



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA
XXIII Ciclo**

**RELAZIONE TRA IL BACKGROUND GENETICO E LA
RISPOSTA CELLULARE IN SEGUITO AL DANNO
PRIMARIO AL DNA**

(BIO/18)

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi

Firma

Tutor: Dott.ssa Roberta Meschini

Firma

Dottoranda: Dott.ssa Vincenza Ortenzi

Firma

*A mio padre, mia madre,
mia sorella.*

INDICE

INDICE	3
ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	8
CAPITOLO 1: LE RADIAZIONI IONIZZANTI E IL DANNO CITOGENETICO	10
1.1 Caratteristiche delle radiazioni	10
1.2 Effetti biologici a livello cellulare e molecolare delle radiazioni ionizzanti	11
1.3 Effetto delle radiazioni in relazione al ciclo cellulare	14
1.4 Le aberrazioni cromosomiche: origine	16
1.5 Le aberrazioni cromosomiche: classificazione	20
1.6 Radiazioni ionizzanti e aberrazioni cromosomiche	26
CAPITOLO 2: L'INSTABILITÀ GENOMICA	28
2.1 Introduzione	28
2.2 Definizione, cause e conseguenze dell'instabilità genomica	30
2.3 La risposta cellulare al danno al DNA	31
2.4 I meccanismi di riparazione del DNA	33
2.5 Riparazione per riunione del singolo filamento	36
2.6 Riparazione per ricongiunzione delle estremità interrotte (NHEJ)	39
2.7 Riparazione per ricombinazione omologa (HR)	42
CAPITOLO 3: LA PROTEINA CHINASI ATM e L'ATASSIA-TELANGIECTASIA	46
3.1 Introduzione	46
3.2 Struttura e funzione di ATM	47
3.3 Funzione di ATM nella risposta alla rottura a doppio filamento del DNA	48
3.4 Funzioni di ATM alternative alla trasduzione del segnale attivata da danno al DNA	50
3.5 Attivazione di ATM	53
3.6 Meccanismo di attivazione di ATM	54
3.7 Principali substrati di ATM	55
3.8 ATM nel sistema immunitario	57
3.9 Ruolo di ATM nella tumorigenesi	58
3.10 Mutazioni di ATM e stress ossidativo	60
3.11 Potenziali terapie	61
3.11.1 Terapie a base di antiossidanti	62
3.11.2 Correzione della funzione del gene ATM mediante "mutation-therapies targeted"	64
CAPITOLO 4: LA PROTEINA p53	67
4.1 Introduzione	67

4.2 Struttura e regolazione della proteina p53	67
4.3 Checkpoints del ciclo cellulare e p53	69
4.4 Apoptosi e p53	71
4.4.1 Sequenza degli eventi nell'esecuzione della morte	72
4.4.2 Principali vie apoptotiche	74
4.5 Geni bersaglio e ruolo di p53 nel controllo dell'apoptosi	76
4.6 Prospettive terapeutiche mediante l'utilizzo di inibitori di p53	79
CAPITOLO 5: L'ISTONE H2AX	84
5.1 La variante istonica H2AX: introduzione	84
5.2 La riparazione delle rotture a doppia elica nel contesto della cromatina	87
5.3 Coinvolgimento della componente istonica della cromatina nella riparazione delle rotture a doppia elica	88
5.4 γ-H2AX come marker di DSBs: possibili applicazioni nel campo della dosimetria biologica	92
5.5 Altri agenti che inducono la fosforilazione di H2AX	95
5.6 La fosforilazione di H2AX durante il ciclo cellulare	96
5.7 γ-H2AX e l'apoptosi	97
CAPITOLO 6: SCOPO DELLA RICERCA	99
CAPITOLO 7: MATERIALI E METODI	103
7.1 Sistemi cellulari	103
7.2 Condizioni di crescita	104
7.2.1 Linee cellulari linfoblastoidi di AT	104
7.2.2 Isolamento dei linfociti umani	104
7.2.3 Stimolazione dei linfociti umani	105
7.2.4 Fibroblasti umani primari	106
7.2.5 Linee cellulari di Hamster Cinese	106
7.3 Reagenti	107
7.4 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per le linee linfoblastoidi di AT	108
7.4.1 Western blotting (SDS page)	108
7.5 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per i linfociti.	109
7.5.1 Fissaggio ed allestimento dei preparati citogenetici	110
7.5.2 Allestimento dei preparati per l'analisi della morfologia nucleare	111
7.5.3 Reazione per la colorazione con anticorpo anti-bromodeossiridina.	111
7.5.4 Colorazione con Giemsa	112
7.5.5 Analisi della cinetica del ciclo cellulare	113
7.5.6 Analisi della morfologia nucleare apoptotica	113
7.5.7 Analisi delle aberrazioni cromosomiche	113
7.5.8 Reazioni citofluorimetriche per l'espressione della proteina p53.	113
7.6 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per i fibroblasti	114
7.6.1 Fissaggio e allestimento dei preparati per l'analisi citogenetica	115
7.6.2 Studio della morte cellulare:	116
7.6.3 Analisi citofluorimetrica per il ciclo cellulare e l'espressione della proteina p53	118
7.7 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per il rilevamento dell'istone γ-H2AX in linee cellulari di hamster Cinese	118
7.7.1 Protocollo sperimentale e agenti utilizzati	118
7.7.2 Marcatura tramite immunofluorescenza di γ -H2AX	120
7.7.3 Analisi tramite microscopia a fluorescenza di γ -H2AX	120
CAPITOLO 8: RISULTATI	122

8.1 Risultati linee cellulari AT	122
8.2 Risultati linfociti umani	124
8.2.1 Progressione del ciclo cellulare in cellule marcate con BrdUrd dopo irradiazione in presenza o assenza di PFT- α	124
8.2.2 Apoptosi indotta dai raggi X nella fase G2 in presenza o assenza di PFT- α , in cellule marcate con BrdUrd.	124
8.2.3 Aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X in G2 in presenza/assenza di PFT- α .	125
8.2.4 Espressione di p53 dopo l'irradiazione in presenza o assenza di PFT- α	125
8.3 Risultati fibroblasti umani primari	127
8.4 Risultati linee cellulari di hamster Cinese	132
CAPITOLO 9: DISCUSSIONE	138
9.1 Linee cellulari di Ataxia Telangiesctasia	138
9.2 Linfociti umani	139
9.3 Fibroblasti umani primari	141
9.4 Linee cellulari di hamster Cinese	146
9.5 Conclusioni generali	148
BIBLIOGRAFIA	149
Partecipazione a corsi e convegni	171
Pubblicazioni	171
Ringraziamenti	172

ABSTRACT

Exposure to ionizing radiation and other genotoxic agents induces DNA damage (e.g., double strand breaks, DSBs). The cells can trigger DNA repair, cell cycle arrest and programmed cell death to maintain genomic integrity. These events depend on the phase of the cycle, the exposure, the environment, the extent of the damage and the radiosensitivity of the particular cellular system under analysis. The cellular response involves a complex "network" of events inducing mechanisms able to rejoin DNA DSBs, that can lead to changes in gene expression profiles and tumorigenesis.

The purpose of this work is to study the relationship between genetic background and the cellular response after primary DNA damage. In particular, we studied the cellular response after X-rays exposure in Ataxia Telangiectasia (AT) lymphoblastoid cell lines that differ for several mutations in the ATM gene. AT is a rare genetic neurodegenerative disease, caused by the lack of functional ATM kinase. In this context, we focused on the role of some proteins, such as p53, on repair of DNA damage, by means its inhibitor pifithryn- α (PFT- α).

The stability genomic control has also been studied in human cell lines such as lymphocytes and primary fibroblasts, after exposure to ionizing radiation in different phases of the cell cycle. Other studies described in literature suggest that apoptosis has a selective role in the removal of cells bearing unstable chromosomal aberrations (dicentrics). The two cellular systems are very different in terms of anatomical, histological and functional, and these differences are also reflected in their neoplastic phenotypes. The fibroblast cell system, chosen for this work, allows to compare the results with those obtained in the lymphocytes.

In addition, preliminary studies on the induction of histone variant γ -H2AX have been led on Chinese hamster cell lines. In particular the analysis was focused on γ -H2AX foci induced by different chemical and physical agents in order to relate the type of DNA damage caused by different agents and its subsequent repair and to determine the involvement of histone H2AX at the various stages that lead to the resolution of DNA damage.

By the analysis of the collected data, we can conclude that the cellular response differs depending on cell type, the phase of the cell cycle when DNA damage occurs, the agent used for its induction and the several mutations in the defective gene. Therefore this study shows the importance of studying the cellular response and how this response controls the genomic stability. This has relevance not only in basic research but also in the field of potential anti-

cancer therapy or treatment for genetic syndromes with genomic instability, such as Ataxia Telangiectasia.

INTRODUZIONE

Il danno indotto al DNA nucleare dalle radiazioni ionizzanti, così come da altri agenti genotossici, influenza il manifestarsi di vari tipi di risposta, tra cui, la riparazione, l'arresto del ciclo e la morte cellulare programmata, che mantengono l'integrità del genoma. Ciascuno di questi eventi può dipendere dalla fase del ciclo in cui si trova la cellula al momento dell'esposizione, dall'ambiente, dalla consistenza del danno e dalla radiosensibilità dello specifico sistema cellulare preso in esame. La risposta cellulare comprende un complicato "network" di eventi, soprattutto quando è implicata in lesioni estremamente citotossiche, come le rotture a doppia elica che possono condurre a veri e propri cambiamenti nei profili dell'espressione genica, e anche nella sintesi, nella degradazione e nella localizzazione delle proteine.

Lo scopo di questa tesi di dottorato era quello di studiare la relazione tra il background genetico e la risposta cellulare in seguito al danno primario al DNA. A tal fine, in questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati diversi sistemi cellulari di mammifero.

In particolare, la risposta cellulare dopo l'esposizione ai raggi X è stata analizzata in linee cellulari linfoblastoidi di Ataxia Telangiectasia che differiscono per la mutazione nel gene ATM, responsabile della sindrome. Difetti genetici che compromettono la risposta cellulare al danno al DNA portano generalmente ad instabilità genomica, ipersensibilità a specifici agenti danneggianti e predisposizione al cancro. Lo studio delle sindromi genetiche che manifestano queste anomalie è il sistema utilizzato dal mondo scientifico per cercare di comprendere i numerosi interrogativi che ancora circondano l'origine di queste malattie. In questo contesto volevamo definire meglio il ruolo di alcune proteine implicate nella riparazione del DNA, quali p53, modulandola con un suo inibitore, la pifitrina- α (PFT- α).

Il controllo della stabilità genomica è stato studiato anche in linee cellulari umane quali i linfociti e i fibroblasti primari, dopo esposizione a radiazione ionizzante in diverse fasi del ciclo cellulare. Tale studio si inserisce in un contesto più ampio in cui secondo vari studi precedenti l'apoptosi elimina selettivamente le cellule che portano aberrazioni instabili (dicentrici e ring) rispetto a quelle con aberrazioni stabili (traslocazioni bilanciate). I linfociti di sangue periferico costituiscono il sistema cellulare umano d'elezione mentre i fibroblasti costituiscono una linea cellulare di interesse radiobiologico e clinico nel momento in cui si considerano le implicazioni del danno genetico in ambito radioterapico oltre che in quello

della normale esposizione ambientale. I due sistemi cellulari sono profondamente diversi dal punto di vista anatomico, istologico e funzionale e tali differenze si riflettono anche nei rispettivi fenotipi neoplastici. Il sistema cellulare dei fibroblasti, da noi scelto per tale lavoro, fornisce la possibilità di comparare i risultati ottenuti con quelli nel sistema linfocitario poiché sono cellule umane normali, non immortalizzate, e si può sfruttare la confluenza, dove la crescita si arresta per il fenomeno di inibizione da contatto, per mimare la fase G0 del ciclo cellulare.

Inoltre, linee cellulari di hamster Cinese sono state utilizzate per studi preliminari sulla fosforilazione della variante istonica H2AX fosforilata indotta da parte di diversi agenti sia chimici che fisici che differiscono per il tipo di danno indotto al DNA, allo scopo di mettere in relazione il tipo di danno indotto dai diversi agenti, la sua segnalazione e la sua conseguente riparazione con il fine di determinare il coinvolgimento dell'istone H2AX nelle varie fasi che portano alla risoluzione del danno al DNA.

Nei vari sistemi cellulari diversi sensori della risposta al danno al DNA quali le proteine ATM, p53 e l'H2AX fosforilato sono stati analizzati per il loro coinvolgimento nei processi di riparazione, morte cellulare per apoptosi e insorgenza di danno cromosomico.

Dall'insieme dei dati possiamo concludere che la risposta cellulare si diversifica a seconda del tipo cellulare, della fase del ciclo in cui avviene il danno al DNA, dell'agente utilizzato per la sua induzione e della mutazione presente nel gene difettivo. Da questo studio emerge quindi chiaramente l'importanza dello studio della risposta cellulare e di come questa controlli la stabilità genomica. Tutto ciò ha una rilevanza non solo nella ricerca di base ma anche nel campo delle potenziali terapie sia antitumorali, sia per le sindromi genetiche ad instabilità genomica, quali l'Ataxia Telangiectasia.

CAPITOLO 1: LE RADIAZIONI IONIZZANTI E IL DANNO CITOGENETICO

1.1 Caratteristiche delle radiazioni

Le radiazioni possono essere definite come radiazioni elettromagnetiche o radiazioni corpuscolari. Le radiazioni elettromagnetiche sono caratterizzate dalla presenza di un campo elettrico e un campo magnetico, mutuamente perpendicolari, che variano ciclicamente nel tempo da un minimo a un massimo. I principali parametri che definiscono la radiazione sono:

- La lunghezza d'onda (λ), ossia la distanza tra due massimi dell'onda;
- La frequenza (f), ossia il numero di lunghezze d'onda che si collocano in un determinato intervallo temporale (secondo);
- L'intensità, ossia quante volte un campo è più intenso rispetto ad un altro preso come riferimento;
- La velocità di propagazione della radiazione (c), pari a circa 300.000 km/s nel vuoto.

L'insieme delle radiazioni in un ampio intervallo di frequenze viene definito spettro elettromagnetico. La teoria quantistica prevede il dualismo onda-particella e perciò le onde elettromagnetiche possono essere considerate a tutti gli effetti come particelle, i fotoni, aventi un'energia proporzionale alla frequenza della radiazione. Per questo motivo possono essere considerate delle radiazioni corpuscolari, tenendo conto del fatto che i fotoni sono particelle avente massa a riposo pari a zero; anche se in biologia per radiazioni corpuscolari si intendono i fasci di energia composti da particelle aventi massa a riposo diversa da zero come i protoni, i neutroni e gli ioni di atomi o molecole (Migliore, 2004). Anche se i diversi tipi di radiazioni ionizzanti hanno differenti modelli di rilascio di energia e diverso potere di penetrazione, non c'è una proprietà che differenzia le radiazioni ionizzanti prodotte da sorgenti naturali. Da questa affermazione si deduce che le sorgenti usate in laboratorio sono altamente comparabili alle sorgenti naturali, carattere questo molto importante sotto l'aspetto della protezione e della prevenzione. Dal momento che le radiazioni si interpretano come onde l'energia viene misurata come densità di potenza e si indica con il simbolo S e viene misurata in Watt/metro quadrato (W/m^2) ed essendo interpretate anche come particelle l'energia di ognuna di esse viene misurata in Elettronvolt (eV), ma naturalmente l'energia

misurata in un modo o nell'altro è sempre la stessa. Le radiazioni si misurano mediante varie unità di misura, ma le più comunemente usate sono:

- Gray (Gy), che è l'unità di misura della dose assorbita per le radiazioni ionizzanti nel Sistema Internazionale (SI). Questa unità misura l'energia assorbita da una massa di materiale biologico pari a 1 Kg; $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/Kg}$;
- Rad (Radiation absorbed dose), vecchia unità di dose sostituita dal Gray; $1 \text{ Rad} = 0,01 \text{ Gy}$.

La velocità con cui avviene il processo di ionizzazione di un materiale è influenzata dalla massa, dalla carica e dalla velocità delle particelle ionizzanti. Una radiazione che incide su un tessuto biologico provoca la ionizzazione degli atomi e delle molecole con conseguente emissione di elettroni; questi elettroni cedono energia al tessuto circostante lungo il loro percorso, e la quantità di energia ceduta per ogni micrometro di percorso è chiamata Linear Energy Transfer (LET) ed è misurata in $\text{keV}/\mu\text{m}$. L'efficacia biologica delle radiazioni dipende dalla quantità di energia trasferita alla cellula e i suoi effetti complessivi sono una funzione del LET. In funzione del LET, le radiazioni possono essere classificate in due grandi categorie: ad alto LET, come i protoni e le particelle α , o a basso LET, come i raggi X e le radiazioni γ .

1.2 Effetti biologici a livello cellulare e molecolare delle radiazioni ionizzanti

Gli effetti biologici provocati dalle radiazioni ionizzanti, al contrario di quelli indotti da composti chimici, in una prima fase di interazione con la materia sono caratterizzati dal fatto di essere indipendenti dal metabolismo, dal ciclo cellulare, dalla complessità della cellula e dell'organismo esposto a radiazioni. I cambiamenti biologici avvenuti nella cellula sia per azione diretta che indiretta non si manifestano immediatamente, ma solo dopo un certo periodo di tempo, il periodo di latenza, che può essere di ore o anni come nel caso di cancro indotto da radiazioni o di generazioni quando il danno viene indotto nelle cellule germinali. Gli effetti sul materiale biologico sono stati studiati sia a livello molecolare (DNA, RNA, proteine) sia a livello cellulare (membrane, citoplasma, nucleo).

A livello molecolare la maggior parte delle conseguenze biologiche delle radiazioni sono il risultato finale sia del danno primario al DNA che dei processi di riparazione da esso attivati. Le radiazioni ionizzanti provocano il distacco e l'eliminazione di basi azotate con conseguente formazione di siti apurinici e/o apirimidinici tramite processi che vedono coinvolti i radicali liberi. Questo tipo di danno può essere letale negli organismi monocellulari

e, si pensa, costituisca una lesione che precede la mutazione genica nel DNA dei mammiferi. Altri tipi di lesioni indotte per ionizzazione sono: rotture a singola elica (SSBs), rotture a doppia elica (DSBs) e legami crociati tra due filamenti di DNA o, negli eucarioti superiori, anche tra DNA e proteine.

Le SSBs avvengono in seguito all'idrolisi del legame fosfodiesterico e all'eliminazione di un gruppo fosfato attraverso un meccanismo che coinvolge i radicali liberi OH° dell'acqua. Studi hanno dimostrato che DNA disidratato subisce un numero di SSBs direttamente proporzionale alla dose di radiazione somministrata. I meccanismi cellulari riparano efficientemente questo tipo di danno, ma qualora ciò non dovesse avvenire insorgono mutazioni.

Le DSBs rappresentano il danno più severo indotto al DNA e il loro meccanismo di riparazione è complesso; quando non vengono riparate o vengono riparate non correttamente causano aberrazioni cromosomiche strutturali, che possono essere causa di morte cellulare, trasformazione neoplastica o gravi anomalie genetiche. Questo tipo di rotture può verificarsi sia per azione diretta che per azione indiretta delle radiazioni. L'effetto diretto è stato dimostrato in studi condotti su DNA disidratato che hanno messo in evidenza una proporzionalità diretta tra dose di radiazione somministrata e numero di rotture. Al contrario, in soluzione acquosa è stata osservata una relazione dose-effetto di tipo quadratico suggerendo che, *in vivo*, le DSBs siano principalmente provocate o da due radicali liberi prodotti dalla radiazione che interagiscono tra loro, o come conseguenza di due rotture sulle singole eliche opposte ma abbastanza vicine da manifestarsi come una rottura della doppia elica.

I legami crociati si originano dall'interazione tra radicali radioindotti nelle basi del DNA e possono dar luogo, con bassa frequenza, a legami tra eliche di due molecole distinte o, in una sola molecola, all'alterazione della sua struttura secondaria. Gli RNA sono stati meno studiati rispetto al DNA, ma sembra che siano meno radiosensibili e che il danno prodotto sia meno rilevante. Le proteine che possono subire danni sono sia proteine con funzione strutturale sia quelle che agiscono come componenti organici nelle reazioni biochimiche, ossia enzimi, alterandone sia la sequenza amminoacidica che la struttura; tuttavia la presenza nelle cellule di numerose copie proteiche e la loro sintesi continua fanno sì che gli effetti delle radiazioni sulle proteine siano comunque limitati.

A livello cellulare si riscontrano numerosi effetti prodotti dalle radiazioni ionizzanti. I radicali liberi prodotti dalle radiazioni possono interagire con le membrane plasmatiche tramite i processi di perossidazione lipidica e ossidazione dei gruppi sulfidrilici proteici. Le

radiazioni inducono sulle membrane una riduzione della fluidità: a basse dosi (1-50 Gy) si verifica una variazione della permeabilità cellulare agli ioni, mentre ad alte dosi (100-200 Gy) si ha un aumento della permeabilità passiva. Le radiazioni possono alterare i siti di ancoraggio del DNA alla membrana; questo effetto potrebbe, a sua volta, produrre una lesione o un'alterazione delle normali funzioni metaboliche del DNA.

Recentemente, esperimenti condotti irraggiando in modo specifico (tramite irraggiatori puntiformi per radiazioni corpuscolari) compartimenti cellulari come il nucleo o il citoplasma hanno dimostrato un fenomeno oggi noto come “effetto bystander”: esso consiste nell'induzione di mutazioni a seguito dell'irraggiamento del solo citoplasma, in cellule non irraggiate, ma “vicine” a cellule irraggiate. Tale fenomeno è stato osservato anche *in vivo* su topi irraggiati schermando una parte del corpo (Mancuso et al. 2008). Le sue basi molecolari non sono state ancora completamente caratterizzate, ma diversi studi sono oggi mirati all'isolamento di mediatori biochimici diffusibili e alla comprensione del ruolo giocato dalle comunicazioni intercellulari tramite gap junctions.

Numerosi studi sono stati condotti per comprendere la capacità delle radiazioni di indurre mutazioni in cellule somatiche e per avere informazioni sul tipo di mutazione provocato. Le radiazioni fanno parte dei cosiddetti “agenti clastogeni”, in grado di indurre alterazioni nella struttura cromosomica; radiazioni ad alto LET provocano un danno maggiore rispetto a quelle a basso LET. Le aberrazioni cromosomiche presentano delle caratteristiche: il tipo di aberrazione dipende dalla fase del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule al momento dell'irraggiamento; le aberrazioni si manifestano nella mitosi successiva all'irraggiamento; molti tipi di lesione possono ricombinarsi senza dare luogo ad aberrazioni; mentre invece le lesioni non riparate o riparate non correttamente daranno origine ad aberrazioni.

Un parametro da lungo tempo studiato per misurare l'effetto delle radiazioni ionizzanti sul materiale vivente è la radiosensibilità dei vari tipi cellulari e la capacità riproduttiva. Si possono verificare due fenomeni: la morte riproduttiva e la morte cellulare per apoptosi.

La morte riproduttiva (o morte mitotica) consiste nella perdita di capacità riproduttiva e di divisione delle cellule attivamente proliferanti come le cellule staminali, le cellule ematopoietiche e le cellule coltivate in vitro. La capacità di una singola cellula di dividersi indefinitamente e dare origine a una colonia cellulare è una prova dell'integrità della cellula stessa; la perdita di tale funzione in relazione alla dose di radiazione è descritta dalle curve di sopravvivenza delle popolazioni irraggiate che rappresentano la relazione tra la dose di radiazione e il numero di cellule che sopravvivono.

La morte cellulare per apoptosi consiste in una serie di eventi a cascata che inducono le cellule ad una “morte programmata” ed è un meccanismo indispensabile durante lo sviluppo embrionale, come anche nell’adulto per evitare la proliferazione di cellule che potrebbero andare incontro a trasformazione neoplastica. L’apoptosi è suddivisa in due fasi principali: in una prima fase avviene una frammentazione del DNA che diviene fortemente condensato e forma delle piccole masse ricoperte di membrane; nella seconda fase le cellule apoptotiche vengono riconosciute e fagocitate dalle cellule adiacenti. In cellule esposte a radiazioni ionizzanti si osserva un aumento della frequenza di cellule apoptotiche. Inoltre, in un tessuto irraggiato si osserva una diversa distribuzione delle cellule apoptotiche: in assenza di irraggiamento le cellule apoptotiche sono presenti in gruppi separati, dopo l’irraggiamento si osservano distribuzioni casuali delle cellule apoptotiche nel tessuto. L’alterazione dei processi apoptotici da parte delle radiazioni è un precoce indicatore della radiosensibilità cellulare.

1.3 Effetto delle radiazioni in relazione al ciclo cellulare

Lo studio degli effetti delle radiazioni su cellule di mammifero ha permesso di stabilire una relazione fra radiazione, ciclo cellulare e riparazione (Pawlik et al. 2004). Le fasi M e G₂ del ciclo cellulare risultano le più sensibili, mentre la fase S è la più radioresistente per la componente istonica che si complessa con il DNA nei vari passaggi del ciclo cellulare o per la presenza in essa di più gruppi sulfidrilici rispetto alla mitosi e alla fase G₁. La regolazione del ciclo cellulare è sotto il controllo genico: le varie fasi sono condizionate dal completamento di quella precedente (Wojcik et al. 1996). I checkpoints sono i punti di controllo da cui dipende il passaggio delle cellule al livello successivo. Le componenti fondamentali dei checkpoints sono le cicline e le chinasi ciclina-dipendente (CDK) che associandosi tra loro regolano le transizioni tra le varie fasi del ciclo cellulare: G₁, S, G₂ e M (Arellano and Moreno, 1997; Israels and Israels, 2000). Le cicline sono proteine sintetizzate e degradate con andamento periodico lungo il ciclo cellulare. L’attività delle cicline è essenziale per l’entrata e la progressione in fase G₁, per la replicazione del DNA e per completare la mitosi. Le cicline interagendo con le chinasi formano complessi attivi ciclina-chinasi, di cui le cicline forniscono la componente regolativa e le chinasi quella catalitica, in grado di fosforilare substrati specifici nelle diverse fasi del ciclo cellulare. La famiglia delle cicline può essere suddivisa in due classi principali:

- le cicline della fase G1-S (cicline C, D1-3, ed E) formano specifici complessi ciclina-chinasi in grado di fosforilare dei substrati implicati nella progressione attraverso la G1 e nella transizione G1/S;
- le cicline della fase G2-M (cicline A e B) coinvolte nella regolazione della transizione G2/M e nella progressione della mitosi.

In seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti le cellule sono in grado di rallentare la loro progressione accumulandosi in specifici checkpoints (G1/S e G2/M), determinando rispettivamente un blocco in G₁ che impedisce l'ingresso nella fase S e/o in G2 che impedisce l'ingresso in mitosi (Taylor and Stark, 2001). Tramite questi rallentamenti transitori le attività riparative hanno un tempo maggiore per evitare o limitare il rischio di avere, in fase S o alla mitosi, uno stampo alterato e quindi, nelle generazioni successive, cellule molto danneggiate (Pawlik et al. 2004). Il punto di controllo in G2 dipende da un meccanismo simile a quello che ritarda l'ingresso in mitosi in seguito a replicazione incompleta del DNA. Per esempio, quando le cellule sono esposte a radiazioni ionizzanti le molecole sensori di danni al DNA attivano proteine chinasi trasduttori di segnale che fosforilano ed inattivano la fosfatasi Cdc25. Questo enzima normalmente attiva il complesso M-Cdk (complesso ciclina-Cdk di attivazione della fase M) rimuovendo gruppi fosfato; la sua inattivazione, perciò, bloccando la defosforilazione di M-Cdk, impedisce l'ingresso in mitosi della cellula. Quando il danno è stato riparato il segnale di inibizione della progressione del ciclo cellulare viene rimosso e il ciclo riprende il suo corso.

Il punto di controllo in G1 impedisce la progressione nella fase S inibendo l'attivazione dei complessi G1/S-Cdk e S-Cdk. Nelle cellule di mammifero il danno al DNA porta all'attivazione della proteina regolatrice p53, che stimola la trascrizione di molti geni; uno di questi geni codifica una proteina, p21, che si lega a G1/S-Cdk e S-Cdk e ne inibisce l'attività permettendo il ritardo dell'ingresso in fase S.

Il danno al DNA attiva p53 attraverso un meccanismo indiretto: nelle cellule non danneggiate, p53 è altamente instabile ed è presente in concentrazioni molto basse perché interagisce con un'altra proteina, Mdm2 che ha la funzione di ubiquitina ligasi e indirizza p53 nei proteosomi per la distruzione. Il danno al DNA attiva delle proteine chinasi che fosforilano p53 riducendone il legame a Mdm2; ciò riduce la degradazione di p53 portando quindi ad un consistente aumento della concentrazione di p53 nella cellula e il diminuito legame a Mdm2 aumenta la capacità di p53 di stimolare la trascrizione genica. Il ruolo chiave di p53 che ha valso a questa molecola l'appellativo di “guardiano del genoma” deriva dalla sua duplice capacità di attivare, da un lato, tramite p21, una pathway di arresto del ciclo

cellulare che favorisce la riparazione del DNA, e dall'altro, in presenza di livelli di danno che superino, per così dire, una soglia di riparazione, una pathway di tipo apoptotico che svolge anch'esso una funzione protettiva impedendo il propagarsi di cloni di cellule mutate. Una teoria sullo sviluppo del cancro molto accreditata è l'ipotesi che causa dell'instabilità genomica sia la perdita funzionale del checkpoint G1/S del ciclo cellulare, dovuta all'alterata attività della proteina p53. Tuttavia, il controllo della transizione G1/S rappresenta solo un aspetto della complessa risposta cellulare al danno indotto (Gewirtz, 2000; Fei and El Deiry, 2003).

Nel lungo periodo, l'accumulo di danni genetici nelle cellule prive di tali meccanismi di controllo porta ad un'aumentata frequenza di mutazioni che promuovono l'insorgenza del cancro; infatti non è certamente casuale che mutazioni nel gene p53 siano presenti in almeno la metà dei vari tipi di cancro riscontrati nell'uomo (Alberts, 2004).

1.4 Le aberrazioni cromosomiche: origine

Le aberrazioni cromosomiche sono alterazioni della struttura o del numero dei cromosomi di una cellula. Sono solitamente rilevabili al microscopio ottico, su preparati citologici di cellule arrestate allo stadio di metafase con appositi inibitori della divisione mitotica/meiotica. Lo sviluppo delle tecniche di Ibridazione *In Situ* Fluorescente (FISH) ha reso possibile il riconoscimento di alcune particolari alterazioni anche allo stadio di interfase, ma l'analisi citogenetica delle metafasi resta il metodo di elezione per la quantificazione e la caratterizzazione delle aberrazioni.

Il livello spontaneo di aberrazioni strutturali nelle cellule di mammifero proficienti nella riparazione dei danni al DNA è generalmente basso, dell'ordine di 1-2 %. Questa frequenza può essere molto aumentata quando le cellule vengono esposte all'azione di agenti chimici o fisici definiti agenti clastogeni (dal greco antico κλαστός – rotto). Le radiazioni ionizzanti sono molto efficaci nell'indurre aberrazioni cromosomiche e sono state spesso utilizzate per comprendere i meccanismi e le modalità di formazione delle aberrazioni. Il livello "basale" di aberrazioni può aumentare anche in relazione a difetti nei meccanismi di riparazione del DNA e, in alcuni tipi cellulari, anche in funzione dell'invecchiamento.

La maggior parte delle aberrazioni strutturali visibili al microscopio ottico ha gravi conseguenze per la cellula e l'individuo, quali morte cellulare, trasformazione tumorale, malattie genetiche associate a difetti di sviluppo. Recentemente, studi epidemiologici hanno messo in evidenza un'associazione tra aumentato livello di aberrazioni cromosomiche nei

linfociti di sangue periferico e rischio di neoplasie (Boffetta et al. 2007). D'altra parte anche molti efficaci farmaci antitumorali sono potenti clastogeni e, come le radiazioni ionizzanti, sono applicati proprio in virtù di questa loro proprietà.

Queste considerazioni spiegano l'interesse per lo studio delle aberrazioni cromosomiche e dei loro meccanismi di formazione.

I lavori pionieristici sugli effetti delle radiazioni ionizzanti nell'induzione delle aberrazioni cromosomiche risalgono ai primi anni del XX secolo e includono lo studio delle anomalie cromosomiche in tessuti di mammiferi come testicoli di ratto, uova di *Ascaris*, testicoli di cavalletta, cellule larvali di anfibi così come cellule somatiche e meiotiche di piante.

Ci sono principalmente due teorie sui meccanismi di formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte da radiazioni (Natarajan, 2002):

- Teoria della rottura-riunione “breakage-and-reunion” di K. Sax (Sax, 1941);
- Teoria dello scambio “exchange” di S.H. Revell (Revell, 1955).

In accordo con la prima teoria, il primo evento causato dalla radiazione è una rottura cromatidica o cromosomica e i tipi di aberrazioni osservate in mitosi dipendono dal destino di queste rotture: le estremità interrotte possono essere riparate ripristinando la condizione originaria precedente all'evento di rottura, possono congiungersi tramite fusione illegittima con le estremità di un'altra rottura, se entrambe sono sufficientemente vicine nel tempo e nello spazio, generando in tal modo le aberrazioni classificate come scambi, oppure, infine, possono non ricongiungersi affatto, producendo in tal modo i cosiddetti frammenti cromosomici.

In accordo con la teoria dello “scambio”, la lesione primaria non è una rottura cromatidica o cromosomica ma una lesione meno grave che decade nel tempo. Se due lesioni sono sufficientemente vicine nel tempo e nello spazio, esse possono entrare in contatto, instaurando una condizione più stabile chiamata “stadio dell'iniziazione dello scambio” (Revell, 1959). Da questa visione consegue che tutti i tipi di aberrazioni derivino da un processo di scambio. Infatti, le delezioni cromatidiche sono considerate come intrascambi incompleti. Bisognerebbe ricordare che Revell propose questa teoria solo per spiegare i suoi dati ottenuti dall'irraggiamento degli apici radicali di *Vicia Faba* in fase G2.

Tra la fine degli anni sessanta e l'inizio degli anni settanta Michael Bender e collaboratori tentarono di definire un modello generale relativo alla genesi delle aberrazioni cromosomiche che tentasse di unificare le teorie precedenti (Bender et al. 1974). I presupposti base di questo modello generale prevedevano che:

- Il cromosoma eucariotico in G1 contenesse un'unica doppia elica di DNA;
- Il “bersaglio” per la produzione delle aberrazioni cromosomiche fosse il DNA;
- Le aberrazioni consistessero in rotture della catena del DNA e in ricombinazione delle terminazioni rotte, che dovevano però mantenere la stessa polarità della catena;
- Le DSBs potessero essere indotte direttamente o indirettamente, attraverso l'azione di meccanismi di riparazione del DNA che convertissero rotture a singolo filamento (generate direttamente o attraverso la riparazione di basi danneggiate) in rotture a doppio filamento.

Il modello di Bender concludeva che all'origine di tutte le aberrazione cromosomiche ci fosse una DSB. Le SSBs, come tali, non contribuirebbero alla formazione delle aberrazioni: la maggior parte di esse sarebbe rapidamente riparata, almeno nelle cellule con sistemi riparativi integri, mentre solo una frazione verrebbe convertita in DSBs dalle nucleasi presenti nella cellula.

Poiché, tuttavia, le radiazioni a basso LET inducono, per unità di dose, un numero di SSBs di diversi ordini di grandezza maggiore di quello delle DSBs e la maggior parte degli agenti chimici produce altre lesioni primarie al DNA, come il danno alle basi azotate, in termini quantitativamente consistenti, numerosi studi si concentrarono sui meccanismi di conversione delle SSBs e dei danni alle basi in DSBs. Oggi sappiamo che le SSBs possono generare rotture a doppio filamento attraverso meccanismi di riparazione per escissione, oppure come conseguenza della riparazione di due basi prospicienti su filamenti opposti del DNA.

Prove sperimentali a supporto del modello di Bender furono fornite da alcuni studi condotti da A.T. Natarajan e collaboratori, in cui le cellule venivano irraggiate con raggi X e contemporaneamente trattate con un'endonucleasi di *Neurospora crassa*, che riconosce regioni del DNA a singolo filamento e le converte in DSBs. I risultati ottenuti in queste condizioni sperimentali mostravano un incremento statisticamente significativo della frequenza di aberrazioni cromosomiche rispetto al trattamento con soli raggi X. L'aumento delle aberrazioni cromosomiche era accompagnato da un concomitante aumento delle DSBs di un fattore 2-3. Questi risultati indicano che le SSBs convertite in DSBs aumentano la probabilità di formazione delle aberrazioni cromosomiche (Natarajan et al. 1980). Parallelamente al trattamento con raggi X, l'effetto dell'endonucleasi veniva valutato in associazione al trattamento con neutroni. In questo caso, il trattamento con endonucleasi non produceva un aumento della frequenza di aberrazioni cromosomiche rispetto al solo

irraggiamento. Tali risultati non erano in contraddizione con le precedenti conclusioni, perché in questo caso la frequenza delle SSBs convertite in DSBs era minima rispetto alla preponderanza delle DSBs indotte direttamente dai neutroni.

Molti aspetti riguardanti la conversione delle SSBs in rotture a doppio filamento sono stati chiariti con eleganti esperimenti che utilizzavano inibitori della riparazione del DNA come l'arabinoside della citosina (ara-C). Questo agente impedisce il processo di risintesi (gap filling) nelle regioni a singolo filamento prodotte dalla riparazione per escissione delle basi danneggiate, determinando quindi l'accumulo di rotture a singolo filamento.

In linfociti umani irraggiati in fase G0 il post-trattamento con ara-C aumentava significativamente le aberrazioni cromosomiche indotte dai soli raggi X, dimostrando che un accumulo di SSBs determinava la produzione di aberrazioni cromosomiche. Queste osservazioni supportavano il modello di Bender, confermando che anche il "misrepair" di un danno alle basi, oltreché di DSBs potesse contribuire al bilancio finale di aberrazioni cromosomiche.

Una delle complicazioni per una migliore comprensione dei meccanismi di formazione delle aberrazioni cromosomiche è che sia le radiazioni sia gli agenti chimici inducono una enorme varietà di lesioni al DNA, la cui evoluzione è difficile da determinare.

Per questo motivo, sono stati condotti esperimenti utilizzando agenti che producono esclusivamente DSBs nel DNA. Questo è stato ottenuto introducendo nelle cellule permeabilizzate endonucleasi di restrizione che generano, in siti specifici del genoma, DSBs "smussate" (blunt) o "coesive" (sticky). Analogamente alle radiazioni ionizzanti, le endonucleasi di restrizione inducevano aberrazioni di tipo cromosomico in G1 e aberrazioni di tipo cromatidico in S e G2, anche se l'efficacia di conversione in aberrazioni cromosomiche delle terminazioni "smussate" o "coesive" è tuttora controversa. Questi esperimenti confermavano ancora una volta che le DSBs potevano essere convertite in aberrazioni cromosomiche, ma non permettevano di concludere che questo tipo di lesione fosse l'unica responsabile della loro formazione.

Oggi la visione corrente sulla formazione delle aberrazioni cromosomiche attribuisce un ruolo centrale alle DSBs sulle quali agiscono i meccanismi di riparazione HR (Homologous Recombination) e NHEJ (Non Homologous End Joining, NHEJ). I due sistemi operano in modo complementare; il NHEJ agisce in tutte le fasi del ciclo, ed è fondamentale in fase G1, mentre l'HR opera durante la tarda fase S e la G2. Considerando che le aberrazioni cromosomiche derivano dal "misrepair" delle DSBs ad opera dell'uno o dell'altro meccanismo, potremmo oggi rivedere le teorie classiche di Sax e Revell alla luce delle nuove

conoscenze molecolari sulla riparazione, concludendo che entrambe sono valide perché interpretano fenomeni diversi che si verificano in fasi diverse del ciclo cellulare.

L'introduzione della tecnica della condensazione prematura dei cromosomi (Premature Chromosome Condensation, PCC), con la quale si possono visualizzare i cromosomi in interfase, ha permesso di studiare la cinetica di riparazione delle rotture cromosomiche. È stato quindi possibile stabilire che nei linfociti irraggiati con raggi X in G₀ la cinetica di riparazione delle rotture segue un andamento bifasico, con una componente molto veloce (circa il 60%) e una componente più lenta la cui lunghezza dipende anche dalla dose di radiazione.

1.5 Le aberrazioni cromosomiche: classificazione

In base alle osservazioni eseguite al microscopio dei preparati in metafase le aberrazioni cromosomiche vennero ben presto classificate in categorie ben precise che consentono un confronto accurato e corretto dei risultati conseguiti in diversi laboratori.

Il primo livello di classificazione riguarda il coinvolgimento nell'aberrazione di uno o entrambi i cromatidi del cromosoma. Si distinguono:

- aberrazioni sub-cromatidiche, che vengono indotte alla fine della fase G₂ o in profase ed appaiono come scambi in cui le unità coinvolte sembrano essere più piccole di un singolo cromatidio;
- aberrazioni cromatidiche, che si formano in fase S o G₂, cioè durante o dopo la replicazione dei cromosomi anche se la lesione al DNA è avvenuta in fase G₁, ed in metafase appaiono come rotture e/o scambi;
- aberrazioni isocromatidiche (cromosomiche), che si formano prima della replicazione dei cromosomi in fase G₁ per cui quando si ha la duplicazione del DNA in fase S, il danno viene trasmesso ad entrambi i cromatidi.

In base a questa classificazione fu presto possibile distinguere tra agenti clastogeni che producevano sempre aberrazioni di tipo cromatidico, indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare nel quale venivano trattate le cellule, e agenti che producevano aberrazioni di tipo cromatidico quando il trattamento avveniva in fase S/G₂ e aberrazioni di tipo cromosomico quando il trattamento avveniva in fase G₁ (Figura 1). Nella prima categoria ricadeva la maggior parte delle sostanze chimiche che, si concluse, producevano aberrazioni principalmente per conversione dei danni alle basi in rotture a doppia elica durante la fase S e per questo motivo furono classificate come agenti S-dipendenti. Nella seconda categoria

ricadevano le radiazioni ionizzanti e alcune sostanze chimiche, come la bleomicina, in grado di produrre direttamente DSBs nel DNA; questi agenti vennero pertanto definiti S-independenti. Più recentemente, sono state raccolte interessanti osservazioni in cellule difettive nella riparazione delle DSBs che mostrano la co-presenza di aberrazioni di tipo cromosomico e aberrazioni di tipo cromatidico nella stessa metafase e addirittura nello stesso cromosoma, dopo irraggiamento in fase G1 (Natarajan et al. 2008; Natarajan and Palitti, 2008). Queste osservazioni sono state interpretate come conseguenza di una riparazione di DSBs parzialmente dilazionata alla fase S/G2, dovuta alla compromissione dei meccanismi di riparazione e del checkpoint in fase G1 (Natarajan et al. 2008; Natarajan and Palitti, 2008; Delacote and Lopez, 2008).

