

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI
VITERBO**

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

Evoluzione biologica e biochimica - XIX CICLO.

**“Cooperazione tra diversi sistemi di riparazione nella
rimozione del danno indotto al DNA dalle radiazioni
ultraviolette”**

BIO/18

Coordinatore: Prof. Lucia Mastrolia

Firma

Tutor: Prof. Fabrizio Palitti

Firma.....

**Dottorando:
Dott.ssa Silvia Filippi**

Firma.....

Ringraziamenti

Questa tesi di dottorato è stata svolta sotto la guida del Prof. Fabrizio Palitti che ringrazio vivamente per la sua disponibilità e supervisione scientifica.

Un ringraziamento particolare alla Dott.Claudia Lorenti Garcia che con grande pazienza mi ha aiutato a raggiungere questo importante traguardo.

Infine un ringraziamento a tutti i colleghi del Laboratorio di Genetica del Dipartimento di Agrobiologia ed Agrochimica di Viterbo, che mi sono stati vicini durante lo sviluppo di questa tesi sperimentale, in particolar modo al dott. Luca Proietti de Santis

INDICE

Riassunto	pag.I
Introduzione	pag.1
Mutanti per la riparazione	pag.3
Aberrazioni Cromosomiche	pag.5
Scambi tra cromatidi fratelli	pag.8
Agenti che danneggiano il DNA	pag. 11
Risposte al danno	pag.13
Sistemi di riparo	pag.15
Base excision repair	pag.15
Nucleotide excision repair	pag.17
Global genome repair	pag.18
Transcription couplet repair	pag.18
Mismatch repair	pag.21
Ricombinazione omologa e end-joining	pag.23
Interstrand cross-links	pag.25
Riparazione degli interstrand cross-links in E.coli	pag.26
Riparazione degli interstrand cross-links in S.Cerevisae	pag.28
Riparazione degli interstrand cross-links nei mammiferi	pag.30
Riconoscimento ed incisione	pag.33
Ricombinazione	pag.34
Translesions DNA synthesis	pag.34
Parte Sperimentale	pag.36
Correlazione tra diversi sistemi di riparazione (NER.HR.TLS) nella ripresa dell'arresto della forza replicativa dopo trattamento con raggi UV	pag.36
Introduzione	pag.36
Materiali e Metodi	pag.39
Linee cellulari	pag.39
Saggio clonogenico	pag.39
Apoptosi	pag.39
Mutazioni geniche	pag.40
Aberrazioni Cromosomiche	pag.40
Quantificazione della ricombinazione omologa	pag.41

Allungamento della forza replicativa	pag.42
Risultati	pag.43
La caffeina ritarda l'allungamento della forza replicativa sul DNA danneggiato dai raggi UV in maniera indipendente dal NER e dall'HR	pag.43
La caffeina riduce le mutazioni indotte dalle radiazioni ultraviolette	pag.44
La caffeina aumenta la "pathway" di ricombinazione indotta dagli UV	pag.45
Solo le cellule difettive per la ricombinazione omologa risultano essere sensibili al trattamento con caffeina dopo irradiazione ultravioletta	pag.46
La caffeina aumenta l'apoptosi indotta dalle radiazioni ultraviolette nella linea cellulare parentale	pag.47
La caffeina aumenta la frequenza delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi UV	pag.48
Discussione	pag.50
Importanza di fotolesioni alternative ai dimeri di pirimidina (CDPs) e 6-4 fotoprodotto (6-4PP) nell'induzione dell'instabilità cromosomica	pag.54
Introduzione	pag.54
Materiali e metodi	pag.57
Linee cellulari e condizioni di cultura	pag.57
Trattamento con mitomicina C	pag.57
Sincronizzazione delle cellule nella fase G ₁ del ciclo cellulare	pag.57
Sopravvivenza cellulare dopo trattamento con MMC	pag.58
Comet Assay per la determinazione degli interstrand cross-linking	pag.58
Analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dal trattamento con MMC	pag.59
Analisi della frequenza degli scambi tra cromatidi fratelli (SCE's) indotta dalla mitomicina C	pag.60
Analisi citofluorimetrica della progressione del ciclo	

cellulare e induzione del processo apoptotico dopo trattamento con MMC	pag.61
Analisi della cinetica di induzione della proteina RAD51 dopo trattamento con mitomicina C mediante western blotting	pag.61
Risultati	pag.63
Saggio clonogenico dopo trattamento con MMC	pag.63
Aberrazioni cromosomiche indotte dalla mitomicina C	pag.64
Analisi danno primario tramite “Comet Assay”	pag.65
Induzione di scambi tra cromatidi fratelli (SCE’s) in seguito a trattamento con MMC	pag.67
Analisi ciclo cellulare dopo trattamento con MMC	pag.68
Induzione di apoptosi dopo trattamento con MMC	pag.69
Induzione della proteina RAD51 in seguito a trattamento con mitomicina C	pag.71
Discussione	pag.72
Conclusioni	pag.76
Bibliografia	pag.78

RIASSUNTO

Nel corso della vita cellulare, il DNA è costantemente esposto ad agenti mutageni, i quali possono essere classificati a seconda della loro natura (fisica o chimica), della loro origine (endogena e esogena) o del tipo di danno che arrecano alla molecola del DNA (modificazioni di basi, legami covalenti, rotture dell'elica etc.).

Il danno al DNA, qualora non adeguatamente riparato, può compromettere processi cellulari fondamentali quali, la trascrizione, la replicazione del DNA e la segregazione cromosomica e dar vita a trasformazione neoplastica (cancro) o senescenza cellulare (invecchiamento).

I sistemi di riparazione del DNA svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità genomica operando a seconda del tipo di lesione e della fase del ciclo cellulare.

Tra questi, il "Nucleotide excision repair" (NER) è deputato alla rimozione delle lesioni voluminose, quali quelle indotte dalla radiazione ultravioletta o da alcuni agenti chimici. Esso si avvale di due modalità distinte, sia in termini di efficienza che di velocità riparativa, a seconda che la lesione si trovi sulle regioni trascrizionalmente attive del genoma (transcription coupled repair, TCR) o sulle regioni non codificanti (global genome repair, GGR).

L'importanza di questo sistema di riparazione è dimostrata dall'esistenza di pazienti affetti da sindromi genetiche, quali lo Xeroderma Pigmentosum e la sindrome di Cockayne, le cui cellule mostrano un'elevata sensibilità alla radiazione ultravioletta. Il dimero di pirimidina (CPDs), il 6-4 fotoprodotto (6-4 PP) e in misura molto minore, l'interstrand cross-links (ICLs), costituiscono i principali tipi di danno indotto dalla radiazione ultravioletta, alla molecola di DNA, che sono responsabili sia del blocco della trascrizione del DNA e sia del blocco della forza replicativa.

Nella prima fase di questo lavoro abbiamo effettuato una serie di esperimenti volti alla comprensione dell'importanza sia della riparazione per escissione di nucleotidi, sia della riparazione per ricombinazione omologa nella ripresa dell'arresto della forza replicativa provocato da lesioni indotte da radiazione ultravioletta.

Il ruolo dei sistemi di riparazione NER e HR nella ripresa del blocco della forza replicativa indotta da UV, è stato studiato utilizzando linee cellulari di hamster

chinese isogeniche difettive per il sistema di escissione di nucleotidi (UV4) e quello per ricombinazione omologa (irs1SF).

I dati ottenuti dimostrano che il danno al DNA indotto dalle radiazioni ultraviolette provocano l'arresto della forza replicativa.

Tale arresto determina l'induzione del processo apoptotico, l'attivazione sia del sistema di riparazione per ricombinazione omologa che di quello del "translesion DNA synthesis".

Inoltre la caffeina determina un cambiamento nella preferenza del meccanismo utilizzato per "by-passare" le lesioni indotte al DNA dai raggi UV.

L'aumento della frequenza degli scambi tra cromatidi fratelli (SCE's) e la diminuzione delle mutazioni puntiformi indotti dalla caffeina, in seguito ad irradiazione ultravioletta, suggeriscono l'intervento del sistema di ricombinazione omologa piuttosto che il TLS.

Quindi l'effetto biologico causato dall'attivazione del processo ricombinazionale è l'induzione di aberrazioni cromosomiche, scambi tra cromatidi fratelli e regressione della forza replicativa; mentre l'attivazione del TLS provoca la formazione di mutazioni puntiformi.

Nella seconda fase di questo lavoro abbiamo studiato l'importanza di fotolesioni alternative ai CPDs e 6-4 PP, come ad esempio gli ICLs, nell'induzione dell'instabilità cromosomica.

Il modello di studio scelto è rappresentato da due malattie genetiche ereditarie che presentano ipersensibilità alle radiazioni ultraviolette: la sindrome di Cockayne (CS) e lo Xeroderma Pigmentosum (XP).

Esistono due gruppi di complementazione per la Sindrome di Cockayne, CSA e CSB. La perfetta funzionalità di queste due proteine è legata alla riparazione dei dimeri di pirimidina indotti dagli UV sul filamento trascritto dei geni attivi, fenomeno conosciuto come riparazione accoppiata alla trascrizione o TCR.

Per lo Xeroderma Pigmentosum esistono sette gruppi di complementazione, XPA-XPG. La corretta efficienza di queste proteine è collegata alla rimozione del danno indotto da UV sull'intero genoma (GGR).

I pazienti affetti dall'una o l'altra sindrome presentano ipersensibilità alle radiazioni solari, neurodegenerazione ed invecchiamento precoce. A differenza dei pazienti XP, quelli CS non mostrano induzione di cancro alla pelle.

Il sistema sperimentale da noi utilizzato per verificare l'effetto degli ICLs nell'instabilità cromosomica causata dall'irradiazione ultravioletta, sono linee cellulari isogeniche di hamster cinese. Precedenti studi hanno dimostrato un'elevata induzione di aberrazioni cromosomiche in seguito ad irradiazione ultravioletta nella linea cellulare UV61, omologa alla sindrome di Cockayne, se paragonata con la linea parentale AA8.

Queste due linee cellulari isogeniche, differiscono sia nella rimozione dei CPDs dal filamento trascritto dei geni attivi, in particolare le AA8 sono proficienti mentre le UV61 sono difettive. Entrambe le linee cellulari non riparano i CPDs indotti nelle regioni non trascritte, a causa della mutazione nel gene p48. Inoltre, sia le cellule AA8 che le UV61 riparano in maniera efficiente il 6-4 fotoprodotto sull'intero genoma. L'esigua differenza, rappresentata dal 5% dell'intero genoma, in termini di capacità di riparazione delle due linee cellulari, era in contraddizione con l'elevata differenza in termini di danno cromosomico, se non ipotizzando l'esistenza di un NER/TCR di altre fotolesioni, come ad esempio gli ICLs, o la cooperazione di diversi sistemi di riparazione nella rimozione del danno indotto da UV.

Al fine di verificare tale ipotesi, abbiamo saggiato la risposta di linee difettive per il NER-TCR ad un potente induttore di ICLs, la mitomicina C.

Il sistema sperimentale da noi utilizzato consiste di tre linee cellulari isogeniche di hamster cinese: AA8 (wild type), UV5 (NER-), UV61 (TCR).

I dati ottenuti tramite test citogenetici (saggio di sopravvivenza, aberrazioni cromosomiche, SCE's) e molecolari (comet assay, western blotting) hanno permesso di determinare la cooperazione di un NER-TCR degli ICLs ed un coinvolgimento diretto o indiretto della proteina CSB nell'attivazione dell'HR.

I risultati ottenuti suggeriscono l'esistenza di una sinergia d'azione del "transcription coupled repair" con il sistema di riparazione per ricombinazione omologa durante la riparazione dell'interstrand cross-link.

Introduzione

Il mantenimento dell'integrità genomica risulta essere di vitale importanza per il normale funzionamento della cellula.

Nel corso della vita cellulare, il DNA è costantemente esposto a diversi tipi di agenti mutageni che possono essere classificati a seconda della loro natura fisica (raggi ultravioletti e raggi X) o chimica (radicali liberi, idrocarburi policiclici aromatici ecc.), della loro origine (esogena ed endogena) e del tipo di lesione che inducono (modificazioni delle basi, legami covalenti, rotture del filamento, interstrand cross-links etc).

Tutte le lesioni sono potenzialmente mutagene se non vengono riparate in modo corretto prima della replicazione del DNA.

Per questo motivo esistono quattro meccanismi di riparazione specifici a seconda della natura della lesione (Hoeijmarkers 2001):

- La riparazione per escissione di base (BER) che interviene specialmente quando sono presenti rotture a singolo filamento, basi ossidate e siti abasici causati dai raggi X, radicali liberi e reazioni spontanee di idrolisi.
- La riparazione per escissione di nucleotidi (NER) che si occupa della rimozione delle fotolesioni, dimeri di pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodotto (6-4PP), e delle lesioni voluminose al DNA causate dalle radiazioni ultraviolette ed idrocarburi policiclici aromatici.
- La riparazione per ricombinazione omologa o non omologa (HR o NHEJ) che interviene sia sulle rotture a doppio filamento e sia sui legami covalenti tra due filamenti di DNA causati dai raggi X o da alcuni agenti antitumorali.
- Il meccanismo di riparazione degli appaiamenti errati (MMR) che si occupa della rimozione di basi erroneamente appaiate durante la replicazione del DNA.

Nel caso di malfunzionamento di uno di questi sistemi di riparo la cellula può attivare diverse strategie per salvaguardare l'integrità genomica, come ad esempio, l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione del processo apoptotico. Nel caso in cui la lesione non venga riparata in maniera corretta può provocare una mutazione nel genoma. Le mutazioni possono causare insorgenza di cancro e invecchiamento precoce, e la loro frequenza può aumentare a causa di un difetto in uno dei sistemi di riparazione (Friedberg 2001; Hoeijmarkers 2001).

L'importanza dei vari sistemi di riparazione è chiaramente sottolineata dall'esistenza di sindromi umane in cui non sono attive specifiche vie di riparazione.

Tali malattie si accompagnano ad una ipersensibilità verso agenti fisici ed ad un'elevata incidenza di mutazioni e insorgenza di processi di cancerogenesi.

Malgrado la mole di lavori volti a dimostrare il ruolo dei vari sistemi di riparazione nella rimozione del danno al DNA indotto dalle radiazioni ultraviolette, a tutt'oggi non è ben chiaro nei mammiferi. Nello studio di questi fenomeni si è reso sempre più necessario l'utilizzo di cellule di roditori mutanti per la riparazione del DNA.

Mutanti per la riparazione

Nelle cellule di mammifero, molto di quello che si conosce sulle vie di riparazione è stato dedotto da studi condotti su linee cellulari isolate da pazienti affetti da malattie genetiche come ad esempio lo Xeroderma Pigmentosum (XP) (Cleaver and Bootsma, 1975), Ataxia Telangenctasia (A-T) (Mc Kinnon, 1987), Anemia di Fanconi (FA) (Sasaki, 1978), Sindrome di Bloom (BL) (German et al.1974) e la Sindrome di Cockayne (CS) (Lehmann et al.1979, Ahmed and Setlow, 1978).

Comunque, queste linee cellulari sono difficili da reperire e poi non coprono tutte le categorie esistenti delle vie di riparazione.

Molti sforzi sono stati fatti nell'isolamento di mutanti da altre specie di mammifero, in particolar modo linee cellulari di roditore.

I mutanti deficienti per la riparazione del DNA più noti sono quelli di hamster cinese (CHO) e cellule di linfoma di topo.

Un cospicuo numero di mutanti CHO, sensibili ai raggi X, agli UV o a mutageni chimici, sono stati isolati e caratterizzati. Alcuni esempi sono riportati nella tabella 1.

L'isolamento di mutanti con un'elevata sensibilità verso gli agenti mutageni, sono stati di vitale importanza, non solo per la comprensione dei meccanismi di riparazione del DNA, ma anche dei legami esistenti tra processi e gli effetti biologici osservati, e all'identificazione delle lesioni al DNA responsabili della morte cellulare e dei cambiamenti genetici.

L'elevata sensibilità dei mutanti CHO osservata in seguito a trattamenti con agenti mutageni chimici e fisici, espressa come aumento della mortalità cellulare, delle mutazioni puntiformi e delle aberrazioni cromosomiche, rende queste linee cellulari utili per testare e valutare l'attività genotossica di molti agenti mutageni presenti nell'ambiente (Darroudi et al.1988).

Inoltre, questi mutanti cellulari sono stati usati per isolare e clonare geni umani per la riparazione del DNA.

A tal fine, il DNA genomico umano è stato trasferito efficientemente nelle cellule di hamster per complementare il difetto nella riparazione (Weaterveld et al.1984, Mc Innes et al. 1984, Rubin et al.1983-1985, Thompson et al.1987, Webwr et al. 1988).

Questo approccio ha portato alla clonazione di molti geni umani impiegati nella riparazione per escissione.

Inoltre, Thompson e collaboratori (1988) hanno isolato geni che complimentano la riparazione dei danni indotti dai raggi X nei mutanti CHO (EM9).

L'identificazione di geni che complimentano i difetti sopra descritti, si realizza con la ripresa di una normale resistenza cellulare ad agenti citostatici, effettuata attraverso la misurazione di alcuni parametri come la sopravvivenza cellulare, le mutazioni, aberrazioni cromosomiche e gli scambi tra cromatidi fratelli (SCE's).

Cell lines	genotype	Defect	human homologous
AA8	WT	WT	
UV4	ERCC1 -	deficient in NER	XPF
UV5	ERCC2 -	deficient in NER	XPB
V3-3	XRCC7 -	deficient in NHEJ	DNA-PK
Irs1SF	XRCC3 -	deficient in HR	Rad 51
EM9	XRCC1 -	deficient in BER	DNA ligase III
UV61	ERCC6-	deficient in TCR	CSB

Tabella 1: Esempi di linee cellulari di hamster cinese difettive in vari sistemi di riparazione

Aberrazioni cromosomiche

L'azione dei diversi agenti genotossici, varia a seconda della loro natura e della fase del ciclo cellulare. Molti tipi di lesioni al DNA possono generare direttamente o indirettamente rotture a doppia elica, responsabili della formazione di aberrazioni cromosomiche.

E' noto che alcune aberrazioni indotte da agenti chimici S-dipendenti insorgono come errori che avvengono durante la replicazione del DNA e pertanto responsabili di aberrazioni di tipo cromatidico.

Al contrario le lesioni provocate dalle radiazioni ionizzanti e da alcuni mutageni S-indipendenti producono immediatamente aberrazioni cromosomiche; queste saranno di tipo cromosomico se l'esposizione avviene nella fase G₁ del ciclo cellulare o di tipo cromatidico se avviene nella fase S e G₂. Gli agenti S-dipendenti sono anche molto efficaci nell'induzione di scambi tra cromatidi fratelli (SCE's).

Riguardo alla formazione delle aberrazioni cromosomiche si pensa che quelle indotte dagli agenti S-indipendenti si formino in seguito ad una riparazione sbagliata delle lesioni, processo definito "miss-repair", laddove quelle indotte da agenti S-dipendenti si originano da una replicazione errata del DNA contenente le lesioni, processo conosciuto come "mis-replication" (Evans et al.1977).

Le aberrazioni cromosomiche si suddividono in: cromosomiche e cromatidiche

Aberrazioni di tipo cromosomico

Si formano nella fase G₁ del ciclo cellulare, prima della replicazione. Esse comprendono:

Intrascambi cromosomici

1. Delezioni terminali: che vengono indicate dalla presenza di frammenti acentrici B''
2. Delezioni interstiziali che sono formati da piccoli anelli acenrici appaiati.
3. Anelli acentrici e centrici a seconda se nell'anello è presente o no il centromero.
4. Inversioni che si formano dall'interazione dei capi di rottura posizionati su uno stesso cromosoma.

Interscambi cromosomici:

1. Traslocazioni reciproche visibili soltanto effettuando il bandeggio

2. Dicentrici o cromosomi policentrici si creano da scambi tra due o più cromosomi che si uniscono a formare cromosomi con due o più centromeri. Di solito sono accompagnati da frammenti acentrici uno per ogni di centrico.

Aberrazioni di tipo cromatidico

Queste si formano nella fase S e G₂ del ciclo cellulare, si dividono in:

Intrascambi cromatidici

1. Rottura cromatidica o delezione terminale si verifica quando sussiste una discontinuità in uno dei due bracci cromatidici e i punti di frattura non sono allineati.
2. Delezione interstiziale cromatidi: quando è presente un frammento cromatidico che può essere appaiato oppure no.
3. Isocromatidi: questi sono formati da scambi tra cromatidi fratelli e possono essere spesso confusi con delle delezioni terminali. Possono essere di due tipi : sister union se i capi di rottura si uniscono oppure non union se non si uniscono.

Intrascambi cromatidici

1. Scambi simmetrici: è composto da uno scambio tra due o più cromosomi. Il più semplice che si può osservare appare in una configurazione a quattro braccia definito “quadriradiale”
2. Scambi asimmetrici: si tratta di uno scambio tra due o più cromosomi che danno luogo da un cromatidio dicentrico.

Un particolare tipo di aberrazioni cromatidiche riguarda la formazione dei triradiali che sono un'aberrazioni a tre rotture che derivano dall'interazione di un isocromatide con una delezione terminale e sono poco frequenti.

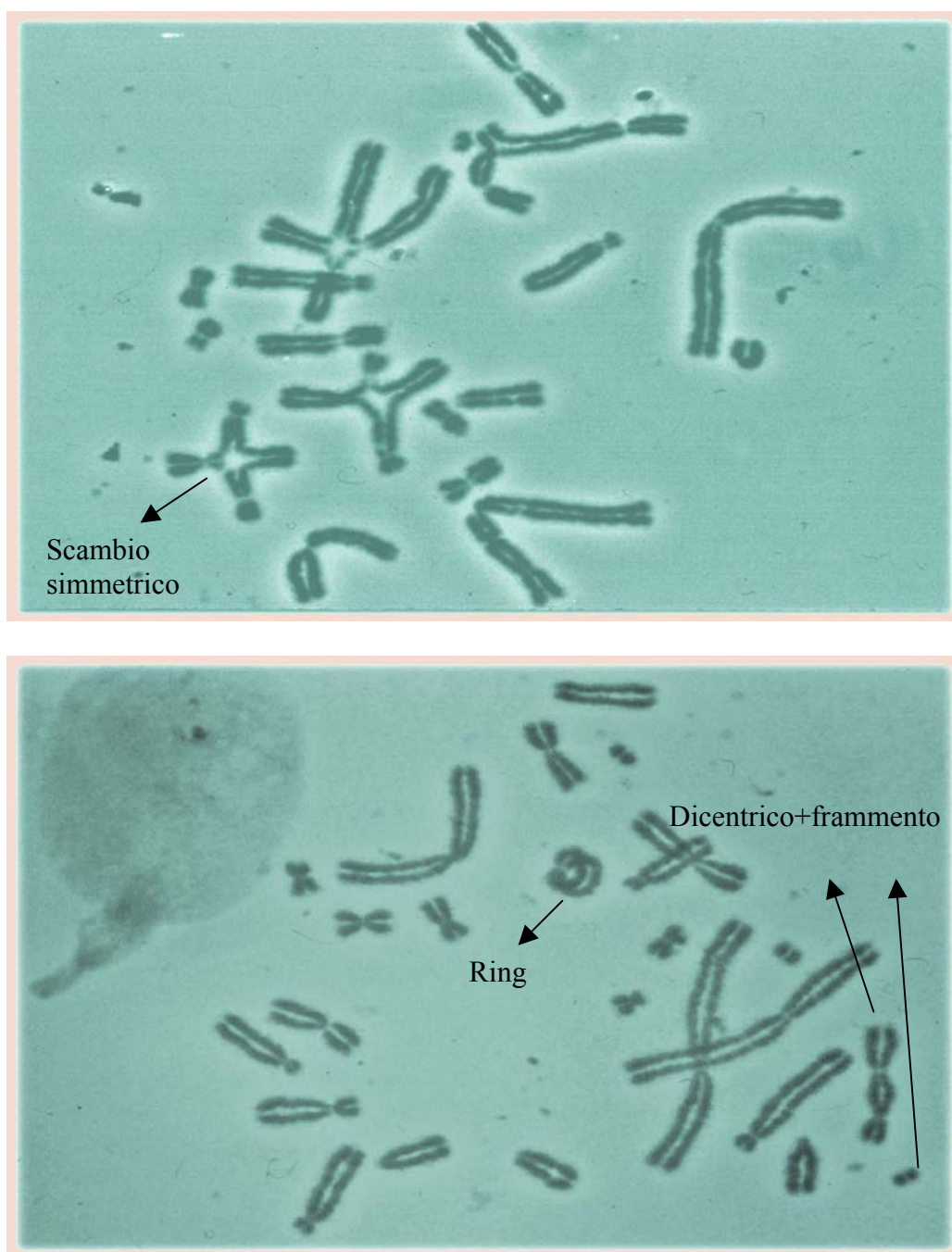


Fig. 1: Esempi di metafasi aberrate

Scambi tra cromatidi fratelli

Gli scambi tra cromatidi fratelli (SCEs) rappresentano un fenomeno che si verifica ampiamente in natura (Chao et al., 1985; Escalza et al., 1989).

