



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica

Corso di dottorato di ricerca
“Evoluzione Biologica e Biochimica” XIX Ciclo

“Relazione tra lesione primaria al DNA, riparazione e
danno cromosomico: implicazioni terapeutiche.”

S.S.D. BIO/18

Coordinatore
Prof.ssa Lucia Mastrolia

Tutor
Prof. Fabrizio Palitti

Dottorando
Pierluigi Mancinelli

*“Un uomo osserva un bambino che dopo aver costruito
un bellissimo castello di sabbia,
inizia a distruggerlo.
L'uomo è deluso perché pensa sia un gesto
Sconsiderato e folle.
Il bambino invece è felice perché sta già pensando
a costruirne uno più grande.”*

Maurizio Sartor

INDICE

Riassunto

pag.6

Parte generale

1) Danno indotto dalle radiazioni ionizzanti	pag. 10
a) Introduzione	pag. 10
b) Proprietà delle radiazioni ionizzanti	pag. 11
c) Effetto delle radiazioni sul DNA	pag. 13
d) Riparazione del danno al DNA indotto dai raggi X	pag. 14
e) Aberrazioni cromosomiche	pag. 18
f) Apoptosi indotta dalle radiazioni	pag. 21
 2) La proteina P53	pag. 23
a) Il mantenimento della stabilità genomica	pag. 23
b) I geni “target” di p53	pag. 24
c) Struttura e mutazioni della proteina p53	pag. 25
d) Regolazione dell’attività trascrizionale di p53	pag. 27
 3) la morte cellulare programmata	pag. 31
Caratteristiche generali dell’apoptosi	pag. 31
• Scoperta e definizione dell’apoptosi	pag. 31
• Apoptosi ed immunità	pag. 32
b) L’apoptosi classica	pag. 33
c) p53 nel controllo dell’apoptosi	pag. 35
d) I diversi modi di morire a disposizione delle cellule:	

dall'apoptosi alla necrosi	pag. 38
4) Possibili applicazioni terapeutiche degli inibitori di p53	pag. 42
a) p53: un determinante principale nella sensibilità alla terapia del cancro	pag. 42
b) La proteina p53 può rappresentare un fattore di resistenza nel trattamento dei tumori	pag. 43
c) Radio e chemio protezione mediata dall'inibizione farmacologica di p53: la Pifithrin- α	pag. 45
d) Rischio associato all'utilizzo degli inibitori di p53	pag. 46

Parte sperimentale

5) Scopo della ricerca	pag. 49
6) Materiali e metodi	pag. 52
a) Sistema cellulare	pag. 52
b) Isolamento dei linfociti	pag. 52
c) Protocollo sperimentale	pag. 53
d) Condizioni di irraggiamento	pag. 58
e) Stimolazione dei linfociti	pag. 59
f) Analisi della morfologia nucleare apoptotica	pag. 60
g) Fissaggio e allestimenti dei preparati citogenetici	pag. 61
h) Reazione per colorazione con anticorpo antibromodeossiridina	pag. 62
i) Saggio citoflorimetrico per valutare l'espressione delle proteine p53 e survivina	pag. 63
l) Comet assay	pag. 64

7) Risultati	pag. 66
a) Esito degli studi condotti nella fase G ₂ del ciclo cellulare	pag. 66
b) Esito degli studi condotti nella fase G ₀ del ciclo cellulare	pag.75
8) Discussione	pag. 89
9) Bibliografia	pag. 98

Riassunto

Riparazione, arresto del ciclo cellulare e morte cellulare programmata, sono tutte possibili strategie che la cellula può utilizzare in risposta al danneggiamento del DNA, al fine di per salvaguardare l'integrità del genoma. Secondo alcuni autori il processo apoptotico agisce eliminando preferenzialmente le cellule contenenti aberrazioni cromosomiche di tipo instabile, come i dicentrici e i rings, rispetto a quelle di tipo stabile come le traslocazioni. L'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi indotta dal danno al DNA sono processi la cui attivazione è regolata dalla proteina p53. Circa la metà dei tumori umani sono accomunati da mutazioni nel gene che codifica per la proteina p53 e si crede che gran parte dei restanti tipi di tumore, pur esprimendo una p53 "wild-type", siano caratterizzati da una via di soppressione tumorale mediata da una p53 inefficiente. Pubblicazioni più recenti, fanno invece riferimento alla proteina p53 e ad un suo possibile coinvolgimento nella riparazione delle "double strand breaks" mediante il meccanismo PL ("precise ligation") ad alta fedeltà. In questo lavoro abbiamo quindi cercato di indagare sul possibile coinvolgimento di p53 nei meccanismi di riparazione del danno al DNA e sul ruolo di p53 nel mantenimento della stabilità genomica anche in relazione al processo apoptotico. Questo tipo di studio, effettuato su linfociti umani di sangue periferico (HPBL), è stato possibile mediante l'utilizzo della PFT- α , un inibitore sintetico della proteina p53. Il presente lavoro sperimentale è composto da due parti distinte.

La prima parte del nostro lavoro è costituita da una serie di esperimenti effettuati per analizzare l'effetto dell'inibizione della proteina p53, tramite la PFT- α , nella fase G₂ del ciclo cellulare, per cercare di comprendere meglio il suo ruolo sia nella formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sia nell'induzione dell'apoptosi in tale fase del ciclo. A tal fine i linfociti umani isolati dal "buffy coat" sono stati indotti a proliferare e trattati con la PFT- α 12h ore prima dell'irradiazione. A 44h dalla stimolazione, e quindi presumibilmente nella fase G₂ del ciclo cellulare, i linfociti sono stati esposti ad una dose di raggi X di 0,5 Gy. Subito dopo l'irradiazione ai linfociti è stata aggiunta la BrdUrd che veniva lasciata nel terreno per 1h. A vari tempi di recupero sono stati analizzati la cinetica del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'espressione delle proteine p53 e survivina e le aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X. I risultati ottenuti si possono riassumere come

segue: la PFT- α non altera la progressione del ciclo cellulare; l'induzione di apoptosi avviene a tempi brevi dall'irradiazione nella cellula in G₂; la proteina p53 si esprime solo a 8h dai raggi X; non si riscontrano differenze, in termini di induzione di rotture cromatidiche, tra il campione solo irradiato ed il campione trattato con i raggi X e la PFT- α , e non si osserva induzione di scambi cromatidici. Infine, dall'insieme dei dati sperimentali possiamo concludere che l'apoptosi che si innesca nelle prime ore dall'irradiazione dei linfociti nella fase G₂ del ciclo cellulare è indipendente dall'azione della proteina p53 e conseguentemente insensibile all'effetto della PFT- α . Tale conclusione è apparentemente in contrasto con quanto avviene nei linfociti umani irradiati in G₀ e stimolati a vari tempi dall'irradiazione dove la morte cellulare per apoptosi è p53 dipendente ed il segnale di innesco del processo apoptotico è la formazione del cromosoma dicentrico (Bassi et al., 2003; Belloni et al., 2005). Possiamo ipotizzare che la via p53 indipendente si attivi, nei linfociti in G₂, data l'assenza, nelle metafasi analizzate, di scambi cromatidici che possono portare alla formazione di cromatidi dicentrici sostenendo, anche se in via indiretta, il ruolo del dicentrico nell'attivare l'apoptosi p53 dipendente.

Nella seconda parte della presente ricerca i linfociti di sangue periferico sono stati irradiati in presenza ed in assenza di PFT- α nella fase G₀ del ciclo cellulare e sono state analizzate la cinetica di riparazione, l'induzione di aberrazioni cromosomiche e l'incidenza di apoptosi a vari tempi di recupero dopo il trattamento con i raggi X. I risultati ottenuti sulla cinetica di riparazione effettuata tramite il saggio della cometa indicano la presenza di una maggiore quantità di danno non riparato nei linfociti cotrattati con raggi X e PFT- α . Il possibile coinvolgimento di p53 nella riparazione delle DSBs potrebbe essere ulteriormente sostenuto da quanto ottenuto dall'analisi citogenetica effettuata alla prima mitosi dopo il trattamento con i raggi X, in cui si è riscontrato un incremento statisticamente significativo delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule irradiate in presenza di PFT- α . Tuttavia l'aumento delle aberrazioni cromosomiche è da mettere in relazione anche alla riduzione dell'induzione del processo apoptotico p53 dipendente mediato dalla stessa PFT- α . Anche alle successive divisioni mitotiche i campioni cotrattati con raggi X e PFT- α presentano un danno citogenetico maggiore rispetto a quelli semplicemente irradiati.

Dagli esperimenti condotti nella fase G_0 del ciclo cellulare sembra quindi che l'inibizione della proteina p53 comporti un aumento dell'instabilità genomica, che nei linfociti umani di sangue periferico riteniamo sia attribuibile ad un effetto congiunto della PFT- α sulla riparazione e sull'apoptosi.

Parte generale

1) Danno indotto dalle radiazioni ionizzanti

a) Introduzione

L'uomo è esposto alle radiazioni durante tutta la sua vita, tra cui gli UV e le radiazioni ionizzanti sono quelle predominanti. Sebbene l'uomo sia esposto a basse dosi di radiazioni ionizzanti e minime se raffrontate alla dose di UV derivante dalla quotidiana esposizione al sole, gli effetti rilasciati dall'esposizione radioattiva si possono esprimere a distanza di mesi o anni dall'irradiazione provocando il cancro nelle cellule somatiche ed alterazioni ereditarie in quelle germinali. È da lungo tempo noto che il DNA sia uno dei "target" principali delle radiazioni ionizzanti. Con la scoperta dell'effetto della colchicina, un veleno del fuso mitotico che provoca l'arresto del ciclo cellulare in metafase (Levan, 1938), fu 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 i cui standard negli anni hanno mostrato una tendenza verso limiti più rigorosi. Le ragioni di questa tendenza si fondano sulla consapevolezza e la preoccupazione degli effetti a lungo termine di tale esposizione, soprattutto per le persone professionalmente esposte e per chi involontariamente è colpito da radiazioni provenienti da impianti nucleari o zone con rifiuti radioattivi (Hendee, 1993). Ben note sono le proprietà carcinogeniche delle radiazioni ionizzanti, il cui spettro dipende dal tessuto esposto, dalle condizioni di esposizione, dal "back-ground" genetico, dal sesso e da altri fattori. Tuttavia 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, le cellule che vengono ingentemente danneggiate non sono in grado di riparare tutto il danno e possono andare incontro alla morte apoptotica.

b) 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 cellulari. Possiamo raggruppare le radiazioni in due classi generali che variano nella velocità di propagazione e per la presenza o assenza di massa a riposo. La prima classe è rappresentata dalle radiazioni elettromagnetiche, 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 Röntgen 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 e neutroni, particelle atomiche dotate di massa a riposo, e particelle α .

I fotoni delle radiazioni ad alta energia (come raggi X e γ) possono eccitare gli atomi fino a far saltare gli elettroni fuori dall'orbita più esterna trasformandoli in ioni positivi. Gli elettroni 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/ μ m) i raggi X e γ sono radiazioni con un basso valore di LET o a ionizzazione sparsa.

Gli effetti fisici delle radiazioni dipendono dall'energia delle radiazioni stesse; radiazioni ad alta energia sono caratterizzate da lunghezze d'onda (λ) minori, quindi, nel caso di onde di natura particellare, il loro effetto ionizzante sarà limitato intorno

alla traccia della particella. Le radiazioni ad energia minore avendo lunghezze d'onda più alte producono una ionizzazione più sparsa (fig. 1).

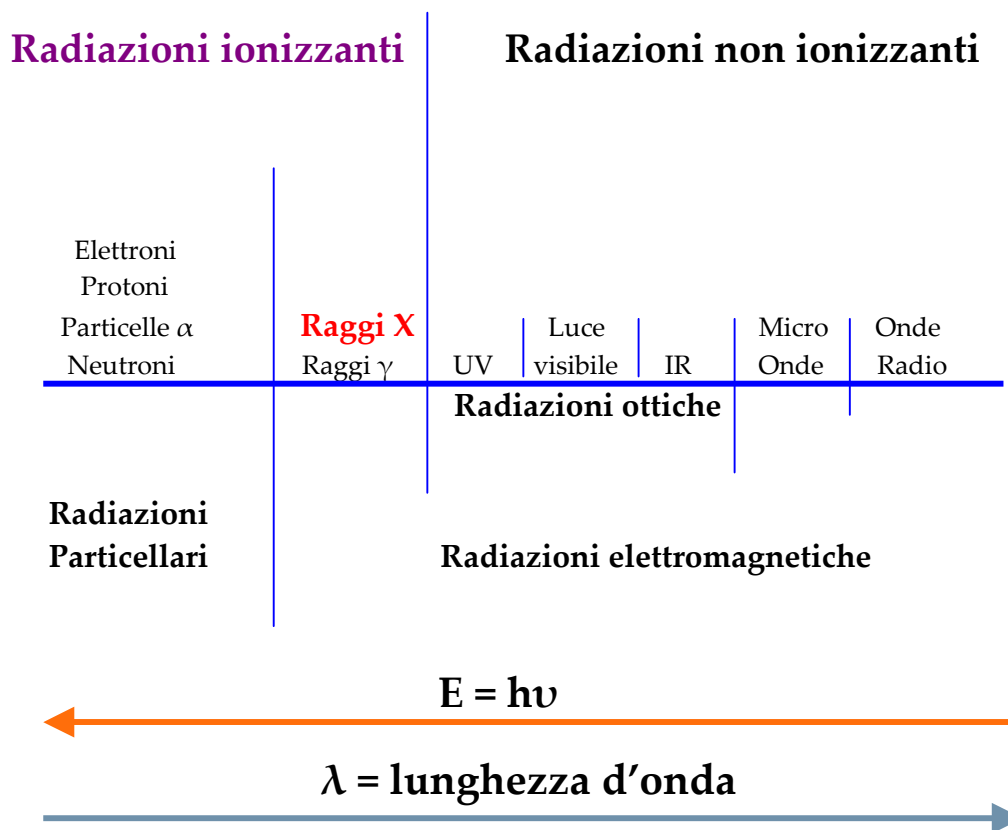


Fig. 1: differenti tipi di radiazioni.

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 accelerando un fascio di elettroni e bloccandoli bruscamente in un bersaglio e in questo modo l'alta energia accumulata si converte in parte in raggi X. Possiamo definire quindi questo tipo di radiazioni ionizzanti come un prodotto extranucleare. I raggi γ al contrario vengono prodotti nel decadimento di isotopi radioattivi e sono quindi di origine intranucleare.

Benchè i diversi tipi di radiazioni ionizzanti abbiano differenti modelli di rilascio di energia e diverso potere di penetrazione, non c'è una proprietà che diversifica 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 con l'esposizione a sorgenti naturali, carattere questo molto importante sotto l'aspetto della protezione e della prevenzione.

c) 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 (Fricke et al., 1938; Goodhead, 1989). L'importanza dell'azione indiretta si comprende meglio tenendo presente che l'80% della cellula è costituito d'acqua 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 in due SSBs pressoché opposte su ciascun filamento dell'elica. La maggior parte degli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti sono dovute alle DSBs.

Un ulteriore tipo di danno prodotto dalle radiazioni ionizzanti è la formazione di legami crociati tra proteine e DNA (Oleinick et al., 1987) 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 indotto un cambiamento fenotipico dovuto a mutazione genetica. Questo fenomeno risulta nella formazione di neoplasie, morte o aberrazioni cromosomiche dovute soprattutto alle DSBs (Natarajan e Obe, 1978; Natarajan e Obe, 1984; Bryant, 1984).

d) Riparazione del danno al DNA indotto dai raggi X

Le piccole lesioni di origine endogena vengono riparate nella maggioranza dei casi dalla via di riparazione per escissione delle basi (BER). Questo sistema di riparazione agisce mediante diverse classi di DNA glicosilasi capaci di riconoscere le basi anormali e catalizzare il taglio idrolitico del legame N-glicosidico della base con lo zucchero. Intervengono poi delle endonucleasi e fosfodiesterasi AP, che generano un vuoto di un singolo nucleotide contenente però l'estremità 3'-OH e il terminale 5'-P; tale sito viene indicato come AP (Apurinico/Apirimidinico). In questo modo si consente alla DNA polimerasi di riempire il vuoto e alla ligasi di saldare la restante apertura. Per ciò che riguarda le rotture dello scheletro zucchero fosfato le SSBs possono essere riparate dalla cellula attraverso il meccanismo di escissione e risintesi libero da errori. Recenti studi hanno dimostrato che le DSBs nei cromosomi di mammifero possono essere riparate tramite diverse "pathways":

- A) ricombinazione omologa (HR): la rottura è riparata tramite lo scambio genetico con il cromosoma fratello omologo;
- B) "non homologous end-joining"(NHEJ): meno efficiente lega insieme le due estremità rotte (Paques e Aber, 1999). La minore efficienza è dovuta ad una rapida riparazione del danno che in molti casi comporta la sottrazione o l'aggiunta di nucleotidi al livello del punto di rottura;
- C) "Precise Ligation" (PL) (Lin e Waldman, 2001).

HR e PL rappresentano un metodo accurato di riparazione delle DSBs che risulta essenzialmente nel ripristino dell'informazione genetica parentale, tuttavia la riparazione di tipo HR può causare la perdita di eterozigotà, ed altri cambiamenti di sequenza se le sequenze interagenti non sono perfettamente omologhe. La riparazione di tipo PL invece, determina la completa ricostruzione dell'informazione contenuta sulla sequenza (Lin et al., 2003). La "pathway" NHEJ, diversamente dalle due precedenti è spesso associata con la perdita o il guadagno di alcuni nucleotidi al sito di rottura. Sebbene si aggiungano o si perdano soltanto pochi nucleotidi, anche l'alterazione di una piccola sequenza può potenzialmente bloccare le funzioni genetiche. La selezione di uno questi meccanismi di riparazione come "pathways" usate per riparare le DSBs può essere determinante per il mantenimento cellulare e la stabilità genomica (Liang et al., 1998). Studi su *S. cerevisiae* dimostrano che le DSBs vengono riparate sia attraverso la ricombinazione omologa sia dall'NHEJ. Nei mammiferi invece è prevalente la NHEJ anche se la ricombinazione omologa gioca un ruolo significativo. Questo può essere spiegato dal fatto che le cellule somatiche possono tollerare una riparazione meno accurata, data la grande quantità di genoma non funzionante che esse possiedono. La riparazione HR inizia con il processamento delle rotture di DSBs: delle nucleasi ed elicasi producono delle estremità 3' -OH a singolo filamento. Su queste estremità polimerizza una proteina, Rad51 (omologa a RecA in *E. coli*, Tsukamoto et al., 1996) che forma un filamento nucleoproteico necessario per il riconoscimento del filamento omologo. Si instaura così uno scambio tra l'omologo danneggiato e il doppio filamento di DNA non danneggiato. Oltre a Rad51, questi eventi richiedono l'attività coordinata di altre proteine: Rad52, Rad54 e Rad55/57 stimolano Rad51, la proteina RPA lega il DNA a singolo filamento determinando lo scambio, una DNA polimerasi ed una ligasi ristabiliscono l'informazione perduta ed infine una resolvasi determina la risoluzione dei filamenti di DNA incrociati (Kanaar et al., 1998). La riparazione tramite l'NHEJ ha inizio invece con il legame sulle DSBs di un eterodimero costituito dalle proteine KU80 e KU70 che hanno un ruolo nel riconoscimento del danno e nel suo processamento (Singleton et al., 1997). Il legame di KU sembra necessario per proteggere le estremità libere di DNA dalla degradazione nucleotidica. Una volta legata, la proteina KU può attrarre la subunità catalitica DNA-PK_{CS}, un polipeptide di 465 kDa

con un dominio protein chinasi all'estremità C-terminale (Gottlieb e Jackson, 1993). A questo punto le estremità sono tenute insieme da questo complesso e la DNA-PK, legata ad un'estremità, fosforila la subunità catalitica sull'altra estremità. La trans-fosforilazione inattiva l'attività chinasi. Contemporaneamente, la fosforilazione determina un rimodellamento del complesso proteico, localizzato alle estremità, permettendo l'accessibilità ai fattori della riparazione. Oltre a ciò, sono richieste altre attività che includono il processamento delle estremità di DNA e la loro riunione attraverso un complesso contenente alcune proteine la cui funzione ancora non è ben conosciuta, come ad esempio RAD50, MRE11 e NSB1. E' stata individuata anche la DNA ligasi IV, che interagendo con XRCC4 sembra responsabile del ricongiungimento delle estremità (Critchlow et al., 1997). Il Precise Ligation (PL) (Lin e Waldman, 2001) è un metodo accurato di riparazione che determina la completa ricostruzione dell'informazione contenuta sulla sequenza di DNA (Lin et al., 1999; Lin et al., 2003). Non è ancora ben chiaro come la riparazione delle DSBs sia portata a termine da una semplice "Precise Ligation" del DNA senza nessuna alterazione nella sequenza di informazioni. 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 dell'aggiunta di nuove sequenze telomeriche direttamente alla fine della rottura di un cromosoma senza la perdita di un singolo nucleotide (Sprung et al., 1999). I processi di riparazione di HR e NHEJ (Fig. 2) competono l'uno con l'altro nella riparazione delle DSBs: la predominanza dell'uno o dell'altro meccanismo dipende dalla specie, dal tipo di cellule e dalla fase del ciclo cellulare. Generalmente, nelle fasi S e G₂, quando è disponibile una copia identica del DNA costituita dal cromatidio fratello, prevale l'HR, mentre il NHEJ, poichè non richiede la presenza di lunghi tratti di omologia, appare essere confinato nelle fasi G₁ o S precoce.

Recenti studi hanno evidenziato il fatto che la proteina MSH₂, proteina della riparazione Mis-match, nella forma attiva, è richiesta per una corretta risposta al danno del DNA indotto dalle radiazioni ionizzanti nella fase G₂ del ciclo cellulare in cellule di mammifero (Franchitto et al., 2003).

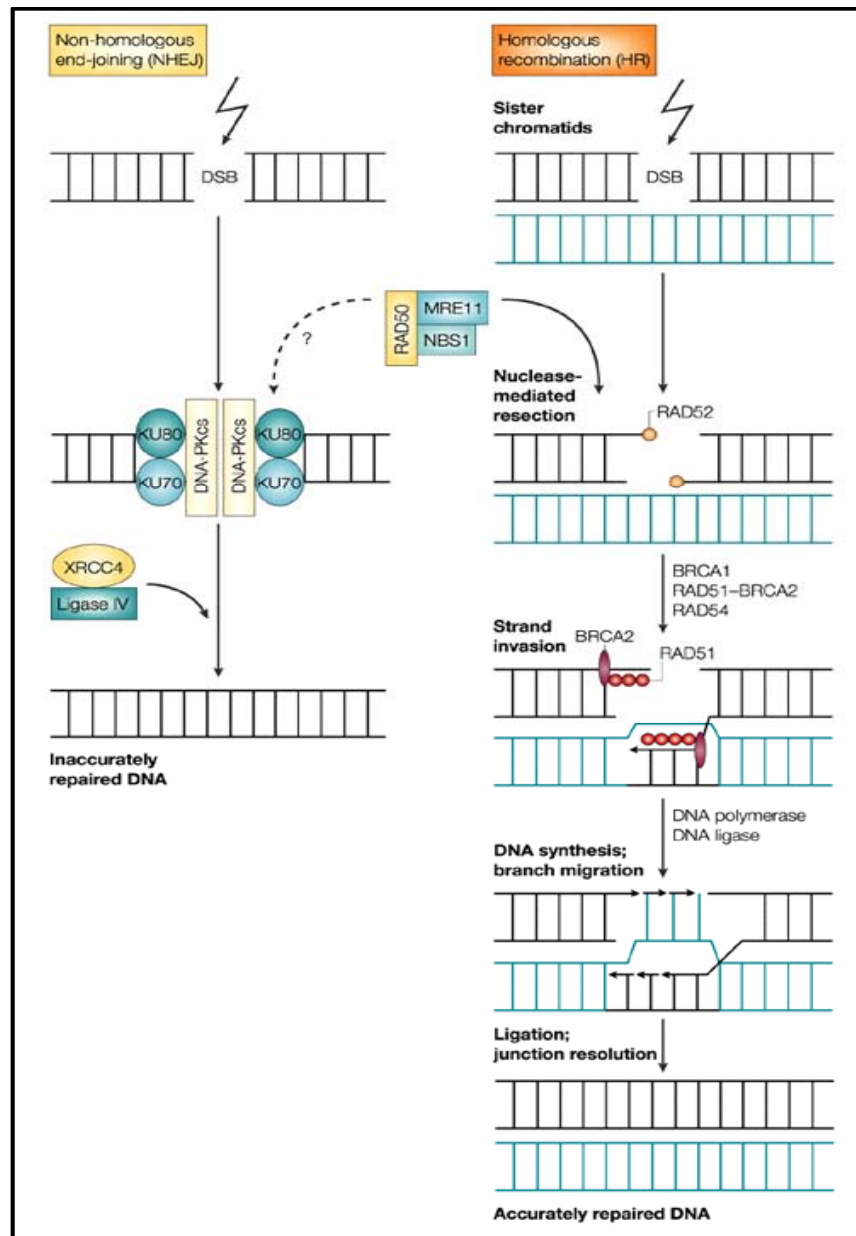


Fig. 2: schemi dei meccanismi riparativi del Non Homologous End Joining (NHEJ) e dell' Homologous Recombination (HR).

Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che il caso del NHEJ e dell'HR è un esempio relativamente semplice del modo in cui i differenti meccanismi di riparazione sono diversamente impiegati, competendo e anche collaborando per le stesse lesioni (Jong-Soo et al., 2005).

d) Aberrazioni cromosomiche

Come già accennato la causa principale della formazione delle aberrazioni cromosomiche sono le DSBs ed il loro errato ricongiungimento mediante il meccanismo di riparazione non omologa (NHEJ). Un fattore determinante molto importante nella generazione di aberrazioni cromosomiche è l'efficienza della riparazione del danno al DNA, che a sua volta può dipendere dalla struttura della cromatina. Alcuni meccanismi di riparazione sono infatti molto sensibili allo stato di condensazione della cromatina; secondo alcuni le regioni eterocromatiche presentano una maggiore frequenza di rotture a singolo e doppio filamento (e risultano quindi più fragili) rispetto a quelle eucromatiche e questo fenomeno è determinato dalla maggiore compattezza e dalla conseguente limitata accessibilità agli enzimi riparativi (Smith, 1987). Ci sono però correnti di pensiero contrastanti a sostegno dell'idea che le aberrazioni cromosomiche si generino più frequentemente in corrispondenza di regioni eucromatiche piuttosto che in quelle eterocromatiche. A sostegno di questa ipotesi vi sono molti studi di mappatura (Slijepcevic e Natarajan, 1994 a,b) delle rotture dell'elica indotte da diversi agenti (endonucleasi, raggi γ e neutroni) che evidenziano una maggiore sensibilità delle regioni eucromatiche rispetto a quelle eterocromatiche. A seconda dell'unità cromatidica o cromosomica coinvolta, a seconda del tipo di mutageno e dello stadio del ciclo cellulare in cui si trova possiamo distinguere le aberrazioni in due classi principali: cromosomiche e cromatidiche (fig. 3).

Un ulteriore categoria di aberrazioni sono quelle sub-cromatidiche che si originano nella fase G₂ del ciclo cellulare o in profase (Kihlman, 1970).

	INTERFASE			MITOSI						
	G ₁	S	G ₂	PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE			
CAMBIAMENTI A LIVELLO DEL DNA	↑↓	↑↓, ↓↑	↑↓, ↑↑							
EFFETTI DEI MUTAGENI	ABERRAZIONI CROMOSOMICHE	ABERRAZIONI CROMATIDICHE						ABERRAZIONI SUB-CROMATIDICHE		
UNITA' CROMATIDICHE PRESENTI	1	2	2					2		

Fig. 3: relazione tra il tipo di aberrazione e lo stadio del ciclo cellulare al momento dell'esposizione all'agente mutageno.

