proteine condotto su linee asincrone rende difficile distinguere in quale fase del ciclo cellulare avvenga l'espressione di una proteina.

Essendo il NHEJ il meccanismo di riparazione il preminente nella fase G_1 del ciclo, lo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte in questa fase del ciclo ci ha permesso di indagare sul ruolo della p53 nel NHEJ in A-T (Tabelle 8.e.; 8.f).

Nelle tre linee A-T, a 24 ore dall'irradiazione, compaiono già i cromosomi dicentrici, segno evidente che in queste linee il checkpoint G_1 risulta difettivo. In cellule A-T perciò, sono sufficienti 24 ore ad una DSB per arrivare in metafase sotto forma di scambio. Nella linea wild-type invece, dove i checkpoints del ciclo cellulare sono funzionanti, bisogna aspettare 48 ore dall'irradiazione per visualizzare cromosomi dicentrici; dopo 24 ore infatti, in questa linea osserviamo la prevalente insorgenza di scambi di tipo cromatidico. A 48 ore dall'irradiazione nelle linee A-T il numero di dicentrici riscontrato su 100 cellule aumenta. Questo risultato ci porta a ipotizzare la presenza di un arresto prolungato delle cellule danneggiate, contenenti dicentrici, in metafase. La stessa conclusione era stata postulata nella mia tesi di laurea eseguita nel 2003 sempre su linee A-T.

L'aumento della aberrazioni (e delle cellule contenenti aberrazioni) riscontrato nella linea wild-type e nelle linee AT21RM e AT28RM nei campioni co-trattati con PFT-α conferma il dato ottenuto in G_2 che ci suggeriva uno squilibrio nei processi riparativi quando la p53 viene inibita con la PFT-α.

Tuttavia, mentre nel wild-type l'aumento delle aberrazioni totali in presenza di PFT-α è dovuto all'incremento dei soli scambi, nelle linee A-T deriva unicamente dall'aumento delle rotture, mentre il numero degli scambi rimane invariato o diminuisce. Essendo lo scambio la conseguenza visibile di un "ricongiungimento errato" di due estremità libere provenienti da diverse DSBs (*Cornforth and Bedford, 1993*) questo risultato indica che, in cellule A-T, la p53 potrebbe avere un ruolo nel processo di "rejoining" delle DSBs. Il mancato incremento nella frequenza degli scambi coincidente con un aumento delle rotture è il segno evidente che in A-T in presenza di PFT-α il "rejoining" delle DSBs è compromesso. Le DSBs prodotte in G_1 permangono "aperte" ed in metafase è visibile un numero più elevato di rotture.

Nella linea wild-type il "rejoining" delle DSBs non sembra essere compromesso in presenza di PFT-α poiché la frequenza di scambi sia cromatidici che cromosomici aumenta. In questo caso la p53 non sembra avere un ruolo nel meccanismo di "rejoining" delle DSBs. In assenza di p53 infatti aumentano gli eventi di "mis-riparazione" di una DSB che si manifestano come scambio alla mitosi. Tuttavia non possiamo escludere che l'aumento del danno citogenetico riscontrato in presenza di PFT-α sia dovuto anche al mancato innesco del checkpoint G_1 p53-dipendente, che determina l'arrivo in fase-S di un maggior numero di lesioni non riparate. Lo stesso discorso vale per l'apoptosi p53-dipendente.

La medesima supposizione non si applica alle cellule A-T, nelle quali il checkpoint G_1 è difettivo o dipendente da altre chinasi del ciclo cellulare (ATR, DNA-PK) che operano con ritardo in risposta al danno al DNA (*Yang et al. 2003*).

Nella linea AT97RM, l'inibitore della p53 PFT-α non mostra effetto neanche sulle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase in G_1. Anche in questo caso il mancato effetto della PFT-α può essere imputato all'assenza di attivazione della p53 riscontrata in questa linea con il western blotting. In questa linea, è interessante notare che per lesioni indotte in G_1 dove opera prevalentemente il NHEJ, non si verifica la diminuzione di aberrazioni osservata per le lesioni indotte in G_2, e nemmeno l'aumento osservato nel wild type e nelle altre due linee A-T.

Questa osservazione avvalora l'ipotesi da noi formulata riguardo l'eventuale altro target della PFT-α in questa linea che secondo noi è da ricercare nella pathway che sovrintende la riparazione per ricombinazione omologa operativa nella fase G_2.

In futuro ci proponiamo di verificare questa ipotesi e di stabilire il meccanismo con cui la PFT-α modula l'intervento dell'HR nella linea AT97RM. La strategia potrebbe essere quella di utilizzare per gli esperimenti altre linee A-T recanti la stessa mutazione (nel dominio di legame tra ATM e p53). Un'altra stimolante sfida per noi sarà quella di capire cosa accade all'HR nelle altre linee in presenza di PFT-α.