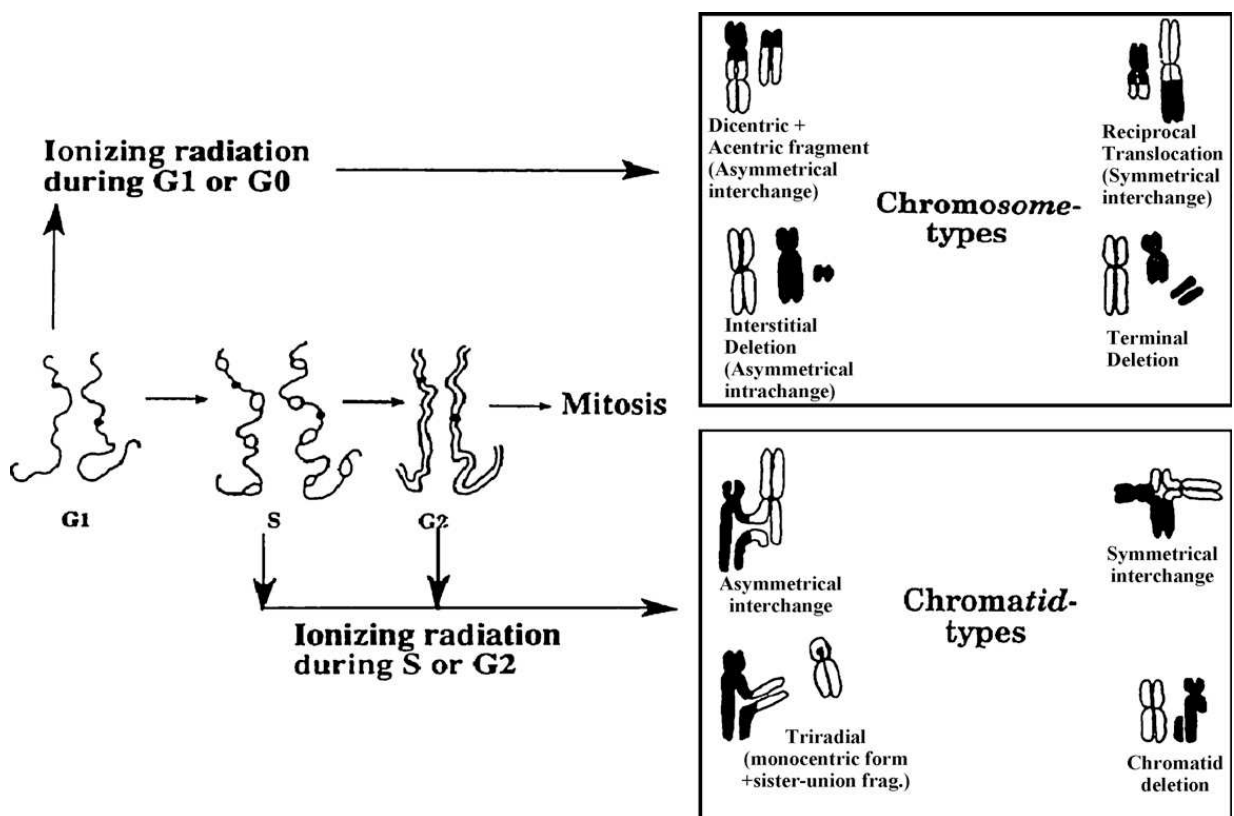


Figura 1: Illustrazione schematica dei tipi di aberrazioni prodotte dalle radiazioni ionizzanti in dipendenza della fase del ciclo cellulare in cui la cellula è stata irradiata.

All'osservazione microscopica le aberrazioni appaiono inoltre immediatamente distinguibili in scambi, quando coinvolgono più cromatidi/cromosomi diversi (o bracci diversi dello stesso cromatidio/cromosoma) e rotture, evidenti come delezioni o frammenti, quando coinvolgono un solo cromatidio/cromosoma. Questi ultimi possono o meno essere associati a scambi quando vengono generati contestualmente ad essi.

Le aberrazioni possono quindi essere anche suddivise in intracromosomiche (intrascambi), quando il riarrangiamento coinvolge un singolo cromosoma, e in intercromosomiche (interscambi), quando sono coinvolti cromosomi diversi. Distinguiamo inoltre scambi interbracci, quando lo scambio avviene tra i bracci dello stesso cromosoma ed intrabracci se lo scambio avviene tra due siti posti sullo stesso braccio cromosomico. Inoltre gli scambi possono essere completi quando tutti i capi di rottura sono uniti a formare lo scambio, oppure incompleti quando i capi di rottura non interagiscono, rimanendo così liberi. Ancora abbiamo gli scambi asimmetrici che avvengono se entrambi i capi di rottura contenenti il centromero (frammenti centrici) si ricongiungono tra loro lasciando due frammenti privi di centromero (frammenti acentrici) che si congiungono a loro volta.

Questi tipi di scambi portano alla formazione di cromosomi o cromatidi dicentrici (con due centromeri) o alla formazione di cromosomi ad anello centrici. Le traslocazioni invece sono scambi simmetrici che si formano quando si ricongiunge un frammento centrico di un cromosoma col frammento acentrico di un altro cromosoma ed ugualmente si comportano le altre terminazioni dei due cromosomi coinvolti. Gli scambi asimmetrici sia di tipo cromatidico che cromosomico sono ben riconoscibili al microscopio poiché sono uniti a frammenti acentrici, a differenza degli scambi simmetrici. Questi ultimi, quando sono di tipo cromosomico, non sono riconoscibili tranne nel caso in cui vi siano scambi incompleti o nel caso in cui ci siano differenze di lunghezza dei bracci cromosomici che vengono scambiati. Invece, gli scambi cromatidici simmetrici per la formazione di strutture a quattro braccia (quadriradiali), causate dall'appaiamento tra i cromatidi fratelli, possono essere facilmente riconosciuti. Al momento della divisione cellulare alcune aberrazioni cromosomiche possono essere perse o trasformate causando varie conseguenze ed è per questo motivo importante analizzare le aberrazioni alla prima mitosi e quindi prima che possano insorgere processi selettivi a carico delle cellule con alcuni tipi di aberrazioni. Infatti, a causa dell'assenza del centromero, che lega i cromosomi alle fibre del fuso, i frammenti acentrici sono quelli che maggiormente vengono perduti e si possono trovare sotto forma di micronuclei (Heddle et al. 1983). Come i frammenti acentrici anche gli stessi scambi asimmetrici possono essere perduti durante la divisione cellulare. Infatti, sia i dicentrici che gli scambi asimmetrici, possedendo due centromeri, possono orientarsi sul fuso mitotico in modo che i due centromeri siano indirizzati ad un solo polo mitotico non portando a problemi meccanici durante la migrazione del cromosoma dicentrico, oppure in modo che i due centromeri siano orientati in direzioni opposte, verso i due poli, creando un ponte cromosomico o cromatidico che causa la perdita dell'aberrazione. Al contrario, il materiale cromosomico non viene perduto nel caso di scambi

simmetrici completi poiché questi non risultano associati a frammenti acentrici. Perciò le aberrazioni possono essere definite di tipo stabile (scambi simmetrici) o instabile (scambi asimmetrici). Le prime (inversioni o traslocazioni) possono essere trasmesse di generazione in generazione al contrario delle seconde (dicentrici, rings o delezioni) che possono essere perdute al momento della divisione cellulare. Gli schemi che riassumono i principali tipi di aberrazioni sia cromatidiche sia cromosomiche sono illustrati rispettivamente in Tabella 1 ed in Tabella 2.

Per quanto riguarda le aberrazioni cromosomiche strutturali congenite cioè quelle trasmesse alla progenie per via germinale che si ritrovano nelle popolazioni umane le più importanti sono le delezioni, le duplicazioni, le inversioni e le traslocazioni. Le delezioni sono intese come rotture di un cromosoma in un punto seguite, per la mancanza di riparazione, dalla perdita del segmento di cromosoma distale al punto di rottura stesso; al contrario, una delezione interstiziale coinvolge la perdita di un segmento di cromosoma generato in seguito a due rotture cromosomiche. La delezione di materiale genetico è spesso associata all'eliminazione di almeno un gene la cui perdita di funzione può essere importante, nelle cellule somatiche, per i processi di iniziazione e progressione dei tumori.

Le duplicazioni comportano una larga aggiunta di materiale genetico e sono generalmente causate da eventi anomali che si verificano durante la ricombinazione e possono avvenire sia tra cromosomi omologhi che non omologhi. Le duplicazioni non sono in genere così dannose come le delezioni e possono, a volte, divenire vantaggiose.

Le traslocazioni consistono nel trasferimento di segmenti cromosomici tra cromosomi diversi. Originano da almeno due rotture cromosomiche che vengono riparate in maniera anomala, oppure dalla ricombinazione non omologa tra cromosomi durante la meiosi. Queste sono visibili solo grazie al bandeggio dei cromosomi oppure all'impiego della moderna tecnica di citogenetica molecolare basata sulla FISH che impiega sonde di DNA coniugate con coloranti fluorescenti che riconoscono sequenze complementari al cromosoma in esame oppure ad uno specifico gene.

Le inversioni originano da due rotture sulle braccia cromosomiche, seguite dalla rotazione di 180° del segmento compreso tra i due punti di rottura e dalla successiva risaldatura dello stesso. Distinguiamo le inversioni pericentriche, che originano quando i punti di rottura sono su due braccia diverse, ed il centromero viene incluso nel riarrangiamento, e le inversioni paracentriche, quando i punti di rottura sono localizzati sullo stesso braccio cromosomico.

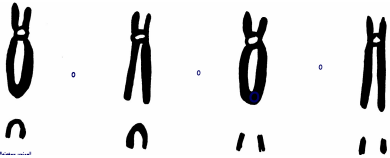
Aberrazioni cromatidiche	Intrascambi	Delezione terminale	
		Delezioni interstiziali	
		Delezioni isocromatidiche	
		Intrabraccia asimmetrico	
		Intrabraccia simmetrico	
	Interscambi	Interbraccia asimmetrico	
		Interbraccia simmetrico	
		Interbraccia triradiale mono centrico	
		Interbraccia triradiale dicentrico	

Tabella 1: Tipi di aberrazioni cromatidiche.

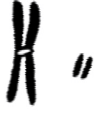
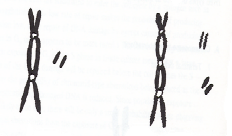
Aberrazioni cromosomiche	Intrascambi	Delezione terminali	
		Minute	
		Anello acentrico	
		Cromosoma ad anello	
		Inversione	
	Interscambi	Dicentrici	
		Traslocazione	

Tabella 2: Tipi di aberrazioni cromosomiche.

1.6 Radiazioni ionizzanti e aberrazioni cromosomiche

Come atteso in base alla loro capacità di indurre DSBs precedentemente descritta e a quanto noto circa la relazione tra DSBs e aberrazioni cromosomiche, le radiazioni ionizzanti appartengono alla classe di agenti clastogeni, cioè in grado di indurre efficacemente alterazioni nella struttura del cromosoma.

Nel 1940 Karl Sax irradiò per la prima volta microspore di *Tradescantia*, e successivamente D. Scott e H. Evans (1967) esposero a radiazioni apici radicali di *Vicia Faba*; le prime osservazioni dimostrarono che le radiazioni erano in grado di indurre alterazioni della struttura del cromosoma e che le radiazioni ad alto LET erano più efficaci di quelle a basso LET.

Le aberrazioni possono essere osservate già a dosi molto basse, come 0,1 Gy; è stato valutato che per ottenere un'aberrazione per cellula sono necessarie dosi comprese fra 0,5 e 2 Gy, a seconda del tipo di cellula e del tipo di radiazione utilizzata nella sperimentazione.

È interessante notare che per radiazioni ad alto LET (per esempio neutroni di fissione) la relazione fra dosi ricevute e aberrazioni indotte è lineare, invece per radiazione a basso LET (raggi X e gamma) la relazione fra dose e aberrazioni indotte è lineare-quadratica. La parte lineare è attribuibile a processi che richiedono un singolo evento di ionizzazione (ad esempio delezioni), mentre quella quadratica è da attribuire ad eventi che richiedono le interazioni tra due lesioni del DNA (ad esempio dicentrici, traslocazioni). Queste lesioni possono essere prodotte da una singola traccia di ionizzazione come avviene, con bassa probabilità, a basse dosi (termine lineare della relazione dose-effetto) o da tracce di ionizzazioni indipendenti che, a dosi più elevate, hanno maggiore probabilità di attraversare la stessa cellula (termine quadratico della relazione dose-effetto).

La determinazione della relazione quantitativa tra dose di radiazione e aberrazioni cromosomiche in linfociti umani irraggiati in vitro, insieme alla riproducibilità di questi risultati sperimentali, suggerì la possibilità di utilizzare la frequenza di cromosomi dicentrici come dosimetro biologico per stimare la dose assorbita in assenza di una dosimetria fisica. Campioni di sangue periferico di individui potenzialmente esposti a radiazioni vengono coltivati *in vitro* e la frequenza di anelli e dicentrici viene valutata in cellule che hanno subito una sola divisione in coltura. La frequenza osservata viene poi riportata su una "curva di calibrazione" costituita irraggiando in vitro numerosi campioni con dosi note di radiazioni γ per ottenere una stima della dose assorbita. Questo tipo di metodologia viene usata quando sono state esposte a radiazioni persone prive di campionatore personale (dosimetro), ad

esempio in seguito ad un incidente come avvenne per i sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki.

Più recentemente, l'introduzione delle tecniche FISH ha reso possibile quantificare l'induzione di traslocazioni senza fare ricorso alle lunghe e complesse tecniche di bandeggio. Questo progresso tecnologico ha aperto la strada ad una dosimetria citogenica basata sulla misura delle traslocazioni anziché dei dicentrici. Il vantaggio di questa tecnica consiste nel poter osservare aberrazioni cromosomiche anche molto tempo dopo l'esposizione a radiazioni, cosa che non è possibile con i dicentrici poiché, essendo aberrazioni instabili, si riducono o si perdono alle mitosi successive. In recenti studi le traslocazioni, che permangono nelle generazioni cellulari successive, sono state osservate anche nei sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki dopo più di quarant'anni dall'esplosione.

CAPITOLO 2: L'INSTABILITÀ GENOMICA

2.1 Introduzione

Il DNA può subire danni provocati da agenti ambientali come le radiazioni e altri agenti genotossici, o da agenti endogeni come le specie reattive dell'ossigeno e altri prodotti generati dal normale metabolismo cellulare (Hoeijmakers, 2001). In seguito all'azione di questi agenti è possibile che si vengano a creare delle lesioni al DNA, di cui alcune sono considerate relativamente benigne mentre altre hanno un effetto deleterio e possono compromettere l'integrità del genoma. Per esempio, si possono verificare modificazioni chimiche delle basi azotate, legami covalenti tra basi dello stesso filamento o di filamenti complementari (legami crociati), rotture della singola elica e rotture della doppia elica; queste ultime sono particolarmente pericolose perché possono provocare mutazioni o traslocazioni cromosomiche in cellule che hanno un sistema di riparazione non accurato o inefficiente. Anche la strada che porta al cancro è fatta di modificazioni, sia nella sequenza che nell'organizzazione del genoma, che spaziano dalle sostituzioni di un singolo nucleotide alle aberrazioni cromosomiche. Queste e altre modificazioni rappresentano delle deviazioni dal primo requisito necessario per mantenere l'omeostasi cellulare: il mantenimento della stabilità genomica.

Sebbene alcune variazioni nel DNA della linea germinale siano fondamentali per mantenere la variabilità genetica, i cambiamenti nella sequenza del DNA delle cellule somatiche sono di solito indesiderati; per questo le cellule somatiche possiedono degli efficienti sistemi di protezione contro tali mutamenti (Levitt and Hickson, 2002). Si ritiene che l'evento cruciale che designi l'inizio della cancerogenesi sia una singola modifica del genoma, le cui conseguenze potrebbero essere minime come ad esempio, un piccolo cambiamento nella quantità di una proteina, o la sostituzione di un singolo aminoacido. Il verificarsi di tale modificazione e la sua fissazione nel genoma sono il risultato del fallimento del meccanismo che avrebbe dovuto individuare la lesione nel DNA o il "mismatch" che ha causato la mutazione, e avrebbe dovuto produrre la risposta corretta per ripristinare la sequenza originale e mantenere la cellula nel suo stato normale. Mentre il fenotipo cellulare neoplastico progredisce, la stabilità genomica continua a diminuire, portando ad un circolo vizioso di aberrazioni cromosomiche e al progredire della malattia (Hahn and Weinberg,

2002). La più grande minaccia alla stabilità genomica proviene dall'azione degli agenti danneggianti il DNA, sia esogeni che endogeni, che possono provocare numerose lesioni al DNA: alcune di queste sono estremamente citotossiche se non vengono riparate velocemente, mentre altre sono mutagene le cui conseguenze variano dal malfunzionamento della cellula alla trasformazione maligna. Non è sorprendente perciò che molti agenti mutageni siano anche cancerogeni, e che esista un'alta corrispondenza fra il loro essere cancerogeni e la loro potenzialità mutagenica.

Tipi diversi di danni al DNA causano tipi diversi di lesioni che vengono gestite dalle cellule in modi diversi. La risposta cellulare può essere la sopravvivenza della cellula e la ripresa del ciclo vitale normale, la morte della cellula o la trasformazione maligna. Il meccanismo che porta la cellula a scegliere tra un tentativo di sopravvivenza e la morte programmata non è ancora del tutto chiaro. Il tentativo di sopravvivenza è complesso ed include molte pathways di segnalazione (Figura 2).

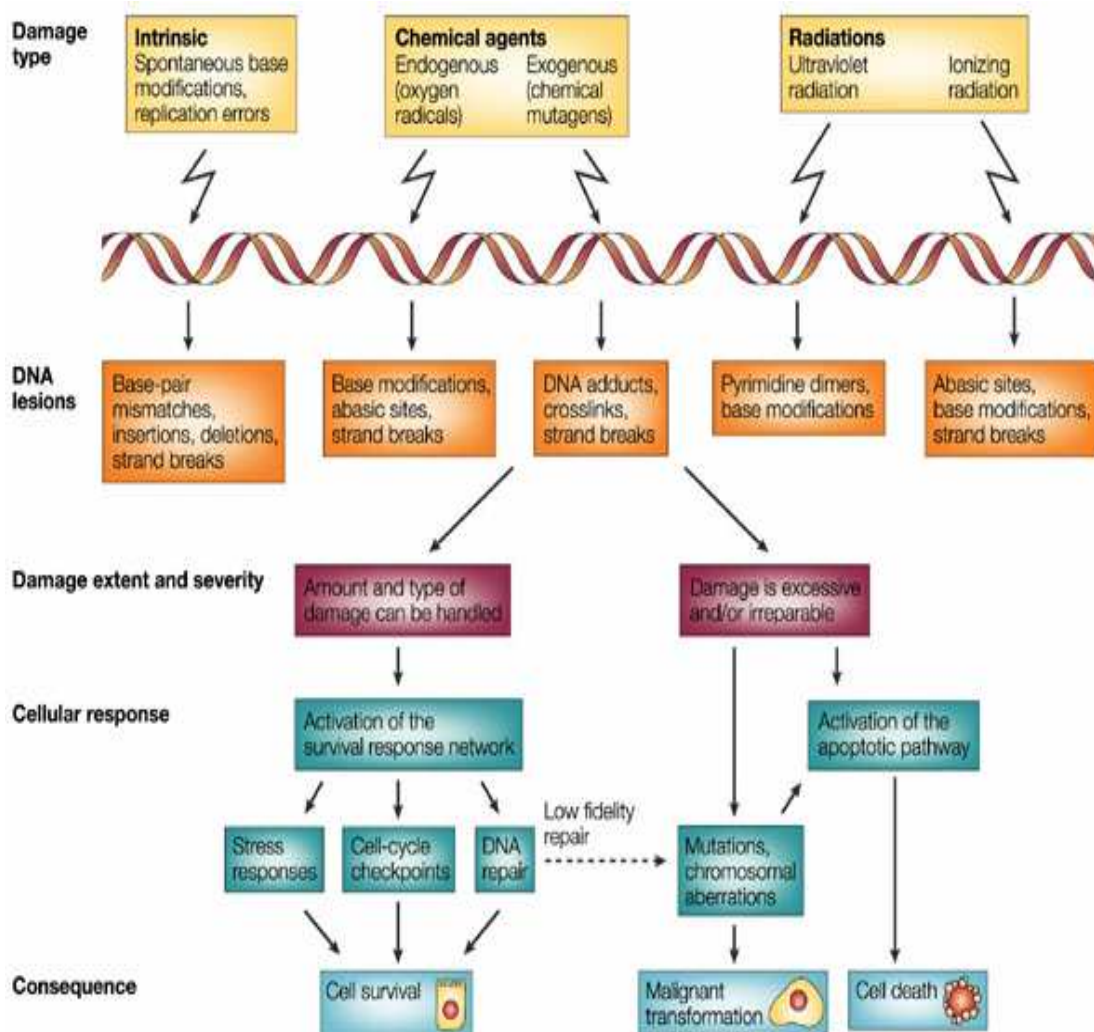


Figura 2: Le risposte cellulari al danno al DNA.

2.2 Definizione, cause e conseguenze dell'instabilità genomica

La risposta convenzionale di danno al DNA si manifesta nell'espressione del danno genomico nel primo o secondo ciclo cellulare dopo l'irradiazione, il termine "instabilità genomica indotta" (De La Chapelle and Peltomaki, 1995) descrive invece in modo generale una serie di fenomeni con cui il danno genomico e le sue conseguenze cellulari sono espressi persistentemente dopo irradiazione su molti cicli cellulari. Questa instabilità, come evidenziato in cellule in coltura, si manifesta sottoforma di un aumento nella frequenza di aberrazioni cromosomiche, di mutazioni geniche ed apoptosi/morte cellulare. I telomeri (estremità dei cromosomi) hanno acquisito una particolare importanza nello studio delle relazioni fra radiazioni ed instabilità genomica (Zhivotovsky and Kroemer, 2004). Infatti, le sequenze telomeriche sono coinvolte nel mantenimento della stabilità del cromosoma di certe regioni del genoma, sia in condizioni normali che in seguito ad irradiazione; si ipotizza che la lunghezza del telomero possa influenzare anche la radiosensibilità. (Meeker and De Marzo, 2004).

Le basi biologiche dell'instabilità genomica indotta, nelle sue diverse forme, non sono ancora ben chiarite. Alcuni dati biochimici suggeriscono il coinvolgimento dello stress cellulare e dei processi ossidativi; altri studi citogenetici implicano segmenti di DNA potenzialmente instabili che codificano per sequenze ripetute di DNA. Esistono due tipi di instabilità genomica: l'instabilità cromosomica (CIN) e l'instabilità da microsatellite (MIN). La CIN è l'alterazione sia nel numero sia nella struttura dei cromosomi nei genomi delle cellule cancerose. Le alterazioni cromosomiche strutturali sono la causa del tentativo sbagliato di riparare il danno al DNA, che probabilmente hanno perso le cellule tumorali. La MIN causa cambiamenti in centinaia di sequenze satellite situate in tutto il genoma cellulare. L'instabilità genomica è una caratteristica quasi universale delle cellule cancerose: essa è probabilmente necessaria perché una cellula accumuli sufficienti mutazioni da trasformarsi in cellula cancerosa.

L'instabilità genomica, nel cancro di tipo ereditario, si origina da mutazioni nei geni della riparazione del DNA e guida lo sviluppo del cancro come previsto dall'ipotesi del mutatore che afferma come l'instabilità genomica sia presente già nelle lesioni precancerose e porti all'insorgenza tumorale aumentando il tasso di mutazione spontanea (Nowell, 1976; Loeb, 1991). Differentemente, nei tumori sporadici non ereditari, le basi molecolari dell'instabilità genomica sono ancora da definire. Infatti, recenti studi di sequenziamento dei genomi dei tumori umani (Sjoberg et al. 2006; Wood et al. 2007; Ding et al. 2008; Jones et al. 2008; Parson et al. 2008) suggeriscono che le mutazioni nei geni della riparazione del

DNA non sono frequenti prima della terapia opponendosi all'ipotesi del mutatore per questi tipi di tumori. Invece, gli spettri di mutazioni del soppressore dei tumori TP53, che codifica per p53, di ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) e dell'inibitore della chinasi ciclica dipendente 2A (CDKN2A) sostengono il modello dello stress da replicazione del DNA indotto dagli oncogeni, che attribuisce l'instabilità genomica e le mutazioni in TP53 e ATM al danno indotto al DNA dagli oncogeni (Halazonetis et al. 2008).

2.3 La risposta cellulare al danno al DNA

L'intervento vero e proprio di riparazione della doppia elica nel contesto della sua organizzazione in cromatina è tuttavia solo la fase, per così dire centrale, della risposta della cellula nel suo insieme, alla presenza di danni al DNA.

La rete dei processi cellulari che vengono attivati in seguito al danno al DNA è conosciuta come DNA-Damage Response (DDR) ed è un meccanismo universale che coinvolge proteine altamente conservate dal lievito fino all'uomo. La DDR avviene per mezzo dell'azione, regolata in modo gerarchico a livello spazio-temporale, di sensori di danno, trasduttori del segnale ed enzimi della riparazione veri e propri o effettori.

Lo studio della DDR nel suo complesso, ha come obiettivo la comprensione dei meccanismi, mediante i quali la riparazione della doppia elica si integra nella fisiologia cellulare, con particolare riguardo alla modulazione dei processi di replicazione, trascrizione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. La trasduzione del segnale di danno al DNA implica l'attivazione concertata di due processi, uno consistente nella riparazione in senso stretto della doppia elica, l'altro nella modulazione del ciclo cellulare che favorisce il primo, impedendo la progressione del ciclo fino a quando non cessi la segnalazione del danno.

Le principali molecole di segnalazione coinvolte appartengono alla famiglia di proteine chinasi correlate alla fosfatidilinositol-3 chinasi (PIKK) e sono: ATM, ATR, ATX (autotaxin) e DNA-PK.

ATM viene attivata fondamentalmente in risposta a DSBs causate da radiazioni ionizzanti o composti radiomimetici, rileva DSBs durante la mitosi e la meiosi e rotture derivate dall'azione dei radicali liberi. ATM viene autofosforilata e dalla forma dimerica inattiva viene convertita nella forma monomerica attiva. La stimolazione di ATM sembra essere principalmente dovuta al riconoscimento del suo substrato, il complesso Mre11, che si lega ad ATM inducendone un cambiamento conformazionale che ne aumenta l'affinità verso ulteriori substrati. Il rilevamento e la segnalazione del danno al DNA sono mediati tramite

molecole a valle di ATM che è in grado di attivare molteplici e diverse pathways simultaneamente e fosforilare direttamente numerosi substrati inclusi p53, Chk1 e Chk2 che, a loro volta, attivano altre proteine che provocano l'arresto del ciclo cellulare e facilitano la riparazione del DNA. La proteina ATM, il suo coinvolgimento nella DDR e nella sindrome genetica ad essa correlata saranno trattati in un capitolo successivo.

ATR (Ataxia Telangiectasia Related) è una proteina chinasi che risponde principalmente a danni come quelli provocati da raggi ultravioletti, che inducono un arresto della forza replicativa. ATR viene richiamata sul sito di rottura e in seguito fosforila Chk1 e Chk2 inducendo l'arresto del ciclo cellulare.

La proteina chinasi dipendente dal DNA (DNA-PK) è un complesso multimerico costituito dalla subunità catalitica (DNA-PKcs) e dall'eterodimero Ku (Ku80 e Ku70). La subunità catalitica è critica per la riparazione del DNA tramite NHEJ ed è in grado di fosforilare diversi substrati comuni ad ATM.

L'assemblaggio dei complessi di riparazione sul sito di danno e l'attivazione della DDR generalmente vengono innescati dalla presenza di lesioni del DNA, ma recenti esperimenti in cellule di lievito e di mammifero hanno dimostrato che non è necessaria la presenza del danno per attuare i processi riparativi. Quando i componenti del complesso di riparazione sono immobilizzati sulla cromatina come le proteine di fusione repressore Lac (Lac repressor fusion proteins) si attiva una DDR completa, comprendente l'arresto del ciclo cellulare, anche in assenza di rotture al DNA. Questi esperimenti mostrano che non è la lesione al DNA "per se", ma piuttosto la formazione di un nucleo di foci di riparazione che attiva le chinasi trasduttrici del segnale, dopo averle legate; quindi il danno stesso non è essenziale per l'integrità del complesso di riparazione (Bonilla et al. 2008; Soutoglou and Misteli, 2008). In accordo con l'ipotesi di un'attivazione delle chinasi trasduttrici indipendente dalla lesione, la sovraespressione di un breve dominio della proteina che stimola ATR, TopBP1, porta all'attivazione di ATR, all'arresto del ciclo cellulare e alla senescenza cellulare in assenza di rotture al DNA (Toledo et al. 2008).

Ulteriori prove che avvalorano questa ipotesi provengono dall'osservazione che ATM viene rapidamente attivata in risposta a cambiamenti strutturali della cromatina dopo esposizione delle cellule ad un tampone leggermente ipotonico o in seguito a trattamento con il TSA, un inibitore delle istone deacetilasi che genera un globale rilassamento della cromatina (Bakkenist and Kastan, 2003). I cromosomi mitotici altamente condensati e le condizioni di ipossia sono in grado di attivare ATM e i pathways di segnalazione del danno in assenza di rotture del DNA (Bencokova et al. 2008). Tutte queste osservazioni fanno

emergere la possibilità che le proteine di riparazione non esplorano il genoma solamente in presenza di danni al DNA, ma anche in caso di cambiamenti nella conformazione della cromatina.

2.4 I meccanismi di riparazione del DNA

Le cellule hanno sviluppato meccanismi di riconoscimento e riparazione di vari tipi di danno al DNA, impedendo così la trasmissione di informazioni genetiche alterate alle cellule figlie dopo la divisione cellulare. Questi meccanismi di riparazione del DNA sono organizzati in processi a più fasi (pathways) che permettono il riconoscimento e la segnalazione del danno, portando all'arresto del ciclo cellulare per consentire la riparazione del danno stesso oppure, quando la lesione non sia riparabile, all'innescio del processo di morte per apoptosi. Questi processi sono estremamente importanti perchè impediscono alla cellula di replicarsi in presenza di danni; negli organismi multicellulari, viene in questo modo evitata la trasmissione di alterazioni del genoma che possono contribuire all'insorgenza del cancro (Huertas et al. 2009). Analogamente, i meccanismi di riparazione del DNA nelle cellule della linea germinale impediscono la trasmissione di alterazioni genetiche alla generazione successiva. Nei mammiferi esistono quattro principali vie di riparazione: riparazione per escissione dei nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, NER), riparazione per escissione delle basi (Base Excision Repair, BER), riparazione degli appaiamenti errati delle basi del DNA (MisMatch Repair, MMR) e riparazione per ricombinazione che include la riparazione per ricombinazione omologa (HR) e quella non omologa (NHEJ) (Figura 3) (Hoeijmakers, 2001; Migliore, 2004). In Figura 3(a), nella parte alta sono indicati i comuni agenti danneggianti; al centro sono riportati esempi di lesioni indotte da questi agenti; in basso sono citati i più importanti meccanismi di riparazione del danno al DNA. In Figura 3(b) sono rappresentati gli effetti deleteri del danno al DNA sulla progressione del ciclo cellulare che portano a un temporaneo arresto nelle fasi G1, S, G2 e M (in alto) e del metabolismo del DNA (al centro). Di seguito sono riportate le abbreviazioni pertinenti la Figura 3: *cis*-Pt e MMC, cisplatino e mitomicina C (agenti che inducono legamo crociati); (6-4)PP e CPD, 6-4 fotoprodotto e dimeri di pirimidina (indotti da UV); BER e NER, riparazione per escisione di basi e riparazione per escisione di nucleotidi; HR, ricombinazione omologa; EJ, ricongiungimento delle estremità.

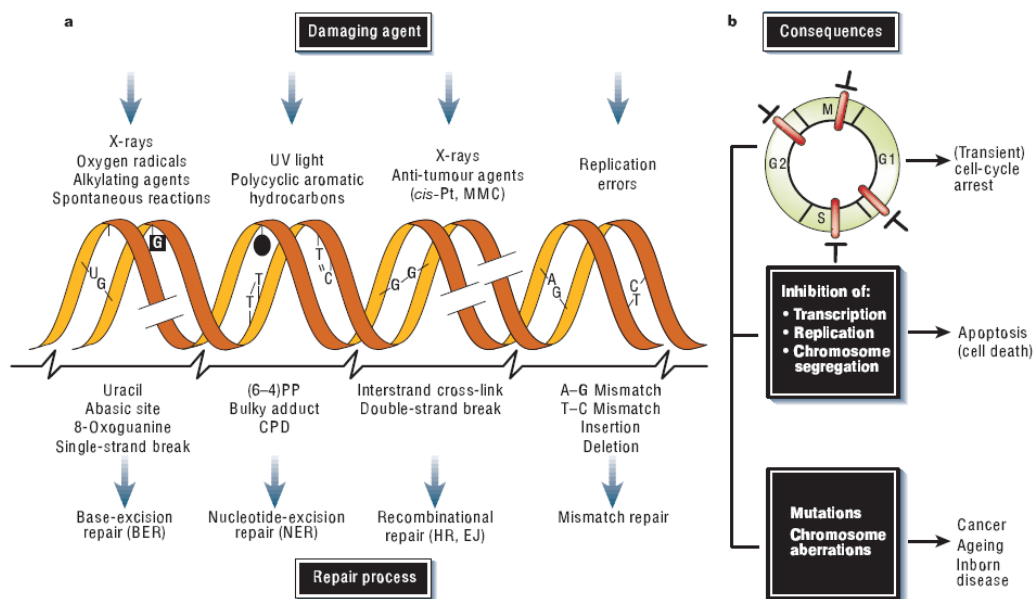


Figura 3: Meccanismi di riparazione del danno al DNA e conseguenze (Hoijsmakers, 2001): (a) comuni agenti danneggianti, danni indotti, meccanismi di riparazione; (b) fasi del ciclo cellulare e conseguenze del danno indotto.

Il NER è un sistema di riparazione efficace contro danni provocati da agenti esogeni quali i raggi UV ed è in grado di rimuovere lesioni che inducono una notevole distorsione nella molecola di DNA. I substrati più rilevanti del NER sono i dimeri di pirimidina (CPD) e i (6-4)fotoprodotto, ma anche altri come gli addotti ingombranti dovuti all'esposizione ad idrocarburi policiclici aromatici e i legami crociati inter- e intra-elica indotti da agenti antitumorali, come la mitomicina C, e da metaboliti cellulari. Il NER si attua tramite cinque tappe fondamentali: riconoscimento del danno; denaturazione locale del DNA e incisione del tratto danneggiato ad entrambi i lati della lesione; escissione dell'oligonucleotide contenente il danno; sintesi riparativa per colmare la discontinuità risultante utilizzando come stampo l'elica complementare integra; ligazione del tratto neosintetizzato alla molecola di DNA. Il NER ripara più velocemente i danni presenti sul filamento trascritto dei geni attivi, mentre quelli presenti sull'altro filamento e sulla restante parte del genoma sono rimossi più lentamente. Queste modalità d'intervento sono definite rispettivamente: riparazione accoppiata alla trascrizione (Transcription Coupled Repair, TCR) e riparazione globale del genoma (Global Genome Repair, GGR) (Tornaletti and Hanawalt, 1999).

Il BER è un meccanismo di riparazione efficiente deputato alla rimozione delle basi del DNA modificate conseguentemente ad eventi di deaminazione idrolitica, ossidazione e alchilazione. Queste modificazioni possono verificarsi a partire da processi endogeni legati al normale metabolismo cellulare o in seguito ad esposizione a cancerogeni ambientali o farmaci

chemioterapici. Il BER interviene anche nella riparazione di siti apurinici/apirimidinici (siti AP) che si formano per perdita spontanea delle basi e nella riparazione di rotture a singola elica del DNA provocate da esposizione ai raggi X. L'evento chiave del meccanismo molecolare alla base del BER è l'idrolisi del legame *N*-glicosidico tra la base alterata e il deossiribosio che determina il rilascio della base stessa; questa reazione è catalizzata da una classe di enzimi detti DNA glicosilasi. La modalità di azione di queste proteine prevede una diffusione facilitata dell'enzima coinvolto lungo il solco minore del DNA fino al riconoscimento di una base sospetta; l'enzima si lega quindi al DNA provocando una distorsione del filamento che presenta il danno; estroflette quindi la base e la inserisce in una sua tasca specifica per il riconoscimento ed effettua il taglio del legame glicosidico tra la base alterata e il deossiribosio. In questo modo si genera un intermedio AP che viene riconosciuto da una AP endonucleasi che incide il sito AP al 5' del fosfodeossiribosio e genera un gruppo 3'-OH che verrà utilizzato dalla polimerasi per inserire il nucleotide corretto. Il completamento della riparazione via BER può essere attuato secondo due modalità: short-patch e long-patch; la prima prevede la sostituzione della base danneggiata con risintesi di un solo nucleotide, la seconda porta alla rimozione e risintesi di un frammento di lunghezza variabile tra i due e i dieci nucleotidi (Mol et al. 1999).

Il MMR interviene nella rimozione di appaiamenti errati delle basi che sono sfuggite alla correzione da parte dell'attività esonucleasica 3'→ 5' delle DNA polimerasi; il MMR agisce anche su anse extra-elica che si formano in regioni ricche di nucleotidi ripetuti per scivolamento del filamento neosintetizzato o di quello che funge da stampo. Per ottenere una riparazione fedele, è necessario che il MMR sia in grado di riconoscere e processare il filamento di nuova sintesi contenente la base appaiata erroneamente o le anse extra-elica. Nel meccanismo di riparazione via MMR possono essere evidenziate quattro fasi principali: il riconoscimento dell'appaiamento errato delle basi (mismatch); il reclutamento dei fattori aggiuntivi che intervengono nel MMR; la ricerca di un segnale che identifichi l'elica danneggiata, seguita dalla degradazione della base mismatch; risintesi del tratto di elica escisso (Jirieny, 1998).

La riparazione delle DSBs viene effettuata da due principali sistemi: l'HR e il NHEJ. I processi di riparazione di HR e NHEJ (Figura 4, Figura 5 e Figura 6) competono l'uno con l'altro nella riparazione delle DSBs: la predominanza dell'uno o dell'altro meccanismo dipende dalla specie, dal tipo di cellule e dalla fase del ciclo cellulare. Generalmente, nelle fasi S e G2, quando è disponibile una copia identica del DNA costituita dal cromatidio fratello, prevale l'HR, mentre il NHEJ, poichè non richiede la presenza di lunghi tratti di

omologia e le estremità della lesione vengono semplicemente riunite, appare essere confinato nelle fasi G1 o S precoce (Kanaar et al. 2008). Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che il caso del NHEJ e dell'HR è un esempio relativamente semplice del modo in cui i differenti meccanismi di riparazione sono diversamente impiegati, competendo e anche collaborando per le stesse lesioni (Jong-Soo et al. 2005).

Nei paragrafi seguenti sono descritti i meccanismi di riparazione delle DSBs che vengono regolati da specifici fattori che ne determinano le modalità di azione.

2.5 Riparazione per riunione del singolo filamento

La riparazione per riunione del singolo filamento (SSA) è un meccanismo di riparazione delle DSBs non conservativo (error-prone) che avviene quando, nel sito di rottura della doppia elica, uno dei due filamenti a entrambi i lati della rottura viene degradato da parte di un'esonucleasi, il complesso MRN, in direzione 5'-3'; a questo evento segue il riappaiamento dei singoli filamenti in corrispondenza di sequenze ripetitive di DNA presenti a monte e a valle della DSB, ad opera di Rad52 e RPA, la rimozione delle code da parte di ERCC1/XPF, la risintesi tramite DNA polimerasi e la ligazione finale (Figura 4). Studi sul lievito indicano che le regioni di omologia possono essere separate al massimo da 15 Kb e regioni distanti meno di 400 bp hanno un'efficienza del processo pari al 100% (Sugawara et al. 2000).

L'SSA è la pathway maggiormente implicata in eventi di ricombinazione intracromosomale tra elementi ripetuti e anche tra due regioni di omologia su due cromosomi separati portando a volte a traslocazioni. Eventi intra e inter-cromosomali avvengono con la stessa frequenza dimostrando che l'attività di riunione non distingue tra due regioni dello stesso cromosoma e due regioni di due cromosomi diversi (Haber and Leung, 1996).

L'SSA è mediata dal gruppo delle proteine Rad52. In *Saccharomyces cerevisiae*, Rad51 non è indispensabile, mentre Rad52 e il suo omologo Rad59 sono essenziali, a meno che le regioni di omologia non siano molto grandi. Mutanti Rad52 del lievito mostrano un fenotipo compromesso per la riparazione delle rotture rispetto ai mutanti Rad51; Rad59, paralogo di Rad51, è richiesto per la ricombinazione intracromosomale Rad51-indipendente; i mutanti Rad59 sono sensibili alle radiazioni ionizzanti e il loro fenotipo di riparazione e ricombinazione può essere annullato dall'over-espressione di Rad52, indicando una sovrapposizione di funzione dei due geni.

Ad oggi ci sono molti dati contrastanti riguardo l'enzimologia della SSA nei mammiferi, tanto che potrebbero esserci diverse pathways, totalmente o parzialmente indipendenti tra loro.

La proteina Rad52 forma strutture a cerchio eptameriche con un diametro di circa 130 Å e una cavità centrale; l'importanza biologica di queste strutture ancora non è ben chiara ma dalle osservazioni al microscopio elettronico condotte da Van Dick e collaboratori si nota la presenza di cerchi di Rad52 alle estremità del DNA e questo suggerisce che queste strutture corrispondano al sito attivo di Rad52 durante l'SSA (Van Dick et al. 2001).

Nella pathway SSA definito long-homology le estremità del DNA sono tagliate da un'esonucleasi, molto probabilmente il complesso MRN, a produrre lunghe protrusioni a singolo filamento; le sequenze omologhe sono appaiate e le estremità che protrudono vengono rimosse dalla nucleasi ERCC1/XPF (Adair et al. 2000). Questa pathway non necessita di Rad51 ma richiede Rad52, che si lega alle estremità del DNA e taglia le DSBs formando, come detto precedentemente, le strutture a cerchio eptameriche, che promuovono l'associazione tra le estremità di DNA complementari. L'enzimologia di questa pathway, definita microhomology, è meno conosciuta. Studi *in vitro* suggeriscono che questo tipo di riparazione inizi con il taglio in direzione 3'-5', seguito dall'appaiamento, allineamento e ligazione. MRE11 sarebbe implicato nello step di degradazione in virtù della sua capacità di allineare le due estremità del DNA e digerire l'estremità 3'-5' fermandosi quando incontra una regione di microomologia tra le due sporgenze in 5' del DNA. Diversi studi *in vitro* e *in vivo* suggeriscono che il meccanismo della SSA basato sulla microomologia non necessiti di Ku (Chen et al. 2001), mentre altri sostengono che avvenga in presenza di questa proteina (Liang et al. 1996).