Nelle aberrazioni cromatidiche l'unità coinvolta è un solo cromatidio poiché queste si formano nella fase S o G₂ del ciclo, cioè durante o dopo la replicazione dei cromosomi. Le aberrazioni di tipo cromosomico interessano invece entrambi i cromatidi poiché si generano prima della replicazione dei cromosomi e l'alterazione viene trasmessa mediante la duplicazione ad entrambi i cromatidi. Quando l'esposizione ai raggi X avviene nella fase G₀/G₁ del ciclo cellulare la maggior parte delle aberrazioni attese dovrebbe essere di tipo cromosomico, quando le cellule vengono irradiate nella fase S/G₂ ci aspettiamo principalmente la formazione di aberrazioni cromatidiche.

Le aberrazioni cromosomiche possono essere classificate in: aberrazioni interscambio o aberrazioni intrascambio (fig. 4).

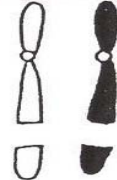
	Interchange	Intrachange	
		Inter-arm	Intra-arm
			
A	 Dicentric	 Centric-ring	 Interstitial deletion
S	 Translocation	 Pericentric inversion	 Paracentric inversion

Fig. 4: tipi di aberrazioni cromosomiche risultanti da due rotture in uno o due cromosomi. l'interazione tra due cromosomi può avvenire simmetricamente (S) o asimmetricamente (A)

Quelle di tipo intrascambio comprendono frammenti acentrici, “minutes”, anelli centrici ed inversioni pericentriche. Le aberrazioni interscambio includono invece i dicentrici e le traslocazioni reciproche (Evans, 1966).

Alcuni tipi di aberrazioni cromosomiche possono essere perse o trasformate durante la divisione cellulare, è quindi di fondamentale importanza analizzare le aberrazioni alla prima metafase dopo il trattamento con un eventuale mutageno o dopo l'esposizione ai raggi X. La presenza di aberrazioni instabili, anche dette asimmetriche, comporta delle difficoltà meccaniche al momento della divisione cellulare. Tali difficoltà determinano la formazione di ponti anafasici, i quali possono disturbare la divisione mitotica, o la formazione di cellule figlie con patrimonio genetico sbilanciato. Diversamente, le aberrazioni di tipo stabile non costituiscono un

ostacolo al momento della segregazione dei cromosomi e sono quindi trasmesse nel corso delle generazioni.

e) Apoptosi indotta dalle radiazioni

La morte cellulare indotta dalle radiazioni avviene in conseguenza di un danno a carico del DNA o della membrana plasmatica. Come già detto, le alterazioni al DNA includono SSBs e DSBs e la maggior parte di queste sono ricongiunte mediante meccanismi di riparazione espressi costitutivamente. Le mutazioni letali, e talvolta le aberrazioni, conducono alla morte cellulare (Bedford, 1991) che avviene dopo alcuni cicli mitotici dall'esposizione al mutageno (Thompson e Suit, 1969). Il danno causato al DNA dalle radiazioni può anche indurre la morte cellulare per apoptosi in conseguenza di una via pro-apoptotica, sebbene essa rimanga sconosciuta. Come conseguenza dell'esposizione ai raggi X, tramite un sistema di monitoraggio del DNA la cellula può arrestare il ciclo cellulare e/o andare in apoptosi, o riparare il danno al DNA. La scelta della via da seguire da parte della cellula dipende dall'entità del danno riconosciuto dal sistema di monitoraggio. Si genera quindi un segnale di allarme che porta al reclutamento degli enzimi di riparazione sul sito danneggiato. La via alternativa produce una cascata di eventi che porta all'attivazione di specifici gruppi di geni o per l'arresto del ciclo cellulare e/o per l'innescare dell'apoptosi (Maity et al., 1996). Uno degli enzimi che può essere visto come un potente sensore del danno a carico del DNA, in quanto attivato dalla formazione delle rotture indotte da radiazioni ionizzanti, è la poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) sebbene il suo ruolo in risposta al danno al DNA rimanga ancora materia di dibattito (Menisier-de Murcia et al., 1997; Lindahl et al., 1995). È stato ipotizzato che in conseguenza del legame di PARP a livello delle rotture si producano dei polimeri di poli(ADP)ribosio ad essa legati. Questo complesso recluta quindi una serie di altre proteine quali la p53 e p21, un inibitore delle chinasi ciclina dipendenti (CDKs). Il reclutamento avviene grazie ad interazioni non covalenti tramite un sito di legame di circa 22 amminoacidi posseduto dalle suddette proteine.

Un'ipotesi su un sistema sensoriale più complesso si basa su studi condotti su cellule di Atassia Telangiectasia (Meyn, 1998). Si ritiene che il prodotto del gene “ Atassia Telangiectasia “ mutato (ATM), una chinasi, appartenga ad una rete di controllo del danno al DNA di cui fa parte anche la proteina p53.

ATM potrebbe essere un fattore di legame tra il riconoscimento del danno al DNA e:

- I segnali di blocco della progressione del ciclo cellulare dalla fase G_1 alla fase S e dalla fase G_2 alla mitosi, “check-points” del ciclo cellulare;
- Il segnale di arresto del ciclo a livello della fase S (Shafman et al., 1997);
- L'attivazione della riparazione del DNA.

In generale tutte queste risposte implicano la presenza della proteina p53 coinvolta nella regolazione del processo apoptotico e nell'arresto del ciclo cellulare in G_1 .

Questa funzione viene svolta tramite la transattivazione di due geni identificati come *p21* (anche chiamato *waf1*, *cip1*) e *gadd45*, un gene implicato nell'arresto della crescita e nel meccanismo di riparazione del DNA chiamato “excision repair” (Smith et al., 1994).

Riassumendo il DNA danneggiato induce l'attività di p53 che porta alla trascrizione sia di *p21* che di *gadd45* da cui deriva il blocco del ciclo cellulare in G_1 . Durante questa pausa la cellula tenta di riparare al danno, e se questo non è rimosso viene innescata l'apoptosi.

2) La proteina p53

a) Il mantenimento della stabilità genomica

Molti sono 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, l’invecchiamento 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 (Amanda S. Coutts et al. 2005).

b) 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") appartenenti 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).

c) 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 (fig. 5):

- un dominio N-terminale con funzione di attivatore trascrizionale (amminoacidi 1-43) (Lu e Levine, 1995; Thut et al., 1995);
- una parte centrale o "core" (amminoacidi 100-300) che si lega a domini specifici del DNA (Baronetti 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 324-353); la p53 nativa è infatti costituita, in soluzione, da un tetramero 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).

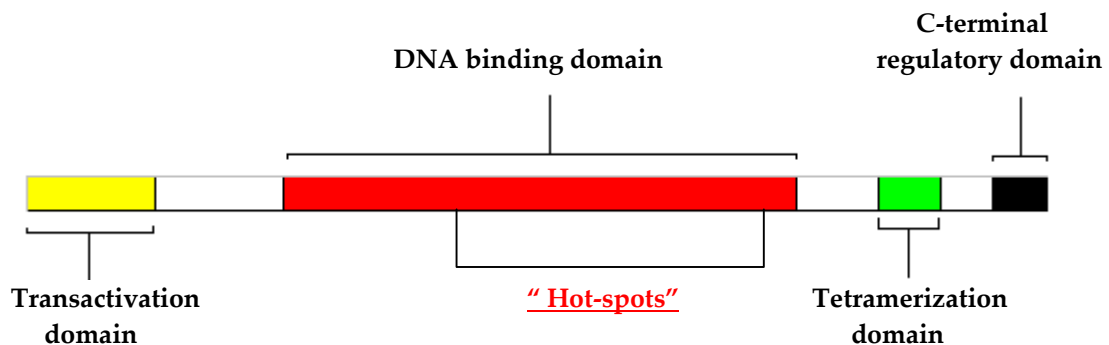


Fig. 5: domini della proteina p53 e sito con maggiore frequenza di mutazioni.

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).

d) 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 (fig. 6). 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)

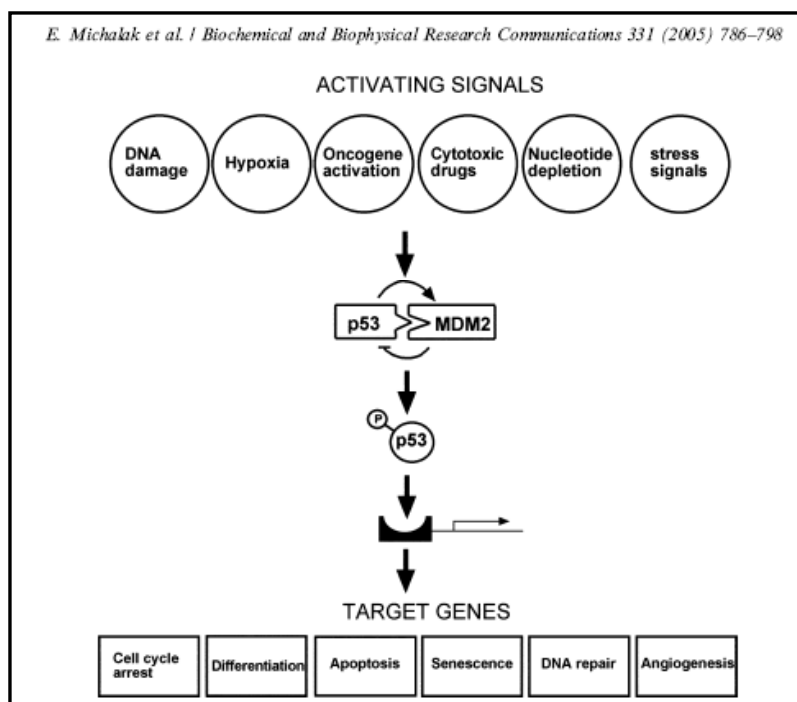


Fig. 6: attivazione di p53 in risposta ai vari segnali di stress cellulare.

Mediante un dominio “ring-finger”, Mdm2 svolge la propria attività di ubiquitin-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 (Lo Uria-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 (E 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 ($\cong 1\text{Mda}$) 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 principale 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.

3) La morte cellulare programmata.

a) Caratteristiche generali dell'apoptosi.

Scoperta e definizione dell'apoptosi

L'apoptosi è un tipo specifico di morte cellulare programmata, sia dal lato morfologico sia biochimicamente. Il termine apoptosi, di etimologia greca, venne utilizzato per la prima volta nel 1972 con il metaforico significato di caduta, allontanamento, ad indicare appunto una particolare tipologia di morte cellulare sostanzialmente contrapponibile a quella fino ad allora conosciuta: la necrosi (Kerr et al., 1972). Si tratta di un processo di autodistruzione che si realizza tramite un programma genico specifico in risposta a stimoli fisiologici o patologici. L'attività decisionale della cellula si basa sia su informazioni derivanti dall'ambiente extra cellulare, quali i segnali di molecole solubili, interazioni cellula-cellula, interazioni con il substrato, sia dall'interno, ad esempio dallo stato metabolico, dal genotipo, da un danno indotto, dal tipo cellulare.

L'inibizione dell'apoptosi da parte di cicloesimide o delle altri inibitori della sintesi proteica ha inoltre un chiaro significato: si tratta di un processo attivo che necessita di polipeptidi specifici per poter realizzarsi (Fesus et al. 1991). In alcuni casi tuttavia sono gli stessi inibitori ad indurre un certo tasso di apoptosi (Cohen, 1991).

Si ritiene che la morte cellulare programmata (PCD) tramite apoptosi, costituisca uno dei più importanti meccanismi di difesa che gli organismi cellulari possiedono per eliminare le cellule danneggiate. Quindi, eventuali fattori capaci di diminuirne l'efficacia potrebbero incrementare il rischio dello sviluppo di tumori.

Il controllo della morte cellulare si rivela fondamentale durante lo sviluppo embrionale o nella morfogenesi, ossia quando occorre eliminare delle cellule necessarie solo per un periodo di tempo.

Si possono citare esempi ben noti quali la fusione del palato (Pratt e Greene, 1976) o l'eliminazione dello spazio interdigitale (Hammer e Mottet, 1971). Anche nello sviluppo del sistema nervoso i neuroni in eccesso vengono rimossi tramite apoptosi, per evitare che le molecole derivanti dalla loro degradazione possano danneggiare i

neuroni rimanenti (Raff, 1992). In modo analogo il fenomeno interviene come meccanismo di difesa con la finalità di eliminare cellule potenzialmente dannose, come cellule infettate da virus (Vaux et al., 1994) o in presenza di cellule tumorali (Williams, 1991). La ricerca ha ormai condotto all'evidenza che il fenomeno della morte cellulare programmata si sia parzialmente conservato nell'evoluzione.

Apoptosi ed immunità

I linfociti e le altre cellule del sistema immunitario si differenziano progressivamente a partire da precursori comuni originatisi dalle cellule staminali del midollo osseo e del fegato fetale. Il processo di differenziazione richiede la presenza di molecole segnale solubili analoghe a fattori di stimolazione delle colonie (CSF) o di interleuchina 3 (IL 3) o del contatto diretto con cellule stromali. Se tali segnali vengono a mancare le cellule progenitrici vanno incontro ad apoptosi (Williams et al., 1990; Rodriguez et al., 1990). L'apoptosi, nei linfociti, ha un'importanza fondamentale per il funzionamento del sistema immunitario (S.I.); è noto infatti come i patogeni vengano riconosciuti tramite uno spettro illimitato di recettori che si genera mediante un riarrangiamento di segmenti genici nella linea germinale durante il processo di differenziamento. Si crea in questo modo una gamma di recettori Ig e TCR (rispettivamente nelle cellule B e T) altamente specifici e allo stesso modo si possono però generare recettori autoreattivi potenzialmente dannosi. Le cellule dotate di tali recettori vanno quindi rimosse o inattivate per evitare reazioni autoimmuni. Tale processo si esplica mediante l'apoptosi. Le cellule T autoreattive ed immature vanno quindi in apoptosi quando si trovano a livello del timo e circa il 95% dei timociti in via di sviluppo muoiono senza aver mai lasciato l'organo (Smith et al., 1989). Per quanto concerne invece i linfociti T maturi, questi, nelle appropriate condizioni, proliferano e si differenziano in seguito alla stimolazione del loro recettore. Tuttavia, una successiva stimolazione ne induce la susseguente apoptosi che può quindi avere un ruolo importante nella cessazione della risposta immunitaria (Russel e Dobos, 1980).

b) L'apoptosi classica

Caratteristiche generali dell'apoptosi

Morfologia nucleare

L'apoptosi è spesso associata a cambiamenti biochimici e morfologici tipici (Kerr et al. 1972; Wyllie et al., 1980). Il citoplasma subisce una evidente condensazione, la membrana plasmatica forma delle protuberanze e si formano grandi vacuoli all'interno del citosol e i mitocondri, nonostante rimangano morfologicamente intatti, perdono gradualmente la loro funzionalità. Sebbene risultino evidenti, questi cambiamenti non sono tuttavia i più importanti; l'effetto primario resta sicuramente la compattazione del nucleo: dopo una transiente decondensazione nello stadio iniziale del processo, la cromatina collassa in grossolani domini omogenei ipercondensati che occludono i pori dell'involucro nucleare. Segue quindi una progressiva introflessione della membrana plasmatica la quale arriva a fondersi con il reticolo endoplasmatico (R.E.) formando delle profonde incisure che mantengono la caratteristica segregazione della cromatina. La compattazione e la segregazione della cromatina risulta nella formazione dei corpi apoptotici, contenenti oltre a porzioni di nucleo anche organelli che persistono intatti. Il destino dei corpi apoptotici è quello di essere fagocitati e degradati dalle cellule adiacenti, che operano in tale processo utilizzando enzimi lisosomiali. Differentemente dall'apoptosi, il processo degenerativo della necrosi cellulare è di natura passiva e si discosta dalla morte programmata sia nelle caratteristiche morfologiche che biochimiche. La necrosi viene innescata da danni diretti di natura tossica o fisica e comporta la lesione del plasmalemma, coinvolge gruppi di cellule contigue e sincrone e non singole cellule ed è associata a chiare reazioni infiammatorie. Va posta in evidenza l'irreversibilità del processo di necrosi, confermata da un aumento della permeabilità della membrana cellulare che culmina nella rottura della stessa; nell'apoptosi al contrario ci troviamo davanti ad una cellula che avrebbe la capacità di sopravvivere ma ha deciso di morire attivamente. Sebbene i processi di apoptosi e necrosi siano così distinti, debbono tuttavia avere qualche passaggio in comune poichè entrambi sono interrotti dalla proteina anti-apoptotica Bcl-2 e dagli inibitori delle caspasi. È stato dimostrato come la scelta della cellula di sottoporsi ad apoptosi o di morire per

necrosi dipenda in larga misura dalla disponibilità intracellulare di ATP: infatti la necrosi non richiede ATP intracellulare mentre per l'apoptosi ne richiede e nel momento in cui si ha la rottura della membrana mitocondriale il fabbisogno di adenosin-trifosfato viene soddisfatto dalla glicolisi (Tsujimoto, 1997).

Frammentazione del DNA

La frammentazione del DNA avviene ad opera di endonucleasi non lisosomiali Ca^{2+} dipendenti con la conseguente formazione di frammenti ad alto peso molecolare compresi tra 50 e 300 Kilobasi (Kb) (Walker et al., 1991; Brow et al., 1993; Oberhammer et al., 1993) e frammenti di 200-1000 paia di basi (bp) costituenti il caratteristico "ladder" apoptotico. Il ladder apoptotico è il risultato di tagli a doppio filamento nel DNA "linker" internucleosomale (Wyllie, 1980; Cohen e Duke, 1984). Sebbene non sia stata ancora definita una precisa correlazione tra gli eventi morfologici e biochimici che si verificano durante il corso del processo apoptotico, tuttavia il confronto tra le dimensioni dei frammenti di DNA e la morfologia nucleare ci consente di stabilire un'associazione temporale tra i due fenomeni:

- a) la formazione di frammenti di 2 Megabasi (Mb) coincide con la perdita della forma nucleare tipica;
- b) la progressiva digestione del DNA in frammenti di 50-300 Kb è accompagnata dalla condensazione della cromatina;
- c) il "ladder" del DNA è concomitante con la formazione dei corpi apoptotici (Ghibelli et al., 1995).

Anche la degradazione della lamina nucleare ha probabilmente un significato determinante per i mutamenti fisiologici nucleari; la lamina è infatti presente sia prima che durante l'esecuzione del processo apoptotico e la sua scomparsa è coinvolta nel disassemblamento irreversibile del nucleo accompagnata dalla degradazione proteolitica delle laminine (Ucker et al., 1992; Lazebnik et al., 1993). Tra le caratteristiche molecolari tipiche del processo apoptotico quella utilizzata come marcatore ultimo del processo è sicuramente il taglio internucleosomale (Schwartzman e Cidlowski, 1993). Una volta avvenuto il "laddering" del DNA la cellula è destinata a morire ed a nulla servirebbe la rimozione di un eventuale agente induttore di apoptosi. Esistono tuttavia evidenze sperimentali di induzione di apoptosi in assenza di taglio internucleosomale del DNA (Zekeri et al., 1993).

Utilizzando la tecnica di elettroforesi in campo pulsato (PFGE), che consente di separare molecole di DNA ad alto peso molecolare (fino a 2 Mb) è stata individuata la frammentazione del DNA in molecole di 50-300 kb (Walker et al, 1991). La presenza di tali frammenti è stata rilevata sia in assenza che in presenza dei “ladders”. Alcuni autori suggeriscono che i frammenti di maggiore peso molecolare siano correlati allo stadio apoptotico precoce e a i cambiamenti della cromatina che si osservano nelle cellule preapoptotiche (Zhivotosky et al., 1994), mentre i frammenti internucleosomali si formano solo successivamente e con un meccanismo biochimico distinto . Se così fosse si potrebbe attribuire ai frammenti di 50-300 Kb il ruolo di precursori per il taglio internucleosomale. Di notevole interesse è comunque la correlazione tra le dimensioni dei frammenti di DNA ad alto peso molecolare e le dimensioni dei domini dei “loops” cromatici dello “scaffold” nucleare (Filipski et al., 1990) e tale evidenza implica che l’endonucleasi agisce sulla cromatina ad un elevato livello di organizzazione. Secondo il modello della struttura cromosomica i frammenti di 50 Kb rappresentano i “loops” di DNA che nella struttura di ordine superiore sono ripiegati in rosette esameriche contenenti 300 Kb che formano una fibra di DNA di 200-300 nm di diametro (Filipski et al., 1990).

c) p53 nel controllo dell’apoptosi

L’apoptosi è un processo che si è sviluppato e conservato nel corso dell’evoluzione per consentire agli organismi di rimuovere le cellule indesiderate o danneggiate. Le radiazioni, alcune cure chemioterapiche, l’assenza di fattori di crescita, l’ipertermia, i glucocorticoidi, le deprivazioni di siero, sono tutti segnali che possono indurre il programma apoptotico.

Nei mammiferi sono state definite due vie apoptotiche principali nelle quali interviene la proteina p53: una “extrinsic pathway” mediata da proteine appartenenti alla super famiglia TNF-R (“tumor necrosis factor receptor”) e una “intrinsic pathway” nella cui regolazione svolge un ruolo determinante la famiglia delle proteine Bcl-2 (fig. 7) (Michalak et al., 2005). Le proteine TNF-R sono recettori di membrana definiti “death receptors” e la loro attivazione avviene tramite l’interazione con un ligando specifico. L’apoptosi indotta dai recettori di morte

richiede il coinvolgimento di molecole adattatrici e della caspasi 8, che genera una cascata di fosforilazioni ad opera di chinasi regolatrici del metabolismo e dell'espressione genica risultante nell'attivazione degli effettori dell'apoptosi. La proteina p53 interviene nella regolazione di questa via apoptotica svolgendo un ruolo fondamentale come attivatore trascrizionale. FAS, DR4 e DR5 sono infatti dei recettori di membrana la cui trascrizione è regolata dalla stessa p53 e la loro attività può indurre o aumentare l'apoptosi dopo il legame con un ligando a livello della membrana cellulare (Liu et al., 2004).

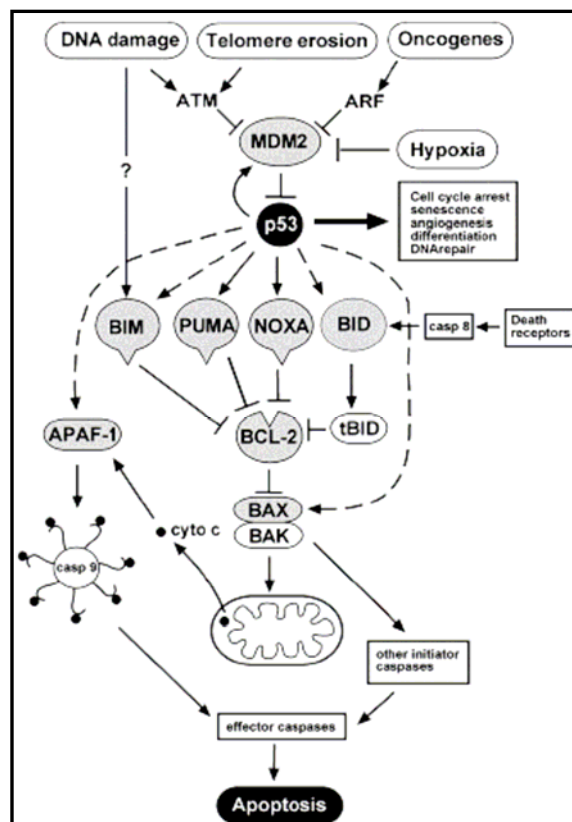


Fig. 7: attivazione dell'apoptosi mediata da p53 (Michalak et al., 2005).

Tale affermazione è supportata da osservazioni “in vivo” che dimostrano la reale traslocazione della p53 verso la superficie mitocondriale esterna durante il fenomeno apoptotico (Erster e Moll, 2005). Alla famiglia di geni *Bcl-2* appartengono sia geni che codificano per proteine pro-apoptotiche (come Bax e Bak) sia geni i cui prodotti sono proteine anti-apoptotiche (come Bcl-2 e Bcl-X_L). Sebbene non sia chiaro l'esatto meccanismo di MOMP (“mitochondrial outer membrane permeabilization”) sembra che le proteine pro-apoptotiche della famiglia Bcl-2 abbiano un ruolo cruciale nel processo come molecole effettrici formatrici di pori (Ferri e Kroemer, 2001). Le proteine anti-apoptotiche della famiglia Bcl-2 (come Bcl-2 e Bcl-X_L) probabilmente si oppongono al fenomeno di MOMP mediante l'eterodimerizzazione con le proteine pro-apoptotiche “Bax-like” (Jäättelä e Tschopp, 2003). Le proteine pro-apoptotiche formatrici di pori, i membri Bax e Bak della famiglia Bcl-2, inducono inizialmente soltanto la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e lasciano intatta l'ultrastruttura della membrana interna. Quindi l'attivazione di Bax e Bak e il risultante MOMP non comporta direttamente la perdita irreversibile della funzionalità mitocondriale e la morte cellulare, ma porta all'attivazione di varie vie di morte programmata, e tra queste l'apoptosi classica. L'apoptosi classica (fig. 8) inizia con un rilascio di citocromo-C dallo spazio mitocondriale intermembrana, dipendente da MOMP (Strasser et al., 2000). L'azione congiunta del citocromo-C insieme ad altri fattori, tra cui l'ATP, il fattore apoptotico di attivazione delle proteasi Apaf-1 e la caspasi 9, promuove l'assemblaggio degli apoptosomi (Wang, 2001), grandi complessi proteici costituenti una efficace piattaforma per il processamento e l'attivazione della caspasi effettrici (caspasi 3, 6, 7) responsabili della demolizione cellulare. Come ulteriore meccanismo di sicurezza, debbono essere rimossi i fattori inibitori delle caspasi (come l'inibitore di apoptosi IAP) tramite l'azione di proteine addizionali (Smac o Omi) che sono rilasciate dal mitocondrio prima che le caspasi diventino completamente attive e si produca la tipica morfologia apoptotica mediante la condensazione della cromatina.