È possibile che la PFT-α possa avere altri effetti oltre a quello di inibire la p53 e ci proponiamo di eseguire ulteriori esperimenti per verificare con certezza i "target" della PFT-α in sistemi cellulari simili al nostro.

Altro nostro obbiettivo sarà quello di saggiare l'effetto della PFT-α sulla p53 utilizzando un anticorpo anti-$p53^{ser15}$, essendo questa la "fosfoforma" che si lega ai siti di rottura della doppia elica (*Al Rashid et al, 2005*). Soltanto così potremo ottenere risultati convincenti sull'effettivo coinvolgimento della p53 nei processi di riparazione in cellule A-T.

In conclusione, i nostri risultati sembrano affermare che, quando attivata da altre chinasi del ciclo cellulare, la proteina p53 interviene nel processo di riparazione delle DSBs prodotte sia in G_2 che in G_1 in cellule di Ataxia Telangiectasia, favorendo il processo di "rejoining" delle rotture stesse.

L'aumento delle rotture cromosomiche, in presenza di un inibitore di p53, riscontrato sia nella fase G_1 che nella fase G_2 del ciclo cellulare non ci permette di stabilire su quale meccanismo di riparazione la p53 intervenga. Tuttavia dalla letteratura sappiamo che la p53 inibisce la ricombinazione omologa (*Bishop et al, 2003*): possiamo ipotizzare che la p53 intervenga nel NHEJ e nel "Precise Ligation".

(Danno ossidativo) Dato che il danno al DNA provocato dallo stress ossidativo è cruciale nella patogenesi della A-T soprattutto nella parte che conduce alla neurodegenerazione, abbiamo investigato se il trattamento con l'L-Carnitina (L-C) riesca a proteggere il DNA delle cellule A-T da questo tipo di insulto. L-C è una piccola molecola endogena presente in tutti i mammiferi. Essa regola il bilancio energetico attraverso le membrane cellulari modulando il trasporto degli acidi grassi dentro il mitocondrio e la loro seguente β-ossidazione. Data la sua intrinseca interazione con i processi bioenergetici cellulari, l'L-C gioca un ruolo importante nella genesi di malattie dove alcuni processi metabolici risultano compromessi specialmente quelli associati all'attività mitocondriale (*Puca et al, 1990*). È noto che la somministrazione di L-C porta importanti benefici in molte situazioni fisiopatologiche come l'ischemia (*Reznick et al, 1992*), danni al miocardio (*Singh el al, 1996*), e malattie neurodegenerative (*Virmani et al, 2004*) eliminando i radicali liberi o riducendo la loro formazione. Nonostante questo, non sono ancora chiare le proprietà farmacologiche della L-C in malattie associate ai ROS come il cancro (*Jackson et al, 2001*).
Nel nostro studio abbiamo comparato l'effetto della L-C in cellule A-T con quello del Mannitolo (Mann), un noto "scavenger" di radicali liberi, attraverso l'analisi del danno indotto dal *t*-Butyl-OOH, la velocità di riparazione del danno e l'induzione di aberrazioni cromosomiche nelle fasi G_2 e G_1 del ciclo cellulare.
I nostri risultati indicano che il *t*-Butyl-OOH causa una marcata induzione di danno al DNA (t=0), come rilevato dal comet assay. Tuttavia, le varie linee cellulari mostrano sensibilità differente al danno ossidativo dovuta alla variabilità inter-individuale esistente tra i donatori. La cinetica di riparazione è stata studiata osservando la variazione del mean tail moment 1, 4 e 24 ore dopo il trattamento con l'agente ossidante. Abbiamo rilevato che la linea wild-type mostra un elevatissima capacità riparativa già dopo 1 ora di recupero dopo il trattamento con *t*-Butyl-OOH suggerendo la presenza di un processo riparativo veloce ed efficiente in questa linea. Al contrario le tre linee A-T mostrano una bassa capacità di riparare il danno allo stesso tempo di recupero dopo trattamento con *t*-Butyl-OOH indicando che la mancanza di ATM funzionante provoca, nelle cellule dei pazienti, una marcata difficoltà al rispondere allo stress ossidativo. È importante sottolineare come pazienti con diversa mutazione nel gene *ATM* rispondono differentemente al danno ossidativo: infatti mentre le linee AT21RM ed AT28RM mostrano, seppur a tempi tardivi (24 ore), capacità di