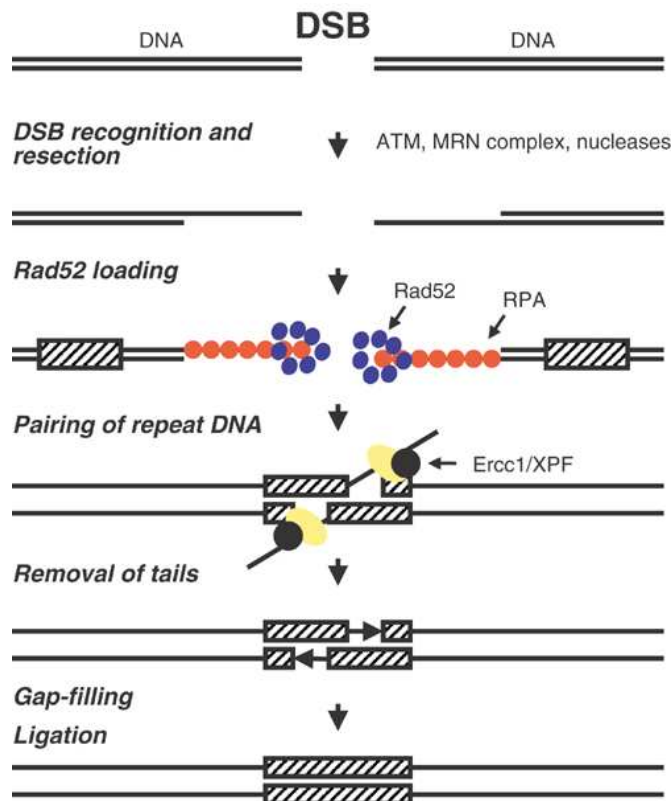


Figura 4: Riparazione per riunione del singolo filamento (Single Strand Annealing) in cui sono visibili le varie tappe: riconoscimento delle DSB, processamento di Rad52, accoppiamento delle sequenze omologhe, rimozione della coda terminale e ligazione.

La dipendenza dal ciclo cellulare della SSA nella riparazione delle DSBs indotte da radiazioni non è ancora stata ben determinata. Frankenberg-Schwager e collaboratori hanno utilizzato cellule di hamster cinese normali, AA8, e cellule difettive per SSA (UV41), mutate nel gene XPF e hanno confrontato la sopravvivenza dopo esposizione delle cellule in fase G1 o in fase S all'azione dei raggi X e particelle α . Quando irraggiate in fase G1, le cellule UV41 e le cellule della linea parentale normale mostrano la stessa sensibilità alle radiazioni e la popolazione cellulare diminuisce all'aumentare della dose di radiazioni, suggerendo che la SSA non giochi un ruolo rilevante nella fase G1. Al contrario, un danno da radiazioni, siano esse raggi X o particelle α , indotto in fase S, determina una letalità più accentuata nella linea cellulare UV41 rispetto alla linea parentale (oltreché rispetto all'irraggiamento in fase G1). Questi risultati suggeriscono che la SSA sia importante nell'aumentare la sopravvivenza di cellule in fase S riparando DSBs semplici o complesse (Frankenberg-Schwager et al. 2009).

2.6 Riparazione per ricongiunzione delle estremità interrotte (NHEJ)

Il NHEJ è un meccanismo di riparazione delle DSBs error-prone che non necessita di omologia di sequenza. E' il meccanismo predominante nelle cellule di mammifero (Kanaar et al. 1998), soprattutto nella fase G1 del ciclo cellulare. La sua pathway non è richiesta solamente per riparare le DSBs indotte da agenti esogeni, ma è richiesta anche per processare gli intermedi generati durante la ricombinazione V(D)J, responsabile della generazione della varietà anticorpale nei vertebrati (Lewis, 1999). Uomini e topi che hanno una compromissione nei meccanismi di ricombinazione V(D)J sviluppano una grave immunodeficienza combinata (Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID).

Studi genetici con cellule di mammifero radiosensibili e difettive nella riparazione delle DSBs sono stati utili per identificare le proteine coinvolte nel processo di riparazione NHEJ. Inizialmente, sono state selezionate numerose linee mutanti in geni diversi identificate con le sigle XRCC4-7. Successivamente, è stato dimostrato che ciascuno di questi geni codificava per una delle proteine implicate nel processo di riparazione.

Il meccanismo generale prevede il coinvolgimento dell'eterodimero Ku, formato da due subunità Ku70 (codificato da XRCC6) e Ku80 (codificato da XRCC5), che lega le estremità del DNA, le allinea e le protegge dalla degradazione. Ku inoltre recluta alle DSBs la subunità catalitica di una proteina chinasi DNA-dipendente, o DNA-PKcs (codificata da XRCC7) e l'eterodimero XRCC4/ligasi IV, responsabile della chiusura finale della DSB. Gli effettori nel processo NHEJ sono completati da altri fattori utilizzati nel processamento della lesione (Artemis, Tdp1, PNKP) e da polimerasi (probabilmente la polimerasi μ) utilizzate nello step di risintesi.

La DNA-PKcs agirebbe fosforilando diversi substrati, tra cui XRCC4, favorendo in tal modo il corretto posizionamento al sito della lesione del dimero XRCC4/ligasi IV, e se stessa in un processo di autofosforilazione propedeutico al suo allontanamento e all'accessibilità dei fattori di processamento della lesione (Figura 5).

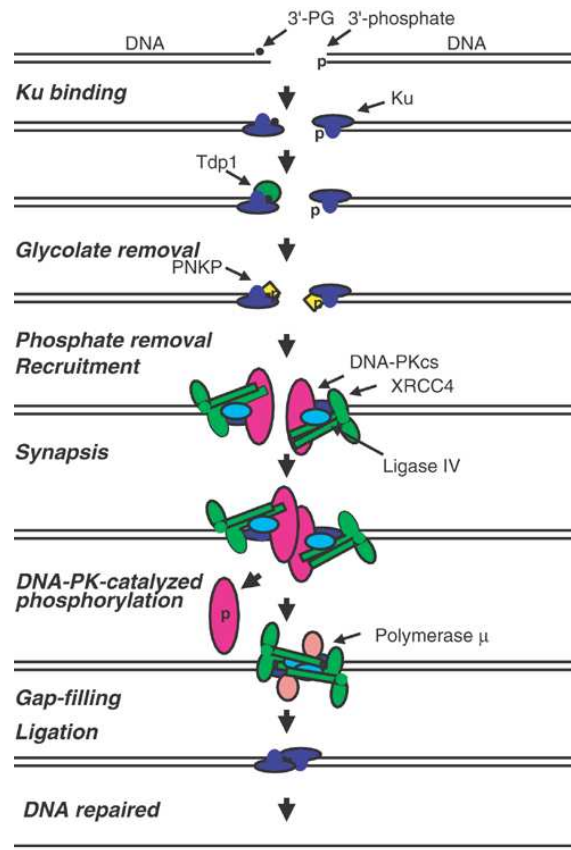


Figura 5: Riparazione per ricongiunzione delle estremità interrotte in cui sono visibili i vari passaggi: legame di KU70, reclutamento del complesso Dna-PKcs/ DNA ligasi IV e ligazione, ricongiunzione delle estremità.

Il primo modello di topo mutante nel NHEJ che è stato identificato fu il mutante SCID (Bosma et al. 1983); questo topo presentava una mutazione spontanea che impediva la formazione di cellule B e T mature; il fenotipo SCID è causato da una mutazione nel gene *Prkdc*, che codifica per la DNA-PKcs, risultando in una delezione dell'amminoacido 83 C-terminale della proteina stessa e nella sintesi di una variante ipomorfa con ridotta funzione enzimatica.

Topi mutanti nella DNA-PKcs sviluppano tumori delle cellule T. Inoltre, fibroblasti embrionali di topo (MEFs), ma non cellule staminali embrionali (ES), DNA-PKcs^{-/-} sono sensibili alle radiazioni ionizzanti. Quest'ultima osservazione suggerisce che le cellule ES utilizzino principalmente una pathway riparativa diversa dalla NHEJ, che diventerebbe il meccanismo prevalente nelle cellule più differenziate (Gao et al. 1998).

Topi Ku70^{-/-} e Ku80^{-/-}, prodotti con tecniche di ingegneria genetica, mostrano un fenotipo più compromesso: peso corporeo ridotto alla nascita, crescita rallentata, aspettativa di vita ridotta e un marcato aumento delle aberrazioni cromosomiche. I fibroblasti che derivano

da questi topi mutanti mostrano una precoce senescenza, indice di difetti proliferativi e sono sensibili alle radiazioni ionizzanti (Gu et al. 1997).

Nei topi mutanti per la DNA ligasi IV non avviene la ricombinazione V(D)J e la linfopoiesi è bloccata (Frank et al. 1998). Embrioni difettivi per XRCC4 mostrano morte per apoptosi dei neuroni post-mitotici generati nello sviluppo del sistema nervoso, hanno una crescita ritardata e i loro fibroblasti in coltura vanno incontro a senescenza prematura (Gao et al. 2000).

È stato constatato che cellule ES deficienti in Artemis non sono sensibili alle radiazioni ionizzanti (Brugmans et al. 2007); questa osservazione, in accordo con quanto riportato nello studio su cellule ES DNA-PKcs^{-/-} citato precedentemente (Gao et al. 1998) suggerisce che tali cellule usino meno la NHEJ per riparare le DSBs oppure che la proteina Artemis giochi un ruolo solo in alcuni eventi legati a questo meccanismo di riparazione.

Il NHEJ è il meccanismo elettivo di riparazione nella fase G1 del ciclo cellulare; effettivamente linee cellulari difettive nel NHEJ mostrano massima sensibilizzazione a radiazioni ionizzanti a basso LET quando irraggiate in fase G1 (Takata et al. 1998; Frankenberg-Schwager et al. 2009). Questo dato è sostenuto anche da recenti esperimenti condotti con la tecnica dell'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) che mostrano come Ku preferisce legarsi alle estremità del DNA in fase G1 (Rodrigue et al. 2006).

La riparazione di lesioni complesse, come quelle indotte in fase G1 da radiazioni ad alto LET, sembra invece essere, almeno in parte, dilazionata alla successiva fase S/G2, ad opera di meccanismi di riparazione ricombinazionali (Frankenberg-Schwager et al. 2009). A questo proposito recentemente è stato proposto un modello di riparazione delle DSBs definito trans-S (Delacote et al. 2008), nel quale cellule mutanti per NHEJ superano il checkpoint G1/S senza aver riparato le DSBs indotte in fase G1, sulle quali interverrebbe un meccanismo di tipo ricombinazionale in fase S/G2; poiché in questo caso anche il cromatidio fratello risulterebbe, dopo la replicazione, portatore di una lesione allo stesso locus, la riparazione ricorrerebbe a regioni di omologia ectopiche risultando pertanto altamente "error prone".

Recenti studi hanno comunque accertato che l'HR è coinvolto solo in tarda fase S e G2 mentre il NHEJ agisce in tutte le fasi del ciclo cellulare: infatti, le evidenze sperimentali dimostrano un aumento di radiosensibilità in cellule NHEJ difettive, irraggiate in tutte le fasi del ciclo (Pfeiffer et al. 2000; Rothkamm et al. 2003).

Questi ed altri dati suggeriscono in definitiva che il ricorso della cellula ad uno o l'altro meccanismo di riparazione non sia immodificabile e, pur esistendo scelte preferenziali, la stessa lesione possa essere riparata con modalità diverse, anche in relazione alla

funzionalità (geneticamente determinata) dei diversi meccanismi di riparazione. Questa problematica è tuttora oggetto di intense ricerche finalizzate a chiarire se, e in quale misura, la scelta dei meccanismi di riparazione sia “hard-wired”, cioè rigidamente determinata, secondo un termine derivato dal gergo informatico (Wang et al. 2001). E’ anche possibile che a questo proposito ci siano differenze non solo tra eucarioti superiori ed inferiori, ma anche tra linee cellulari di mammifero e di pollo, entrambe largamente utilizzate come modelli sperimentali. Queste questioni possono assumere rilevanza anche per lo sviluppo di farmaci antitumorali che inibiscano selettivamente uno dei pathways di riparazione.

Prima di concludere, è opportuno citare anche una serie di recenti evidenze sperimentali che hanno portato gli autori a proporre l’esistenza, accanto ad un meccanismo di NHEJ dipendente dall’azione di DNA-PK (D-NHEJ), di un meccanismo di “back-up” (B-NHEJ), anch’esso di tipo non ricombinazionale (Wang et al. 2001; Iliakis et al. 2004). Il D-NHEJ sarebbe un meccanismo evolutivamente più recente che assicurerebbe alla cellula una riparazione molto veloce della DSB grazie all’azione di orchestrazione del processo fornita dalla DNA-PK. Il B-NHEJ consiste, invece, di un meccanismo più antico e più lento, conservato come una sorta di ruota di scorta, che tuttavia, proprio per la sua lentezza, comporterebbe una maggiore probabilità di riparazioni “error prone”. Alcuni autori suggeriscono inoltre l’esistenza di un meccanismo di riparazione non ricombinazionale, distinto dal D-NHEJ, che richiederebbe l’intervento della proteina Parp-1 (in tal modo implicata nella riparazione delle DSB oltrechè, come noto delle SSB) e l’utilizzo di sequenze di microomologia al sito della rottura (Audebert et al. 2008).

2.7 Riparazione per ricombinazione omologa (HR)

L’HR è un altro meccanismo di riparazione delle rotture, considerato error-free (esente da errori), che utilizza sequenze omologhe di circa 200 paia di basi per ristabilire l’integrità del DNA. Molti dei geni coinvolti in questo processo appartengono al gruppo epistatico di Rad52, come Rad50, Rad51, omologo eucariotico della recombinasi RecA di *Escherichia coli*, Rad54, Rad52 stesso, XRCC2, XRCC3, oltre ai geni per la predisposizione al cancro BRCA1, BRCA2 e altri geni come NSB1, MRE11 (Frankenberg-Schwager et al. 2009).

L’HR è il meccanismo di riparazione predominante nei batteri e nel lievito (Kanaar et al. 1998) e agisce soprattutto nelle fasi S e G2 del ciclo cellulare nelle cellule di mammifero (Frankenberg-Schwager et al. 2009). L’HR può essere divisa concettualmente in tre stadi (Figura 6) (Tan et al. 2003; Heyer et al. 2006):

1. Pre-sinapsi;
2. Sinapsi;
3. Post-sinapsi.

Durante il primo stadio avviene la degradazione nucleolitica in direzione 5'→3' (definita "resection" con la produzione di una lunga estremità a singolo filamento (3' ssDNA ends). Tale reazione è catalizzata dal complesso MRN, che ha attività esonucleasica.

Le code di DNA a singola elica sono rivestite dal complesso RPA (replication protein A) reclutato in prossimità delle lesioni pochi minuti dopo il complesso MRN. Il probabile ruolo di RPA è quello di eliminare le strutture secondarie dal filamento a singola elica per favorire la sua associazione con le molecole di Rad51. A questo processo partecipa anche la proteina BRCA2 che si lega ai siti di rottura grazie all'aiuto di BRCA1 e la proteina Rad52 che forma le strutture a cerchio eptameriche che interagiscono sia con il singolo filamento del DNA che con la doppia elica; a Rad52, si unisce anche Rad54 con la sua attività ATPasica permettendo il cambiamento della topologia del DNA per facilitare l'accesso agli altri fattori coinvolti nella riparazione.

Durante lo stadio di sinapsi, il complesso formato dal filamento nucleo proteico con Rad51 è capace di ricercare la sequenza del locus omologo e di "invadere" la relativa doppia elica (reazione detta "strand invasion") portando alla formazione della "giunzione di Holliday"; a questo punto la coda di 3' ssDNA è utilizzata come primer per la sintesi del tratto di DNA che è andato perso durante la fase di "resection" utilizzando la sequenza omologa come stampo.

Infine allo stadio di post-sinapsi, si hanno due possibilità:

1. Non avviene il crossing-over, si scioglie la giunzione di Holliday, i filamenti di DNA si appaiano e le interruzioni vengono riempite;
2. Avviene il crossing-over con risoluzione della giunzione di Holliday e le interruzioni vengono riempite portando alla formazione di due copie complete di DNA.

Questo ultimo step è compiuto ad opera di DNA polimerasi e ligasi che provvedono alla polimerizzazione e alla ligazione.

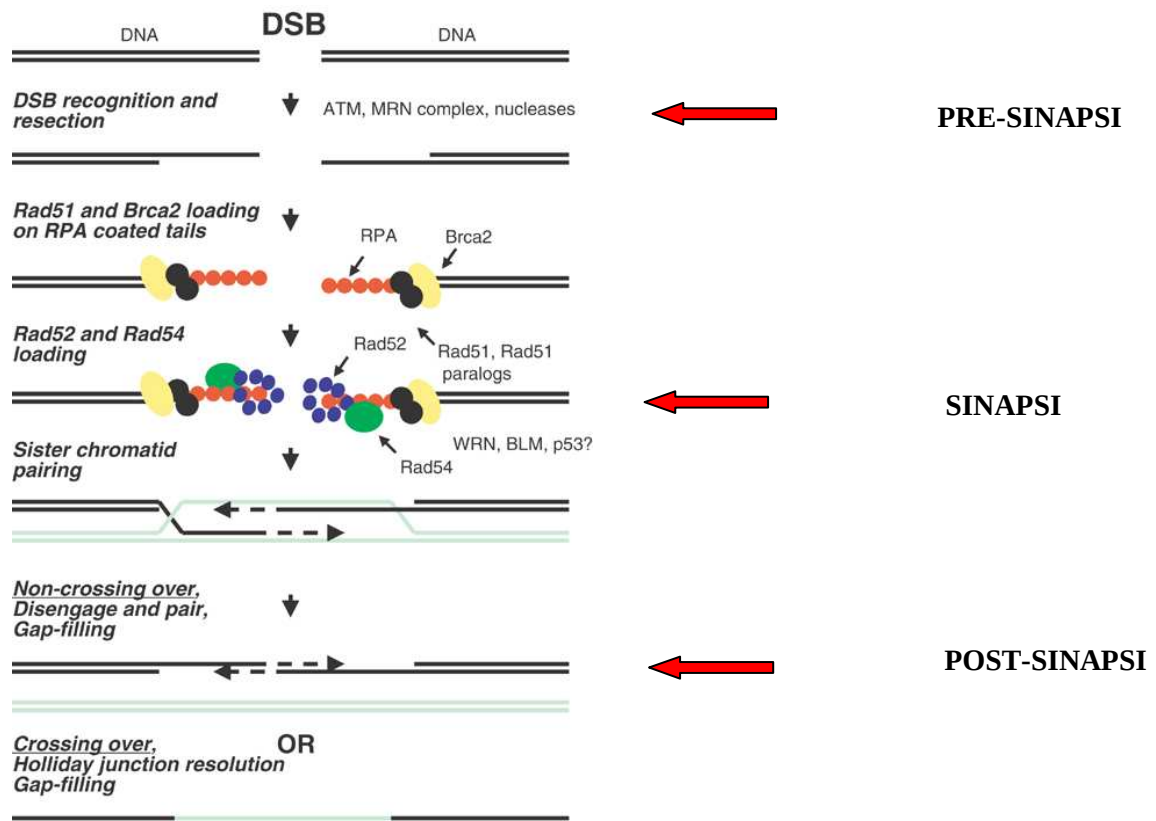


Figura 6: Ricombinazione omologa in cui è evidente il coinvolgimento dei diversi fattori nelle tre diverse tappe: pre-sinapsi, sinapsi e post-sinapsi.

I fenotipi associati a mutazioni “null” nei geni codificanti i diversi fattori implicati nel processo HR sono variabili, in funzione della relativa ridondanza genetica (Brugmans et al. 2007).

Rad51 è la proteina chiave del processo HR, conservata dal lievito all’uomo. Embrioni di topo difettivi in Rad51 non sopravvivono. Cellule DT40 di pollo knockout per Rad51 accumulano aberrazioni cromosomiche che limitano la loro capacità proliferativa.

Al contrario, la perdita di Rad52 nei mammiferi non porta ad un fenotipo aberrante, ma gli embrioni di topo sono vitali. Queste osservazioni suggeriscono che nel caso di Rad52 geni paraloghi possono vicariarne la funzione, come dimostrato da un esperimento con cellule DT40, nel quale si osservava letalità per il doppio mutante Rad52 $-/-$ XRCC3 $-/-$, mentre i singoli mutanti erano vitali (Fujimori et al. 2001).

In lievito sono stati identificati due geni paraloghi di Rad51: Rad55 e Rad57. Nei vertebrati sono stati identificati 5 geni paraloghi: XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad51D. Nelle cellule di pollo, tutti i mutanti in questi geni sono vitali, ma esibiscono instabilità genomica, moderata radiosensibilità e marcata sensibilità all’induzione di legami crociati (ad esempio per effetto della mitomicina C) (Takata et al. 2001). A differenza dei

risultati ottenuti nelle cellule DT40, la distruzione dei paraloghi Rad51 nei topi porta a letalità embrionale come accade per i topi knockout per Rad51.

Il complesso MRN, che consiste di Rad50, Mre11 e Nbs1, gioca un ruolo importante in vari aspetti della risposta cellulare alle DSBs, soprattutto nell'agganciare le estremità del DNA ai lati della DSB. In *S. cerevisiae*, mutazioni nei componenti il complesso mostrano effetti sulla ricombinazione meiotica e nella HR tra cromatidi fratelli in cellule mitotiche. Negli eucarioti superiori il complesso MRN è essenziale per la vitalità cellulare: cellule DT40 di pollo con mutazioni "null" in MRE11 mostrano una ridotta funzionalità dell'HR e arresto proliferativo associato con alti livelli di aberrazioni cromosomiche; nei mammiferi, mutazioni nei geni Mre11, Rad50 e Nbs1 risultano letali nelle cellule staminali embrionali (una rassegna dei lavori originali è riportata da Brugmans et al. 2007).

La maggior parte dei lavori di letteratura dimostra che, come atteso in base al meccanismo dell'HR basato sulla disponibilità di sequenze di omologia rappresentate dal cromatidio fratello, questa pathway di riparazione agisce principalmente nelle fasi S/G2 del ciclo cellulare di cellule mitotiche, oltre che durante la ricombinazione meiotica (Rothkamm et al. 2003; Frankenberg et al. 2009).

Una visione diversa (Iliakis et al. 2004) attribuisce all'HR un ruolo molto secondario nelle cellule di vertebrati, nelle quali prevarrebbero pathways basate sul NHEJ (vedi paragrafo precedente) e l'HR entrerebbe in gioco solo in una fase successiva alla chiusura della DSB per ripristinare la sequenza corretta.

CAPITOLO 3: LA PROTEINA CHINASI ATM E L'ATASSIA-TELANGEICTASIA

3.1 Introduzione

L'Atassia Telangectasia (AT), o Sindrome di Louis-Bar, è una patologia neurodegenerativa che si presenta precocemente nell'infanzia ed appartiene ad un gruppo di malattie umane globalmente conosciute come: "Sindromi ad instabilità genomica"; ciascuna di queste patologie è prodotta dalla risposta difettiva ad una specifica lesione del DNA. I difetti genetici riguardano specifici meccanismi di risoluzione di uno o più tipi di danno al DNA, e danno origine ad una sindrome caratterizzata da particolari combinazioni sintomatologiche di varia entità quali: degenerazione tissutale, ritardo nella crescita e nello sviluppo, invecchiamento precoce, instabilità cromosomica, sensibilità ai corrispettivi agenti di danno al DNA e predisposizione all'insorgenza di cancro. In aggiunta, altre disfunzioni caratterizzano questa malattia, tra cui immunodeficienza, atrofia del timo e delle gonadi ed elevata predisposizione allo sviluppo di leucemie e linfomi.

I pazienti AT presentano movimenti non coordinati (atassia), spesso associati a dilatazione dei vasi sanguigni degli occhi (telangectasia). La principale manifestazione neurologica dell'AT è una progressiva ed inesorabile degenerazione della corteccia cerebellare, con una marcata perdita delle cellule del Purkinje e dei granuli; caratteristiche dell'AT sono inoltre il danneggiamento del sistema del movimento extrapiramidale e una neuropatia periferica. L'AT è una malattia multisistemica, ma è in primo luogo una malattia neurodegenerativa. Mentre il difetto nella risposta al danno al DNA potrebbe spiegare la risposta cellulare difettosa alle rotture del DNA nelle cellule AT e diverse caratteristiche della malattia, è stato concettualmente difficile mettere in relazione ciò con il sintomo evidente dell'AT, la progressiva degenerazione neuronale (Biton et al. 2006). Inoltre, è presente un'estrema sensibilità alle radiazioni ionizzanti ed alle sostanze radiomimetiche che producono rotture a doppia elica nel DNA (McKinnon, 2004). Questa patologia unisce la maggior parte delle caratteristiche di una risposta difettiva al danno al DNA, che individua chiaramente nella DSB, la lesione che provoca questi difetti. Infatti, cellule in coltura da pazienti AT mostrano una generale incapacità nel rispondere alle DSBs. L'identificazione del gene ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), la cui mutazione è causa della malattia, ha

sostenuto una rapida progressione nella comprensione delle basi molecolari di questa malattia. Inoltre, le manifestazioni cliniche e il fenotipo cellulare che è causato dalla perdita della funzione di ATM, collocano chiaramente questa proteina al vertice della cascata di risposta alle DSBs (Savitsky et al. 1995; Shiloh, 2003). L'AT è una patologia autosomica recessiva che può essere provocata da più di 400 distinte mutazioni nel gene ATM; queste consistono in piccole mutazioni, inserzioni e cambiamenti di un singolo nucleotide e spesso conducono a difetti di splicing. Circa l'85% di queste mutazioni determina la mancata espressione della proteina o l'espressione di forme tronche e non funzionali. In pochi casi i pazienti AT presentano livelli normali di proteina, ma in questi casi essa è difettiva nella sua attività enzimatica. Gli eterozigoti presentano invece un'espressione ridotta di ATM, indicando che entrambi gli alleli contribuiscono alla produzione della proteina. E' stato inoltre osservato che nonostante i livelli di mRNA specifico siano spesso abbondanti nei pazienti AT, la proteina mutata è instabile e prontamente condotta alla degradazione (Teraoka et al. 1999; Becker-Catania et al. 2000).

3.2 Struttura e funzione di ATM

Il gene ATM che ha ~66 esoni codifica una proteina di circa 370 kDa, che appartiene ad una famiglia di proteine conservate, la maggioranza delle quali possiede attività serina treonina chinasi. Tutte queste proteine contengono un motivo che è tipico delle fosfatidil inositolo 3-chinasi (PI3K), da cui sono state chiamate "PI3K-like protein Kinases" (PIKKs); queste preferenzialmente fosforilano proteine piuttosto che lipidi (Shiloh, 2003). Il dominio PI3K contiene il sito catalitico delle proteine chinasi attive della famiglia delle PIKKs. La proteina ATM è caratterizzata anche dalla presenza di altri domini strutturali (Figura 7): il dominio FAT, posto all'N-terminale del dominio chinasi, e conservato tra i membri della famiglia PIKK nelle proteine FRAP, ATR e TRRAP ed il dominio FATC, di 33 amminoacidi, posto al C-terminale della proteina. Recenti lavori dimostrano il ruolo cruciale di questi domini nella regolazione dell'attività catalitica di ATM (Bakkenist and Kastan, 2003; Jiang et al. 2006). Infatti, il dominio FAT contiene la serina 1981, sito che viene autofosforilato durante l'attivazione di ATM, consentendone così la dissociazione da omodimero inattivo a monomero attivo (Bakkenist and Kastan, 2003). Il dominio FATC invece media l'interazione tra ATM e l'istone acetiltransferasi 10 Tip60, che ne regola l'attivazione in seguito a danno al DNA (Jiang et al. 2006). La funzione della grande regione N- terminale della proteina è invece pressoché sconosciuta, anche se è noto che una sua porzione è necessaria ad ATM per

regolare la risposta cellulare al danno al DNA (Turenne et al. 2001; Fernandes et al. 2005); essa contiene, infatti, siti di interazione con importanti substrati, quali p53, BRCA1 e c-Abl (Shafman et al. 1997; Khanna et al. 1998; Gatei et al. 2000). Le proteine chinasi attive di questa famiglia, che risulta essere ampiamente conservata dai lieviti ai mammiferi, sono in grado di rispondere a vari tipi di stress mediante fosforilazione di proteine chiave nelle corrispondenti vie di risposta. Possono quindi interessare numerosi processi, a seconda dello spettro dei loro substrati. Nei mammiferi quattro PIKKs sono coinvolte nella risposta al danno al DNA: la DNA-PK, ATM, ATR ed ATX. Mentre ATM e DNA-PK rispondono principalmente alle rotture a doppia elica del DNA, ATR ed ATX rispondono sia al danno da luce ultravioletta che a rottura a doppia elica ed ATR anche al blocco delle forche di replicazione. mTOR/FRAP è invece l'unica chinasi attiva di questa famiglia che non è coinvolta nella risposta al danno al DNA; è invece implicata nella risposta alle variazioni dei livelli di nutrienti ed agli stimoli mitogeni. (Shiloh, 2003). È localizzata soprattutto nel nucleo, ma è stata ritrovata anche in vescicole citoplasmatiche.

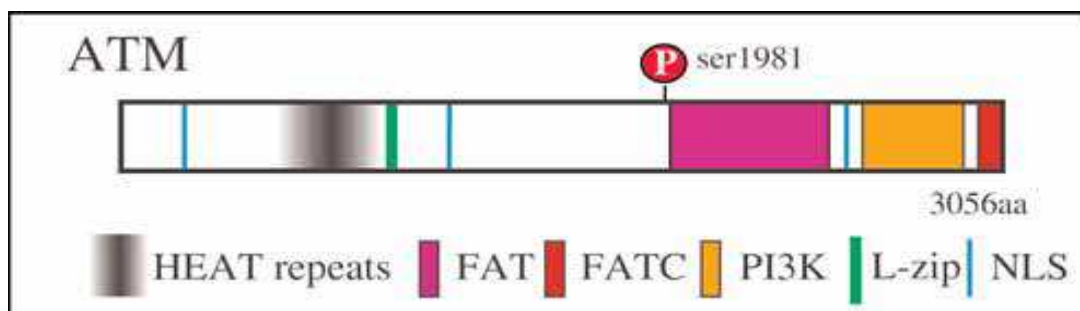


Figura 7: Struttura e domini del gene ATM. Le linee in blu indicano i segnali di localizzazione nucleare (NLS). Le linee in verde indicano le regioni con dominio a zip di leucina.

3.3 Funzione di ATM nella risposta alla rottura a doppio filamento del DNA

Nel caso di induzione di DSBs nel DNA il primo e principale trasduttore è ATM che trasmette il messaggio attraverso la fosforilazione di proteine substrato. In particolare, l'attività della chinasi ATM modula l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione o la risposta apoptotica nel caso in cui il danno sia molto esteso, così da prevenire la replicazione del DNA in presenza di DNA danneggiato (D'Amours and Jackson, 2002). Il complesso MRN (MRE11-RAD50-NBS1) è stato individuato come il mediatore essenziale per il reclutamento e l'attivazione di ATM a livello dei siti delle DSBs (Lee and Paull, 2005). MRE11 è una proteina capace di legarsi al DNA che possiede attività esonucleasica 3'-5' oltre ad un'attività

endonucleasica rivolta alle forcelle di replicazione del DNA. RAD50 è un membro della famiglia SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) e forma omodimeri che si associano a due molecole MRE11 per formare complessi tetramericici MRE11-RAD50 denominati “MR complex”. I due bracci del complesso suddetto permettono al tetrametro di inserirsi tra le estremità libere del DNA oppure tra i cromatidi fratelli. Il terzo componente del complesso MRN, NBS1, presenta una regione capace di legare direttamente ATM, ed è necessario per il reclutamento di ATM a livello dei siti di danno (Lee and Paull, 2005). Inoltre, ATM colocalizza e fosforila rapidamente l’istone H2AX (γ -H2AX), a livello del residuo di Ser139, lo stesso residuo riconosciuto e fosforilato anche da altre due chinasi appartenenti alla famiglia delle PIKK, ossia ATR e DNA-PK (Rogakou et al. 1998). Tale fosforilazione recluta direttamente MDC1 (Mediator of DNA-damage Checkpoint protein 1), che amplifica la fosforilazione di H2AX, probabilmente tenendo legato a se ATM, oppure agendo in modo da impedire la defosforilazione dell’istone (Stucki and Jackson, 2006). MDC1 e H2AX permettono che sul sito di danno vengano reclutati altri fattori addizionali; in questo modo vengono coordinati i processi di formazione degli IRIF (Ionizing Radiation-Induced Foci). Tali formazioni sono “foci”, rilevabili a livello del sito di taglio su doppio filamento indotti dall’azione di radiazioni ionizzanti (Andegeko et al. 2001). A livello degli IRIF, H2AX e MDC1 reclutano 53BP1 un mediatore che agisce durante la fase di ricombinazione e che recluta a sua volta CHK2 e p53, attivandole. Queste ultime, a loro volta, attivano altre proteine che provocano l’arresto del ciclo cellulare e facilitano la riparazione del DNA (Figura 8).

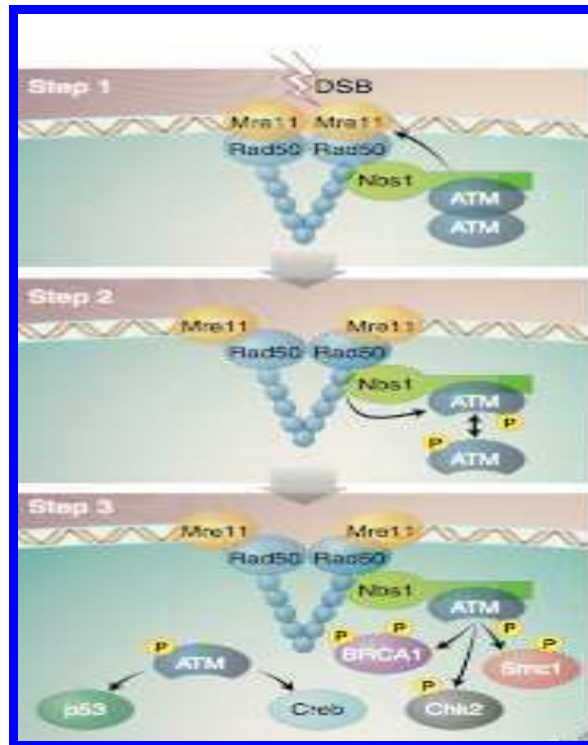


Figura 8: ATM nella risposta cellulare alle DSBs. Step1 L'induzione di una lesione di tipo DSB sulla doppia elica di DNA comporta il repentino reclutamento del complesso MNR. Tale complesso forma un ponte tra le estremità libere del DNA tramite i bracci *coiled-coil* del dimero Rad50. I dimeri inattivi di ATM vengono reclutati a livello della DSB tramite l'interazione con la regione C-terminale di NBS1, in aggiunta all'interazione meno stabile con Rad50. **Step2** L'attività 3'-5' esonucleasica di MRE11 catalizza la reazione che porta alla formazione di ssDNA. A questo punto viene inviato il segnale di attivazione ai dimeri di ATM probabilmente tramite cambiamento conformazionale di NBS1. ATM si autofosforila in Ser1981 e da dimero passa alla forma di monomero attivo. Il complesso dovrebbe quindi promuovere un ulteriore cambiamento conformazionale di ATM che stimoli il reclutamento dei substrati. **Step3** Monomeri attivi di ATM rimangono sia vicino ai siti delle DSBs (dove fosforilano i substrati colocalizzati) sia diffondono al di fuori di questi siti per fosforilare i substrati nucleari come p53 e CREB. Tratto da (Abrham et al. 2004).

3.4 Funzioni di ATM alternative alla trasduzione del segnale attivata da danno al DNA

ATM aiuta la cellula a mantenere la propria stabilità genomica secondo un meccanismo diverso da quello promosso dal danno al DNA. Negli ultimi anni si sono accumulate diverse prove riguardo le funzioni fisiologiche svolte dalla chinasi ATM. ATM sembra essere legata al controllo del mantenimento della lunghezza e dell'integrità dei telomeri. I telomeri sono delle strutture specializzate poste alle estremità dei cromosomi, che possiedono diverse funzioni tra le quali: salvaguardare l'integrità genomica, mantenere la

capacità proliferativa cellulare e controllare l'attivazione dei checkpoints del ciclo cellulare. Pandita e collaboratori (1996) riscontrarono che cellule derivanti da pazienti AT sono caratterizzate da instabilità telomerica; frutto di tale instabilità sono le associazioni telomeriche, definite come chromosome end-to-end association che si osservano quando le cellule AT entrano in metafase. Nelle cellule AT è stato riscontrato inoltre un accorciamento delle sequenze telomeriche, anch'esso attribuito al mancato funzionamento della chinasi ATM (Pandita and Dhar, 2000). Nonostante numerosi lavori sostengano l'ipotesi che ATM sia una proteina prevalentemente nucleare coinvolta nella trasduzione di segnali relativi al danno al DNA e che regolano il macchinario di controllo del ciclo cellulare, alcune pubblicazioni dimostrano che ATM è anche una proteina citosolica. In particolare, la quantificazione della proteina presente nei differenti compartimenti dopo frazionamento, dimostrano che circa il 20% della proteina è nei microsomi e l'80% nel nucleo; la conferma di tale localizzazione subcellulare si è avuta anche mediante colorazione specifica in microscopia elettronica (Watters et al. 1997). Inoltre, una funzione citoplasmatica per ATM, è stata osservata in alcuni tipi cellulari in cui il trattamento con insulina ne attiva l'attività chinasi e stimola la fosforilazione della proteina di regolazione traduzionale 4E-BP1. Questa osservazione fornisce un potenziale collegamento per l'insulino-resistenza osservata nei pazienti con l'ataxia telangectasica (Yang and Kastan, 2000). Inoltre, nel citoplasma, ATM localizza alle vescicole, interagendo con la β -adaptina, uno dei componenti del complesso AP-2, che è coinvolto nell'endocitosi dei recettori mediata da clatrina. Questa interazione tra ATM e le proteine associate alle vescicole potrebbe svolgere un ruolo importante nella regolazione delle vescicole stesse o nel trasporto di proteine nei neuroni. Disfunzioni in questi percorsi possono contribuire alla progressiva degenerazione cerebellare nei pazienti AT (Lim et al. 1998). Comprendere il ruolo di ATM nel sistema nervoso è fondamentale per una completa conoscenza della malattia, sebbene rimanga ancora molto lavoro sperimentale da svolgere. Le funzioni di ATM sono state studiate principalmente in colture di cellule proliferanti, in cui un ruolo importante della risposta al danno al DNA è quello di attivare il controllo del ciclo cellulare. In linea di principio, questi checkpoint non sono attivati nella fase post-mitotica delle cellule. E' stato dimostrato che in un modello neuronale umano differenziato in coltura, in cui ATM è in prevalenza nucleare la risposta mediata da ATM alle DSBs è simile a quelle delle cellule in proliferazione. Inoltre, l'eliminazione di ATM in queste cellule non interferisce con il differenziamento neuronale, ma abolisce la risposta al danno al DNA, concludendo che ATM nucleare media la risposta alle DSBs in maniera simile a quello delle cellule in proliferazione (Biton et al. 2006). Ma perchè quindi una proteina importante per

l'arresto del ciclo cellulare e per la riparazione del DNA è necessaria nel sistema nervoso? Una possibilità è che ATM agisca come una componente di vie che rilevano ed avviano la riparazione, o eliminano molecole danneggiate tra cui proteine, lipidi e il DNA. In questo contesto, si può prevedere un ruolo per ATM dopo il completamento dello sviluppo del cervello, quando la maggior parte delle cellule sono postmitotiche (e quindi non richiedono una funzione di controllo del ciclo cellulare), ma possono richiedere ATM per attivare riparazioni macromolecolari. Così, in sua assenza la riparazione non si verifica e, di conseguenza, le cellule potrebbero degenerare. Un sostegno a favore di questa ipotesi viene da alcuni lavori che evidenziano danni a proteine e lipidi, indotti da radicali liberi (Barlow et al. 1999) o una minore capacità di sopravvivenza e funzionalità in seguito a stress ossidativo in topi *Atm* ^{-/-} (Chen et al. 2003). Un'altra possibilità è che, durante lo sviluppo, ATM funzioni come una molecola che, direttamente o indirettamente attivi il controllo del ciclo cellulare o la riparazione in precursori neurali in proliferazione. In questo scenario, l'assenza di ATM può provocare l'accumulo di alterazioni genetiche in precursori neuronali ancora in divisione mitotica prima di formare cellule mature all'interno del cervello.

Tali anomalie potrebbero manifestarsi più tardi come neurodegenerazione (Allen et al. 2001). In alcuni tessuti postmitotici neuronali è stato anche osservato che ATM è in prevalenza citoplasmatica. Questi risultati suggeriscono che ATM potrebbe avere un ulteriore ruolo nel differenziamento neuronale e la sopravvivenza cellulare e che la sua assenza possa portare ad anomalie negli organelli citoplasmatici come riflesso di un aumento del numero dei lisosomi (Oka and Takashima, 1998; Barlow et al. 2000). Infine, in una pubblicazione di Wu e collaboratori (2006) è stato dimostrato che ATM può traslocare nel citosol in seguito alla fosforilazione e legarsi alla proteina NEMO, una subunità regolatoria del complesso IKK che svolge un ruolo centrale nella regolazione del fattore di trascrizione NF-kappaB. Sebbene il ruolo della chinasi ATM nel citosol rimanga poco chiara, la comprensione di questa funzione potrebbe aiutare a spiegare come mutazioni del gene ATM possano causare molteplici effetti nel fenotipo AT. Infatti, un ruolo di ATM nella segnalazione intracellulare e nel citosol è stato suggerito da diversi cambiamenti fenotipici osservati in cellule AT, come ad esempio l'alto livello di fattori di crescita necessari per la proliferazione cellulare (Shiloh et al. 1982), l'insulino-resistenza in pazienti AT (Bar et al. 1978), e l'alterata regolazione dei livelli di actina citoscheletrica nelle cellule AT (McKinnon and Burgoyne, 1985). Inoltre, un accumulo di vescicole lipidiche citoplasmatiche e un aumento del numero di lisosomi in cellule di pazienti AT è stato osservato mediante microscopia elettronica (Schoonderwaldt et al. 1973), suggerendo un alterato metabolismo lipidico o un'alterata attività enzimatica lisosomiale.

Così, sebbene ATM sia attivato con maggiore efficacia da radiazioni e agenti radiomimetici, le grandi dimensioni della proteina e le sue molteplici localizzazioni subcellulari suggeriscono che esso possa avere più di una funzione (Kurz and Lees-Miller, 2004).

3.5 Attivazione di ATM

ATM si trova prevalentemente nel nucleo delle cellule in divisione e risponde rapidamente alle DSBs fosforilando numerosi substrati. Il segno distintivo della risposta di ATM è un rapido aumento della sua attività chinastica immediatamente successivo alla formazione delle DSBs. Evidenze sperimentali indicano che l'attivazione di ATM (Figura 9) può comportare l'autofosforilazione. Un grande passo avanti nella comprensione di questo processo è derivato dalla pubblicazione di Bakkenist e Kastan (2003), che hanno dimostrato che le molecole di ATM sono inattive in cellule integre e sono mantenute in questa condizione come dimeri o multimeri di ordine superiore. In questa configurazione, il dominio chinastico di ogni molecola è bloccato dal dominio FAT degli altri. In seguito al danno al DNA, ogni molecola ATM fosforila le altre in un residuo di serina in posizione 1981 all'interno del dominio FAT; questa fosforilazione rilascia le due molecole di monomeri pienamente attivi. Pochi minuti dopo l'induzione anche di un numero esiguo di DSBs, si attiva la maggior parte delle molecole di ATM.