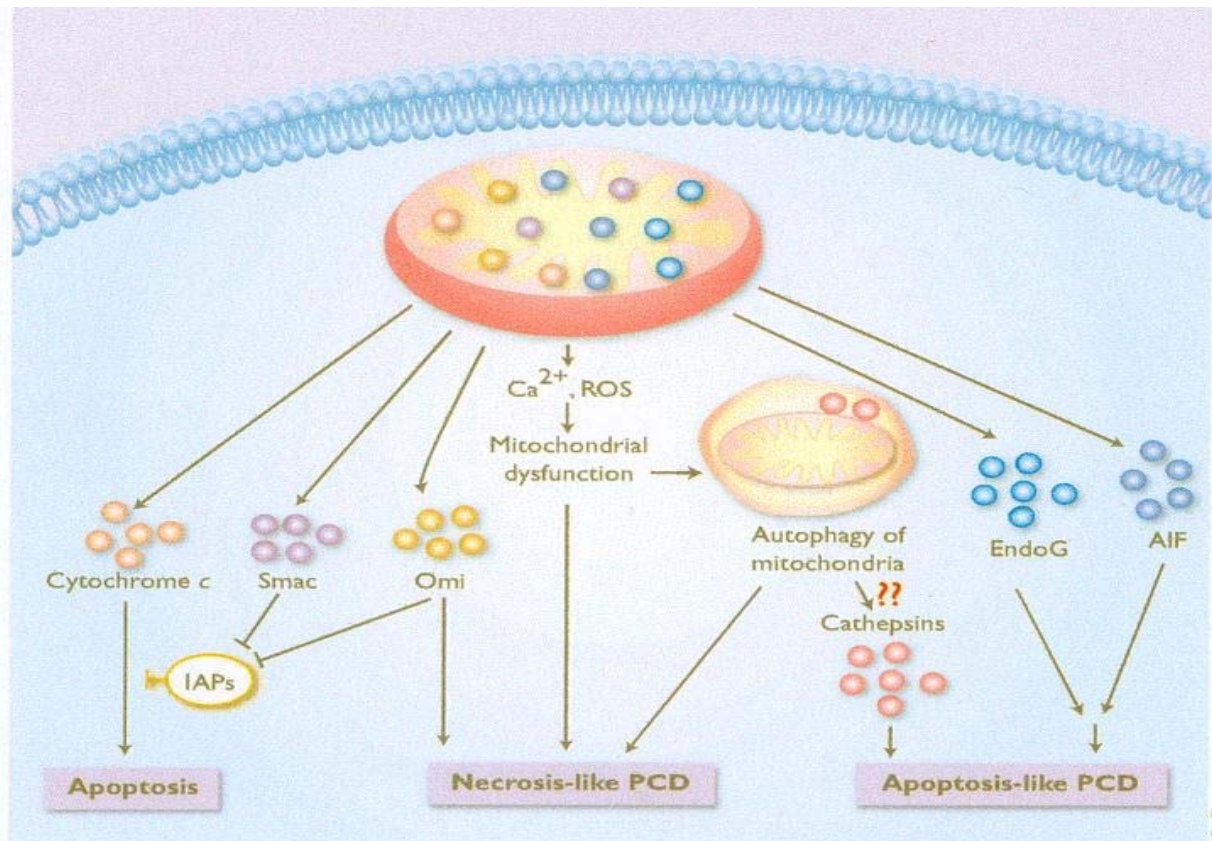


Fig. 8: distinti tipi di morte cellulare programmata.

d) I diversi modi di morire a disposizione delle cellule: dall'apoptosi alla necrosi

Sebbene l'apoptosi mediata dalle caspasi rappresenti il principale programma di morte cellulare in molti meccanismi fisiologici e di sviluppo, per un organismo sarebbe molto pericolosa la dipendenza da una singola famiglia di proteine per la rimozione di cellule non desiderate e potenzialmente dannose. Dati recenti indicano che la morte cellulare programmata (PCD) può avvenire anche in assenza delle caspasi. Alcune cellule capaci di sopravvivere all'attivazione delle caspasi pro-apoptotiche ci forniscono interessanti indicazioni sulla diversificazione del programma di morte cellulare e sull'idea che le sole caspasi siano insufficienti per

indurre la PCD. Non ci sono ancora precise definizioni indicanti le vie alternative di morte cellulare programmata e la sola cosa che possiamo affermare è che si tratta comunque di processi attivi dipendenti da eventi di segnalazione nelle cellule morenti. Poiché si sta ancora studiando la precisa caratterizzazione biochimica dei “checkpoints” che controllano questi tipi alternativi di morte, l’unico sistema attualmente idoneo per poterli distinguere si basa sulla morfologia nucleare delle cellule morenti. Per i linfociti T sono state identificate 3 sottoclassi di PCD:

1. Apoptosi classica;
2. Morte cellulare programmata simile all’apoptosi (“apoptosis-like PCD”);
3. Morte cellulare programmata simile alla necrosi (“necrosis-like PCD”) (Jäättelä e Tschopp, 2003).

Nell’apoptosi si ha la condensazione della cromatina in forme discrete e compatte; al contrario nella “apoptosis-like PCD” la cromatina appare aggrumata in masse meno compatte. Sembra invece che la necrosis-like PCD possa avvenire in assenza della condensazione della cromatina (fig. 9) ed esempi rappresentativi di questo fenomeno sono l’autofagia (anche denominata PCD di tipo II) con la formazione di grandi vacuoli di derivazione lisosomale nel citosol (Lockshin et al., 2002), e la necrosi indotta mediante recettori di morte. In entrambi i casi si parla di programmi attivi di morte cellulare in assenza della condensazione della cromatina, classificabili quindi come necrosis-like PCD. Sebbene la morfologia delle cellule che muoiono per “necrosis-like PCD” sia indistinguibile da quella delle cellule morenti per necrosi accidentale, il fenomeno è comunque il risultato di un processo attivo e ciò può essere verificato o usando degli inibitori della formazione di autofagosomi (Tolkovsky et al., 2002), o sfruttando delle mutazioni nelle molecole di segnalazione intracellulare (Holler et al., 2000) come anche mediante gli inibitori delle proteasi (Denecker et al., 2001). Data la complessità delle varie vie di segnalazione per i diversi programmi di morte cellulare, le cellule che muoiono per “apoptosis-like” e per “necrosis-like PCD” possono mostrare tutte le altre caratteristiche apoptotiche in ogni grado e combinazione, incluso l’esposizione di fosfatidilserine, la contrazione citoplasmatica, la perdita del potenziale di membrana mitocondriale, la formazione di corpi apoptotici e l’attivazione delle caspasi.

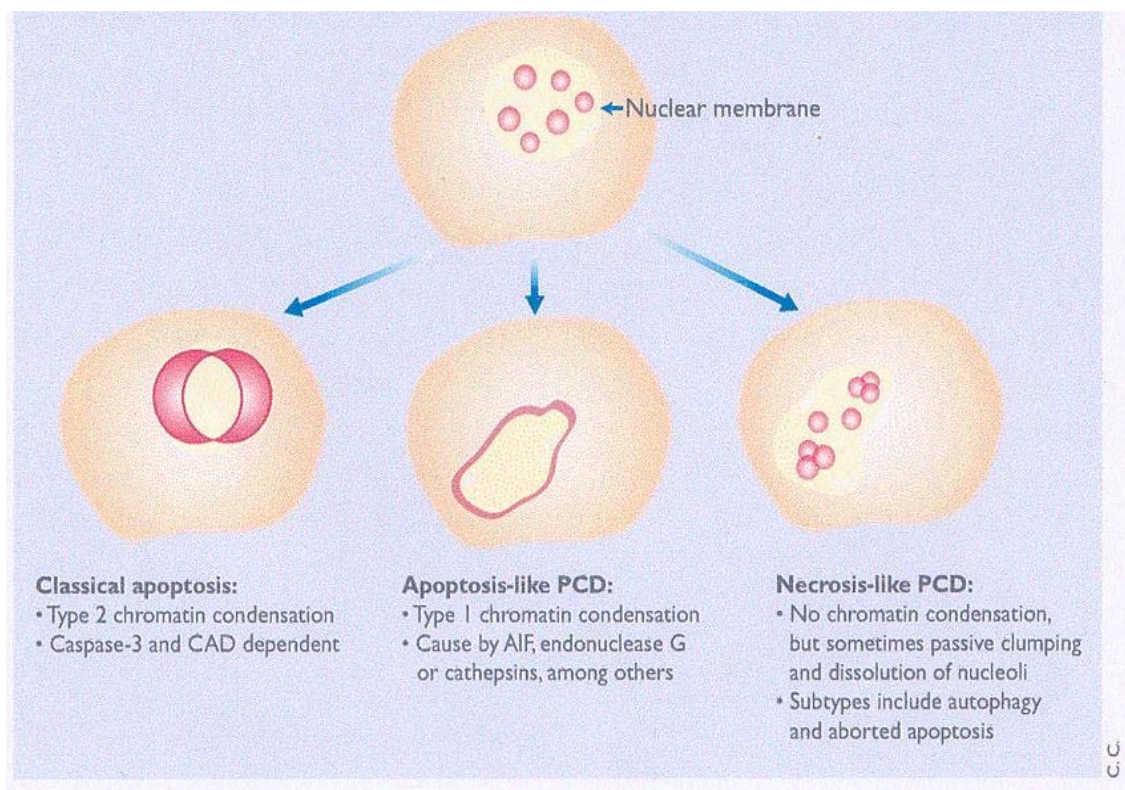


Fig 9: relazione tra i distinti tipi di PCD e la condensazione della cromatina.

Si può affermare che le modificazioni nella modalità di morte cellulare programmata non interessano l'efficienza della rimozione delle cellule morenti e probabilmente si sono evolute con la stessa finalità dell'apoptosi classica, ossia quella di rimuovere le cellule senza provocare infiammazione, effetto sicuramente causato dalla necrosi vera e propria e dalla necrosis-like PCD. In questi ultimi casi si ha infiammazione perché le cellule vengono riconosciute e rimosse dalle cellule fagocitarie soltanto dopo la lisi della membrana plasmatica, ossia quando il contenuto citoplasmatico si è già riversato nell'ambiente extra cellulare (Chung et al., 2000; Nylandsted et al., 2002). Come nell'apoptosi classica, i programmi di morte cellulare indipendente dalle caspasi possono essere scatenati da recettori di morte della membrana plasmatica o mediante il danneggiamento del DNA, sempre sotto il controllo della membrana mitocondriale esterna e comunque eseguiti da enzimi proteolitici. Altri organelli, come i lisosomi ed il reticolo endoplasmatico, hanno un ruolo importante nella percezione dello stress cellulare e nella definizione del destino cellulare. Le proteasi lisosomiali, denominate catepsine, possono promuovere l'intero spettro di

morfologie PCD, dalla “necrosis-like”, all’apoptosi classica (Foghsgaard et al., 2001). Le catepsine specialmente la catepsina B, L e D partecipano nella morte cellulare programmata (sia caspasi-dipendente che caspasi-indipendente) indotta da vari stimoli incluso i recettori di morte della famiglia TNF-R, la proteina oncosoppressore p53 e la camptotecina (Roberg et al., 1999). In conseguenza del tipo cellulare e dello stimolo le catepsine possono essere sopraregolate o sottoregolate dalle caspasi o anche agire in modo completamente indipendente da queste (Foghsgaard et al., 2001).

4) Possibili applicazioni terapeutiche degli inibitori di p53

a) p53: un determinante principale nella sensibilità alla terapia del cancro

La proteina p53 è un soppressore tumorale non funzionale nella maggior parte delle tipologie di cancro. Molti tumori rispondono al ripristino della proteina p53 “wild type” con un alto tasso di apoptosi o con l’arresto irreversibile del ciclo cellulare. In base a tali osservazioni si è giunti allo studio di terapie geniche il cui bersaglio è proprio la proteina p53. Purtroppo, i molti gruppi di ricerche impegnati nella sperimentazione di questa strategia terapeutica non hanno ottenuto grandi risultati a causa delle notevoli difficoltà che insorgono quando si tenta di introdurre vettori che esprimono la proteina p53 all’interno delle cellule tumorali (Fang e Roth, 2003). Generalmente, le cellule tumorali difettive per p53 o presentano delle mutazioni nei geni che codifica la proteina o sono caratterizzate da un difetto nel controllo post-trascrizionale della proteina che ne impedisce la funzionalità. Difetti di questo tipo potrebbero essere risolti mediante un ulteriore ed interessante approccio terapeutico rappresentato dal ripristino farmacologico della proteina p53 inattiva (Bullock e Fersht, 2001; Lain e Lane, 2003). Sebbene il ripristino della proteina p53 sia visto generalmente come la strategia anti cancro più solida e promettente, la sua riattivazione ha sicuramente un impatto nocivo su un organismo sottoposto a terapia. I trattamenti contro il cancro nei quali si utilizzano le radiazioni o i farmaci citotossici sono infatti associati all’induzione di stress genotossico nei tessuti sani, derivante o dal diretto danneggiamento del DNA o dall’incapacità delle cellule di andare incontro ad una normale mitosi. La risposta cellulare “in vitro” allo stress genotossico implica l’attivazione di p53 e di conseguenza l’innescarsi di una cascata di eventi che portano all’arresto del ciclo cellulare o all’apoptosi. Poiché tali eventi si verificano anche come effetto collaterale di una radioterapia o chemioterapia nei tessuti sani, ciò si traduce in un effetto fortemente debilitante sull’organismo del

paziente. Numerosi studi condotti sui topi hanno indicato una forte risposta apoptotica p53 dipendente dopo esposizione ai raggi γ nelle cellule del sistema ematopoietico (Cui et al., 1995), nei follicoli piliferi (Song S e Lambert, 1999), negli oligodendroblasti del midollo spinale (Chow et al., 2000) ed in parte nelle cellule epiteliali del tratto digerente (Merritt et al., 1994). Tutte queste osservazioni indicano che la proteina p53 gioca un ruolo chiave nella radio e chemio sensibilità dei tessuti ed in genere nella radio sensibilità dell'organismo; è infatti dimostrato che i topi deficienti per p53 sopravvivono a dosi di radiazioni che sono letali per gli animali "wild type" (Westphal et al., 1997). Sebbene p53 rappresenti il più importante fattore di protezione contro il cancro, la stessa proteina può quindi complicare drasticamente la cura dei tumori inducendo una massiccia percentuale di morte cellulare programmata specificamente nei tessuti normali e non in quelli tumorali a conseguenza dello stress genotossico sistemico che si associa alla radio e chemio terapia. L'insieme di tutte le osservazioni riportate indica la strada verso una terapia alternativa che si basa sulla inibizione farmacologica della proteina p53, un approccio il cui obiettivo è quello di ridurre gli affetti collaterali associati al trattamento dei tumori p53 deficienti.

b) La proteina p53 può rappresentare un fattore di resistenza nel trattamento dei tumori.

La proteina p53 è ritenuta il principale determinante nell'induzione di apoptosi conseguente al danneggiamento del DNA e la sua perdita è sinonimo di una prognosi non favorevole in molte forme di tumori (Faletto et al., 1998). Si ritiene quindi che il ripristino di p53 e l'attivazione della sua "pathway" apoptotica possa in molti casi rendere i tumori p53 deficienti più sensibili alla terapia. Occorre però tenere presente che tale modello può essere utile soltanto nel caso in cui il tipo cellulare trattato sia capace di utilizzare la via apoptotica p53 dipendente che in molti casi risulta essere non funzionale nei tumori. È quindi necessario stabilire quale sia l'effetto o il limite di una possibile riattivazione della proteina p53 nel caso di tumori su tessuti che mancano della via apoptotica mediata dalla stessa proteina. È noto che p53 sia anche responsabile del prolungato arresto del ciclo cellulare dopo un esposizione alle

radiazioni ionizzanti ed in assenza di apoptosi si crede che questo fenomeno possa facilitare le cellule nella riparazione del danno al DNA. Da tale considerazione si evince che i tessuti tumorali del suddetto tipo potrebbero avere una ridotta capacità di riparare il DNA ed essere quindi più suscettibili alla catastrofe mitotica a seguito dei trattamenti (fig. 10). Concludendo, in assenza di apoptosi la proteina p53 funzionale potrebbe agire nei tumori come un fattore di sopravvivenza. Il ruolo di p53 nella suscettibilità ai trattamenti contro il cancro non è così semplice come si riteneva in passato; il suo effetto può avere conseguenze benefiche o negative in base alla sua abilità di espletare le distinte funzioni (apoptosi, arresto reversibile del ciclo cellulare, arresto irreversibile del ciclo cellulare, controllo della stabilità genomica) nei singoli tessuti.

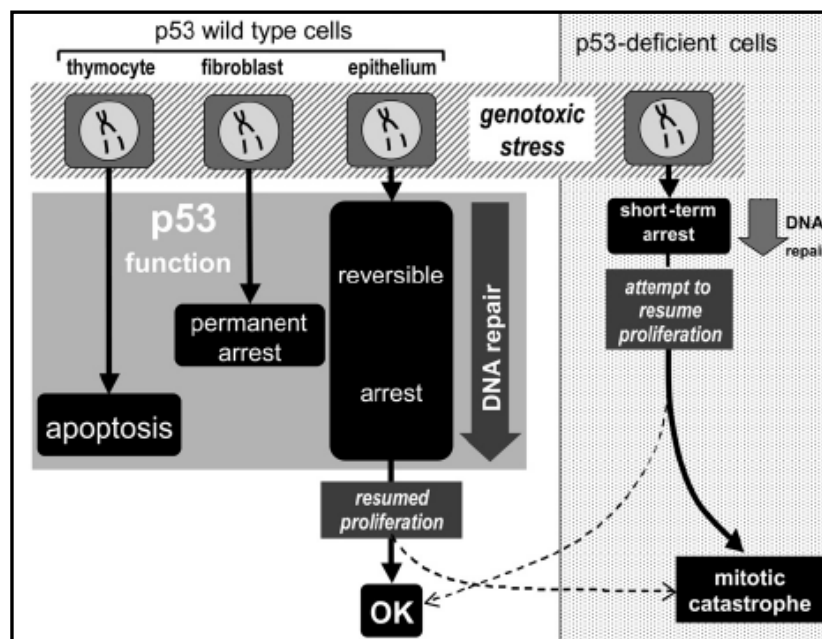


Fig. 10: la diversità della risposta allo stress genotossico mediata da p53 viene uniformata dall'inibizione di p53 (Gudkov e Komarova, 2005).

L'importanza diagnostica e terapeutica di p53 deve sempre essere correlata ai molti fattori addizionali specifici di un determinato contesto tumorale.

Sia il ripristino che la soppressione reversibile della proteina p53 possono risultare vantaggiosi nei trattamenti contro il cancro (fig. 11). Si ritiene che il primo tipo di approccio possa contribuire al ripristino della efficiente capacità di eliminare le cellule tumorali riportando la proteina ai livelli dei tessuti sani, mentre la seconda strategia potrebbe migliorare la riuscita dei trattamenti contro il cancro riducendone gli effetti collaterali convertendo reversibilmente i tessuti sani in tessuti p53 deficienti.

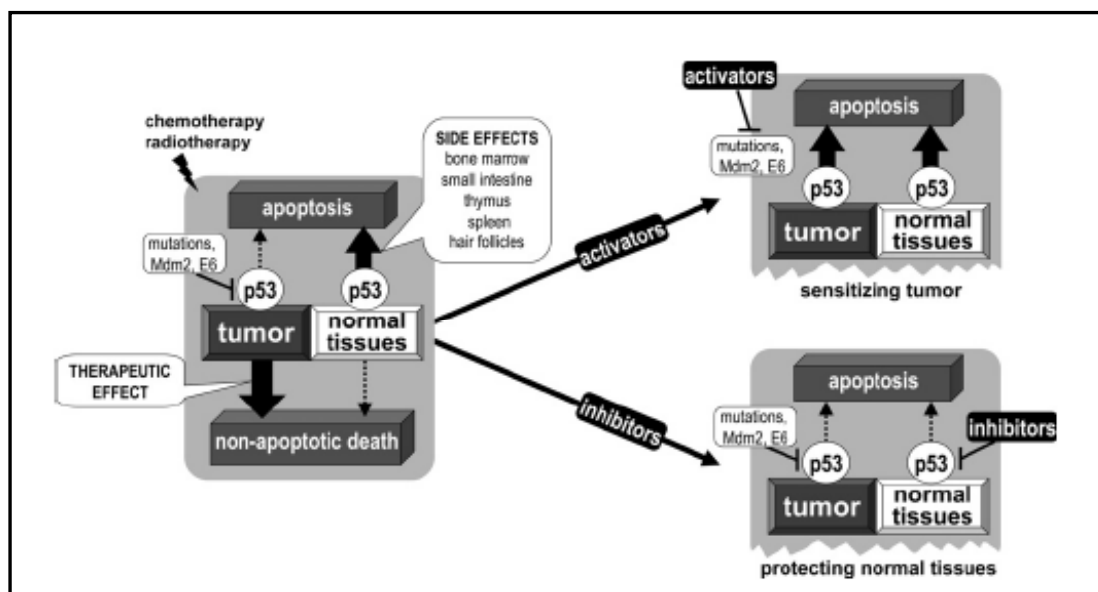


Fig. 11: principi per la modulazione farmacologica di p53 nella terapia dei tumori (Gudkov e Komarova, 2005).

c) Radio e chemio protezione mediata dall'inibizione farmacologica di p53: la Pifithrin- α .

Dalla scoperta del primo inibitore di p53, in molti laboratori si è indagato sull'inibizione della proteina allo scopo di proteggere i tessuti sani nel corso dei trattamenti contro il cancro ed in altre circostanze patologiche che implicano uno stress genotossico sistemico. Un approccio di questo tipo può essere applicato nel caso dei tumori p53 deficienti che rappresentano la più alta percentuale delle forme di cancro conosciute. La Pifithrin- α (PFT- α) è un inibitore chimico sintetico di p53

che ha la proprietà di salvare le cellule p53 proficienti dall'apoptosi indotta dalle radiazioni ionizzanti e da varie sostanze citotossiche. Sebbene non si conosca l'esatto meccanismo di azione della molecola, sembra che la PFT- α sia coinvolta nella modulazione del processo di "import-export" della proteina p53 tra il citoplasma ed il nucleo e ne riduca la stabilità a livello intranucleare. Esperimenti condotti "in vivo" dimostrano che la PFT- α riduce la mortalità dei topi esposti a radiazioni γ senza provocare in essi un aumento nell'incidenza tumorale (Komarov et al., 1999) e senza alterare l'efficacia dei trattamenti sui tumori p53 deficienti. Altre osservazioni indicano che la molecola protegge le cellule cardiache di topo dall'apoptosi indotta dalla Doxorubicina (Dox)(Liu et al., 2004). Quindi, la PFT- α potrebbe rappresentare un prototipo per molecole cardioprotettive utilizzabili nelle terapie antitumorali di pazienti con problemi al cuore. Il "cisplatin" è un agente chemioterapico molto utilizzato che oltre a provocare uno stress genotossico generale ha effetti neurotossici e per questa ragione il suo utilizzo è spesso accompagnato da complicazioni all'udito oltre che dalla perdita dei capelli. Studi condotti su colture cellulari di coclea ed otricolo pretrattati con "cisplatin" indicano che la PFT- α potrebbe ridurre gli effetti collaterali della terapia sull'organo uditivo e la perdita dei capelli (Zhang et al., 2003). Un limite ulteriore del "cisplatin" è rappresentato dalla sua tossicità renale (Jiang et al., 2004) ed anche in questo caso la PFT- α potrebbe essere utilizzata per ridurre l'apoptosi a livello nefronale. L'apoptosi p53 dipendente può rappresentare il meccanismo comune di perdita cellulare in molte malattie neurodegenerative quali l'Alzheimer o il morbo di Parkinson (De la Monte et al., 1998), suggerendo che l'utilizzo degli inibitori di p53 potrebbe avere un effetto benefico anche sui neuroni umani sottoposti a varie condizioni di stress (Komarova e Gudkov, 2001).

L'insieme delle seguenti osservazioni riportate indica che l'inibizione reversibile di p53, mediata dalla PFT- α ed in genere dagli inibitori della proteina, può rappresentare un approccio valido nel tentativo di ridurre gli effetti collaterali della chemio e radioterapia.

d) Rischio associato all'utilizzo degli inibitori di p53.

La sicurezza del paziente è certamente l'obiettivo principale su cui si debbono concentrare gli sforzi nella ricerca di nuove terapie contro il cancro. Da questo punto di vista l'inibizione della proteina p53 potrebbe risultare nella sopravvivenza di cellule geneticamente alterate dalle quali si potrebbero potenzialmente originare sottopopolazioni cellulari geneticamente instabili, che potrebbero aumentare il rischio dell'insorgenza di tumori secondari. Studi condotti sui topi indicano che la radioprotezione mediata dall'utilizzo degli inibitori di p53 non è associabile ad un aumento dei tumori, suggerendo che l'inibizione reversibile di p53 può essere considerata relativamente sicura (Komarov et al., 1999). Recenti studi condotti in vitro indicano invece che l'utilizzo della Pft- α su cellule linfoblastoidi umane trattate con agenti chemioterapici è accompagnata da un tasso elevato di anormalità cromosomiche (Bassi et al., 2002).

Occorre quindi valutare attentamente quali siano i rischi ed i benefici che accompagnano un utilizzo prolungato degli inibitori della proteina p53 in termini di insorgenza tumorale. In base alle conoscenze attuali tali molecole potrebbero essere utilizzate nella cura dei tumori su organismi adulti ma tale strategia terapeutica non sembra applicabile a livello embrionale poiché sarebbe troppo elevato il rischio di insorgenza di malformazioni nello sviluppo.

Parte sperimentale

5) Scopo della ricerca

Riparazione, arresto del ciclo cellulare e morte cellulare programmata sono tutte possibili strategie che la cellula può utilizzare in risposta al danneggiamento del DNA, al fine di salvaguardare l'integrità del genoma. Ciascuno di tali eventi è fortemente condizionato dalla fase del ciclo cellulare, dall'ambiente e dalla consistenza del danno. E' stato proposto un possibile ruolo dell'apoptosi (Schwartz e Jordan, 1997) nella selettiva eliminazione di cellule che portano tipi di aberrazioni instabili, come i dicentrici, i rings e i frammenti cromosomici rispetto a cellule con le aberrazioni stabili come le traslocazioni bilanciate. Questo studio ha riscontrato che le aberrazioni di tipo instabile sono molto più efficaci nel condurre le cellule alla morte cellulare in confronto a quelle stabili. L'analisi delle aberrazioni cromosomiche e dell'induzione di apoptosi indica una relazione tra i dicentrici e l'induzione di apoptosi, suggerendo che l'apoptosi rappresenta un processo che elimina preferenzialmente le cellule che hanno dicentrici in confronto con le cellule portanti traslocazioni stabili. Tuttavia, il meccanismo attraverso il quale un cromosoma dicentrico attiva il checkpoint che porta la cellula alla morte apoptotica non è ancora stato compreso. La cellula adotta questo tipo di strategia perchè la presenza di aberrazioni instabili, anche dette asimmetriche, comporta delle difficoltà meccaniche al momento della divisione cellulare. Al contrario, le aberrazioni di tipo stabile non costituiscono un ostacolo al momento della segregazione dei cromosomi e sono quindi trasmesse nel corso delle generazioni. Questa capacità le rende pericolose a lungo termine, sia per l'individuo, sia per la progenie nel caso dovessero interessare la linea germinale.

L'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi indotta dal danno al DNA sono processi la cui attivazione è regolata dalla proteina p53.

I dati sperimentali riportati in lavori scientifici di recente pubblicazione, indicano che la proteina p53 può essere coinvolta anche nella riparazione delle "double strand breaks" del DNA mediante il meccanismo PL ("precise ligation") ad alta fedeltà (Waldman et al., 2003).

Lo studio da noi presentato, effettuato su linfociti umani di sangue periferico (HPBL), è stato possibile mediante l'utilizzo della PFT- α , un inibitore sintetico della

proteina p53. Poiché i linfociti umani di sangue periferico rappresentano il sistema cellulare preferito per gli studi di dosimetria biologica è interessante comprendere l'efficacia del processo apoptotico nel modulare la frequenza delle cellule portatrici di aberrazioni cromosomiche indotte dopo l'irradiazione.