rimuovere la lesione dal DNA, la linea AT97RM si rivela impotente nel far fronte ad un insulto ossidante anche trascorse 24 ore. Inoltre i nostri dati provenienti dal comet assay in presenza ed in assenza di L-C e Mann suggeriscono che l'L-C aumenta la quantità di danno riparato e la velocità di riparazione dalle lesioni indotte dal *t*-Butyl-OOH in cellule A-T. Questo fenomeno si verifica significativamente soltanto a tempi molto precoci (1 ora) dopo l'induzione della lesione ma in tutte le linee A-T analizzate. Più in generale comunque, l'effetto della L-C nel ridurre lo stress ossidativo è molto più pronunciato di quello del Mann. Questo effetto della L-C sulla riparazione potrebbe essere dovuto ad un incremento dello stato energetico delle cellule dei campioni sottoposti al pre-trattamento con L-C per 48 ore. Un'altra spiegazione possibile per questa differenza potrebbe essere che l'L-C non aumenti il riparo delle basi ossidate, visualizzato come scomparsa della rottura a singolo filamento con il comet assay, ma prevenga la formazione della rottura stessa contrastando la generazione di una base ossidata.

Lo studio del danno citogenetico indotto dal *t*-Butyl-OOH nella fase G_2 del ciclo cellulare ha mostrato un aumento significativo delle delezioni in cellule A-T, in accordo con i risultati di altri reports (*Shackelford et al, 2006*). Sorprendentemente, la presenza di un elevato numero di rotture cromatidiche indica che il *t*-Butyl-OOH induce rotture a doppia elica specialmente in cellule A-T. I risultati ottenuti dopo trattamento delle cellule nella fase G_1 hanno mostrato l'induzione di aberrazioni di tipo sia cromatidico che cromosomico in cellule A-T. Un aspetto da sottolineare è che, in seguito a trattamento con *t*-Butyl-OOH, abbiamo rilevato la presenza di cromosomi dicentrici soltanto nelle tre linee A-T e non nella linea wild-type. La presenza di cromosomi dicentrici in cellule A-T, suggerisce che l'incapacità di rispondere alla condizione di stress ossidativo a cui sono sottoposte costantemente queste cellule, può provocare anche la formazione di DSBs "miss-riparate". Questo evento può essere dovuto alla permanenza sul filamento della SSB che col tempo si trasforma in DSB, oppure alla elevata induzione di SSBs in cellule A-T che, inevitabilmente vicine, generano indirettamente una DSB. In accordo con i risultati del comet assay abbiamo rilevato inoltre che l'L-C ha un effetto protettivo anche nella formazione di danno citogenetico indotto dal *t*-Butyl-OOH in tutte la fasi del ciclo cellulare, e che questo effetto, risulta molto più marcato di quello del Mannitolo. Tuttavia, occorre ricordare che l'effetto dell'L-C sulla riparazione si manifesta entro l'ora seguente l'induzione della lesione e ciò suggerisce che questo composto influenzi più il tipo di lesione provocata dal *t*-Butyl-OOH e perciò la sua "riparabilità" piuttosto che il meccanismo di formazione delle alterazioni cromosomiche in generale.

In finale, come era da aspettarsi, abbiamo osservato che il trattamento con *t*-Butyl-OOH provoca l'inibizione della crescita cellulare soltanto nelle cellule wild-type e non nelle cellule difettive per ATM. Infatti le cellule A-T, sebbene portatrici di un più elevato danno cromosomico, proliferano molto meglio delle cellule normali mancando di un controllo ai checkpoints. Il trattamento con L-C

non protegge le cellule wild-type dall'inibizione della proliferazione indotta dal *t*-Butyl-OOH mentre sembra favorire la proliferazione delle cellule A-T diminuendo il loro danno citogenetico. Il trattamento con L-C sembra migliorare la capacità della cellula di riparare il danno cromosomico prima che arrivi alla mitosi. Infatti la modulazione della riparazione del danno al DNA attraverso l'L-C come meccanismo alternativo per contrastare la clastogenicità dello stress ossidativo è un concetto supportato anche dai risultati ottenuti da *Boerritger et al, nel 1993*. In definitiva con i nostri esperimenti abbiamo dimostrato un effetto protettivo e specifico della L-C nel ridurre lo stress ossidativo in cellule A-T sia in termini di danno primario sia in termini di formazione di aberrazioni cromosomiche.

Queste osservazioni possono rappresentare un importante strumento da utilizzare per ricerche più approfondite sulla possibile applicazione farmacologica della L-C nella terapia dei pazienti colpiti da Atassia Telangiectasia.

Conclusioni:

Sebbene il concetto di danno al DNA e riparazione sia di cruciale importanza per spiegare la patogenesi di molte malattie ed adottare eventuali cure, il funzionamento di questi meccanismi è ancora lontano dall'essere capito.