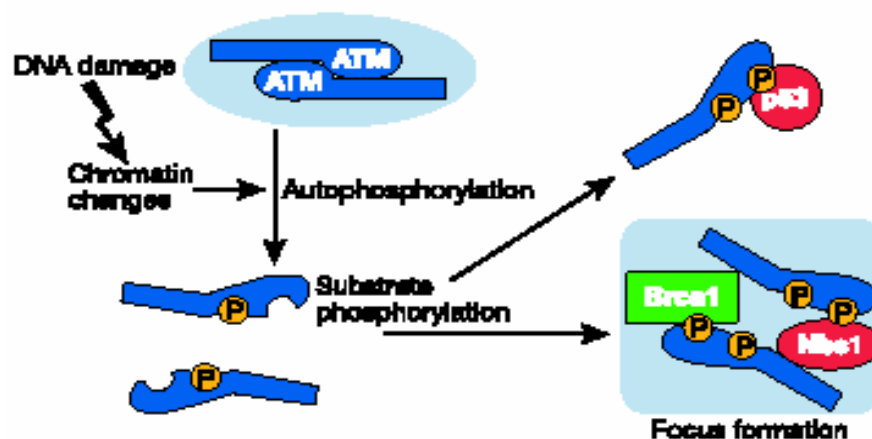


Figura 9: Modello schematico dell'attivazione di ATM dopo irradiazione. Le DSBs portano ad un'alterazione della struttura della cromatina che provoca l'autofosforilazione del dimero di ATM sulla serina1981 e una conseguente dissociazione del dimero. I monomeri attivati di ATM sono allora liberi di migrare e fosforilare i loro substrati (qui: p53, Nbs1 e Brca1).

3.6 Meccanismo di attivazione di ATM

Ci sono diverse ipotesi riguardo il meccanismo molecolare attraverso cui viene attivato ATM in seguito a danno al DNA. Bakkenist e Kastan forniscono la prova che il segnale di attivazione per ATM potrebbe essere la modifica della cromatina piuttosto che il contatto diretto di ATM con le rotture del DNA (Bakkenist and Kastan, 2003). Mentre non è ancora chiaro se sia la rottura del doppio filamento di DNA di per sé o il cambiamento conformazionale della cromatina derivante dalla rottura ad avviare il processo di attivazione di ATM, meglio descritti sono altri eventi connessi con questo processo (Figura 10). NBS1 (un componente del complesso Mre11) è convenzionalmente ritenuto essere un substrato a valle di ATM. NBS1 viene reclutata presso le DSBs dalla interazione diretta dei suoi domini FHA/BRCT con l'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX). Attraverso l'interazione con il dominio C-terminale legante hMRE11 della nibrina, due altre proteine, hMRE11 e hRAD50, vengono richiamate dal citoplasma al nucleo ai siti delle DSBs e il complesso multimerico NBS1/hMRE11/hRAD50 (N/M/R) forma foci ai siti di danno del DNA. Il complesso lega il DNA, ha attività nucleasica, è essenziale per la normale sensibilità alle radiazioni e sembra avere un ruolo nel processamento e nella riparazione delle lesioni. Almeno due diverse sequenze SQ della nibrina, in particolare i residui di serina 278 e 343, vengono fosforilate da ATM in risposta alla formazione di DSBs. NBS1 agisce nella cascata di attivazione ATM-dipendente dei checkpoint del ciclo cellulare, forse come modificatore/adattatore del segnale in pathway multipli. Il checkpoint in fase S è mediato da due vie parallele, una delle quali coinvolge ATM, NBS1 e SMC1. Nbs1 sembra anche modulare la fosforilazione da parte di ATM di altri substrati, quali p53 e Chk2, nel controllo delle transizioni in fase G1/S e G2/M.

Tuttavia recenti studi suggeriscono che NBS1/MRN potrebbe funzionare a monte di ATM, reclutando ATM in prossimità della sede del danno al DNA ed attivandone la sua funzione enzimatica (Uziel et al. 2003). In aggiunta al reclutamento del complesso MRE11, per l'attivazione di ATM sono inoltre necessarie una serie di modifiche post-traduzionali. Oltre all'importanza della fosforilazione in serina 1981 vi è anche la prova che la defosforilazione di ATM influenza la sua attività enzimatica. Goodarzi e collaboratori (2004) hanno dimostrato che l'acido ocadaico, inibitore delle protein fosfatasi, induce l'autofosforilazione della serina 1981 di ATM in cellule non irradiate, a concentrazioni che inibiscono l'attività *in vitro* della proteina fosfatasi 2A (PP2A). Inoltre, risulta che la subunità catalitica e di scaffolding della PP2A co-immunoprecipita con ATM in cellule irradiate, mentre è dissociato dal complesso dopo l'irradiazione. Questi risultati suggeriscono che PP2A associa con ATM in cellule non danneggiate mantenendolo in uno stato inattivo. Inoltre Sun e

collaboratori (2005) ha suggerito un ruolo diretto per l'istone acetiltransferasi TIP60 nell'attivazione di ATM in risposta al danno al DNA. ATM in cellule non stressate sembra essere associato attraverso il dominio FATC con TIP60. In seguito a danno al DNA, TIP60 è attivato ed acetila direttamente ATM; questo evento è correlato con l'attivazione della chinasi.

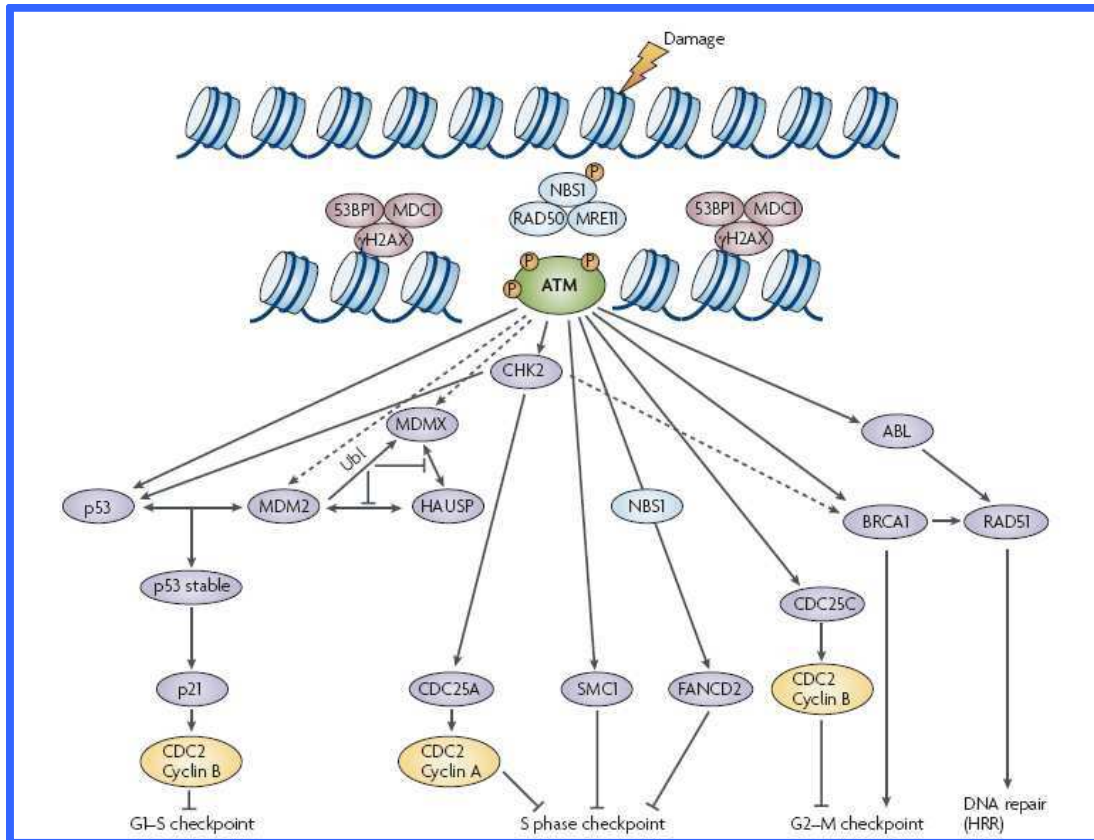


Figura 10: Attivazione a monte di ATM e rete di risposta a valle in seguito a DSB (Lavin, 2008).

3.7 Principali substrati di ATM

La fosforilazione ATM-mediata incrementa o reprime l'attività dei suoi substrati, interessando così specifici processi in cui queste proteine sono coinvolte (Figura 10). Simile ad altre PIKKs attive (con l'eccezione di mTOR/FRAP), ATM ha come bersaglio residui di serina o treonina seguita da glutammina (il motivo "SQ/TQ") (Traven and Heierhorst, 2005). La conoscenza dei substrati di una protein chinasi è essenziale per la comprensione delle sue funzioni biologiche. Così, quando ATM è stata identificata come membro della famiglia delle PIKK, in grado di fosforilare una varietà di substrati coinvolti nella segnalazione delle DSBs, è stato evidente il suo ruolo chiave nel controllo del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA

e nell'apoptosi. Uno dei primi processi che iniziano dopo l'induzione delle DSBs è la massiva fosforilazione di una variante di una proteina istonica chiamata H2AX.

Un altro importante substrato di ATM dopo danno al DNA è p53. Le cellule AT sono difettive in tutti i checkpoint del ciclo cellulare (Beamish and Lavin, 1994). ATM svolge un complesso ruolo di regolazione del checkpoint G1/S, S e G2/M, fosforilando direttamente i suoi substrati o attivando altre chinasi e garantendo il rigido mantenimento dei checkpoint mediante un controllo a più livelli. Ciò è dimostrato per il checkpoint G1/S. Quando Kastan e collaboratori (1992) hanno dimostrato un difetto nella stabilizzazione di p53 in risposta all'esposizione alle radiazioni, p53 è emerso come un mediatore di cruciale importanza nel checkpoint G1/S. Gli stessi, in precedenza, avevano dimostrato che le radiazioni esercitano la loro influenza sul checkpoint G1/S, ritardando il passaggio delle cellule alla fase S, al fine di facilitare la riparazione del DNA (Kastan et al. 1991). E' noto ormai che ATM fosforila p53 sulla serina 15 ed è responsabile di altre fosforilazioni di p53 che contribuiscono all'efficienza della sua attivazione trascrizionale (Banin et al. 1998), responsabile dell'attivazione del checkpoint G1/S o dell'induzione dell'apoptosi (Lavin and Gueven, 2006).

ATM fosforila ed attiva anche CHK2, una chinasi del checkpoint G2/M che fosforila p53 sulla serina 20 (Bartek et al. 2001). Ciò interferisce con l'interazione p53-MDM2. La proteina oncogenica MDM2 è un inibitore diretto ed indiretto di p53, poichè agisce da ubiquitina ligasi su p53, mediandone la sua degradazione attraverso il proteosoma. ATM fosforila anche direttamente MDM2 in serina 395, interferendo con l'esportazione nucleare del complesso p53-MDM2 e, di conseguenza, con la degradazione di p53 (Khosravi et al. 1999). Inoltre, è stato riferito che la fosforilazione di p53 in serina 46, importante per attivare il programma apoptotico, in seguito a radiazioni ionizzanti è regolata da ATM, il quale agisce come regolatore della proteina HIPK2 (Dauth et al. 2007; Rinaldo et al. 2007). Questa serie di modifiche dipendenti da ATM che attivano e stabilizzano p53, illustrano, anche se forse non completamente, l'elaborato modo in cui ATM gestisce un unico effettore, e indica che potrebbe regolare effettori diversi all'interno della stessa via di trasduzione del segnale. La maggior parte di queste vie di trasduzione non sono state completamente caratterizzate ed il coinvolgimento dei substrati di ATM in esse è stato dedotto semplicemente dalla mancata attivazione di specifici checkpoint in seguito all'abolizione della fosforilazione ATM mediata di queste proteine. E' possibile che tali proteine abbiano un duplice ruolo nei processi a monte ed a valle di ATM. Questo è il caso di NBS1: da un lato, si tratta di un componente del complesso MRN che è ritenuto essere coinvolto nella risposta iniziale alla DSB; dall'altro lato, si tratta di un effettore a valle di ATM, in una via di controllo

Così l'emergente complessità dei rapporti tra ATM ed i suoi substrati sta disegnando nuovi complessi schemi di risposta al danno al DNA, che si discostano da quelli tradizionali più lineari ed assegnano a diverse proteine più del ruolo 'a monte' o 'a valle' in questo schema.

L'elenco dei substrati di ATM pubblicati è ben lungi dall'essere completo, e molte risposte dipendenti da ATM probabilmente coinvolgono substrati di ATM attualmente sconosciuti. Inoltre, recentemente Matsuoka e collaboratori (2007) hanno eseguito un'analisi proteomica su vasta scala di proteine fosforilate in risposta al danno al DNA su siti consenso riconosciuti da ATM e ATR ed hanno identificato più di 900 siti di fosforilazione che riguardano più di 700 proteine. Le proteine che sono state identificate dagli autori sono state classificate mediante analisi ontologica. L'analisi funzionale di questi dati ha indicato che le proteine identificate sono in prevalenza coinvolte nella risposta al danno al DNA. E' interessante osservare però che sono state individuate anche un numero cospicuo di proteine e di reti non precedentemente collegati a tale risposta. Queste informazioni delineano uno scenario molto più ampio rispetto a quello precedentemente stimato ed aprono nuove prospettive di indagine sulle risposte al danno al DNA nei mammiferi.

3.8 ATM nel sistema immunitario

Come le altre sindromi ad instabilità genomica, l'AT è una disfunzione predisponente al cancro. La maggiore suscettibilità al cancro nei pazienti AT è associata all'assenza della risposta ai danni al DNA, che si traduce nell'instabilità genomica (Khanna and Jackson, 2001). Tuttavia, nonostante il sistema nervoso sia fortemente interessato nell'AT, i tumori che si riscontrano in questa sindrome sono principalmente linfomi e leucemie (Taylor et al. 1996; Gummy-Pause et al. 2004). Questa caratteristica clinica è in accordo con il ruolo centrale di ATM nella gestione delle DSBs generate durante lo sviluppo del sistema immunitario (Starczynski et al. 2003; Matei et al. 2006). Il controllo dei danni al DNA ed il controllo della riparazione delle DSBs sono necessarie per preservare l'integrità del genoma durante la ricombinazione V(D)J, un processo necessario per riorganizzare i segmenti dei geni delle cellule B e del recettore delle cellule T (TCR). Sebbene responsabile dell'enorme diversità del sistema immunitario, la rottura dei cromosomi e la ricongiunzione durante la ricombinazione V(D)J contribuisce alla trasformazione oncogenica nel contesto di un controllo difettivo nella riparazione dei danni al DNA. Così, difetti nelle proteine coinvolte nella ricongiunzione dopo rotture indotte dalla ricombinazione V(D)J preclude la generazione di recettori per gli antigeni, compromettendo profondamente lo sviluppo di cellule B e T e provocando gravi

carenze immunitarie. E' interessante notare che le mutazioni che colpiscono la risposta al danno al DNA portano ad un maggiore aumento di incidenza di leucemie e linfomi rispetto ad altri tumori, suggerendo che i linfociti in via di sviluppo siano particolarmente vulnerabili alle conseguenze oncogeniche di tali mutazioni (Revy et al. 2005). In particolare, topi che non esprimono ATM mostrano una sorprendente predisposizione a neoplasie linfoidi ed in particolare linfomi del timo, in seguito ai quali muoiono nel primo anno d'età (Shiloh, 2001; Shiloh and Kastan, 2001).

3.9 Ruolo di ATM nella tumorigenesi

Il mantenimento dell'integrità genomica è fondamentale per prevenire l'insorgere di una neoplasia. In questa ottica, un efficiente apparato di risposta al danno al DNA è da considerarsi come una barriera inducibile contro la progressione tumorale. Questo meccanismo di risposta regolato da ATM è stato osservato principalmente nel contrastare la progressione tumorale negli stadi precoci di sviluppo. Infatti, in diversi campioni clinici di tessuti provenienti da varie fasi di tumori umani della vescica urinaria, della mammella, del polmone e del colon, già le prime lesioni precursori pre-tumoral (ma non i tessuti normali), esprimono i marcatori di una attiva risposta al danno al DNA. Questi includono la fosforilazione della chinasi ATM e Chk2, dell'istone H2AX e di p53. Simili risposte sono state indotte in cellule in coltura mediante l'espressione di differenti oncogeni che deregolano la replicazione del DNA. E' stato quindi postulato che già nelle fasi precoci della tumorigenesi (prima dell'instabilità genomica e della conversione in tumore maligno), le cellule attivano una rete di risposta al danno al DNA che ritardi o impedisca la progressione tumorale. Le mutazioni che compromettono questo controllo, tra cui i difetti della via di ATM-Chk2-p53, potrebbero consentire la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, una maggiore instabilità genomica e la conseguente progressione del tumore (Bartkova et al. 2005; Bartek et al. 2007). Una gran parte della letteratura sulle mutazioni del gene ATM ed il cancro tratta degli eterozigoti portatori di mutazioni nel gene in questione. Per più di due decenni, ATM ha suscitato l'interesse degli epidemiologi a causa dell'osservazione della predisposizione al cancro tra i portatori eterozigoti di mutazioni ATM. Questi studi hanno evidenziato un'elevata incidenza di tumori maligni, in particolare del cancro al seno, tra i membri sani delle famiglie con un paziente AT (Khanna, 2000).

Considerando la stima dell'1-2% della frequenza di portatori di una mutazione ATM nella popolazione generale, questa osservazione ha importanti implicazioni per la salute

pubblica. Le mutazioni ATM portano, nella maggior parte dei casi, a prodotti proteici incompleti ed instabili; questi alleli quindi non riescono affatto a produrre ATM. I portatori di tali mutazioni hanno quindi un livello ridotto di proteina ATM funzionale. Altre mutazioni AT portano a sostituzioni amminoacidiche (mutazioni missenso) o delezioni in frame, che producono una proteina cataliticamente inattiva. Nelle cellule dei portatori di queste mutazioni si osservano sia molecole di ATM funzionali sia inattive, in vari rapporti. Un meticoloso studio dei tipi di mutazioni di ATM nelle famiglie AT, con alta incidenza di tumori ha rivelato un'alta frequenza di mutazioni missenso (Stankovic et al. 1998). L'importanza delle mutazioni missenso nella predisposizione al cancro nei portatori di mutazione ATM, può essere spiegato con l'effetto di dominante negativo della forma inattiva della proteina, che porta ad una riduzione della funzione di ATM. Ulteriori elementi di prova dell'importanza delle mutazioni missenso di ATM che causano alterazioni genomiche è venuto dalla ricerca di mutazioni somatiche di ATM in tumori umani sporadici. In particolare, le alterazioni del gene ATM, e soprattutto mutazioni missenso, sono state riscontrate frequentemente nelle neoplasie linfoidi degli adulti (Gumy-Pause et al. 2004). La perdita di eterozigosi in 11q22-23 (dove è localizzato il gene ATM) è un evento frequente nei tumori linfoidi sporadici e numerosi studi hanno segnalato una netta prevalenza di alterazioni del gene ATM in diverse malattie linfoproliferative, aggiungendo elementi di prova all'ipotesi di un contributo di ATM nella patogenesi di questi tumori (Bullrich et al. 1999; Stankovic et al. 1999; Camacho et al. 2002). Più di recente sono state esaminate alterazioni del gene ATM nelle leucemie acute dell'infanzia e nei linfomi di Hodgkin. Sono state riscontrate frequentemente varianti missenso di ATM nella linea germinale (Gumy-Pause et al. 2003; Liberzon et al. 2004) e due studi hanno dimostrato che alcune delle varianti si sono rilevate patogeniche, codificando una proteina funzionalmente anomala. Esaminando il gene ATM in bambini con Corea di Huntington (HD) per cercare singoli polimorfismi nucleotidici (SNP), è stata trovata una correlazione con specifiche mutazioni ed un fattore di rischio genetico per i linfomi di Hodgkin pediatrici (Oguchi et al. 2003; Takagi et al. 2004). Questi risultati suggeriscono che ATM possa essere anche coinvolto nella patogenesi delle neoplasie linfoidi infantili. Recentemente Renwick et al. (2006), studiando 443 famiglie con tumore della mammella e 521 controlli hanno dimostrato che mutazioni ATM conferiscono agli eterozigoti un rischio relativo di 2,37 di sviluppare cancro. ATM è quindi un fattore minore di suscettibilità genetica al cancro della mammella.

Queste osservazioni inoltre sembrano riconciliare il dibattito sul ruolo delle mutazioni ATM nella predisposizione genetica al cancro (Stankovic et al. 1998; Gatti et al. 1999;

Khanna, 2000), e collocano il gene che codifica per la proteina ATM nell'elenco dei geni che sono coinvolti nella insorgenza del cancro nella popolazione generale.

3.10 Mutazioni di ATM e stress ossidativo

Studi recenti hanno dimostrato che, in assenza di ATM, il controllo del livello dei ROS nella cellula è compromesso. Tutti i dati sono sostenuti da quattro evidenze sperimentali: un'anomala risposta delle cellule AT agli agenti che inducono danno ossidativo; anomalie nei livelli di espressione o nella funzione dei sistemi antiossidanti in queste cellule; evidenze di un aumentato stress ossidativo nei tessuti di individui AT; la presenza di una reazione continua allo stress ossidativo, che può essere mitigata dall'impiego di antiossidanti. Tuttavia, mentre è stato ampiamente dimostrato che le cellule AT soffrono di stress ossidativo costante, e che questa condizione è responsabile di una parte del fenotipo clinico, non è ancora chiaro il meccanismo che sta alla base di questo fenomeno.

Secondo le ultime scoperte la proteina ATM potrebbe agire regolando lo stato “redox” della cellula in modo diretto ed indiretto. ATM potrebbe regolare direttamente l'espressione di geni codificanti proteine che combattono il danno ossidativo o modificare l'attività di queste proteine attraverso modificazioni post-traslazionali (es. fosforilazione). Le modificazioni post-traslazionali potrebbero essere eseguite da ATM stessa o da altri enzimi, in modo ATM-dipendente. ATM stessa, inoltre, potrebbe essere un sensore del livello di ROS nell'ambiente cellulare.

È interessante notare però che la regolazione dello stato “redox” della cellula avviene soprattutto nel citoplasma e che ATM è stata osservata anche al di fuori del nucleo in cellule di cervelletto (Oka and Takashima, 1998). Una elevata porzione di ATM citoplasmatico è stata ritrovata nei perossisomi (Watters et al. 1999). Anche l'attività dell'enzima catalasi risulta difettiva in cellule AT (Watters et al. 1999). Anche se non è stato ancora dimostrato un intervento diretto di ATM sulle pathways di risposta al danno ossidativo sono stati proposti due meccanismi d'azione (Figura 11). ATM è coinvolta nelle fasi precoci della risposta alle DSBs e potrebbe riconoscere anche altri tipi di segnali, alcuni dei quali non associati con il danno al DNA (Shiloh, 2001) ma non è stato dimostrato che questa proteina reagisca direttamente a livelli anormali di ROS.

Una spiegazione alternativa è basata sul concetto che la continua presenza di DSBs non riparate sul DNA di cellule AT potrebbe avere un effetto secondario sul metabolismo intracellulare. Stern e collaboratori (2002) infatti, propongono che la continua presenza di

danno non riparato sul DNA comporti l'attivazione di vie di risposta, dipendenti dal consumo di NAD^+ . Uno degli enzimi che si attivano immediatamente dopo l'induzione di danno al DNA è PARP (poli-ADP-ribosio polimerasi), responsabile della sintesi di polimeri ADP-ribosio. Quindi l'attivazione di PARP in seguito al danno provoca la conseguente diminuzione del NAD^+ intracellulare. Potrebbe essere questa carenza di NAD^+ la causa dello stress ossidativo in cellule AT. Tale modello potrebbe spiegare la presenza di neuropatologie associate a difetti della riparazione. Il mantenimento della stabilità genomica è cruciale per lo sviluppo della cellula neuronale, ed essendo lo stress ossidativo una diretta conseguenza dell'incapacità di riparare lesioni al DNA, potrebbe essere proprio questa condizione di instabilità a provocare neurodegenerazione nelle cellule difettive per la riparazione, come lo sono le AT (Figura 11).

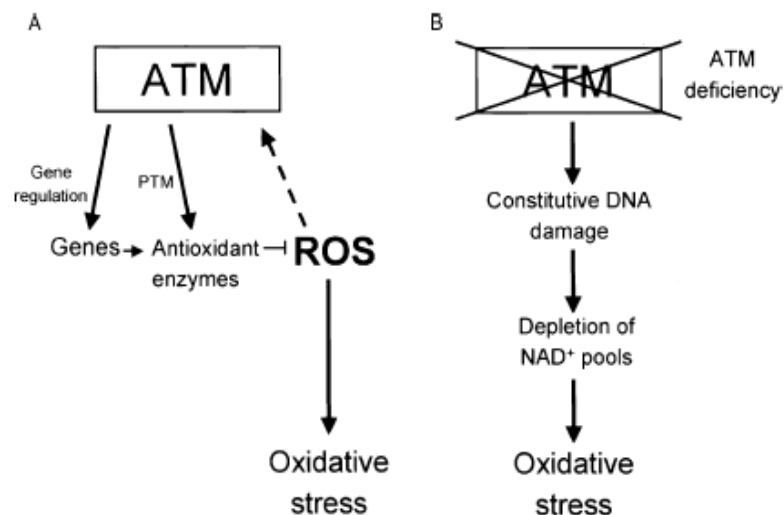


Figura 11: Due ipotesi per spiegare come l'assenza di ATM può comportare stress ossidativi.

3.11 Potenziali terapie

Allo stato attuale non vi è alcuna terapia efficace per curare o prevenire la progressione dell'atassia telangiectasia. Sebbene sia possibile alleviare alcuni sintomi associati con l'immunodeficienza e la carente funzionalità polmonare, né la predisposizione al cancro, né la progressiva neurodegenerazione può essere prevenuta.

3.11.1 Terapie a base di antiossidanti

Recenti studi suggeriscono che le capacità antiossidanti sono ridotte nel siero e nelle colture cellulari dei pazienti AT conferendo un costante stato di aumentato stress ossidativo (Barzilai and Yamamoto, 2004). La perdita di ATM potrebbe portare alla deregolazione della trascrizione o alla persistenza delle rotture nei cromosomi attraverso alterazioni nell'espressione genica o interferire nella funzione mitocondriale causando lo sbilancio nel metabolismo dell'ossigeno con conseguente stress ossidativo. Tale stress può portare danno alle macromolecole cellulari e quindi instabilità genomica, cancro e neurodegenerazione. Quindi un approccio per il trattamento dell'AT potrebbe essere l'uso di antiossidanti (Figura 12). Due esempi di potenziali terapie a base di agenti antiossidanti sono di seguito riportate.

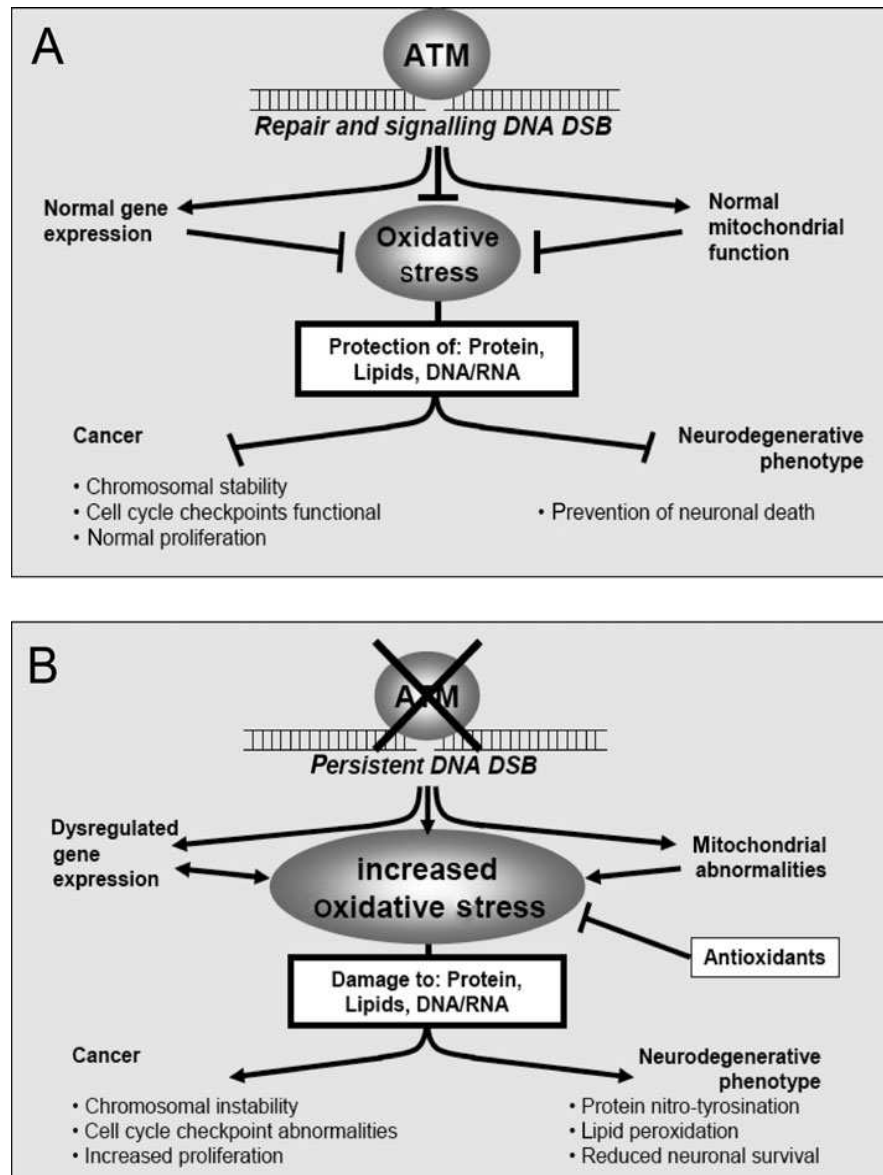


Figura 12: Meccanismo di stress ossidativo in cellule AT (A) Raffigurazione della normale funzione di ATM nel riconoscimento e riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA al fine di ridurre al minimo lo stress ossidativo, l'instabilità del genoma, il cancro e la neurodegenerazione. (B) Mutazione o perdita di ATM che porta ad una segnalazione anormale delle rotture a doppia elica del DNA. La perdita di funzione di ATM è associata con l'aumento dello stress ossidativo.

Trial di uso combinato di antiossidanti e inibitori della PARP: L'AT Clinical Center del Johns Hopkins Hospital (Baltimora, USA) ha condotto tale trial utilizzando un antiossidante quale l'acido α -lipoico (200 mg TID) e la nicotinammide (12,5 mg/kg BID), un inibitore della PARP, allo scopo di controllare alcune delle conseguenze secondarie dello stress ossidativo in pazienti AT sia adolescenti che adulti. Significativi effetti negativi attribuibili ai due agenti chimici somministrati non sono stati riscontrati nei pazienti in cura (Lederman et al. 2006). Inoltre, il livello di alcani totali nelle urine e la capacità di

assorbimento dell'ossigeno ridotto nel siero subivano un miglioramento significativo rispetto allo stato basale, quando ai soggetti venivano somministrati i medicinali. Lo studio ha consentito di valutare la riproducibilità di più parametri della funzione neurologica e polmonare. Sebbene non sia stato riscontrato nessun importante miglioramento di tali parametri, è stato possibile determinare quale di essi era sufficientemente riproducibile per il suo uso in un ulteriore trial clinico.

Trials pre-clinici con l'antiossidante isoindoline nitrossine: L'agente antiossidante 5-carbossi-1,1,3,3-tetramethylisoindolin-2-yloxyl (CTMIO) è stato somministrato in topi $Atm^{-/-}$. Questo antiossidante, membro del gruppo dei nitrossidi, è un radicale libero stabile capace di agire come “scavenger” dei ROS. I nitrossidi possono agire cataliticamente come SOD (superossidodismutasi che converte il superossido in perossido di idrogeno) e queste proprietà li rendono adatti per il trattamento di malattie caratterizzate da stress ossidativo. La somministrazione di CTMIO in topi $Atm^{-/-}$ ha ridotto il tasso di morte delle cellule del Purkinje, migliorato la dendritogenesi fino al livello del wild-type (Chen et al. 2003) e aumentato l'attività della catalasi, che demolisce l'acqua ossigenata in acqua ed ossigeno molecolare nel cervelletto. Questi risultati suggeriscono come questo agente possa proteggere dallo sviluppo della neurodegenerazione. Queste evidenze suggeriscono che la terapia antiossidante ha un notevole potenziale nel controllo delle sintomatologie caratteristiche dell'AT ed eventualmente in altre patologie neurodegenerative da stress ossidativo.

3.11.2 Correzione della funzione del gene ATM mediante “mutation-therapies targeted”

La maggior parte dei pazienti AT eredita due distinte mutazioni. Fino ad oggi sono state descritte per il gene ATM più di 500 mutazioni distribuite su tutta l'intera regione codificante (Eng et al. 2004). La maggior parte di questi cambiamenti (circa 80%) in pazienti AT danno luogo a proteine tronche, sia attraverso mutazioni nonsense, sia attraverso mutazioni di splicing o terminazioni premature secondarie che risultano da mutazioni frameshift. Pertanto qualsiasi tentativo di ripristinare la normale funzione dei geni ATM mutati attraverso “mutation-therapies targeted” richiederebbe la lettura attraverso il codone di terminazione o l'occultamento del sito di splicing criptico. Chiaramente, in entrambi i casi la metodologia usata deve essere mirata alle singole specifiche mutazioni. Gli approcci di questo tipo non devono necessariamente ripristinare il normale livello della proteina poiché anche

bassi livelli di ATM (5-10%), in alcuni pazienti AT, danno luogo ad un fenotipo moderato (Taylor et al. 2005).

Correzione della funzione del gene ATM mediante la lettura attraverso il codone di terminazione prematuro: Lai e collaboratori (2004) hanno utilizzato gli aminoglicosidi al fine di ottenere l'espressione di una proteina ATM funzionale mediante la lettura attraverso il codone di terminazione prematuro. Gli antibiotici aminoglicosidici si legano all'ansa interna dell'elica 44 della subunità 16S dell'RNA ribosomiale, il sito di decodifica, inducendo un cambiamento conformazionale locale che compromette la lettura corretta codone-anticodone e permette la traslazione attraverso quello che sarebbe un codone di terminazione. E' stato dimostrato che la proteina così prodotta era funzionale nelle vie di segnalazione ATM-dipendenti, tra cui l'attivazione del checkpoint in fase S, la correzione della radiosensibilità e l'autofosforilazione, indicando che la proteina ATM era realmente attivata. Tale metodologia quindi è in linea di principio molto promettente; tuttavia, alle concentrazioni richieste per garantire la loro efficacia l'uso di aminoglicosidi risulta tossico sia per le cellule in coltura sia per l'uomo. Perché diventi una reale opzione terapeutica, è necessario identificare altri composti che abbiano una minore tossicità, ma mantengano la stessa efficienza nella lettura attraverso il codone di terminazione.

Correzione delle mutazioni di splicing con oligonucleotidi "morfolino" antisenso: Gatti e collaboratori (2007) si sono serviti di oligonucleotidi morfolino antisenso (AMOs) per ridirigere e ripristinare il normale splicing del gene ATM. Due delle tre mutazioni testate di ATM, attivano siti di splicing criptici al 5' e 3' rispettivamente negli esoni 55 e 8; mentre la terza attiva un sito di splicing criptico al 5' a valle e/o al sito di splicing criptico al 3' a monte nell'introne 28, che causa l'inclusione di una porzione dell'introne 28 come pseudoesone. Gli AMOs mirano a nascondere questi siti e permettono l'espressione di un mRNA per ATM della giusta lunghezza, poiché è avvenuto un normale processo di splicing (Figura 13). L'efficienza della traduzione di questo mRNA in proteina è di circa il 30% rispetto al normale dopo circa 3 giorni di esposizione delle cellule all'AMOs. La proteina così ottenuta si autofosforila in risposta alla presenza delle DSBs e fosforila i substrati a valle come p53, NBS1, SMC1 etc. Inoltre, le cellule mostrano una aumentata radioresistenza.

Per poter utilizzare tale tecnica come terapia per l'uomo deve essere determinata sia la sua tossicità che la sua efficacia in modelli animali. Il loro uso in pazienti AT potrebbe essere limitato dal metodo per il trasporto e il rilascio: infatti, tale terapia richiede che l'ATM

corretto tramite l'uso degli AMOs sia processato nel cervelletto dove è necessario per restaurare la normale funzione delle cellule del Purkinje; inserire oligonucleotidi o altri costrutti in tale sito presenta impedimenti quali la barriera ematoencefalica e il piccolo numero di cellule del Purkinje che popolano il cervelletto.

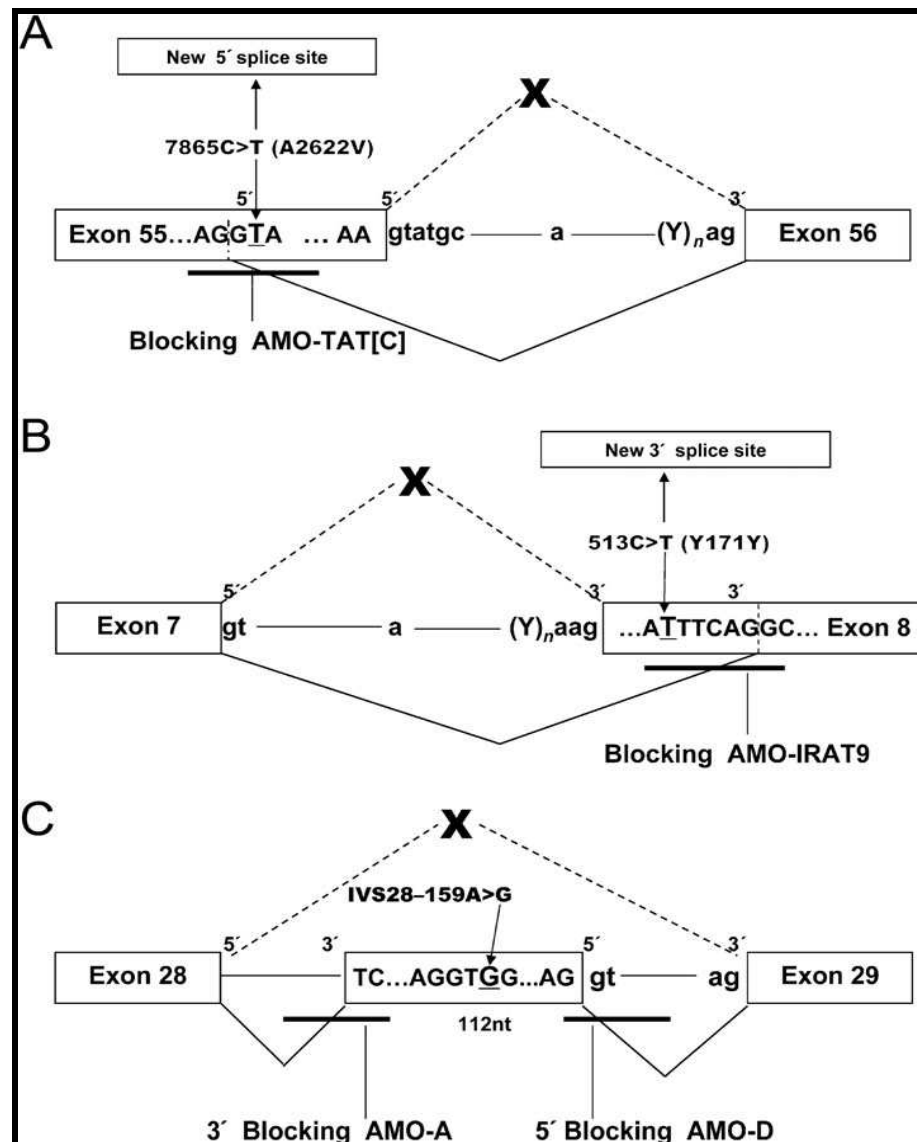


Figura 13: Rappresentazione schematica della correzione AMO delle mutazioni del gene ATM. 'X' si riferisce allo splicing normale. (A) AMO-TAT [C] è stato impiegato per bloccare le mutazioni che generano un nuovo sito 5' di splicing. (B) AMO-IRAT9 è stato progettato per bloccare le mutazioni che generano un nuovo sito 3' di splicing. (C) Due AMO sono stati utilizzati, AMO-A e AMO-D, per ripristinare la normale giunzione tra gli esoni 28 e 29 (Lavin et al, 2007).

CAPITOLO 4: : LA PROTEINA p53

4.1 Introduzione

La proteina p53 è un importante fattore che interviene nella regolazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi. Si ritiene inoltre che la p53 sia implicata anche in numerosi altri processi, tra i quali la regolazione della duplicazione del centrosoma, i checkpoints del fuso mitotico, la differenziazione cellulare, l'invecchiamento e l'angiogenesi (Kubbutat et al. 1997). La p53 è un fattore di trascrizione: accende cioè altri geni, al momento giusto. Essa è in grado di legarsi sotto forma di tetramero a specifiche sequenze del DNA dei geni posti sotto il suo controllo (Kaelin, 1999; Chumakov, 2000). Agisce quando la cellula è esposta a stress che possono provocare dei danni nel DNA: quando ciò accade la cellula in proliferazione deve prima attivare specifici inibitori del ciclo cellulare e, poi, i sistemi di riparazione del danno. In altre situazioni, se il danno è troppo esteso, p53 induce l'apoptosi. La p53 agisce dunque come una sentinella che garantisce il mantenimento dell'integrità del genoma. Inoltre, la presenza di mutazioni nel gene che la codifica nella maggioranza dei tumori umani, tumori che infatti rispondono poco efficacemente alla radioterapia e alla chemioterapia, ha reso questa molecola particolare oggetto di studio (Levine, 1997). Infatti, nell'uomo circa il 50% dei tumori umani presenta mutazioni nel gene per la p53 e la restante metà è caratterizzata da alterazioni nei componenti della via di soppressione tumorale mediata dalla stessa.

4.2 Struttura e regolazione della proteina p53

La proteina p53 è una fosfoproteina nucleare di 53 kDa costituita da 393 amminoacidi, codificata dal gene soppressore tumorale omologo, a singola copia, localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 e contenente undici esoni. La sequenza della proteina può essere suddivisa in quattro principali regioni strutturali e funzionali (Figura 14):

- un dominio N-terminale (amminoacidi 1-43), in cui risiede la funzione di attivatore trascrizionale, e capace di interagire con i fattori della trascrizione TFII D e TFII H (Lu and Levine, 1995; Thut et al. 1995). Questo dominio lega la proteina Mdm2 che è il principale regolatore di p53;

- una regione centrale o “core” (amminoacidi 100-300), deputata al legame specifico con regioni di DNA attraverso il riconoscimento di una sequenza consenso (Bargonetti et al. 1993);
- un dominio di tetramerizzazione (amminoacidi 323-356), che si organizza in una struttura ad α -elica; la p53 nativa infatti è un tetramero ed esercita la sua attività di oncosoppressore solo in questa forma (Shaulian et al. 1992; Stenger et al. 1994; Jeffrey et al. 1995);
- un dominio C-terminale (amminoacidi 363-393), ricco di amminoacidi basici con funzione di regolazione sull’interazione tra la regione “core” e il DNA (Hupp and Lane, 1994; Lee et al. 1995); sembra assumere la funzione di dominio pro-apoptotico o di riconoscimento del danno a seconda delle situazioni (May and May, 1999).