Allo stato attuale non è ancora ben chiaro il meccanismo d'azione della PFT- α ; si ipotizza tuttavia che agisca sul potenziale di trans-attivazione di p53. È stato osservato che la PFT- α ha la capacità di indurre un abbassamento dei livelli nucleari della proteina, riducendone così l'azione. È stato quindi suggerito che la PFT- α potrebbe interagire con il processo "import-export" di p53 tra nucleo e citoplasma. L'interesse del nostro studio si è rivolto sull'effetto della PFT- α nelle cellule umane normali. Infatti, l'apoptosi p53 dipendente indotta nei tessuti normali durante la radioterapia e la chemioterapia può danneggiare i tessuti sani, limitando l'azione dei trattamenti anti-cancro. Poiché l'inattivazione di p53 tramite la PFT- α produce una diminuzione dell'apoptosi (Komarov et al., 1999), la temporanea soppressione di p53 funzionale, incrementando la sopravvivenza di cellule non alterate, potrebbe risultare un aiuto farmacologico per diminuire gli effetti secondari della terapia anti-cancro. Comunque tale approccio è attuabile solo in tumori privi di p53 funzionale e inoltre, le cellule sopravvissute potrebbero essere geneticamente modificate e causare l'insorgenza di ulteriori tumori secondari (Komarov et al., 1999; Bassi et al., 2002) dato che la morte cellulare per apoptosi gioca un ruolo principale nel meccanismo che controlla l'eliminazione delle cellule maggiormente danneggiate che possono, altrimenti, costituire un rischio neoplastico.

Il gene *p53* è coinvolto anche nella regolazione di differenti geni, includenti il gene *survivina*, che sono implicati nell'induzione dell'apoptosi. Il danneggiamento del DNA indotto dai raggi X rappresenta un segnale per l'apoptosi p53 dipendente nella maggioranza delle cellule di mammifero (Szumiel, 1998). Inoltre la regolazione dei vari checkpoint del ciclo cellulare è p53 dipendente. Precedenti studi condotti dal nostro gruppo indicano che nei linfociti umani irradiati in G_0 , e trattati con l'inibitore della riparazione cellulare Ara-C che potenzia l'induzione dei dicentrici, e poi immediatamente stimolati alla crescita, le cellule aventi cromosomi dicentrici muoiono mediante l'apoptosi dipendente da p53/survivina (Bassi et al., 2003). Sempre nei linfociti umani irradiati in G_0 ma non stimolati, le cellule portatrici di

dicentrici muoiono nella fase G_0 del ciclo cellulare raggiungendo un picco massimo di apoptosi 48 ore dopo l'esposizione alla radiazione in presenza di Ara-C, seguendo un meccanismo apoptotico p53 dipendente (Belloni et al., 2005). Il gene soppressore tumorale p53 ha quindi un ruolo chiave nella risposta al DNA danneggiato e nel mantenimento della stabilità genomica nelle cellule di mammifero.

La prima parte della nostra ricerca è stata condotta per determinare la relazione tra la frequenza di alterazioni cromosomiche e l'apoptosi nella fase G_2 del ciclo cellulare. Per comprendere meglio la relazione tra il danno al DNA e l'induzione della morte cellulare programmata nei linfociti umani irradiati in G_2 , è stato esaminato anche il coinvolgimento della proteina p53. Per svolgere il lavoro sperimentale i linfociti umani di sangue periferico sono stati irradiati nella fase G_2 del ciclo cellulare sia in presenza che in assenza di PFT- α , a vari tempi, e sono stati studiati la cinetica del ciclo cellulare, l'incidenza di apoptosi, l'induzione di aberrazioni cromosomiche e l'espressione delle proteine p53 e survivina.

Nella seconda parte del presente lavoro abbiamo quindi utilizzato gli HPBL nella fase G_0 del ciclo cellulare per indagare sul possibile coinvolgimento di p53 nella riparazione del danno primario al DNA e sul ruolo di p53 nel mantenimento della stabilità genomica anche in relazione al processo apoptotico. Linfociti di sangue periferico sono stati irradiati in presenza o assenza di PFT- α e sono state studiate la cinetica di riparazione, l'induzione di aberrazioni cromosomiche e l'incidenza di apoptosi a vari tempi di recupero dopo il trattamento con i raggi X nella fase G_0 del ciclo cellulare.

6) Materiali & Metodi

a) Sistema cellulare

Linfociti umani

Nella realizzazione della parte sperimentale della mia tesi di dottorato sono stati utilizzati linfociti umani di sangue periferico (human peripheral blood lymphocytes-HPBL). Il sistema modello dei linfociti umani è sotto molti aspetti vantaggioso:

- 1) sono cellule di origine umana;
- 2) è relativamente semplice ottenere sangue in quantità sufficiente per procedere agli esperimenti;
- 3) la popolazione cellulare che si ottiene è costituita maggiormente di linfociti in fase G₀, quindi durante gli esperimenti gli effetti dovuti all'interferenza del ciclo cellulare dovrebbero essere minimizzati. I linfociti possono inoltre essere stimolati a proliferare mediante l'uso di attivatori come la phyto-haemagglutinin (PHA, Murex) che mimano l'effetto antigenico;
- 4) è possibile compiere sia studi in vitro che in vivo;
- 5) hanno distribuzione uniforme nel corpo umano.

Utilizzando i linfociti occorre considerare una certa variabilità nella risposta individuale ai diversi agenti, oltre alla tendenza spontanea ad andare in apoptosi nelle colture in vitro.

b) Isolamento dei linfociti

I linfociti umani di sangue periferico sono stati isolati da sacche arricchite di leucociti provenienti da donatori diversi. Il sangue viene diluito 1:1 in tampone fosfato salino (PBS).

L'isolamento viene effettuato mediante la stratificazione del sangue in una soluzione di polisaccarosio e sodio diatrizioato (Histopaque 1077, d=1.077-0.001 g/ml, Sigma) che consente la separazione delle varie componenti cellulari presenti nel sangue mediante un gradiente di densità.

10 ml di Histopaque 1077 vengono quindi depositati sul fondo di tubi Falcon da 50 ml contenenti il sangue diluito e, dopo centrifugazione per 30 minuti a 1800 rpm, si preleva lo strato di cellule mononucleate che si forma sull'interfaccia siero/Histopaque. Gli eritrociti ed i granulociti sedimentano invece sul fondo dei tubi dopo la centrifugazione. Lo strato dei linfociti, prelevato accuratamente con una pipetta Pasterur, viene trasferito in altri tubi e diluito 1:1 con PBS per poi essere ulteriormente centrifugato per 20 minuti a 1800 rpm. Si effettuano quindi altri due lavaggi in PBS allo scopo di purificare il pellet, eliminando così la quasi totalità delle piastrine presenti. Dopo l'ultimo lavaggio, una volta aspirato il sovrantante, i linfociti isolati vengono trasferiti in una capsula di Petri con il terreno di coltura Ham's-F10 complementato con:

- antibiotici (penicillina 50 UI/ml e streptomycin 50 µg/ml);
- L-glutamina 2 mM (1%);
- 20 % di siero bovino fetale inattivato mediante l'esposizione a 56° per 20 minuti.

Per procedere agli esperimenti occorre seminare circa 1×10^6 cellule/ml, dopo averne stimato la quantità utilizzando la camera di Burker per poi effettuare la semina in bottiglie da 50 ml. Le colture di linfociti vengono quindi incubate a 37°C, con una umidificazione d'aria del 95% e con il 5% di CO₂.

c) Protocollo sperimentale

Reagenti

Pifithrin-α (PFT-α) (Calbiochem): **2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyethanone, 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, ma 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. In fig.12 è riportata la struttura della molecola della PFT-α.

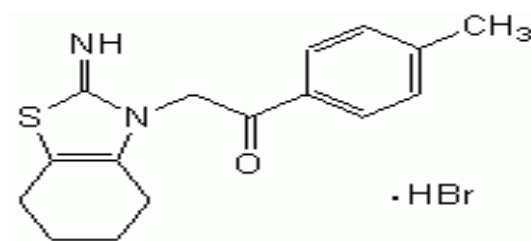


Fig.12: struttura della molecola della PFT- α .

Bromodeossiuridina (BrdUrd) (Sigma): è un analogo della base timina. È stato disciolto in acqua distillata ad una concentrazione di 300 $\mu\text{g/ml}$ e conservata a -20°C fino al momento dell'uso. Negli esperimenti condotti è stata utilizzata alla concentrazione di 6 $\mu\text{g/ml}$.

Colcemid (Sigma): blocca la polimerizzazione della tubulina e quindi inibisce la formazione delle fibre del fuso mitotico. Si aggiunge alla coltura cellulare (0,2 $\mu\text{g/ml}$) 3/4 ore prima di effettuare il fissaggio. La soluzione madre di tale composto ha una concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$.

Trattamenti in S/G₂

Nella figura 13 è illustrato il protocollo sperimentale programmato ed utilizzato negli esperimenti effettuati irradiando i HPBL nella fase S/G₂ del ciclo cellulare.

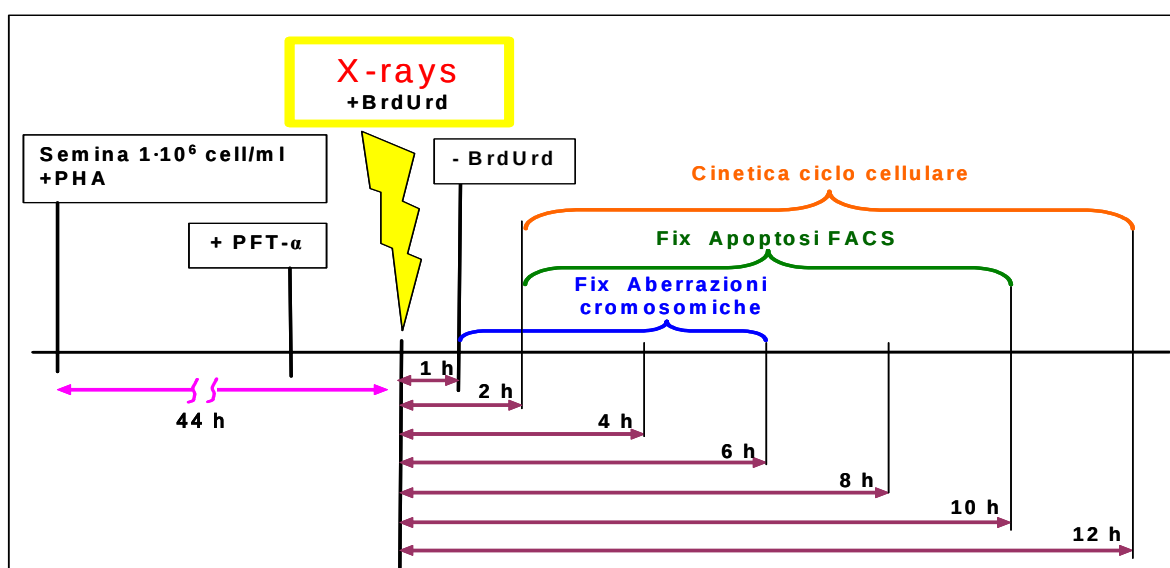


Fig. 13: protocollo sperimentale utilizzato negli esperimenti condotti su HPBL nella fase S/G₂ del ciclo cellulare.

I linfociti isolati dal “buffy coat” sono stati seminati nel terreno di coltura alla concentrazione di 1×10^6 /ml. Successivamente alla semina è stata aggiunta la PHA, in grado di stimolare la proliferazione cellulare. La pifitrina PFT- α viene somministrata ai linfociti 12h prima dell’irradiazione. Dopo 44 ore dalla stimolazione con PHA i linfociti nella fase G₂ del ciclo cellulare sono stati irradiati con una dose di 0,5 Gy di raggi X, sia in presenza che in assenza di PFT- α . Subito dopo l’irradiazione ai linfociti viene aggiunta la BrdUrd che viene lasciata nel terreno per 1h. L’incorporazione della BrdUrd nella molecola del DNA al posto della timina ha consentito l’analisi, tramite l’individuazione del bandeggio da replicazione con anticorpi specifici, delle metafasi che si trovavano o nella fase G₂ del ciclo cellulare (negativa al bandeggio da replicazione) o nella fase S (positiva al bandeggio da replicazione) al momento dell’irradiazione. Questa analisi è stata effettuata a diversi tempi di fissaggio (2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h) dall’irradiazione aggiungendo prima la colchicina per arrestare le cellule in metafase. I parametri analizzati in questo lavoro comprendono l’analisi della cinetica di proliferazione nella fase G₂ del ciclo cellulare, lo studio dell’apoptosi, un saggio citofluorimetrico per valutare l’espressione delle proteine p53 e survivina e l’analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X.

Trattamenti in G₀

Nelle figure 14 e 15 sono illustrati i protocolli sperimentali degli esperimenti programmati ed eseguiti irradiando i HPBL nella fase G₀ del ciclo cellulare.

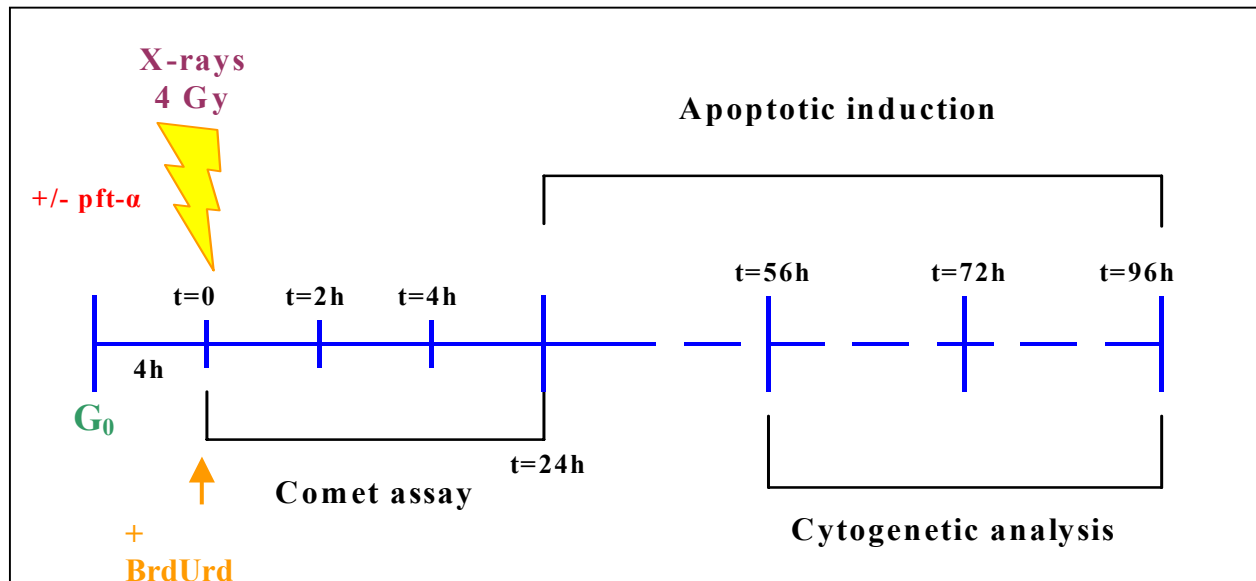


Fig.14: protocollo sperimentale utilizzato negli esperimenti condotti su HPBL derivanti dal donatore 1 e donatore 2

Il disegno sperimentale riportato nella figura 14 è stato progettato per gli esperimenti condotti su campioni di sangue intero derivanti dal donatore 1 e 2. Per ogni donatore sono stati seminati 4 punti sperimentali denominati:

- 1) K
- 2) PFT-α
- 3) 4 Gy
- 4) 4 Gy + PFT-α.

Il punto sperimentale 1 rappresenta il controllo, ed è costituito da linfociti stimolati alla proliferazione e non trattati mentre il campione n.2 è costituito da cellule

stimolate con PHA e mantenute in presenza di PFT- α per la durata dell'intero esperimento. Il punto 3 è costituito da linfociti sottoposti ad un trattamento con raggi X alla dose di 4 Gy ed immediatamente stimolati alla proliferazione mentre il campione n. 4 è analogo al punto 3 con la differenza che gli HPBL sono mantenuti in presenza di PFT- α

La PFT- α è stata aggiunta quattro ore prima dell'irradiazione nei campioni 2 e 4 mantenuta nel terreno di coltura fino al tempo di recupero di 96h.

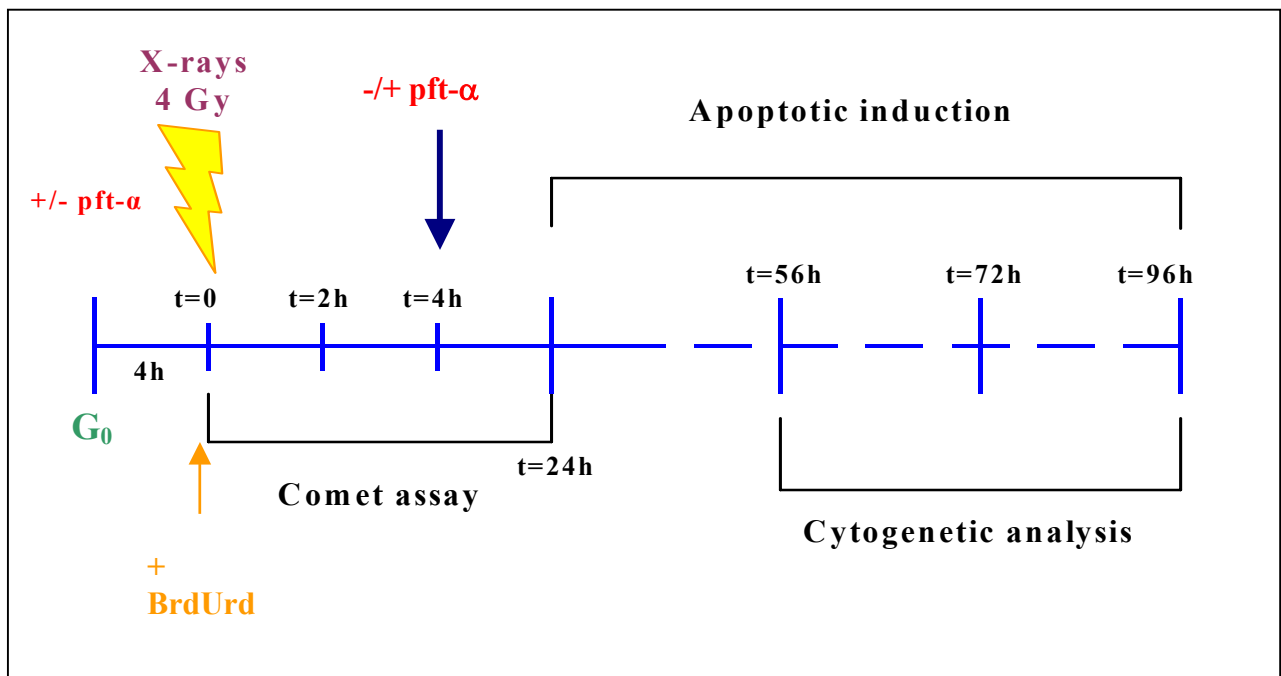


Fig.15: protocollo sperimentale utilizzato negli esperimenti condotti su HPBL derivanti dal donatore 3.

L'incorporazione della BrdUrd nel DNA ci ha consentito di distinguere le cellule che si trovavano alla prima, seconda e terza divisione mitotica dopo il trattamento con i raggi X durante l'analisi citogenetica dei campioni, mediante l'utilizzo della tecnica di colorazione differenziale dei cromatidi fratelli denominata "FPG" (Fluorocromo Plus Giemsa).

Il disegno sperimentale riportato nella figura 15 è relativo agli esperimenti condotti su sangue intero derivante dal donatore 3. In questo caso sono stati seminati 6 punti sperimentali denominati:

- 1) K**
- 2) PFT- α post**
- 3) 4 Gy**
- 4) 4 Gy + PFT- α pre**
- 5) 4 Gy + PFT- α post**
- 6) 4 Gy + PFT- α**

I campioni n.1,3,6 sono analoghi ai punti sperimentali 1,3,4 relativi al protocollo in figura 14. Il punto 2 è un controllo al quale è stata aggiunta la PFT- α dopo l'irradiazione degli altri campioni.

I punti sperimentali 4 e 5 sono stati aggiunti al disegno sperimentale per distinguere gli effetti dovuti all'azione della PFT- α sulla riparazione del danno al DNA e sull'apoptosi. Il campione n.4 è costituito da linfociti ai quali è stata aggiunta la PFT- α 4 ore prima dell'irradiazione e rimossa mediante la sostituzione del terreno di coltura 4 h dopo l'irradiazione e la stimolazione dei linfociti. Nel punto sperimentale 5 la PFT- α è stata addizionata soltanto 4h dopo l'irradiazione dei HPBL, ossia quando la riparazione del danno primario indotti dai raggi X è stata presumibilmente ultimata.

I parametri analizzati in questi esperimenti comprendono l'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni, lo studio dell'induzione apoptotica come conseguenza dei raggi X e l'analisi del danno al DNA sulle singole cellule mediante il comet essay (single cell gel electrophoresis).

d) Condizioni di irraggiamento

I linfociti in Go o nella fase G₂/S del ciclo cellulare sono stati irradiati con i raggi X, utilizzando una macchina Gilardoni MGL 200/8D, operante a 250 kV e 6 mA ("dose rate" 60 cGy/min) .

e) Stimolazione dei linfociti

Nella stimolazione dei linfociti si impiegano degli attivatori policlonali in grado di indurre i linfociti B e T alla proliferazione a prescindere dalla loro specificità antigenica. Le lectine rappresentano gli attivatori di uso più comune; sono proteine polimeriche di origine vegetale in grado di legare specificamente i residui glucidici delle glicoproteine di superficie delle cellule T, incluso il complesso del recettore TCR: CD3, mimando così il segnale trasmesso da tale complesso per la stimolazione. La concanavalina A e la fitoematoagglutinina, efficace prevalentemente sulle cellule T, sono le lectine più utilizzate a scopo sperimentale.

La stimolazione comporta tutta una serie di cambiamenti chimici e fisici a livello cellulare:

- modificazioni della permeabilità di membrana (aumento dell'attività di scambio Na^+/H^+ ; aumento del numero di canali K^+ aperti, aumento del trasporto di nutrienti);
- l'idrolisi dei fosfoinositoli di membrana provoca un innalzamento della concentrazione di calcio ionizzato;
- fosforilazione;
- viene incrementata la trascrizione di numerosi geni;
- la trasformazione blastica è una successione di eventi che si attuano in seguito alla stimolazione dei linfociti, che inizialmente si trovano nella fase G_0 del ciclo cellulare e sono molto piccoli, ma dopo uno stimolo antigenico entrano nella fase G_1 ed il loro diametro raggiunge i 10-15 μm , il citoplasma diventa più consistente ed il numero di organelli, così come la quantità di RNA, aumenta rispetto ai linfociti quiescenti. La progressione continua nella fase S fino alla mitosi.

Nella realizzazione degli esperimenti è stata utilizzata la *fitoematoagglutinina* (PHA) come mitogeno per attivare i linfociti T immunocompetenti inducendoli alla divisione cellulare. Dopo 48 ore di trattamento con PHA (concentrazione finale del 2%) normalmente si osservano le prime mitosi.

f) Analisi della morfologia nucleare apoptotica

Fissaggio e semina di linfociti isolati

Le cellule (2×10^5) vengono centrifugate per 10 minuti a 1200-1600 rpm in tubi eppendorf. Una volta aspirato il sopranatante, il pellet viene risospeso in 30 μ l di paraformaldeide al 4%. I linfociti sono così fissati per un tempo di 1-24 ore.

Terminato il fissaggio si prelevano 10 μ l del campione e si distribuiscono in modo omogeneo sui vetrini gelatinati che si lasciano asciugare. Si lavano accuratamente i vetrini con acqua distillata e si procede poi alla colorazione con ematossilina (Sigma) allo 0.1% per 10 minuti. I vetrini sono quindi nuovamente lavati e lasciati asciugare. Una volta coperti con un vetrino coprioggetto fissato con eukitt i vetrini sono pronti per essere osservati.

Fissaggio e semina di linfociti da sangue intero

Circa 1 ml di sospensione cellulare, contenente circa $2,5 \times 10^6$, viene centrifugato in tubi eppendorf per 7 minuti a 1400 rpm. Aspirato il sopranatante si risospende accuratamente il pellet e si aggiunge 1 ml di fissativo 3:1 (metanolo:acido acetico). Le sospensioni cellulari vanno nuovamente risospese e lasciate a temperatura ambiente per 5 minuti. Oltre a fissare le cellule, il fissativo provoca la lisi degli eritrociti che conferiscono al contenuto dei tubi una colorazione rosso bruno. Occorre quindi effettuare ripetuti lavaggi in PBS per purificare la sospensione cellulare. Infine si aspira il sopranatante e si aggiunge nuovo fissativo 3:1. I preparati sono ora pronti per la semina, che va effettuata su vetrini bagnati.

Analisi della morfologia nucleare

La morfologia nucleare si osserva al microscopio ottico facendo uso dell'obiettivo 100 x e di olio da immersione.

Per ogni punto sperimentale sono state controllate 500 cellule, e sono state considerate come apoptotiche le cellule con le seguenti caratteristiche morfologiche:

- 1) marginazione e condensazione della cromatina;
- 2) frammentazione del nucleo in corpi apoptotici.

g) Fissaggio e allestimento dei preparati citogenetici

Nelle due ore precedenti al fissaggio delle cellule, i campioni sono stati trattati con colcemid per bloccarle in metafase, momento nel quale la condensazione della cromatina ci consente di poter effettuare lo studio dei cromosomi al microscopio ottico con obiettivo 100x per valutare l'eventuale presenza di aberrazioni cromosomiche. 5 ml di terreno, contenenti circa 5×10^6 di linfociti, vengono prelevati e trasferiti in tubi falcon da 15 ml. Le cellule vengono quindi centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm (o 7 minuti a 1500 rpm), si aspira il sovrnatante, si risospende il pellet e si aggiungono in ogni tubo 5 ml di soluzione ipotonica KCl (0.75 M) previamente mantenuta a 37°C. I tubi vengono quindi lasciati per 10 minuti nel bagnetto a 37°C. Subito dopo occorre centrifugare nuovamente i tubi a 900 rpm per 8 minuti, si aspira il sovrnatante e, risospeso il pellet si aggiungono 5 ml di fissativo 3:1 (metanolo:acido acetico) versandolo nei tubi goccia a goccia. I tubi vengono poi nuovamente centrifugati (nelle stesse condizioni iniziali), si riaspira il sovrnatante, si risospende il pellet e si aggiunge nuovo fissativo. Tale procedura si ripete ancora una volta. Le cellule sono ora fissate e possono essere conservate in frigorifero a +4°C fino al momento della semina sui vetrini. Prima della semina si effettua una nuova centrifugazione dei tubi contenenti le cellule, in modo di poter eliminare il fissativo in eccesso. Il pellet può essere ora risospeso nel nuovo fissativo, che viene aggiunto in quantità tale da ottenere la giusta concentrazione di cellule per la semina sui vetrini. I vetrini debbono essere preparati prima lavandoli in acqua corrente e conservandoli in una soluzione di H₂O₂ e metanolo al 10% a +4 °C per un'ora almeno.

La sospensione finale di cellule viene quindi fatta cadere dall'alto sui vetrini bagnati goccia a goccia. I vetrini vanno quindi lasciati asciugare ed invecchiati 24 ore prima di procedere alla colorazione secondo la tecnica Fluorocromo plus Giemsa (FPG, Perry and Wolf, 1974). La metodica consiste nell'immergere i vetrini in una soluzione al 3% di Hoechts 33258 per 20 minuti, subito dopo i preparati vanno immersi in acqua di fonte ed esposti per 30 minuti ad una sorgente di luce UV. Quindi i vetrini vanno colorati con una soluzione di Giemsa al 3% nella quale vanno

immersi e lasciati per 7 minuti. Asciutti e coperti con vetrino coprioggetto (fissato con eukitt) i preparati sono pronti per essere studiati.

h) Reazione per colorazione con anticorpo antibromodeossiuridina.