Il significato biologico e il meccanismo con cui si verifica ancora non è stato chiarito, ma numerosi studi hanno messo in evidenza che la formazione degli SCEs richiede il passaggio della cellula attraverso la fase di sintesi del DNA (Wolff et al., 1974). Infatti molti dati suggeriscono che il loro sito di formazione sia localizzato a livello della forca di replicazione (Kato, 1980; Cortés et al., 1993). Studi di Sonoda e collaboratori (1999) hanno messo in evidenza che vi è una relazione tra gli SCEs e la ricombinazione omologa (HR). Infatti è proprio durante la formazione della forca di replicazione, quando i doppi filamenti omologhi si trovano vicini, che questo evento potrebbe prendere luogo con molta facilità (Morales-Ramirez et al., 1990). La ricombinazione omologa spontanea avviene, nelle cellule di mammifero, con tasso di $10^{-6}/10^{-5}$ per ciclo cellulare, tra sequenze di DNA ripetute. Un comune substrato della HR è lungo circa 1-5 kb e corrisponde a circa 10 eventi di HR in ogni cellula per ciclo cellulare. Questo tasso di ricombinazione, molto probabilmente, dipende dalla posizione del genoma, dalla lunghezza delle sequenze ripetute e dalla distanza tra di esse (Helleday et al., 1998). Il numero di SCEs spontanei visualizzati con tecniche citogenetiche in cellule di mammifero è di circa 10 per cellula, quindi è ragionevole supporre che la maggior parte degli eventi di HR spontanei che prendono luogo in cellule di mammifero, siano SCEs poiché essi sono mediati attraverso la ricombinazione (Sonoda et al., 1999). Da un punto di vista citologico, quindi, gli SCEs risultano in una rottura a doppio filamento della molecola di DNA con conseguente ricongiungimento in siti omologhi di due cromatidi di uno stesso cromosoma. Da un punto di vista genetico, sono neutrali se vengono scambiate parti uguali dei cromatidi; se, invece, gli scambi avvengono in maniera disuguale, allora si possono verificare delezioni o inserzioni.

Quando il DNA cellulare è danneggiato da agenti genotossici il tasso di SCEs aumenta.

Si pensa che gli SCEs siano un tentativo della cellula di fissare il danno causato dagli agenti genotossici e, quindi, più potente è l'agente maggiore sarà la

frequenza della loro induzione. Tra gli agenti chimici che inducono SCEs possiamo ricordare il trizio (Brewen e Peacock, 1969; Gibson e Prescott, 1972), la radiazione ultravioletta (Kato, 1973; Wolff et al., 1974), gli agenti alchilanti (che a basse concentrazione è stato visto indurre molti SCEs ma poche aberrazioni cromosomiche) (Kato, 1974; Latt, 1974; Perry e Evans, 1975; Solomon e Bobrow, 1975), ed altri agenti mutageni (Perry e Evans, 1975). Gli SCEs sono stati osservati per la prima volta da Taylor (1985) in studi autoradiografici di cromosomi marcati con trizio e consistevano di un cromatidio marcato e uno non marcato. Negli anni successivi sono state sviluppate nuove tecniche di colorazione capaci di distinguere i cromatidi fratelli e, quindi, di osservare gli SCEs senza utilizzare l'autoradiografia.

Queste tecniche dipendono dall'esposizione delle cellule agli analoghi della timidina, quali le 5-bromo-2-deossiridina (BrdUrd), durante due cicli di replicazione del DNA. Dopo l'esposizione a questa sostanza i cromosomi consisteranno di un cromatidio monosostituito ed un cromatidio bisostituito con BrdUrd. (Fig.4) Da un punto di vista pratico lo stesso risultato si ottiene esponendo le cellule agli analoghi delle basi solo per un ciclo di replicazione, seguito da un secondo ciclo in assenza di essi.

Tali cromatidi fratelli sostituiti vengono colorati con composti fluorescenti quali l'Hoechst 33258 (Latt, 1973) o arancio di acridina (Kato, 1974; Perry et Wolff, 1974) o con una combinazione di sostanze fluorescenti e Giemsa (tecnica FPG "Fluorescent Plus Giemsa"); Perry et Wolff 1974; Wolff and Perry 1974;). Grazie alla tecnica FPG il potere di rilevamento citologico dello scambio è stato notevolmente migliorato rendendo la sua analisi molto più semplice, tuttavia il trattamento delle colture cellulari con BrdUrd genera un leggero aumento del numero degli SCEs, sia spontanei che indotti, nella seconda divisione mitotica (Natarajan et al., 1983). Questo perché la BrdUrd ha la capacità di cambiare la struttura della cromatina in maniera tale da causare lesioni che inducono SCEs dopo la replicazione del DNA.

Il saggio degli SCEs permette di analizzare l'esposizione anche a basse dosi di sostanze chimiche rispetto alle aberrazioni cromosomiche ed ai micronuclei, due tests generalmente meno sensibili che richiedono l'esposizione ad elevate concentrazioni di mutageni e carcinogeni (Lilly et al., 1975); inoltre negli SCEs si può osservare un incremento nella loro frequenza, statisticamente significativo,

anche dopo l'analisi di sole 10 o 20 cellule, mentre i tests delle aberrazioni cromosomiche e dei micronuclei richiedono l'analisi di un gran numero di cellule. L'analisi degli SCEs è molto semplice a differenza di quella delle aberrazioni cromosomiche che risulta più difficile e richiede un'elevata esperienza da parte dell'osservatore. L'induzione degli SCEs si ottiene molto efficientemente in seguito al trattamento con agenti mutageni e cancerogeni, specialmente quelli che formano addotti covalenti col DNA o che sono in grado di interferire direttamente o indirettamente con la replicazione. Studi su cellule di mammifero hanno dimostrato che gli SCEs vengono indotti molto più efficacemente dagli agenti S-dipendenti (purchè presenti prima o durante la fase S del ciclo cellulare), quali gli agenti alchilanti e la radiazione ultravioletta, rispetto agli agenti S-indipendenti, quali i raggiX, e la bleomicina (Kilman, 1975; Solomon and Bobrow, 1975). Per questi motivi gli SCEs sono considerati indicatori sensibili del danno cromosomico. Quindi grazie alla sua elevata sensibilità e alla sua facilità del procedimento, questo test è uno dei saggi più comunemente utilizzati per valutare l'attività mutagena di composti chimici ambientali mettendo in evidenza l'avvenuto danno al DNA.



Fig.2.: Visualizzazione di scambi tra cromatidi fratelli.

Agenti che danneggiano il DNA

Le cellule sono continuamente esposte a vari agenti danneggianti il DNA che possono essere classificati a seconda la loro natura chimica o fisica, della loro natura (endogena o esogena), e del tipo di lesione che inducono (Hoeijmakers Jan H.J. 2001).

Tra i principali agenti fisici ricordiamo i raggi ultravioletti che sono onde elettromagnetiche, non ionizzanti con una lunghezza d'onda compresa tra i 200 e 400 nm. Lo spettro di assorbimento può suddividersi in base alle proprietà fisiche ed agli effetti biologici da essi prodotti in: UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315nm), UV-A (315nm-400nm).

Quelle che risultano essere più dannose per gli organismi viventi sono gli UV-C perché assorbite dal DNA, per questo motivo sono quelle più utilizzate per studi di mutagenesi.

I raggi UV inducono distorsione dell'elica del DNA (Friedberg et al. 1995) previa formazione del ciclobutano del dimero di pirimidina (CPD) e del 6-4. Pirimidina-pirimidone fotoprodotto (6-4PP). Queste lesioni bloccano la progressione dell'RNA-Polimerasi II con il risultato di una diminuzione della sintesi del RNA messaggero (Tornaletti et al. 1997; McKay B.C. et al. 2001).

Inoltre tra gli agenti fisici sono inclusi le radiazioni ionizzanti che sono onde elettromagnetiche a lunghezza d'onda molto inferiore rispetto alle radiazioni non ionizzanti a cui è associato un alto valore energetico, ne sono un esempio i raggi γ ed i raggi X. Questi tipi di radiazioni nell'attraversare la materia cedono energia attraverso collisioni casuali con atomi e molecole, determinando la formazione di radicali liberi, rotture a singola e doppia elica sul DNA.

Tra gli agenti chimici ricordiamo: il metilmentansulfonato (MMS), un agente alchilante monofunzionale i cui principali prodotti dell'interazione con il DNA sono N-7 alchilguanina, O⁶ alchilguanina, l'N-3-alchiladenina (Friedberg et al. 1995).

L'ossido di nitrochinolina (4-NQO), un agente chimico UV mimetico, a causa delle sue somiglianze condivise con i raggi UV in molti sistemi di riparazioni, rappresenta un potente cancerogeno.

La mitomicina C, un agente alchilante bifunzionale, usato nella terapia antitumorale, forma addotti al N-7 e al N-2 delle guanine, intrastrand cross-links,

e interstrand cross-links (ICLs) tra l' N-2 delle guanine e d(CpG) delle sequenze della scanalatura minore del DNA. (Tomasz M.et al. 1995; Kumar G. S. et al.1997) .

Tali agenti inducono lesioni primarie al DNA in tutte le fasi del ciclo cellulare.

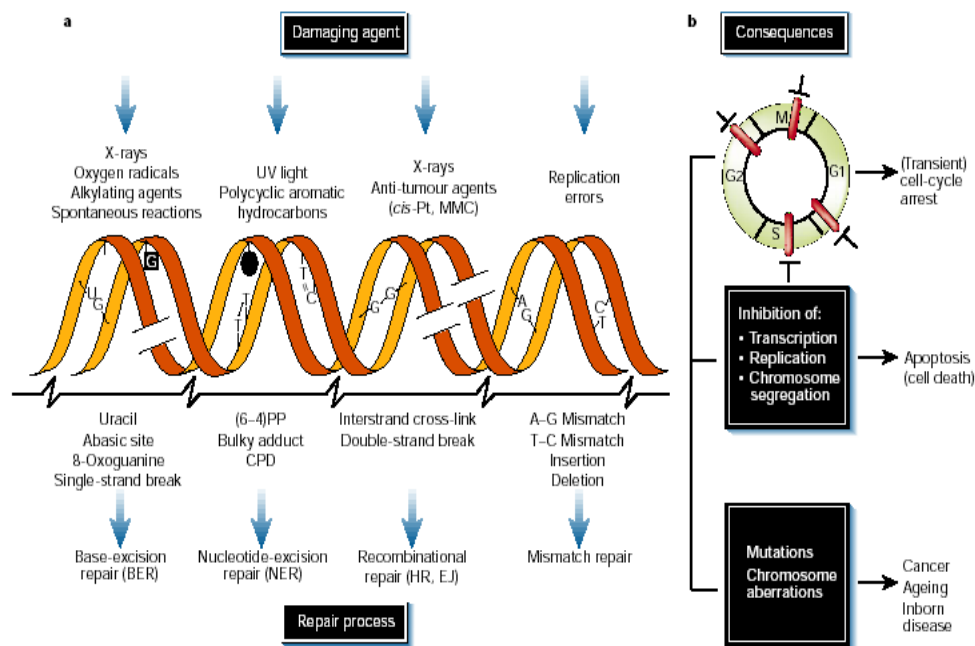
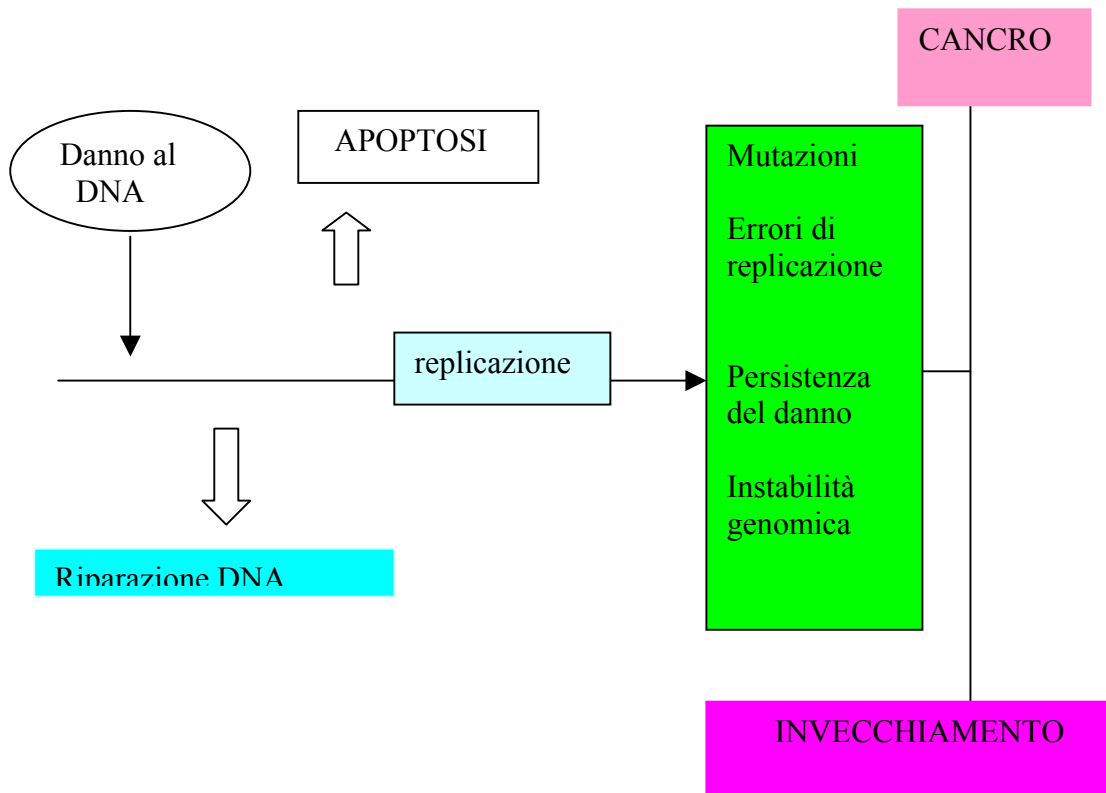


Fig.3: Agenti che danneggiano il DNA e relativi sistemi di riparazione (Hoeijmaekers 2001)

Risposte al danno al DNA

Le cellule hanno sviluppato diverse strategie per contrastare il danno indotto al DNA: tollerare il danno, ripararlo oppure andare in apoptosi.



Se il danno permane dopo la replicazione, il risultato è l'instabilità genomica, la quale si può manifestare sotto forma di mutazione.

Per questo motivo si sono evoluti numerosi sistemi di riparazione: “nucleotide excision repair”, “base excision repair”, “mismatch repair”, “double strand break repair”.

Inoltre, vengono attivate vie di trasduzione del segnale in presenza di danno al DNA che provocano il blocco del ciclo cellulare.

L'arresto del ciclo cellulare durante le diverse fasi è probabilmente provocato dall'inibizione dell'attività chinasi delle cicline che sono deputate al controllo della progressione del ciclo cellulare

(Lock and Ross 1990; Dulic et al.1994; O'Connor et al. 1993).

La presenza dei check-point risulta essere fondamentale per aumentare il tempo a disposizione per l'intervento dei sistemi di riparazione prima che inizi il processo replicativo .

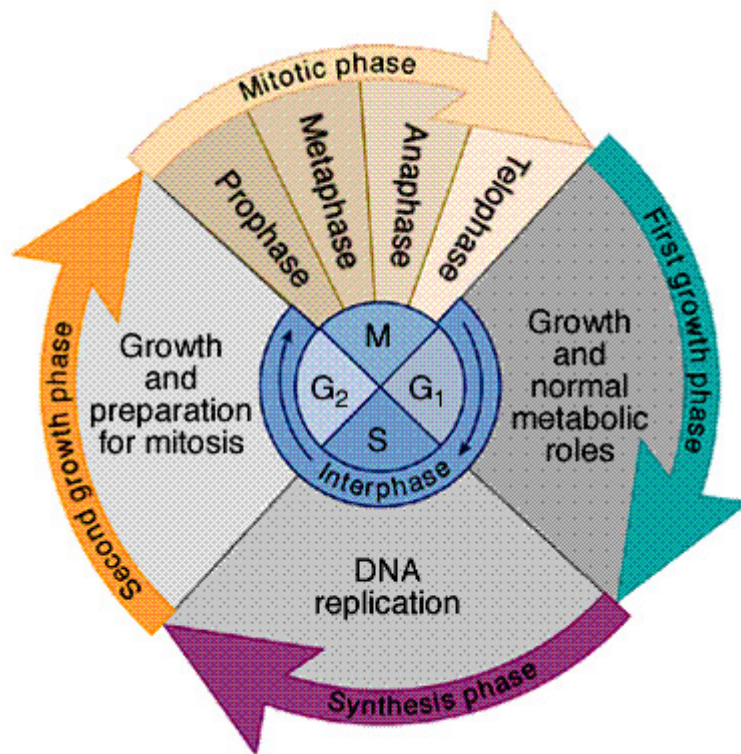


Fig.4: Ciclo cellulare

Sistemi di riparo

L'instabilità genomica causata principalmente da danno al DNA e da errori commessi dalla macchina replicativa del DNA sono la principale causa dei processi di cancerogenesi. Quindi il mantenimento dell'integrità genomica è fondamentale, per questo motivo nei mammiferi esistono diversi meccanismi di riparazione: nucleotide excision repair (NER), base excision repair (BER), homologous recombination, end joining, mismatch repair and telomere metabolism (Hoejmarkes Jan H.J. 2001)

Base excision repair (BER)

Il BER è il maggior guardiano contro il danno dovuto al metabolismo cellulare includendo le specie reattive dell'ossigeno, metilazioni, deaminazioni ed idrossilazioni.

L'inizio della fase riparativa del BER è dovuta ad una specifica classe di enzimi denominati DNA-glicosilasi. Questi enzimi riconoscono una singola o un numero relativamente basso di lesioni.

Le DNA-glicosilasi catalizzano l'idrolisi del legame N-glicosidico tra lo scheletro del DNA e la base modificata determinando la perdita della base e la formazione dei siti abasici. L'idrolisi del legame fosfodiesterico al 5' dei siti abasici da parte delle endonucleasi apuriniche/apirimidine, crea dei primer per la DNA-polimerasi prima e poi per la DNA-ligasi che ristabilisce la continuità del filamento riparato (Friedberg et al.1996, Lindahl et al.1997, Lindahl and Wood 1999).

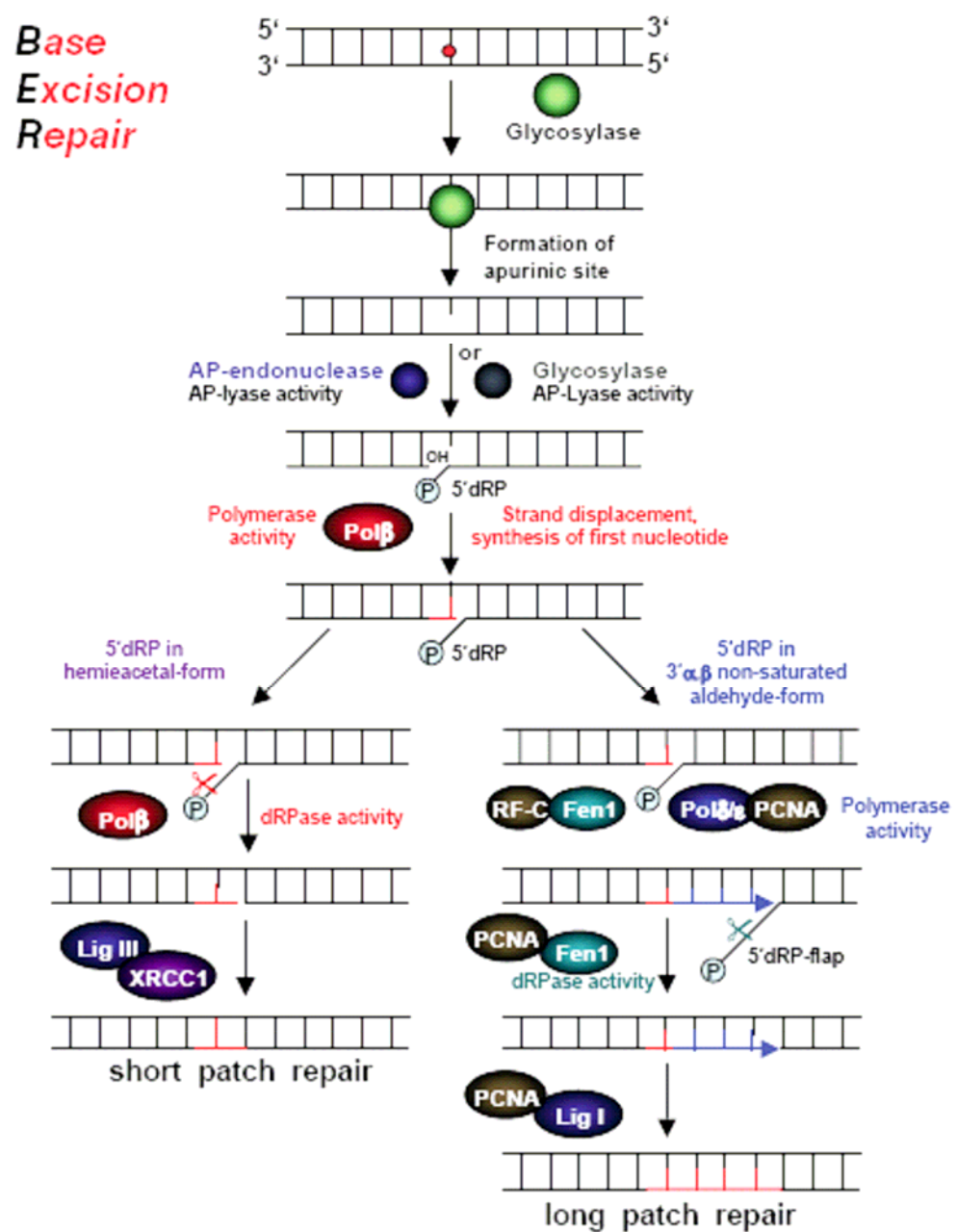


Fig.5: Meccanismo molecolare del “base excision repair” (Christmann M. et al. 2003).

Nucleotide excision repair (NER)

Il NER tra tutti i sistemi di riparazione è quello più versatile in termini di riconoscimento di lesioni.

Esistono due subpathways del NER ognuna con un substrato specifico: global genome repair (GGR) deputato alla rimozione del danno sull'intero genoma, e il transcription coupled repair (TCR) che focalizzato il danno blocca l'allungamento dell'RNA-polimerasi e quindi si occupa preferenzialmente della rimozione del danno sul filamento trascritto (Tornaletti et al. 1999). Una delle maggiori funzioni del NER è la rimozione del danno inflitto dai raggi UV dal sole, come il ciclobutano del dimero di pirimidina (CPD) e il 6-4 pirimidina piramidone fotoprodotto (6-4 PP). Il TCR è uno dei più importanti legami tra riparazione e trascrizione. Queste connessioni tra NER e trascrizione sono di grande importanza per comprendere la complessità del fenotipo CS, XP e TTD (Hojimarkers et al. 1996; Lehmann et al. 1995). Il NER è un processo strettamente regolato che coinvolge più di 30 prodotti genici (Friedberg et al. 1995) che svolgono un'azione sequenziale nel riconoscimento del danno, reclutamento del macchinario di riparazione, apertura del sito danneggiato, incisione del sito danneggiato, rimozione dell'oligonucleotide contenente il sito e la formazione di gap con DNA normale (Friedberg et al. 1995; Wood et al. 1996, 1997; de Laat et al. 1999).

Nelle cellule umane l'incisione avviene al legame 3'-5' a partire dal 3' e dopo 24 nucleotidi al 5' risultando nel rilascio di 27-29 basi (Huang et al. 1992).

Sono state identificate 17 proteine coinvolte nel processo del NER (Sancar et al. 1995).

La proteina XPA è coinvolta nello step iniziale del riconoscimento del danno e si lega alla lesione. Questa forma un eterodimero con XPF-ERCC1 e la proteina A (RPA).

Un altro fattore proteico, il TFIIH, è reclutato al livello della lesione insieme alle proteine XPC e XPG.

La proteina XPG incide al lato 3' della lesione mentre XPC taglia al 5'; la risultante gap a singolo filamento è risentitizzata per l'azione della DNA-polimerasi δ o ξ e siglata dalla DNA-ligasi.

Inoltre è stato individuato il reclutamento di PCNA (antigene nucleare delle cellule proliferanti), probabilmente associato alla stimolazione dell'attività

polimerasica o all'incremento del turnover catalitico degli enzimi coinvolti nel processo di riparazione.

Molte delle conoscenze sul meccanismo molecolare del NER sono da attribuire a studi effettuati su cellule di pazienti affetti da **Xeroderma-Pigmentosum**, una rara malattia genetica.

Per molto tempo si è pensato che il nucleotide excision repair potesse agire sull'intero genoma, ma lo sviluppo di tecniche più adatte hanno messo in evidenza l'esistenza di una sua eterogeneità nell'efficienza di riparazione all'interno del genoma (Bohr et al.1985).

Questa diversità di riparazione si osserva al livello degli stessi geni attivi tra filamento trascritto e non trascritto.