Per esempio, la duplice natura dei ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno), con le loro deleterie proprietà in termini di stress ossidativo per la cellula ma con il loro determinante coinvolgimento nei processi di formazione di energia, testimonia come diventi difficile disegnare una strategia mirata a curare le malattie genetiche che manifestano neurodegenerazione collegata all'attività dei ROS. Nell'identificare la strategia da seguire per curare i sintomi di questa malattia sarà importante tenere presente che uno degli effetti secondari delle radiazioni è proprio la generazione di ROS.

Le osservazioni ricavate dal nostro lavoro portano a confermare che lo "stress ossidativo" è un componente basilare del fenotipo clinico dei pazienti A-T. Tuttavia, un livello incrementato di ROS sembra essere secondario rispetto al difetto basilare di queste cellule (che è la risposta difettiva alle DSBs), ma non si può prescindere da questa osservazione se si tenta di identificare il trattamento adatto per i pazienti A-T.

Un altro interrogativo interessante emerso dal nostro studio sulla risposta delle cellule A-T ad un insulto ossidante riguarda proprio la modalità di formazione di una DSB: è più nociva o letale per una cellula A-T una DSB prodotta direttamente dalla radiazione oppure quella generata indirettamente da due SSBs non riparate e strettamente vicine tra loro "nel tempo e nello spazio"? La riduzione dello stress ossidativo attraverso una dieta ricca di antiossidanti potrebbe essere una valida strategia per alleviare i sintomi di questa devastante malattia.

Come abbiamo visto però sarà difficile trovare una strategia comune per tutti i pazienti poiché linee cellulari con mutazioni differenti rispondono diversamente ai vari trattamenti.
Quali sono le implicazioni cliniche che potremmo trarre dal capire le basi molecolari del difetto che conduce all'Atassia Telangiectasia? Poiché la proteina ATM ha un ruolo centrale nel mantenere l'omeostasi cellulare se si riuscisse a capire bene il meccanismo di azione di questa proteina, otterremo informazioni addizionali riguardo la risposta al danno al DNA in cellule umane e si aprirebbero nuove frontiere per la comprensione ed il trattamento di malattie genetiche associate a difetti nella riparazione e che manifestano il grave sintomo della neurodegenerazione.

BIBLIOGRAFIA

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev 15, pp. 2177-2196 (2001).

Ahn J et al. Down-regulation of the stathmin/Op 18 and FKBP25 genes following p53 induction. Oncogene 18, 5954-5958 (1999).

Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coackley C, Folkard M, Xu Y, Chen BP, Chen DJ, Lilge L, Prise KM, Bazett Jones DP, Bristow RG. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. Cancer Res. 2005 Dec 1;65(23):10810-21.

Amundson SA, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ Jr. Induction of gene expression as a monitor of exposure to ionizing radiation. Radiat Res. 2001 Nov;156(5 Pt 2):657-61

Andegeko Y et al. Nuclear retention of ATM at sites of DNA double-strand breaks. J. Biol. Chem. 276, pp. 38224-38230 (2001).

Ashkenazi A and Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 281, 1305-1308 (1998).

Bakkenist CJ and Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science. 1998 Sep 11;281(5383):1674-7.

Barak Y, Juven T. Haffner R and Oren M. Mdm2 espression is induced by wild-type p53 activity. EMBO J. 12, 461-468 (1993)..

Bargonetti J et al. A proteolytic fragment from the central region of the p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from an oncogenic mutant p53 protein. Genes Dev. 7, 2565-2574 (1993).

Bartek J, Falck J, Lukas J. CHK2 kinase: a busy messenger. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Dec;2(12):877-86.

Bernardi R, Pandolfi PP. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. Oncogene 22, 9048-9057 (2003).

Bishop AJ, Hollander MC, Kosaras B, Sidman RL, Fornace AJ Jr, Schiestl RH. Atm^{-}, p53^{-}, and Gadd45a^{-} deficient mice show an increased frequency of homologous recombination at different stages during development. Cancer Res. 2003 Sep 1;63(17):5335-43.

Boerrigter M, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of l-carnitine and acetyl-l-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood. Carcinogenesis 1993; 14: 2131–2136.

Boué J, Boué A. Spontaneous abortion in women: cytogenetic and epidemiological studies. Rev Fr Gynecol Obstet. 1973 Nov;68(11):625-43. French.

Bryant PE. Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam H1: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1984 Jul;46(1):57-65.

Bullock AN and Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. Nat. Rev. Cancer 1 68-76 (2001).

Bullock AN. et al. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. Oncogene. 2000 Mar 2;19(10):1245-56.

Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. Carcinogenesis 23, 2011-2018 (2002).