L'applicazione di questa tecnica sperimentale risulta di fondamentale importanza per effettuare uno studio della cinetica del ciclo cellulare a seguito di un trattamento con raggi X nella fase S; ci consente infatti di individuare il bandeggio da replicazione tramite l'incorporazione di BrdUrd, e di distinguere così le cellule che si trovano nella fase S del ciclo cellulare al momento dell'irradiazione. I vetrini seminati vanno fatti invecchiare almeno una settimana prima di procedere alla reazione di colorazione. I vetrini vengono denaturati per 1 min. in una soluzione 10 mM di NaOH in 70% di etanolo in agitazione. Si procede poi alla disidratazione dei preparati effettuando dei passaggi di 5 minuti ciascuno in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo (70%, 90%, 100%). Si lasciano quindi asciugare i preparati. I vetrini vanno ora incubati per 30 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo "mouse anti-BrdUrd" (Boehringer-Mannheim), diluito 1:100 in buffer immunologico (PBS, 0,5% BSA e 0,5% Tween 20). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario si effettuano 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno in agitazione.

Nei successivi 30 minuti i preparati vanno incubati a temperatura ambiente con un anticorpo secondario "anti-mouse IgG-FITC" diluito 5:100 in buffer immunologico. Dopo aver eseguito altri 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno in agitazione, i campioni vanno nuovamente disidratati in soluzioni a concentrazione crescente di etanolo.

La colorazione con DAPI viene effettuata immergendo i vetrini in una soluzione di DAPI 0,2 µg/ml in SSC 2x per 5 minuti in agitazione. Si aggiungono quindi su ogni vetrino 40 µl di Vectashield Mounting Medium (Vector Lab) e si monta il vetrino coprioggetto. I vetrini sono ora pronti per essere analizzati al microscopio a fluorescenza. L'analisi è stata effettuata osservando 100 metafasi per punto sperimentale (usando l'obiettivo 100x), considerando le metafasi positive al

bandeggio da replicazione come cellule che al momento dell'irradiazione si trovavano nella fase S del ciclo cellulare.

i) Saggio citoflorimetrico per valutare l'espressione delle proteine p53 e survivina.

Per ogni punto sperimentale sono stati prelevati 2×10^6 di linfociti, contenuti in circa 2 ml di terreno. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate risospendendo il pellet cellulare in una soluzione al 50% di metanolo freddo in PBS e quindi lasciate per 24 ore nel frigorifero a -20°C (Kastan et al., 1991). Per l'analisi dell'espressione della proteina p53, le cellule sono state poi lavate per 2 volte in PBS ed incubate a $+4^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti in una blocking solution (PTA: 0,2 % Tween 20; 1% bovin serum albumin (BSA) in PBS). I linfociti sono stati poi centrifugati nuovamente ed incubati a $+4^{\circ}\text{C}$ per 1 ora con l'anticorpo monoclonale IgG₂A di topo anti p53 (DO-1) (SantaCruz Biotechnology) diluito 1:6 in PTA.

Dopo tre lavaggi in PTA i linfociti sono stati incubati 1 ora a $+4^{\circ}\text{C}$ con anti-topo IgG (H+L) (Vector Laboratories) diluito 1:200 in PTA, ed infine sono stati effettuati altri 3 lavaggi in PTA. Per l'analisi dell'espressione della proteina survivina le cellule sono state lavate per 2 volte in PBS ed incubate per 15 minuti in una blocking solution (PTS: 0,2 % Tween 20; 10% FBS in PBS) a $+4^{\circ}\text{C}$.

I linfociti sono stati poi centrifugati nuovamente ed incubati a $+4^{\circ}\text{C}$ per 1 ora con l'anticorpo policlonale Anti goat Sur diluito 1:100. Dopo tre lavaggi in PTS i linfociti sono stati incubati per 30 minuti a $+4^{\circ}\text{C}$ con anti-goat FITC diluito 1:100 in PTS, ed infine sono stati effettuati altri 3 lavaggi in PTS. I preparati, sia per l'analisi di p53 sia per la survivina, sono stati quindi colorati con ioduro di propidio (5 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) + RNasi (100 $\mu\text{g/ml}$) in PBS ed analizzati con FACS Calibur (Becton-Dickinson, San Josè, CA) equipaggiato con un Laser Class 1 operante ad una lunghezza d'onda di 488 nm e 13 mW di potenza. Come controllo è stato utilizzato un campione di linfociti precedentemente trattati con il solo anticorpo secondario.

I) Comet assay

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:

- 1) 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.
- 2) 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 2×10^4 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 (0,5% Natrium lauril sarcosinate, 1 mM di NaCl, 2 mM di EDTA, 0,03 M di NaOH, pH 10), ed in essa vengono quindi incubati a 4°C per 45 minuti. Dopo la lisi si effettua un trattamento necessario per fare in modo che il DNA cellulare si denaturi, lasciando i campioni per 45 minuti in 0,03 M di NaOH contenente 2 mM di EDTA. I vetrini sono quindi pronti per essere trasferiti nel contenitore per l'elettroforesi contenente una soluzione alcalina di NaOH 0,03 M.

La corsa viene effettuata a 0,8 V/cm ed ha la durata di 15 min. Bisogna sempre tenere in considerazione che tutte le suddette operazioni vanno effettuate al buio, minimizzando l'esposizione alla luce dei campioni. Terminata la corsa, si neutralizzano i vetrini con 0,4M Tris-HCl (pH 7,4), e si lavano con TE buffer (10 mM di Tris-HCl, 1 mM di EDTA, pH 7,4). 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 TE buffer 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".

7) Risultati

a) Esito degli studi condotti nella fase G₂ del ciclo cellulare.

Lo scopo del presente lavoro sperimentale era quello di analizzare l'effetto dell'inibizione della proteina p53 nella fase G₂ del ciclo cellulare, per cercare di comprendere meglio il suo ruolo sia nella formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sia nell'induzione dell'apoptosi in tale fase del ciclo. A tal fine i linfociti umani isolati dal "buffy coat" sono stati stimolati a proliferare e trattati con la PFT- α 12h prima dell'irradiazione. A 44h dalla stimolazione, e quindi presumibilmente nella fase G₂ del ciclo cellulare, i linfociti vengono esposti ad una dose di raggi X di 0,5 Gy. Subito dopo l'irradiazione ai linfociti viene aggiunta la BrdUrd che viene lasciata nel terreno per 1h. L'incorporazione della BrdUrd nella molecola del DNA al posto della timina ha consentito l'analisi, tramite l'individuazione del bandeggio da replicazione con anticorpi specifici, delle metafasi che si trovavano o nella fase G₂ del ciclo cellulare (negativa al bandeggio di replicazione) o nella fase S (positiva al bandeggio da replicazione) al momento dell'irradiazione.

I parametri analizzati in questo lavoro comprendono l'analisi della cinetica di proliferazione nella fase G₂ del ciclo cellulare, lo studio dell'apoptosi tramite l'analisi della morfologia nucleare, un saggio citofluorimetrico per valutare l'espressione delle proteine p53 e survivina e l'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X, a vari tempi di fissaggio dal trattamento.

Nella figura 16 è illustrata l'analisi della cinetica della proliferazione effettuata nella fase G₂ del ciclo cellulare. Tale analisi è stata effettuata ai tempi di fissaggio di 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h dall'irradiazione. Si può osservare come la percentuale di metafasi positive al bandeggio da replicazione è maggiore nei campioni di controllo e trattati con la sola PFT- α rispetto ai campioni irradiati sia in presenza sia in assenza di PFT- α . Inoltre, non si riscontrano differenze nella percentuale di metafasi positive al bandeggio da replicazione tra gli ultimi due campioni sopra citati.

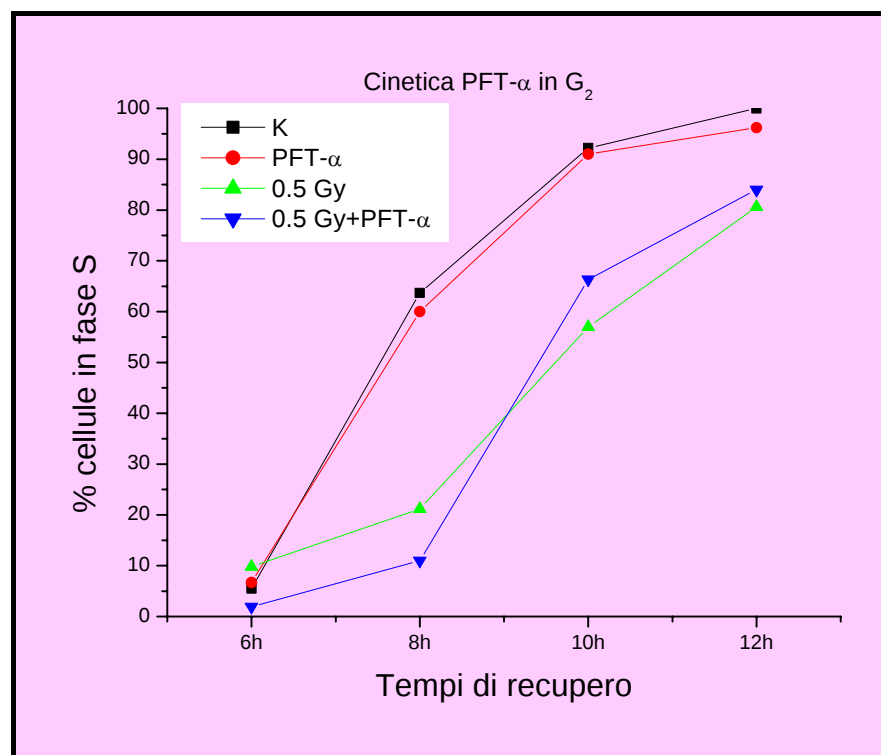


Figura 16: grafico della cinetica cellulare ai vari tempi di fissaggio.

Nella figura 17 sono raffigurati i risultati ottenuti dall'analisi della morfologia nucleare osservata su linfociti sottoposti al "pulse" di BrdUrd. Ciò ha consentito l'attribuzione delle cellule apoptotiche ad una specifica fase del ciclo cellulare risultando le cellule nella fase G₂ negative al bandeggio da replicazione e quelle nella fase S positive allo stesso.

L'analisi dell'apoptosi è stata effettuata ai tempi di fissaggio di 2h, 4h, 6h, 8h, 10h dall'esposizione ai raggi X. I risultati dell'analisi della morfologia nucleare apoptotica mostrano la presenza di un picco di induzione di apoptosi al tempo di fissaggio di 4h dall'irradiazione, sia nel campione trattato con i soli raggi X sia nel campione trattato con raggi X e PFT-α. Ai successivi tempi di fissaggio la percentuale d'induzione di apoptosi diminuisce gradualmente in entrambi i campioni. Tuttavia, al tempo di fissaggio di 8h dal trattamento con i raggi X si può osservare come il campione trattato con raggi X e PFT-α raggiunga i valori di controllo, mentre

il campione trattato con i soli raggi X presenti ancora una maggiore percentuale di cellule apoptotiche. Tale differenza è statisticamente significativa al test di Student ($p<0.01$). Nel campione di controllo e in quello trattato con la sola PFT- α l'induzione di apoptosi si mantiene ai livelli basali.

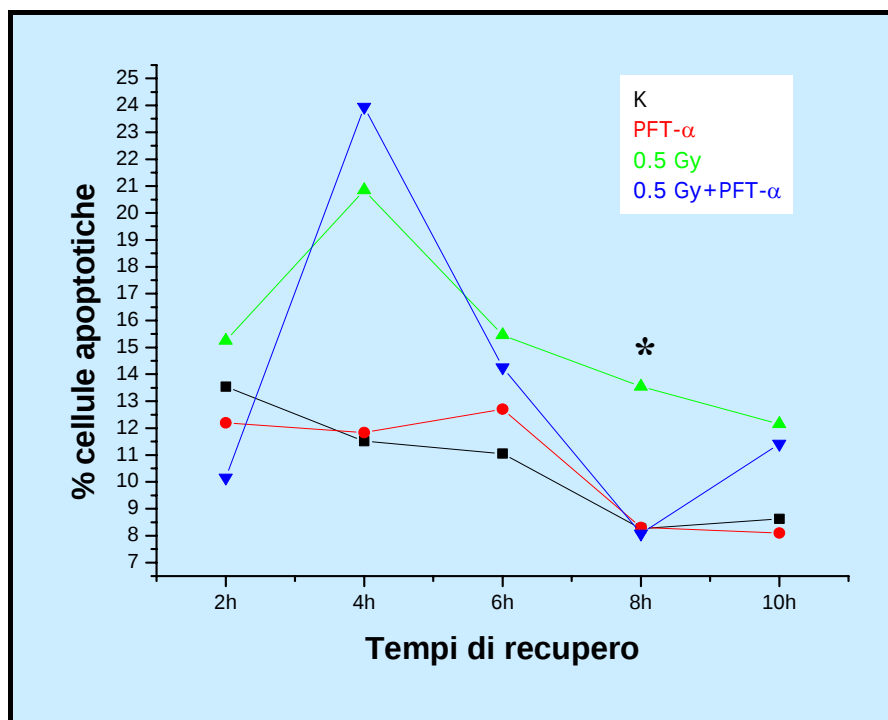


Figura 17: grafico dell'induzione di apoptosi ai vari tempi di fissaggio; (*) t-test $p<0.01$.

Riportiamo di seguito i risultati dello studio dell'espressione delle proteine p53 e survivina, effettuato tramite analisi citofluorimetrica con anticorpi specifici.

La figura 18 illustra il controllo negativo della p53; la figura 19 e la figura 20 rappresentano l'analisi della progressione del ciclo cellulare (vedi i grafici (a), (b), (c) e (d)) e dell'espressione di p53 (vedi i grafici (e), (f), (g) e (h)) rispettivamente dopo 4h e 8h dall'irradiazione. Tale analisi, effettuata anche per altri tempi di recupero dalle radiazioni (2h, 6h e 10h), ha rilevato una lieve presenza della proteina p53 al solo tempo di 8h, come è evidente dal confronto dei grafici (g) e (h) in fig.20.

Per quanto riguarda l'espressione della proteina survivina non è stata riscontrata la sua presenza per nessuno dei vari tempi di fissaggio dopo l'esposizione ai raggi X. La figura 21 riporta il controllo negativo della survivina; la figura 22 rappresenta l'analisi della progressione del ciclo cellulare (vedi i grafici (a) e (b)) e dell'espressione di survivina (vedi grafici (c) e (d)) dopo 8h dall'irradiazione.

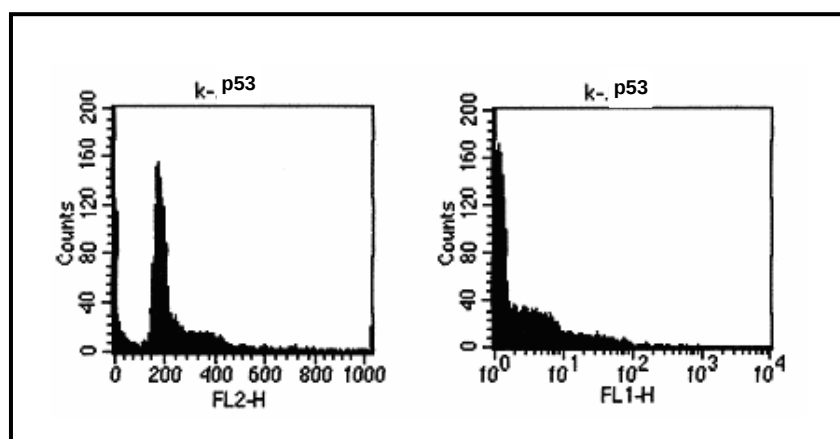


Figura 18: controllo negativo per l'espressione della proteina p53.

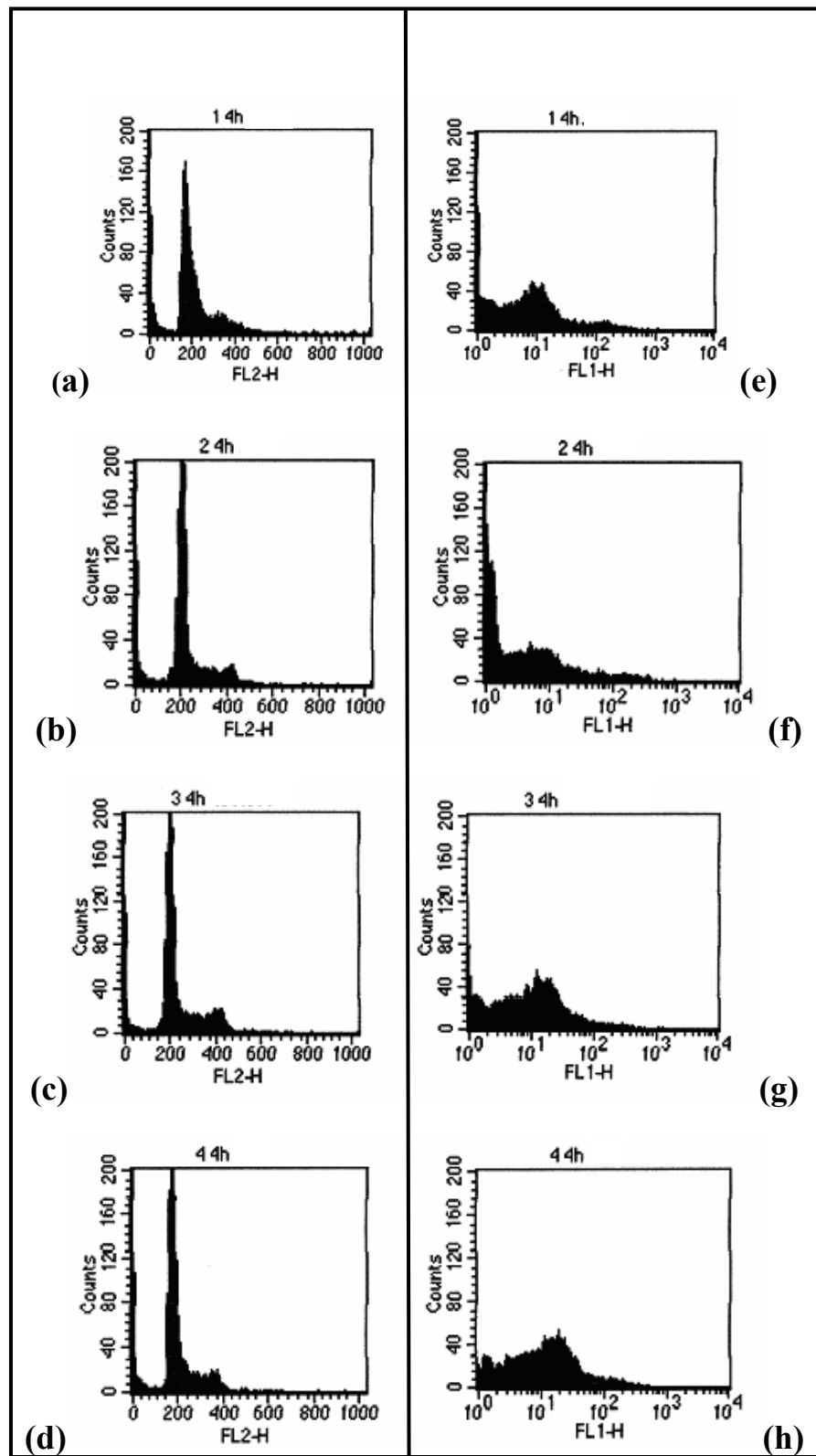


Figura 19: analisi della progressione del ciclo cellulare (a) (b) (c) (d) e dell'espressione di p53 (e) (f) (g) (h) a 4 ore dall'irradiazione. I numeri (1, 2, 3, 4) rappresentano i punti sperimentali: (1) controlli, (2) campioni trattati con la PFT- α , (3) campioni trattati con i raggi X, (4) campioni trattati con i raggi X e la PFT- α .

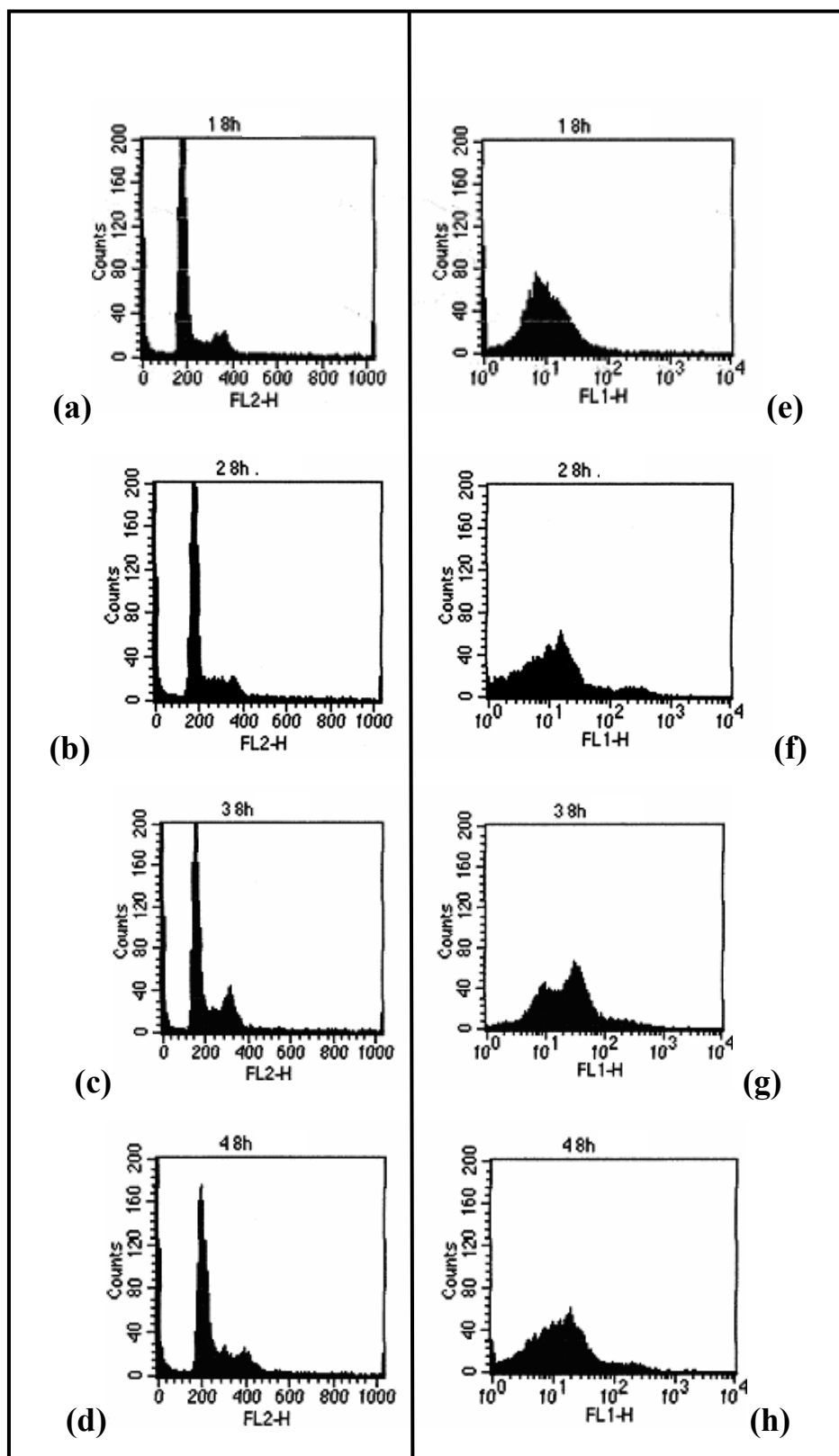


Figura 20: analisi della progressione del ciclo cellulare (a) (b) (c) (d) e dell'espressione di p53 (e) (f) (g) (h) a 8 ore dall'irradiazione. I numeri (1, 2, 3, 4) rappresentano i punti sperimentali: (1) controlli, (2) campioni trattati con la PFT- α , (3) campioni trattati con i raggi X, (4) campioni trattati con i raggi X e la PFT- α .

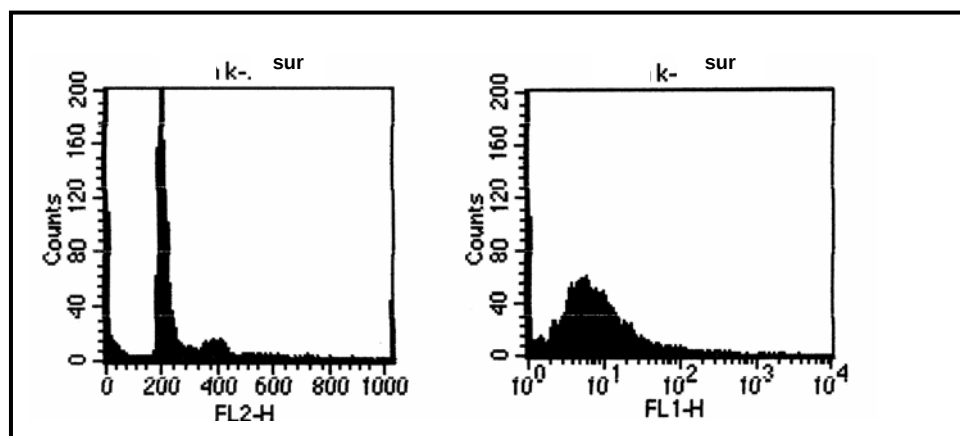


Figura 21: controllo negativo dell'espressione della proteina survivina.

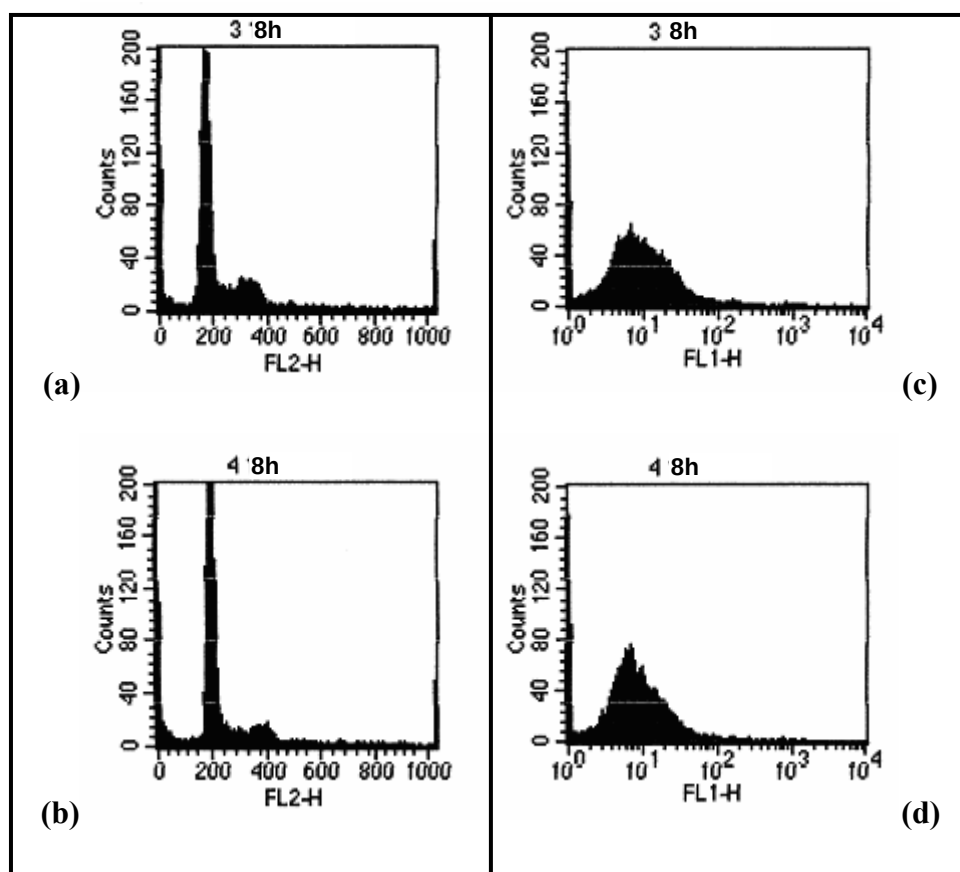


Figura 22: analisi della progressione del ciclo cellulare (a) (b) e dell'espressione di survivina (c) (d) a 8 ore dall'irradiazione. I numeri (3, 4) rappresentano i punti sperimentali: (3) campioni trattati con i raggi X, (4) campioni trattati con i raggi X e la PFT- α .