Genome Global Repair

Il GGR agisce sulle lesioni al DNA presenti sull'intero genoma, le cinetiche di riparazione possono essere influenzati da vari parametri.

Le lesioni che rappresentano un buon substrato per il NER spesso causano un locale svolgimento di poche paia di basi che circondano il sito di danneggiamento. L'efficienza di riparazione è influenzata dalla struttura della cromatina (Venema et al.1992), sia dall'accessibilità delle lesioni sul DNA agli enzimi di riparazione.

La differenza fondamentale al livello molecolare tra GGR e TCR è nella fase di riconoscimento del danno: nel genome global repair la lesione è riconosciuta da XPC-HR23B (HR23B è uno dei due omologhi umani del lievito della proteina Rad23 NER) che hanno un'alta affinità per il DNA, questa affinità aumenta di 10 volte se il DNA è danneggiato (Sugasawa et al.1998). Le fasi successive risultano essere uguali al TCR.

Transcription Coupled repair

Il TCR è attivo al livello del filamento trascritto dei geni ed è dipendente dalla trascrizione, infatti si pensa che il segnale di attivazione di tale processo sia dovuto all'arresto della RNA-Polimerasi II al livello della lesione (Mellon and Hanawalt 1989).

Nei batteri, e precisamente in E.coli, è stata identificata un'unica proteina sufficiente per la subpathway, mentre nell'uomo sono coinvolte due proteine CSB

e CSA, la cui mutazione provoca una malattia genetica ereditaria definita sindrome di Cockayne.

I geni CSB e CSA sono stati clonati e caratterizzati biochimicamente (Troelstra et al.1992). La proteina CSA ha un ruolo prettamente strutturale e di regolazione, ma non enzimatica (Henning et al.1995), al contrario CSB pur non essendo elicasi mostra un'attività ATPasica stimolata dal RNA.

La proteina CSB aumenta la velocità di reclutamento del macchinario di riparazione attraverso la sua interazione sia con l'RNA-polimerasi II e TFIIH, sia con proteine coinvolte nel processo di riparazione. Il blocco della RNA-polimerasi II a livello della lesione richiama diverse proteine coinvolte sia nel processo di riparazione che nella trascrizione.

L'ipotesi sul doppio funzionamento del TCR implica l'esistenza di due forme alternative di TFIIH, una coinvolta nel processo di riparazione e l'altra nella trascrizione ed il ruolo della proteina CSB nel passaggio da una forma ad un'altra. Il TFIIH è un complesso formato da nove subunità contenente le elicasi XPB e XPD (Egly et al.2001) inizialmente è stato identificato come un componente essenziale del macchinario iniziatore della riparazione dell'RNA-polimerasi II (RNAP2) (Drapkin and Reinberg 1994). Dopo l'assemblaggio del complesso preiniziatore della trascrizione al livello del promotore, il TFIIH apre l'elica del DNA (Holstege et al.1996), come nel NER, permettendo in questo alla RNAP2 di portare a termine la trascrizione del filamento (Dvir et al.,2001; Moreland et al.1999)

Inseguito è stato suggerito che la proteina CSB agisce come un fattore di legame tra riparazione e trascrizione dissociando il TFIIH dai siti di riparazione e reclutandolo al punto di stasi trascrizionale.

Una delle caratteristiche delle CS che sono TCR deficienti è quella di essere incapaci a riprendere la trascrizione in seguito ad irradiazione UV, tesi avvalorata da microiniezione di proteina CSB nelle cellule di Cockayne di tipo B poiché i livelli di trascrizione erano riportati a valori normali (Citterio et al.2000).

Nucleotide Excision Repair

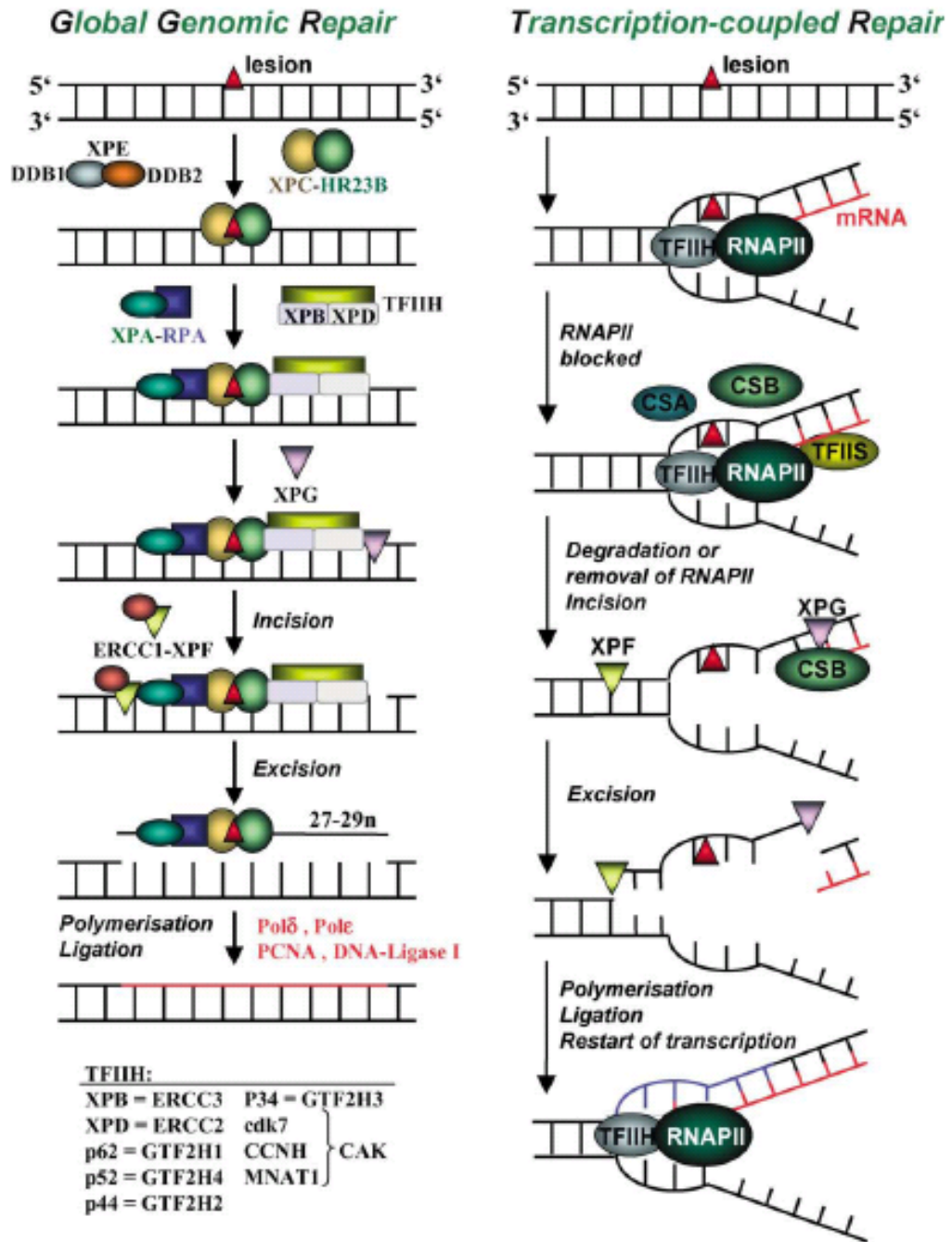


Fig.6:Meccanismo molecolare del “nucleotide excision repair” (Christmann M. et al.2003)

Mismatch repair

Un'appaiamento difettivo delle basi deriva dall'inserzione di una base sbagliata durante la replicazione del DNA. Questi errori sono corretti da una forma riparazione per escissione chiamata "mismatch repair". Mutazioni al livello del MMR provocano un'instabilità al livello dei microsatelliti, questo fenotipo è stato osservato in una serie di tumori ereditari come per esempio quello del colon (HNPCC). Le proteine coinvolte nel processo sono HMLH1, hPMS1 e hPMS2 che risultano essere omologhe a quelle trovate in E.coli.

Un difetto al livello di queste proteine determina un malfunzionamento del mismatch repair che determina un aumento della velocità di mutazione e conseguentemente un quello del processo di oncogenesi. Quattro sono le tappe del processo:

1. Riconoscimento del danno da parte del mismatch
2. Reclutamento dei fattori addizionali del MMR
3. Ricerca di un segnale che identifica il filamento errato neo-sintetizzato, seguita dalla degradazione del mismatch
4. Risintesi del tratto exciso.

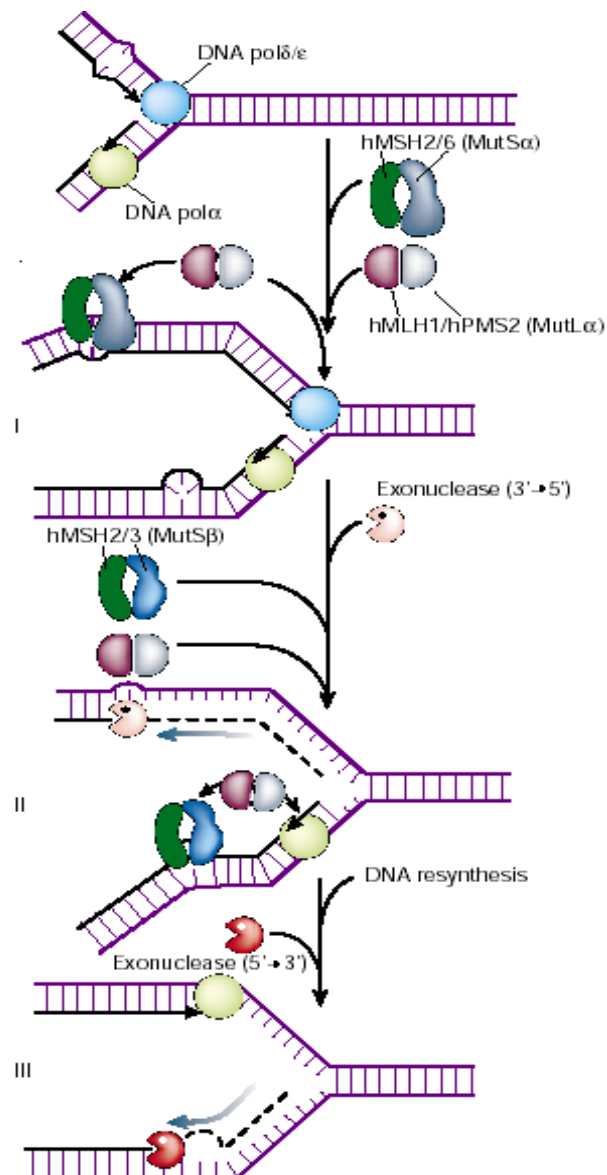


Fig.7: Meccanismo molecolare del sistema di riparazione denominato “mismatch repair” (Hoeijmakers et al. 2001)

Ricombinazione omologa e end- joining

Le rotture a doppia elica (DSBs) sono una forma comune di danno al DNA indotte dai raggi X, radicali liberi e replicazione delle rotture a singole eliche (SSBs).

Si conoscono fondamentale due vie di riparazione delle DSBs: l'homologous recombination (HR) e il non-homologous end rejoining (NHEJ).

La ricombinazione omologa rappresenta la via principale di riparazione delle DSBs nel lievito, laddove le cellule di mammifero usano la ricombinazione non omologa.

Il non-homologous end rejoining (NHEJ) non richiede sequenze omologhe tra le estremità del DNA da riparare. Questo sistema di riparazione utilizza varie proteine che legano le estremità del DNA che unendosi a formare un eterodimero attivano una proteina chinasi dipendente PK-DNA che stabilizza l'interazione con il DNA.

Questo meccanismo facilita il ricongiungimento delle DSBs ad opera di una DNA ligasi (Smith and Jackson, 1999)

L'homologous recombination (HR) richiede l'omologia tra l'estremità del DNA che devono essere riparate. Le cellule di mammifero, al contrario di quelle di lievito, utilizzano poco questo sistema di riparazione comunque ne fanno uso nella riparazione delle DSBs in tarda fase S e nella fase G₂ del ciclo cellulare nel momento in cui il cromatidio fratello non danneggiato è reso disponibile.

Una proteina fondamentale, per tale processo, è Rad51 che catalizza lo scambio tra filamenti di DNA con una reazione catalizzata da Rad52 e RPA (proteina di replicazione A) (New et al.,1998;Benson et al.,1998).

La proteina Rad52 lega le estremità del DNA e coopera con Rad51 nella riparazione delle rotture a doppia elica.

Una forma di ricombinazione omologa è rappresentata dal sistema di riparazione per le "single strand annealing" (SSA). I geni coinvolti in questa pathway sono Rad50, Mre11 e Nbs1.

Rad50 lega il DNA, mentre Mre11 svolge un'attività elicastica e quindi è in grado di riparare il filamento a singola elica danneggiato. Nel caso in cui il cromatide fratello è disponibile, la riparazione avviene secondo il modello HR; altrimenti i siti di omologia limitata solo all'interno della regione tagliata si possono congiungere per iniziare il processo di riparazione tramite SSA

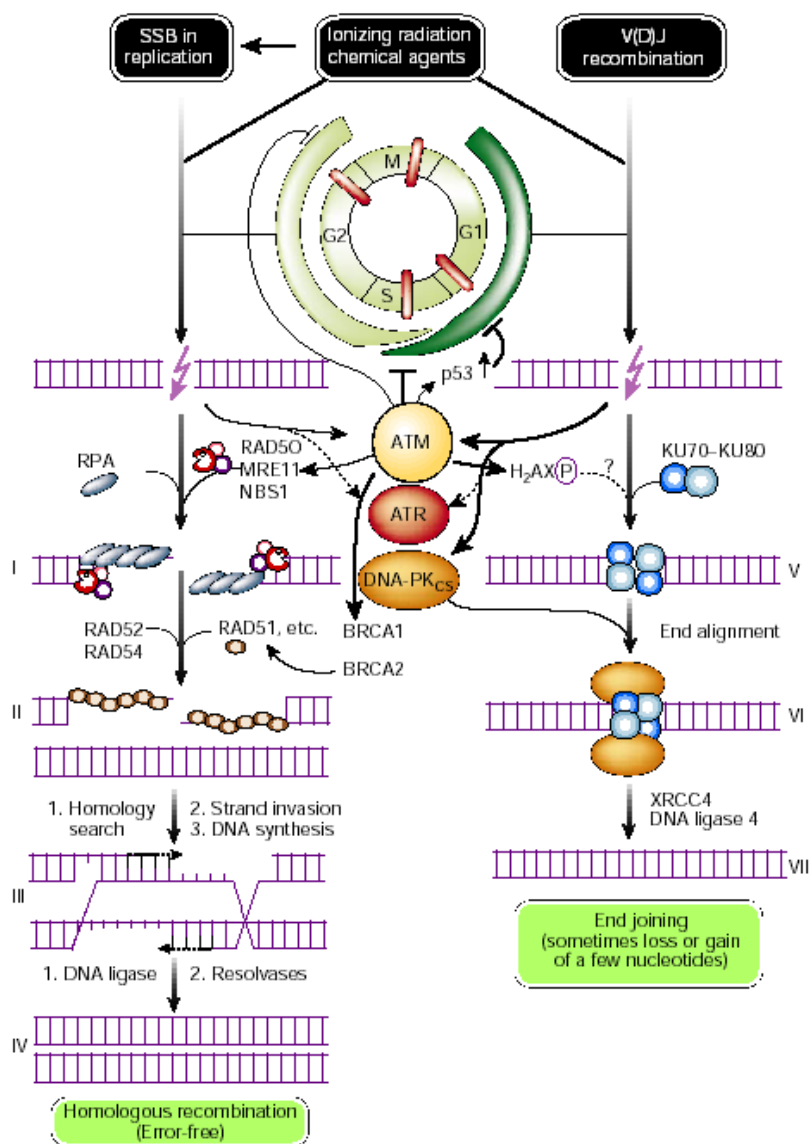


Fig.8: Sistema di riparazione omologa e non-omologa (Hoeijmarkers et al.2001)

Interstrand cross-links

Gli agenti che inducono ICLs formano vari addotti con la molecola di DNA. Gli addotti non sono sempre prodotti a caso nel genoma, poichè la struttura della cromatina ne può influenzare la formazione.

Tra le diverse lesioni che si formano nel DNA, in seguito ad esposizione ad agenti induttori di ICLs, quest'ultimi sebbene rappresentino solo una piccola frazione, risultano essere le lesioni più tossiche, poichè sono responsabili della inibizione della separazione del doppio filamento di DNA durante processi fondamentali come la replicazione e la trascrizione del DNA, la segregazione cromosomica ecc..

Il possibile arresto della replicazione e/o trascrizione del DNA potrebbe rappresentare un elemento di riconoscimento per eventuali sistemi di riparazione, a sua volta quest'ultimo potrebbe essere influenzato dalla struttura tridimensionale dell'ICL formatosi.

Il riconoscimento del blocco della replicazione o trascrizione potrebbe portare all'arresto del ciclo cellulare e permettere alla cellula di riparare. Nel caso di riparazione inefficiente, si potrebbe innescare un meccanismo di morte cellulare.

La riparazione degli ICLs è molto meno caratterizzata rispetto ad altre vie di riparo del DNA, sia per la difficoltà di creare substrati adatti allo studio meccanicistico della loro rimozione, sia per la diversità di proteine della riparazione coinvolte nella rimozione degli stessi.

Un ostacolo alla riparazione di questo tipo di lesione è rappresentato dal fatto che alla loro rimozione partecipano diversi meccanismi riparativi sovrapposti e ridondanti.

Due processi principali di riparazione sono individuati nella rimozione degli ICLs. Il primo, è un meccanismo di riparazione per ricombinazione omologa di tipo "error free", il secondo, è un meccanismo di riparazione per "translation DNA synthesis" di tipo error prone.

Entrambi si servono e cooperano con proteine appartenenti al NER.

Riparazione degli ICLs in *Escherichia coli*

Dapprima viene inciso il filamento con l'anello furanico, è solo successivamente dopo l'intervento del sistema di riparazione per ricombinazione RecA dipendente, capace di portare ad una precisa sintesi del tratto di DNA precedentemente escisso, ad opera degli enzimi del NER viene rimosso un breve tratto di DNA contenente l'anello ironico.

La gap risultante viene poi riempita ad opera della DNA polimerasi I e sigillata dalla ligasi.

La proteina RecA, ha un ruolo centrale nel processo di ricombinazione in *E.coli*.

Risultati ottenuti con batteri deficienti per la proteina RecA hanno evidenziato una via di riparazione alternativa che dipende dalla DNA polimerasi II ("Translesion repair pathway") (M.Berardini et al.1999).

Mentre studi effettuati su linee batteriche mutate per Uvr, hanno evidenziato un terzo sistema di riparazione indipendente da UvrABC, che utilizza l'azione di altre nucleasi (J.M.H. Vos 1992).

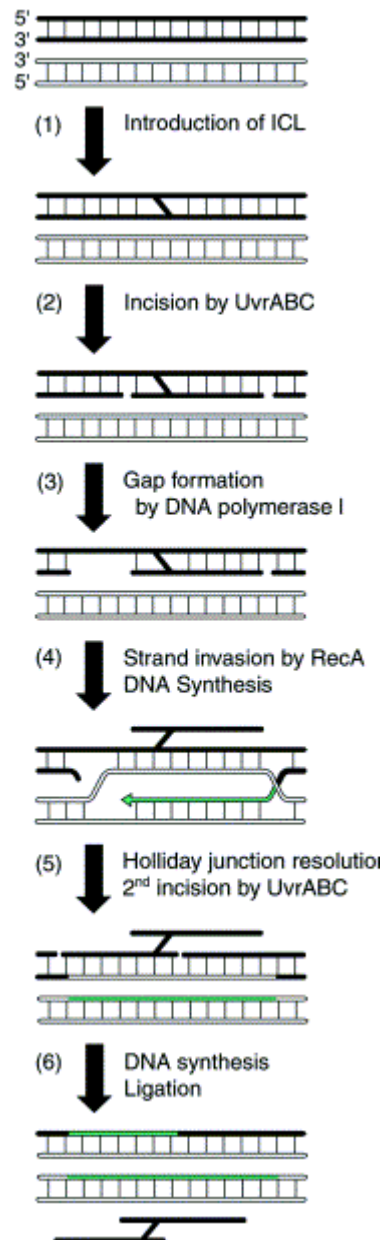


Fig. 9: Meccanismo di riparazione degli ICL in *E. coli*

Riparazione degli ICLs nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

La riparazione degli ICLs nel lievito *S. Cerevisiae* non è ben dettagliata come quello descritto in *E.coli*.

Sebbene si conoscano una miriade di geni coinvolti nella riparazione, degli ICLs, solo per alcuni è chiara la funzione specifica. I sistemi che partecipano alla rimozione degli ICL sono diversi: il “nucleotide excision repair (NER)”, “homologous recombination (HR)” e il “post-replication/translesion repair” (M. Brendel and A. Ruhland 1984).

Nella rimozione degli ICLs non interviene un singolo sistema di riparazione ma esiste una sinergia di sistemi che dipende da diversi fattori, come la posizione e il tipo di ICL, la fase del ciclo cellulare, la ploidia, e la struttura della cromatina.

Dal punto di vista meccanicistico la riparazione inizia con una incisione da entrambe le parti dell' ICLs in uno dei filamenti di DNA. Queste incisioni vengono effettuate dagli enzimi coinvolti nel NER e preferenzialmente nelle regioni trascritte del genoma.

Quando il cromatidio fratello o il cromosoma omologo risulta disponibile, il sistema di riparo per omologia può continuare le reazioni di riparazione, seguendo lo schema già precedentemente illustrato per *E.coli* (Fig.9).

Dopo l'incisione vicina all'ICL effettuata dagli enzimi del NER o da altre nucleasi, la DNA polimerasi ζ può by-passare l'oligonucleotide cross-linkato. Successivamente l'attività del NER rimuove l'oligonucleotide contenente il ICL e risintetizza la parte del DNA mancante (Fig.10).

La particolarità della riparazione degli ICLs nei lieviti è la formazione di DSBs come intermedio di riparo, cellule di lievito difettose per geni importanti nell'HR, come ad esempio RAD51, RAD52 e RAD54 sono incapaci di risolvere le rotture a doppia elica che si formano in seguito al processamento dell'ICLs, tutt'al più può avvenire una riparazione error-prone effettuata dal post-replication/translesion repair.

In alcuni casi, si è visto che la ricombinazione omologa è epistatica al NER per la riparazione degli ICLs, suggerendo una presunta partecipazione in un'unica via (J.D Henriques and B. Mustacchi, 1987).

In molti casi, si è osservato un sinergismo tra NER e HR, infatti doppi mutanti (NER e HR) risultano più sensibili di singoli mutanti, suggerendo un loro

coinvolgimento, almeno in parte, in vie di riparazione alternative (R. Chanet et al. 1985; N. Magana-Schwencke et al. 1991)

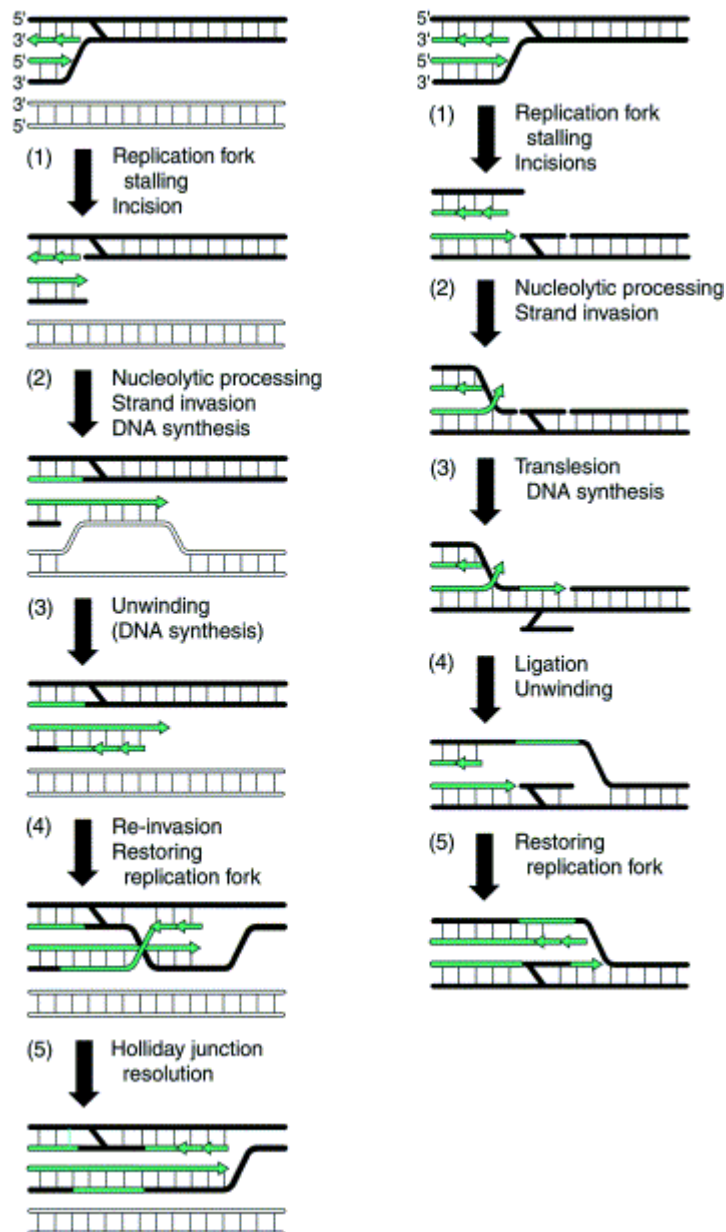


Fig. 10: Modello putativo della riparazione degli ICLs in *S.cerevisiae* durante la replicazione

Riparazione degli ICLs nei mammiferi

La conoscenza della riparazione degli ICLs nei mammiferi è derivata sia dalla conoscenza del processamento degli ICLs nel lievito e sia dall'utilizzo di linee cellulari di hamster cinese difettive nei vari sistemi di riparazione.