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. Science. 1998 Sep 11;281(5383):1677-9.

Casper, A. M., Nghiem, P., Arlt, M. F., Glover, T. W. ATR regulates fragile site stability. Cell 111, pp. 779-789 (2002).

Chen MJ, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EY. ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. J Biol Chem. 2001 May 11;276(19):16580-6. Epub 2001 Feb 6.

Chiu SM, Sokany NM, Friedman LR, Oleinick NL. Differential processing of ultraviolet or ionizing radiation-induced DNA-protein cross-links in Chinese hamster cells. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1984 Dec;46(6):681-90.

Cho Y et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science. 1994 Jul 15; 265 (5170): 346-55.

Conger AD. and Fairchild LM. Breakage of chromosomes by oxygen, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 38 (1952) 289–299.

Cornforth and Bedford. Ionizing radiation damage and its early development in chromosomes. Adv. Radiat. Biol. 17 (1993), pp. 423–496.

Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. Science. 2001 Nov 23;294(5547):1713-6

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. Science. 1999 Nov 5;286(5442):1162-6.

Coutts AS, La Thangue NB. The p53 response: Emerging levels of co-factor complexity. Biochemical and Biophysical Research Communications 331, 778-785 (2005).

Dahm-Daphi J, Hubbe P, Horvath F, El-Awady RA, Bouffard KE, Powell SN, Willers H. Non-homologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. Oncogene. 2005 Mar 3;24(10):1663-72.

D'Amours D. and Jackson SP. The MRE11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 3, pp. 317-327 (2002).

Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defense, and damage removal, repair, and replacement systems, IUBMB Life 50 (2000) 279–289.

De Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, Lowe SW. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. Mol. Cell 13, 523-535 (2004).

Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M, Oppitz U. Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. Lab Invest. 1999 Jun;79(6):699-705.

Evans, HJ. Actions of radiations on human chromosomes. Phys Med Biol 17(1), 1-13 (1972)

Falck J., Petrini J H, Williams BR, Lucas, J, Bartek, J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpiont is regulated by parallel pathways. Nature Genet. 30, pp. 290-294 (2002).

Foray N. et al. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. Mol. Cel. Biol. 22, pp. 4020-4032 (2002).

Foster BA et al. Pharmacological resque of mutant p53 conformation and function. Science 286, 2507-2510 (1999).

Friedler A. et al. A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: Chaperone strategy for rescue of ontogenic mutants. PNAS. 99, 937-942 (2002).

Gatti RA. et al. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. Mol. Genet. Metab. 68, 419-423 (1999).

Gellert. M. V(D)J recombination: rag proteins, repair factors, and regulation. Annu. Rev. Biochem. 71, 101-132 (2002).

Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. Int J Radiat Biol. 1989 Nov;56(5):623-34.

Guiloff RJ, Thomas PK, Contreras M, Armitage S, Schwarz G, Sedgwick EM Linkage of autosomal dominant type I hereditary motor and sensory neuropathy to the Duffy locus on chromosome 1. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1982 Aug;45(8):669-74.

Hahn WC. and Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. Nature Rev. Cancer 2, pp. 331-341 (2002).

Hainaut P. and Hollstan M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Adv Cancer Res. 2000;77:81-137. Review

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, Nature 387, 296-299 (1997).

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res. 1983 Sep;123(1):61-118.

Hekmat-Nejad M, You Z, Yee MC, Newport JW, Cimprich KA. Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. Curr Biol. 2000 Dec 14-28;10(24):1565-73.

Hoeijmakers JH. Genoma maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411, pp. 366-374 (2001).

Hollestein et al. Database of p53 gene somatic mutation in human tumors and cell lines. Nucleic Acids. 22, 3551-3555 (1994).

Honda R. and Yasuda H. Association of p19 (ARF) with MDM2 inhibits ubiquitin ligase activity of MDM2 for tumor suppressor p53. EMBO J. 18, 22-27 (1999).

Hupp TR. and Lane DP. Two distinct signalling pathways activate the laten DNA-binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. J. Biol. Chem. 270, 18165-18174 (1994).

Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. Ann Hum Genet. 1974 May;37(4):359-76.

Jackson AL and Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. Mutat. Res. 2001; 477: 7–21.

Jackson SP. Sensing and repair breaks. Carcinogenesis 523, pp. 687-696 (2002).

Jacobs PA, Melville M, Ratcliffe S, Keay AJ, Syme J. A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. Oncogene. 2003 Sep 1;22(37):5834-47.

Jeffrey PD et al. Crystal structure of the tetramerization domain of p53 tumor suppressor st 1.7 angstroms. Science. 276, 1498-1502 (1995).