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dall'irradiazione dei linfociti nella fase G₂ del ciclo cellulare è riportata nella tabella in figura 23.

Treatment	Normals	Abnormals	Gap	B'	Iso	Minute	Chromatidic exchanges
1h K	98	2	2	0	0	0	0
1h Pft- α	100	0	0	0	0	0	0
1h 0,5 Gy	30	70	0	368	4	0	0
1h 0,5 Gy + Pft- α	24	76	16	346	6	0	0
2h K	98	2	2	0	0	0	0
2h Pft- α	90	10	12	0	2	0	0
2h 0,5 Gy	20	80	0	228	4	8	4
2h 0,5 Gy + Pft- α	22	78	4	170	4	0	4
4h K	98	2	2	0	0	0	0
4h Pft- α	98	2	10	0	0	0	0
4h 0,5 Gy	26	74	10	228	2	0	0
4h 0,5 Gy + Pft- α	32	68	2	218	2	0	0
6h K	96	4	4	0	0	0	0
6h Pft- α	87	13	13	1	0	0	0
6h 0,5 Gy	60	40	29	19	3	0	1
6h 0,5 Gy + Pft- α	56	44	43	18	1	0	1

Figura 23: analisi citogenetica dei linfociti in fase G₂ del ciclo cellulare a diversi tempi di fissaggio dall'irradiazione.

Come si può osservare nella tabella precedente, le rotture cromatidiche sono il tipo di danno citogenetico più ricorrente nei vari punti sperimentali e ai diversi tempi di fissaggio. In generale, si osserva un'induzione di rotture cromatidiche a tutti i tempi di recupero dai raggi X. In particolare, la frequenza di rotture cromatidiche è molto elevata ad 1h dopo l'esposizione alle radiazioni, diminuisce leggermente ai tempi di 2h e 4h e si riduce notevolmente solo al tempo di recupero di 6h. Inoltre, non si riscontrano differenze, in termini d'induzione di aberrazioni cromosomiche, tra il campione solo irradiato ed il campione trattato con i raggi X e la PFT- α ai tempi di

fissaggio di 1h, 4h e 6h. Una leggera differenza si osserva al solo tempo di 2h dall'esposizione ai raggi X.

Alcuni esempi di rotture cromatidiche sono visibili nelle foto delle metafasi effettuate al microscopio riportate nella figura 24; le rotture sono indicate dalle frecce rosse.

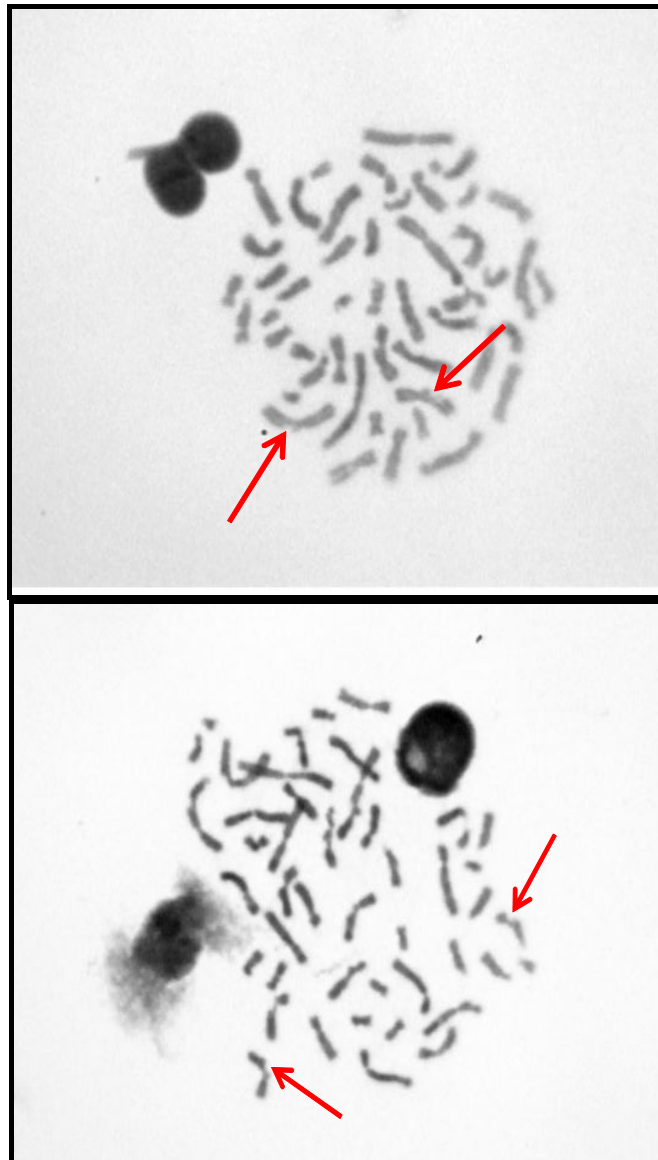


Figura 24: esempi di rotture cromatidiche (indicate dalle frecce) in metafasi di linfociti umani, analizzati dopo l'irradiazione.

b) Esito degli studi condotti nella fase G₀ del ciclo cellulare.

Lo scopo di questa seconda serie di esperimenti era quello di analizzare l'effetto dell'inibizione della proteina p53 nella fase G₀ del ciclo cellulare, per cercare di comprendere meglio il suo ruolo sia nella formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sia nell'induzione dell'apoptosi, sia nella riparazione del danno indotto al DNA dai raggi X in tale fase del ciclo. A tal fine sono stati condotti una serie di esperimenti irradiando gli HPBL di tre distinti donatori nella fase G₀ del ciclo cellulare. Come già detto nella sezione "Materiali e metodi" i parametri analizzati in questi esperimenti comprendono l'analisi del danno al DNA sulle singole cellule mediante il "Comet assay" (single cell gel electrophoresis), lo studio dell'induzione di apoptosi come conseguenza dei raggi X e l'analisi del danno citogenetico indotto dalle radiazioni. Nelle figure 25, 26 e 27 sono illustrati i risultati ottenuti rispettivamente con i donatori 1, 2 e 3 riguardanti l'analisi della cinetica di riparazione del danno primario indotto dai raggi X nella fase G₀ del ciclo cellulare ai tempi di recupero di 0h, 2h, 4h, e 24h. Analizzando i grafici si può facilmente constatare come i campioni irradiati in presenza di PFT- α presentino una cinetica di riparazione del danno al DNA più lenta rispetto ai campioni semplicemente irradiati. Questa osservazione è desumibile dai valori del "mean tail moment", parametro mediante il quale viene quantificata l'entità del danno primario presente nei singoli punti sperimentali analizzati.

Infatti, i risultati ottenuti indicano che dopo 2 e 4 h dall'irradiazione i campioni trattati con raggi X e PFT- α presentano valori di "mean tail moment" più alti rispetto ai campioni trattati con i soli raggi X. Inoltre, la differenza di "mean tail moment" tra i suddetti campioni è supportata dall'analisi statistica effettuata mediante il *t*-test di Student.

A 24 h dal trattamento con i raggi X non è più rilevabile alcuna differenza tra i campioni di linfociti esaminati poiché il valore del "mean tail moment" è simile in tutti i punti sperimentali, ciò a sostegno della avvenuta restituzione del danno indotto dai raggi X al DNA.

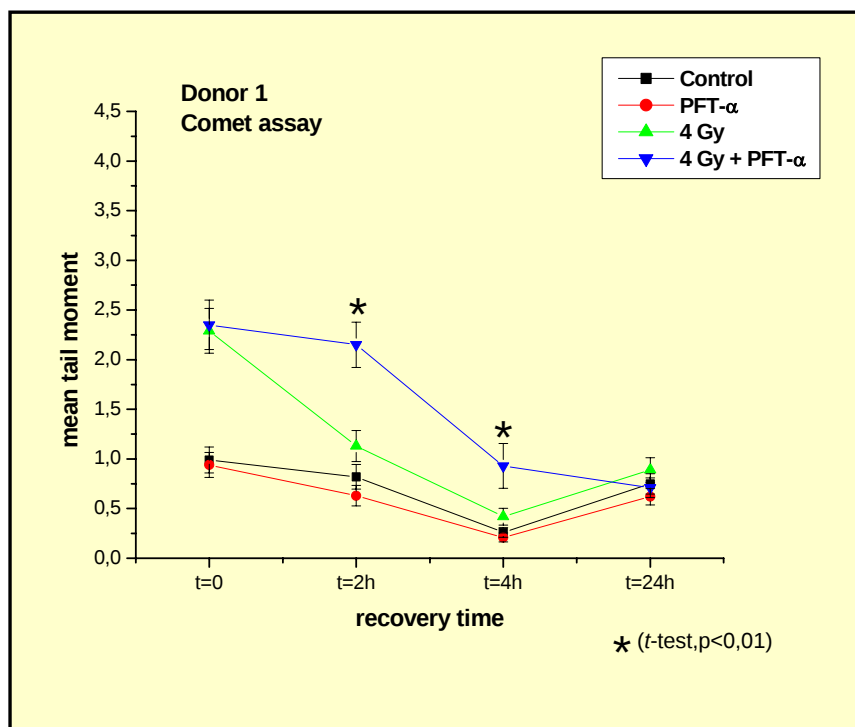


Fig 25: grafico relativo all'analisi della cinetica di riparazione del danno primario indotto dai raggi X nel donatore 1

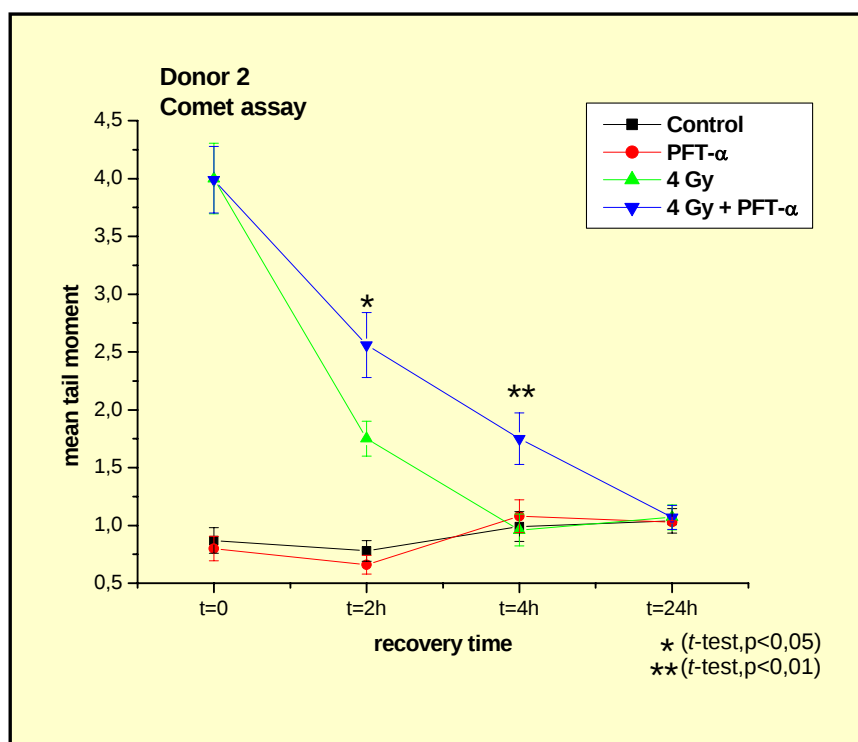


Fig 26: grafico relativo all'analisi della cinetica di riparazione del danno primario indotto dai raggi X nel donatore 2

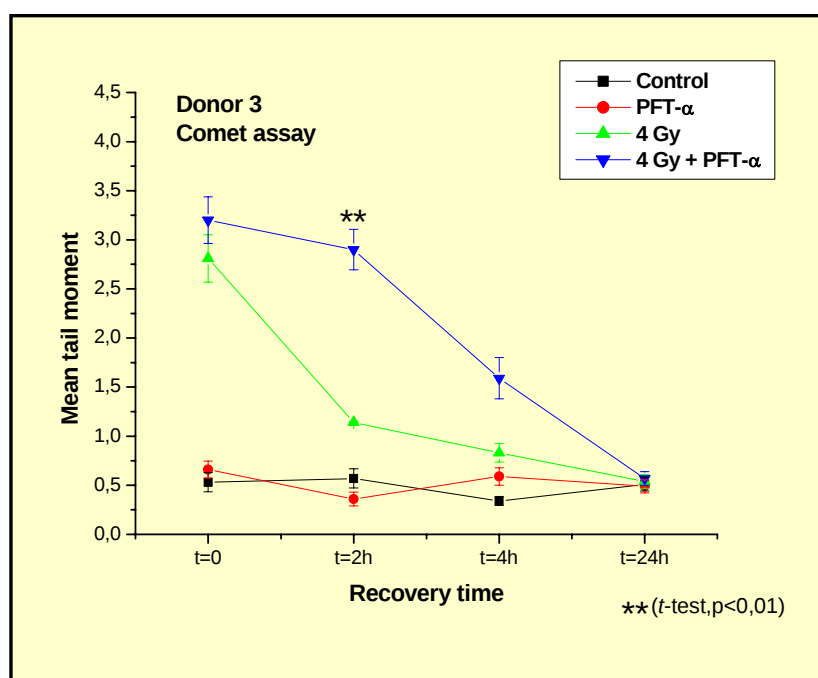


Fig 27: grafico relativo all’analisi della cinetica di riparazione del danno primario indotto dai raggi X nel donatore 3

Le piccole differenze riscontrate nell’entità del danno primario indotto dai raggi X nei linfociti dei singoli donatori, riflettono essenzialmente una differente radiosensibilità interindividuale. Infatti, come si può notare dai grafici (Fig. 25, 26, 27), le curve della cinetica di riparazione nei singoli punti sperimentali presentano un andamento molto simile in tutti e tre i casi analizzati. Occorre chiarire il fatto che, sebbene il “Comet assay” ci permetta di valutare l’entità del danno primario al DNA, l’utilizzo di tale tecnica analitica non ci consente di valutare se la riparazione di esso avvenga in maniera corretta.

Nelle figure 28, 29 e 30 sono illustrati i risultati ottenuti rispettivamente con i donatori 1, 2 e 3 riguardanti l’analisi della morfologia nucleare apoptotica effettuata 24h, 56h, 72h e 96h dopo l’esposizione dei campioni ai raggi X. Dai grafici relativi alle fig. 28, 29, e 30 si osserva come vi sia una differenza significativa nella quantità di cellule apoptotiche, tra i campioni irradiati e quelli cotrattati con raggi X e PFT-α “in continuos”. Tale dato indica che la PFT-α, inibendo l’azione della proteina p53, influenza il naturale ingresso in apoptosi dei linfociti irradiati, riducendone notevolmente la percentuale.

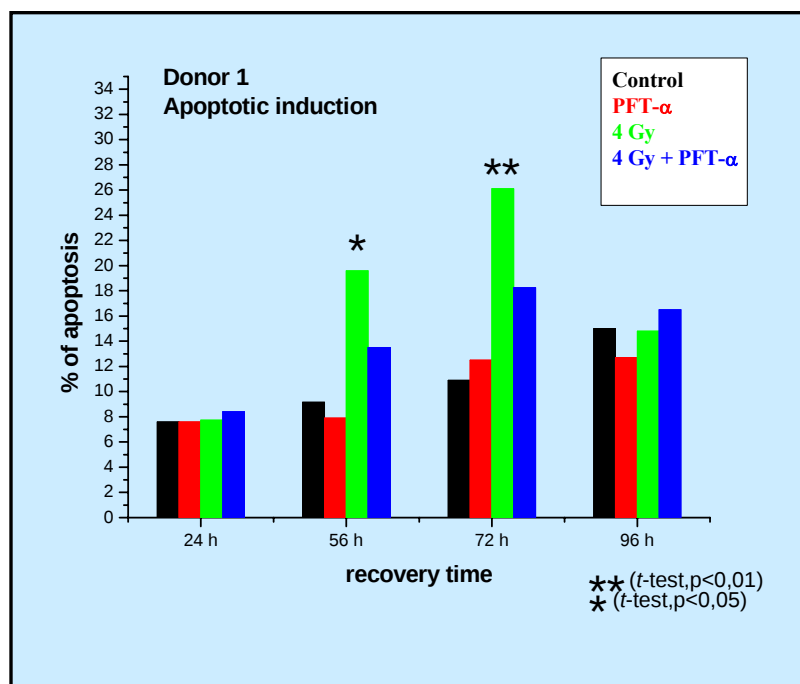


Fig. 28: grafico relativo all'analisi della morfologia nucleare apoptotica effettuata nel donatore 1

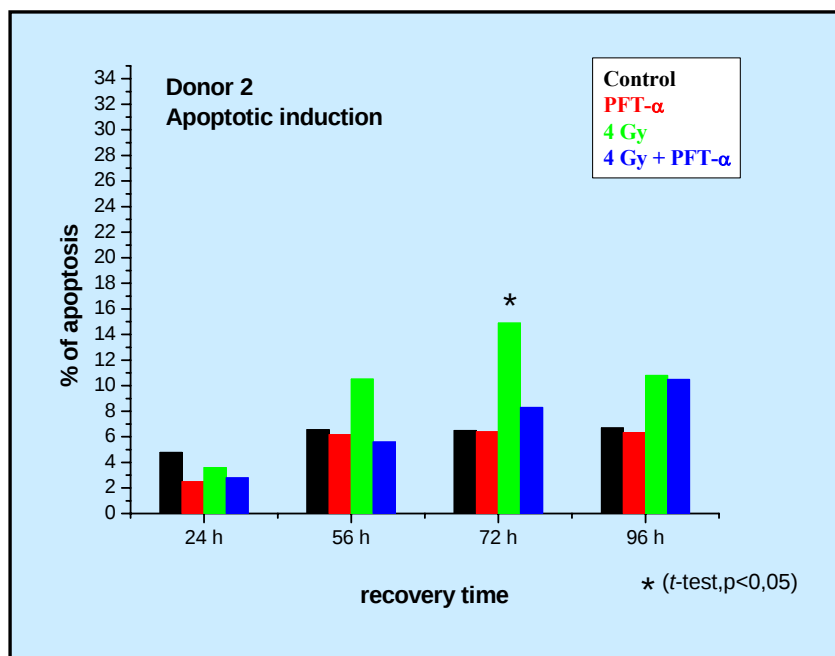


Fig. 29: grafico relativo all'analisi della morfologia nucleare apoptotica effettuata nel donatore 2

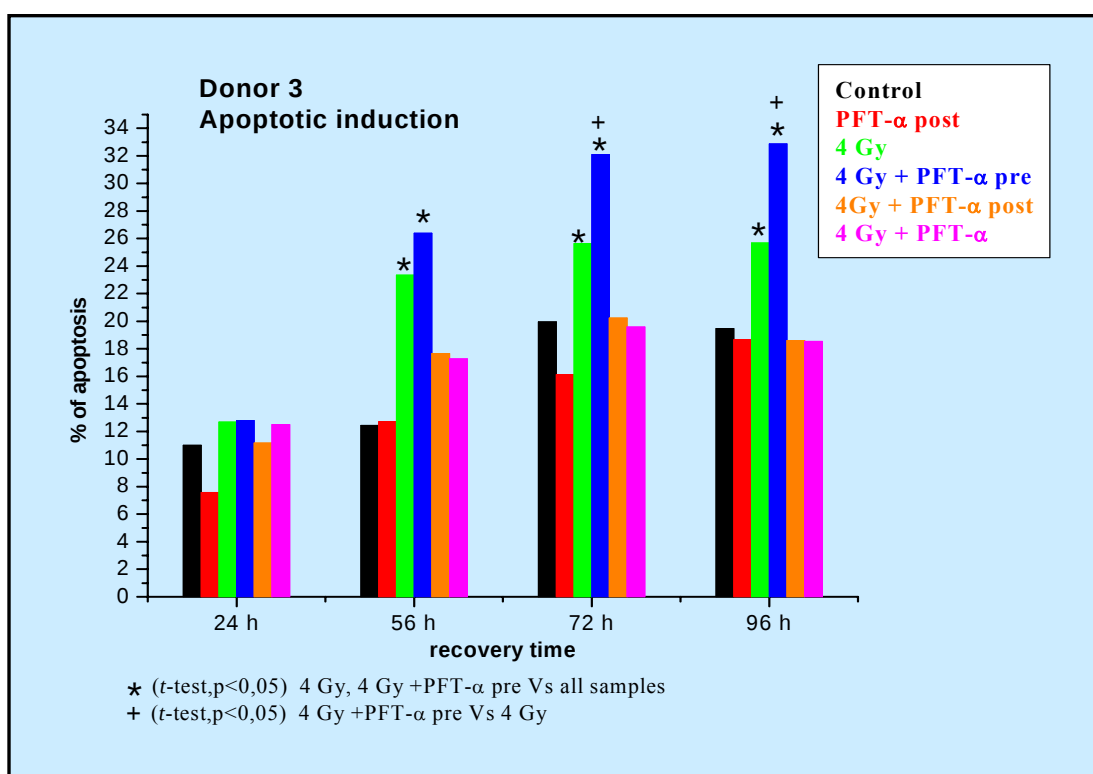


Fig. 30: grafico relativo all'analisi della morfologia nucleare apoptotica effettuata nel donatore 3

Le variazioni riscontrate nei risultati ottenuti tra i diversi donatori in relazione all'analisi della morfologia nucleare apoptotica, sia in termini di apoptosi spontanea che indotta, sono riconducibili alla diversa sensibilità interindividuale.

Come già descritto nella sezione “Materiali & Metodi”, per gli esperimenti condotti sui HPBL del donatore 3 sono stati aggiunti al disegno sperimentale originale due ulteriori punti, uno nel quale è stato effettuato il trattamento con PFT- α solo fino a 4 ore dopo l'irradiazione, un altro nel quale la PFT- α è stata aggiunta ai linfociti 4 ore dopo l'esposizione ai raggi X e lasciata nel terreno di coltura fino al termine dell'esperimento. Tale modifica al protocollo originale è stata effettuata con l'obiettivo di capire quale fosse l'importanza dell'inibizione della proteina p53 nel lasso di tempo in cui avviene la riparazione del danno indotto al DNA dai raggi X prescindendo dall'effetto antiapoptotico della PFT- α . Dal grafico nella figura 30 si osserva che ai tempi di recupero di 72 h e 96 h il campione di linfociti irradiati e

mantenuti in presenza di PFT- α solo per le successive 4 h presenta una quantità di cellule apoptotiche superiore rispetto a tutti gli altri campioni esaminati, anche rispetto al campione cotrattato con raggi X e PFT- α “in continuous”. Inoltre tale incremento è supportato da un’analisi statistica effettuata mediante il *t*-test di Student. Anche al tempo di recupero di 56 h l’analisi statistica indica che il campione irradiato e pre-trattato con PFT- α presenta una quantità di cellule apoptotiche significativamente superiore rispetto agli altri campioni esaminati, ad eccezione del campione solo irradiato rispetto al quale sebbene vi sia differenza in termini di apoptosi, non vi è il supporto dell’analisi statistica.

Nelle figure 31, 32 e 33 sono riportate le tabelle riguardanti i risultati dell’analisi citogenetica effettuata rispettivamente sui donatori 1, 2, 3 al tempo di recupero di 56 h dopo l’esposizione ai raggi X dei linfociti.

Donor 1 M₁	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Minute	Gap	B'	Total Ab	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''						
Treatment										
t = 56 h										
K	100	0	1	1	0	1	1	4	4	
PFT-α	100	0	0	0	0	1	2	3	3	
4 Gy	100	15	120	35	7	1	1	179	74	1,62
4 Gy + PFT-α	100	12	139	81	2	3	0	237 *	93 *	1,49

* = (*t*-test, $p < 0,01$)

Fig. 31: tabella relativa all’analisi citogenetica effettuata sul donatore 1 alla prima divisione mitotica dopo l’esposizione ai raggi X

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Donor 2 M₁	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Minute	Gap	B'	Total AB	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
Treatment		Ring	Dic	B''						
t = 56 h										
K	100	0	0	2	0	0	2	4	4	
PFT-α	100	0	0	0	0	2	0	2	2	
4 Gy	100	5	95	70	0	0	1	171	71	1,34
4 Gy + PFT-α	100	1	140*	75	0	1	1	218	98*	1,42

* = (t-test, p<0,01)

Fig. 32: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 2 alla prima divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Donor 3 M₁	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total Ab	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''					
Treatment									
t = 56 h									
K	100	0	0	0	4	0	4	4	
PFT-α post	100	0	0	0	0	0	0	0	
4 Gy	100	17	117	90	0	0	224	80	1,46
4 Gy + PFT-α pre	100	11	93	65	0	0	168	67**	1,37
4 Gy + PFT-α post	100	18	115	63	0	0	196	84	1,36
4 Gy + PFT-α	100	18	*150	91	0	0	259**	90	1,66

* = (t-test, p<0,05)

** = (t-test, p<0,01)

Fig. 33: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 3 alla prima divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Lo studio delle aberrazioni cromosomiche sugli HPBL è stato effettuato analizzando 100 metafasi per ogni punto sperimentale. I dati riportati nelle suddette tabelle, sebbene caratterizzati dalla variabilità interindividuale, indicano complessivamente che nei linfociti cotrattati con raggi X e PFT- α si riscontra un incremento del danno citogenetico rispetto ai campioni esposti ai soli raggi X. Analizzando i risultati in modo più dettagliato si può osservare come nei campioni di linfociti irradiati e mantenuti in presenza di PFT- α per il corso dell'intero esperimento sia stato riscontrato un aumento nel numero dei dicentrici rispetto ai campioni irradiati in assenza di PFT- α . In particolare, nei donatori 2 (fig. 32) e 3 (fig. 33) il dato è risultato statisticamente significativo. Per ciò che riguarda il conteggio delle aberrazioni totali i campioni di linfociti cotrattati con raggi X e PFT- α presentano dei valori maggiori rispetto ai campioni solo irradiati, ma la differenza è risultata statisticamente significativa solo nel caso del donatore 1 (fig. 31). Inoltre sempre nei campioni cotrattati con raggi X e PFT- α si riscontra una quantità di metafasi aberrate superiore rispetto ai campioni semplicemente irradiati. Nel caso dei donatori 1 (fig. 31) e 2 (fig. 32) la differenza nella quantità di cellule anormali osservate nei suddetti campioni è confermata anche dall'analisi statistica. Nel caso del donatore 3 l'analisi citogenetica (fig. 33) è stata effettuata su due ulteriori punti sperimentali: uno nel quale è stato effettuato il trattamento con PFT- α solo fino a 4 ore dopo l'irradiazione ed uno nel quale la PFT- α è stata aggiunta ai linfociti 4 ore dopo l'esposizione ai raggi X e lasciata nel terreno di coltura fino al termine dell'esperimento. Come si può dedurre osservando la tabella in entrambi i campioni è stato osservato un danno citogenetico statisticamente inferiore rispetto al campione irradiato e trattato con la PFT- α nel corso dell'intero esperimento, sia come quantità di cromosomi dicentrici sia come aberrazioni totali. Nel caso del campione pretrattato con PFT- α ed irradiato occorre sottolineare la presenza un numero di metafasi anormali statisticamente inferiore rispetto al campione esposto ai raggi X e trattato con PFT- α nel corso dell'intero esperimento.