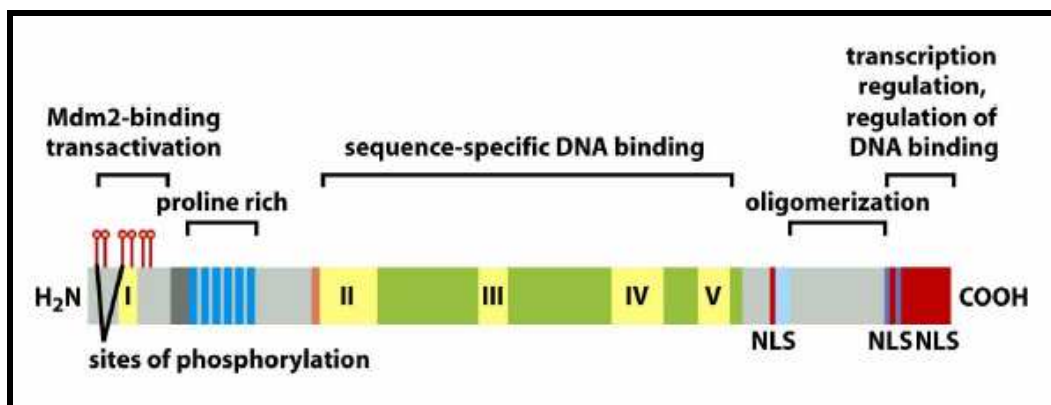


Figura 14: Struttura della proteina p53 dove sono rappresentati i diversi domini funzionali. NLS= segnale di localizzazione nucleare.

In condizioni normali, in cellule non danneggiate, la proteina p53 è altamente instabile (ha una vita media di circa 10-20 minuti) ed è presente in concentrazioni molto basse. Questo perché la proteina p53 interagisce con un fattore regolativo, Mdm2, (da “murine double minute 2”) che si lega all’estremità N-terminale della proteina e mediante un dominio ring-finger, agisce da ubiquitina ligasi E3 indirizzando la proteina p53 verso la degradazione all’interno dei proteosomi (Joseph et al. 2003). Il controllo negativo della p53 da parte di Mdm2 si esercita anche promuovendo la traslocazione della proteina fuori del compartimento nucleare verso il citoplasma dove essa non può esercitare la sua funzione di fattore di trascrizione. La proteina p53 stessa regola la trascrizione del gene Mdm2, partecipando quindi alla propria regolazione mediante un meccanismo a feedback negativo: in tal modo, quando i livelli intranucleari di p53 si innalzano, viene di conseguenza rafforzata la via di degradazione

grazie all'aumento di espressione di Mdm2. Recentemente, è stato proposto un meccanismo di inibizione della proteina p53 indipendente da Mdm2. E' stata infatti, purificata e caratterizzata una proteina denominata Parc da "p53-associated, parking like cytoplasmatic protein", presente nel citoplasma come parte di un grande complesso e strettamente associata a p53 (Nikolaev et al. 2003). Parc interagisce direttamente tramite il suo N-terminale con l'estremità C-terminale della p53. L'analisi della sequenza amminoacidica dimostra che Parc contiene alcuni domini comuni ad altre proteine con attività di ubiquitina-ligasi. Tuttavia, sembra che la regolazione di p53 tramite questa proteina sia indipendente dall'ubiquitinazione e Parc agisca piuttosto prevenendo il sequestro citoplasmatico di p53. Quindi, questa proteina sarebbe importante come regolatrice della localizzazione intracellulare di p53. Al contrario, il fattore ARF (Alternative Reading Frame) codificato dal gene INK4A, svolge un ruolo centrale nel controllo positivo della proteina p53 in presenza di certi segnali di stress cellulare. ARF sequestra Mdm2 impedendogli di legare p53, e il complesso Mdm2/ARF viene traslocato all'interno del nucleolo utilizzando i segnali di localizzazione nucleolare presenti sia in Mdm2 che in ARF. In questo modo la proteina p53 è lasciata libera dall'interazione che l'avrebbe destinata alla degradazione e può svolgere la sua attività trascrizionale nel nucleoplasma. L'espressione di ARF può essere stimolata dall'attività di c-myc e da quella di E2F, che a sua volta può essere indotta da diversi segnali apoptotici.

Quando la cellula è sottoposta ad un segnale di stress genotossico, si ha l'attivazione di varie proteine-chinasi, tra cui ATM, la protein-chinasi C, la Cdk1, che catalizzano la fosforilazione di p53 su alcuni residui di serina, quali Ser15, Ser20, Ser47. A causa del cambiamento conformazionale dovuto a queste modificazioni, l'interazione p53/Mdm2 viene destabilizzata riducendo così la degradazione proteosomale della p53 che si accumula a partire da questo momento. Ciò porta all'aumento della sua concentrazione e all'incremento della stimolazione della trascrizione genica.

4.3 Checkpoints del ciclo cellulare e p53

Il processo di divisione cellulare è altamente ordinato e regolato. I checkpoints sono dei punti di controllo deputati a ritardare la progressione del ciclo nella fase successiva solamente quando la fase precedente è pienamente completata. Il loro scopo principale è di garantire che le cellule figlie ereditino una copia completa e fedele del genoma. I checkpoints sono attivati dalla presenza di danno al DNA, da segnali di stress esogeni, da errori che avvengono durante la replicazione del DNA o dal mancato attacco dei cromosomi alle fibre

del fuso mitotico. L'eliminazione dei checkpoints del ciclo cellulare può portare alla morte per un organismo unicellulare mentre, per gli organismi pluricellulari conduce alla proliferazione incontrollata e alla tumorigenesi (Nyberg et al. 2002).

Il soppressore tumorale p53 svolge un ruolo chiave in ognuno dei checkpoints del ciclo cellulare: il checkpoint G1/S, quello in fase S e infine il checkpoint G2/M (Giono and Manfredi, 2006).

L'attivazione sequenziale delle cicline D, E e A, cicline G1/S, dà luogo all'iperfosforilazione di pRb, che poi rilascia E2F, permettendo la trascrizione dei geni richiesti per l'entrata nella fase S. L'arresto del ciclo cellulare al limite della fase G1/S avviene mediante l'eliminazione sia della ciclina D1 sia di Cdc25A, attivatore di cdk2. p53 mantiene questo arresto inducendo l'espressione di p21, inibitore di cdk che blocca questa progressione inibendo i complessi cdk2. La transizione G2/M è guidata dal complesso cdc2/ciclina B. In seguito allo stress cellulare, l'arresto in G2/M avviene inizialmente tramite la fosforilazione di Cdc25C, la fosfatasi che attiva cdc2/B, che è poi sequestrata nel citoplasma dalle proteine 14-3-3. Un numero di geni bersaglio di p53 assicurano il mantenimento di questo arresto: p21 inibisce sia il complesso cdc2/B sia CAK, la sua chinasi attivatrice; GADD45 promuove la dissociazione del complesso cdc2/B; 14-3-3 σ sequestra cdc2/B nel citoplasma; l'espressione di Cdc25C è repressa da p53 (Figura 15).

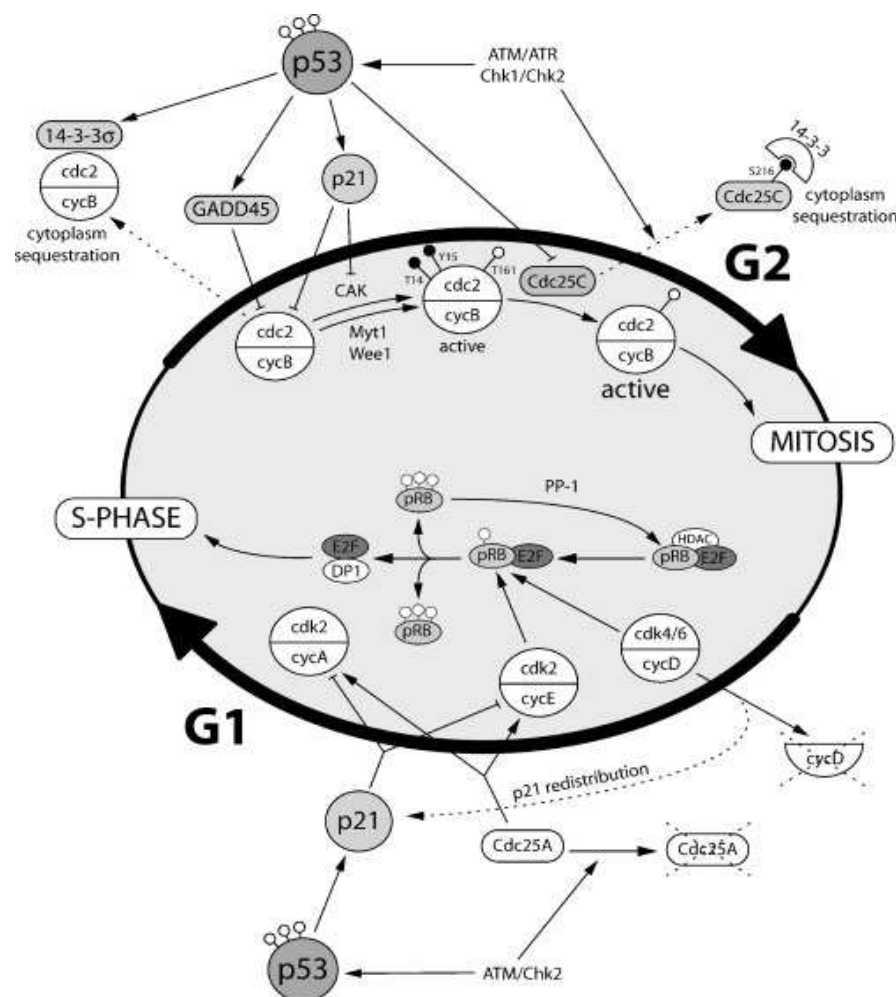


Figura 15: I checkpoints G1/S e G2/M e il coinvolgimento della p53.

4.4 Apoptosi e p53

L'apoptosi è l'autodistruzione della cellula e si tratta di un evento fondamentale nell'equilibrio riproduttivo dei tessuti e nei meccanismi di sorveglianza contro lo sviluppo dei tumori. La morte delle cellule "vecchie" avviene attraverso due processi estremamente diversi tra loro: la necrosi e l'apoptosi. La prima si manifesta con un rapido rigonfiamento che si conclude con la lisi cellulare e di norma causa una risposta infiammatoria perché le sostanze intracellulari vengono riversate all'esterno, e rappresenta un evento traumatico.

L'apoptosi, invece, avviene sotto stretto controllo genetico. Questo evento è stato identificato per la prima volta nel 1972 (Kerr et al. 1972), ma l'interesse è esploso negli anni novanta quando conoscere i geni responsabili della morte cellulare e i meccanismi con cui esplicano la loro funzione poteva rappresentare il primo passo verso la comprensione dei processi di invecchiamento e per l'applicazione di terapie che accelerassero la morte cellulare. Uno dei geni coinvolti è p53, che ferma l'accrescimento e la divisione cellulare nel caso in cui

vengano rilevati dei danni al DNA. Questi ultimi devono essere riparati, altrimenti la cellula viene indirizzata verso la morte. Un altro compito assolto dall'apoptosi è di tipo "altruista": in una cellula sottoposta a stress ambientali talmente forti da non poter reagire e difendersi mediante la sintesi delle proteine da stress o da shock termico viene attivato il programma di morte. Questo tipo di controllo è estremamente vantaggioso per le cellule che la circondano e per l'intero organismo: infatti durante l'apoptosi non avviene il rilascio di sostanze endocellulari nell'ambiente esterno, come nella necrosi, e non si genera così nessun evento infiammatorio. E' nota poi un'intera famiglia di geni inibitori dell'apoptosi, la cui attività si riscontra in numerose patologie tumorali: l'attività errata di questi geni sottrae la cellula al suo destino e ne permette la crescita e le successive divisioni, causando l'insorgenza di tumori.

4.4.1 Sequenza degli eventi nell'esecuzione della morte

La morfologia di una cellula apoptotica è caratteristica in quanto la cellula è soggetta a cambiamenti sia biochimici che morfologici (Kerr et al. 1972; Wyllie et al. 1980). Inizialmente sia il citoplasma che il nucleo subiscono una evidente condensazione. A livello del citoplasma, la membrana plasmatica forma delle protuberanze e si formano grandi vacuoli a livello del citosol e i mitocondri, nonostante rimangano morfologicamente intatti, perdono gradualmente la loro funzionalità. Poi avviene la compattazione del nucleo dopo la sua decondensazione nello stadio iniziale del processo e si formano, quindi, granuli compatti ipercondensati di cromatina che si spostano verso la periferia dello stesso. Successivamente, frammenti discreti di materiale nucleare raggiungono la membrana plasmatica, dove, circondati da evaginazioni della stessa, tendono a staccarsi dal corpo cellulare trascinando con sé parte del citoplasma e del materiale nucleare, dando origine ai cosiddetti corpi apoptotici che vengono fagocitati dalle cellule vicine.

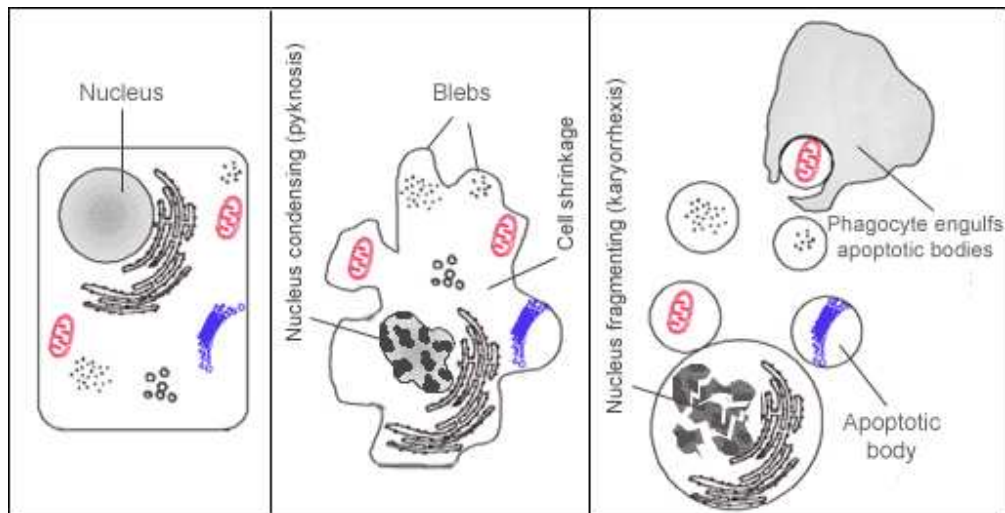


Figura 16: Evoluzione morfologica di una cellula in apoptosi (Nagata, 2000).

Gli eventi principali che si susseguono sono (Figura 16):

- la condensazione nucleare e citoplasmatica;
- la frammentazione del DNA in siti compresi tra i nucleosomi ad opera di specifiche endonucleasi;
- il collasso del potenziale di membrana mitocondriale;
- lo spostamento del citocromo-C dai mitocondri al citosol, dove essi contribuiscono ad attivare proteasi cellulari chiamate caspasi che sono suddivise in induttrici ed esecutrici.

L'apoptosi può essere innescata direttamente da recettori sulla superficie della membrana che attivano le caspasi iniziatrici che a loro volta attivano quelle esecutrici; oppure il danno irreparabile al genoma attiva direttamente, tramite un meccanismo sconosciuto, le caspasi esecutrici (Salvesen and Dixit, 1997). Il segnale apoptotico, dall'evento iniziale, è trasmesso attraverso varie componenti (p53, Rb, c-myc, c-abl) al fine di alterare le interazioni e i rapporti tra i membri della famiglia BCL-2 che proteggono e promuovono la morte o la diretta attivazione delle caspasi. L'attivazione delle caspasi deriva da tagli proteolitici specifici dove una caspasi attiva un'altra caspasi in una cascata proteolitica (Zhivotovsky et al, 1996). La frammentazione del DNA avviene grazie a molti tagli indotti nelle regioni "linker" tra i nucleosomi tramite l'attivazione delle endonucleasi che rompono il DNA con la formazione di frammenti. L'attivazione delle endonucleasi può essere effettuata dalle caspasi (Enari et al. 1998). Benché gli effetti finali dell'apoptosi hanno come obiettivo il DNA genomico, la maggioranza delle molecole coinvolte nel controllo e nell'esecuzione dell'apoptosi hanno una localizzazione non nucleare; ad esempio il mitocondrio gioca un ruolo principale nel processo apoptotico (Green and Kroemer, 1998). Infatti, come risposta

agli stimoli inducenti all'apoptosi, le cellule mostrano un collasso del potenziale mitocondriale di membrana che precede i segni nucleari dell'apoptosi (Vayssière et al. 1994). Un altro evento cardine che riguarda il mitocondrio è il rilascio del citocromo-C nel citoplasma, inducendo l'attivazione della caspasi-9 (Liu et al. 1996). Non si conosce l'esatta relazione tra il collasso del potenziale mitocondriale di membrana ed il rilascio del citocromo-C.

4.4.2 Principali vie apoptotiche

Il processo apoptotico viene innescato da una serie di segnali extracellulari e intracellulari che includono le radiazioni gamma e ultraviolette, lo stress ossidativo, le sostanze cancerose, le infezioni virali, i danni al DNA, la mancanza di alcuni fattori di crescita e di citochine. Una cascata di reazioni può attivare gli effettori dell'apoptosi; i segnali extracellulari inducono tramite i recettori una risposta mediata da molecole che attivano cascate di secondi messaggeri che mettono in azione a loro volta cascate di fosforilazioni ad opera di chinasi regolatrici del metabolismo e dell'espressione genica.

Nei mammiferi sono state identificate due vie apoptotiche principali definite come via intrinseca e via estrinseca (Salvesen and Duckett, 2002) (Figura 17).

Nella via estrinseca i segnali apoptotici sono trasmessi da proteine recettoriali di membrana appartenenti alla super-famiglia dei TNF-R (Tumor Necrosis Factor Receptor) definiti recettori di morte, al momento dell'interazione con i loro specifici ligandi. Questa trasduzione del segnale verso l'interno della cellula richiede il coinvolgimento di molecole adattatrici, complessi proteici di reclutamento e la caspasi 8 per l'attivazione delle caspasi effettrici, tra cui la caspasi 3, che possano attuare l'esecuzione del programma di morte. Ad esempio, il legame del ligando Fas al suo recettore Fas porta alla trimerizzazione del recettore al livello della membrana plasmatica e alla formazione di un complesso chiamato DISC (Death-Inducing-Signalling-Complex) derivato dall'associazione della regione citoplasmatica del recettore Fas e una proteina adattatrice FADD e la procaspasi 8. La procaspasi è attivata dal taglio proteolitico a formare un enzima attivo che può attivare a sua volta le caspasi a valle.

La via intrinseca, o mitocondriale è innescata dall'attivazione sulla membrana esterna del mitocondrio di proteine pro-apoptotiche appartenenti alla famiglia Bcl-2, Bax e Bak. Questo evento porta al rilascio del citocromo C che risiede nel mitocondrio, nel citosol ed è spesso accompagnato dalla perdita di potenziale e dalla destabilizzazione della membrana mitocondriale esterna. Il citocromo C si associa ad Apaf1 e a molecole multiple di procaspasi

9 che, in questo complesso, vengono attivate. Il complesso ruolo del mitocondrio nell'apoptosi delle cellule di mammifero è stato messo in evidenza quando una serie di studi biochimici ha portato all'identificazione di diverse proteine mitocondriali capaci di attivare direttamente il programma apoptotico (Susin et al. 1999) (Figura 18). Tra queste le principali sono: il citocromo C (Liu et al. 1996), Smac/Diablo, AIF (Susin et al. 1999) e l'endoG (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993).

Le due vie non sono completamente separate, ma si possono sovrapporre se si considera che le funzioni di alcune proteine, come nel caso della proteina Bid della famiglia Bcl-2, possono avere effetti che si collocano sia nell'una che nell'altra via.

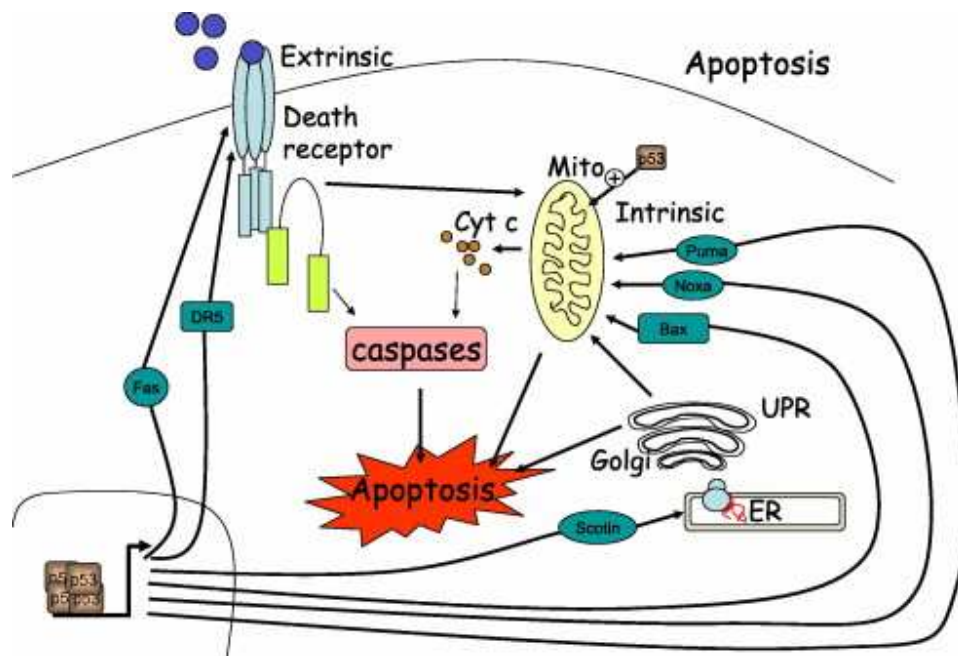


Figura 17: Le due vie apoptotiche principali: via intrinseca e via estrinseca e il coinvolgimento della proteina p53.

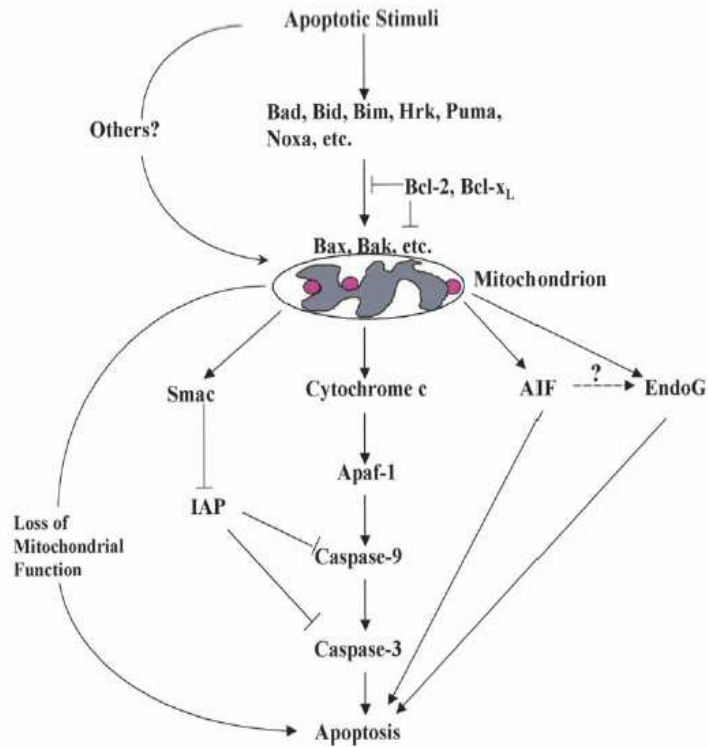


Figura 18: Rappresentazione schematica della via in cui è coinvolto il mitocondrio durante l'apoptosi.

4.5 Geni bersaglio e ruolo di p53 nel controllo dell'apoptosi

Da una serie di studi su p53 e sui geni indotti dal danno al DNA sono stati identificati più di 100 geni bersaglio della proteina (Zhao et al. 2000). Il ruolo della proteina p53, sia come attivatore trascrizionale che come soppressore tumorale, dipende soprattutto dalla capacità della proteina di mantenere una conformazione che consenta l'interazione ed il legame del suo dominio centrale con il DNA (Figura 19).

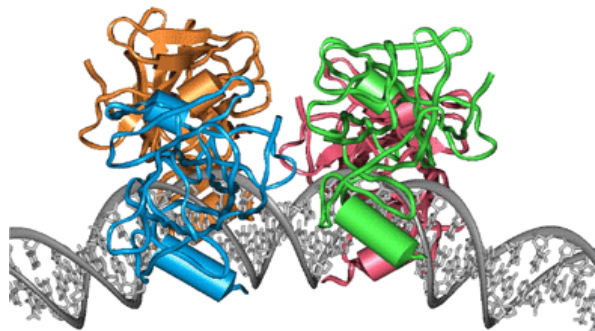


Figura 19: Associazione tra il DNA e la proteina p53; l'interazione avviene con la proteina p53 in forma di tetramero.

Le modificazioni quali, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione che avvengono su specifici residui, attraverso l'induzione di cambiamenti conformazionali, possono modificare l'affinità di legame di p53 alle sequenze promotrici di vari geni bersaglio, determinando così diverse risposte cellulari (Vousden and Lu, 2002).

Tra i molti geni, la cui trascrizione è regolata da promotori che rispondono alla p53, quelli principalmente coinvolti nella regolazione dell'apoptosi e nell'arresto del ciclo cellulare sono:

- *p21*, *Cip1*, *GADD45*, *CDK2* nella regolazione del ciclo cellulare;
- *BAX*, altri membri della famiglia *Bcl-2*, *FAS/APO1*, *DR4*, *DR5*, *PIG-3* nella regolazione dell'apoptosi.

Quando la proteina p53 attiva stimola la trascrizione della proteina *p21*, questa si lega ai complessi CiclinaG1/S-Cdk e ne inibisce l'attività portando all'arresto della cellula nella fase G1 del ciclo cellulare (Figura 20).

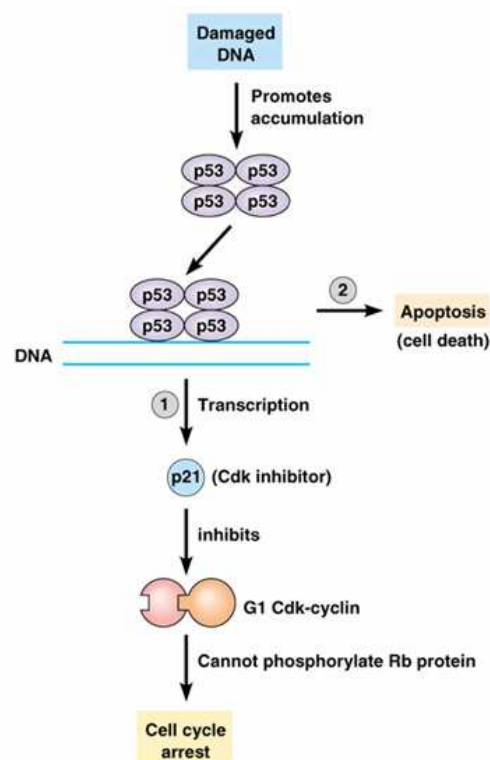


Figura 20: Rappresentazione schematica di come l'aumento di concentrazione di p53 può portare all'arresto del ciclo cellulare.

Un altro gene importante è rappresentato da *GADD45*, che induce la dissociazione e la conseguente inattivazione del complesso ciclina B-cdc2 causando l'arresto della cellula in fase G2 del ciclo cellulare (Dynlacht, 1997).

L'apoptosi, invece, può essere indotta dalla p53, sia attraverso la regolazione della trascrizione genica, sia in maniera indipendente dalla propria attività trascrizionale. La proteina p53 come fattore di trascrizione, regola l'espressione di diversi geni, come ad esempio quelli che codificano per i membri della famiglia Bcl-2, in modo tale da indurre l'espressione dei componenti pro-apoptotici, come BAX o PUMA e reprimere l'espressione di quelli anti-apoptotici come Bcl-2. La proteina PUMA sembra essere uno dei più importanti fattori pro-apoptotici indotti da p53 anche se, recentemente, si è dimostrato che può essere indotta anche da un altro membro della famiglia cui appartiene la p53, che è la proteina p73 (Melino et al. 2004). La p53, inoltre regola la trascrizione di FAS, DR4 e DR5 che sono recettori di membrana, detti recettori di morte, la cui attivazione in seguito ad interazione con i loro specifici ligandi, innesca una segnalazione intracellulare e il reclutamento di fattori che innescano il processo apoptotico (Liu et al. 2004).

La proteina p53, svolge un ruolo pro-apoptotico indipendente dalla propria attività trascrizionale, che la vede coinvolta in un'interazione diretta con i membri della famiglia Bcl-2 responsabili della permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna. Questa affermazione è supportata da osservazioni “*in vivo*” della reale traslocazione di p53 verso la superficie mitocondriale esterna durante l'apoptosi (Erster and Moll, 2005). Sulla membrana mitocondriale p53 può indurre direttamente l'oligomerizzazione di BAX per la formazione di pori nel doppio strato lipidico, oppure, può interagire con i complessi Bcl-2/Bcl-XL liberando le proteine BH3-only, che una volta affrancate dal complesso possono attivare l'oligomerizzazione di BAX e determinare il rilascio del citocromo C (Figura 21).

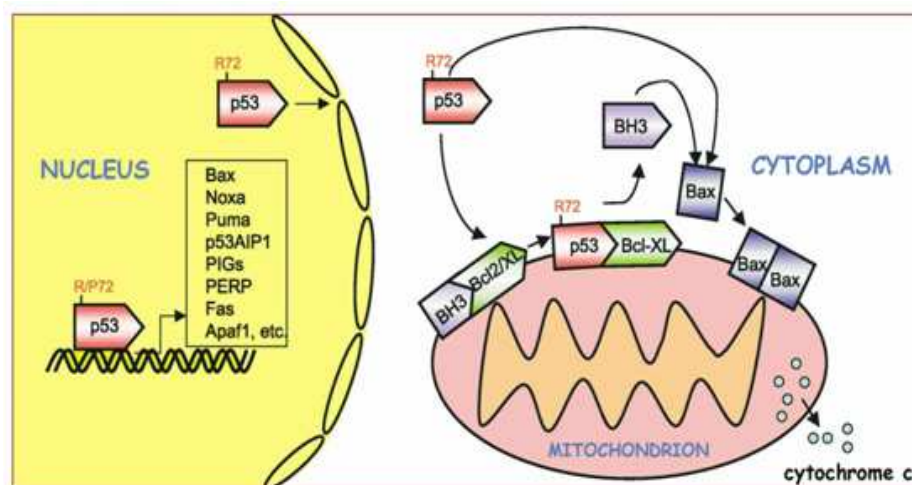


Figura 21: Funzioni apoptotiche della proteina p53 nel nucleo, come fattore di trascrizione, e a livello mitocondriale.

Nella via “estrinseca” p53 può promuovere l’apoptosi mediante l’attivazione dei recettori di morte localizzati sulla membrana cellulare, che includono Fas, DR4, DR5. Sia DR5 che DR4 sono regolati da p53 e possono innescare o aumentare l’apoptosi indotta da agenti chemioterapici (Liu et al. 2004). Sebbene *Fas* possa essere attivato da p53, l’induzione di *Fas* a causa del danno al DNA è tessuto specifica e spesso non richiede p53, e la proteina *Fas* è superflua per l’apoptosi p53 dipendente in molti tessuti (Muller et al. 1998; Bouvard et al. 2000). Nella via “intrinseca” p53 regola molte proteine con domini BH3 che funzionano a monte di BAX/BAK per indurre l’apoptosi. Alcune di queste proteine sono state recentemente identificate come dei mediatori critici dell’apoptosi mediata da p53. PUMA e Noxa sono attivati in maniera p53 dipendente in seguito al danno al DNA. PUMA media una rapida apoptosi indotta da p53, ipossia, agenti che danneggiano il DNA e lo stress del reticolo endoplasmatico nelle cellule cancerose umane colorettali (Oda et al. 2000; Han et al. 2001). I membri pro-apoptotici BIM, PUMA e Noxa possono legare i membri anti-apoptotici della famiglia di BCL-2 e bloccare la loro funzione di sopravvivenza.

4.6 Prospettive terapeutiche mediante l’utilizzo di inibitori di p53

Il gene *p53* è un soppressore tumorale che è mutato o inattivato nella maggioranza dei tumori e alcuni tumori rispondono all’espressione della *p53* “wild type” tramite una rapida apoptosi o l’arresto della crescita, in tal modo evidenziando le possibili applicazioni della modulazione del gene *p53* nella terapia genica. Questa strategia terapeutica è stata studiata da molti con modesto successo.

Nella maggioranza dei tumori *p53* è mutata o inattivata da meccanismi inibitori come MDM2 o E6, (Prives and Hall, 1999; Soussi et al. 2000; Woods and Vousden, 2001), creando una situazione potenzialmente reversibile (Bullock and Fersht, 2001; Lain and Lane, 2003). Questa possibilità identifica, come approccio terapeutico, il ripristino farmacologico della *p53*. Sebbene l’attivazione di *p53* viene vista come la più diretta e promettente strategia anti-cancro, essa non è un fattore favorevole per un tessuto normale. Il trattamento del cancro con radiazioni e farmaci chemioterapici è associato con l’induzione di stress genotossico risultante dal danno diretto al DNA (radiazioni, farmaci anti-topoisomerasi, analoghi di nucleotidi) o all’inabilità di procedere alla normale mitosi (agenti anti-microtubuli come il taxolo). La reazione cellulare allo stress genotossico implica l’attivazione di *p53* che inizia una cascata di eventi che portano all’arresto della crescita o all’apoptosi. Quindi, *p53* è un importante fattore

della percettibilità dei tessuti normali allo stress genotossico associato ai trattamenti antitumorali e ad altre condizioni attivanti p53 (Figura 22).

Tuttavia, proprio la p53, il maggiore fattore che previene il cancro, può complicare il trattamento dello stesso innescando la massiva morte cellulare programmata nei tessuti normali (ma non nei tessuti cancerosi) durante lo stress genotossico associato con la chemio- e la radioterapia. Questo fa di p53 un bersaglio per la soppressione terapeutica, un approccio per ridurre gli effetti collaterali associati con il trattamento dei tumori mancanti di p53 (Komarova and Gudkov, 1998, 2001; Gudkov and Komarova, 2003, 2005).

Un metodo applicabile al trattamento dei tumori mancanti di p53, che sono la maggioranza, è l'uso della pifitrina- α (PFT- α), un analogo del tetraidrobenzotiazolo e inibitore sintetico di p53, che salva le cellule con p53 "wild type" dall'apoptosi indotta dalle radiazioni e da vari farmaci citotossici includenti la doxorubicina (Dox), l'etoposide, il taxolo, e l'Ara-C (Komarov et al. 1999). La PFT- α previene anche la comparsa delle cellule apoptotiche nelle cellule umane endoteliali HUVECSs trattate con Dox nelle quali essa inibisce sia i livelli basali che inducibili di p53 (Lorenzo et al. 2002). La PFT- α blocca anche l'apoptosi, indotta da Dox, delle cellule cardiache di topo inibendo l'espressione dei geni bersaglio di p53 quali BAX e MDM2. Perciò, la PFT- α può costituire un prototipo per l'elaborazione di un nuovo farmaco cardioprotettivo che può essere usato per il trattamento del cancro in pazienti con condizioni cardiache pre-esistenti.

La p53 gioca un ruolo attivo sia nello sviluppo sia nella regolazione della risposta allo stress del tessuto neuronale. L'apoptosi associata a p53 è un meccanismo comune responsabile della perdita di cellule in molte malattie neurologiche tra le quali il morbo di Alzheimer (Mattson et al. 1993; De la Monte et al. 1998) e il morbo di Parkinson (Jenner and Olanow, 1998). Il trattamento con gli inibitori di p53 potrebbe essere di beneficio per i neuroni sotto condizioni di stress nell'organismo umano. La protezione ad opera della PFT- α è associata con la diminuzione della capacità di p53 di legare il DNA, la ridotta espressione di BAX, la soppressione della disfunzione mitocondriale e dell'attivazione delle caspasi. L'inibizione dell'attività delle caspasi tramite la PFT- α è stata osservata anche nei neuroni che esprimono presenilina, che modula la risposta cellulare apoptotica durante la fase iniziale del morbo di Alzheimer (Alvarez-Salas et al. 1999; Alves Da Costa et al. 2003). Inoltre, in un modello sperimentale della malattia di Parkinson nel topo, il trattamento con PFT- α ha determinato un miglioramento della funzione motoria, ha ridotto il danno ai neuroni dopaminergici nigrostriatali ed ha ridotto la deplezione di dopamina. La PFT- α ed altri 10 suoi nuovi analoghi sintetizzati proteggono i neuroni dell'ippocampo dalla morte indotta da

farmaci che danneggiano il DNA come la camptotecina e l'etoposide (Zhu et al. 2002; Gilman et al. 2003). L'identificazione dei bersagli molecolari della PFT- α potrebbero portare a nuove intuizioni nei meccanismi della regolazione di p53 e aiutare a capire i potenziali rischi associati con la somministrazione di PFT- α , dato che il meccanismo dell'attività anti-p53 della PFT- α rimane ancora largamente sconosciuto.

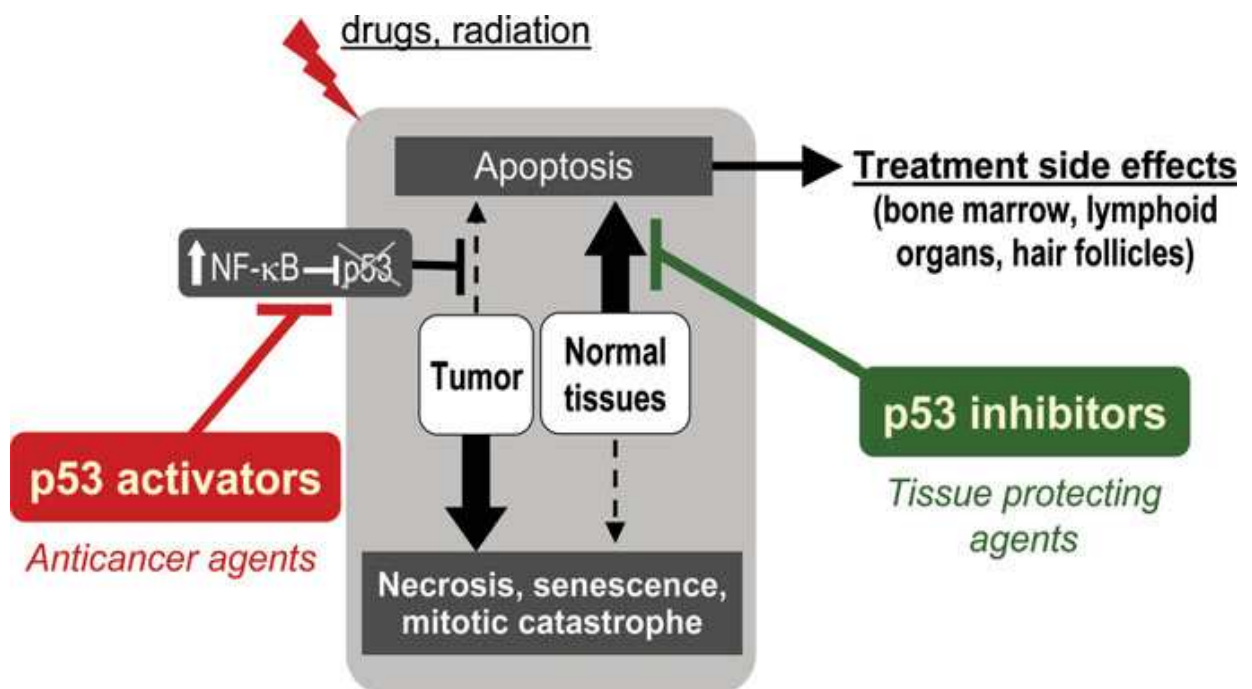


Figura 22: Principali applicazioni dei modulatori farmacologici di p53.

La PFT- α fu isolata per la sua abilità di bloccare l'attivazione trascrizionale p53 dipendente. E' stato dimostrato che la PFT- α sopprime la transattivazione di alcuni geni che modulano la risposta di p53: p21, MDM2, ciclina G e BAX. Essa, inoltre, abbassa i livelli di p53 nucleare ma non di quella citoplasmatica dopo il danno al DNA. Queste osservazioni suggeriscono che la PFT- α può modulare l'importo o l'esporto (o entrambi) nucleare di p53 o diminuire la stabilità della p53 nucleare. Inoltre, è stato dimostrato che la PFT- α causa un aumento del diametro dei pori nucleari (Feldherr et al. 2001). La PFT- α può anche bloccare l'induzione di alcuni recettori che includono ICAM-1 (Gorgoulis et al. 2003), i recettori degli androgeni (Cronauer et al. 2004), e CD95 (Lorenzo et al. 2002). Quindi, questo indica che gli effetti della PFT- α non sono limitati a p53 e ai componenti a valle di p53 ma coinvolgono anche altri fattori cellulari e le vie di trasduzione del segnale.

La soppressione di p53 potrebbe portare alla sopravvivenza di cellule geneticamente alterate, normalmente eliminate dall'apoptosi, e potenzialmente formare una sottopopolazione

ad alto rischio dalla quale cellule tumorali potrebbero essere eventualmente reclutate. Infatti, recenti studi in vitro indicano che l'effetto della PFT- α su cellule p53 "wild type", trattate con farmaci chemioterapici, era associato ad un tasso elevato di anomalie cromosomiche (Bassi et al. 2002). Quindi, questi studi richiedono una maggiore attenzione, sia negli aspetti statistici che farmacologici, per valutare la correlazione tra le applicazioni prolungate degli inibitori, che mimano le future applicazioni cliniche, e la frequenza di cancro. Tuttavia, la funzione del soppressore tumorale p53 è di così vitale importanza per l'organismo che è essenziale verificare attentamente il rischio di sviluppo del cancro associato con l'uso di queste nuove prospettive farmaceutiche e terapeutiche.

Un'altra interessante opportunità mira alla dissezione farmacologia delle funzioni sia di protezione cellulare sia di alcune delle funzioni apoptotiche di p53, isolando composti che bloccherebbero il legame di p53 al mitocondrio. Strom e collaboratori (2006) hanno isolato una piccola molecola chiamata pifitrina- μ (PFT- μ) che inibisce il legame di p53 a Bcl-xL e Bcl-2 e riduce l'associazione di p53 con i mitocondri ma non ha effetto sulla transattivazione dipendente da p53 (Figura 23). La PFT- μ ha un alto livello di specificità per p53 e non protegge le cellule dai fattori pro-apoptotici a valle o indipendenti da p53. Evidenze sperimentali (Strom et al. 2006) nei modelli murini indicano che la PFT- μ salva i timociti primari dall'apoptosi mediata da p53 indotta dalle radiazioni e protegge dalle dosi di radiazioni che causano sindromi ematopoietiche letali. Questi risultati dimostrano che la selettiva inibizione del ramo mitocondriale della via p53-dipendente è sufficiente per la radioprotezione *in vivo* e avvalorare l'approccio che mira a sviluppare l'uso clinico degli inibitori di p53. In conclusione, gli approcci che hanno come target farmacologico la p53 utili per una varietà di propositi terapeutici possono essere riassunti come segue:

1. L'attivazione di p53 può essere utile per il trattamento del cancro e la sua prevenzione; tuttavia, dovrebbe essere usata attentamente mediante un "targeting" selettivo del meccanismo di soppressione di p53 specifico del tumore in questione, anche al fine di evitare diversi effetti collaterali nei tessuti sani;
2. La temporanea e reversibile soppressione di p53 può essere utile ai fini preventivi e nel trattamento di condizioni acute associate con forte stress genotossico; anche in questo caso tale approccio deve essere applicato attentamente bloccando selettivamente la funzione pro-apoptotica di p53 e mantenendo le sue funzioni protettive dei tessuti.