Le vie di riparazione del DNA si sono conservate durante l'evoluzione dal lievito all'uomo, come mostrato nella tabella 1.

Analogamente al lievito, anche nei mammiferi i geni richiesti per la riparazione degli ICLs sono quelli coinvolti nel NER, homologous recombination e nel post-replication/traslesion repair.

La riparazione delle lesioni del DNA nelle cellule di mammifero è comunque più complessa di quella del lievito e ciò spesso si riflette in un aumento di proteine coinvolte.

Esistono comunque delle differenze tra il lievito ed in mammiferi sia al livello della riparazione delle rotture a doppia elica del DNA, poichè nel lievito interviene solamente l'homologous recombination mentre nei mammiferi un ruolo importante è da attribuire anche al non-homologous end-joint (E.C. Friedberg et al.1995; T. Nagase et al.1995; M.H. Koken et al.1991; J. Thacker et al.1999; C. Masutani et al.1994; M.L.G. Dronkert et al.2000; C. Masutani et al.1999; J.P. McDonald et al.1999).

L'utilizzo di linee cellulari di Hamster cinese difettive in differenti sistemi di riparazione ci hanno permesso di scoprire le proteine coinvolte nella riparazione degli ICLs.

Un evidente contrasto esiste tra le cellule di mammifero e di lievito nel coinvolgimento del NER. Tutti i mutanti del NER nel lievito sono caratterizzati da un'elevata sensibilità agli agenti induttori di ICLs. La maggior parte delle linee cellulari difettose per il NER mostrano una moderata sensibilità agli ICLs, solamente linee cellulari mutate specificamente in nucleari specifiche del NER risultano molto sensibili.

Una spiegazione di questa differenza non è stata ancora trovata (A.R. Collins 1993). La formazione di ICLs in cellule di mammifero può differire nelle diverse regioni del genomiche.

In letteratura sono presenti dati che indicano un aumento dei livelli di ICLs indotti nelle regioni trascrizionalmente attive rispetto a quelle inattive (A.L. Islas et al.1991).

Il discorso è vero per la riparazione, almeno per quanto riguarda lo step di incisione che può avvenire precocemente nei geni trascrizionalmente attivi (J.M.Vos et al.1991; F.Larminat et al.1993; A.L. Islas et al.1991; A.L. Islas et al.1994;B.W. Futscher et al.1992).

Tale differenza scompare per elevati livelli di ICLs, probabilmente a causa della saturazione della via di riparazione dipendente dalla trascrizione che porta alla loro rimozione.

<i>S. cerevisiae</i>	Mammals
Nucleotide excision repair	
<i>RAD1</i>	<i>XPF/ERCC4</i>
<i>RAD2</i>	<i>XPG/ERCC5</i>
<i>RAD3</i>	<i>XPD/ERCC2</i>
<i>RAD4</i>	<i>XPC</i>
<i>RAD10</i>	<i>ERCC1</i>
<i>RAD14</i>	<i>XPA</i>
<i>RAD23</i>	<i>RAD23A</i>
	<i>RAD23B</i>
<i>RAD25</i>	<i>XPB/ERCC3</i>
Homologous recombination	
<i>RAD50</i>	<i>RAD50</i>
<i>RAD51</i>	<i>RAD51</i>
<i>RAD55</i>	<i>RAD51B</i>
<i>RAD57</i>	<i>RAD51C</i>
	<i>RAD51D</i>
	<i>XRCC2</i>
	<i>XRCC3</i>
<i>RAD52</i>	<i>RAD52</i>
<i>RAD59</i>	
<i>RAD54</i>	<i>RAD54</i>
<i>RDH54</i>	<i>RAD54B</i>
<i>MRE11</i>	<i>MRE11</i>
<i>XRS2</i>	<i>NBS1</i>
–	<i>BRCA1</i>
–	<i>BRCA2</i>
Post-replication/translesion repair	
<i>RAD6</i>	<i>HHR6A/UBCH1</i>
	<i>HHR6B/UBCH2</i>
<i>RAD18</i>	<i>RAD18</i>
<i>POL30/PCNA</i>	<i>PCNA</i>
<i>RAD5/REV2/SNM2</i>	(Only Arabidopsis <i>RAD5</i>)
<i>MMS2</i>	<i>MMS2</i>
	<i>CROC-1</i>
<i>UBC13</i>	<i>UBE2N</i>
<i>REV3/PSO1</i>	<i>REV3</i>
<i>REV1</i>	<i>REV1</i>
<i>REV7</i>	<i>REV7</i>
<i>RAD30</i>	<i>RAD30/XPV/POLη</i>
	<i>RAD30B/POLι</i>
–	<i>POLθ</i>
Non-homologous end joining	
<i>KU70/HDF1</i>	<i>KU70</i>
<i>KU80/HDF2</i>	<i>KU80</i>
–	<i>DNA-PKα</i>
Other genes	
<i>SNM1/PSO2</i>	<i>SNM1</i>
	<i>SNM1B</i>
	<i>SNM1C/ARTEMIS</i>
<i>PSO3/WHI2</i>	–
<i>PSO4/PRP19</i>	<i>NMP200</i>
–	<i>FANC genes</i>

Tab.1: Glossario delle proteine coinvolte nelle pathways di riparo degli ICLs nel lievito e nei mammiferi.

Riconoscimento ed incisione

Le proteine responsabili del riconoscimento degli ICLs nei mammiferi non sono ancora conosciuti.

In letteratura sono presenti dati contrastanti: potrebbero esserci delle proteine che riconoscono direttamente il danno al DNA o il riconoscimento potrebbe avvenire inseguito al blocco della replicazione o della trascrizione.

A causa della complessità della riparazione degli ICLs sono stati proposti modelli differenti:

1. alcuni ricercatori sostengono che le uniche proteine del NER, coinvolte nella riparazione del danno indotto da ICLs sono ERCC1 ed ERCC4/XPF (E.C. Friedberg et al.1995). Queste due proteine formano un complesso con attività esonucleasica, che tagliando generano la formazione di rotture a doppia elica in prossimità dell'ICL.

Questa osservazione è derivata da studi in vivo condotti su linee cellulari mutate sia per ERCC1 che XPG, dove l'incisione è risultata ridotta nelle prime e normale nelle seconde.

Una volta formata la rottura a doppia elica, l'HR può continuare la reazione di riparazione.

Il complesso ERCC1-XPF potrebbe inoltre avere un ruolo addizionale dopo l'intervento dell'HR nella rimozione dell'ICLs effettuando un'incisione sul filamento del DNA contenente l'ICLs.

2. Mentre altri ricercatori prendono in considerazione la riparazione degli ICLs durante la fase S del ciclo cellulare.

Quando la forca replicativa incontra l'ICLs, si blocca e lo stress torsionale dovuto al blocco determina il collasso della forca stessa durante la sintesi del DNA, formando una rottura a doppia elica.

Come risultato si genera una struttura intermedia di DNA "rilassato", substrato per il complesso XPF-ERCC1 più RPA. Dopo la prima incisione, l'HR può continuare le reazioni di riparazione dell'ICLs.

Ricombinazione

Per quanto riguarda la riparazione delle rotture a doppia elica del DNA esistono delle differenze a seconda dell'organismo e/o del tipo di rottura.

Il sistema di riparazione NHEJ, interviene nella riparazione delle rotture indotte dai raggi X mentre l'HR gioca un ruolo fondamentale nella riparazione delle DSBs indotte dagli ICLs.

Ciò è stato dimostrato effettuando studi su linee cellulari difettive sia per le proteine che intervengono nel NHEJ sia per quelle che intervengono nell'HR. I risultati hanno messo in evidenza una non sensibilità delle cellule difettive per NHEJ agli agenti induttori di ICLs mentre un'estrema sensibilità è stata riscontrata in quelle difettive per HR (Collins A.R. et al.1993; Garcia-Higuera L. et al.2001; Esseres J. et al.1997; Takata M. et al.2001; M. Takata et al.2000) .

L'importanza del sistema di riparazione per omologia è stata dimostrata studiando la ricombinogenicità dopo trattamento con MMC.

E' stato dimostrato che la tossicità di questa sostanza dipende dalla quantità di scambi tra cromatidi fratelli (SCE's) inseguito al trattamento.

L'aumento degli SCE's è stato osservato solo dopo la prima replicazione suggerendo che gli ICLs non possono essere by-passati efficientemente durante la replicazione , causando in questo modo morte cellulare se la riparazione è fallita (S. Wolff and V. Afzal 1996).

L'aumento degli SCE's indotti dagli agenti ICL risulta essere ridotta nelle cellule mutate per le proteine RAD54 , RAD51 ed i suoi paraloghi (M. Takata et al.2001; M. Takata et al.2000; E. Sonoda et al.1999; M.L.G. Dronkert et al.2000).

Quindi nei mammiferi, la ricombinazione omologa risulta essere indispensabile per la completa rimozione degli ICL.

Translesion DNA synthesis

Nei mammiferi è stata messa in evidenza una via di riparazione alternativa durante la fase G₁ del ciclo cellulare, nella quale sono coinvolte sia il NER che il TLS agendo in maniera sinergica nella rimozione del danno (Wang X. et al.2001).

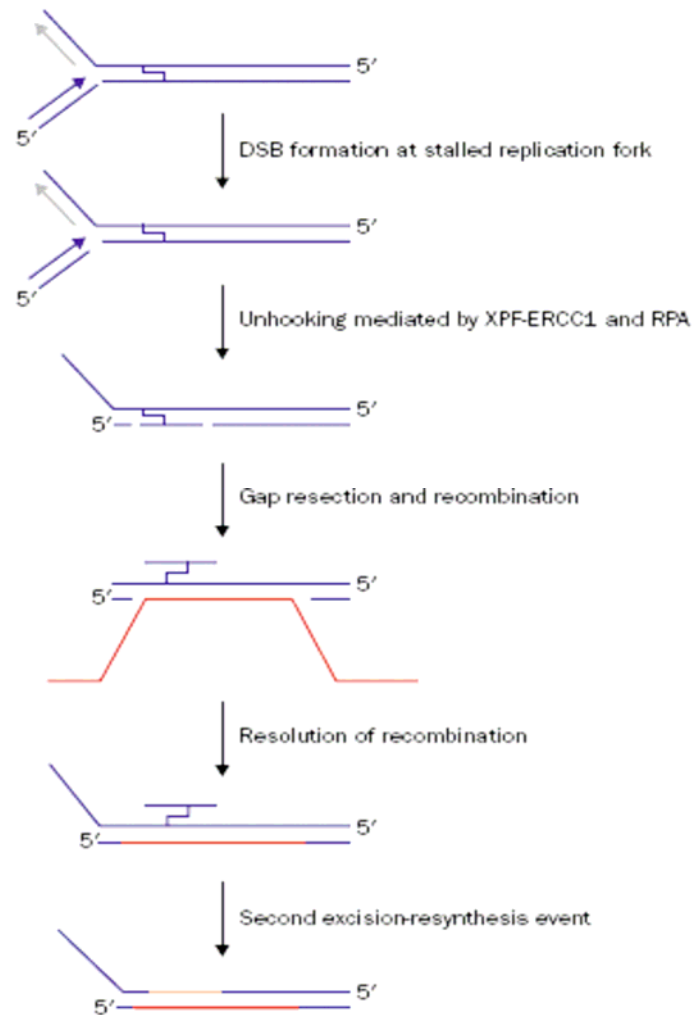


Fig. 11: Modello di riparazione degli ICLs nei mammiferi durante la fase S del ciclo cellulare (Peter J McHugh et.2001)

“ Cooperazione tra diversi sistemi di riparazione nella rimozione del danno al DNA indotto dalle radiazioni ultraviolette”

PARTE SPERIMENTALE

- 1° aspetto: Correlazione tra diversi sistemi di riparazione (NER, HR, TLS) nella ripresa dell'arresto della forza replicativa dopo trattamento con UV
- 2° aspetto: Importanza di lesioni alternative ai dimeri di pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodotto (6-4PP) nell'induzione dell'instabilità cromosomica.

Correlazione tra diversi sistemi di riparazione (NER, HR, TLS) nella ripresa dell'arresto della forza replicativa dopo trattamento con UV

INTRODUZIONE

Le cellule di mammifero utilizzano due differenti meccanismi per “by-passare” le lesioni ingombranti incontrate durante la replicazione del DNA: il “translesion DNA synthesis (TLS)” ed il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR).

Il TLS utilizza delle polimerasi a fedeltà più bassa se paragonate con quelle coinvolte nel processo di replicazione del DNA. Le polimerasi η , ι , κ e Rev1 coinvolte in questo meccanismo, facenti parte della famiglia Y (Prakash S. et al. 2005), sono capaci di inserire vari nucleotidi opposti alle basi danneggiate.

Nelle cellule umane, ad esempio, la polimerasi η “by-passa” i dimeri di pirimidina (CPDs) indotti dalle radiazioni ultraviolette in modo corretto (Masutani C. et al. 1999; Masutani C. et al. 2000; Jonhson R.E et al. 1999). Al contrario, la polimerasi ζ bypassa il danno indotto dalle radiazioni ultraviolette in maniera “error-prone” (Li Z. et al. 2002).

Le lesioni indotte dagli UV sul filamento veloce del DNA, causa del blocco della replicazione, possono dare origine ad estese regioni in cui sono presenti rotture a singolo filamento di DNA (Cordeiro-Stone M. et al. 1999; Lopes M. et al. 2006). E' stato proposto che, il legame della proteina RPA a questi siti, determina l'attivazione del check-point cellulari regolato da ATR/ATRIP (Zou L. et al. 2003), segnale poi per l'attivazione tramite la ciclina chinasi 1 del macchinario di ricombinazione omologa (Sorensen C.S. et al. 2005).

In E.coli la replicazione del DNA danneggiato sembra generare delle gaps nel filamento neo-sintetizzato, presulbilmente come conseguenza di una ripresa della replicazione al di là del DNA danneggiato. La ricombinazione omologa utilizzando il filamento complementare di DNA come stampo può riparare la gap (Rupp W.D. et al 1971; Ganesan A.K. et al. 1974; West S.C. et al. 1981) tramite un processo definito “post-replication repair”.

Anche nei mammiferi è stato suggerito un modello simile (Cordeiro-Stone M. et al. 1999; Lopes M. et al. 2006; Lehmann A.R. et al. 2000).

Ad oggi nei mammiferi, il significato biologico di un mal funzionamento o del TLS o HR durante la fase di riparazione della lesione, nei mammiferi non è stato ancora completamente chiarito.

In questo lavoro, noi abbiamo investigato se la caffeina, noto inibitore della replicazione post-riparativa (Lehmann A.R et al 1974) potesse avere un'influenza sul TLS o su entrambi i meccanismi di riparazione TLS e HR nell'oltrepassare la lesione durante la fase S.

Noi abbiamo confrontato, l'effetto della caffeina su linee cellulari deficienti per il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (ERCC1) o quello per ricombinazione omologa (XRCC3) monitorando la progressione della forca replicativa, la frequenza di mutazioni e di ricombinazione, la formazione di aberrazioni cromosomiche, l'induzione del processo apoptotico e la sopravvivenza cellulare in seguito ad irradiazione ultravioletta.

I nostri risultati dimostrano che il ritardo della forca replicativa dovuto all'irradiazione ultravioletta aumenta in seguito a trattamento con la caffeina e sembra essere indipendente sia dal NER che dall'HR. Inoltre, mentre la frequenza delle mutazioni diminuisce in presenza di caffeina, l'induzione dei processi di ricombinazione e di aberrazioni cromosomiche aumenta.

Questi dati, suggeriscono che la caffeina è responsabile del blocco del TLS provocando di conseguenza l'aumento dell'attività svolta dal sistema di riparazione per ricombinazione omologa RAD-51 dipendente.

Materiali e metodi

Linee cellulari

Le linee cellulari di hamster cinese AA8, UV4 , irs1SF e SPD8 sono state fatte crescere in DMEM (minimum essential medium Dulbecco's salt) supplementato con 10% siero fetale di bovino (FBS) e 1% di penicillina e streptomicina a 37°C, 5% di anidride carbonica e 95% di umidità.

La linea cellulare UV4 è difettiva per la proteina ERCC1, che insieme con XPF incide il filamento danneggiato in posizione 5' e la linea irs1SF è mutata nel gene che codifica per XRCC3, parologo di RAD51, necessario per il corretto funzionamento della ricombinazione omologa nei mammiferi.

La linea cellulare SPD8, derivata dalla linea di hamster cinese V79, è stata utilizzata per esaminare gli eventi ricombinazionali. La duplicazione in tandem dell'esone 7 all'interno del gene hprt in queste cellule è utile per monitorare processi di ricombinogenesi.

Saggio clonogenico

Le linee cellulari AA8, UV4 ed irs1SF sono state seminate ad una concentrazione di 500 cell/per punto sperimentale ed esposte 24h dopo a differenti dosi di radiazione ultravioletta.

Dopo i raggi UV, alle cellule è stato nuovamente aggiunto terreno di coltura fresco e sono state fatte crescere in incubatore per circa 15 giorni.

Le colonie cellulari ottenute sono state fissate in metanolo e colorate con giemsa.

Apoptosi

Le linee cellulari AA8 ed irs1SF sono state seminate ad una concentrazione di 5×10^5 cell/per punto sperimentale. Dopo 24h dalla semina, sono state irradiate con dosi differenti di radiazione ultravioletta e più precisamente 8 J/m^2 nel caso delle AA8 e 2 J/m^2 alle irs1SF.

In seguito è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente caffeina (1mM) e lasciate crescere in incubatore.

L'analisi dell'apoptosi è stata effettuata utilizzando una combinazione di fluoresceina di acetato (FDA, $5 \mu\text{g/ml}$), ioduro di propidio (IP, $0.5 \mu\text{g/ml}$) ed Hoechst (HO, $1 \mu\text{g/ml}$).

La FDA e HO sono coloranti vitali che colorano, rispettivamente, il citoplasma ed il nucleo delle cellule vive; mentre lo IP penetra all'interno della membrana cellulare solamente quando la sua funzionalità è compromessa, ad esempio nel caso della necrosi o di apoptosi allo stadio terminale. Questa tecnica ci ha permesso di discriminare tra cellule vive, apoptosi e necrosi.

L'analisi morfologica è stata effettuata dopo 24 e 36h dall'irradiazione UV in presenza o assenza di caffeina, per mezzo di un microscopio a fluorescenza.

Mutazioni geniche

Le mutazioni nel gene codificante per "hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) sono state identificate utilizzando una procedura descritta da Zhang L.H e collaboratori nel 1989. Brevemente, le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 1×10^6 per ogni punto sperimentale e tenute per 24h in incubatore. In seguito sono state lavate per due volte in PBS ed irradiate con raggi UV ed è stato nuovamente aggiunto terreno di coltura. Dopo 24h le cellule sono state nuovamente seminate sia per l'analisi della crescita sia per la determinazione della sopravvivenza cellulare.

Nel caso della sopravvivenza cellulare sono state seminate 500 cellule per ogni punto sperimentale e lasciate crescere in incubatore per 10 giorni e poi fissate e colorate. L'esperimento è stato condotto in duplicato.

Invece, per la selezione delle cellule mutate, sono state seminate nelle fiasche da coltura ad una densità di 3×10^5 per punto sperimentale e fatte crescere per 7 giorni in incubatore. Dopodiché, le cellule sono state tripsinizzate, contate e seminate nuovamente ad una concentrazione pari a 10^5 per punto ed incubate in presenza di terreno selettivo contenente 6-tioguanina per 12 giorni. In parallelo sono state seminate 500 cellule per punto sperimentale e lasciate crescere 10 giorni in terreno di coltura. Queste incubazioni sono seguite dal fissaggio, dalla colorazione con blue di metilene e dalla conta delle colonie.

La frequenza di mutazione così ottenuta è aggiustata per l'efficienza di clonaggio osservata dopo il corrispettivo trattamento senza selezione.

Aberrazioni Cromosomiche

Le linee cellulari AA8 ed irs1SF sono state seminate in doppio il giorno prima ad una densità di 3×10^5 cellule per ogni punto. Poi sono state irradiate a differenti dosi di raggi UV e precisamente 8 J/m^2 per le AA8 e 2 J/m^2 per irs1SF. In un set di piastre dopo l'irradiazione è stata aggiunta caffeina (1mM) e tenuta per 21 h nel caso della linea parentale e 23h nella linea irs1SF ed è stato nuovamente aggiunto terreno di coltura fresco (trattamento in fase S) dopodiché è stato aggiunto il colcemid ($0,1 \text{ ug/ml}$) per 3h. Parallelamente nelle altre piastre alle cellule è stato aggiunto terreno di coltura fresco e lasciate crescere in incubatore per 21h nel caso delle AA8 e 23h per la linea irs1SF dopo è stato aggiunto il colcemid insieme alla caffeina (trattamento in G_2) e tenuto per 3h . Dopodiché è stato effettuato il fissaggio con metanolo-acido acetico (3:1), i vetrini sono stati colorati in giemsa ed analizzati al microscopio ottico.

Per ogni punto sperimentale sono state lette 100 metafasi per la presenza di aberrazioni cromosomiche, le quali sono state classificate in accordo con la descrizione di Savage (Savage J.R 1977). L' analisi statistica è stata effettuato utilizzando il test t-student

Quantificazione della ricombinazione omologa

Per monitorare la ricombinazione omologa, le cellule SPD8 sono state seminate ad una densità pari a 1×10^6 in pastre petri e lasciate crescere per 24h in incubatore. Dopodiché sono state irradiate con i raggi UV e lasciate crescere per 48h per quantificare sia la sopravvivenza cellulare che i repertanti del gene HPRT.

Per questo motivo, una parte delle cellule (500 per punto sperimentale) è stata seminata e lasciata far crescere in terreno di coltura fresco per testare l'efficienza di crescita; nel caso dell'analisi dei revertanti sono state seminate 3×10^5 per ogni punto sperimentale ed è stato aggiunto terreno di coltura selettivo contenente (ipoxantina, l-azaserina e timidina). Le cellule sono state lasciate crescere in incubatore per 10 giorni poi è stato effettuato il fissaggio e le colonie sono state colorate con il blu di metilene e contate.

Allungamento della forza replicativa.

Le cellule sono state seminate ad una densità pari a 2×10^5 nei pozzetti da 24 lasciate crescere in incubatore per 24h; dopodiché è stata aggiunta timidina triziata ($^3\text{H-TdR}$), per 30 minuti, in accordo con Johansson F e collaboratori (Johansson F. et al. 2004). L'irradiazione ultravioletta è stata effettuata come descritto in precedenza ed è stata aggiunta caffeina dove necessario durante il periodo di incubazione.

L'inibizione della forza replicativa causata dalle lesioni al DNA determina la formazione di rotture a singola elica marcate con $^3\text{H-TdR}$ osservate utilizzando la tecnica "alkaline unwinding". Mentre la ripresa della forza replicativa è determinato dalla formazione di rotture a doppia elica marcate.

Risultati

La caffeina ritarda l'allungamento della forza replicativa sul DNA danneggiato dagli UV in maniera indipendente sia dal NER che dall'HR.

Le lesioni indotte dalle radiazioni ultraviolette possono, se non riparate efficientemente dal NER determinare un ostacolo all'avanzamento del macchinario replicativo.

Johnasson e collaboratori (2003), utilizzando una modificazione della tecnica “alkaline DNA unwinding” hanno dimostrato che il NER è di fondamentale importanza per il mantenimento della replicazione in seguito ad irradiazione ultravioletta. Inoltre, hanno suggerito anche un ruolo importante della ricombinazione omologa nella replicazione in presenza di lesioni indotte dalle radiazioni ultraviolette.

Per studiare l'avanzamento della forza replicativa, le cellule sono state seminate e marcate con timidina triziata prima di essere irradiate con raggi UV. Dopo l'irradiazione con UV è stata aggiunta caffeina e contemporaneamente è stata monitorato l'avanzamento della forza replicativa.

I risultati ottenuti (fig.1), hanno dimostrato che l'inibizione dell'avanzamento della forza replicazione sul DNA danneggiato, dovuto alla caffeina risulta uguale in tutte e tre le linee cellulari AA8, irs1SF ed UV4, suggerendo così che la caffeina inibisce un processo distinto sia dal NER che dall'HR.