Nelle figure 34, 35 e 36 sono riportate le tabelle riguardanti i risultati dell'analisi citogenetica effettuata rispettivamente sui donatori 1, 2, 3 al tempo di recupero di 72 h dopo l'esposizione ai raggi X dei linfociti.

Donor 1 M₂	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total AB	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''					
Treatment									
t = 72 h									
K	100	0	0	0	1	1	2	2	
PFT-α	100	0	0	1	2	1	4	4	
4 Gy	100	2	53	48	0	2	105	52	1,02
4 Gy + PFT-α	100	5	89*	45	0	2	154 *	67 *	1,32

* (t-test, p<0,05)

Fig. 34: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 1 alla seconda divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Donor 2 M₂	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total Ab	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''					
Treatment									
t = 72 h									
K	100	0	0	4	0	0	4	4	
PFT-α	100	0	0	2	0	0	2	2	
4 Gy	100	4	65	46	0	0	115	52	1,25
4 Gy + PFT-α	100	2	89*	82	0	0	173 *	59	1,5

* (t-test, p<0,05)

Fig. 35: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 2 alla seconda divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Donor 3 M_2	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total Ab	Abnormal cells	% of polyploid cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''						
Treatment										
t = 72h										
K	100	0	0	0	0	0	0	0	0%	
PFT- α post	100	0	0	0	2	0	0	2	0%	
4 Gy	100	18	57	62	0	0	137	70	24%	0,81
4 Gy + PFT- α pre	100	17	68	51	0	0	136*	52**	28%	1,3
4 Gy + PFT- α post	100	19	66	79	0	0	164	78	27%	0,84
4 Gy + PFT- α	100	16	87*	56	0	0	159	90	28%	0,96

* = (t-test, $p < 0,05$)

** = (t-test, $p < 0,01$)

Fig. 36: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 3 alla seconda divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B'' = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

I risultati che abbiamo ottenuto dall'analisi citogenetica effettuata alla seconda divisione mitotica dopo l'irradiazione indicano una riduzione generale del danno citogenetico nei linfociti di tutti i donatori analizzati.

Tuttavia tale riduzione risulta meno marcata nei campioni cotrattati con raggi X e PFT- α , sia per la presenza dei dicentrici, sia in termini di aberrazioni totali. Come si può constatare dalle tabelle riportate nelle figure 34, 35, 36, i suddetti campioni presentano sempre una quantità di dicentrici superiore a confronto dei rispettivi campioni irradiati e tale incremento risulta essere statisticamente valido. Lo stesso tipo di osservazione può essere effettuata valutando il danno citogenetico come aberrazioni totali presenti nelle metafasi esaminate, dove i linfociti irradiati e mantenuti in presenza di PFT- α per la durata dell'intero esperimento presentano una quantità maggiore di aberrazioni rispetto ai campioni sottoposti ai soli raggi X. Nel caso degli HPBL derivanti dal donatore 1 (fig. 34) e 2 (fig. 35) la differenza nel numero di aberrazioni totali presenti nei suddetti campioni è supportata dall'analisi

statistica effettuata mediante il test di Student ($p < 0,05$). Si nota inoltre che nei campioni cotrattati troviamo sempre un numero di cellule anormali leggermente superiore rispetto ai campioni solo irradiati.

Per ciò che concerne l'analisi del danno citogenetico riscontrato 72 h dopo l'irradiazione nel donatore 3 (fig. 36) è necessario sottolineare che nel campione mantenuto in presenza di PFT- α fino a 4 h dopo l'irradiazione sia stata osservata una quantità di aberrazioni totali inferiore rispetto al campione irradiato e mantenuto in presenza della molecola fino al termine dell'esperimento e che tale decremento è risultato statisticamente significativo. Nello stesso campione abbiamo inoltre verificato la presenza di un numero di cellule anormali nettamente inferiore (t-test, $p < 0,01$) in confronto a tutti gli altri campioni esaminati ed in particolare rispetto al campione cotrattato con raggi X e PFT- α "in continuos". Nel caso del donatore 3 abbiamo analizzato anche la presenza delle cellule poliploidi (fig. 36) in quanto la poliploidizzazione rappresenta un meccanismo per evitare l'apoptosi da parte delle cellule danneggiate; i risultati ottenuti indicano che non vi sono particolari differenze nell'entità del fenomeno tra i diversi campioni trattati.



Fig. 36: esempio di cellula poliploide multiaberrata riscontrata durante l'analisi del danno citogenetico a 72h nei linfociti del donatore 3.

Nelle figure 37, 38, 39, sono riportate le tabelle riguardanti i risultati dell'analisi del danno citogenetico rilevato rispettivamente nei linfociti dei donatori 1, 2, 3 al tempo di recupero di 96 h dopo l'esposizione ai raggi X.

Donor 1	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total AB	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
M₃		Ring	Dic	B''					
Treatment									
t = 96 h									
K	100	0	0	0	2	2	4	4	
PFT-α	100	0	0	0	0	0	0	0	
4 Gy	100	0	20	19	1	6	46	33	0,606
4 Gy + PFT-α	100	1	28	19	1	4	53	35	0,8

Fig. 37: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 1 alla terza divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

B'' = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Dalle tabelle si evince come vi sia un generale decremento sia nella presenza dei dicentrici, sia nella quantità di aberrazioni totali, sia nella quantità di cellule aberrate. Occorre però osservare che nei campioni irradiati e trattati con PFT- α "in continuos", tali parametri rimangono comunque leggermente più alti rispetto ai campioni semplicemente irradiati. Tale risultato è comune a tutti e tre i donatori analizzati e nel caso specifico del donatore 2 (fig. 38) permane una differenza significativa nella quantità di aberrazioni totali tra il campione esposto ai soli raggi X ed il campione cotrattato con raggi X e PFT- α . Per quanto riguarda il donatore 3 è interessante notare come nel campione sottoposto a trattamento con PFT- α solo fino a 4 ore dopo l'irradiazione vi sia una riduzione statisticamente significativa della quantità di metafasi anormali rispetto al campione irradiato e mantenuto in presenza PFT- α per l'arco dell'intero esperimento.

Donor 2 M ₃	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total AB	Abnormal cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''					
Treatment									
t = 96h									
K	100	0	0	0	0	0	0	0	
PFT-α	100	0	0	2	2	0	4	4	
4 Gy	100	1	31	25	0	0	57	37	0,84
4 Gy + PFT-α	100	1	47	42	1	1	92 *	46	1,02

Fig. 38: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 2 alla terza divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X

* (t-test, p<0,05)

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Donor 3 M ₃	Cells scored	Chromosomal aberrations		Isocrom.	Gap	B'	Total Ab	Abnormal cells	% of poliploid cells	Dic/Ab.cells
		Ring	Dic	B''						
Treatment										
t = 96h										
K	100	0	0	0	0	0	0	0	0%	
PFT-α post	100	0	0	2	0	0	0	2	0%	
4 Gy	100	9	32	42	0	1	84	44	2%	0,72
4 Gy + PFT-α pre	100	8	33	43	0	0	84	*39	5%	0,84
4 Gy + PFT-α post	100	11	38	60	0	0	109	55	6%	0,69
4 Gy + PFT-α	100	12	44	49	0	1	106	57	5%	0,77

Fig. 39: tabella relativa all'analisi citogenetica effettuata sul donatore 3 alla terza divisione mitotica dopo l'esposizione ai raggi X.

* (t-test, p<0,05)

B^{II} = frammenti cromosomici

Dic = dicentrico con frammento

Nella figura 40 sono riportati alcune immagini di metafasi di linfociti riscontrate durante l'analisi citogenetica effettuata sui donatori 1,2,3.

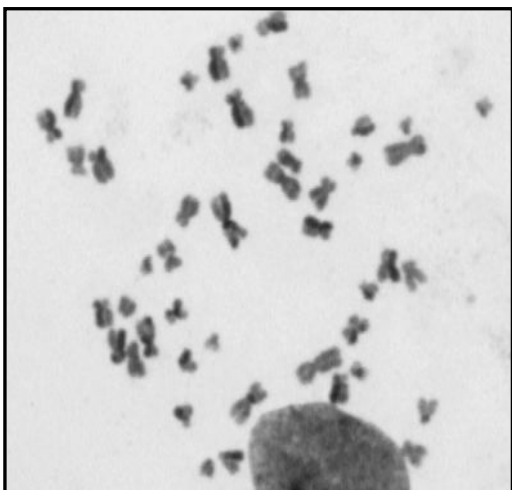
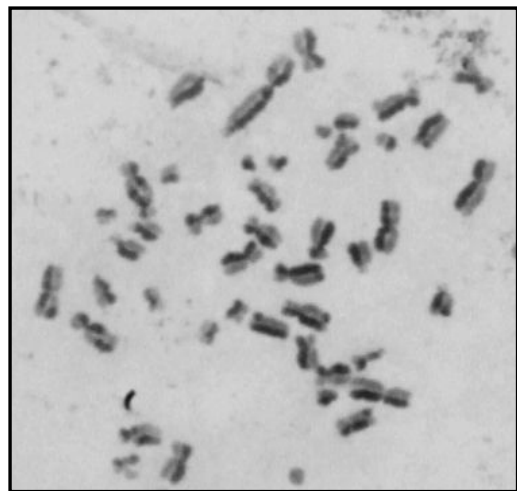
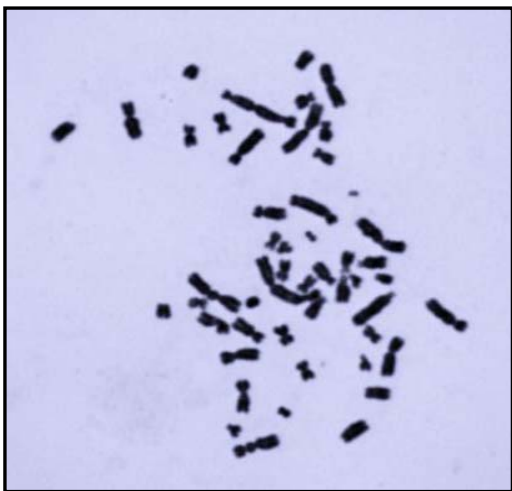


Fig. 40: esempi di metafasi riscontrate durante l'analisi del danno citogenetico ai tempi di recupero di 56 h, 72 h e 96 h dopo l'irradiazione nei linfociti. Si noti come la colorazione differenziale dei cromatidi fratelli ci consenta di distinguere le prime tre divisioni mitotiche successive al trattamento con raggi X.

8) Discussione

Riparazione, arresto del ciclo cellulare e morte cellulare programmata sono tutte possibili strategie che la cellula può utilizzare in risposta al danneggiamento del DNA al fine di salvaguardare l'integrità del genoma. L'arresto del ciclo cellulare e/o l'apoptosi indotta dal danno al DNA sono processi la cui attivazione è regolata dalla proteina p53. Dati sperimentali riportati in lavori di recente pubblicazione (Waldman et al., 2003) indicano che la proteina p53 possa essere coinvolta anche nella riparazione delle rotture a doppia elica del DNA mediante il meccanismo PL ad alta fedeltà. Circa la metà dei tumori umani sono accomunati da mutazioni nel gene che codifica per la proteina p53 e si crede che gran parte dei restanti tipi di tumore, pur esprimendo una p53 "wild type" siano caratterizzati da una via di soppressione tumorale mediata da una p53 inefficiente. Il logico approccio per la terapia contro il cancro consiste quindi nel ripristino della proteina p53 nelle cellule tumorali, così da renderle più sensibili alla terapia antineoplastica attraverso il recupero del meccanismo dell'apoptosi e del controllo della proliferazione cellulare p53 dipendente. A tale scopo si sta cercando di fornire alle cellule tumorali la proteina p53 esogena mediante l'uso di vettori, e si sta investigando su proteine e piccole molecole che abbiano la capacità di riattivare la p53 mutante. Recentemente è stata suggerita una strategia terapeutica alternativa applicabile ai tumori che hanno perso la funzione della proteina p53. Komarov e coll. (1999) sostengono che la temporanea inibizione di p53 ad opera della PFT- α nelle cellule normali, durante la terapia antitumorale, potrebbe salvarle dall'apoptosi p53 dipendente, risparmiando così quei tessuti che contengono dei compartimenti di cellule attivamente proliferanti come le mucose ed il sistema ematopoietico. Allo stato attuale non è ancora ben chiaro il meccanismo d'azione della PFT- α ; si ipotizza tuttavia che agisca sul potenziale di trans-attivazione di p53. Non sappiamo se la PFT- α alteri la capacità di p53 di legarsi a specifiche regioni del DNA in seguito all'esposizione ad agenti genotossici, tuttavia ha la capacità di indurre un abbassamento dei livelli nucleari della proteina, riducendone così l'azione. E' stato quindi suggerito che la PFT- α potrebbe interagire con il processo di importo-esporto di p53 tra nucleo e citoplasma.

Nel determinare il destino della cellula è importante anche la fase del ciclo cellulare e il tipo di aberrazione cromosomica eventualmente presente. Infatti, secondo alcuni autori il processo apoptotico agisce eliminando preferenzialmente le cellule contenenti aberrazioni cromosomiche di tipo instabili, come i dicentrici e i rings, rispetto a quelle di tipo stabile come le traslocazioni (Schwartz e Jordan, 1997). La cellula adotta questo tipo di strategia perché la presenza di aberrazioni instabili, anche dette asimmetriche, comporta delle difficoltà meccaniche al momento della divisione cellulare. Tali difficoltà determinano la formazione di ponti anafasici i quali disturbano la divisione mitotica e portano alla formazione di cellule figlie con patrimonio genetico sbilanciato. Al contrario, le aberrazioni di tipo stabile non costituiscono un ostacolo al momento della segregazione dei cromosomi e sono quindi trasmesse nel corso delle generazioni. Ciò le rende pericolose a lungo termine, sia per l'individuo, sia per la progenie nel caso dovessero interessare la linea germinale. Infatti, è stato osservato che nei linfociti umani irradiati in G_0 , e trattati con l'inibitore della riparazione cellulare Ara-C che potenzia l'induzione dei dicentrici, e poi immediatamente stimolati alla crescita, le cellule aventi cromosomi dicentrici muoiono mediante l'apoptosi dipendente da p53/survivina (Bassi et al., 2003). Sempre nei linfociti umani irradiati in G_0 ma non stimolati, le cellule portatrici di dicentrici muoiono nella fase G_0 del ciclo cellulare raggiungendo un picco massimo di apoptosi 48 ore dopo l'esposizione alla radiazione in presenza di Ara-C, seguendo un meccanismo apoptotico p53 dipendente (Belloni et al., 2005).

Lo scopo degli esperimenti condotti nella fase G_2 del ciclo cellulare era quello di analizzare l'effetto dell'inibizione della proteina p53, tramite la PFT- α , per cercare di comprendere meglio il suo ruolo sia nella formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni ionizzanti sia nell'induzione dell'apoptosi in tale fase del ciclo. A tal fine i linfociti umani isolati dal "buffy coat" sono stati indotti a proliferare e trattati con la PFT- α 12h ore prima dell'irradiazione. A 44h dalla stimolazione, e quindi presumibilmente nella fase G_2 del ciclo cellulare, i linfociti sono stati esposti ad una dose di raggi X di 0,5 Gy. Subito dopo l'irradiazione ai linfociti è stata aggiunta la BrdUrd che veniva lasciata nel terreno per 1h. A vari tempi di recupero sono stati analizzati la cinetica del ciclo cellulare, l'apoptosi,

l'espressione delle proteine p53 e survivina e le aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X.

Lo studio della cinetica di proliferazione effettuata nella fase G₂ del ciclo cellulare conferma che la radiazione ionizzante provoca un rallentamento della progressione cellulare dovuta, come noto, all'arresto del ciclo cellulare, per consentire la riparazione del danno indotto dai raggi X alla molecola del DNA. Con riferimento all'effetto del trattamento con l'inibitore della proteina p53, PFT- α , non avendo riscontrato differenze tra i campioni trattati e non, possiamo concludere che la PFT- α non altera l'avanzamento del ciclo cellulare sia nei linfociti di controllo non irradiati sia in quelli irradiati.

I risultati ottenuti dall'analisi della morfologia nucleare apoptotica suggeriscono l'attivazione del processo di morte cellulare per apoptosi già a tempi brevi di recupero (4h) dall'esposizione ai raggi X dove si osserva un picco nella percentuale di cellule apoptotiche. L'utilizzo del "pulse" di BrdUrd ci ha consentito di attribuire la provenienza di tali cellule alla fase G₂ del ciclo cellulare, fase in cui era avvenuta l'irradiazione dei linfociti. Inoltre, la presenza dell'inibitore sintetico PFT- α non ha influenzato il tasso di induzione di morte ai primi tempi (2h, 4h, 6h) di recupero dall'irradiazione. Tuttavia, ai successivi tempi di fissaggio (8h), quando l'apoptosi diminuisce gradualmente, si osserva una differenza statisticamente significativa tra il campione trattato con i raggi X e PFT- α , che raggiunge i valori di controllo, e il campione trattato con i soli raggi X dove permane una maggiore percentuale di cellule apoptotiche. Tale differenza può essere spiegata con l'effetto della PFT- α , nota per esercitare la sua funzione nella inibizione del processo apoptotico.

Dai dati fin qui esposti possiamo suggerire che l'innesco del processo apoptotico che avviene subito dopo l'esposizione dei linfociti nella fase G₂ alle radiazioni, risulta indipendente dalla proteina p53. Contrariamente, ai tempi successivi (8h), avendo riscontrato un effetto della PFT- α sulla diminuzione della percentuale di cellule apoptotiche, la morte cellulare sembra dipendere dall'azione della p53. L'analisi citofluorimetrica sostiene tale ipotesi poiché ha rilevato una lieve presenza della suddetta proteina solo ai tempi più lunghi di recupero (8h) dall'esposizione ai raggi X.

Dallo studio delle aberrazioni cromosomiche indotte dall'irradiazione dei linfociti nella fase G₂ del ciclo cellulare non si riscontrano differenze, in termini di induzione di rotture cromatidiche, tra il campione solo irradiato ed il campione trattato con i raggi X e la PFT- α , ma solo una loro graduale diminuzione con il susseguirsi dei vari tempi di fissaggio, e l'assenza dell'induzione di scambi cromatidici. Questo dato conferma ulteriormente l'indipendenza del processo apoptotico indotto in G₂ dall'azione della proteina p53. Infatti, l'inattivazione della p53 tramite la PFT- α , come precedentemente dimostrato (Komarov et al., 1999; Bassi et al., 2002), porta ad una diminuzione dell'apoptosi ed ad un contemporaneo aumento delle aberrazioni cromosomiche. Inoltre, dai dati ottenuti dall'analisi delle aberrazioni cromosomiche possiamo anche suggerire che la proteina p53 non giochi un ruolo, almeno nella fase G₂ del ciclo cellulare, nella riparazione delle rotture a doppia elica del DNA indotte dai raggi X dato che si riscontra la medesima frequenza di rotture cromatidiche sia nel campione solo irradiato sia in quello trattato con i raggi X e la PFT- α .

Infine, dall'insieme dei dati sperimentali possiamo concludere che l'apoptosi che si innesca nelle prime ore dall'irradiazione dei linfociti nella fase G₂ del ciclo cellulare è indipendente dall'azione della proteina p53 e conseguentemente insensibile all'effetto della PFT- α . Tale conclusione è apparentemente in contrasto con quanto avviene nei linfociti umani irradiati in G₀ e stimolati a vari tempi dall'irradiazione dove la morte cellulare per apoptosi è p53 dipendente ed il segnale di innesco del processo apoptotico è la formazione del cromosoma dicentrico (Bassi et al., 2003; Belloni et al., 2005). Possiamo ipotizzare che la via p53 indipendente si attivi, nei linfociti in G₂, data l'assenza, nelle metafasi analizzate, di scambi cromatidici che possono portare alla formazione di cromatidi dicentrici sostenendo, anche se in via indiretta, il ruolo del dicentrico nell'attivare l'apoptosi p53 dipendente. Viste le incoraggianti indicazioni forniteci dal lavoro svolto fino a questo punto abbiamo ritenuto opportuno effettuare ulteriori approfondimenti incentrando la nostra attività di ricerca sulla verifica di una reale correlazione tra il danno primario indotto al DNA dalle radiazioni ionizzanti, il danno citogenetico e l'apoptosi in presenza di PFT- α . A tale proposito sono stati condotti degli esperimenti nella fase G₀ del ciclo cellulare per analizzare l'effetto dell'inibizione della proteina p53, tramite la PFT- α , per cercare di comprendere meglio il suo ruolo sia nella formazione delle aberrazioni

cromosomiche, sia nell'induzione dell'apoptosi dovuta all'effetto delle radiazioni ionizzanti e allo stesso tempo per indagare sul possibile coinvolgimento della p53 nella riparazione del danno primario indotto dai raggi X al DNA. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando linfociti di sangue periferico nella fase G₀ del ciclo cellulare, derivanti da tre distinti donatori. I linfociti in G₀ sono stati trattati "in continuos" con la PFT- α a partire dalle 4 h precedenti l'esposizione ai raggi X, immediatamente stimolati alla proliferazione in presenza di BrdUrd e, a vari tempi di recupero, è stata analizzata la cinetica di riparazione, l'induzione di apoptosi e di aberrazioni cromosomiche. I risultati della cinetica di riparazione, ottenuti tramite il saggio della cometa ai tempi di recupero di 0 h, 2 h, 4 h e 24 h indicano in tutti i donatori la presenza di una maggiore quantità di danno non riparato nei linfociti irradiati e mantenuti in presenza di PFT- α rispetto ai campioni semplicemente irradiati. Infatti a 2 h e 4 h ore dall'irradiazione, nei campioni cotrattati con raggi X e PFT- α , si riscontra un "mean tail moment" maggiore rispetto ai campioni trattati con i soli raggi X. Tuttavia a 24 h dal trattamento non è più rilevabile alcuna differenza tra i campioni di linfociti esaminati, ciò a sostegno dell'avvenuta restituzione del danno primario indotto dai raggi X al DNA. Riassumendo, i dati ottenuti dallo studio della cinetica di riparazione sui linfociti in G₀ indicano che i campioni cotrattati con raggi X e PFT- α presentano una cinetica della riparazione del danno primario più lenta rispetto ai campioni irradiati in assenza di PFT- α , e avvalorano l'ipotesi che la proteina p53 possa avere un ruolo nella riparazione del DNA. Tali dati sono in accordo con quanto viene riportato in precedenti pubblicazioni nelle quali si suggerisce un probabile coinvolgimento della proteina p53 sia nella riparazione delle DSBs mediante un meccanismo ad alta fedeltà definito "Precise Ligation" (PL) (Lin et al., 2003) sia nel NER (Nucleotide Excision Repair) agevolandone l'accesso alla cromatina (Allison e Milner, 2004). È stato inoltre dimostrato che in fibroblasti primari umani, irradiati nella fase G₀/G₁ del ciclo cellulare, l'isoforma fosforilata in ser15 di p53 si localizza sui siti di rottura del DNA (Al Rashid et al., 2005). Sebbene il "Comet assay" ci permetta di valutare l'entità del danno primario indotto al DNA, l'utilizzo di tale tecnica analitica non ci consente di valutare se la riparazione di esso avvenga in maniera corretta.

I dati ottenuti dall'analisi della morfologia nucleare apoptotica, effettuata su tutti i donatori a 24h, 56h, 72h e 96h dopo l'esposizione dei campioni ai raggi X, indicano una chiara diminuzione in termini di apoptosi nei campioni cotrattati con raggi X e PFT- α rispetto ai campioni solo irradiati ed in particolare a 72 h dall'irradiazione tale risultato è evidente per tutti e tre i donatori. Tale dato indica che la PFT- α , inibendo l'azione della proteina p53, influenza il naturale ingresso in apoptosi dei linfociti irradiati, riducendone notevolmente la percentuale.

L'analisi citogenetica, effettuata sui tre donatori ai tempi di recupero di 56 h, 72 h e 96 h dopo il trattamento con raggi X grazie all'uso della BrdUrd, un analogo di base la cui incorporazione nel DNA, ci ha consentito di distinguere le cellule che si trovavano alla prima, seconda e terza divisione mitotica, utilizzando la tecnica di colorazione differenziale dei cromatidi fratelli denominata "FPG" (Fluorocromo Plus Giemsa).

I dati riguardanti l'analisi citogenetica effettuata sui linfociti dei donatori a 56 h dall'irradiazione sebbene caratterizzati dalla variabilità interindividuale, indicano complessivamente che nei linfociti cotrattati con raggi X e PFT- α si riscontra un incremento del danno citogenetico rispetto ai campioni esposti ai soli raggi X. Tale incremento è quantificabile sia nel numero dei cromosomi dicentrici osservati, sia sul totale delle aberrazioni, sia nella quantità di cellule anormali presenti nei campioni analizzati. Anche da questi risultati si può suggerire il probabile coinvolgimento di p53 nella riparazione del danno primario al DNA, poiché l'inibizione della suddetta proteina ad opera della PFT- α potrebbe portare ad eventi di miss-riparazione che conseguentemente incrementerebbero il danno citogenetico. Ciò si può evincere anche dai risultati del "Comet assay" a 24 h dal trattamento con i raggi X in cui non è rilevabile più alcuna differenza nel tail moment medio tra i campioni di linfociti esaminati. È noto infatti come la riparazione del danno indotto dai raggi X avvenga nell'arco delle ore immediatamente successive all'irraggiamento. La PFT- α agisce anche salvando le cellule dall'apoptosi, quindi non possiamo completamente escludere che l'aumento di aberrazioni cromosomiche possa essere dovuto anche alla mancata eliminazione delle cellule portatrici delle aberrazioni stesse.

I risultati ottenuti dall'analisi citogenetica effettuata alla seconda divisione mitotica dopo l'irradiazione indicano una riduzione generale del danno citogenetico, sia come quantità di dicentrici osservati, sia come aberrazioni totali, sia come cellule anormali riscontrate. Riteniamo che il decremento generale del danno citogenetico osservato nei campioni analizzati per tutti e tre i donatori sia dovuto alla proliferazione cellulare. Infatti, è noto che le aberrazioni di tipo asimmetrico come il cromosoma dicentrico possono comportare delle difficoltà meccaniche alla divisione cellulare determinando la formazione di ponti anafasici i quali disturbano la divisione mitotica e possono provocare la formazione di cellule figlie con patrimonio genetico sbilanciato. Nei linfociti cotrattati con raggi X e PFT- α "in continuos", la riduzione del danno citogenetico alla seconda divisione mitotica risulta meno evidente, sia per la presenza dei dicentrici sia in termini di aberrazioni totali. Tale risultato è in accordo con i dati ottenuti dall'analisi della morfologia nucleare apoptotica effettuata a 72 h dall'irradiazione, dove nei campioni in questione abbiamo osservato una riduzione dell'apoptosi ad opera della PFT- α . Infatti, l'analisi parallela dei risultati ottenuti dalla morfologia nucleare apoptotica e dall'analisi citogenetica effettuata a 72 h dall'esposizione ai raggi X, è in accordo con precedenti evidenze sperimentali che indicano nei linfociti umani irradiati in G₀ l'esistenza di una via apoptotica p53 dipendente la cui attivazione è causata dalla presenza del cromosoma dicentrico (Bassi et al., 2003).