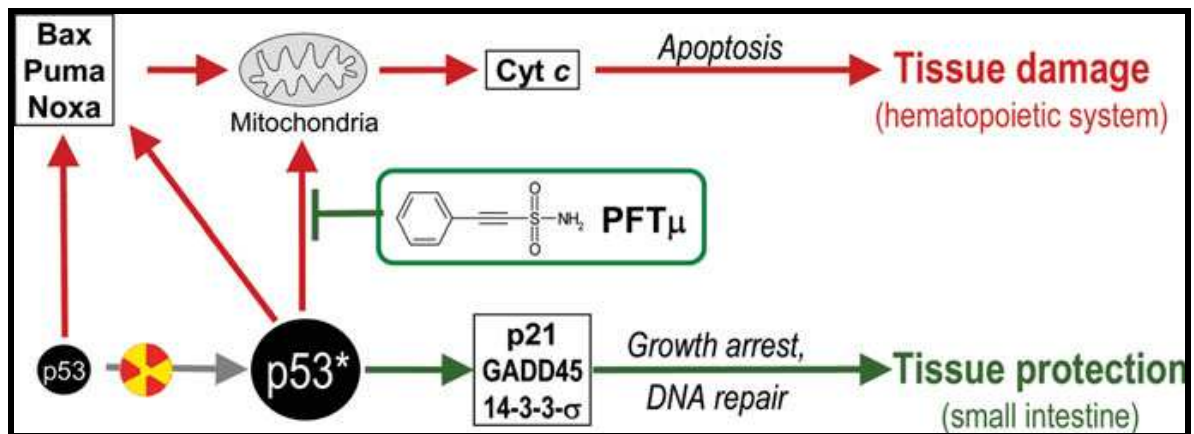


Figura 23: I due diversi rami nella via di p53 permettono la dissezione farmacologica delle differenti attività della stessa.

CAPITOLO 5: L'ISTONE H2AX

5.1 La variante istonica H2AX: introduzione

L'istone H2AX fu identificato per la prima volta nel 1980, in cellule umane, come isoforma elettroforetica dell'istone H2A (West and Bonner, 1980) e fu sequenziato solo verso la fine degli anni '80 (Mannironi et al. 1989). In questi studi iniziali venne riscontrata la presenza di una corta sequenza C-terminale mai ritrovata in altre isoforme di H2A dei mammiferi, ma presente nell'unico omologo di H2A degli eucarioti inferiori (Redon et al. 2002). H2AX rappresenta circa il 2-25% della componente istonica del pool di H2A, a seconda della linea cellulare o del tessuto preso in considerazione; come altri membri della famiglia di H2A, H2AX può essere fosforilato sulla serina 1, acetilato sulla lisina 5 e ubiquitinato sulla lisina 119, ma ciò che lo rende particolarmente interessante è un residuo di serina, estremamente conservato, localizzato a quattro amminoacidi di distanza dall'estremità COOH in posizione 139, che viene rapidamente fosforilato in seguito ad un danno al DNA (Rogakou et al. 1998). Tale serina si trova all'interno del motivo detto SQ che è seguito da un residuo acidico e dal carbossiterminale idrofobico. E' da notare inoltre che la fosforilazione della S-139 nell'H2AX è una delle poche modificazioni che avvengono nel sito carbossiterminale di un istone, che più frequentemente vengono modificati nell'amminotermine. Ciò potrebbe essere rilevante poiché in virtù della localizzazione e dell'orientamento di H2A nel nucleosoma, la fosforilazione della S-139 modificherà il nucleosoma nella posizione giusta nei punti di entrata/uscita del DNA. Nell'istone H2AX una coda carbossiterminale protrude dal nucleosoma e la serina in posizione 139 è facilmente accessibile alle chinasi (Figura 24).

In seguito alla formazione di lesioni al DNA, le diverse proteine coinvolte nella riparazione interagiscono con le proteine della cromatina, come l'istone H2AX. Successivamente a questa interazione, si ha un rimodellamento della cromatina che permette l'accesso al sito danneggiato e la riparazione della lesione in maniera regolata nel tempo. Negli eucarioti, la riparazione per ricombinazione è regolata da complessi multiproteici che sono organizzati in foci nel sito della lesione. Questi foci sono strutture di giga-dalton altamente dinamiche in grado di riparare contemporaneamente lesioni multiple. Inoltre, la composizione di questi centri di riparazione dipende dal tipo di lesione ed è in stretta relazione con la fase del ciclo cellulare. Molti dei componenti dei foci di riparazione sono

regolati tramite modificazioni post-traduzionali, quali la fosforilazione e l'ubiquitinazione. L'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX) è essenziale per un efficiente riconoscimento e riparazione delle DSBs e molte molecole, spesso migliaia, di H2AX vengono rapidamente fosforilate ad ogni sito in cui è presente una DSB. Il sito di fosforilazione è evolutivamente conservato negli organismi, dalla *giarda intestinalis* all'uomo. Topi e lieviti privi di questo residuo di serina mostrano difetti nel riconoscimento e riparazione delle DSBs. I topi knockout per l'istone H2AX risultano più piccoli, ipersensibili alle radiazioni ionizzanti, difettivi nello switch isotipico e nella spermatogenesi. Inoltre, cellule di questi topi mostrano un significativo aumento dei difetti genetici. L'istone H2AX è sostanzialmente immobile nella cromatina e i cicli di fosforilazione defosforilazione non sono seguiti da uno scambio diffusionale della molecola.

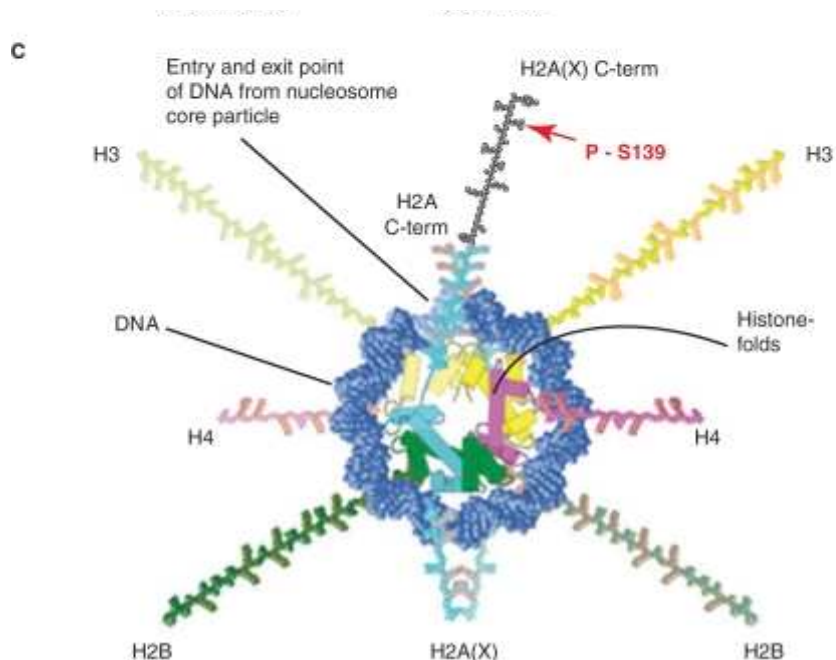


Figura 24: Modello del core nucleosomico che mostra le interazioni tra il DNA e gli istoni del core. Il DNA entra ed esce in punti che sono localizzati a livello del dimero H2A/H2B. La porzione C-terminale di H2AX, più estesa di 14 amminoacidi rispetto a quella di H2A, è mostrata in nero; una freccia rossa indica il sito di fosforilazione all'interno del motivo SQEY (Kinner et al. 2008).

La fosforilazione di H2AX che porta alla forma modificata dell'istone, chiamata γ -H2AX, è estremamente rapida in seguito all'induzione di DSBs: circa la metà dei livelli massimi della forma modificata dell'istone si riscontrano in un tempo che varia tra uno e tre minuti dopo esposizione a radiazioni ionizzanti, mentre i livelli massimi si riscontrano dopo 10-30 minuti ed è stato dimostrato che circa l'1% di H2AX per Gray di radiazione ionizzante

passi nella forma fosforilata (Rougakou et al. 1999). Grazie all'uso di un anticorpo policlonale, sviluppato nel coniglio e diretto verso un peptide sintetico contenente la sequenza C-terminale fosforilata di γ -H2AX, è stato possibile localizzare tali molecole in foci nucleari entro un minuto in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti (Rougakou et al. 1999). Per stabilire la correlazione tra il numero di tali foci e il numero di DSBs, sono stati effettuati studi utilizzando ^{125}I che, una volta incorporato nel DNA, è in grado di provocare una DSB per ogni disintegrazione radioattiva. In cellule coltivate in presenza di ^{125}IdU e analizzate tramite immunocitochimica per determinare il numero di foci, venne osservata una correlazione diretta tra il numero di decadimenti attesi e il numero di foci per cellula e quindi anche una correlazione 1:1 tra numero di foci e DSBs (Sedelnikova et al. 2002).

Il coinvolgimento di H2AX nella riparazione del danno al DNA è stato, in un primo momento, provato nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* in cui l'eliminazione del residuo di serina C-terminale dall'istone portava al deterioramento della riparazione per NHEJ (Downs et al. 2002). In seguito, l'uso di cellule staminali embrionali e di modelli murini knock-out per H2AX ha mostrato che la presenza di questo istone, pur non essendo essenziale per la riparazione per HR e NHEJ, era comunque implicato nella modulazione di entrambi i processi (Bassing et al. 2002).

Nei modelli murini privi dell'istone H2AX i fenotipi osservati avevano le seguenti caratteristiche: taglia ridotta, instabilità cromosomica, radiosensibilità; anomalie nell'inattivazione trascrizionale e nell'appaiamento dei cromosomi X e Y negli spermatociti; difetti nel punto di controllo G2/M; difetti nello "switch" isotipico. Si pensa che tutti questi effetti siano dovuti a due funzioni strutturali complementari fornite dal processo di fosforilazione di H2AX: la prima è l'assemblaggio e il mantenimento di fattori coinvolti nella riparazione in regioni della cromatina vicine al sito di danno; la seconda è la riorganizzazione strutturale della cromatina necessariamente associata sia a taluni processi fisiologici sia alla riparazione dei danni alla doppia elica (Fernandez-Capetillo et al. 2004).

Le principali tecniche utilizzate per il rilevamento del segnale di γ -H2AX sono l'immunoistochimica e immunocitochimica, l'immunoblotting e la citometria a flusso. Alla base di queste tecniche di rilevazione di γ -H2AX sta la produzione di un anticorpo diretto contro la sequenza CKATQAS(PO₄)QEY derivata dalla sequenza umana. Questo anticorpo è efficace in tutti i mammiferi esaminati, compreso il topo che contiene un ulteriore residuo di serina al posto della treonina presente nella sequenza umana (Nakamura et al. 2006).

L'immunoistochimica e l'immunocitochimica sono metodiche che consentono di identificare in una sezione di tessuto o in cellule disperse su un vetrino molecole specifiche

tramite reazioni del tipo antigene-anticorpo. Mediante queste tecniche è possibile distinguere cellule contenenti o meno il marcatore in funzione dell'antigene ed eventualmente determinare la sua localizzazione subcellulare come, per esempio nucleare o citoplasmatica.

5.2 La riparazione delle rotture a doppia elica nel contesto della cromatina

Gli studi sui meccanismi di riparazione del DNA si sono evoluti nel corso degli anni dal riconoscimento degli enzimi e dei complessi multimerici coinvolti, alla descrizione delle fasi successive di questi processi, alla comprensione degli ambiti di azione dei diversi processi e delle interrelazioni tra gli stessi. Più recentemente si è cercato di estendere queste conoscenze a un contesto nel quale il DNA non fosse inteso come nuda doppia elica, ma nella reale complessità della sua organizzazione in cromatina.

Studi recenti hanno dimostrato che la formazione delle DSBs è seguita da un rilassamento della cromatina dipendente da ATM. Questo rilassamento faciliterebbe l'accesso dei fattori di riparazione al DNA. Un'altra indicazione sul coinvolgimento della cromatina nella modulazione della riparazione dei danni al DNA viene dall'osservazione che doppie rotture in regioni di eterocromatina sono riparate più lentamente di doppie rotture nell'eucromatina (Goodarzi et al. 2008). Inoltre un aumento di resistenza ad agenti che danneggiano il DNA è stato osservato in cellule embrionali staminali geneticamente modificate per un ridotto contenuto dell'istone H1 o in cellule trattate con inibitori delle deacetilasi che inducono un generale rilassamento della cromatina (Murga et al. 2007). In tal senso, l'organizzazione e il grado di compattazione della cromatina potrebbero modulare l'intensità e l'efficacia della riparazione in tipi cellulari diversi, come avviene proprio nelle cellule embrionali staminali che sembrano possedere una cromatina più rilassata rispetto ad altri tipi cellulari, una condizione favorevole ad un'efficiente riparazione in cellule progenitrici di tutte le linee del differenziamento, in cui la stabilità del genoma appare particolarmente critica.

Anche l'organizzazione spaziale dei cromosomi e delle regioni cromosomiche nel nucleo non è casuale e potrebbe influenzare il meccanismo di riparazione delle lesioni a doppia elica a loro carico e/o la loro predisposizione ad una riparazione per ricombinazione pseudo-omologa e alla conseguente insorgenza di riarrangiamenti cromosomici.

I fattori per la riparazione del DNA, come molte proteine nucleari, diffondono rapidamente nello spazio nucleare in seguito a reclutamento indotto da una lesione. Il nucleo delle cellule di mammifero non è una struttura omogenea ma contiene vari

sottocompartimenti funzionalmente distinti ed è ancora incerto se la riparazione del DNA avvenga con uguale efficienza in ogni sito nucleare o se esistano dei siti specifici per il suddetto meccanismo, come sembra probabile in lievito (Misteli and Soutoglou, 2009).

5.3 Coinvolgimento della componente istonica della cromatina nella riparazione delle rotture a doppia elica

Una rottura della doppia elica (Figura 25) viene inizialmente rilevata dal complesso Mre11 (Meiotic recombination 11), (MRE11-RAD50-NBS1), che svolge attività nucleasica, necessaria per “rifinire” le estremità rotte prima del loro ricongiungimento, e mantiene vicini i cromatidi fratelli o le estremità rotte per agevolare la riparazione mediante HR o NHEJ e, contemporaneamente, impedire la loro interazione con partners eterologhi.

L'associazione del complesso Mre11 con il DNA danneggiato favorisce il reclutamento della chinasi ATM (Figura 25). Di seguito sono riportati i punti pertinenti la figura 25: (a) Una DSB viene indotto nella cromatina (es. da radiazioni ionizzanti), (b) Il complesso MRN si lega alle estremità della DSB e recluta ATM che fosforila H2AX, che diventa γ -H2AX. Viene reclutato MDC1 che si lega a γ -H2AX. La fosforilazione di MDC1 da parte di CK2 porta al reclutamento e al legame di molti complessi MRN-ATM e le nuove molecole di ATM fosforilano altre molecole di H2AX. Cicli sequenziali di questi eventi portano alla formazione di un dominio γ -H2AX di dimensioni dell'ordine delle Mb che circonda la DSB. Viene reclutata anche TIP60 che acetila γ -H2AX. Quindi, si associa con l'enzima che coniuga l'ubiquitina E2, UBC13 per regolare la poliubiquitinazione di γ -H2AX acetilata. (c) γ -H2AX acetilata e poliubiquitinata viene rimossa dalla cromatina, probabilmente solo intorno alla DSB. ATM, legata a MDC1 tramite MRN, fosforila MDC1 per reclutare il complesso RNF8-UBC13 che sembra regolare l'ubiquitinazione dell'istone H2AX. RNF168 si lega a questi istoni poliubiquitinati e promuove la formazione di coniugati di ubiquitina. Gli istoni poliubiquitinati reclutano il complesso BRCA1-A e 53BP1. BRCA1-A lega direttamente gli istoni-Ub tramite la subunità RAP80. 53BP1 si lega agli istoni metilati che potrebbero essere riconosciuti solo dopo poliubiquitinazione mediata da RNF8-RNF168-UBC13. (d) Questi eventi facilitano la riparazione della DSB e/o arrestano il ciclo cellulare.

In cellule non danneggiate ATM è mantenuto in complessi multimerici con il dominio provvisto di attività chinastica inattivato dal legame con la regione della serina 1981. L'autofosforilazione di questa serina conseguente al danno determina la dissociazione del complesso multimerico e l'attivazione della fosforilazione. La riparazione del DNA coinvolge un esteso set di modificazioni istoniche, tra cui la più importante è la fosforilazione della

serina 139 carbossi-terminale di H2AX, variante istonica di H2A nei mammiferi. H2AX può essere fosforilato da tre diversi tipi di chinasi: ATM, ATR, e DNA-PK e il loro inibitore, la wortmannina, è efficiente nel prevenire la formazione dei foci corrispondenti (Paull et al. 2000). Tutte e tre i principali membri di PIKK possono fosforilare H2AX e evidenze sperimentali suggeriscono che ognuna di loro interviene quando le altre sono geneticamente compromesse (Andegeko et al. 2001; Burma et al. 2001; Stiff et al. 2004; Wang et al. 2005).

La funzione principale di H2AX sembra essere quella di reclutare e trattenere i fattori proteici di riparazione sul sito di danno. La forma fosforilata di H2AX (γ -H2AX) lega quindi MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1) e questo legame stimola il reclutamento di altre molecole del complesso Mre11 amplificando la fosforilazione di H2AX in un dominio esteso fino a 2 Mb intorno all'iniziale DSB. MDC1 svolge un ruolo importante anche nella terminazione del processo di riparazione perché il suo legame con γ -H2AX protegge l'istone dalla defosforilazione che potrebbe causarne una dissociazione dai complessi di riparazione della cromatina (Stucki et al. 2005; Stucki and Jackson, 2006). Segue quindi l'acetilazione di γ -H2AX che favorisce il suo legame con UBC13 e la conseguente poliubiquitinazione (Figura 25). Questo ultimo evento regola il turn-over di γ -H2AX in prossimità della doppia rottura. La poliubiquitinazione di H2A e H2AX, mediata da RNF8, è invece necessaria per il reclutamento di altre proteine della riparazione più a valle nel processo di riparazione, quali BRCA1 (Breast Cancer 1) o 53BP1 (tumour suppressor p53 Binding Protein 1). Mentre BRCA1 si legherebbe direttamente agli istoni poliubiquitinati tramite interazione con RAP80 e la proteina mediatrice ABRA1 (Wang et al. 2007), 53BP1 si legherebbe all'istone H4 metilato nella sua lisina 20, pur restando indispensabile per tale legame un processo di ubiquitinazione.

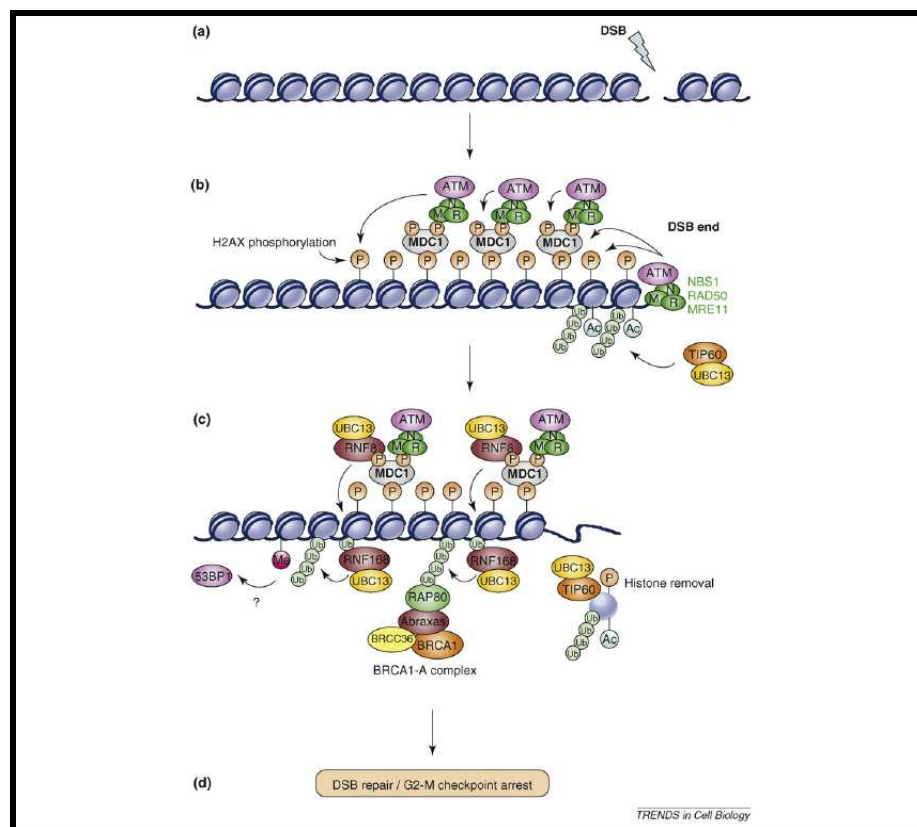


Figura 25: Modello della funzione di γ -H2AX nella risposta alle DSBs nei mammiferi (van Attikum and Gasser, 2005).

Il rilassamento della cromatina conseguente al danno è determinato anche dall'acetilazione dell'istone H4 e di altri istoni mediata da acetiltransferasi come TIP60. L'acetilazione di H4 promuove il rimodellamento della cromatina sia direttamente che favorendo il reclutamento di complessi rimodellatori ATP-dipendenti come quelli della famiglia SW1/SNF. Studi condotti principalmente in lievito hanno mostrato ruoli distinti per specifici complessi rimodellatori, quali la rimozione di alcuni istoni e l'attivazione/inattivazione di checkpoint.

Il processo di riparazione del danno viene manifestato, a livello microscopico, sotto forma di foci di riparazione del DNA, che sono strutture che emergono in seguito al reclutamento e all'accumulo di fattori di riparazione nel sito di danno. E' stato ipotizzato che ad una DSB sia associato un singolo focus, visibile grazie al reclutamento dei fattori di riparazione, che si estende fino ad una Mb di distanza dal sito di danno (Lukas et al. 2005). Una delle prime descrizioni di questo fenomeno fu effettuata da Haaf e colleghi nel 1995 (Haaf et al. 1995) osservando i foci di Rad51, che possono essere indotti in seguito a DSBs prodotte da radiazioni ionizzanti o da agenti alchilanti come il metil metan sulfonato (MMS). Nel 1997, Maser e colleghi usarono il termine foci indotti da radiazioni ionizzanti (Ionizing

Radiation Induced Foci, IRIF) per descrivere il raggruppamento di Mre11 e Rad50 tipico dei foci (Maser et al. 1997). I foci possono essere indotti sperimentalmente tramite raggi X o γ , composti radiomimetici come la bleomicina, irraggiamento finemente localizzato mediante laser o con endonucleasi sequenza-specifiche; sono strutture che si ritrovano in tutte le cellule dal lievito fino ai mammiferi (Lukas et al. 2005). Il reclutamento di fattori deputati alla riparazione potrebbe esercitare un ruolo rilevante nel mantenere in prossimità spaziale le estremità rotte, incrementando così l'efficienza della riparazione; un'altra importante funzione dei foci è quella di amplificare la segnalazione del danno al DNA tramite il reclutamento di copie multiple delle chinasi di segnalazione sul sito di danno. I foci possono essere visualizzati grazie all'utilizzo di anticorpi specifici verso proteine di segnalazione e di riparazione del danno al DNA. Benché una volta formati i foci di riparazione persistano nella maggior parte dei casi per diversi minuti e talvolta ore, essi sono strutture altamente dinamiche nelle quali avviene continuamente lo scambio tra molecole e complessi associati alla cromatina ed altri liberi nel nucleoplasma. Nei foci, il tempo di residenza di questi fattori dipende dalla natura della loro interazione con la cromatina danneggiata, ma anche dalla loro affinità verso altri componenti del complesso di riparazione.

Studi di colocalizzazione nei foci hanno messo in evidenza la presenza di alcuni fattori coinvolti nella riparazione del danno al DNA tra cui γ -H2AX, Rad50 e Rad51, Brca1, il complesso MRN (Paull et al. 2000). Gli studi di colocalizzazione non hanno rilevato nei foci di riparazione la presenza di alcuni fattori critici quali p53 o Ku70-Ku80 e DNA-PK suggerendo che nel primo caso l'interazione con i siti di danno possa essere solo transitoria, e nel secondo, che il numero di molecole coinvolte possa essere insufficiente per il loro rilevamento mediante tecniche immunocitochimiche.

Lo studio dei foci di riparazione è stato molto importante perché l'analisi di queste strutture ha permesso il rilevamento dei complessi di riparazione del DNA *in situ*, nell'esatto sito di danno del DNA. Nelle cellule eucariotiche l'integrità dell'informazione genomica in seguito al danno al DNA non è completamente ripristinata fino a che non venga ristabilita, tramite numerosi eventi, di nuovo la corretta struttura cromatinica perché lo stato epigenetico originale è essenziale per il mantenimento di un genoma funzionale. Le modificazioni istoniche post-traduzionali necessarie per facilitare l'accesso al sito di danno da parte dei complessi di riparazione devono essere rimosse sia attivamente da parte di enzimi specifici come le fosfatasi e le deacetilasi sia dallo scambio con forme istoniche non modificate. I tratti epigenetici, come modificazioni istoniche in specifici loci e particolari assetti di metilazione del DNA dovrebbero essere reintrodotti.

Il primo passo per il ripristino della conformazione cromatinica originaria è l'eliminazione della forma fosforilata dell'istone H2AX, γ -H2AX, tipica del processo di riparazione. All'eliminazione di γ -H2AX contribuiscono sia l'azione di scambio con molecole di H2AX non fosforilate favorita da complessi multimerici, che l'eliminazione diretta dei gruppi fosfato tramite fosfatasi specifiche. Nelle cellule umane le fosfatasi che defosforilano γ -H2AX sono PP2A e PP4C e questa ultima sembra essere la molecola principalmente coinvolta nella defosforilazione di γ -H2AX nelle DSBs indotte da radiazioni ionizzanti (Nakada et al. 2008). Successivamente l'azione delle istone deacetilasi (HDACs) rimuove la presenza dei gruppi acetile dagli istoni una volta che la riparazione è stata completata (Tamburini and Tyler, 2005); le HDACs probabilmente sono coinvolte nel recupero della struttura cromatinica di ordine superiore. Oltre all'azione delle HDACs, un altro cambiamento osservato è l'acetilazione della serina 1 di H4 per mezzo della caseina chinasi 2 (CK2) in uno stadio tardivo della risposta al danno.

Un ruolo importante nella modulazione dell'accessibilità della cromatina ai fattori di riparazione è svolto anche dall'esposizione di alcuni residui di lisine metilate negli istoni H3 e H4 che si verifica a seguito del rilassamento della cromatina. Al termine della riparazione il ricompattamento della cromatina comporterà, tra l'altro, il ritorno ad una struttura nella quale tali residui non siano esposti all'interazione con fattori esterni.

Durante il rimodellamento della cromatina gli istoni, precedentemente rimossi per permettere la riparazione del danno, devono essere di nuovo inseriti sul DNA riparato mediante un processo definito "assemblaggio della cromatina" che è critico per la sopravvivenza cellulare in seguito alla riparazione del DNA. Il reinserimento degli istoni non richiede energia e l'assemblaggio cromatinico è supportato dai complessi di rimodellamento nucleosomico.

5.4 γ -H2AX come marker di DSBs: possibili applicazioni nel campo della dosimetria biologica

L'esposizione a radiazioni ionizzanti può produrre in un organismo una serie di alterazioni dipendenti dalla dose; queste alterazioni possono esprimersi in un arco di tempo che va da poche ore a settimane dopo l'irraggiamento, possono essere transitorie o irreversibili ed eventualmente produrre danni a lungo termine (Cologne and Preston, 2000).

La dosimetria biologica è quel settore di studio della radiobiologia nel quale, basandosi sui meccanismi e sugli effetti cellulari delle radiazioni in funzione della dose, si cerca di

sviluppare marcatori biologici grazie ai quali sia possibile risalire ad una stima della dose di esposizione.

Storicamente, il primo settore di applicazione della dosimetria biologica è stato quello relativo alle esposizioni accidentali, quando non fosse disponibile una dosimetria fisica della dose di esposizione. Più recentemente, il campo delle possibili applicazioni di marcatori biologici della risposta alle radiazioni si è ampliato al settore della radioterapia e radiodiagnostica alla luce delle evidenze sulle variazioni di suscettibilità individuale geneticamente determinate: in questo contesto, i marcatori biologici di effetto potrebbero “correggere” la stima fisica della dose somministrata introducendo un fattore che potrebbe, ad esempio, contribuire a personalizzare le terapie. Il crescente sviluppo delle conoscenze relative ai meccanismi molecolari delle fasi iniziali della risposta cellulare al danno ha offerto nuovi potenziali biomarcatori di effetto precoce.

Nel lavoro di Marchetti e collaboratori (Marchetti et al. 2006) sono stati presi in rassegna lavori pubblicati dal 1973 al 2006 in cui erano riportati cambiamenti nei livelli di determinate proteine o nelle loro modificazioni post-traduzionali a seguito di trattamento *in vitro* o *in vivo* con raggi X o γ di diversi modelli sperimentali di mammifero. La rassegna ha catalogato 261 proteine diverse coinvolte nella risposta cellulare alle radiazioni. Tra queste quelle considerate come più promettenti per lo sviluppo di biodosimetri molecolari in campo radiobiologico sono state ritenute ATM e H2AX. ATM e H2AX sono le proteine più interessanti perché rispondono specificamente alla presenza di DSBs, un tipo di danno tipicamente indotto dalle radiazioni ionizzanti, e potrebbero essere utilizzate per discriminare tra soggetti esposti a radiazioni ionizzanti e soggetti esposti a tossine biologiche e agenti ambientali dannosi, i quali non inducono DSBs.

In studi iniziali era stata osservata una stretta correlazione tra numero di foci γ -H2AX e numero di DSBs. Per esempio, nel lavoro di Rothkamm e Löbrich (2003) è stata determinata una relazione dose-effetto lineare per l'induzione di foci γ -H2AX sovrapponibile alla curva di induzione di DSBs misurata nel range delle dosi più alte con tecniche di Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE). Tuttavia, è stato determinato un limite inferiore di sensibilità nella rilevazione di un effetto radioindotto basato sulla conta del numero di foci per cellula intorno a 1 mGy. La cinetica di scomparsa dei foci è ritenuta compatibile con quella di riparazione delle DSBs, con l'eccezione dei foci indotti da dosi pari o inferiori a 1 mGy che permangono per molti giorni dopo l'irraggiamento, forse a causa dell'incapacità delle cellule di rilevare un livello di danno al di sotto di una determinata soglia. Nel loro complesso, i risultati di questo lavoro rafforzano l'ipotesi secondo la quale la formazione dei foci γ -H2AX

rappresenti un marcatore della riparazione di DSBs in cellule umane ed ogni focus corrisponda ad una DSB.

Un campo di ricerca specifico riguarda la caratterizzazione dei foci indotti da radiazioni ad alto LET rispetto a quelli indotti da radiazioni a basso LET (Aten et al. 2004). Come è noto all'aumentare del LET aumenta anche il numero di DSBs e la complessità del danno per traccia di radiazione, portando ad un aumento della mutagenicità e ad una diminuzione della capacità di riparazione del danno. E' stato dimostrato che, a parità di dose, i foci γ -H2AX indotti in seguito a trattamento con particelle α sono circa 1.5 volte più grandi rispetto a quelli formati in seguito a esposizione a radiazioni a basso LET (raggi γ). Tuttavia, occorre anche tener conto del fatto che all'aumentare della densità di ionizzazione aumenta anche la densità delle DSBs e pertanto l'aumento di dimensione dei foci può riflettere in realtà la diversa distribuzione delle rotture lungo la traccia di ionizzazione. Anche la cinetica di risoluzione dei foci sembra essere influenzata dalla qualità della radiazione, con un rallentamento al crescere del valore di LET (Desai et al. 2005; Leatherbarrow et al. 2006).

Un altro interessante lavoro che propone la formazione di foci γ -H2AX come biosensore *in vivo* riguarda la loro misura in linfociti periferici di persone sottoposte a tomografia computerizzata (computed tomography, CT) (Löbrich et al. 2005). Questa procedura di diagnostica medica ha infatti un crescente utilizzo ed implica l'esposizione a dosi piccole, ma non trascurabili (Andreassi and Picano, 2009). Nel lavoro citato i pazienti sono stati sottoposti a CT del torace e/o addome. Il numero dei foci γ -H2AX ha mostrato una relazione lineare in funzione della dose di esposizione e della superficie corporea esposta. In un paziente che aveva precedentemente mostrato sintomi di radiosensibilità è stato rilevato un numero di foci significativamente più elevato di quello riscontrato negli altri soggetti e tale effetto è stato correlato ad un difetto nei meccanismi di riparazione del DNA, suggerendo il possibile utilizzo dell'analisi γ -H2AX come biomarcatore di suscettibilità oltre che di esposizione.

In un'altra pubblicazione (Ismail et al. 2007) viene descritta la messa a punto di un metodo citofluorimetrico per la misura del contenuto di γ -H2AX in cellule ematiche umane come possibile biomarcatore di esposizione e di suscettibilità a radiazioni ionizzanti. Dopo esposizione *in vitro* di campioni di sangue non fissato di diversi soggetti a raggi γ sono state misurate variazioni interindividuali dell'ordine di un fattore 2 ed il metodo si è rivelato fino a 100 volte più sensibile dell'analisi mediante test della cometa.

5.5 Altri agenti che inducono la fosforilazione di H2AX

La fosforilazione di H2AX non è indotta solo dall'esposizione a radiazioni ionizzanti. Alcuni studi hanno evidenziato la comparsa dei foci γ -H2AX in cellule trattate con diversi fattori di stress (Zouh et al. 2006); γ -H2AX è stato usato come indicatore di morte cellulare indotta da agenti chemoterapeutici (Banath and Olive, 2003); come marker di DSBs in cellule di adenocarcinoma polmonare umano esposte a fumo di tabacco (Albino et al. 2004); come strumento per valutare l'efficacia di terapie antitumorali e per la diagnosi di campioni biotici di neoplasie (Wasco and Pu, 2008); l'induzione di foci γ -H2AX è stata osservata in risposta a concentrazioni crescenti di agenti genotossici a diverso meccanismo d'azione quali l'etoposide (inattivatore dell'enzima topoisomerasi II), la bleomicina (agente capace di produrre direttamente rotture della doppia elica) e il metil-metansulfonato (MMS, agente alchilante) (Cowell et al. 2007).

A seconda dell'agente genotossico utilizzato sono state notate differenze nella distribuzione e nella morfologia dei foci: foci indotti da etoposide apparivano più diffusi rispetto a quelli indotti da bleomicina; i foci indotti da bleomicina si presentavano più brillanti e più distinti rispetto a quelli indotti da etoposide; i foci indotti da MMS mostravano generalmente un segnale più debole e difficilmente distinguibile rispetto agli altri precedentemente descritti. I foci indotti da tali sostanze erano localizzati preferenzialmente nelle regioni eucromatiche della maggior parte dei nuclei delle cellule analizzate, un fenomeno riscontrato anche in cellule esposte a irraggiamento (Cowell et al., 2007).

γ -H2AX è stato utilizzato come marker di danno genotossico in molti studi che prevedevano il trattamento dei campioni con sostanze mutagene quali idrocarburi policiclici aromatici (Mattsson et al. 2009), DNA crosslinkers (Clingen et al. 2008), radiazioni ionizzanti (MacPhail et al. 2003), radiazioni ultraviolette (Tanaka et al. 2007), farmaci antitumorali (Ishiguro et al. 2006). E' risultato che i raggi UV innescano la fosforilazione di H2AX nei fibroblasti umani (Rogakou et al. 1998; Zhou and Elledge, 2000; Fernandez-Capetillo et al. 2002; Iliakis et al. 2004) ed in alcune linee cellulari umane di cancro (Rogakou et al. 1999; Iliakis et al. 2003). Sebbene i raggi UV non inducono direttamente DSB nel DNA, è stato ipotizzato che la fosforilazione di H2AX può essere innescata dalle DSB indotte come risultato del blocco della replicazione ai siti delle lesioni indotte dagli UV (Rouse and Jackons, 2002; Iliakis et al. 2003; Iliakis et al. 2004). Le DSBs associate con il danno da UV o lo stress replicativo sono, infatti, rilevate da ATR (Ward and Chen, 2001; Limoli et al. 2002; Hanasoge and Ljungman, 2007), che fosforila anche H2AX. ATR è attivato mediante l'interazione con ATRIP, che riconosce le regioni a singolo filamento nel DNA che possono

essere causate dalla forza replicativa o dalla riparazione degli addotti al DNA (Paulsen and Cimprich, 2007). Quindi la fosforilazione di H2AX mediata da ATR non necessariamente indica la presenza di una DSB nel genoma. Questo è da tenere in considerazione quando γ -H2AX è usato come un indicatore delle DSBs, in particolare nelle cellule in fase S, e può in parte spiegare l'alto numero di γ -H2AX normalmente visti in fase S in assenza di trattamenti che inducono danni al DNA.

Uno specifico campo di ricerca interessa l'induzione della fosforilazione di H2AX in seguito ad esposizione ad agenti che producono legami crociati inter elica (interstrand cross link, ICL). E' stato osservato che γ -H2AX si associa con molti fattori di ricombinazione omologa richiesti per la riparazione degli ICLs. Sulla base di queste osservazioni è stato proposto che γ -H2AX possa essere utilizzato come biomarcatore di risposta cellulare, e relativa efficacia terapeutica, a trattamenti antitumorali con farmaci induttori di ICL. La fosforilazione di H2AX in risposta ad agenti che inducono ICLs si pensa sia correlata alla presenza di DSBs associate alla riparazione di questo tipo di danno al DNA o all'interruzione delle forche replicative che incontrino ICL durante la fase S (Clingen et al. 2008; Olive and Banath, 2009).

5.6 La fosforilazione di H2AX durante il ciclo cellulare

Poiché le modificazioni post-traduzionali indotte nelle molecole H2AX dall'irraggiamento, che portano alla formazione di foci microscopicamente visibili, implicano la fosforilazione/defosforilazione di migliaia di molecole in un volume corrispondente circa ad 1 Mb è possibile che le variazioni dello stato di condensazione della cromatina che avvengono normalmente durante le varie fasi del ciclo cellulare influenzino la formazione dei foci γ -H2AX.

La cinetica di comparsa e scomparsa dei foci γ -H2AX è stata confrontata con la cinetica di induzione e riparazione di DSBs in cellule mitotiche e in fase G1 dopo irraggiamento. Mentre non sono state osservate differenze tra i due stadi del ciclo cellulare per quanto riguarda la cinetica delle DSBs, invece la scomparsa dei foci γ -H2AX è risultata più lenta nelle cellule mitotiche rispetto a quelle in G1. Tale effetto potrebbe essere ricondotto all'alto grado di compattazione delle proteine istoniche attorno alle DSBs nei cromosomi mitotici: ciò limiterebbe l'accessibilità degli enzimi coinvolti nella defosforilazione di γ -H2AX nei cromosomi metafasici rispetto ai cromosomi in interfase G1. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere quella secondo cui i foci γ -H2AX persistano "intrappolati" nella

cromatina ricompattata. Questa è un'evidenza del fatto che DSBs e foci γ -H2AX non risultano direttamente correlati in cellule mitotiche (Kato et al. 2007).

La fosforilazione di H2AX è stata anche implicata, insieme all'azione dell'enzima BRCA1, nella replicazione tardiva del cromosoma X inattivo (Xi) delle cellule femminili di mammifero. A tale riguardo è stato ipotizzato che la fosforilazione di H2AX possa contribuire dopo la replicazione, in sinergia con l'azione dei complessi di rimodellamento della cromatina, al ripristino delle modificazioni istoniche tipiche dei nucleosomi di Xi (Chadwick and Lane, 2005).

5.7 γ -H2AX e l'apoptosi

La morte cellulare programmata (Programmed Cell Death, PCD) o apoptosi è un processo fisiologico, che si verifica negli organismi multicellulari, mediante il quale vengono eliminate delle cellule durante lo sviluppo embrionale e nell'adulto. L'apoptosi svolge un ruolo molto importante nel contrastare la crescita tumorale e difetti nei pathways di segnalazione apoptotici sono stati riscontrati in cellule tumorali (Hanahan and Weinberg, 2000). Durante la PCD viene attivata una specifica famiglia di cisteina proteasi, le caspasi, i cui componenti sono in grado di attuare proteolisi di molte molecole e condurre quindi alla distruzione della cellula apoptotica. I cambiamenti morfologici attivati dalle caspasi includono la contrazione della cellula, la condensazione cromatinica, la frammentazione del DNA e, l'eventuale disintegrazione della cellula in piccoli frammenti che possono essere fagocitati dalle cellule circostanti. Esistono due principali pathways apoptotici che portano allo stesso effetto finale, l'attivazione delle caspasi: il pathway estrinseco o dei recettori di morte (Ashkenazi and Dixit, 1998) e il pathway intrinseco o mitocondriale (Green and Reed, 1998) (Figura 26).

Apoptosis (Programmed Cell Death)

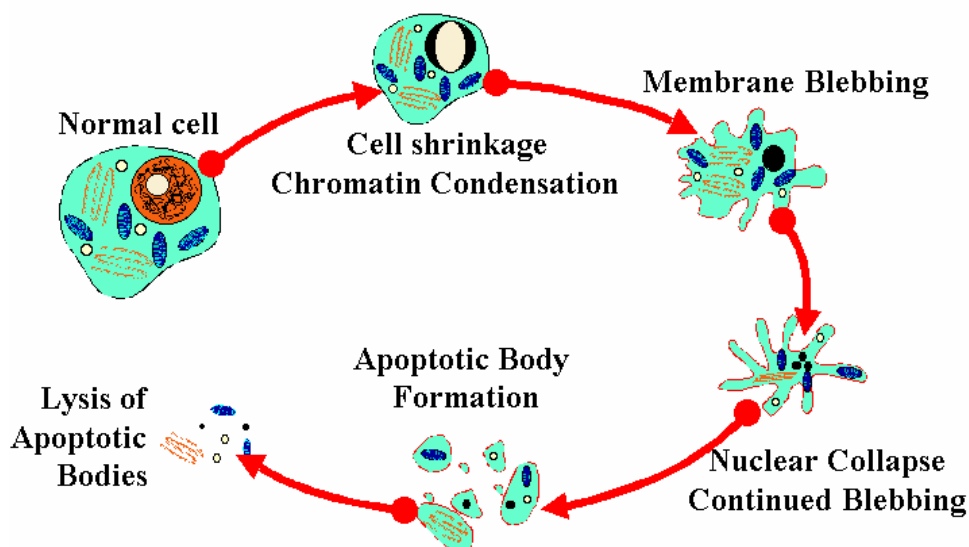


Figura 26: Cambiamenti morfologici in una cellula correlati alla morte cellulare programmata

E' stato osservato che H2AX viene fosforilato anche durante l'apoptosi, in concomitanza con l'inizio della frammentazione del DNA (Rogakou et al. 2000). Nel lavoro di Mukherjee e collaboratori (Mukherjee et al. 2006) è stato dimostrato, in cellule ovariche di Hamster cinese e in fibroblasti umani, che la fosforilazione di H2AX coincide con la frammentazione del DNA ed è limitata a nuclei che presentano una caratteristica condensazione della cromatina. In tale lavoro è stato dimostrato che la chinasi responsabile della fosforilazione di H2AX associata all'apoptosi sarebbe la DNA-PK. Cosa potrebbe indicare la fosforilazione di H2AX in uno stadio tardivo dell'apoptosi quale la frammentazione del DNA? A tale proposito sono state avanzate due ipotesi. Secondo la prima la fosforilazione di H2AX potrebbe non essere semplicemente un riflesso condizionato associato alla frammentazione del DNA, ma potrebbe rappresentare l'innesco di un estremo tentativo di riparazione tramite NHEJ mediato dalla DNA-PK, che potrebbe, seppure con bassa probabilità e al prezzo della formazione di riarrangiamenti cromosomici, revertire il processo apoptotico (Betti et al. 2001).