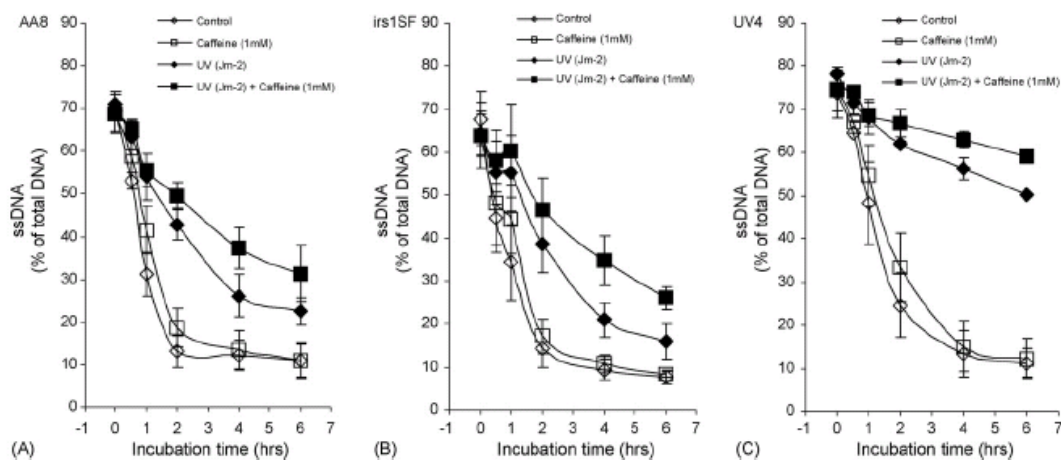


Fig.1: Avanzamento della forza replicativa nelle linee cellulari AA8 (A), irs1SF (B) e UV4 (C) inseguito ad irradiazione ultravioletta in presenza o assenza di caffeina.

La caffeina riduce la frequenza delle mutazioni indotte dalle radiazioni ultraviolette.

Le lesioni indotte principalmente dalle radiazioni ultraviolette sono i dimeri di pirimidina (CPDs) ed il 6-4 fotoprodotto (6-4PP). Se non vengono riparate correttamente possono bloccare l'azione delle DNA polimerasi ad alta fedeltà durante la replicazione, favorendo l'azione di quelle a più bassa fedeltà.

Ciò può essere la causa di un aumento della frequenza di mutazione.

Se è vero che la caffeina inibisce il processo di "TLS" la frequenza delle mutazioni dovrebbe diminuire.

Per testare tale ipotesi, abbiamo monitorato l'induzione delle mutazioni nel gene HPRT nella linea cellulare AA8 sottoposta a differenti dosi di raggi UV in presenza o assenza di caffeina.

I risultati hanno dimostrato che il trattamento con la caffeina dopo irradiazione ultravioletta porta ad un decremento della frequenza di mutazioni (fig.2), supportando l'idea che questo composto inibisce il TLS ma lasciando ancora irrisolta la questione se la caffeina influenzi o meno la ricombinazione.

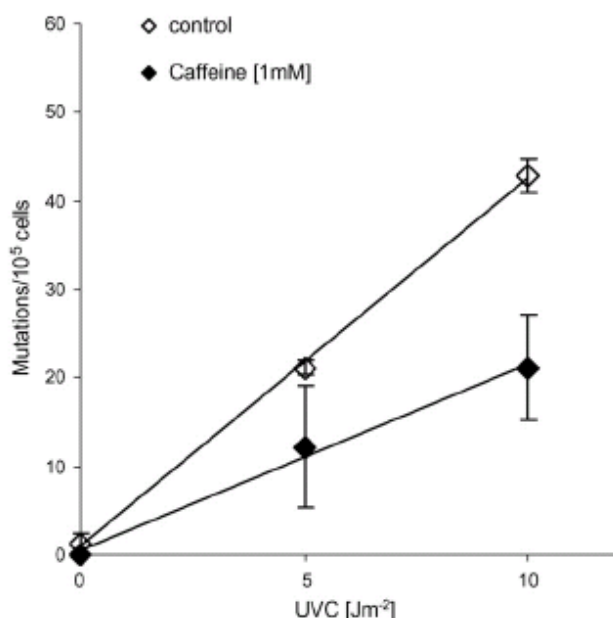


Fig.2: Mutazioni nel gene hprt indotte dagli UV nella linea cellulare AA8 fatta crescere in presenza o assenza di caffeina (1mM).

La caffeina aumenta la “pathway” di ricombinazione indotta dagli UV.

Studi effettuati in precedenza hanno messo in evidenza un'ipersensibilità di cellule difettive nel sistema di riparazione per ricombinazione omologa alle radiazioni ultraviolette (Johnasson F. et al. 2004; Tebbs R.S. et al. 1995; Henry-Mowatt J. Et al. 2003). La sopravvivenza cellulare della linea irs1SF irradiata con UV sembra confermare dati già presenti in letteratura (fig.4). Per studiare se la caffeina influenza il processo di ricombinazione omologa, abbiamo usato le cellule SPD8, le quali possiedono un gene HPRT non-funzionale (Helleday T. et al. 1998).

La ricombinazione omologa tra la regione duplicata è stata scelta come meccanismo per restaurare la funzione del gene HPRT.

L'irradiazione con raggi ultraviolette delle cellule SPD8 seguita dal trattamento con caffeina ha confermato che i raggi UV aumentano la ricombinazione omologa (Masutami C. et al. 1999). Noi abbiamo trovato che la frequenza di ricombinazione indotta dagli UV è aumentata in presenza di caffeina (Fig.3).

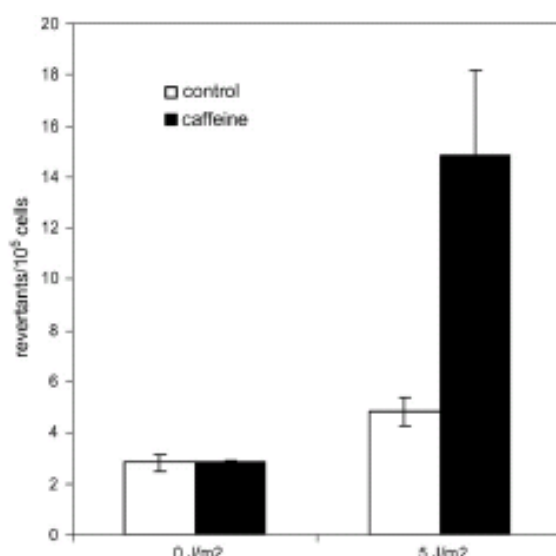


Fig.3: Frequenza di ricombinazione nella linea cellulare SPD8, indotta dagli UV in presenza o assenza di caffeina (1mM)

Solo le cellule difettive per la ricombinazione omologa risultano essere sensibili al trattamento con caffeina dopo irradiazione ultravioletta

Se è vero che il trattamento con caffeina inibisce il “Translesion synthesis” nella regione circostante la lesione indotta dai raggi UV, ci dovremmo aspettare un effetto sulla sopravvivenza cellulare delle linee cellulari difettive per l’HR in seguito ad irradiazione ultravioletta.

Per saggiare questa ipotesi, abbiamo monitorato la sopravvivenza cellulare della linea parentale, di quella mutata nel sistema di riparazione per escissione nucleotidica e di quella difettiva nel sistema di riparazione per ricombinazione omologa, dopo trattamento con raggi UV in presenza o assenza di caffeina (1mM).

I risultati presentati nella fig.4 hanno evidenziato un chiaro effetto della caffeina, noto inibitore della replicazione post-replicativa (Lehmann A. R. et al.1974), sulla sopravvivenza solo sulla linea cellulare *irs1SF* mutata nell’HR, ma non nella linea cellulare UV4 difettosa per il NER. Ciò supporta l’ipotesi che l’inibizione del TLS durante il “by-passaggio” della lesione indotta dagli UV può essere compensata dall’azione della ricombinazione omologa.

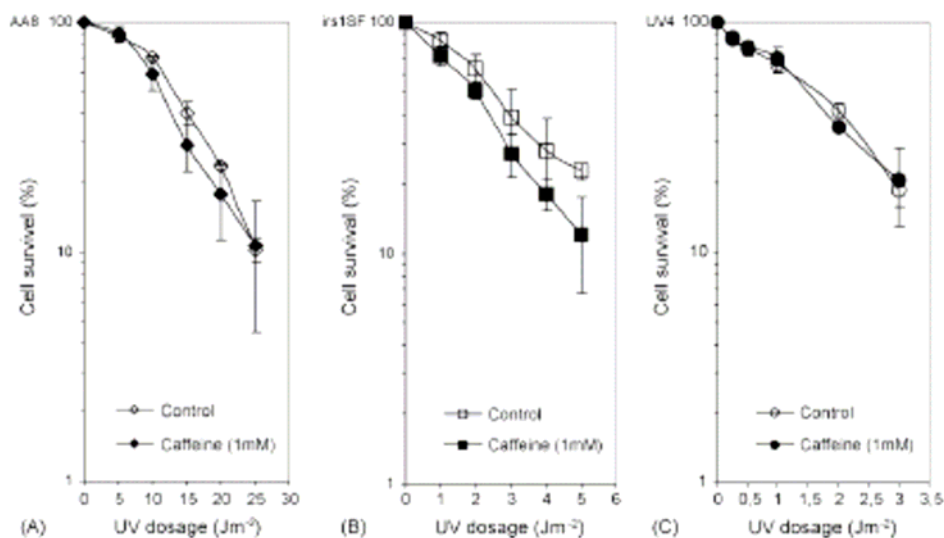


Fig.4: Saggio di sopravvivenza delle linee cellulari AA8 (A),*irs1SF* (B) ed UV4 (C) in seguito ad irradiazione ultravioletta in presenza o assenza di caffeina.

La caffeina aumenta l'apoptosi indotta dalle radiazioni ultraviolette nella linea cellulare parentale.

La frequenza dell'induzione del processo apoptotico, in seguito ad irradiazione ultravioletta, è stata studiata in presenza o assenza di caffeina .

Come riportato in fig.5 la caffeina da sola non ha nessun effetto in termini di induzione di apoptosi in entrambe le linee cellulari, AA8 ed irs1SF.

Le due linee cellulari AA8 ed irs1SF sono state irradiate a dosi differenti di radiazioni ultraviolette, 8 J/m² e 2 J/m². L'induzione del processo apoptotico causato dei raggi UV è risulta significativa in entrambe le linee cellulari, tale effetto è accentuato dal trattamento con la caffeina solo nella linea parentale e non in quella mutata nella ricombinazione omologa. Tali risultati suggeriscono che la caffeina combinata con un difetto nella proteina XRCC3 non provoca un aumento della morte cellulare via apoptotica.

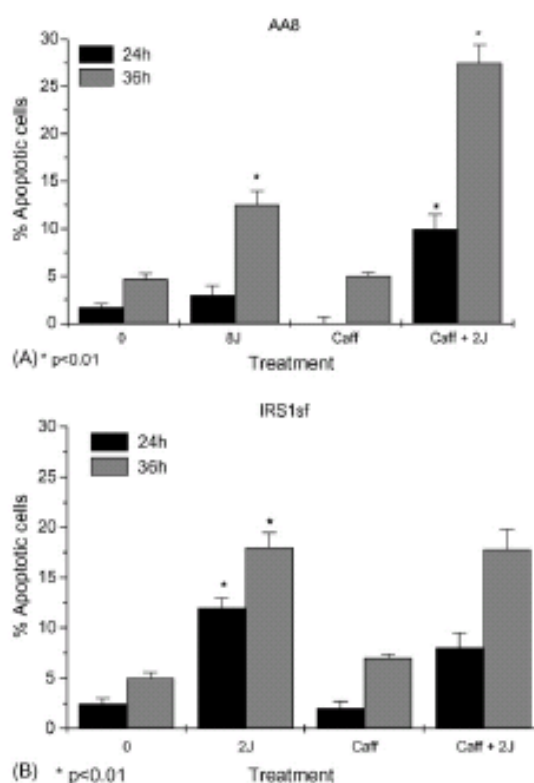


Fig.5: Induzione del processo apoptotico in seguito ad irradiazione ultravioletta in presenza o assenza di caffeina nelle linee cellulari AA8 (wild-type) ed irs1SF (XRCC3-).

La caffeina aumenta la frequenza delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi UV.

I risultati ottenuti confermano, come mostrato nella tab.1, che la caffeina aumenta la formazione delle aberrazioni cromosomiche in seguito ad irradiazione ultravioletta (Cremer C. et al. 1981; Palitti F. et al. 1983; Seguin L.R. et al. 1992). Inoltre, i dati indicano che la linea cellulare irs1SF è più sensibile in termini di induzione di aberrazioni cromosomiche della linea parentale, AA8 dopo irradiazione ultravioletta.

Il trattamento durante la fase S o G₂ del ciclo cellulare con la caffeina aumenta l'induzione di aberrazioni cromosomiche in entrambe le linee cellulari AA8 ed irs1SF, tale induzione è più marcata nella linea parentale.

Queste osservazioni suggeriscono che l'aumentata frequenza di cellule altamente danneggiate nella linea cellulare irs1SF potrebbe essere dovuta ad una saturazione del sistema di riparazione per ricombinazione omologa. Tale ipotesi è supportata dall'aumento dell'indice mitotico (MI) nella linea cellulare AA8 e dalla mancata variazione del MI nella linea irs1SF dopo raggi UV in presenza o assenza di caffeina (tab.2).

Cell Line	Cells scored	Treatment	Abnormal Cells	Chromatid Breaks	Chromatid Exchanges	Chromosomes Breaks	Chromosomes Exchanges	Total Aberr.	Highly damaged cells
AA8	100	K	0	0	0	0	0	0	0
	100	8J	22	20	6	2	0	28	2
	100	Caff	2	1	1	0	0	2	0
	100	8J+Caff (24h)	38	18	20	0	0	38	22
	100	8J+Caff (G2)	42	14	12	32	2	60	10
IRS1sf	100	K	38	24	14	22	4	64	1
	100	2J	78	70	80	34	0	184	12
	100	Caff	46	34	24	22	1	81	0
	100	2J+Caff (26h)	82	48	100	28	0	176	24
	100	2J+Caff (G2)	84	74	76	36	0	186	18

Tab.1: Aberrazioni cromosomiche indotte dopo irradiazione ultraviolette in presenza o assenza di caffeina nelle linee cellulari AA8 ed irs1SF.

MITOTIC INDEX

Cell line	Treatment	IM
AA8	K	4,8
	8J	4,7
	Caff	4,9
	8J+Caff	6,6
	8J+Caff(G2)	8,74
Irs1SF	K	5,87
	2J	4,58
	Caff	5,48
	2J+Caff	5,88
	2J+Caff(G2)	5,39

Tab.2: Indice mitotico dopo irradiazione ultravioletta in presenza o assenza di caffeina (1mM) nelle linee cellulari AA8 ed irs1SF.

Discussione

Le lesioni indotte al DNA dalle radiazioni ultraviolette se non riparate in maniera efficiente, determinano il blocco della progressione della replicazione del DNA, e possono quindi generare instabilità genetica. Esistono due meccanismi di riparazione differenti coinvolti nella riparazione della lesione: il “Translesion DNA synthesis (TLS)” e il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR) (Lehmann A.R. et al.1974; Park S.D. et al.1979). La caffeina è nota per essere un inibitore della riparazione post-replicativa, un processo che sembra essere correlato sia al TLS che all’HR (Lehmann A.R. et al.2000). Noi abbiamo studiato l’influenza della caffeina sulla replicazione del DNA in seguito ad irradiazione ultravioletta su linee cellulari deficienti per il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER) e per il sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR). Studi precedenti, condotti da Johnsson e collaboratori (2003) hanno dimostrato che i raggi UV causano l’arresto della forza replicativa nelle linee cellulari difettive per il NER o HR.

Noi abbiamo trovato che la caffeina provoca un addizionale ritardo dell’allungamento della forza replicativa, sia in cellule mutate per XRCC3 e ERCC1 che parentali, se confrontate con la sola irradiazione ultravioletta (fig.1). Queste osservazioni suggeriscono che la caffeina influenza una via di riparazione attiva in tutte e tre le linee cellulari e distinta dal NER e dall’HR.

Inoltre, noi troviamo che il conseguente trattamento con la caffeina riduce il livello delle mutazioni indotte dalle radiazioni ultraviolette nella linea cellulare parentale (fig.2). Una riduzione simile è stata osservata quando la polimerasi ζ , coinvolta nella sottovia “error-prone” del TLS, risulta essere bloccata da un RNA-antisense (Li Z. et al. 2002). Al contrario, in cellule derivate dai pazienti affetti da xeroderma pigmentosum di fenotipo variante, è stato osservato che l’aumento delle mutazioni in seguito ad irradiazione ultravioletta è dovuto ad una deficienza nella polimerasi η (Masutami C. et al. 2000). Quindi questi risultati suggeriscono che, nelle cellule di mammifero, il TLS potrebbe essere la via più importante che determina l’induzione di mutazioni in seguito a trattamento con i raggi UV.

Se le lesioni indotte dalle radiazioni ultraviolette non sono oltrepassate in modo efficiente dal TLS in presenza di caffeina, possono essere superate dall’HR.

Questa spiegazione, è supportata dall'aumento della ricombinazione omologa RAD51-dipendente, che noi abbiamo osservato in presenza di caffeina (fig.3).

I risultati ottenuti possono essere spiegati solamente ipotizzando un cambiamento nel sistema di riparazione impiegato nel superare la lesione indotta da UV in seguito a trattamento con caffeina.

Tale ipotesi è supportata dall'osservazione sia di un aumentato numero di SCE's (Tohda H. et al.1988; Cleaver J.E et al.1999), che di aberrazioni cromosomiche (tab.1) indotte dagli UV in presenza di caffeina, suggerendo quindi il coinvolgimento dell'HR piuttosto che del TLS.

Come ulteriore conferma, è stato dimostrato che la deficienza nel TLS dei CPDs nelle cellule umane XPV determina sia un aumento dei livelli di ricombinazione omologa RAD51-RAD50 dipendente (Limoli C.L. et al.2005), sia un elevato livello di SCE's (Tohda H. et al.1988;Cleaver J.E. et al. 1999; Afzal V. et al. 1995). Inoltre è stato osservato che cellule XPV irradiate con UV hanno una rallentata attività di resintesi delle gaps, formatesi in seguito all'attività di incisione del NER, rispetto alle cellule normali, effetto amplificato in presenza di caffeina (Park S.D. et al. 1979; Lehmann A.R. et al. 1975; Fujiwara Y. Et al. 1976; Cleaver J.E. et al. 1979; Arlett C.F. et al. 1975). Queste osservazioni suggeriscono che un malfunzionamento del TLS provoca l'arresto della forza replicativa, la quale è risolta da un processo di ricombinazione omologa RAD51-dipendente. L'effetto della caffeina sembra minare il fenotipo XPV producendo un aumentato livello di SCE's, HR e aberrazioni cromosomiche.

La via di ricombinazione omologa RAD51-dipendente risulta essere importante per la promozione della sopravvivenza cellulare in seguito al trattamento con radiazioni ultraviolette, prevenendo l'arresto della forza replicativa responsabile della formazione delle aberrazioni cromosomiche. Nella linea cellulare irs1SF, difettiva nel sistema di riparazione HR , l'inibizione del TLS necessaria a "bypassare" la lesione è attesa essere letale. Infatti la caffeina diminuisce la sopravvivenza cellulare di questa linea cellulare in seguito ad irradiazione ultravioletta (fig.4) ma non ha effetto sull'induzione del processo apoptotico (fig.5).

A causa della perdita del check-point cellulare nella fase G₂ del ciclo cellulare (Hinz J.M. et al.2003) (tab.2), la linea cellulare difettiva per la proteina XRCC3 appare essere più sensibile agli eventi di miss-riparo del DNA danneggiato

durante la fase S del ciclo cellulare, come dimostrato dalla formazioni di aberrazioni cromosomiche complesse che si riflette sull'aumentato numero di cellule altamente danneggiate (tab.1).

I risultati ottenuti, indicano che la risposta delle cellule di mammifero al danno al DNA indotto dai raggi UV coinvolge numerose vie di riparo come mostrato nella fig.6.

Il danno al DNA se non riparato determina o l'arresto o il ritardo dell'avanzamento della forza replicativa. Precedentemente è stato dimostrato che il "translesion repair synthesis" è più veloce rispetto alla ricombinazione omologa nell'oltrepassare le lesioni indotte al DNA (Johnasson F. et al.2003). I nostri dati suggeriscono che la conseguenza biologica dell'attivazione del TLS è la mutazione mentre il risultato dell' induzione del processo di ricombinazione omologa sono le aberrazioni cromosomiche.

Il meccanismo con il quale venga attivato il TLS invece che l'HR in seguito al danno al DNA indotto dalle radiazioni ultravioletta è ancora sconosciuto, ma possiamo ipotizzare che dipenda dal tipo di danno al DNA presente, dalla natura delle polimerasi del TLS coinvolte e/ o da altri sensori che possono riconoscere strutture differenti dell'arresto della forza replicativa. Un buon candidato sembra essere l'attivazione della via ATR/Chk1/Rad18/Rad6 coinvolta nel processo di monoubiquitinazione di PCNA (Bi X. et al. 2006; Hirano Y. Et al.2006), che determina il cambiamento di scelta della polimerasi coinvolte nel TLS. Noi suggeriamo che la caffeina inibisce la "translesion DNA synthesis" causando l'attivazione del sistema di riparazione per ricombinazione omologa per "bypassare" il danno indotto dai raggi UV.

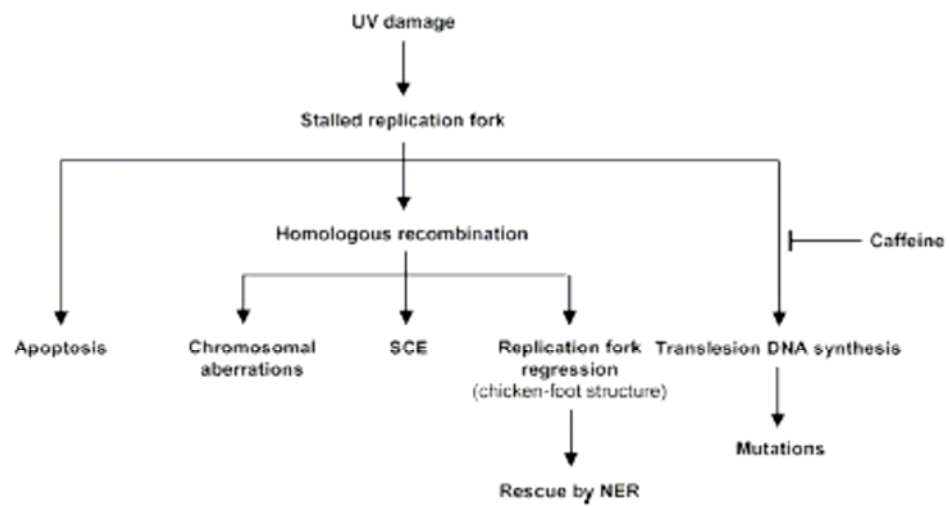


Fig. 6: Possibili vie di riparo coinvolte nella ripresa dell'arresto della forza replicativa come conseguenza del danno indotto dai raggi ultravioletti e la loro possibile conseguenza biologica

Importanza di fotolesioni alternative ai dimeri di pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodotto (6-4PP) nell'induzione dell'instabilità cromosomica.

INTRODUZIONE

L'irradiazione ultravioletta induce principalmente due tipi di danno al DNA: i dimeri di pirimidina (CPDs) e i 6-4 fotoprodotto (6-4PP). I CPDs rappresentano la lesione predominante, costituendo circa il 65-80% delle lesioni totali (Friedberg et al. 1995). Il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER) è uno dei più importanti meccanismi cellulari che si occupa della rimozione delle lesioni ingombranti presenti sul DNA, come ad esempio quelle indotte dal cis-platino e dall'irradiazione ultravioletta.

Questo tipo di lesioni, se non riparate o se non lo sono in maniera efficiente, interferiscono con le normali attività metaboliche del DNA, causando l'induzione di mutazioni, aberrazioni cromosomiche e morte cellulare.

La drammatica conseguenza di un difetto del NER è sottolineata dall'esistenza di sindromi umane ereditarie, come ad esempio, lo Xeroderma Pigmentosum (XP) e la Sindrome di Cockayne (CS).

I pazienti CS ed XP sono caratterizzati da una estrema fotosensibilità alle radiazioni solari, da anomalie dello scheletro, da neurodegenerazione ed invecchiamento precoce.

Nel caso di XP, esistono sette gruppi di complementazione (A-G). Molte delle proteine che complementano il difetto nella riparazione per escissione di nucleotidi (NER) partecipano nelle fasi di riconoscimento ed incisione del danno al DNA (Wood R.D 1997).

Per CS, sono stati identificati due gruppi di complementazione (A-B) e i corrispondenti geni sono stati clonati (Troestra C. et al. 1992).

Entrambi i geni CS sono componenti di una sottovia di riparazione del NER, il transcription coupled repair (TCR). Il TCR è responsabile della rimozione veloce delle lesioni al DNA dal filamento trascritto dei geni attivi (Mellon I. et al. 1987) e della resistenza cellulare in seguito ad irradiazione ultravioletta; sembra essere quindi, questa la causa dell'estrema sensibilità agli effetti citotossici dei raggi UV delle cellule CS. Sensibilità resa evidente dalla loro incapacità nel riprendere la replicazione e la trascrizione in seguito ad induzione del danno.