Joseph TW, Zaika A, Moll UM. Nuclear and cytoplasmic degradation of endogenous p53 and HDM2 occurs during downregulation of the p53 response after multiple types of DNA damage. FASEB J. 17, 1622-1630 (2003).

Kamijo T et al. Functional and physical interaction of the ARF tumor suppressor with p53 and MDM2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 8292-8297 (1998).

Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. J. Natl Cancer Inst. 92, pp. 795-802 (2000).

Khanna KK and Jackson SP. DNA double-strand breaks: signalling, repair and the cancer connection. Nature Genet.27, pp. 247-254 (2001).

Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM, Yokomori K. Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. J Cell Biol. 2005 Aug 1;170(3):341-7.

Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. J Biol Chem. 1999 Dec 31;274(53):37538-43.

Kim ST, Xu B, Kastan MB. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. Genes Dev. 2002 Mar 1;16(5):560-70.

Kishi S. and Lu KP. A critical role for Pin2/TRF1 in ATM- dependent regulation. Inhibition of Pin2/TRF1 function complements telomere shortening, radiosensitivity, and the G(2)/M checkpoint defect of ataxia-telangiectasia cells. J. Biol. Chem. 277, pp. 7420-7429 (2002).

Kitao H. and Yuan ZM. Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl mediated phosphorylation. J. Biol. Chem. 277, pp. 48944-48948 (2002).

Komarov PG et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science. Sep 10; 285 (5434), 1733-7 (1999).

Kozlov S, Gueven N, Keating K, Ramsay J, Lavin MF. ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. J Biol Chem. 2003 Mar 14;278(11):9309-17.

Kurki S, Latonen L, Laiho M. Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. J. Cell Sci. 116, 3917-3925 (2003).

Latonen L et al. UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblast. Oncogene 20, 6784-6793 (2001).

Lee S et al. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell. 81, 1013-1020 (1995).

Levan A. The effect of colchicine on root mitosi in Allium. Hereditas 24: 471-486

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88, 323-331 (1997).

Lewitt NC. and Hickson ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. Trends Mol. Med. 8, 179-186 (2002).

Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. Nature. 2000 Jul 13;406(6792):210-5.

Lin Y. and Waldman AS. Capture of sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. Genetics. 158, 1665-1674 (2001).

Lin Y. et al. Promiscous patching of broken chromosomes im mammalian cells with extrachromosomal DNA. Nucleic Acids Res. 22, 3975-3981 (2001).

Lin Y. et al. Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin-α, a chemical inhibitor of P53. DNA Repair, 2, 1- 11 (2003).

Liu Y and Kulesz-Martin. P53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence specific and non-sequence-specific DNA binding. Carcinogenesis, 22, 851-860 (2001).

Ljungman M. and Lane D. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. Nat. Rev. Cancer 4, 727-737 (2004).

Louis-Bar Denise. Sur un syndrome progressif cormprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. Confinia Neurologica, 1941, 4: 32-42.

Louria-Hayon I, Grossman T, Sionov RV, Alsheich O, Pandolfi PP, Haupt Y. The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):33134-41. Epub 2003 Jun 16.

Lu H. and Levine AJ. Human TAFII31 protein is a trancriptional coactivator of the p53 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 5154-5158 (1995).

Mailand N. et al. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. Science 288, pp. 1425-1429 (2000).

Matlashewski G. P53: twenty years on, Meeting Review. Oncogene. 18, 7618-7620 (1999).

Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. Genes Dev. 2001 May 1;15(9):1067-77.

McKinnon PJ. Ataxia-telangiectasia: an inherited disorder of ionizing-radiation sensitivity in man. Progress in the elucidation of the underlying biochemical defect. Hum Genet. 1987 Mar;75(3):197-208.

Meek DW. The p53 response to DNA damage, DNA Repair 3, 1049-1056 (2004).

Meijer AE, Zhivotovsky B, Lewensohn R. Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines of ataxia telangiectasia patients are defective in X-ray-induced apoptosis. Int J Radiat Biol. 1999 Jun;75(6):709-16.

Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH. P73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. J. Biol. Chem. 279, 8076–8083 (2004).

Momand J, Zambetti GP, George DL, Levine AJ. The MDM2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 69, 1237-1245 (1992).

Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. Nature 378, 203-206 (1995).

Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. EMBO J. 2000 Feb 1;19(3):463-71. Erratum in: EMBO J 2000 Feb 15;19(4):786.

Natarajan AT and Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. I. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. Mutat Res. 1978 Oct;52(1):137-49

Natarajan AT and Obe G. Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. III. Restriction endonucleases. Chromosoma. 1984;90(2):120-7.

Nikolaev AY. et al. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. Cell. 112, 29-40 (2003).