La seconda ipotesi riguardante il significato della fosforilazione di γ -H2AX nei processi apoptotici metterebbe in relazione il fenomeno alle modificazioni conformazionali della cromatina che si verificano in concomitanza con la frammentazione della doppia elica e che sono probabilmente propedeutiche alle fasi successive di fissione nucleare e fagocitosi.

CAPITOLO 6: SCOPO DELLA RICERCA

Le cellule eucariotiche rispondono ad agenti esogeni ed endogeni attivando varie pathways di trasduzione del segnale che portano all'arresto del ciclo cellulare, alla riparazione del danno al DNA o all'innescio della morte per apoptosi. La presenza di cellule danneggiate, infatti, determina risposte cellulari assai complesse e articolate; la scelta del destino di ogni cellula dipende dal tipo cellulare, dall'estensione del danno e dall'ambiente extracellulare. Per esempio l'apoptosi può essere la risposta preferita da cellule danneggiate in cui è fallito il meccanismo riparativo. Queste cellule infatti, se non eliminate, costituiscono un rischio di accumulo di aberrazioni cromosomiche che sono l'origine della cancerogenesi. Le rotture a doppia elica del DNA (DSBs) costituiscono la lesione critica che, se non riparata o erroneamente riparata, può causare le aberrazioni cromosomiche, la morte cellulare come anche mutazioni e trasformazione cellulare. I meccanismi in grado di eliminare le DSB si suddividono in processi dipendenti dall'omologia di sequenza (Homologous Recombination) ed indipendenti da essa (Non Homologous End Joining). Molti passaggi di questi delicati meccanismi e le relazioni che intercorrono tra di essi non sono ancora ben compresi. La scoperta di nuove pathways cellulari è spesso favorita dallo studio delle malattie genetiche, come l'Atassia Telangiectasia, nelle quali le stesse pathways risultano difettive. Alternativamente, è possibile l'analisi delle proteine coinvolte nella riparazione che interagiscono con le proteine della cromatina, come l'istone H2AX.

Durante il primo anno di dottorato al fine di comprendere meglio le pathways cellulari legate alla riparazione del danno al DNA, il nostro studio si è rivolto ad una malattia genetica, l'Atassia Telangiectasia. Questa sindrome genetica autosomica recessiva sfocia in un intricato fenotipo cellulare e si manifesta in difetti a quasi tutti i tessuti dell'organismo. Tutte le disfunzioni sono derivanti dall'inattivazione di un singolo gene, il gene *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated). Si è arrivati all'identificazione di questo gene nel 1988 quando Gatti e collaboratori (1988) lo mapparono sul cromosoma 11q22-23. Numerose ricerche seguite a questa identificazione portarono all'assegnazione di un ruolo essenziale per *ATM* nella risposta cellulare al danno al DNA.

Inoltre, una delle principali vie di trasduzione del segnale in risposta al danno al DNA nelle cellule eucariotiche è quella che coinvolge, oltre ad altri fattori, la proteina p53, il guardiano del genoma. La maggior parte dei tumori solidi e delle leucemie recano una

mutazione nel gene *p53*. Questo gene codifica per una proteina di 393 residui aminoacidici e 53 kda. Essa è in grado di legarsi come tetramero ad una sequenza specifica del DNA comportandosi così da attivatore trascrizionale di numerosi geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA e nel processo apoptotico. Il compito di *p53* consiste nel bloccare la divisione cellulare per impedire che il DNA danneggiato si duplichi, dando così alle cellule la possibilità di correggere l'errore prima che questo passi alle cellule figlie; non meno importante è il ruolo della *p53* nell'innescare la morte per apoptosi in caso di danno eccessivo o irreparabile. È stato dimostrato che nel nucleo esistono varie fosfoforme (famiglie) di *p53*, che differiscono tra loro per l'amminoacido modificato al momento dell'attivazione. È stato ipotizzato un ruolo diverso per ogni fosfoforma di *p53* nei vari processi del ciclo cellulare: per esempio la *p53*^{ser15} sembra avere un ruolo attivo nel processo di riparazione del DNA poiché colocalizza con proteine che intervengono in questo processo (Al Rashid et al. 2005). L'attivazione di tutte le fosfoforme è sotto il controllo di ATM.

In questo contesto si inserisce la nostra ricerca con il fine di saggiare il ruolo di *p53* in cellule AT in seguito ad esposizione a radiazione ionizzante. A questo scopo abbiamo utilizzato la PFT- α , un inibitore sintetico della *p53* che sembra interferire con l'attività trascrizionale della proteina. Allo scopo di chiarire il ruolo di *p53* nella riparazione delle DSBs indotte dalla radiazione ionizzante abbiamo analizzato l'espressione sia di *p53* e *p53*^{ser15} sia di proteine implicate nel processo di riparazione del DNA come RAD51 tramite western blotting (con e senza PFT- α). Una volta comprese le basi molecolari del difetto che conduce all'Atassia Telangiectasia si potrebbero ottenere importanti implicazioni terapeutiche.

Nel secondo anno di tesi lo studio si è indirizzato a determinare la relazione tra la frequenza di alterazioni cromosomiche e l'apoptosi e ad esaminare il ruolo di *p53* nel controllo della stabilità genomica in linee cellulari umane quali i linfociti e i fibroblasti primari, dopo esposizione a radiazione ionizzante in diverse fasi del ciclo cellulare. Tale studio si inserisce in un contesto più ampio in cui secondo studi precedenti (Schwartz e Jordan, 1997) l'apoptosi elimina selettivamente le cellule che portano aberrazioni instabili (dicentrici e ring) rispetto a quelle con aberrazioni stabili (traslocazioni bilanciate); inoltre, nei linfociti umani irradiati in G0 e o immediatamente stimolati a proliferare o mantenuti per 48h nella fase G0, la diminuzione della frequenza di aberrazioni instabili è correlata con l'apoptosi-*p53*-dipendente (Bassi et al. 2003; Belloni et al. 2005); infine, in un recente lavoro (Belloni et al. 2008) è stata fornita un'evidenza diretta del fatto che le cellule contenenti cromosomi dicentrici sono di preferenza eliminate mediante morte apoptotica.

Per quanto riguarda i fibroblasti umani primari è stato condotto uno studio allo scopo di analizzare la correlazione tra le aberrazioni cromosomiche e la morte cellulare indotte dalle radiazioni. I fibroblasti, infatti, costituiscono una linea cellulare di interesse radiobiologico e clinico nel momento in cui si considerano le implicazioni del danno genetico in ambito radioterapico oltre che in quello della normale esposizione ambientale. Il sistema cellulare dei fibroblasti, da noi scelto per tale lavoro, fornisce la possibilità di comparare i risultati ottenuti con quelli già descritti nel sistema linfocitario poiché sono cellule umane normali, non immortalizzate, e si può sfruttare la confluenza, in cui la crescita si arresta per il fenomeno di inibizione da contatto, per mimare la fase G0 del ciclo cellulare. Sperimentalmente, colture confluenti di fibroblasti sono state irradiate e immediatamente dopo sono state indotte alla proliferazione mediante tripsinizzazione e nuova semina. A vari tempi di recupero dopo l'irradiazione è stata effettuata l'analisi del danno citogenetico, dell'apoptosi e l'andamento del ciclo cellulare.

Infine, il terzo anno di dottorato è stato dedicato allo studio delle proteine coinvolte nella riparazione che interagiscono con le proteine della cromatina, come ad esempio l'istone H2AX. Successivamente all'interazione proteine-istone si ha un rimodellamento della cromatina che permette l'accesso al sito danneggiato e la riparazione della lesione in maniera regolata nel tempo. Negli eucarioti, la riparazione è regolata da complessi multiproteici che sono organizzati in foci nel sito della lesione. Questi foci sono strutture di giga-dalton altamente dinamiche in grado di riparare contemporaneamente lesioni multiple del DNA. Inoltre, la composizione di questi centri di riparazione dipende dal tipo di lesione al DNA ed è in stretta relazione con la fase del ciclo cellulare. Molti dei componenti dei foci di riparazione sono regolati tramite modificazioni post-traduzionali, quali la fosforilazione e l'ubiquitinazione.

L'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX) è essenziale per un efficiente riconoscimento e riparazione delle DSBs, e molte molecole, spesso migliaia, di H2AX vengono rapidamente fosforilate ad ogni sito in cui è presente una DSB (Rogakou et al. 1998). Il sito di fosforilazione è una serina situata a 4 residui dal C-terminale che è evolutivamente conservata negli organismi. L'istone H2AX può essere fosforilato da tre diversi tipi di chinasi: ATM, ATR e DNA-PK. I foci di γ -H2AX possono essere quantificati tramite microscopia immunofluorescente o citometria a flusso. Data la rapida induzione e amplificazione della forma fosforilata dell'istone H2AX, e visto il rapporto di 1:1 tra il numero di foci di γ -H2AX e il numero di DSB (Sedelnikova et al. 2002), gli anticorpi che riconoscono l'istone H2AX fosforilato sono diventati degli ottimi reagenti per determinare la presenza di DSBs. Inoltre,

l'analisi dei foci dell' γ -H2AX ha un ruolo chiave nello studio della relazione tra lesione primaria al DNA, riparazione e formazione di danno cromosomico.

Il nostro studio si è incentrato sull'analisi dell'induzione dell'istone γ -H2AX fosforilato da parte di diversi agenti sia chimici che fisici che differiscono per il tipo di danno indotto al DNA, allo scopo di mettere in relazione il tipo di danno indotto dai diversi agenti, la sua segnalazione e la sua conseguente riparazione con il fine di determinare il coinvolgimento dell'istone H2AX nelle varie fasi che portano alla risoluzione del danno al DNA.

CAPITOLO 7: MATERIALI E METODI

7.1 Sistemi cellulari

Diverse linee cellulari sono state utilizzate per svolgere gli esperimenti di questa tesi:

1) Linee cellulari linfoblastoidi di Ataxia Telangiectasia (AT). Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti sono state ottenute dal Laboratorio di Medicina Sperimentale dell'Università La Sapienza di Roma. Esse sono:

- FLEBV - linea di controllo "wild-type";
- AT97RM - omozigote per la mutazione ATM (0% di proteina nativa);
- AT21RM - omozigote per la mutazione ATM (32% di proteina nativa);
- AT28RM - eterozigote composto per la mutazione ATM (0% di proteina nativa).

2) Linfociti umani di sangue periferico (HPBL), prelevati da donatori sani e isolati da "buffy coat". E' un sistema cellulare vantaggioso perché sono cellule di origine umana ed è semplice ottenere sangue in quantità sufficiente per procedere agli esperimenti. La popolazione cellulare che si ottiene è costituita soprattutto di linfociti in fase G0, che dovrebbe minimizzare gli effetti dovuti all'interferenza del ciclo cellulare. Infatti, i linfociti possono essere stimolati a proliferare mediante l'uso di attivatori che mimano l'effetto antigenico. I linfociti sono distribuiti in maniera uniforme nel corpo umano ed è possibile compiere sia studi in vivo che in vitro. Tuttavia, tale sistema può presentare lo svantaggio della spontanea tendenza ad andare in apoptosi nelle colture in vitro e dalla diversa risposta individuale ai diversi agenti.

3) Fibroblasti umani primari normali FB789, con cui sono state allestite colture aderenti a termine. Ciò sta ad indicare che, in vitro, le cellule compiono un numero limitato di divisioni cellulari, per poi andare incontro a degenerazione e morte, indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita, principalmente a causa del fenomeno di senescenza replicativa, a differenza di quanto avviene per linee cellulari immortalizzate.

4) Linee parentali di Hamster Cinese che si mantengono stabili in coltura, il cui cariotipo è costituito da 21+1 cromosomi riarrangiati e tutti diversi tra loro: le AA8 e le V79.

7.2 Condizioni di crescita

7.2.1 Linee cellulari linfoblastoidi di AT

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

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

Saltuariamente le colture cellulari vengono passate in terreno arricchito con vitamine, aminoacidi essenziali e aminoacidi non-essenziali. Poste in questi terreni di coltura, le linee cellulari crescono in sospensione e sono mantenute in incubatore a una temperatura di 37°C, in condizioni di saturazione di umidità e al 5% di CO₂. Le colture vengono suddivise regolarmente ogni due giorni alla concentrazione di 400.000 cellule per ml di terreno. La durata del ciclo cellulare è, per le 3 linee, di circa 20 ore ed il numero modale dei cromosomi è 46.

7.2.2 Isolamento dei linfociti umani

I linfociti umani di sangue periferico sono stati isolati da sacche arricchite di leucociti provenienti da donatori diversi. Il sangue viene diluito 2:1 in tampone fosfato salino (PBS).

L'isolamento viene effettuato mediante la stratificazione del sangue in una soluzione di polisaccarosio e sodio diatrizotato di densità pari a 1.077-0.001 g/ml (Histopaque 1077, Sigma) che, creando un gradiente, consente la separazione delle diverse componenti del sangue. Vengono depositati 12 ml di Histopaque 1077 sul fondo di ogni tubo e si lascia cadere goccia a goccia la stessa quantità di sangue diluito. Dopo centrifugazione per 30 minuti a 1800 rpm, si preleva l'anello di linfociti che si forma all'interfaccia siero/Histopaque. Gli eritrociti ed i granulociti dopo la centrifugazione sedimentano sul fondo dei tubi. Lo strato dei linfociti viene prelevato e diluito 1:1 con PBS per poi essere centrifugato per 20 minuti a 1800 rpm. Seguono altri due lavaggi in PBS per eliminare la quasi totalità delle piastrine presenti nel pellet cellulare. Dopo l'ultimo lavaggio, una volta aspirato il sovrnatante, i linfociti isolati vengono trasferiti nella capsula di Petri con il terreno di coltura Ham's-F10 complementato con:

- antibiotici (penicillina 50 UI/ml e streptomicina 50 µg/ml);

- L- glutammina 2 mM (1%);
- 20% di siero bovino fetale (FBS) inattivato mediante l'esposizione a 56°C per 20 minuti.

Prima di iniziare gli esperimenti occorre sempre stimare la popolazione dei linfociti contandoli tramite camera di Burkner, per procedere così alla semina di 1×10^6 cellule per ml di terreno in bottiglie di coltura da 50 ml. Le bottiglie contenenti i linfociti vengono quindi poste in incubatore a 37° C, con una umidificazione d'aria del 95% e con il 5% di CO₂.

7.2.3 Stimolazione dei linfociti umani

La stimolazione dei linfociti avviene mediante l'impiego di attivatori policlonali in grado di attivare i linfociti B e T a prescindere dalla loro specificità antigenica. Tra gli attivatori comunemente utilizzati troviamo le lectine, proteine polimeriche delle piante che sono in grado di legare specificamente i residui glucidici delle glicoproteine di superficie delle cellule T, incluso il complesso del recettore TCR:CD3, mimando così il segnale trasmesso da tale complesso per la stimolazione. Tra le lectine di uso più frequente in laboratorio si possono citare la concanavalina A e la fitoematoagglutinina, che agisce maggiormente sui linfociti T.

In seguito alla stimolazione, si osservano una serie di cambiamenti:

- modificazioni della permeabilità di membrana (aumento dell'attività di scambio Na⁺/H⁺; aumento del numero di canali K⁺ aperti, aumento del trasporto di nutrienti);
- aumenta la concentrazione di calcio ionizzato in seguito alla idrolisi dei fosfoinositoli di membrana;
- fosforilazione;
- aumento della trascrizione genica.

Prima della stimolazione i linfociti si trovano nella fase G0 del ciclo cellulare, ma in risposta ad uno stimolo antigenico i linfociti entrano nella fase G1 ed il loro diametro raggiunge i 10-15 µm, il citoplasma diventa più consistente e contiene più organelli ed RNA rispetto ai linfociti quiescenti. La progressione continua nella fase S fino alla mitosi. Tale successione di eventi è denominata trasformazione blastica.

Per gli esperimenti è stata utilizzata la fitoematoagglutinina (PHA) come mitogeno per attivare i linfociti T immunocompetenti stimolandone la divisione cellulare. La PHA si

aggiunge al terreno di coltura completo alla concentrazione finale del 2% e, normalmente, dopo 48 ore di trattamento si osservano le prime mitosi.

7.2.4 Fibroblasti umani primari

Come è noto, le cellule che *in vivo* fanno parte di tessuti solidi *in vitro* crescono aderendo in monostrato alla superficie di una piastra di coltura. L'adesione è una condizione necessaria per la duplicazione del DNA e la sintesi proteica, ed è un fenomeno attivo che richiede l'interazione di recettori di membrana, le integrine, con proteine adesive come la fibronectina, adsorbite sulla superficie della piastra di coltura. Le piastre per colture aderenti possono essere distinte in due tipi principali: fiasche e capsule Petri. Le nostre colture sono state mantenute in fiasche, contenitori ad imboccatura stretta, chiuse con tappo a vite, con area di 25 o 75 cm². Le cellule aderenti crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile e questo stadio si definisce coltura confluenta. A confluenza la crescita si arresta, per il fenomeno di inibizione da contatto, e le cellule devono essere trasferite in nuove fiasche. Per il trasferimento le cellule vengono staccate dal fondo della fiasca con una soluzione di EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) e tripsina. L'EDTA chela il Ca²⁺ ed il Mg²⁺ necessari per l'adesione, mentre la tripsina, in quanto enzima proteolitico, degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti. Una volta ottenuto il distacco delle cellule l'azione di tripsina ed EDTA viene neutralizzata con l'aggiunta di terreno completo, che contiene specifici inibitori della tripsina nel siero.

Il terreno base utilizzato per le nostre colture è il McCoy (GIBCO, Invitrogen), cui vengono aggiunti il 20% di siero fetale bovino (FBS), L-glutamina 2 mM (1%) e antibiotici, usati a scopo preventivo, quali penicillina (50 UI/ml) e streptomina (50 µg/ml). I trasferimenti (anche passaggi) sono stati effettuati all'incirca ogni due o tre giorni in base al grado di confluenza delle cellule preventivamente giudicato mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase e valutazione occhiometrica della colorazione del terreno di crescita. Dopo la semina, effettuata in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare, le fiasche contenenti le cellule venivano mantenute in incubatore a 37°C con umidificazione d'aria del 95% e con il 5% di CO₂.

7.2.5 Linee cellulari di Hamster Cinese

Le linee cellulari parentali di hamster cinese crescono in adesione in terreno di coltura costituito da:

- terreno DMEM;
- 10% di siero fetale bovino;
- 1% di L-Glutamina (2 mM);
- 1% di Penicillina (50 UI/ml) e Streptomicina (50 mg/ml);
- 0,1% di Gentamicina.

7.3 Reagenti

La Pifithrin- α (PFT- α) (Calbiochem) è un inibitore dell'apoptosi e dell'attività trascrizionale p53 dipendente (Komarov et al., 1999). Tale composto è stato disciolto in DMSO alla concentrazione madre di 27,2 mM. Viene aggiunta 12 h prima del trattamento con i raggi X alla dose finale di 30 μ M. La struttura della PFT- α è riportata in Figura 27.

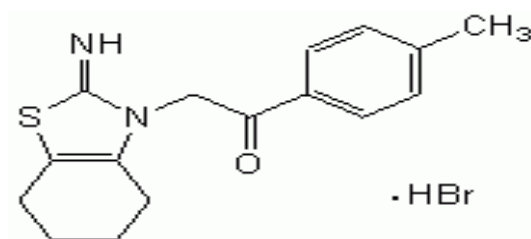


Figura 27: Struttura della pifitrina- α .

La Bromodeossiuridina (BrdUrd) (Sigma) è un analogo della base timina che viene incorporato nel DNA nel periodo di sintesi. È stata disciolta in acqua distillata ad una concentrazione di 300 μ g/ml e conservata a -20°C fino al momento dell'uso. Viene aggiunta alle cellule subito dopo l'irradiazione e tolta dopo un'ora, ad una concentrazione di 6 μ g/ml.

Il Colcemid è un veleno del fuso mitotico che blocca la polimerizzazione della tubulina e inibisce la formazione del fuso mitotico. Si aggiunge alla coltura cellulare (0,2 μ g /ml) 3/4 ore prima di effettuare il fissaggio.

La Fitoematoagglutinina (PHA) è una mucoproteina estratta dal *Phaseolus vulgaris* che stimola i linfociti T timo-dipendenti. Si aggiunge alle colture cellulari ad una concentrazione del 2%.

7.4 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per le linee linfoblastoidi di AT

7.4.1 Western blotting (SDS page)

Dopo l'irradiazione (la PFT- α è stata aggiunta tre ore prima dell'irradiazione) le cellule sono state processate per il western blotting. Le cellule sono state lavate una volta in PBS e lisate in RIPA buffer (1% Igepal, 1% Na-deossicolato, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Na-fluoride, 100 U/ml aprotinina) per 25-30 minuti in ghiaccio. I campioni vengono poi centrifugati a 11000 rpm per 10 min a +4°C. La concentrazione delle proteine nei campioni, contenute nel sovranatante, è stata misurata mediante la costruzione di una retta di taratura con BSA ottenuta tramite un saggio spettrofotometrico con il metodo Bradford. 40 μ g di proteine sono stati caricati nei pozzetti (con loading buffer 4X) di un 4-12% Novex Tris-Glicine gel (Invitrogen). In un pozzetto è stato caricato il marker (Benchmark Prestained protein ladder, Invitrogen). La camera elettroforetica (Sure Lock, Invitrogen) è stata riempita con Tris-Glycine-SDS buffer (250 mM Tris-HCl, 1.92 M Glicina, 1% SDS, pH 8.3). La corsa è stata condotta a 35 mA e 150 V per 2-3 ore. A fine corsa il gel viene montato su un supporto adatto (Blot Module, Invitrogen), e si procede al trasferimento delle proteine su una membrana di nitrocellulosa. Per fare questo la camera elettroforetica viene riempita con Tris-Glycine Transfer buffer (315 mM Tris-HCl, 2.4 M Glicina, 20% metanolo) e si esegue l'elettroforesi a 150 mA e 30 V per 2 ore. Si procede ora al bloccaggio delle proteine immergendo la membrana per un'ora nella "blocking solution" (5% di not-fat dried milk in TBST: 1 M Tris-HCl, 5 M NaCl and 0.05% Tween-20, pH 7.6). Si immerge quindi la membrana in una soluzione 1:500 di anticorpo primario in milk e si lascia incubare overnight a +4°C. Per p53 abbiamo usato l'anticorpo "anti-mouse DO-1" (Santa Cruz); per RAD51 abbiamo usato un "anti-rabbit RAD51" (Sigma) e per p53^{ser15} un "anti-rabbit p53^{ser15}" (Calbiochem). Si eseguono 3 lavaggi in TBST e poi si procede all'incubazione per un'ora della membrana con l'anticorpo secondario (1:10000) coniugato con la perossidasi. Si eseguono ancora 2 lavaggi in TBST ed uno in TBS (per eliminare l'eccesso di Tween-20) e si procede con lo sviluppo della lastra fotografica usando il "Western Blotting detection reagents kit" (Amersham). L'avvenuta reazione antigene-anticorpo è segnalata dalla formazione di una banda di colore nero sulla lastra fotografica, dalla cui intensità si ricava la quantità di espressione della proteina in esame.

7.5 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per i linfociti.

I linfociti isolati dal “buffy coat” sono stati seminati nel terreno di coltura alla concentrazione di $1 \times 10^6/\text{ml}$. Successivamente alla semina è stata aggiunta la PHA, in grado di stimolare la proliferazione cellulare. La PFT- α , inibitore sintetico della proteina p53, viene somministrata ai linfociti 12 h prima dell’irradiazione. Dopo 44 ore dalla stimolazione con PHA i linfociti nella fase G2 del ciclo cellulare sono stati irradiati con una dose di 0,5 Gy di raggi X, sia in presenza che in assenza di PFT- α , utilizzando una macchina Gilardoni MGL 200/8D, operante a 250 kV e 6 mA (“dose rate” 60 cGy/min). Subito dopo l’irradiazione ai linfociti viene aggiunta la BrdUrd che viene lasciata nel terreno per 1 h. L’incorporazione della BrdUrd nella molecola del DNA al posto della timina ha consentito l’analisi, tramite l’individuazione del bandeggio da replicazione con anticorpi specifici, delle metafasi che si trovavano o nella fase G2 del ciclo cellulare (negativa al bandeggio da replicazione) o nella fase S (positiva al bandeggio da replicazione) al momento dell’irradiazione. Questa analisi è stata effettuata a diversi tempi di fissaggio (2, 4, 6, 8, 10, 12 h) dall’irradiazione aggiungendo prima la colchicina per arrestare le cellule in metafase. I parametri analizzati in questo lavoro comprendono l’analisi della cinetica di proliferazione nella fase G2 del ciclo cellulare, lo studio dell’apoptosi, un saggio citofluorimetrico per valutare l’espressione della proteina p53 e l’analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X. In Figura 28 è illustrato il protocollo sperimentale e qui sotto i punti sperimentali effettuati:

1. K
2. PFT- α
3. 0.5Gy
4. 0.5 Gy + PFT- α

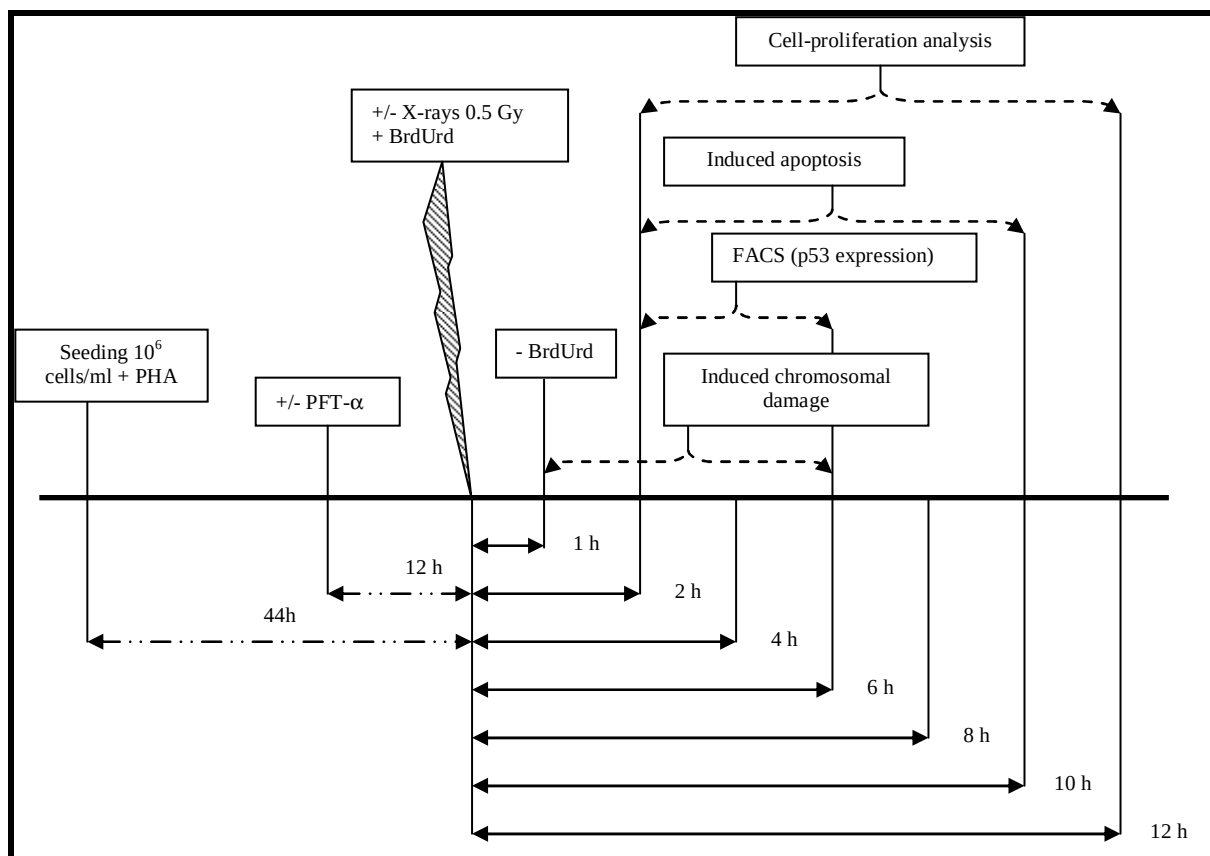


Figura 28: Protocollo sperimentale per l'analisi in G2 dei linfociti umani.

7.5.1 Fissaggio ed allestimento dei preparati citogenetici

Nelle due ore precedenti al fissaggio le cellule sono state trattate con colcemid per bloccarle in metafase, momento nel quale la condensazione della cromatina ci consente di distinguere nel migliore dei modi i cromosomi e di valutare l'eventuale presenza di aberrazioni cromosomiche. Vengono prelevati 5×10^6 di linfociti contenuti in circa 5 ml di terreno e trasferiti in tubi falcon da 15 ml. Le cellule vengono quindi centrifugate per 10 minuti a 1000 rpm (o 7 minuti a 1500 rpm), si aspira quindi il sovrnatante, si risospende il pellet e si aggiungono in ogni tubo 5 ml di soluzione ipotonica di KCl 0.75 M. I tubi vengono quindi lasciati per 10 minuti nel bagnetto a 37°C. Subito dopo occorre centrifugare nuovamente i tubi a 1000 rpm per 10 minuti, si aspira il sovrnatante e, risospeso il pellet, si aggiungono 5 ml di fissativo composto di metanolo:acido acetico (3:1) versandolo nei tubi goccia a goccia. I tubi vengono poi nuovamente centrifugati (nelle stesse condizioni), si riassume il sopranatante, si risospende il pellet e si aggiunge nuovo fissativo. Tale procedura si ripete ancora una volta. Le cellule sono ora fissate e possono essere conservate in frigorifero a +4° C dalle due alle 24 ore prima della semina sui vetrini. Prima della semina, si effettua una nuova centrifugazione dei tubi contenenti le cellule, in modo di poter eliminare il fissativo in

eccesso. Il pellet può essere ora risospeso nel nuovo fissativo, che viene aggiunto in quantità tale da ottenere la giusta concentrazione di cellule per la semina sui vetrini. I vetrini sono precedentemente lavati in acqua corrente e conservati in acqua distillata e metanolo 1:1 in frigorifero a +4 °C almeno per un'ora. La sospensione finale di cellule viene fatta cadere dall'alto goccia a goccia sui vetrini bagnati.

7.5.2 Allestimento dei preparati per l'analisi della morfologia nucleare

Circa 1×10^6 cellule vengono trasferite in tubi Eppendorf e centrifugate a 1800 rpm per 10 minuti. Dopo aver aspirato e risospeso il pellet cellulare si aggiungono 1,5 ml di fissativo 5:1 (metanolo:acido acetico). La soluzione quindi viene conservata a -20°C.

La semina va effettuata su vetrini lavati con acqua corrente e conservati a + 4°C in una soluzione di acqua distillata e metanolo al 10%. I vetrini vengono poi colorati con la reazione con anticorpo anti-bromodeossiuridina.

7.5.3 Reazione per la colorazione con anticorpo anti-bromodeossiuridina.

Questa reazione ci permette di individuare il bandeggio da replicazione tramite l'incorporazione della BrdUrd. Dopo che i vetrini sono stati seminati vengono fatti invecchiare almeno una settimana prima di proseguire alla reazione di colorazione. I vetrini vengono denaturati per un minuto in 10 mM NaOH 70% di etanolo in agitazione. Successivamente i vetrini si disidratano per 5 minuti ciascuno in etanolo al 70, 90, 100% in agitazione e quindi vengono asciugati all'aria.

Da ora in poi, lavorando al buio, i vetrini si devono incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con 100 µl per vetrino di anticorpo anti-BrdUrd di topo (Boehringer-Mannheim) diluito 1:100 in buffer immunologico (PBS, 0,5% BSA e 0,5% Tween 20), con coprioggetto.

Poi si eseguono 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno in agitazione. Nei successivi 30 minuti i vetrini, a temperatura ambiente, si incubano con 100 µl per vetrino di anticorpo anti-topo IgG-FITC di capra diluito 5:100 in buffer immunologico (PBS, 0,5% BSA e 0,5% Tween 20). Dopo aver eseguito altri 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno in agitazione, i vetrini si disidratano nuovamente in etanolo al 70, 90, 100% per 5 minuti ciascuno in agitazione.

Una volta asciugati i vetrini all'aria la colorazione con DAPI viene eseguita immergendo i vetrini per 5 minuti in una soluzione di 0,2 µg/ml di DAPI in 2xSSC. Quindi, si

aggiungono su ogni vetrino 40 μ l di Vectashield Mounting Medium (Vector Lab) e si monta il vetrino coprioggetto, che si fissa con dello smalto. I vetrini sono pronti per l'analisi al microscopio a fluorescenza (Figura 29).

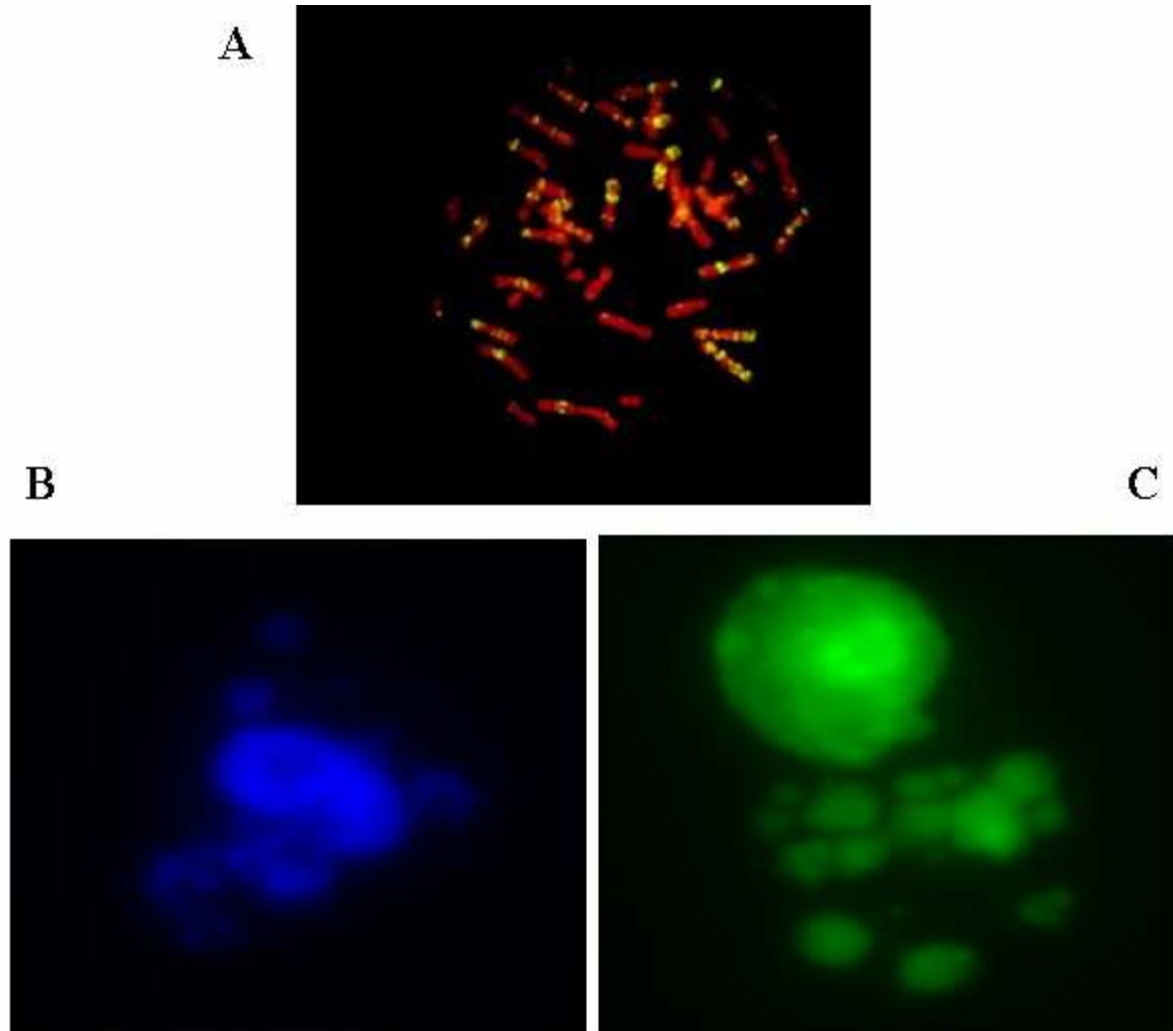


Figura 29: Esempio del rilevamento immunocitochimico dell'incorporazione della BrdUrd sia in cellule in metafase sia apoptotiche ottenute di linfociti umani esposti all'irradiazione in presenza o assenza PFT- α . a) metafase BrdUrd positiva; b) cellula apoptotica BrdUrd negativa; c) cellula apoptotica BrdUrd positiva.

7.5.4 Colorazione con Giemsa

Dopo il fissaggio e la semina su vetrino descritti nel paragrafo 7.5.1 si procede alla colorazione con una soluzione al 3% di Giemsa nella quale i vetrini vanno immersi e lasciati per 6 minuti. Una volta asciugati i vetrini vengono coperti con vetrino coprioggetto fissato con eukitt.

7.5.5 Analisi della cinetica del ciclo cellulare

Per lo studio della cinetica di progressione del ciclo cellulare sono state analizzate 100 metafasi per punto sperimentale, usando l'obiettivo 100x, considerando le metafasi positive al bandeggio da replicazione come cellule che al momento dell'irradiazione si trovavano nella fase S del ciclo cellulare (Figura 29).

7.5.6 Analisi della morfologia nucleare apoptotica

La morfologia nucleare si osserva al microscopio a fluorescenza facendo uso dell'obiettivo 100x. Per ogni punto sperimentale sono state analizzate 500 cellule, considerando come apoptotiche le cellule con le seguenti caratteristiche morfologiche (Figura 29):

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

7.5.7 Analisi delle aberrazioni cromosomiche

Per osservare la presenza di eventuali aberrazioni cromosomiche sono state analizzate 300 cellule per punto sperimentale nella fase G2 del ciclo cellulare selezionata sulla base della cinetica. Le aberrazioni sono analizzate secondo quanto riportato da Savage (1975). I preparati sono analizzati al microscopio ottico con obiettivo 100x.

7.5.8 Reazioni citofluorimetriche per l'espressione della proteina p53.

Per ogni punto sperimentale sono stati prelevati 2×10^6 di linfociti, contenuti in circa 2 ml di terreno. Dopo un lavaggio in PBS, le cellule sono state fissate risospendendo il pellet cellulare in una soluzione al 50% di metanolo freddo in PBS e quindi lasciate per 24 ore nel frigorifero a -20°C (Kastan et al. 1991).

Per l'analisi dell'espressione della proteina p53, le cellule sono state poi lavate per 2 volte in PBS ed incubate a $+4^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti in una blocking solution (PTA: 0,2 % Tween 20; 1% bovin serum albumin (BSA) in PBS). I linfociti sono stati poi centrifugati nuovamente ed incubati a $+4^{\circ}\text{C}$ per 1 ora con l'anticorpo monoclonale IgG₂A di topo anti-p53 (DO-1) (SantaCruz Biotechnology) diluito 1:6 in PTA.

Dopo tre lavaggi in PTA i linfociti sono stati incubati 1 ora a +4°C con anti-topo IgG (H+L) FITC (Vector Laboratories) diluito 1:200 in PTA, ed infine sono stati effettuati altri 3 lavaggi in PTA.

I preparati sono stati quindi colorati con ioduro di propidio (5 µg/ml) (Sigma) + RNasi (100µg/ml) in PBS ed analizzati con FACS Calibur (Becton-Dickinson, San Josè, CA) equipaggiato con un Laser Class 1 operante ad una lunghezza d'onda di 488 nm e 13 mW di potenza. Come controllo negativo è stato utilizzato un campione di linfociti precedentemente trattati con il solo anticorpo secondario.

7.6 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per i fibroblasti

Il primo protocollo sperimentale riguarda la valutazione dell'effetto di una dose crescente di raggi X sulla frequenza delle aberrazioni cromosomiche (B", dicentrici e rings) indotte nella fase G1 del ciclo cellulare nei fibroblasti umani primari. Per la determinazione di una curva dose-effetto l'analisi è stata effettuata ai tempi di fissaggio di 24 e 48 h dal momento dell'esposizione (Figura 30).

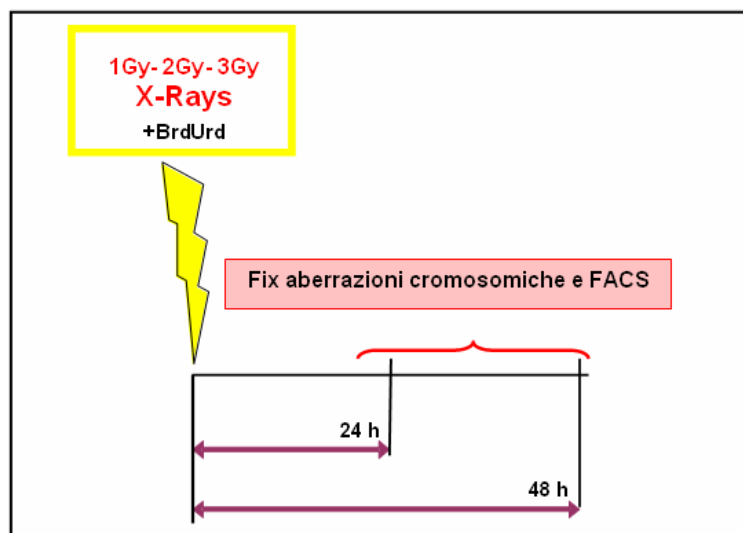


Figura 30: Protocollo sperimentale per la determinazione di una curva dose-effetto per tre dosi di raggi X pari a 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy per i tempi di recupero 24 e 48 h dall'esposizione.

Successivamente, lo studio è proseguito utilizzando un'unica dose di raggi X pari a 3Gy, a vari tempi di fissaggio collocati intorno a due momenti fondamentali, quali 24 e 48 ore che corrispondono, con buona approssimazione, al momento della prima e della seconda

divisione cellulare rispettivamente. I parametri analizzati in questo secondo protocollo sperimentale (Figura 31) comprendono, l'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X nella fase G1 del ciclo cellulare, lo studio della morte cellulare, la valutazione citofluorimetrica del ciclo cellulare e dell'espressione della proteina p53. Questi ultimi due parametri sono stati analizzati anche a tempi precoci dall'irradiazione.