La mancata funzionalità del TCR sembra, inoltre, essere correlata all'induzione del processo apoptotico nelle CS in seguito ad irradiazione ultravioletta (Ljungmann M. et al. 1996; Ljungmann M. et al. 1999; Balajee A.S. et al. 2000), grazie alla quale queste, contrariamente alle XP, risultano essere protette dallo sviluppo di tumori (Cleaver J.E. et al. 1999).

Studi precedenti (Proietti de Santis L. et al. 2001), hanno osservato un'elevata induzione di aberrazioni cromosomiche e apoptosi dopo irradiazione ultravioletta nella linea cellulare di hamster cinese UV61, omologa alla sindrome di Cockayne umana, rispetto alla linea parentale. Queste due linee cellulari risultano proficienti nella riparazione del 6-4 fotoprodotto in tutto il genoma, ma differiscono nella rimozione dei CPDs. La linea cellulare AA8 risulta essere proficiente nella riparazione dei 6-4 PP in tutto il genoma e in quella dei CPDs nel filamento trascritto dei geni attivi ma non nel resto del genoma (Thompson et al. 1989; Lommel and Hanawalt 1991; Orren et al. 1996). Sebbene la linea cellulare AA8 non possa rimuovere i CPDs nelle regioni inattive del loro genoma, risulta essere relativamente resistente alle radiazioni ultraviolette. La linea cellulare UV61 è mutata nel gene CSB di hamster omologo a quello umano (Troelstra et al. 1990; Troelstra et al. 1992), ha una sensibilità intermedia ai raggi UV, ed è normale nella riparazione dei 6-4 PP ma deficiente nel "transcription couple-repair" dei CPDs dei geni attivi (Thompson et al. 1989; Lommel and Hanawalt 1991; Orren et al. 1996). Una differenza così minima nella riparazione dei CPDs, circa il 5-8% dell'intero genoma, non può spiegare una così elevata induzione di aberrazioni cromosomiche osservata nella linea cellulare UV61 dopo raggi UV. Per tale ragione, si è ipotizzato che altri tipi di danno indotto dalle radiazioni ultraviolette, come ad esempio gli interstrand cross-links (ICLs) (Marmur J. et al. 1961), avessero potuto contribuire all'instabilità cromosomica delle cellule CS.

In questa tesi, abbiamo analizzato l'effetto di un noto induttore di ICLs, la mitomicina C (Noll M.D. et al. 2006), su cellule difettive per il NER e per il TCR attraverso lo studio di parametri citogenetici e molecolari.

Da esperimenti effettuati sui batteri e sul lievito (Dronkert M.L.G. and Kanaar R. 2001), la riparazione degli ICLs è affidata a due sistemi di riparazione, il NER e l'HR, che cooperano insieme per la completa rimozione del danno indotto al DNA.

Il NER agisce facendo un incisione al 3' e al 5' dell'ICL, determinando lo sganciamento della lesione e la formazione di rotture a doppia elica sul DNA (DSBs), creando così il substrato per l'azione del sistema per ricombinazione omologa, la quale utilizzando il filamento non danneggiato come stampo ripristina l'informazione genetica. A questo punto avviene un secondo evento di escissione per eliminare l'ICL e la resintesi del tratto eliminato (McHugh P.J. et al. 2001).

Nei mammiferi il meccanismo di riparazione degli ICLs non è ben conosciuto, perché gli studi fin'ora effettuati, sono stati realizzati utilizzando saggi di citotossicità e agenti chimici differenti e diverse linee cellulari. Conseguentemente, risulta difficile comparare direttamente i risultati provenienti da esperimenti diversi; infatti i dati ottenuti sono spesso contraddittori fra di loro e di conseguenza rimane complicato formulare un modello di riparazione degli ICLs generalizzato.

Noi abbiamo studiato l'effetto della mitomicina C su linee cellulari difettive per il "Nucleotide excision repair (NER)" (ERCC2) e per il "Transcription coupled-repair (TCR)" (ERCC6), andando ad analizzare la sopravvivenza cellulare, l'induzione delle aberrazioni cromosomiche e scambi tra cromatidi fratelli, la riparazione degli ICLs tramite una modificazione del "Comet Assay", il ciclo cellulare e l'induzione del sistema di ricombinazione omologa andando a monitorare la cinetica di induzione della proteina RAD51 nel tempo in seguito a trattamento con la mitomicina C.

I dati ottenuti dimostrano un ruolo del TCR nella fase di incisione dell'ICL e un coinvolgimento diretto o indiretto della proteina CSB nell'attivazione del sistema di riparazione per ricombinazione omologa.

Materiali e metodi

Linee cellulari e condizioni di coltura.

Per lo svolgimento di questa tesi di dottorato sono state utilizzate quattro linee cellulari isogeniche di hamster cinese le AA8, le UV61, le UV5 e le irs1SF.

La linea AA8 è quella parentale e quindi proficiente nei sistemi di riparo deputati alla rimozione del danno al DNA.

La linea UV61 possiede una mutazione nella proteina ERCC6, omologa a CSB umana, e quindi risulta essere deficiente nel TCR.

La linea UV5 ha una mutazione nella proteina ERCC2, omologa a XPD umana, e quindi difettiva nel NER.

Le linee cellulari di hamster cinese sono cresciute di routine in HAM's F10 (Gibco) supplementato con il 10% di siero fetale di Bovino (Gibco), 1% di glutammina e penicillina e streptomicina (Gibco) ad una temperatura di 37°C, 95% di umidità e lo 0,5% di CO₂.

Trattamento con mitomicina C.

Le cellule sono state seminate il giorno prima del trattamento nelle fiasche per colture cellulari.

La mitomicina C, MMC, (Sigma-aldrich) è stata stoccata ad una concentrazione pari a 500 µM in acqua distillata sterile.

Il trattamento è stato effettuato in terreno di coltura completo per 1h.

Dopo il trattamento sono stati effettuati due lavaggi in PBS ed è stato nuovamente aggiunto terreno di coltura fresco.

Sincronizzazione cellule nella fase G₁ del ciclo cellulare.

Da cellule in fase di crescita sono state raccolte le mitosi per shake-off, seminate alla giusta concentrazione due ore prima del trattamento con mitomicina C, al fine di avere cellule nella fase G₁ del ciclo cellulare.

Sopravvivenza cellulare dopo trattamento con MMC.

Le linee cellulari AA8, UV61, UV5 sono state seminate ad una concentrazione pari a 500 cellule per punto sperimentale nelle piastre petri da 90 mm dove sono lasciate per 16h per far aderire le cellule.

Il giorno dopo, è stato effettuato il trattamento con l'agente chimico mutageno, la mitomicina per 1h. Le dosi utilizzate sono state 1 μ M, 2.5 μ M, 3.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M.

Dopo il trattamento le cellule sono state lavate in PBS per due volte, è stato aggiunto terreno di coltura fresco e le cellule sono lasciate crescere per 6-7 giorni in incubatore a 37°C per favorire la crescita delle colonie.

Le colonie sono poi fissate in metanolo freddo per 10 minuti e colorate con una soluzione di Giemsa al 5% per 5 minuti.

Dopo la colorazione le colonie formatesi sono state contate per analizzare la sensibilità delle linee cellulari alla mitomicina C.

Comet Assay per la determinazione degli interstrand cross-linking.

Il comet assay modificato per la determinazione degli interstrand cross-links è stato descritto in dettaglio da Spanswick e collaboratori nel 1999.

Brevemente, le cellule sincronizzate nella fase G₁ del ciclo cellulare, sono state trattate con MMC alla dose di 3.5 μ M per 1h a 37°C. Dopo il trattamento il terreno è stato aggiunto nuovamente ed incubate per differenti tempi di ripresa.

Le cellule sono state tripsinizzate e diluite in agarosio a basso punto di fusione (low melting point agarose) e sono state seminate su vetrini precedentemente gelatinizzati con agarosio all'1%.

I vetrini sono stati immersi in una soluzione di lisi contenente 10% di DMSO e l'1% di Triton X-100 per 1h a + 4°C.

Dopodiché i vetrini sono stati lavati tre volte per 5 minuti con il PBS ed incubati nuovamente in soluzione di lisi senza DMSO contenete Proteinasi K (1mg/ml) per 2h a 37°C.

Una volta incubati con la proteinasi K è stata effettuata la denaturazione per 45 minuti e la corsa elettroforetica a 26 V e 260 mA per 45 minuti.

Al termine della corsa i vetrini sono stati lavati tre volte per 5 minuti con una soluzione neutralizzate e colorate con bromuro d'etidio (20 ug/ml).

Per l'analisi dell'induzione degli interstrand cross-links sono state lette 100 cellule utilizzando il comet assay software (Perceptive Instrument Comet Assay III).

Analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dal trattamento con MMC

Per analizzare l'induzione delle aberrazioni cromosomiche indotte dal trattamento con MMC, le cellule sono state seminate ad una concentrazione pari a 3×10^5 per punto sperimentale.

Le mitosi sono state seminate due ore prima del trattamento e lasciate in incubatore per far aderire le cellule alle fiasche.

Il trattamento è stato effettuato alle dosi di $1 \mu\text{M}$ e $3.5 \mu\text{M}$ per 1h.

Dopo il trattamento sono stati fatti due lavaggi in PBS ed aggiunto nuovamente il terreno di coltura a 37°C .

Le fiasche contenenti le cellule sono state poste in incubatore per 20h per permettere alle lesioni di trasformarsi in aberrazioni cromosomiche.

Le colture cellulari sono poi trattate con una soluzione di colcemid ($2 \mu\text{g/ml}$) 2h prima del fissaggio per permettere un accumulo di metafasi. Il fissaggio è stato effettuato seguendo un protocollo standard.

Il terreno di coltura contenente le cellule tripsinizzate è stata trasferita nei tubi da centrifuga e centrifugato a $1500 \text{ rpm} \times 5'$.

Il pellet cellulare viene trattato in seguito con 5 ml di una soluzione ipotonica di Tricitrato all'1% e lasciata agire per 10 minuti.

Le cellule vengono nuovamente centrifugate a $1500 \text{ rpm} \times 5'$ e fissate con metanolo e acido acetico (3:1).

Infine, si è proceduto alla semina della sospensione sui vetrini precedentemente lavati. Una volta asciugati i vetrini vengono colorati con una soluzione di Giemsa al 3%.

L'esperimento è stato ripetuto tre volte e sono state analizzate 100 metafasi per ogni dose di MMC impiegata.

Le aberrazioni cromosomiche sono classificate secondo Savage (Savage, 1976).

La differenza delle aberrazioni cromosomiche è calcolata con il test del T di student, confrontando le aberrazioni cromosomiche tra le cellule trattate e non, così come anche tra la linea parentale e quelle difettive.

Analisi della frequenza degli scambi tra cromatidi fratelli (SCE's) indotta dalla mitomicina C.

Per analizzare l' aumento degli SCE's indotti dalla mitomicina C, le cellule sono state seminate alla concentrazione di 3×10^5 per punto sperimentale, 12h prima del trattamento è stata aggiunta la Bromodeossiridina (BrdUdR) alla concentrazione 6µg/ml. Le dosi di MMC utilizzate sono 1 e 3.5 µM.

Dopo il trattamento è stata messo nuovamente il terreno di coltura fresco e le cellule sono lasciate crescere per altre 12h in incubatore.

Le colture cellulari sono poi trattate con una soluzione di colcemide (2 µg/ml) 2h prima del fissaggio per permettere un accumulo di metafasi. Il fissaggio è stato effettuato seguendo un protocollo standard.

Il terreno di coltura contenente le cellule tripsinizzate è stata trasferita nei tubi da centrifuga e centrifugato a 1500 rpm x 5'.

Il pellet cellulare viene trattato in seguito con 5 ml di una soluzione ipotonica di Tricitrato all'1% e lasciata agire per 10 minuti.

Le cellule vengono nuovamente centrifugate a 1500 rpm x 5' e fissate con metanolo e acido acetico (3:1). Infine, si è proceduto alla semina della sospensione sui vetrini precedentemente lavati.

I vetrini seminati sono lasciati invecchiare per una notte in stufa a 42°C.

Successivamente i vetrini vengono immersi in una soluzione di Hoescht (HO) al 4% per 25 minuti al buio. Una volta trascorso questo tempo, i vetrini immersi in acqua vengono posti sotto una lampada solare per 20 minuti per permettere la reazione dell'HO e della BrdUdR.

In seguito i vetrini vengono colorati con una soluzione di Giemsa al 3% per 10 minuti e lasciati asciugare.

L'esperimento è stato condotto per tre volte e per ogni punto sperimentale sono state lette 50 metafasi.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il t-student test.

Analisi citofluorimetrica della progressione del ciclo cellulare e induzione del processo apoptotico dopo trattamento con MMC

Le cellule vengono seminate il giorno prima nelle piastre petri da 90 mm. Il trattamento è stato effettuato alla dose di 3,5 μ M per 1h.

Dopo il trattamento sono stati effettuati due lavaggi in PBS ed è stato nuovamente aggiunto il terreno di coltura e fissate a tempi differenti (0, 24h, 48h).

Le cellule vengono tripsinizzate e fissate in metanolo:acetone diluito 1:1.

Dopo il fissaggio, la sospensione cellulare è stata lavata con il PBS ed è stato aggiunto ioduro di propidio (1mg/ml) e lasciato incubare per 20 minuti a temperatura ambiente ed al buio, poi i campioni sono stati letti al FACS.

Analisi della cinetica di induzione della proteina RAD51 dopo trattamento con mitomicina C mediante western blotting.

Le cellule sono state seminate il giorno prima del trattamento nelle piastre petri da 140 mm. Il trattamento con la MMC (3.5 μ M) è stato effettuato pre 1h in terreno completo.

Alla fine del trattamento sono stati effettuati due lavaggi in PBS ed è stato nuovamente aggiunto terreno di coltura completo.

Le cellule sono recuperate a differenti tempi di ripresa (4h, 8h, 16h, 24h) tramite “scraping”.

La sospensione cellulare è stata centrifugata per 10' a 2500 rpm. Il supernatante è stato aspirato ed il pellet è stato sospeso in 100 μ l di soluzione di lisi (20 mM Hepes, 20% glicerol, 500 mM di NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% NP40, PIC) per 10 in ghiaccio.

La sospensione è stata centrifugata per 10' a 11000 rpm a 4°C. Il supernatante è stato raccolto e posto in eppendorf e congelato in azoto liquido.

I campioni sono stati messi a -80°C dove possono essere conservati per un mese.

Dopo aver fatto misurare le proteine, è stata effettuata la corsa caricandone 50 μ g per punto sperimentale.

Le proteine sono state fatte correre su un gel di poliacrilammide all'8% a 120 V 89 mA per 2h. Il blotting è stato effettuato per 45' sempre a 120 V e 289 mA in ghiaccio.

Dopo il blotting le membrane sono incubate per 30' in milk ed incubate tutta la notte con l'anticorpo Anti-Rad51 made in rabbit (oncogene) diluito 1:100, B-tubulina made in mouse diluito 1:2000 in milk.

Inseguito all'incubazione con l'anticorpo primario sono stati effettuati tre lavaggi di 5' in PBS/Tween 20 allo 0,05% e le membrane sono state nuovamente incubate con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi per 45'.

Sono stati effettuati tre lavaggi in PBS/Tween20 allo 0,05% e si è proceduto allo sviluppo della membrana.

Risultati

Saggio clonogenico dopo trattamento con MMC.

Le linee cellulari AA8 , UV61 ed UV5 sono state trattate con differenti dosi di mitomicina C ed è stato effettuato un saggio clonogenico in triplice copia per saggiare la sopravvivenza cellulare.

Le linee cellulari UV61 ed UV5 mostrano una percentuale di sopravvivenza ridotta rispetto alla linea parentale dopo il trattamento per 1h con la mitomicina C (Fig.1).

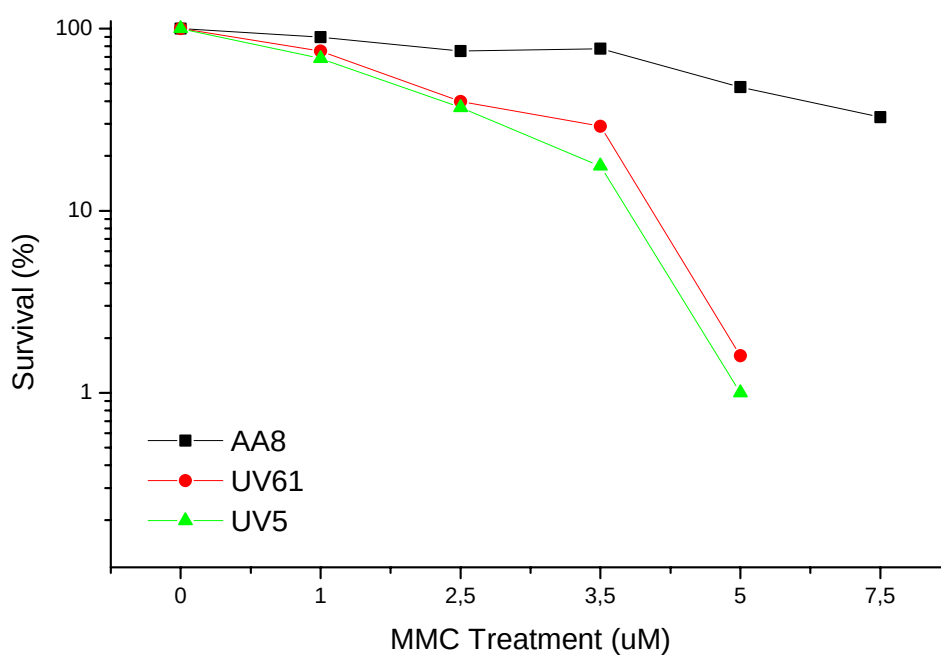
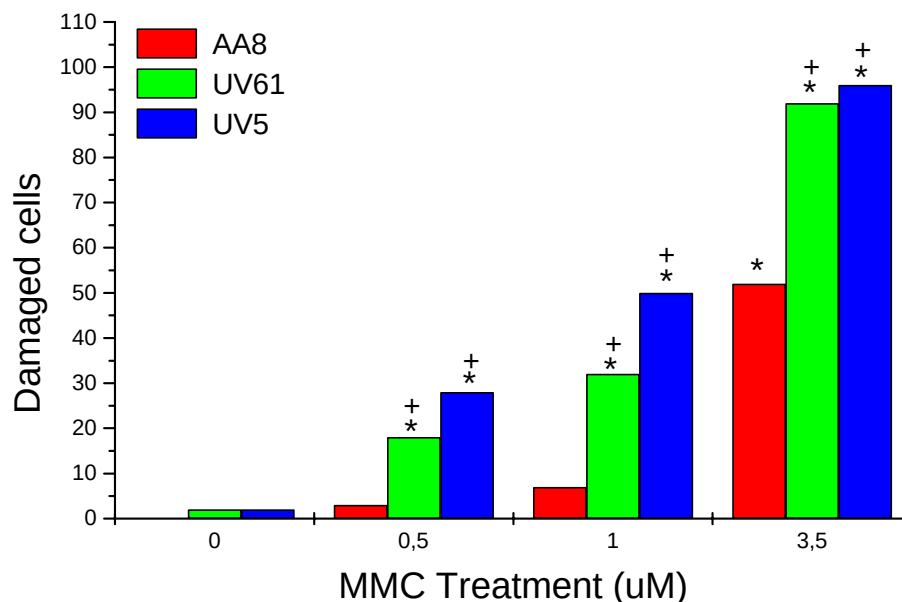


Fig.1: Sensibilità delle linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 dopo trattamento con MMC.

Aberrazioni cromosomiche indotte dalla mitomicina C.

Le linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 sono state trattate con differenti dosi di mitomicina C per 1h ed analizzate 18h dopo il trattamento per la presenza di danno cromosomico.

I risultati evidenziano una maggiore sensibilità delle linee cellulari UV61 ed UV5 rispetto alla linea parentale AA8 sia in termini di percentuale di cellule danneggiate sia nel totale di aberrazioni cromosomiche (Fig.3). Questi dati suggeriscono che l'induzione dell'instabilità cromosomica osservata, nelle linee cellulari UV61 ed UV5 in seguito a trattamento con MMC, potrebbe essere causata dalla persistenza della lesione inalterata durante la fase S del ciclo cellulare.



* $p < 0,01$ statistically significant AA8 vs UV61, UV5
+ $p < 0,01$ statistically significant 0 vs treated

Fig.3: Incremento delle aberrazioni cromosomiche nelle linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 dopo trattamento con MMC.

Analisi danno primario tramite “Comet Assay”

Per verificare se l'instabilità cromosomica e la sensibilità alla MMC osservata nelle UV61 e nelle UV5, potesse essere dovuta ad una alterazione nello step di incisione della riparazione degli ICLs, svincolato dalla replicazione del DNA, abbiamo analizzato gli ICLs indotti dalla MMC in cellule AA8, UV61 e UV5 sincronizzate nella fase G₁ del ciclo cellulare.

A tal fine è stata utilizzata la tecnica del comet assay in cui il protocollo standard è stato modificato ed adattato all'analisi di questo tipo di lesione (Spanswick V .J et al.).

Sono state utilizzate condizioni di denaturazione ed elettroforetiche tali da provocare una pronunciata e spontanea migrazione del DNA osservabile come un tail moment (TM) elevato, mentre la presenza di ICLs, ostacolando la denaturazione, causa un ritardo nella migrazione elettroforetica riflettendosi in un accorciamento del TM. La riduzione del TM sarà dunque proporzionale al livello degli ICLs indotti. L'attività di incisione invece appare come ripristino del tail moment e tanto più efficiente sarà tale funzione tanto maggiore sarà il valore del TM osservato.

I risultati ottenuti ci indicano una riduzione del TM a tempo zero, simile in tutte e tre le linee cellulari utilizzate, mentre solo nella linea parentale AA8 dopo 6h dal trattamento risulta essere capace di riportare il TM a valori elevati.

Questi risultati suggeriscono una incapacità di incisione al livello degli ICLs nelle cellule TCR/NER difettive (Fig.2).

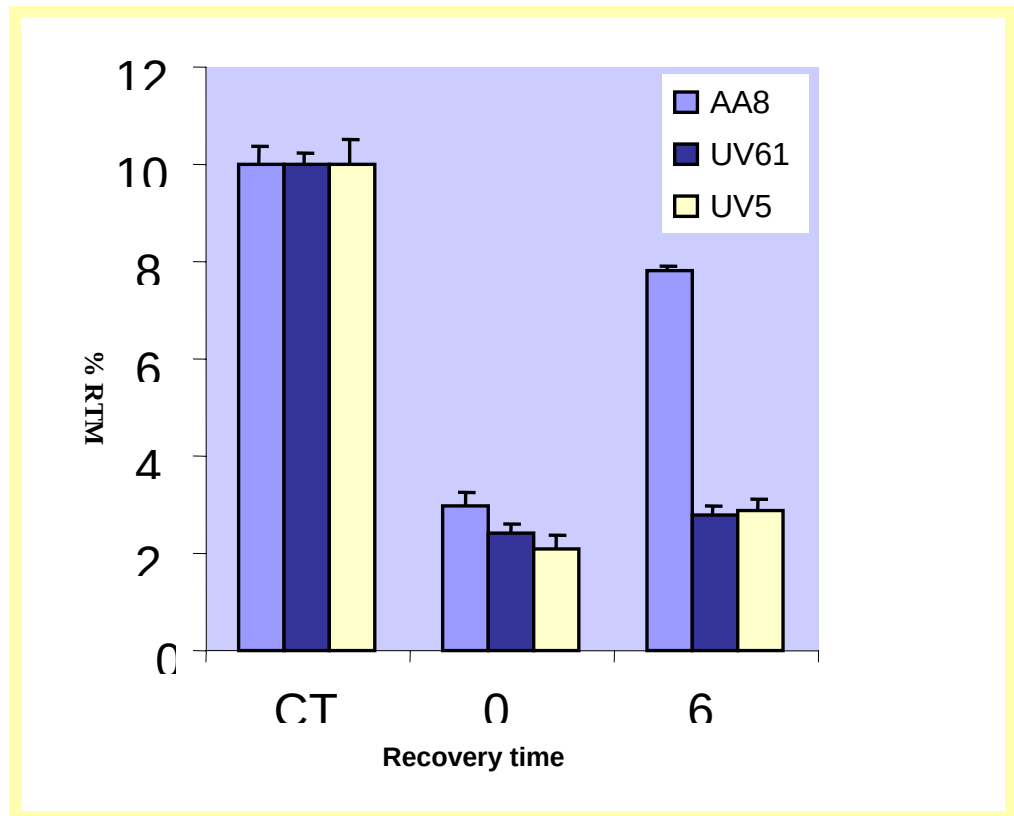


Fig.2: Analisi “Comet Assay” dopo trattamento con MMC (3.5 uM)

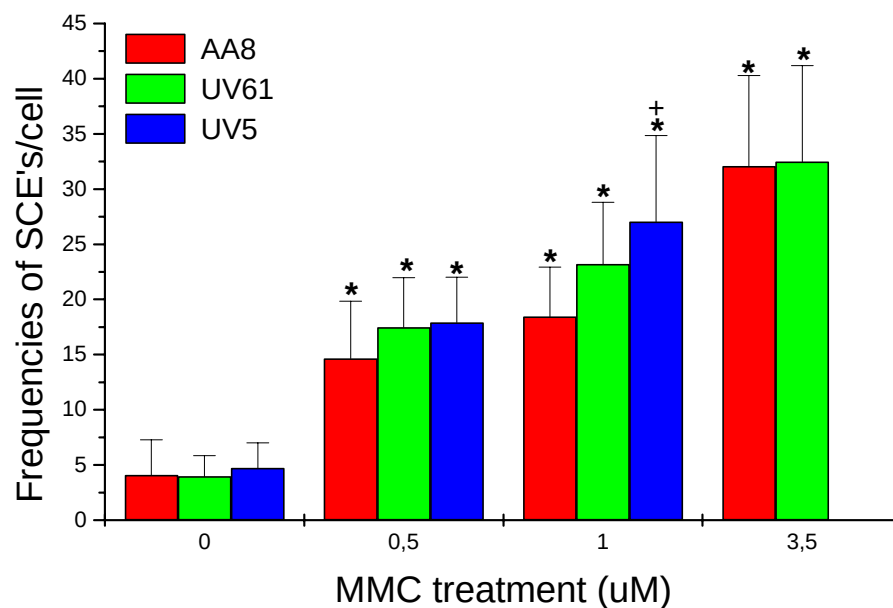
Induzione di scambi tra cromatidi fratelli (SCE's) in seguito a trattamento con MMC.