Nygren J, Ljungman M, Ahnström G. Chromatin structure and radiation-induced DNA strand breaks in human cells: soluble scavengers and DNA-bound proteins offer a better protection against single- than double-strand breaks. Int J Radiat Biol. 1995 Jul;68(1):11-8.

Oka A, and Takashima S. Expression of the ataxia telagiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development, Neurosci. Lett. 252 (1998) 195–198.

Okorokov AL, Warnock L, Milner J. Effect of wild-type, S15D and R175H p53 proteins on DNA end joining in vitro: potential mechanism of DNA double-strand break repair modulation. Carcinogenesis. 2002 Apr;23(4):549-57.

Olive PL, Durand RE, Jackson SM, Le Riche JC, Luo C, Ma R, McLaren DB, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T. The comet assay in clinical practice. Acta Oncol. 1999;38(7):839-44.

Orre LM, Stenerlöw B, Dhar S, Larsson R, Lewensohn R, Lehtiö J. p53 is involved in clearance of ionizing radiation-induced RAD51 foci in a human colon cancer cell line. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Apr 21;342(4):1211-7. Epub 2006 Feb 24.

Pandita TK. The role of ATM in telomere structure and function. Radiat. Res. 156, pp. 642-647 (2001).

Perkins EJ. et al. Sensing of intermediates in V(D)J recombination by ATM. Genes Dev. 16, pp. 159-164 (2002).

Perry P. and Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature. 1974 Sep 13;251(5471):156-8.

Puca FM, Genco S, Specchio LM, Brancasi B, D'Ursi R, Prudenzano A, Miccoli A, Scarcia R, Martino R, Savarese M. Clinical pharmacodynamics of acetyl-l-carnitine in patients with Parkinson's disease. Int. J. Clin. Pharmacol. Res. 1990; 10: 139–143.

Redon C. et al. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. Curr. Opin. Genet. Dev. 12, pp. 162-169 (2002).

Regoli F. and Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite, peroxyl radicals, and hydroxyl radicals. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1999; 156: 96–105.

Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R, Tsuchiya M, Khwaja S, Serbinova EA, Packer R. Antiradical effects in l-propionyl carnitine protection of the hearth against ischemia-reperfusion injury: the possible role of iron chelation. Arch. Biochem. Biophys. 1992; 296: 394–401.

Romanova LY, Willers H, Blagosklonny MV, Powell SN. The interaction of p53 with replication protein A mediates suppression of homologous recombination. Oncogene. 2004 Dec 2;23(56):9025-33.

Roos-Mattjus P. et al. Genotoxin-induced Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) cromatin association is an early checkpoint signaling event. J. Biol. Chem. 277, pp. 43809-43812 (2002).

Rotman G, Shiloh Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. Oncogene. 1999 Nov 1;18(45):6135-44.

Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jun 21;91(13):6064-8.

Rouse J. and Jackson SP. Interfaces between the detection, signalling and repair of DNA damage. Science 297, pp. 547-551 (2002).

Ryan KM. Philips AC., Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. Curr Opin. Cell Biol. 13, pp. 332-337 (2001).

Sasaki MS. and Miyata H. Biological dosimetry in atomic bomb survivors. Nature. 1968 Dec 21;220(5173):1189-93

Scott SP. et al. Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99. 925-930 (2002).

Shackelford RE., Fu Y, Manuszak RP, Brooks TC, Sequeira AP, Wang S, Lowery-Nordberg M, Chen A. Iron chelators reduce chromosomal breaks in ataxia-telangiectasia cells. DNA Repair 2006; 5: 1327-1336.

Shaulian E. et al. Identification of minimal trasforming domain of p53: negative dominance througth abrogation of sequence-specific DNA binding. Mol. Cell. Biol. 12, 5581-5592 (1992).

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell. 1997 Oct 31;91(3):325-34.

Shiloh Y. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. Biochem Soc Trans. 2001 Nov;29(Pt 6):661-6.

Singh RB, Niaz MA, Agarwal P, Beegum R, Rastogi SS, Sachan DS. A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of l-carnitine in suspected acute myocardial infarction. Post-grad. Med. J. 1996; 72: 45–50.

Sonoda E, Hochegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA Repair (Amst). 2006 Sep 8;5(9-10):1021-9. Epub 2006 Jun 27. Review

Soussi T. and Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. Nat. Rev. Cancer 1, 233-240 (2001).

Spring K. et al. Mice heterozygous for mutation in Atm, the gene involved in ataxia-telangiectasia, have heightened susceptibility to cancer. Nature Genet. 32, 185-190 (2002).

Sprung CN, Reynolds GE, Jasin M, Murnane JP. Chromosome healing in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jun 8;96(12):6781-6.