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche effettuata al tempo di recupero di 96 h dopo l'esposizione alle radiazioni indica un ulteriore calo nell'entità del danno citogenetico riscontrato negli HPBL di tutti i donatori. Come spiegato in precedenza il risultato è dovuto alla proliferazione cellulare ed alla segregazione casuale che generalmente porta al dimezzamento delle aberrazioni cromosomiche di tipo instabile. Occorre però osservare che nei campioni cotrattati con raggi X e PFT- α , tali parametri rimangono comunque leggermente più alti rispetto ai campioni semplicemente irradiati. Riteniamo che tale risultato sia dovuto alla minore percentuale di cellule apoptotiche osservata a 72h dall'irradiazione nei campioni cotrattati, e che tale effetto si ripercuota poi sulla popolazione cellulare alla terza divisione mitotica.

Considerando nell'insieme i dati riguardanti l'analisi citogenetica effettuata sui linfociti dei tre donatori analizzati, risulta evidente che i campioni trattati con raggi X e PFT- α presentano un danno citogenetico maggiore rispetto a quelli semplicemente irradiati. Sebbene lo studio della cinetica di riparazione indichi che l'inibizione della proteina p53 ad opera della PFT- α potrebbe compromettere la corretta riparazione del danno primario indotto al DNA dai raggi X, poichè l'azione della PFT- α è prevalentemente quella di salvare la cellula dall'apoptosi, questi dati non ci consentono di escludere che l'aumento di aberrazioni cromosomiche sia dovuto alla mancata eliminazione delle cellule portatrici delle aberrazioni stesse.

Per capire in che misura la maggiore frequenza di danno citogenetico osservato nei campioni trattati con raggi X e PFT- α "in continuos" sia attribuibile ad un effetto della PFT- α sulla riparazione o sull'apoptosi, occorre analizzare in maniera più accurata l'esito dei risultati ottenuti dal donatore n. 3. Infatti, nel protocollo sperimentale programmato per le analisi su tale donatore abbiamo potuto studiare separatamente l'effetto dell'inibizione della proteina p53 sulla riparazione del danno primario al DNA e sull'apoptosi indotta dai raggi X nella fase G₀ del ciclo cellulare, grazie all'aggiunta di due nuovi punti sperimentali.

I dati ottenuti dall'analisi della morfologia nucleare apoptotica, indicano che nel campione irradiato e mantenuto in presenza di PFT- α nel lasso di tempo in cui avviene la riparazione del danno al DNA si riscontra un'induzione di apoptosi superiore rispetto a tutti gli altri campioni esaminati a 56 h, 72 h e 96 h dall'irradiazione. Dall'analisi citogenetica che abbiamo effettuato parallelamente risulta evidente che nel suddetto campione sono state riscontrate una minore quantità di cellule anormali a tutti i tempi di recupero. Riteniamo che la riduzione nella presenza di cellule aberrate sia dovuta all'effetto dell'apoptosi, che in accordo con precedenti evidenze sperimentali (Bassi et al., 2003), elimina preferenzialmente le cellule portatrici di dicentrici. In questo modo si spiega anche il fatto che nello stesso punto sperimentale, al tempo di recupero di 56 h, sia stata osservata una minore quantità di dicentrici rispetto agli altri campioni irradiati.

Al tempo di recupero di 56 h abbiamo trovato nel campione irradiato e trattato con PFT- α "in continuos" un danno citogenetico maggiore sia rispetto al campione nel quale la PFT- α è stata aggiunta soltanto quando la riparazione era ormai avvenuta,

sia rispetto al campione irradiato e pretrattato con PFT- α . Questi risultati suggeriscono che nel campione cotrattato con PFT- α “in continuous”, l’incremento del danno citogenetico potrebbe essere attribuito ad un effetto congiunto della PFT- α sulla riparazione e sull’apoptosi.

Nel caso del donatore 3 abbiamo analizzato anche la presenza delle cellule poliploidi in quanto la poliploidizzazione rappresenta un meccanismo per evitare l’apoptosi da parte delle cellule danneggiate; i risultati ottenuti indicano che non vi sono particolari differenze nell’entità del fenomeno tra i diversi campioni trattati, quindi non possiamo trarre particolari conclusioni riguardo all’influenza della PFT- α sul fenomeno della poliploidia.

L’insieme dei risultati ottenuti negli studi da noi condotti sull’azione della PFT- α nei linfociti umani irradiati nella fase G₀ del ciclo cellulare indicano complessivamente che l’inibizione della proteina p53 altera la cinetica di riparazione del danno primario indotto al DNA provocando un incremento degli eventi di miss-riparazione e di conseguenza un aumento del danno citogenetico alla prima divisione mitotica. Anche alle successive divisioni mitotiche i campioni cotrattati con raggi X e PFT- α presentano un danno citogenetico maggiore rispetto a quelli semplicemente irradiati, riteniamo che ciò sia attribuibile ad un effetto congiunto della PFT- α sulla riparazione e sull’apoptosi. Infatti la molecola oltre ad alterare la cinetica di riparazione del danno indotto dai raggi X al DNA, provoca anche la riduzione dell’apoptosi p53 dipendente che nei HPBL in G₀ elimina preferenzialmente le cellule aberrante portatrici di cromosomi dicentrici.

Bibliografia

ADAMS JM, CORY S (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 715-720.

AHN J, MURPHY M, KRATOVICZ S, LEVINE AJ and GEORGE DL (1999). Down-regulation of the stathmin/Op 18 and FKBP25 genes following p53 induction. *Oncogene* 18, 5954-5958.

AJ LEVINE (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

AL RASHID ST, DELLAIRE G, CUDDIHY A, JALALI F, VAID M, COACKLEY C, FOLKARD M, XU Y, CHEN BPC, CHEN DJ., LILGE L, PRISE KM., BAZETT JONES DP, BRISTOW RG (2005). Evidence for the Direct Binding of Phosphorylated p53 to Sites of DNA Breaks In vivo. *Cancer Res*, 65 (23), 10810-1082.

ASHEROFT M, TAYA Y and VOUSDEN KH (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3224-3233.

ASHKENAZI A, DIXIT VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

BAFFY G, MYASHITA T, WILLIAMSON R and REED JC (1993). Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 from an IL-3 dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.*, 268, 6511-6519.

BARAK Y, JUVEN T, HAFFNER R and OREN M (1993). Mdm2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461-468.

BARGONETTI J, MANFREDI JJ, CHEN X, MARSHAK DR and PRIVES C (1993). 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.

BASSI L, CARLONI M, FONTI E, PALMA DE LA PENA, MESCHINI R and PALITTI F (2002). Pifithrin- α , an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro. *Mutat. Res.*, 499, 163-176.

BATES S and VOUSDEN KH (1996). p53 in signalling check point arrest or apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 1-7.

BEDFORD JS (1991). Sublethal damage, potentially lethal damage and chromosomal aberration in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 21, 1457-1469.

BELLONI P, R. MESCHINI, S. CZONE, M. HARMS-RINGDAHL, F. PALITTI (2005). Studies on radiation-induced apoptosis in Go human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81, 8, 587-599.

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

BERTRAND P, RUIILLARD D, BOULRT A, LEVALOIS C, SOUSSI T and LOPEZ BS (1997). Increase in spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene*, 14, 1117-1122.

BROWN DG, SUN X-M. and COHEM GH (1993). Dexamethasone induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J. Biol. Chem.*, 268, 3037-3039.

BRYANT PE (1984). Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI: Evidence for the double strand breaks origin of chromosomal aberration. *Int. J. of Radiat. Biol.*, 46, 57-65.

BULLOCK AN, FERSHT AR (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* 1 68-76.

BULLOCK AN, HENCKEL J and FERSHT AR (2000). *Oncogene* 19, 1245-1256.

BUNZ F, HWANG PM, TORRANCE C, WALDMAN T, ZHANG Y, DILLEHAY L, WILLIAMS J, LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* 104, 263-269.

BYKOV VJ, ISSAEVA N, SELIVANOVA G, WIMAN KG (2002). 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.

CHO Y, GORINA S, JEFFREY PD and PAVLETICH NP (1994). *Science* 265, 346-355.

CHOW BM, LI YQ, WONG CS (2000). Radiation-induced apoptosis in the adult central nervous system is p53-dependent. *Cell Death Differ.* 7, 712-720.

CHUNG S, GUMIENNY TL, HENGARTHER MO and DRISCOLL MA(2000). A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. Nat. Cell biol., 2, 931-937.

COHEN JJ (1991). Adv. Immunol., 50, 55-85.

COHEN JJ and DUKE RC (1984). Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. J. Immunol., 132, 38-42.

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

CRITHLOW SE, BOWATER PR and JACKSON SP (1997). Mammalian DNA double strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. Curr. Biol., 7, 588-598.

DE LA MONTE SM, SOHN YK, GANJU N, WANDS JR (1998). p53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. Lab. Invest. 78, 401-411.

DE STANCHINA E, QUERIDO E, NARITA M, DAVULURI RV, PANDOLFI PP, FERBEYRE G, LOWE SW (2004). PML is a direct p53 target thatmodulates p53 effector functions. Mol. Cell 13, 523-535.

DENECKER G et al. (2001). Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspase and mitochondria. Cell Death Differ. 8, 829-840.

DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY JR CA., BUTEL JS, BRADLEY A (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 356, 215-221.

ERSTER S, MOLL U (2005). Biochem. Biophys. Res. Commun. 331, 843-850.

EVANS HJ (1966). Repair and recovery from chromosome damage after fractionated X rays dosage. In genetical aspects of radiosensitivity: Mechanism of repair. Int. Atom. En. Agen., Vienna, 31-47.

FALETTE N, PAPERIN MP, TREILLEUX I, GRATADOUR AC, PELOUX N, MIGNOTTE H, TOOKE N, LOFMAN E, INGANAS M, BREMOND A, OZTURK M, PUISIEUX A (1998). Prognostic value of p53 gene mutations in a large series of node- negative breast cancer patients. *Cancer Res.* 58, 1451-1455.

FANG B, ROTH JA (2003). Tumor-suppressing gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2, S115-S121.

FERRI KR and KROEMER G (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E225-E263.

FESUS L, DAVIES PJA, PIACENTINI M (1991). *Eur. J. Cell. Biol.* , 56, 170-177.

FILIPSKI JJ, LEBLANC T, YOUNDALE M, SIKORSKA and WALKER PR (1990). Periodicity of DNA foldind in higher order chromatin structure. *EMBO J.*, 9, 1319-1327.

FOGHSGAARD L.et al., (2001). Cathepsin B acts as a dominant axecution protease im tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.*, 153, 999-1009.

FOSTER BA, COFFEY HA, MORIN MJ and RASTINEJAD F (1999). Pharmacological resque of mutant p53 conformation and function. *Science* 286, 2507-2510.

FOSTER BA, COFFEY HA, MORIN MJ, RASTINEJAD F (1999). *Science* 286, 2507-2510.

FRICKE JJ, HART EJ and SMITH HP (1938). Chemical action of X rays activated water. *Chem. Phys.*, 6, 229.

FRIEDLER A, HANSON LO, VEPRINTSEV DB, FREUND SMV, RIPPIN TM, NIKOLOVA PV, PROCTOR MR, RÜDIGER S and FERSHT AR (2002). A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: Chaperone strategy for rescue of ontogenic mutants. *PNAS.* 99, 937-942.

GEYER RK, YU KZ and MAKI CG (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell. Biol.* 2, 568-573.

GOODHEAD DT (1989). The initial phisical damage produced by ionizing radiation. *Inter. J. of Radiat Biol.*, 56, 623-634.

GU GL, NIE L, WIEDERSCHAIN D and YUAN MZ (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol. Cel. Biol.* 21, 8533-8546.

GUDKOV AV, KOMAROVA EA (2005). Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 726-736.

HAIMOVITZ-FRIEDMANN A et al., (1998). Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat. Res.*, 150, 102-108.

HAINAUT P and HOLLSTAIN M (2000). *Adv. Cancer Res.* 77, 81-137.

HAMMER S, MOTTET NK (1971). Tetrazolin salt and electron microscopic studies of cellular degeneration and necrosis interdigital areas of the developing chick limb. *J. Cell. Sci.*, 8, 229.

HAUPT Y, MAYA R, KAZAZ A, OREN M (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53, *Nature* 387, 296-299.

HENDEE WR (1993). History, current status, and trends of radiation protection standards. *Med. Phys.*, 20, 1303-1314.

HOCKEBERRY D, OLTVAI Z, YIN X-M, MILLIMAN C and KORSEMEYER SJ (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway apoptosis. *Cell*, 75, 241-251.

HOLLER N et al. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunology*, 1, 489-495.

HOLLSTEIN M, RICE K, GREEBLATT MS, SOUSSI T, FUCHS R, SORLIE T, HOVIG E, SMITH-SORENSEN B, MONTESANO R and HARRIS CC (1994). Database of p53 gene somatic mutation in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids.* 22, 3551-3555.

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

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

JÄÄTTELÄ M and TSCHOPP J (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature Immun.*, 4, 416-423.

JEFFREY PD, GORINA S and PAVLETICH NP (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science.* 276, 1498-1502.

JIANG M, YI X, HSU S, WANG CY, DONG Z (2004). Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*

Joseph TW, Zaika A, Moll UM (2003). Nuclear and cytoplasmic degradation of endogenous p53 and MDM2 occurs during downregulation of the p53 response after multiple types of DNA damage. *FASEB J.* 17, 1622-1630.

KAMIJO T, WEBER JD, ZAMBETTI G, ZINDY F, ROUSSEL FM and SHERR CJ (1998). Functional and physical interaction of the ARF tumor suppressor with p53 and MDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8292-8297.

KANAAR R, HOEIJMAKERS JHJ and VAN GENT DC (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in Cell. Biol.*, 8, 483-489.

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.

KIHLMAN BA (1970). Sub-cromatid exchanges and the strandedness of chromosomes. *Hereditas*, 65, 172-186.

KOMAROV PG; KOMAROVA EA, KONDRATOV RV, CHRISTOV_TSELKOV K, COON JS, CHERNOV MV, GUDKOV AV (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. Sep 10; 285 (5434), 1733-7.

KOMAROVA EA, GUDKOV AV (1998). Could p53 be a target for therapeutic suppression? *Semin. Cancer Biol.* 8, 389-400.

KOMAROVA EA, GUDKOV AV (2001). Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 62, 657-667.

KUBBUTAT G, MICHAEL H and VOUSDEN KH (1997). Proteolytic cleavage of human p53 by Calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 17, 460-468.

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

- LAIN S, LANE D (2003). Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *Eur. J. Cancer* 39, 1053-1060.
- LATONEN L, TAYA Y and LAIHO M (2001). UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblast. *Oncogene* 20, 6784-6793.
- LAZEBNIK YA, COLE S, COOKE CA, NELSON WG and EARSHAW CW (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro cell-free mitotic extract: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 1, 7-22.
- LEE S, ELENBAAS B, LEVINE A and GRIFFITH J (1995). P53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*. 81, 1013-1020.
- LEVAN A, (1938). The effect of calcium on root mitosis in allium. *Heredity*, 24, 472-468.
- LEVINE AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- LIANG F, HAN M, ROMANIENKO PJ and JASIN M (1998). Homology-directed repair is a major double strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 5172-5177.
- LIN Y and WALDMAN AS (2001). Capture of sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics*. 158, 1665-1674.
- LIN Y, WALDMAN AS and YANG D (2001). Promiscuous patching of broken chromosomes in mammalian cells with extrachromosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 3975-3981.
- LIN Y, WALDMAN CRUSCIOLO B and WALDMAN AS (2003). Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin- α , a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair*, 2, 1- 11.
- LINDAHL T, SATOH MS, POIRIER DG and KLUNGLAND A (1995). Post-translational modification of poly(ADP-ribose)polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 405-411.
- LIU X, CHUA CC, GAO J, CHEN Z, LANDY CL, HAMDY R, CHUA BH (2004). Pifithrin- α protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286 H933-H939.

LIU X, YUE P, KHURI FR, SUN SY (2004). p53 Upregulates Death Receptor 4 Expression through an Intronic p53 Binding Site. *Cancer Res.* 64, 5078-5083.

LIU Y and KULESZ-MARTIN (2001). p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence specific and non –sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis*, 22, 851-860.

LJUNGMAN M, LANE D (2004). Transcription-guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat. Rev. Cancer* 4, 727-737.

LOCKSHIN RA and ZAKERI Z (2002). Caspase-independent cell death. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 14, 727-733.

LU H and LEVINE AJ (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 5154-5158.

MAITY A, KAO GD, MUSCHEL RJ and McKENNA WG (1996). Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 37, 639-653.

MARJA JÄÄTTELÄ AND JÜRGEN TSCHOPP (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature Immunology*, 4, 416-423.

MARTIN SJ and GREEN DR (1995). Protease activation during apoptosis: death by thousand cuts? *Cell*, 82, 349-352.

MATLASHEWSKI G (1999). p53: twenty years on, Meeting Review. *Oncogene*. 18, 7618-7620.

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

MELINO G, BERNASSOLA F, RANALLI M, YEE K, ZONG WX, CORAZZARI M, KNIGHT RA, GREEN DR, THOMPSON C, VOUSDEN KH (2004). p73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J. Biol. Chem.* 279, 8076–8083.

MENISSER-DE MURCIA, NIEDERGANG C, TUCCO M, RICOUL M, DUTRILLAX B, MARCK M, OLIVER FJ, MANSON M, DIERICH A, LEMEURE M, WALZTINGER, CHAMBON P and DE MURCIA G (1997). Requirement of poly(ADP-ribose)polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 7303-7307.

MERRITT AJ, POTTEN CS, KEMP CJ, HICKMAN JA, BALMAIN A, LANE DP, HALL PA (1994). The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res.* 54, 614-617.

MEYN MS (1998). Ataxia telangiectasia and cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 55, 5991.

MICHALAK E, VILLUNGER A, ERLACHER M, STRASSER A (2005). Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 786-798.

MIHARA A et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondrial. *Mol. Cell.* (2003).

MOMAND J, ZAMBETTI GP, GEORGE DL, LEVINE AJ (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.

MONTES DE OCA LUNA R, WAGNER DS, LOZANO G (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-206.

NATARAJAN AT and OBE G (1978). Molecular mechanism involved in the production of chromosomal aberration I. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of aberration production in G₂ stage of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 52, 137-149.

NATARAJAN AT and OBE G (1984). Molecular mechanisms involved in the production of chromosome aberration III. Restriction endonuclease. *Chromosoma*, 90, 120-127.

NATARAJAN AT, BALAJEE AS, BOEI JJ, CHATTERJEE S, DARROUDI F, GRIGOROVA M, NODITI M, OH HJ, SLIJPCEVIC S, VERMEULEN S. (1994). Recent developments in the assessment of chromosomal damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 66: 615-623.

NICHOLSON DV and THORNBERRY NA (1997). *Trends Biochem. Sci.*, 22, 299.

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

NYLANDSTED J et al. (2002). Eradication of glioblastoma and breast and colon carcinoma xenografts by hsp70 depletion. *Cancer Res.* 62, 7139-7142.

OBERHAMMER FA, WILSON DC, MORRIS ID, HICMANN JA, WALKELING AE, WALKER PR and SIKORSKA M (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.*, 12, 3679-3684.

OLEINICK NL, CHIU SM, RAMAKRISHNAN N and XUE LY (1987). The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. Br. J. Cancer Suppl., 8, 135-140.

OSBORNE BA and SCHWARTZ LM (1994). Essential genes that regulate apoptosis. Trends in Cell Biol., 4, 394.

PAQUES F and HABER JE (1999). Multiple pathways of recombination induced by double strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. Micro. Mol. Biol. Rev., 63, 349-404.

PRATT RM, GREENE RM (1976). Dev. Biol., 54, 135-145.

RAFF MC (1992). Social controls on cell survival and cell death. Nature, 356, 397-400.

ROBERG K, JOHANSON U and OLLINGER K (1999) lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. Free Radic. Biol. Med., 27, 1228-1237.

RODRIGUEZ TG, COLLINS M and LOPEZ RA (1990). Embo J., 9, 2997-3200.

ROTONDA J. Et al., (1996). Nature Struct. Biol., 3, 619.

RUSSEL JH and DOBOS CB (1980). Mechanism of immune lysis II. CTL induced nuclear disintegration of the target begins within minutes of cell contact. J. Immunol., 125, 1256.

SASAKI M and MIYATA H (1968). Biological dosimetry in the atomic bomb survivors. Nature, 220, 1189-1193.

SCHWARTZMAN RA and CIDLOWSKY JA (1993). Endocrinology, 133, 591-599.

SCWARTZ JL, JORDAN R (1997). Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by P53-dependent apoptosis. Carcinogenesis. 18, 201-205.

SHAFMANT, KHANNA KK, KEDAR P, SPRING K, KOZLOV S, YEN T, HOBSON K, GATEL M, ZHANG N, WATTERA D, EGERTO M, SHILH Y, KHARBANDA S, KUFE D and LAVIN MF (1997). Interaction between ATM protein and c-abl in response to DNA damage. Nature, 386, 520-523.

SHAULIAN E, ZAUBERMAN A, GINSBERG D and OREN M (1992). Identification of minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5581-5592.

SHIEH SY, IKEDA M, TAYA Y and PRIVES C (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91, 325-334.

SHIMIZU H, BURCH LR, SMITH AJ, DORNAN D, WALLACE M, BALL KL and HUPP TR (2002). The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 28446-28458.

SHIN S, SUNG BJ, CHO YS, KIM HJ, HA NC and HWANG JI (2001). An antiapoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase 3 and 7. *Biochemistry* 40, 1117-1123.

SIMON J, ALLISON AND JO MILNER (2004). Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis*, 25 (9), 1551-1557.

SINGLETON BK, PRIESTLEY D, GELL D, BLUNT T, JACKSON SP, LEHMANN AR and JAGGO PA (1997). Molecular and biochemical characterization of mutants defective KU80. *Mol. Cell Biol.* 17, 1264-1273.

SLICHENMYER WJ, NELSON WG, SLEBOS RJ, KASTAN MB (1993). Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.* 53, 4164-4168.

SLIJEPCEVIC P and NATARAJAN AT (1994) a. Distribution of radiation induced G₁ exchange and terminal deletion breakpoints in Chinese hamster chromosomes as detected by G-banding. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 747-755.

SLIJEPCEVIC P and NATARAJAN AT (1994) b. distribution of X-rays induced G₂ chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin conformation. *Mutat. Res.*, 323, 113-119.

SMITH CA (1987). DNA repair in specific sequences in mammalian cells. *Cell. Sci.*, 6, 225-241.

SMITH CA, WILLIAMS GT, KINGSTON R, JENKINSON EJ and OWEN JJT (1989). Antibodies to Cd3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T-cells in thimic culture. *Nature*, 337, 181.

SMITH ML, CHEN IT, ZHAN Q, BAE I, CHEN CY, GILMER TM, KASTAN MB, O'CONNOR PM and FORNACE Jr AJ (1994). Interaction of the p53 regulation protein Gadd45 with proliferating cell nucleAR antigen. *Science*, 226, 1376-1380.

SONG S, LAMBERT PF (1999). Different responses of epidermal and hair follicular cells to radiation correlate with distinct patterns of p53 and p21 induction. *Am. J. Pathol.* 155, 1121-1127.

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

STENGER JE, TEGTMEYER P, MAYR GA, REED M, WANG Y, WANG P, WANG P, HOUGH V and MASTRANGELO IA (1994). p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J.* 13, 6011-6020.

SZUMIEL I (1998). Monitoring and signalling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiation Research*, 150, 92-101.

STRASSER A, O'CONNOR L, and DIXIT VM (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 217-245.

THOMPSON LH and SUIT HD (1969). Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56, 525-537.

THORNBERRY NA and LAZEBNIK Y (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.

THUT C, CHEN JL, KLEMM R and TIJIAN T (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF1140 and TAF1160. *Science* 267, 100-104.

TOLKOVSKY AM, XUE L, FLETCHER GC and BARUTAITE V (2002). Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*, 84, 233-240.

TSUJIMOTO Y (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP levels as a determinat for cell death modes. *Cell Death And Differentiation.*, 4, 429-434.

TSUKAMOTO Y, KATO J and IKEDA H (1996). Effect of mutations of RAD50, RAD51, RAD52 and related genes on illegitimate recombination in *S.cerevisiae*. *Genetics*, 142, 383-391.

UCKER DS, OBERMILLER PS, ECKART W, APGAR JP, BERGER NA and MEYERS J (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 3060-3069.

UNGER T, JUVEN –JERSON T, MOALLEM E, BERGER M, VOGT SIONOV R, LOZANO G, OREN M and HAUPT Y (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by MDM2. *EMBO J.* 18, 1805-1814.

VAUX DL, HAECKER S, and STRASSE A (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.*, 76, 777-779.

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

WALKER NPC et al., (1994). *Cell*, 78, 343.

WALKER PR, SMITH C, YOUNDALE T, LEBLANC J, WITHFIELD JF and SIKORSKA M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemioterapeutic drugs induce apoptosis in immature thymocytes. *Cancer Res.*, 51, 1078-1085.

WANG W, TAKIMOTO R, RASTINEJAD F and EL-DEIRY WS (2003). Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2171-2181.

WANG W, TAKIMOTO R, RASTINEJAD F and S.EL-DEIRY W (2003). Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2171- 2181.

WESTPHAL CH, ROWAN S, SCHMALTZ C, ELSON A, FISHER DE, LEDER P (1997). Atm and p53 cooperate in apoptosis and suppression of tumorigenesis, but not in resistance to acute radiation toxicity. *Nat. Genet.* 16 397-401.

WILLIAMS TG (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65, 1097-1098.

WILLIAMS TG, SMITH CA, SPOONER E, DEXTER TM and TAYLOR DR (1990). Nature, 343, 76-79.

WYLLIE AH (1980). Glucocorticoid induced lymphocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature, 284, 550-556.

WYLLIE AH, KERR JFR, and CURRIE AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., 68, 251-303.

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

XIRODIMAS DP, STEPHEN CW and LANE DP (2001). Cocompartmentalization of p53 and MDM2 is a major determinant for MDM2-mediated degradation of p53. Exp. Cell Res. 270, 66-77.

YU J, ZHANG L (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. Biochemical and Biophysical Research Communications 331, 851-858.

YU J, ZHANG L, HWANG PM, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol. Cell 7, 673-682.

YUAN J, SHAHAN S, LEDOUX S and HORVITZ HR (1993). The C elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. Cell, 75, 641-652.

ZAKERI ZF, QUAGLIANO D, LATHAM T and LOCKSHIN RA (1993). Faseb J., 7, 470-478.

ZHANG M, WU LIU, DING R, SALVI (2003). Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. Neuroscience 120 191-205.

ZHAO R, GISH K, MURPHY M, YIN Y, NUTTERMAN D, HOFFMAN WH, TOM E, MACK DH and LEVINE AJ (2000). Genes Dev. 14, 981-993.

ZHIVOTOSKY B, WADE D, GAHM A, ORRENIUS S, NICOTERA P (1994). Formation of 50 Kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. FEBS Letters, 351, 150-154.

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

Ringraziamenti

A conclusione di questa attività di ricerca, colgo l'occasione per ringraziare sentitamente il Prof. Fabrizio Palitti e la Dott.ssa Roberta Meschini per il supporto scientifico che mi hanno fornito nel corso dei tre anni passati nel laboratorio di "Citogenetica e Mutagenesi Ambientale", grazie a loro questa esperienza mi ha aiutato a crescere sia professionalmente che dal punto di vista umano.

Ringrazio anche Vincenza Ortenzi, la cui collaborazione è stata sicuramente importante nel corso dell'attività sperimentale. Sento il dovere di ringraziare tutti coloro che in questi tre anni ho sentito vicino a me nel laboratorio.

Gran parte di loro erano "gente"...ora sono "amici".

Infine vorrei ricordare il Prof. Fernando Dulout, recentemente scomparso, con il quale ho avuto il piacere di collaborare durante il suo ultimo periodo di permanenza a Viterbo...ciao Fernando, grazie anche a te...