Le linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 sono state sottoposte a trattamento con mitomicina C a differenti dosi.

L'analisi per l'induzione degli SCE's è stata effettuata a 24h dal trattamento con l'agente induttore di ICLs.

I risultati riportati in fig.4 mostrano un incremento dose dipendente della frequenza di SCE's statisticamente significativo in tutte e tre le linee cellulari analizzate.

Non esiste invece una differenza statisticamente significativa tra AA8 e le linee mutate UV61 e UV5, sebbene l'indice di proliferazione si abbassa notevolmente nelle UV61 e UV5 rispetto alle AA8.



* Statistically significant $p < 0,001$ (Student's t-test) vs Control

+ Statistically significant $p < 0,001$ (Student's t-test) AA8 vs UV61 and UV5

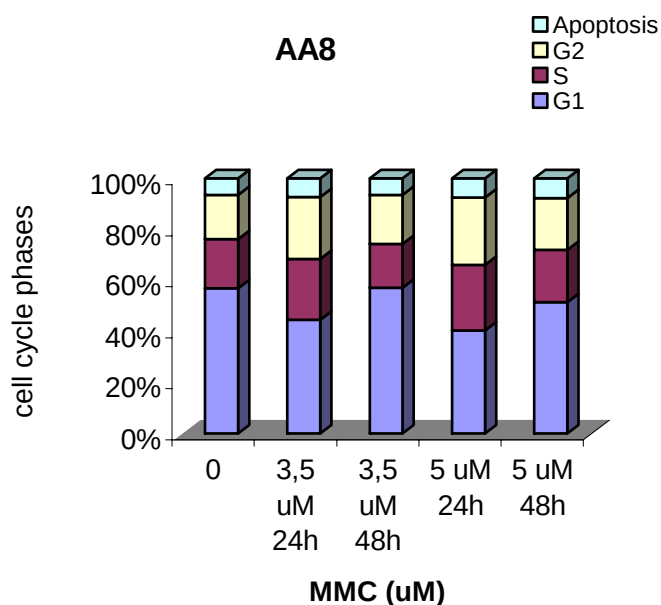
Fig.4: Induzione di SCE's nelle linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 dopo trattamento con MMC.

Analisi ciclo cellulare dopo trattamento con MMC.

Le linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 sono state trattate per 1h con MMC a differenti dosi (3.5 e 5 uM).

Dopo 24h e 48h dal trattamento sono state fissate ed analizzate tramite colorazione con ioduro di propidio (PI) al citofluorimetro.

L'analisi al citofluorimetro ha evidenziato un blocco nella fase G₂/M del ciclo cellulare nelle linee cellulari mutate per il NER- (UV5) e per il TCR- (UV61) a 24h dal trattamento con MMC. Dopo 48h dal trattamento la percentuale di cellule in G₂/M risulta essere minore e si osserva la comparsa di una cospicua presenza di cellule apoptotiche. Questi risultati suggeriscono un arresto del ciclo cellulare indotto da MMC in cellule difettose nel NER/TRC, suggerendo un ruolo diretto o indiretto di tali sistemi di riparazione nella riduzione della lesione (Fig.5).



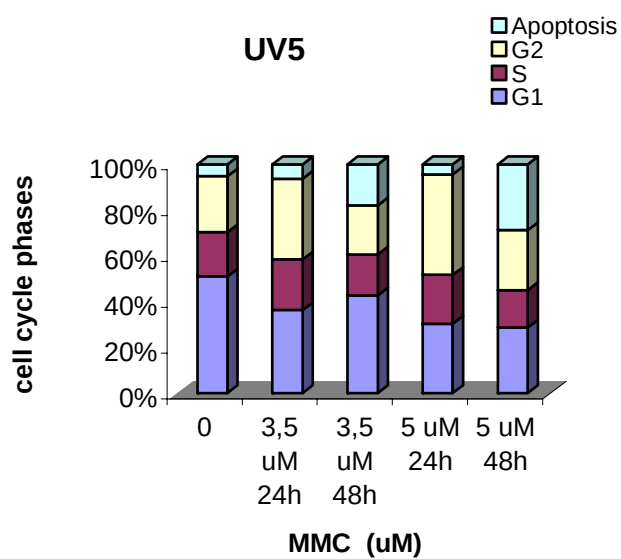
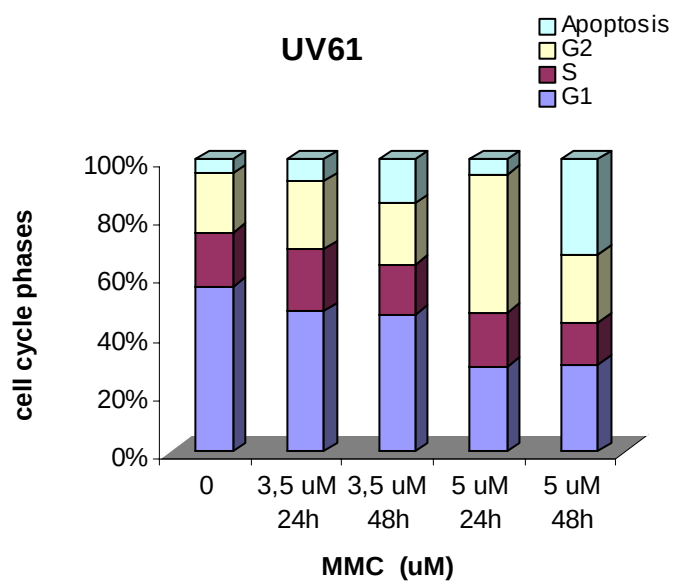


Fig.5: Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare nelle linee cellulari AA8,UV61 ed UV5 dopo trattamento con MMC.

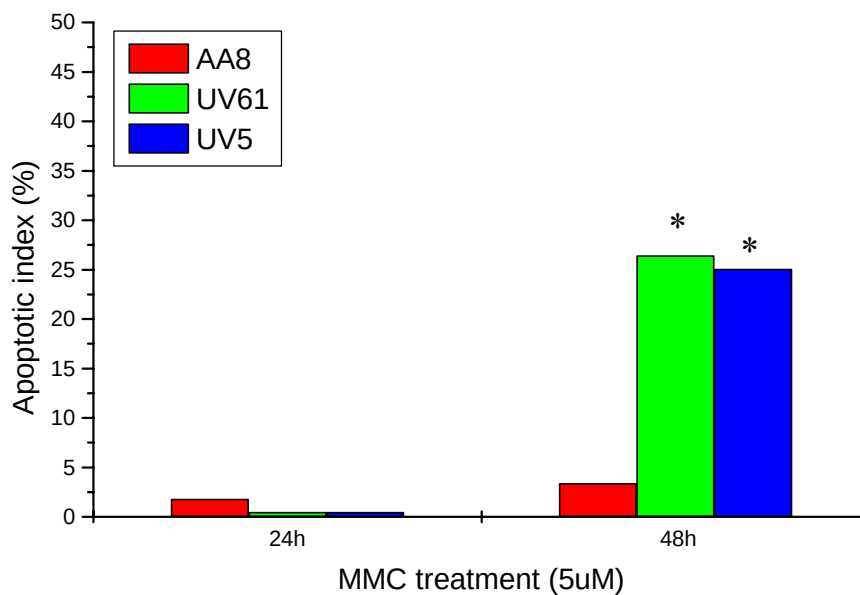
Induzione di apoptosi dopo trattamento con MMC.

Le tre linee cellulari AA8, UV61 ed UV5 sono state trattate per 1h con MMC alla dose di 5 μ M.

L'analisi dell'induzione del processo apoptotico è stata effettuata dopo 24 e 48h dal trattamento.

L'apoptosi è stata analizzata al citofluorimetro attraverso la valutazione del picco ipodiploide.

I risultati mostrati in fig.6 indicano un' induzione del processo apoptotico dopo 48h dal trattamento solo nelle linee cellulari UV61 ed UV5 e la presenza di cellule apoptotiche sembra essere strettamente correlata all'incapacità di queste di riprendersi dal blocco nella fase G₂/M del ciclo cellulare. Tale incremento è risultato significativo rispetto alla linea parentale AA8.



P<0,01 Statistically significant AA8 vs UV61, UV5

Fig.6: Induzione del processo apoptotico in seguito a trattamento con MMC

Induzione della proteina RAD51 in seguito a trattamento con mitomicina C.

Le linee cellulari AA8 ed UV61 sono state trattate con MMC (3.5 uM) per 1h e analizzate a differenti tempi con la tecnica del western blotting per saggiare l'espressione della proteina RAD51, marker di ricombinazione omologa.

I risultati mostrano un' induzione della proteina RAD51 in entrambe le linee cellulari AA8 e UV61.

Tale incremento risulta essere molto maggiore nella linea parentale (AA8) rispetto a quella mutata UV61 (TCR-) (fig.7).

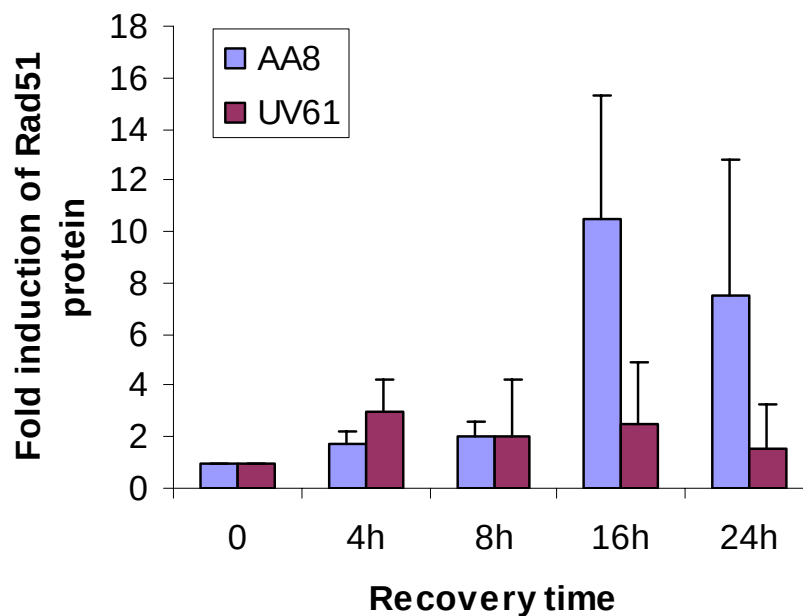


Fig.7: Induzione maggiore della proteina Rad51 nella linea wild tipe AA8 rispetto alla linea mutata UV61 in seguito a trattamento con MMC.

Discussione

Il preciso meccanismo con cui le cellule di mammifero riparano gli interstrand cross-links (ICLs) è ampiamente sconosciuto, sebbene si pensi siano coinvolti il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER) e la riparazione per ricombinazione omologa (HR) come in *S. Cerevisiae* e in *E.coli* (Dronkert and Kanaar 2001).

La maggior parte degli studi sulla riparazione degli ICLs nelle cellule di mammifero è stata condotta usando differenti saggi, substrati e linee cellulari diversi, di conseguenza, è difficile confrontare direttamente i dati presenti in letteratura, che spesso risultano contraddittori. Per queste ragioni, a tutt'oggi, non è stato possibile generalizzare un meccanismo di riparazione per gli ICLs in cellule di mammifero.

Diversi sono i modelli di sistemi di riparazione proposti per la rimozione di tali lesioni, seppur differendo tra loro per le diverse proteine coinvolte risultano tutti essere accomunati dal coinvolgimento di proteine appartenenti al NER e all'HR e dal fatto di procedere attraverso differenti step: incisione, intervento della riparazione per ricombinazione omologa, evento di escissione e resintesi (review corta).

Lo step di incisione sembra essere necessario per lo sganciamento della doppia elica del DNA nella regione circostante il danno. Essa avviene ad opera dell'esonucleasi ERCC1-XPF che taglia in direzione 5'-3' nella regione antistante la lesione. In questa fase il probabile coinvolgimento di altre proteine del NER non risulta ancora chiaro.

Ad esso segue l'intervento dell'HR, volto al riempito della gap generata in seguito al taglio dell'esonucleasi. Le proteine coinvolte in questo step sembrano essere XRCC2, XRCC3 e RAD51.

Infine, segue una seconda incisione, mirata alla completa eliminazione del danno processato e presente ora solo su un filamento di DNA ad opera di enzimi del NER.

Cellule di ovario di hamster cinese (CHO) che sono deficienti in proteine coinvolte nel NER e nell'HR possono essere considerate degli ottimi sistemi sperimentali di studio per la comprensione dell'importanza di questi sistemi di riparazione nell'eliminazione degli ICLs.

In questa tesi di dottorato abbiamo studiato il ruolo del NER/TCR nella rimozione del danno al DNA provocato dalla mitomicina C utilizzando cellule di ovario di hamster cinese isogeniche AA8, UV61 e UV5. Le cellule AA8 rappresentano la linea parentale con un TCR e NER funzionante, mentre le UV61 e le UV5 sono rispettivamente deficienti per il TCR ed il NER.

L'importanza di queste vie di riparazione nella rimozione degli ICLs è sottolineata dai risultati ottenuti con la sopravvivenza cellulare. Le cellule UV61 ed UV5 sono risultate più sensibili alle dosi di mitomicina C (MMC) utilizzata in termini di sopravvivenza cellulare rispetto alla linea parentale. Tale sensibilità correla positivamente con l'aumento delle aberrazioni cromosomiche osservate nelle stesse linee cellulari.

I nostri dati indicano chiaramente che l'induzione di danno cromosomico avviene in assenza di un NER/TCR funzionante e sono in accordo con i dati molecolari ottenuti da Islas e collaboratori (1994) i quali dimostrano l'esistenza di una riparazione preferenziale, in termini di tempo e di efficienza, degli ICLs presenti nelle regioni trascritte del genoma rispetto a quelle non trascritte. Inoltre, una maggiore formazione di delezioni cromosomiche indotte da un noto agente di ICLs, lo psoralene, è stata osservata in cellule di hamster cinese deficienti nella funzione del NER/TCR (Richards S. et al. 2005).

Tuttavia altri composti induttori di ICLs, come ad esempio la 4-idroperossiciclofosfamide e la mostarda azotata saggiata su cellule di hamster cinese difettive nel NER/TCR hanno mostrato solamente una lieve sensibilità al trattamento (Andersson B et al. 1996), sottolineando ancora una volta che il ruolo del NER-TCR nei mammiferi rimane irrisolto.

Diversi dati presenti in letteratura lasciano presupporre che le forche di replicazione bloccate o rotte dalla presenza di ICLs rappresenterebbero un substrato per il complesso ERCC1-XPF (32 triplex). Nelle cellule proliferanti l'attività di ERCC1-XPF a livello delle forche bloccate potrebbe oscurare i contributi offerti dall'attività del NER/TCR, i quali potrebbero avere un ruolo indipendente dalla replicazione (22 triplex). Dunque, ci siamo chiesti se i componenti del NER/TCR potessero essere coinvolti nel processamento degli ICLs del DNA genomico in assenza di replicazione. Al fine di verificare tale

ipotesi abbiamo utilizzato un saggio cellulare capace di analizzare la risposta al trattamento con la MMC in una fase del ciclo cellulare ed in un arco di tempo che preclude la replicazione. Abbiamo trattato cellule wild type (AA8) e deficienti nella proteina CSB (UV61) e XPD (UV5) con la MMC nella fase G₁ del ciclo cellulare, e misurato l'induzione di rotture al DNA genomico tramite l'utilizzo del "comet assay".

I nostri dati hanno mostrato che il tail moment raggiunge i livelli di controllo dopo 6h dal trattamento nelle cellule parentali, prima di entrare nella fase S del ciclo cellulare. Comunque, le cellule CSB e XPD difettive non hanno mostrato nessuna ripresa dell'attività di incisione nel tempo.

Questi risultati ci indicano che sia la funzione del NER che del TCR sono importanti nella risposta al trattamento con agenti induttori di interstrand cross-links e mostrano una chiara correlazione tra la capacità di incidere gli ICLs e la stabilità cromosomica.

La risposta citofluorimetrica agli ICLs indotti da MMC delle tre linee cellulari sembra non essere evidente fino all'entrata delle cellule nella fase S del ciclo cellulare e all'inizio della replicazione. Dai profili cellulari delle diverse linee trattate con differenti dosi di MMC è emerso un rallentamento del ciclo cellulare nella fase S in tutte le linee esaminate, solamente le UV61 e le UV5, hanno mostrato un blocco permanente nella fase G₂/M del ciclo cellulare se confrontati con la linea parentale. Dopo 24h dal trattamento le cellule AA8 mostrano una completa ripresa del ciclo cellulare mentre l'induzione di apoptosi è stata osservata solo in cellule UV61 e UV5.

Nell'insieme questi risultati lasciavano presupporre una cooperazione tra il sistema di riparazione per escissione di nucleotidi e la ricombinazione omologa nel mantenimento della stabilità genomica in seguito a trattamento con MMC. Al fine di verificare se il processamento della lesione in questione potesse rappresentare un substrato per l'induzione di un sistema di riparazione per ricombinazione omologa, utile al mantenimento della stabilità cromosomica, abbiamo analizzato l'induzione della proteina RAD51, un marker dell'attività del sistema di riparazione per ricombinazione omologa, dopo trattamento con MMC.

Alcuni autori, usando la tecnica del Western Blotting hanno esaminato i livelli delle proteine del riparo per ricombinazione dopo trattamento con la mostarda azotata in diverse linee cellulari umane. Essi hanno mostrato un elevato

incremento dei livelli di RAD51 e proteine accessorie al sistema di riparazione per ricombinazione omologa, come ad esempio XRCC2 e RAD52, ma nessun effetto è stato osservato per ciò che riguarda l'induzione di proteine del sistema di ricombinazione non-omologo, Ku70, Ku86 e DNA-PK, avvalorando il principale ruolo del sistema di riparazione per ricombinazione omologa ed escludendo, invece, una partecipazione di questa via di riparo nell'eliminazione del danno. (Wang Z.M et al.2001).

Al fine di verificare il coinvolgimento dell' HR nella riparazione degli ICLs indotti da MMC, abbiamo misurato i livelli delle proteina RAD51 nelle tre linee cellulari.

La linea cellulare parentale ha evidenziato un marcato aumento dei livelli della proteina RAD51 come risposta al trattamento, un così pronunciato incremento non è stato invece osservato nella linea cellulare UV61.

Questi dati suggeriscono che il NER-TCR funzionante sia necessario per la corretta induzione di un sistema di riparazione per ricombinazione omologa. Allo stesso modo Aboussekhra e collaboratori hanno mostrato in *S.Cerevisiae* l'esistenza di una connessione tra il "transcription coupled-repair" e la ricombinazione omologa nella rimozione del danno indotto dai raggi UV (Aboussekhra A. et al.2005).

Conclusioni

Durante lo svolgimento della tesi di dottorato, abbiamo studiato l'effetto delle radiazioni ultraviolette e della mitomicina C su linee cellulari isogeniche di hamster cinese difettive nel sistema di riparazione per escissione di nucleotidi (NER), nel "Transcription coupled- repair" (TCR) e nel sistema di riparazione per ricombinazione omologa (HR) tramite l'utilizzo di tecniche citogenetiche e molecolari.

Nella prima parte della tesi abbiamo analizzato il ruolo del NER e HR nella ripresa della forza replicativa dopo trattamento con raggi UV; nella seconda, invece, abbiamo studiato la riparazione degli ICLs indotti dalla mitomicina C.

I risultati ottenuti hanno dimostrato la cooperazione dei vari sistemi di riparazione, come ad esempio il NER e l'HR sia nella ripresa del blocco della forza replicativa in seguito ad irradiazione ultravioletta sia nella riparazione degli ICLs

.

Bibliografia

Aboussekhra A. and Al-Sharif I.S. Homologous recombination is involved in transcription-coupled repair of UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2005 Jun 1;24(11):1999-2010.

Adayabalam S Balajee, Luca Proietti De Santis, Robert M Brosh Jr, Rebecca Selzer and Vilhelm A Bohr. (2000). Role of the ATPase domain of the Cockayne syndrome group B protein in UV induced apoptosis.

Ahmed F.E and Setlow R.B. Excision repair in Ataxia-telengienctasia, Fanconi's Anemia, Cockayne's syndrome and bloom's Syndrome after treatment with UV light and N-acetoxy-2-acetylomine-fluorene. *Biochim.Bipophys.* (1978) 521:805-817.

Arlett CF, Harcourt SA, Broughton BC. The influence of caffeine on cell survival in excision-proficient and excision-deficient xeroderma pigmentosum and normal human cell strains following ultraviolet-light irradiation. *Mutat Res.* 1975 Dec;33(2-3):341-6.

Arnaudeau, C, Helleday, T, Jenssen, D. The RAD51 protein supports homologous recombination by an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol*, 1999. 289(5): p. 1231-8.

Barber L.J., Ward T.A., Hartley J.A. and McHugh P.J. (2005): DNA interstrand cross-links repair in the *S.Cerevisiae* cell cycle: overlapping ruoles for PSO2 (SNM1) with MutS factors and EXO1 during S-phase. *Mol Cell Biol.* 25:2297-2309.

Benson FE, Baumann P and West SC (1998): Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* 391: 401-407

Berardini M., P.L. Foster, E.L. Loechler, DNA polymerase II (*polB*) is involved in a new DNA repair pathway for DNA interstrand cross-links in *Escherichia coli*, J. Bacteriol.(1999) 181:2878-2888.

Brendel M., A. Ruhland, Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents. Mutat. Res. 133 (1984) 51–85.

Brenneman, M. A., B. M. Wagener, C. A. Miller, C. Allen, and J. A. Nickoloff.2002.XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. Mol. Cell. 10:387-395.

Brenneman,M.A., Weiss,A.F., Nickoloff,J.A. and Chen,D.J. (2000). XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat. Res.* 459, 89-97.

Brewen J.G. and Peacock W.J. The effects of tritiated thymidine on sister chromatid exchanges in a ring chromosome. Mutat. Res (1969) 7: 433-440.

Chanet R., Cassier C. and Moustacchi E. Genetic control of the bypass of mono-adducts and of the repair of cross-links photoinduced by 8-methoxypsoralen in yeast. Mutat. Res. (1985)145:145-155.

Chao C.C., Rosenstein R.B. and Rosenstein B.S. Induction of sister chromatid exchanges in ICR 2A frog cells exposed to 265-313 nm monochromatic ultraviolet wavelengths and photoreactivating light. Mutat.Res. (1985) 149:443-450.

Chaung, W, Mi, L, Boorstein, R. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. Nucleic Acids Res, 1997. 25(5): p. 992-4.

Cleaver J.A. and Bootsma D. Xeroderma Pigmentosum: Biochemical and genetic characteristic. Ann. Rev. Genet. (1975) 9: 19-38.

Cleaver , J.E. L.H. Thompson, A.S. Richardson, J.C. States, A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy, Hum. Mutat. 14 (1999) 9–22.

Citterio E., Van De Boom V., Schnitzler G., kanaar R., Bonte E., Kingston R.E., Hoejimaers J.H.J., and Vermeulen W. (2000): ATP-Dependent chromatin remodelling by the Cockayne's syndrome B DNA Repair-Transcription-Coupling factor. Molecular and Cell biology 20, 7643-7653.

Collins A.R., Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics, Mutat. Res. 293 (1993) 99–118.

Cortes F., Pinero J. and Ortiz T. Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE' by inhibitor of DNA topoisomerases. Mutat. Res. (1993) 303:71-76.

Cremer C, Cremer T, Zorn C, Zimmer J. Induction of chromosome shattering by ultraviolet irradiation and caffeine: comparison of whole-cell and partial-cell irradiation. Mutat Res. 1981 Dec;84(2):331-48.