Stankovic T. et al. ATM mutations in sporadic lymphoid tumurs. Leuk. Lymph. 43, 1563-1571 (2002).

Stenger JE et al. P53 oligomerization and DNA looping are linked with trascriptional activation. EMBO J. 13, 6011-6020 (1994).

Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL. Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. N Engl J Med. 1991 Dec 26;325(26):1831-6.

Taniguchi T. et al. Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia signaling pathways. Cell 109, pp. 459-472 (2002).

Tauchi H. et al. Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. Nature 420, 93-98 (2002).

Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE, Iliakis G. Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells. Cancer Res. 2005 Dec 15;65(24):11292-6.

Thut C. et al. P53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF1140 and TAF1160. Science 267, 100-104 (1995).

Tibbetts RS. et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. Genes Dev. 13, pp. 152-157 (1999).

Tibbetts RS. et al. Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. Genes Dev. 14, pp. 2989-3002 (2000).

Virmani A. and Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. Mol. Aspects Med. 2004; 25: 533–549.

Vousden KH and Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. Nat. Rev. Cancer 2, 594-604 (2002).

Waldmann TA, Misiti J, Nelson DL, Kraemer KH. Ataxia-telangiectasia: a multisystem hereditary disease with immunodeficiency, impaired organ maturation, x-ray hypersensitivity, and a high incidence of neoplasia. Ann Intern Med. 1983 Sep;99(3):367-79.

Wang W et al. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorilation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. Mol. Cell. Biol. 23, 2171-2181 (2003).

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev. 15, 2922-2933 (2001).

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes Dev. 2000 Apr 15;14(8):927-39.

Ward JF. The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. Int J Radiat Biol. 1994 Nov;66(5):427-32. Review.

Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. Nat Genet. 1998 Jun;19(2):175-8.

Watters D, P. Kedar, K. Spring, J. Bjorkman, P. Chen, M. Gatei, G. Birrell, B. Garrone, P. Srinivasa, D.I. Crane, M.F. Lavin. Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisome, J. Biol. Chem. 274 (1999) 34277–34282.

Weiss RS., Matsuoka S, Elledge SJ., Leder P. Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. Curr. Biol. 12, pp. 73-77 (2002).

Winston GW, Harvey W, Berl L, Cederbaum AI. The generation of hydroxyl and alkoxyl radicals from the interaction of ferrous bipyridyl with peroxides. Biochem. J. 1983; 216: 415-421.

Wojewódzka M, Buraczewska I, Kruszewski M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. Mutat Res. 2002 Jun 27;518(1):9-20.

Wong KK. et al. Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. Nature 22 Jan 2003.

Xu Y. ATM in lymphoid development and tumorigenesis. Adv Immunol. 72, pp. 179-189 (1999).

Yang Haijuan, Philip D. Jeffrey, Julie Miller, Elspeth Kinnucan, Yutong Sun, Nicolas H. Thomä, Ning Zheng, Phang-Lang Chen, Wen-Hwa Lee, Nikola P. Pavletich BRCA2 Function in DNA Binding and Recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA Structure Science 13 September 2002: Vol. 297. no. 5588, pp. 1837 – 1848.

Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. Carcinogenesis. 2003 Oct;24(10):1571-80. Epub 2003 Aug 14. Review.

Yazdi PT, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. Genes Dev. 2002 Mar 1;16(5):571-82.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol. Cell 7, 673–682 (2001).

Yunfu Lin, Tamas Lukacsovich, and Alan S. Waldman. Multiple Pathways for Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Chromosomes. Mol. Cell. Biol. 1999 19: 8353-8360.

Zhao R. et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. Genes Dev. 2000 Apr 15;14(8):981-93.

Zhao H. and Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. Mol. Cell. Biol. 21, pp. 4129-4139 (2001).

Zhou SB-B. and Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature 408, 403-439 (2000).

Zou L., Cortez D., Elledge SJ. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. Genes Dev. 16, pp. 198-208 (2002).

RINGRAZIAMENTI

In primis vorrei ringraziare il Prof. Palitti per avermi dato la possibilità di vivere un'esperienza di così elevato valore formativo nel suo laboratorio. Lo ringrazio anche perché mi ha permesso di collaborare con il Prof. A.T. Natarajan, uno studioso eccezionale che mi ha insegnato molto. Ringrazio anche la Dott.ssa Roberta Meschini, "il Tutor dei Tutor", per avermi seguito, aiutato ed incoraggiato anche nei momenti di sconforto. Ovviamente tutti gli altri colleghi del laboratorio sono stati per me di grande aiuto in questi tre anni, e ringrazio anche loro.
Il mio ultimo pensiero va a Cristina che, con la sua presenza ed il suo sorriso mi dà la forza per superare tutte le difficoltà.