Cui, X., M. Brenneman, J. Meyne, M. Oshimura, E. H. Goodwin, and D. J. Chen. 1999. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. Mutat. Res. 434:75-88.

Dare, E, Zhang, L-H, Jenssen, D, Bianchi, V. Characterization of mutants involving partial exon duplications in the hprt gene of Chinese hamster V79 cells. Somat Cell Mol Genet, 1996. 22(3): p. 201-10.

Dorroudi F., Targa H and Natarajan A.T. Influence of dietary carrot on cytostatic drug activity of cyclophosphamide and its main directly acting metabolite: Induction of sister chromatid exchanges in normal human lymphocytes, Chinese hamster ovary cells, and their DNA repair-deficient cell line. Mutat. Res. (1988) 198:327-335.

Drapkin R., and Reinberg D. (1994): The multifunctional TFIIH complex and transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 209-214.

Dronkert M.L.G., J. de Wit, M. Boeve, M.L. Vasconcelos, H. van Steeg, T.L. Tan, J.H. Hoeijmakers, R. Kanaar, Disruption of mouse *SNM1* causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 4553–4561.

Dronkert M.L.G. and Kanaar R. Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutat Res.* 2001 Sep 4;486(4):217-47. Review.

Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J. and Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):1013-23.

Dvir A., Conoway J.W. and Conaway R.C. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet. Dev.* (2001) 11:209-214

Egly J.M. (2001): The 14th data lecture. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS lett.* 498:124-128

Escalza P., Pinero J. And Cortes F.A standadized method for three way differential staining of plants chromosomes and the scorino of SCE per cell cycle. *Mutat. Res.* (1989) 216:203-209.

Essers J., R.W. Hendriks, S.M.A. Swagemakers, C. Troelstra, J. de Wit, D. Bootsma, J.H.J. Roelmakers, R. Kanaar, Disruption of mouse *RAD54* reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination, *Cell* 89 (1997) 195–204.

Evans L.A., Kevin M.J. and Jenkins E.C. Human sister chromatid exchange caused by methylazoxymethanol acetate. *Mutat Res.* 1977 Sep;56(1):51-8.

Fox M. The effect of post-treatment with caffeine on survival and UV-induced mutation frequencies in Chinese hamster and mouse lymphoma cells in vitro. *Mutat Res.* 1974 Aug;24(2):187-204.

Friedberg E.C., G.C. Walker, W. Siede, DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, Washington, DC, 1995.

Friedberg E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer.* (2001) 1:22-33. Review.

Futscher B.W., R.O. Pieper, W.S. Dalton, L.C. Erickson, Gene-specific DNA interstrand cross-links produced by nitrogen mustard in the human tumor cell line Colo320HSR, *Cell Growth Differ.* 3 (1992) 217–223.

Garcia-Higuera I., T. Taniguchi, S. Ganesan, M.S. Meyn, C. Timmers, J. Hejna, M. Grompe, A.D. D'Andrea, Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway, *Mol. Cell* 7 (2001) 249–262.

Ganesan AK. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol.* 1974 Jul 25;87(1):103-19.

Germann J. Bloom's syndrome. II . The phenotype of human genetic disorder predisposing to chromosome instability and cancer, in: J.german (Ed), *Chromosome and cancer* , Wiley, New York pp. 601-617.

Gibson D.A. and Prescott D.M. Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat Kangaroo cells by tritium incorporated into DNA. *Exptl. Cell Res.* (1972) 74:397-402.

Glick E, Vigna KL, Loeb LA. Mutations in human DNA polymerase ϵ motif II alter bypass of DNA lesions. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):7303-12.

Helleday T., Arnaudeau C. and Jessen D. Effects of carcinogenic agents upon different mechanism for intragenic recombination in mammalian cells. *Carcinogenesis* (1998) 19:973-978.

Henning K.A, Li L., McDaniel L.D., Reagan M.S., Legerski R., Schultz R.A., Stefanini M., Lehamman A.R., Mayne L.V., Friedberg E. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and subunit of RNA polymerase II TFIIH. *Cell* 82 (1995) 555-564.

Henriques J.A and Moustacchi E. Isolation and characterization of pso mutants sensitive to photo-addition of psoralen derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1980 Jun;95(2):273-88.

Henry-Mowatt J, Jackson D, Masson JY, Johnson PA, Clements PM, Benson FE, Thompson LH, Takeda S, West SC, Caldecott KW. XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):1109-17.

Hinz JM, Helleday T, Meuth M. Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3. *Carcinogenesis* 2003 24(2):249-253.

Hoeijmakers J.H.J Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* (2001) 413: 66-374.

Holstege F.C.P., Van der Vliet P.C., and Timmers H.T.M (1996): Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factor TFIIE and TFIIH. *EMBO J*. 15: 1666-1677

Huang JC, Svoboda PL, Reardon JT and Sabcar (1992): Human nucleotide excision nuclease remove thymine dimers by hydrolysing the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the protodimer. *Pro.Natl.Acad.Sci. USA* 89:3664-3668.

Islas A.L., J.M. Vos, P.C. Hanawalt, Differential introduction and repair of psoralen photoadducts to DNA in specific human genes, *Cancer Res.* 51 (1991) 2867–2873.

Islas A.L., F.J. Baker, P.C. Hanawalt, Transcription-coupled repair of psoralen cross-links but not monoadducts in Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry* 33 (1994) 10794–10799.

Johansson F, Lagerqvist A, Erixon K, Jenssen D. A method to monitor replication fork progression in mammalian cells: nucleotide excision repair enhances and homologous recombination delays elongation along damaged DNA. *Nucleic Acids Res.* 2004 Nov 10;32(20):e157.

Johnson RE, Kondratieck CM, Prakash S, Prakash L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science.* 1999 Jul 9;285(5425):263-5.

Johnson RE, Trincao J, Aggarwal AK, Prakash S, Prakash L. Deoxynucleotide triphosphate binding mode conserved in Y family DNA polymerases. *Mol Cell Biol.* 2003 Apr;23(8):3008-12.

Johnson RE, Washington MT, Prakash S, Prakash L. Bridging the gap: a family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12224-6.

Kato H. Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchanges. *Cancer genet. Cytogenet.* (1980) 2:69-77.

Kato H. Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exptl Cell Res.* (1974) 85:239-247.

Kato H. Induction of sister chromatid exchanges by UV-light and its inhibition by caffeine. *Exptl. Cell Res.* (1973) 82:383-390.

Killman B.A. Sister chromatid exchanges in *Vicia Faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxy-caffeine on the frequency of SCE's. *Chromosoma* (1975) 51:11-18.

Koken M.H., P. Reynolds, I. Jaspers-Dekker, L. Prakash, S. Prakash, D. Bootsma, J.H. Hoeijmakers, Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 8865–8869.

Kondratieck CM, Washington MT, Prakash S, Prakash L. Acidic residues critical for the activity and biological function of yeast DNA polymerase ϵ . *Mol Cell Biol.* 2001 Mar;21(6):2018-25.

Kumar G.S. A New and Concise Synthesis of 3-Hydroxybenzo[c]phenanthrene and 12-Hydroxybenzo[g]chrysene, Useful Intermediates for the Synthesis of Fjord-Region Diol Epoxides of Benzo[c]phenanthrene and Benzo[g]chrysene. *J Org Chem.* 1997 Nov 28;62(24):8535-8539.

Kurumizaka, H., S. Ikawa, M. Nakada, K. Eda, W. Kagawa, M. Takata, S. Takeda, S. Yokoyama, and T. Shibata. 2001. Homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3.Rad51C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:5538-5543.

Larminat F., W. Zhen, V.A. Bohr, Gene-specific DNA repair of interstrand cross-links induced by chemotherapeutic agents can be preferential, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2649–2654.

Latt S.A. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *P.N.A.S. USA* (1973) 70:3395-3399.

Latt S.A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *P.N.A.S. USA* (1974) 71:3162-3166.

Lehmann AR. Post-replication repair of DNA in ultraviolet-irradiated mammalian cells. No gaps in DNA synthesized late after ultraviolet irradiation. *Eur J Biochem.* 1972 Dec 18;31(3):438-45.

Lehmann AR., Kirk-Bell and Mayne L. Abnormal kinetics of DANN synthesis in ultraviolet light-irradiated cells from patient with Cockayne's syndrome. *Cancer Res.* (1979) 39: 4238-4241.

Lehmann AR. Replication of UV-damaged DNA: new insights into links between DNA polymerases, mutagenesis and human disease. *Gene.* 2000 Jul 25;253(1):1-12.

Li Z, Zhang H, McManus TP, MacGormick JJ, Lawrence CW, Maher VM. 2002. hREV3 is essential for error-prone translesion synthesis past UV or Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced DNA lesions in human fibroblasts. *Mutation Res.* 510:71-80.

Ljungmann M., F. Zhang, Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for UV light-induced apoptosis, *Oncogene* 13 (1996) 823–831.

Ljungmann M., Repair of radiation-induced DNA strand breaks does not occur preferentially in transcriptionally active DNA, *Radiat. Res.* 152 (1999) 444–449.

Lilly L.J., Bahner B. and Magee P.N. Chromosome aberration in rat induced in rat lymphocytes by N-nitroso compounds as a possible basis for carcinogen screening. *Nature* (1975) 258:611-612.

Limoli CL, Giedzinski E, Bonner WM, Cleaver JE. UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jan 8;99(1):233-8.

Limoli CL, Giedzinski E, Cleaver JE. Alternative recombination pathways in UV-irradiated XP variant cells. *Oncogene.* 2005 May 26;24(23):3708-14.

Limoli CL, Giedzinski E, Morgan WF, Cleaver JE. Inaugural article: polymerase eta deficiency in the xeroderma pigmentosum variant uncovers an overlap between the S phase checkpoint and double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):7939-46.

Lindhal T., Karran P. and Wood R.D. DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Apr;7(2):158-69. Review.

Lindhal T. and Wood R.D. Quality control by DNA repair. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1897-905. Review.

Ling H, Boudsocq F, Woodgate R, Yang W. Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):91-102.

Liu, N., J. E. Lamerdin, R. S. Tebbs, D. Schild, J. D Tucker, M. R. Shen, K. W. Brookman, M. J. Siciliano, C. A. Walter, W. Fan, L. S. Narayana, Z. Q. Zhou, A. W. Adamson, K. J. Sorensen, D. J Chen, N. J Jones, and L. H. Thompson. 1998. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol. Cell* 1:783-793.

Lock R.B. and Ross W.E. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*. 1990 Jun 15;50(12):3761-6.

Lommel L. and Hanawalt P. The genetic defect in the Chinese hamster ovary cell mutant UV61 permits moderate selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers in an expressed gene. *Mutat. Res* 255 (1991) 183-191.

Marmur J., L. Grossman, Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic

Jenssen D. A quantitative test for mutagenicity in V79 Chinese hamster cells, in: B.J. Kilbey, W. Nichols, C. Ramel (eds), Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam (1984) pp. 269-290.

McDonald J.P., V. Rapic-Otrin, J.A. Epstein, B.C. Broughton, X. Wang, A.R. Lehmann, D.J. Wolgemuth, R. Woodgate, Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta, Genomics 60 (1999) 20–30.

McHugh P.J., Spaniswich V.J. and Hartley J.A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. Lancet Oncol. 2001 Aug;2(8):483-90. Review.

Mc Innes M.A., Bingham J.D., Thompson L.H. and Strinste C.F. DNA mediated cotransfer of excision repair capacity and drug resistance into Chinese hamster ovary cell line UV-135. Mol.Cell.Biol. (1984) 4:1152-1158.

McKay B.C., Chen F., Clarke S.T., Wiggin H.E., Harley L.M. and Ljungman M. UV light-induced degradation of RNA polymerase II is dependent on the Cockayne's syndrome A and B proteins but not p53 or MLH1. Mutat Res. 2001 Mar 7;485(2):93-105.

Mac Kinnon P.J. Ataxia telangiectasia: an inbred disorder of ionizing radiation sensitivity in man. Hum.Genetic (1987) 75: 197-208.

Magana-Schwencke N. and Averbeck D. Repair of exogenous (plasmid) DNA damaged by photoaddition of 8-methoxypsoralen in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. (1991) 251:123-131.

Marmur J., Anderson W.F., Matthews L., Bens K., Gajewska E. Lane. And Doty P. The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. J Cell Comp Physiol. 1961 Dec;58(3)Pt 2:33-55.

Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η . EMBO J. 2000 Jun 15;19(12):3100-9.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . Nature. 1999 Jun 17;399(6737):700-4.

Masutani C., K. Sugawara, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P.J. van der Spek, D. Bootsma, et al., Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast *RAD23*, EMBO J. 13 (1994) 1831–1843.

Mellon I. and Hanawalt P.C. Induction of the Escherichia coli lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. Nature. 1989 Nov 2;342(6245):95-8.

Morales-Ramirez P., Rodriguez-Reyes R. and Vallarino-Kelly T. Fate of DNA lesions that elicit sister chromatid exchanges . Mutat. Res (1990) 232:77-88

Moreland R.J., Tirode F., Yan Q., Conaway J.W., Egly J.M., and Conaway R.C. (1999): A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. Genes Dev. 10: 22127-22130

Mu, D., C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon, and A. Sancar. 1995. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. J. Biol. Chem. 270:2415-2418.

Muller WU, Spindle A. Induction of sister chromatid exchange in preimplantation mouse embryos in vitro by 3H-thymidine or ultraviolet light in combination with caffeine. Teratog Carcinog Mutagen. 1986;6(2):107-14.

Nagase T., N. Miyajima, A. Tanaka, T. Sazuka, N. Seki, S. Sato, S. Tabata, K. Ishikawa, Y. Kawarabayasi, H. Kotani, et al., Prediction of the coding sequences

of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081–KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1 (supplement), DNA Res. 2 (1995) 51–59.

Nair DT, Johnson RE, Prakash S, Prakash L, Aggarwal AK. Replication by human DNA polymerase- ϵ occurs by Hoogsteen base-pairing. Nature. 2004 Jul 15;430(6997):377-80.

Natarajan A.T., van- Zeeland A.A. and Zwanenburg T.S.B. Influence of inhibitors of Poli (ADP_ribose)- polymerase on DNA repair, chromosomal alterations and mutations. Japan Scientific Societies Press, Tokio, pp.227-242.

New JH., Sugiyama T, Zaitseva E, Kowalczykowski SC (1999): Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. Nature 391: 407-409.

Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M., van Drunen E., Maas A., Theil A.F., de Wit J., Jasper N.G., Beverloo H.B., Hoeijmakers J.H.J et al. (2004) The structure-specific endonuclease ERCC1-Xpf is required to resolve DNA cross-link-induced double strand breaks. Mol Cell Biol 21: 713-720

Noll M.D., Mason T.M. and Miller P.S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. Chem Rev. 2006 Feb;106(2):277-301. Review.

O'Connor C.M., Gaffney K., Keane J., Southey A., Byne N., O' Mahoney S. and Fitzgerald M.X. α 1-Proteinase inhibitor, elastase activity, and lung disease severity in cystic fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1993 Dec;148(6 Pt 1):1665-70.

Orren D.K., Dianov G. and Bohr V.A. The human CSB (ERCC6) gene corrects the transcription-coupled repair defect in the CHO cell mutant UV61. Nucleic Acids Res. 24 (1996) 3317-3323.

Palitti F, Tanzarella C, Degrossi F, De Salvia R, Fiore M, Natarajan AT. Links Formation of chromatid-type aberrations in G2 stage of the cell cycle. Mutat Res. 1983 Aug;110(2):343-50

Perry P. and Evans J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature* (1975) 258:121-125.

Perry P. and Wolff S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature (Lond)* (1974) 251: 156-158.

Pierce, A. J., R. Johnson, L. H. Thompson, and M. Jasin. 1999. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* 13:2633-2638.

Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic Translesion Synthesis DNA Polymerases: Specificity of Structure and Function. *Annu Rev Biochem.* 2004 Nov 19.

Proietti De Santis L, Garcia CL, Balajee AS, Latini P, Pichierri P, Nikaido O, Stefanini M, Palitti F. (2002). Transcription couplet repair efficiency determines the cell cycle progression and apoptosis after UV exposure in hamster cells. *DNA Repair* 1: 209-223.

Richards S., Liu S.T., Majumdar A., Liu J.L., Narin R.S., Bernier M., Maher R.V. and Seidman M.M. Triplex targeted genomic crosslinks enter separable deletion and base substitution pathways. *Nucleic Acids Res.* 2005 Sep 25;33(17):5382-93.

Rubin J.S., Prideaux V.R., Hungigton F.W., Dulhanty A.M., Withmore G.F. and Bernstein A. Molecular cloning and chromosomal localization of DNA sequences associated with a human DNA repair gene. *Mol.cell.Biol.* (1985) 5:398-405.

Rubin J.S., Loyner A.L. Bernstein and Whitmore G.F. Molecular identification of human repair gene following DNA-mediated gene transfer. *Nature (London)* (1983) 306:206-208.

Rupp WD, Wilde CE 3rd, Reno DL, Howard-Flanders P. Exchanges between DNA strands in ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 1971 Oct 14;61(1):25-44.

Sasaki M.S. Fanconi's anemia: A condition possibly associated with a defective DNA repair, in: PC Hanawalt, E.C. Friedberg and CF: Fox (Eds) DNA repair mechanism, Academy press, New York, pp-675-684.

Savage J.R. (1977). Application of chromosome banding techniques to the study of primary chromosome structural changes. *J. Med. Genet*. 14: 362-370.

Schild, D., Y. C. Lio, D. W. Collins, T. Tsomondo, and D. J. Chen. 2000. Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J. Biol. Chem*. 275:6443-6449.

Seguin LR, Ganges MB, Tarone RE, Robbins JH. Skin cancer and chromosomal aberrations induced by ultraviolet radiation. Evidence for lack of correlation in xeroderma pigmentosum variant and group E patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992 Jun;60(2):111-6.

Sijbers, A. M., W. L. de Laat, R. R. Ariza, M. Biggerstaff, Y. F. Wei, J. G. Moggs, K. C. Carter, B. K. Shell, E. Evans, M. C. de Jong, S. Rademakers, J. de Rooij, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, and R. D. Wood. 1996. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86:811-822.

Silvian LF, Toth EA, Pham P, Goodman MF, Ellenberger T. Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from *Sulfolobus solfataricus*. *Nat Struct Biol*. 2001 Nov;8(11):984-9.

Smith GSM, Jackson SP (1999): The DNA-dependent protein kinase. *Genes.Dev*. 13:916-934

Solomon E. and Bobrow M. Sister chromatid exchanges a sensitive assay of agents damaging human chromosomes. *Mutat. Res.* (1975) 30:273-278.

Sonoda E., Sasaki M.S., Morrison C., Yamaguchi-Iwai Y., Takata M and Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol.Cell.Biol.* (1999) 19:5166-5169.

Spanswick V .J., Hartley J. M., Ward T.H. and Hartley J.A. Measurement of drug-induced DNA interstrand crosslinking using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay p. 143-154. in R.Brown and U. Boger-Brown (ed), *Methods in molecular medicine*, vol.28:cytotoxic drug resistance mechanism. Humana Press, Totowa, N.J.

Storgaard Sorensen C, Tengbjerg Hansen L, Dziegielewska J, Syljuåsen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T. The cell-cycle checkpoint CHK1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biol.* 7(2):195-2001.

Sugasawa K. Ng J.M., Masutani C., Iwai S., van der Spek P.J., Eker A.P., Hanaoka F., Bootsma D., and Hoeijmakers J.H.J. (1998): Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol.Cell* 2:223-232

Takata, M., M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson, and S. Takeda. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell Biol.* 21:2858-2866.

Takata M., M.S. Sasaki, E. Sonoda, T. Fukushima, C. Morrison, J.S. Albala, S.M. Swagemakers, R. Kanaar, L.H. Thompson, S. Takeda, The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair, *Mol. Cell Biol.* 20 (2000) 6476–6482.

Taylor J.H. Sister chromatid exchanges in tritium.labelled chromosomes. *Genetics* (1985) 43:515-529.

Thompson L.H., Salazar E.P., Brookman K.W., Collins C.C., Stewart S.A., Busch D.B., and Webwe C.A. recent progress with the DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells, in: Collins A., Johson R.T and Boyle J.M. (Eds). Molecular Biology of DNA repair, J.Cell Sci., (1987) 6 (suppl.):97-100.

Thompson L.H., Brookman K.W., Weber C.A., Salazar S.A. Human DNA repair genes. J. Cell. Biochem.(1988), Alan R. Liss, Inc., New York, pp-246.

Thompson L., Mitchell D., Regan J., Bouffler S., Stewart S., Carrie W., Nairn R. and Jonhson R. CHO mutant UV61 removes (6-4) Photoproducts but not cyclobutane dimmers. Mutagenesis 4 (1989) 140-146.

Tohda H, Oikawa A. Characterization of the enhancing effect of caffeine on sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet radiation in excision-proficient xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cells. Mutat Res. 1988 Sep;201(1):1-8.

Tohda H, Oikawa A. Differential features of sister-chromatid exchange responses to ultraviolet radiation and caffeine in xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cell lines. Mutat Res. 1983 Feb;107(2):387-96.

Tomasz M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). Chem Biol. 1995 Sep;2(9):575-9. Review.

Tornaletti S., Donahue B.A., Reines D. and Hanawalt P.C. Nucleotide sequence context effect of a cyclobutane pyrimidine dimer upon RNA polymerase II transcription. J Biol Chem. 1997 Dec 12;272(50):31719-24.

Thacker J., A surfeit of *RAD51*-like genes, Trends Genet. 15 (1999) 166–168.

Trincao J, Johnson RE, Escalante CR, Prakash S, Prakash L, Aggarwal AK. Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis. Mol Cell. 2001 Aug;8(2):417-26.

Troelstra C., Odijk H., de Wit J., Westerveld A., Thompson L., Bootsma D., and Hoeijmakers J. Molecular cloning of the human DNA excision repair gene ERCC-6. *Mol.Cell.Biol.* 10 (1990) 5806-5813.

Troelstra C., van Gool A., de Witt J., Vermeulen W., Bootsma D., and Hoeijmakers J.H.J. ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71 (1992) 939-953.

Troesta C., Van Gool A., deWit J., Vermeuleun W., Bootsma D., Hoijemarkers J.H.J. ERCC6, a member of subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* 71 (1992) 939-953).

Vos J.M., E.L. Wauthier, Differential introduction of DNA damage and repair in mammalian genes transcribed by RNA polymerases I and II, *Mol. Cell Biol.* 11 (1991) 2245–2252.

Vos J.-M.H., *Cis* and *trans* mechanisms of DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4 (1992) 385–395.

Vogel W, Bauknecht T. Effects of caffeine on sister chromatid exchange (SCE) after exposure to UV light or triaziquone studied with a fluorescence plus giemsa (FPG) technique. *Hum Genet.* 1978 Jan 19;40(2):193-8.

Wang X, Peterson CA, Zheng H, Nairn RS, Legerski RJ, Li L. Involvement of nucleotide excision repair in a recombination independent and error-prone pathway of DNA interstrand crosslink repair. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 713–20.

Wang Z.M., Chen Z.P., Xu Z.Y., Christodouloupoulos G., Bello V., Mohr G., Aloyz R. and Panasci L.C. In vitro evidence for homologous recombinational repair in resistance to melphalan. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Oct 3;93(19):1473-8.

Weaterveld A. Hoeijmakers J.H.J., van Dui M., de Wit J., Odijk H., Pastink A., Wood R.D and Bootsma D. Molecular cloning of human DNA repair gene. Nature (1984) 310:425-429.

Weber C.A., Salazar E.P., Stewart S.A and Thompson L.H. Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2 which corrects the nucleotide excision-repair defects in CHO UV5 cells. Mol.Cell Biol.(1988) 8: 1137-1146.

West SC, Cassuto E, Howard-Flanders P. Mechanism of E. coli RecA protein directed strand exchanges in post-replication repair of DNA. Nature. 1981 Dec 17;294(5842):659-62.

Wolff S., Bodycote J. and Painter R.B. Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of cell cycle:the necessity for cell to pass through S. Mutat. Res. (1974) 25:73-81.

Wolff S. and Perry P. Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma (Berl.) (1974) 48: 341-353.

Wolff S., V. Afzal, Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreduplicated cells to track sister-chromatid exchanges induced by cross-links, alkylations, or X-ray damage, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1996) 5765–5769.

Wood R.D. (1996): Dna repair in eukaryotes . Annu. Rev. Biochem 65: 135-167

Wood R.D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. J.Biol. Chem 272 (1997) 23465-23468.

Yang W. Portraits of a Y-family DNA polymerase. FEBS Lett. 2005 Feb 7;579(4):868-72.

Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O, Geacintov NE, Wang Z. Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa. *Mutat Res.* 2002 Dec 29;510(1-2):23-35.

Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O, Wang Z. Activities of human DNA polymerase kappa in response to the major benzo[a]pyrene DNA adduct: error-free lesion bypass and extension synthesis from opposite the lesion. *DNA Repair (Amst).* 2002 Jul 17;1(7):559-69.

Zhou BL, Pata JD, Steitz TA. Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell.* 2001 Aug;8(2):427-37.