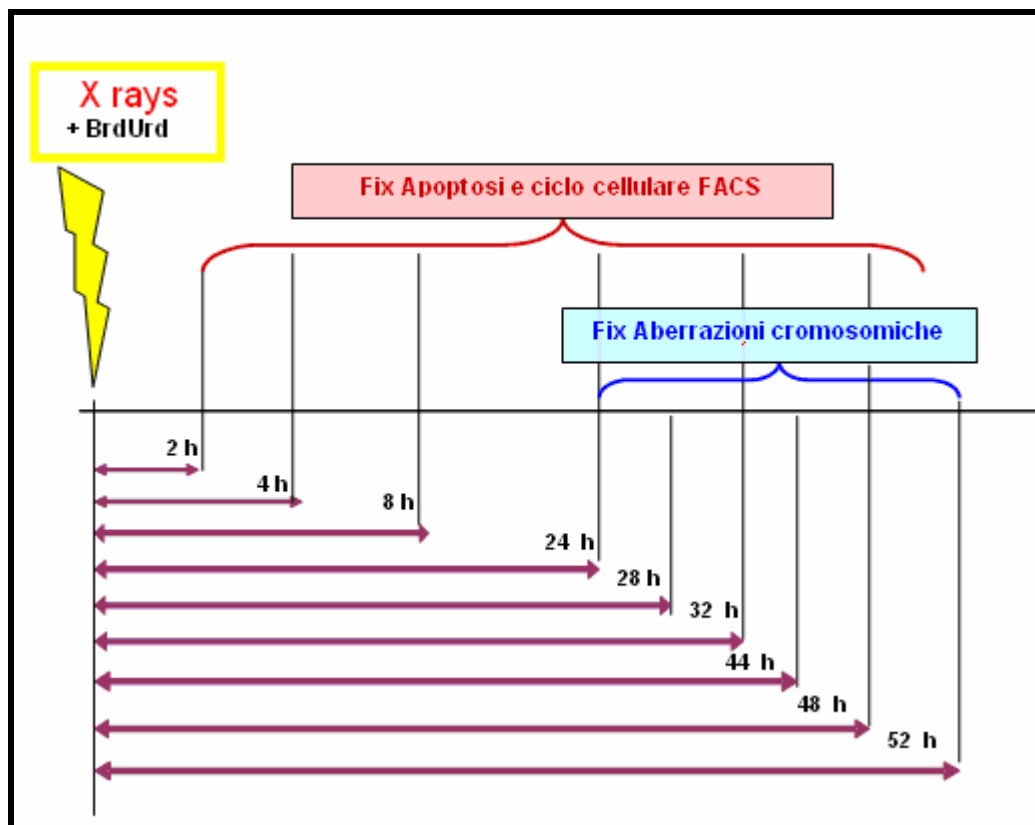


Figura 31: Protocollo sperimentale per lo studio delle aberrazioni cellulari, dell'apoptosi e del ciclo cellulare a vari tempi di recupero dopo l'esposizione a 3Gy di Raggi X.

7.6.1 Fissaggio e allestimento dei preparati per l'analisi citogenetica

Quattro ore prima di ogni fissaggio le cellule sono state trattate con Colcemid per bloccarle in metafase, stadio in cui la massima condensazione della cromatina consente di distinguere meglio i cromosomi e di valutare l'eventuale presenza di aberrazioni cromosomiche. Il terreno di crescita viene prelevato da ciascuna fiasca e trasferito in tubi falcon da 15 ml. Si effettuano due lavaggi con 5 ml di PBS e si trasferiscono nei tubi da fissaggio e si procede al distacco delle cellule ancora adese alle fiasche con 1,5 ml di tripsina. Una volta staccate esse vengono raccolte con un po' di terreno e trasferite nei tubi falcon. Si effettua una centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti, si rimuove il sovrnatante e si

risospende il pellet cellulare. A questo punto si aggiungono 5 ml di ipotonica preriscaldata, Tricitrato 1%, e si lasciano i tubi per 20 minuti a 37°C. Sull'ipotonica si aggiungono 5 ml di fissativo composto da metanolo:acido acetico (3:1) versandolo nei tubi goccia a goccia. Le cellule vengono nuovamente centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti, si aspira via il sovrantante, si risospende il pellet e si aggiunge nuovo fissativo. Tale procedura si ripete ancora una volta. Le cellule sono ora fissate e possono essere conservate in frigorifero a +4°C da due a 24 ore prima della semina sui vetrini. Prima della semina, si effettua una nuova centrifugazione dei tubi contenenti le cellule, in modo di poter eliminare il fissativo in eccesso. Il pellet cellulare può essere ora risospeso nel nuovo fissativo, che viene aggiunto in quantità tale da ottenere la giusta concentrazione di cellule per la semina sui vetrini.

I vetrini sono precedentemente lavati in acqua corrente e conservati in acqua distillata e metanolo 1:1 in frigorifero a +4 °C almeno per un'ora. La sospensione finale di cellule viene fatta cadere dall'alto goccia a goccia sui vetrini bagnati cosicché, per l'impatto, avviene la rottura delle membrane cellulari che provoca la liberazione e l'apertura delle metafasi sul vetrino. I vetrini vengono lasciati ad asciugare ed invecchiare almeno una settimana prima di procedere alla reazione di colorazione secondo la tecnica Fluorocromo plus Giemsa (FPG) (Perry and Wolf, 1974). Questo metodo consiste nell'immergere i vetrini in una soluzione al 3% di Hoechts 33258 per 20 minuti, dopodiché i preparati vanno immersi in acqua di fonte ed esposti per 30 minuti ad una sorgente di luce UV. Quindi i vetrini vengono colorati con una soluzione di Giemsa al 4% in cui sono immersi e lasciati per 7 minuti. Una volta asciugati i preparati vengono coperti con vetrini coprioggetto fissati con eukitt e sono pronti per essere analizzati.

7.6.2 Studio della morte cellulare:

Elettroforesi in campo pulsato (PFGE):

- **preparazione dei blocchetti:** per tale procedura è necessario un quantitativo di cellule pari a circa 1×10^6 . Le cellule tripsinizzate vengono trasferite in eppendorf e centrifugate a 1500 rpm per 8 minuti. Si aspira via il sovrantante e le cellule sono risospese in 100 µl di una soluzione contenente 0.15 M NaCl, 2 mM KH_2PO_4 pH 6.8, 1 mM EGTA e 5 mM MgCl_2 . Viene aggiunto un uguale volume di agarosio "low-melting" e tale soluzione viene colata in appositi supporti per la formazione di blocchi di agarosio e lasciata solidificare per 10 minuti a 4°C. In ogni blocco sono contenute 500.000 cellule e per ogni punto sperimentale vengono preparati due blocchetti. Successivamente, i blocchi di agarosio contenenti le cellule

vengono trasferiti in una soluzione per la lisi cellulare costituita da 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 25 mM EDTA, 1% lauril sarcosine e 200 µg di Proteinasi K e quindi incubati per 24 h a 50°C. Trascorse le 24 h i blocchi vengono lavati per tre volte in 10 mM Tris-HCl pH 8.0 e 1 mM EDTA. Ciascun lavaggio dura 2 h a 4°C. I blocchi possono essere conservati per circa un mese prima dell'uso a 4°C in 50 mM EDTA pH 8.0.

- ***corsa elettroforetica:*** il DNA contenuto nei blocchi può quindi essere separato in base al peso molecolare dei frammenti mediante elettroforesi pulsata in un gel di agarosio all'1% in 0.5 x TBE costituito da 45 mM Tris, 1.25 mM EDTA e 45 mM di acido borico pH 8.0. Il tampone di corsa, sempre costituito da 0.5 x TBE viene mantenuto ad una temperatura di 12°C. La corsa elettroforetica viene effettuata per 19 ore a 180 Volts in un sistema CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) (Pharmacia) con un programma di impulsi a 6 fasi (20'/6h; 10'/3h; 4'/2h; 2'/2h; 1'/3h). Dopo la corsa il gel viene colorato per circa 1 h in Bromuro di Etidio (EtBr) ad una concentrazione di 1 µg/ml, osservato su una fonte di luce UV a 312 nm e fotografato con un sistema Polaroid.

Analisi dell'apoptosi mediante colorazione fluorescente (saggio dei tre colori): la tecnica prevede l'uso combinato di Fluoresceina di-acetata (FDA; 5 µg/ml) e Hoechst (HO, 1 µg/ml) per l'identificazione delle cellule apoptotiche e di quelle necrotiche rispetto alle cellule vive. FDA e HO sono coloranti vitali che identificano rispettivamente il citoplasma (in verde) e il nucleo (in azzurro) delle cellule vive. La necrosi e lo stadio tardivo dell'apoptosi vengono identificate mediante colorazione con ioduro di propidio (PI). Le cellule nella fase precoce (marcatura con HO) e nella fase tardiva (marcatura con IP) dell'apoptosi, mostrano il caratteristico pattern di frammentazione della cromatina (Figura 32). Sono state analizzate al microscopio circa 200 cellule per punto sperimentale.

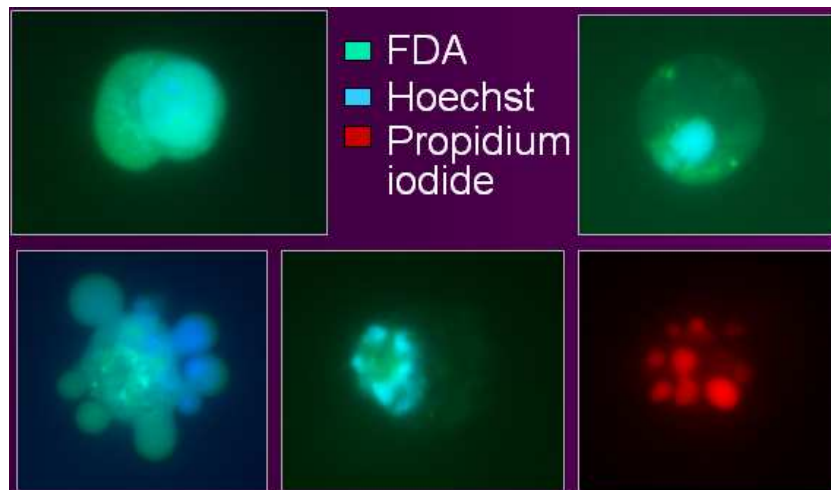


Figura 32: Analisi dell'apoptosi mediante colorazione fluorescente che illustra le differenti morfologie cellulari.

7.6.3 Analisi citofluorimetrica per il ciclo cellulare e l'espressione della proteina p53

Il protocollo utilizzato per l'analisi dell'espressione della proteina p53 è il medesimo già descritto per i linfociti (paragrafo 7.5.8) senza sostanziali modifiche.

7.7 Protocollo sperimentale e tecniche utilizzate per il rilevamento dell'istone γ H2AX in linee cellulari di hamster Cinese

7.7.1 Protocollo sperimentale e agenti utilizzati

Tale analisi è stata effettuata in due linee parentali cellulari di hamster cinese, le AA8 e le V79. Le AA8 sono state usate inizialmente per mettere a punto la tecnica; successivamente abbiamo utilizzato la linea V79 poiché è subentrata l'esigenza di avere una linea cellulare sincrona e quindi più stabile in condizioni di confluenza.

Abbiamo analizzato diversi agenti che inducono danno al DNA sia S-dipendenti sia S-indipendenti e tutti sono stati esaminati un'ora dopo il trattamento:

- i raggi X sono agenti S-indipendenti che inducono principalmente rotture a doppio filamento (DSBs) in modo lineare con la dose di radiazione e con una frequenza di approssimativamente di 20-40 DSBs per cellula e per Gy di raggi X;
- i raggi ultravioletti (UV) sono S-dipendenti poichè non inducono direttamente DSBs ma solo in conseguenza del passaggio attraverso la fase di sintesi; le lesioni primarie indotta nel DNA dai raggi UV sono i dimeri di pirimidina e i 6-4

fotoprodotti che sono riparate principalmente dal “nucleotide excision repair” (NER);

- gli enzimi di restrizione sono endonucleasi che si legano ad una specifica sequenza di DNA (sito di riconoscimento) e tagliano entrambi i filamenti di DNA (Figura 33) creando quindi una DSB; nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato BamHI e AluI:

BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'GGATCC 3'CCTAGG	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'

Figura 33: Tagli al DNA degli enzimi di restrizione BAM HI e AluI.

Per introdurre gli enzimi di restrizione nelle cellule di mammifero possono essere usati vari metodi. Nei nostri esperimenti abbiamo scelto di utilizzare il metodo dello shock osmotico (Winegar and Preston, 1988) in cui il glicerolo (1,1 M) è comunemente usato per trattare le cellule con gli enzimi di restrizione poiché questo composto penetra lentamente la membrana cellulare; le cellule sono state trattate per 30 minuti con le seguenti dosi di enzima 10 U, 20 U, 25 U, 50 U (in una soluzione di glicerolo 1.1 M), e dopo un'ora sono state fissate;

- il VP16 o etoposide è un agente anti-tumorale; questo agisce inibendo l'enzima topoisomerasi II: il VP16 forma un complesso ternario con il DNA e l'enzima topoisomerasi II e prevenendo la “re-ligation” del filamento di DNA causa DSBs; le cellule sono state trattate per 45 minuti alle seguenti dosi 5 μ M, 15 μ M, 25 μ M, e dopo un'ora sono state fissate;
- la camptotecina (CPT) è un inibitore delle topoisomerasi I ed è dotata di attività antitumorale; la CPT non è in grado di legarsi né al DNA né alla topoisomerasi I presi singolarmente ma solo al complesso DNA-enzima (cleavable complex); il suo effetto citotossico si manifesta soprattutto quando la sostanza viene somministrata durante la fase S del ciclo cellulare: la presenza della CPT blocca il “cleavable complex” e quindi la capacità della topoisomerasi I di ripristinare l'integrità del filamento di DNA incrementando la formazione di SSBs che portano l'enzima legato alla estremità 3'-OH; le cellule sono state trattate per 45 minuti alle seguenti dosi 5 μ M, 15 μ M, 25 μ M, e dopo un'ora sono state fissate.

7.7.2 Marcatura tramite immunofluorescenza di γ -H2AX

Le cellule, che crescono in adesione, sono seminate ad una concentrazione di 1×10^5 in piastrine dove precedentemente è stato posto il coprioggetto sterilizzato. Dopo un lavaggio in PBS per 5 minuti le cellule sono fissate con formaldeide al 3% in PBS per 10 minuti. Al fissaggio seguono due lavaggi in PBS per 5 minuti dopo i quali le cellule sono permeabilizzate in Triton 0,5% in PBS per 5 minuti. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS per 5 minuti e due lavaggi in 0,05% Tween 20 in PBS per 5 minuti si effettua il bloccaggio in FBS (Foetal Bovine Serum) 10% in PBS per 45 minuti. Successivamente le cellule sono incubate con 100 μ l di anticorpo monoclonale primario anti- γ -H2AX (Monoclonal Antibody Millipore) diluito 1:1000 in FBS 10% per 1 h a 37°C o over-night a +4°C. Il giorno dopo i vetrini sono lavati con Tween 20 in PBS per 5 minuti per tre volte e le cellule sono incubate per 1 h a 37°C con 100 μ l di anticorpo secondario anti-mouse FITC Alexa Fluor 488 donkey (Invitrogen) diluito 1:200. Seguono tre lavaggi in Tween 20 in PBS. Infine, le cellule sono controcolorate con DAPI (0.2 μ g/ml) in antifade (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA).

7.7.3 Analisi tramite microscopia a fluorescenza di γ -H2AX

L'analisi dei foci dell'istone γ -H2AX si osserva al microscopio a fluorescenza facendo uso dell'obiettivo 100x. Per ogni punto sperimentale sono state analizzate 100 cellule.

La lettura è stata effettuata sia con metodo occhiometrico sia mediante un software specifico che permette di determinare il numero di foci in una singola cellula, l'intensità di fluorescenza dei foci per cellula e l'intensità di fluorescenza della cellula. Il programma è chiamato Focicounter ed è pubblicamente consultabile nel sito <http://focicounter.sourceforge.net> (Jucha et al. 2009). Un microscopio fluorescente in combinazione con una fotocamera digitale può essere usato per acquisire le immagini dei foci di γ -H2AX. Le cellule positive sono state divise in diverse classi in base al numero di foci γ -H2AX presenti (0-5, circa 10, circa 20, circa 30); le cellule che non presentavano foci γ -H2AX sono state riportate come negative.

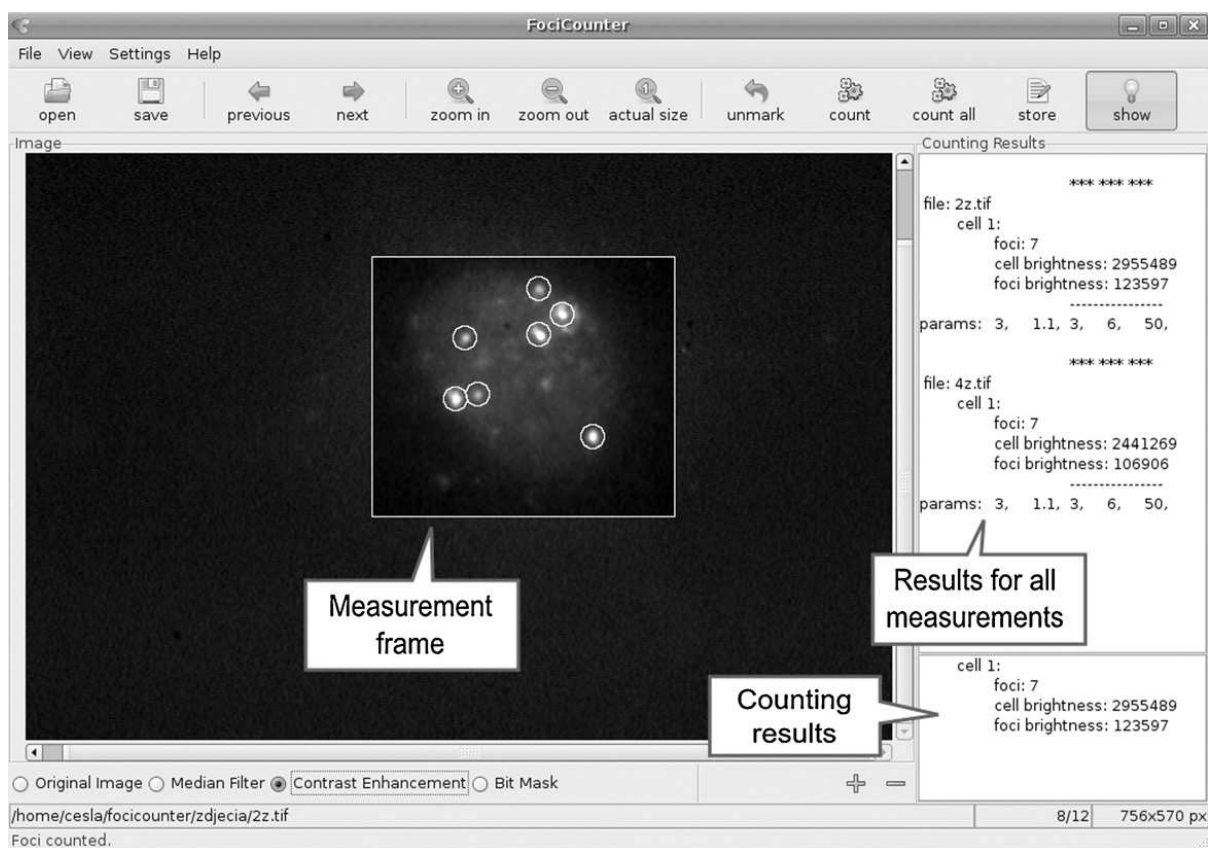


Figura 34:Software FociCounter.

CAPITOLO 8: RISULTATI

8.1 Risultati linee cellulari AT

Il sistema cellulare utilizzato per comprendere meglio le basi molecolari e cellulari del difetto che conduce all'Atassia Telangiectasia (AT) è costituito da quattro linee cellulari linfoblastoidi: tre linee AT (caratterizzate da diverse mutazioni nel gene *ATM*) ed una linea wild-type di controllo. E' noto che cellule derivanti da pazienti affetti da AT sono difettive nella risposta alle rotture a doppia elica (DSBs) (Rotman and Shiloh, 1999). Da studi precedenti si erano ottenuti i seguenti risultati:

- per quanto riguarda le aberrazioni cromosomiche in tre linee (FLEBV, AT28RM, AT21RM) nei campioni co-trattati con raggi X e PFT- α nella fase G2, le rotture cromatidiche aumentavano rispetto al campione solo irradiato, mentre nella linea AT97RM le rotture cromatidiche diminuivano nel campione co-trattato con raggi X e PFT- α sempre rispetto al campione solo irradiato;
- questo risultato è stato confermato dal comet assay;
- in seguito a co-trattamento con PFT- α e radiazioni abbiamo riscontrato un aumento significativo delle rotture cromatidiche in tutte le linee analizzate tranne che nella linea AT97RM dove abbiamo osservato una diminuzione significativa delle delezioni; ossia, nei campioni co-trattati con PFT- α e radiazioni, le linee AT21RM e AT28RM mostravano un andamento simile a quello della linea di controllo (FLEBV), mentre la linea AT97RM mostrava un andamento inverso ma, allo stesso modo, significativo; quindi, nella linea AT97RM la PFT- α sembra stimolare la riparazione delle DSBs indotte nella fase G2 del ciclo cellulare; ciò porta ad ipotizzare che la PFT- α possa agire su un altro target proteico coinvolto nei sistemi di riparazione delle DSBs (HR o NHEJ); differentemente, nelle linee FLEBV, AT21RM e AT28RM la p53 sembra intervenire nella riparazione delle DSBs indotte dalle radiazioni in assenza di ATM favorendo il "rejoining" delle estremità rotte.

Allo scopo di chiarire il ruolo di p53 nella riparazione delle DSBs indotte dalla radiazione ionizzante abbiamo analizzato l'espressione sia di p53 e p53^{ser15} sia di proteine implicate nel processo di riparazione del DNA come RAD51 tramite western blotting (con e senza PFT- α).

Le bande di chemiluminescenza relative all'espressione delle proteine p53 e RAD51 ottenute tramite western blotting dopo irradiazione in presenza ed in assenza di PFT- α sono mostrate in Figura 35. Per quanto riguarda la proteina p53 sia nella linea FLEBV (wild-type) sia nella AT21RM si osserva un aumento dell'espressione della p53 nei campioni irradiati (B) rispetto ai campioni di controllo (A). Nelle stesse linee, l'intensità delle bande relative ai campioni co-trattati con PFT- α e radiazioni (C) subisce una diminuzione. Nelle linee AT28RM e AT97RM in seguito ad irradiazione (B), non si osserva un aumento nell'induzione della proteina p53 rispetto ai valori di controllo (A). In queste stesse linee, nei campioni co-trattati con PFT- α e radiazioni (C), l'intensità delle bande rimane invariata rispetto a quelle dei campioni solo irradiati (B).

In nessuna linea cellulare analizzata si osserva induzione della proteina RAD51 in seguito ad irradiazione (B). L'intensità delle bande relative ai campioni co-trattati con PFT- α e radiazioni (C) rimane inalterata rispetto a quella dei campioni solamente irradiati (B), in tutte le linee analizzate.

Invece, i risultati di p53^{ser15} mostrano un aumento della sua espressione dopo il trattamento con i raggi X (B) e una riduzione dopo il trattamento con raggi X e PFT- α (C) in tutte le linee cellulari eccetto che nella AT97RM dove non è stato osservato alcun cambiamento nell'espressione di p53^{ser15}.

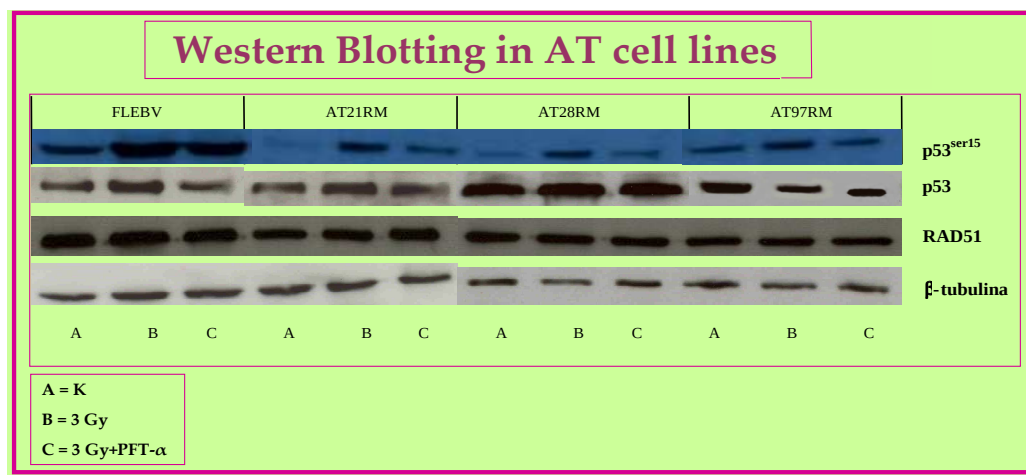


Figura 35: Analisi tramite Western blotting dell'espressione di p53, p53^{ser15} e RAD51 in linee cellulari AT.

8.2 Risultati linfociti umani

8.2.1 Progressione del ciclo cellulare in cellule marcate con BrdUrd dopo irradiazione in presenza o assenza di PFT- α

La progressione del ciclo cellulare è stata effettuata tramite un pulse di BrdUrd (Figura 36). Mediante questo metodo le metafasi marcate con la BrdUrd rappresentano la fase S, mentre quelle non marcate la fase G2. La frequenza di metafasi positive all'incorporazione della BrdUrd è stata determinata a 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h dopo l'irradiazione. Le metafasi positive alla BrdUrd non appaiono prima del tempo di recupero di 6 h dopo l'esposizione dei linfociti ai raggi X. In particolare, tra le 6 h e le 12 h, la percentuale delle metafasi positive per l'incorporazione della BrdUrd è maggiore nel campione di controllo e nel campione trattato con la sola PFT- α rispetto alla percentuale di cellule nei campioni irradiati sia con che senza PFT- α . Inoltre, la PFT- α non altera la progressione del ciclo cellulare, la percentuale delle metafasi positive osservate nel campione trattato con i raggi X (range da 9.7% a 6 h a 80.7% a 12 h) ed in quello con i raggi X e PFT- α (range da 2.2% a 6 h a 84.0% a 12 h) sono simili.

8.2.2 Apoptosi indotta dai raggi X nella fase G2 in presenza o assenza di PFT- α , in cellule marcate con BrdUrd.

Lo studio dell'apoptosi indotta dai raggi X nella fase G2 del ciclo cellulare in presenza/assenza di PFT- α tramite un pulse di BrdUrd è mostrata nella Figura 37. La frequenza di cellule apoptotiche è stata determinata a 2, 4, 6, 8 e 10 h dopo l'irradiazione. I risultati mostrano un aumento nella percentuale di cellule negative alla BrdUrd, che rappresentano le cellule nella fase G2, sia nel campione trattato solo con i raggi X che nel campione trattato con i raggi X e la PFT- α al tempo di 4 h dopo l'irradiazione. Questo aumento è statisticamente significativo (χ^2 -test, $p < 0.01$) rispetto ai campioni sia di controllo che in quello trattato con la sola PFT- α . Nei successivi tempi di recupero (6, 8, 10 h) è stata riscontrata una diminuzione di cellule apoptotiche in entrambi i campioni. Inoltre la percentuale di cellule apoptotiche positive alla BrdUrd, rappresentanti la fase S, è compresa in un range tra 0% e 1% e in range tra l'1% e il 6% a 4 h e ai successivi tempi di recupero, rispettivamente.

8.2.3 Aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X in G2 in presenza/assenza di PFT- α

La frequenza di aberrazioni cromosomiche nei linfociti irradiati in G2 sia in presenza che in assenza di PFT- α sono mostrati nella Tabella 3. A tutti i tempi di recupero dopo l'irradiazione è stata osservata una induzione statisticamente significativa (Student's *t*-test, $p < 0.01$) di rotture cromatidiche. La frequenza di rotture cromatidiche è alta a 1 h dopo l'irradiazione, decresce leggermente ai tempi di recupero di 2 h e 4 h e si riduce fortemente a 6 h dopo l'irradiazione. A tutti i tempi di recupero non c'è differenza tra i campioni solo irradiati e quelli irradiati e trattati con PFT- α .

8.2.4 Espressione di p53 dopo l'irradiazione in presenza o assenza di PFT- α

L'espressione della proteina p53 nei linfociti irradiati in presenza o assenza di PFT- α è stata valutata tramite analisi citofluorimetrica. L'analisi è stata effettuata a vari tempi di recupero (2, 4, 6 h) incentrati intorno all'aumento dell'induzione di apoptosi. Non è stata rilevata l'espressione della proteina p53 a nessun tempo di recupero (Figura 38).

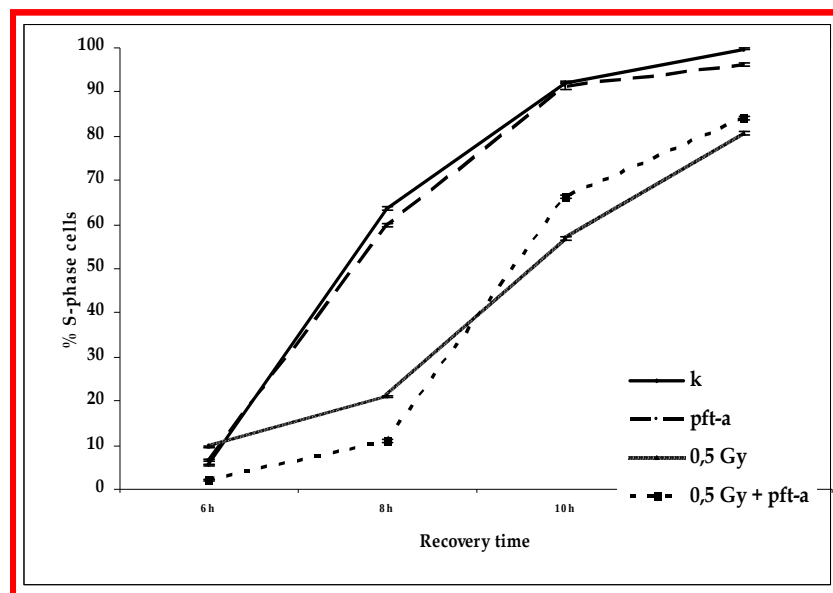


Figura 36: Grafico della cinetica cellulare ai vari tempi di recupero dall'irradiazione, in presenza e assenza di PFT- α ; le barre rappresentano l'errore standard ($\pm$ SD).

N°Metaph. Analysed	Treatment	Recovery time	% Abnormal cells±SE	X ² p	Chromatid/100 cells			t* _p
					Gaps	Bks.	Exch.	
300	k	1h	1,7±0,8		2,0±1,1	0	0	
300	PFT-α	1h	1,3±0,6		2,3±1,2	0	0	
300	0,5 Gy	1h	71,3±2,6	*	2,6±1,4	172,6±5,7	0	*
300	0,5 Gy + PFT-α	1h	73±1,7		9,0±3,7	162,6±6,4	0	
300	k	2h	1,6±0,8		2,0±1,1	0	0	
300	PFT-α	2h	1,0±1,0		1,3±1,3	0	0	
300	0,5 Gy	2h	76,6±2,0	*	0	115,6±5,8	0	*
300	0,5 Gy + PFT-α	2h	75,0±2,0		4,6±0,6	114,3±3,1	1,3±1,3	
300	k	4h	1,6±0,3		2,3±0,3	0	0	
300	PFT-α	4h	1,7±0,8		5,0±2,8	0	0	
300	0,5 Gy	4h	69,6±1,4	*	5,0±2,8	103,0±4,6	0	*
300	0,5 Gy + PFT-α	4h	67,6±2,0		4,0±1,1	108,0±4,6	0	
300	k	6h	2,6±0,6		3,6±0,3	0	0	
300	PFT-α	6h	6,3±1,8		6,6±1,6	0,3±0,3	0	
300	0,5 Gy	6h	38,6±1,7	*	5,3±1,7	26,6±2,0	0,3±0,3	*
300	0,5 Gy + PFT-α	6h	43,0±1,5		5,6±1,2	32,0±1,7	0,6±0,3	

Tabella 3: Frequenza delle aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X (0.5 Gy) nei linfociti umani in G2, in presenza e assenza di PFT-α, a vari tempi di fissaggio dopo l'irradiazione; * Student's *t*-test, *p*<0.01.

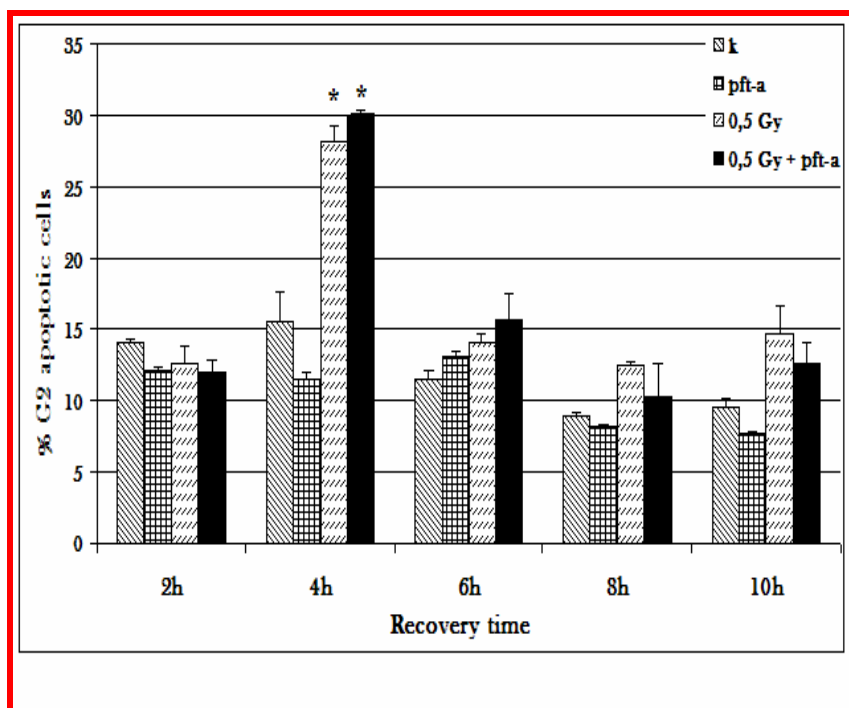


Figura 37: Grafico dell'induzione di apoptosi ai vari tempi di recupero dall'irradiazione, in presenza e assenza di PFT- α ; le barre rappresentano l'errore standard ($\pm$ SD); * χ^2 -test, $p < 0.01$.

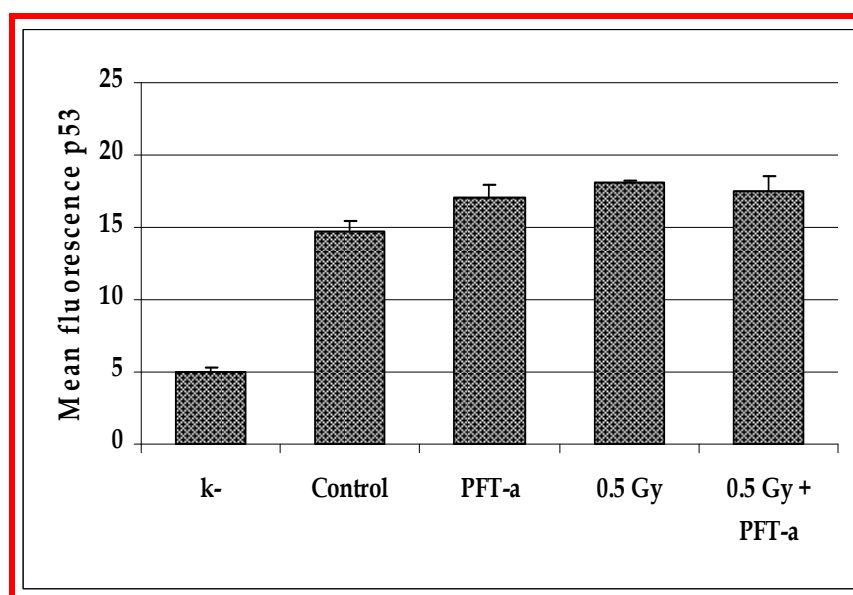


Figura 38: Analisi dell'espressione della proteina p53 dopo irradiazione in presenza e assenza di PFT- α ; le barre rappresentano l'errore standard ($\pm$ SD).

8.3 Risultati fibroblasti umani primari

I risultati osservati sono di seguito riportati:

Esperimenti preliminari (non mostrati) sono serviti a scegliere la dose di 3Gy di raggi X da utilizzare nei successivi trattamenti e per la definizione del protocollo sperimentale. Pertanto, si è approfondita l'analisi citogenetica delle cellule irradiate in fase G1, utilizzando un'unica dose di raggi X pari a 3Gy, e fissandole a vari tempi collocati intorno a due momenti fondamentali, quali 24 e 48 ore che corrispondono, con buona approssimazione, al momento della prima e della seconda divisione cellulare rispettivamente. In Tabella 4 sono riportati i risultati di queste analisi. In generale, si osserva un'induzione di rotture cromosomiche, B", a tutti i tempi di recupero dall'irradiazione con raggi X, rispetto ai controlli non irradiati e la frequenza dei dicentrici ha un andamento pressoché costante nei diversi campioni irradiati e ai differenti tempi di recupero. Si osserva una forte riduzione dell'indice mitotico in tutti i campioni trattati con raggi X.

Trattamento	Cellule Normali	Cellule Anormali	B"	Dicentrici	Ring
K 24 h	80	20	9	0	0
K 32 h	87	13	7	0	0
K 44 h	89	11	9	2	0
K 48 h	95	5	3	0	0
K 52 h	90	10	11	1	0
3Gy 24 h	5	95	295	55	23
3Gy 32 h	10	90	101	89	13
3Gy 44 h	7	93	187	69	8
3Gy 48 h	1	99	214	86	10
3Gy 52 h	14	86	231	68	9

Tabella 4: Induzione di aberrazioni cromosomiche nei fibroblasti irradiati in G1 e fissati a vari tempi di recupero dall'irradiazione.

Tramite l'analisi citofluorimetrica è stato studiato l'andamento del ciclo cellulare dei fibroblasti irradiati in G1 e fissati ai tempi di recupero di 24 h e 48 h. I risultati ottenuti a 24 h indicano un normale andamento del ciclo alle dosi di 1 e 2 Gy e la presenza di un arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M alla dose di 3 Gy di radiazione. Contrariamente alle 48 h di recupero si osserva un normale profilo del ciclo nell'intervallo di dosi utilizzato. Tuttavia, è

da notare un aumento della percentuale delle cellule in fase G1 e una diminuzione delle cellule in fase S del ciclo cellulare, rispetto ai campioni analizzati alle 24 h (Figura 39).

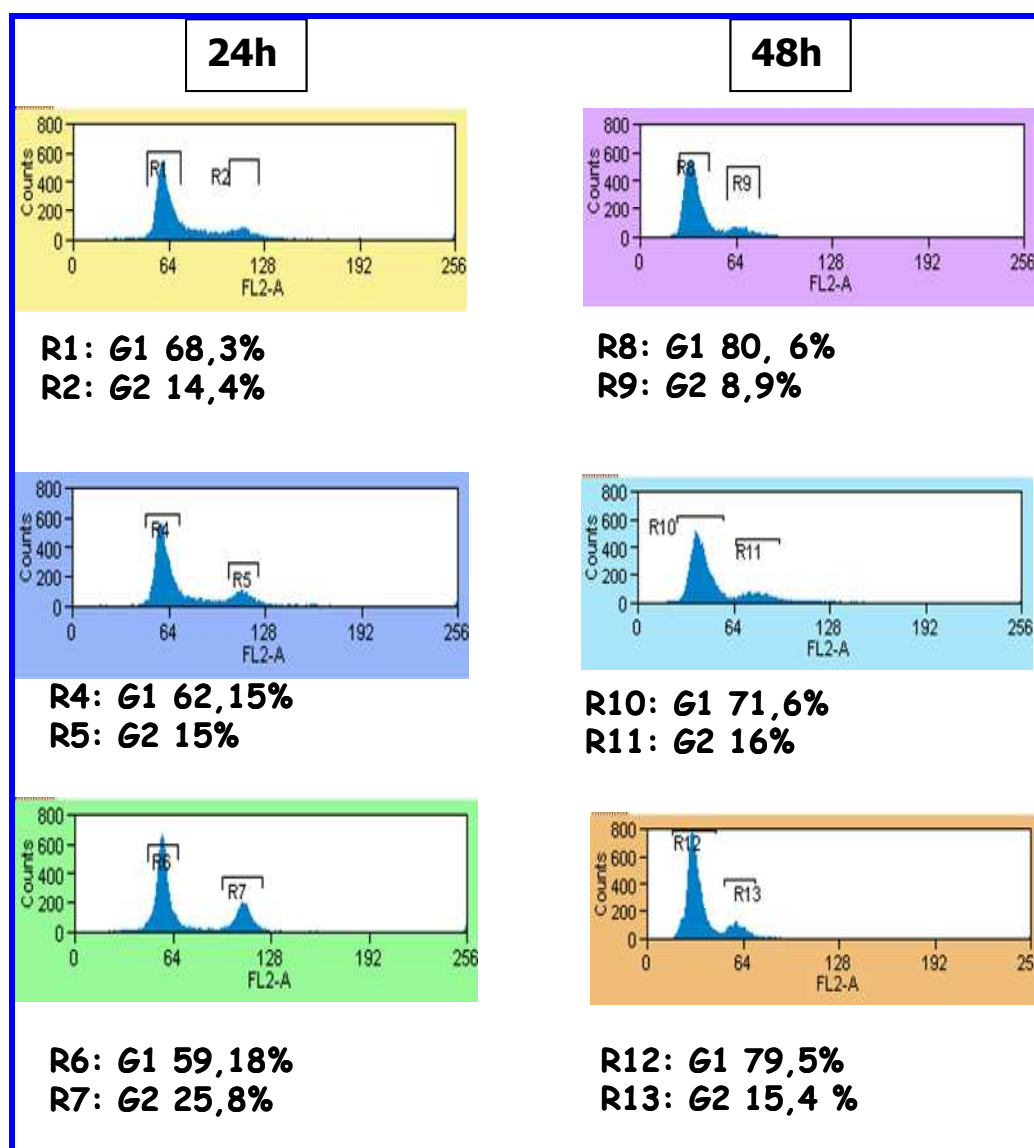


Figura 39: Analisi del ciclo cellulare nei fibroblasti irradiati in G1 e fissati ai tempi di recupero di 24 h e 48 h.

Per quanto riguarda l'espressione della proteina p53 nelle cellule esposte alla dose di 3 Gy di raggi X, l'analisi citofluorimetrica mostra che ai tempi precoci di recupero di 2, 4 e 8 h dall'irradiazione non si ha un aumento dell'espressione della suddetta proteina (Figura 40). Al contrario, ai tempi tardivi di 24, 32, 48 h si osserva un discreto aumento dell'espressione di p53 rispetto al campione fissato a 0 h (Figura 41).

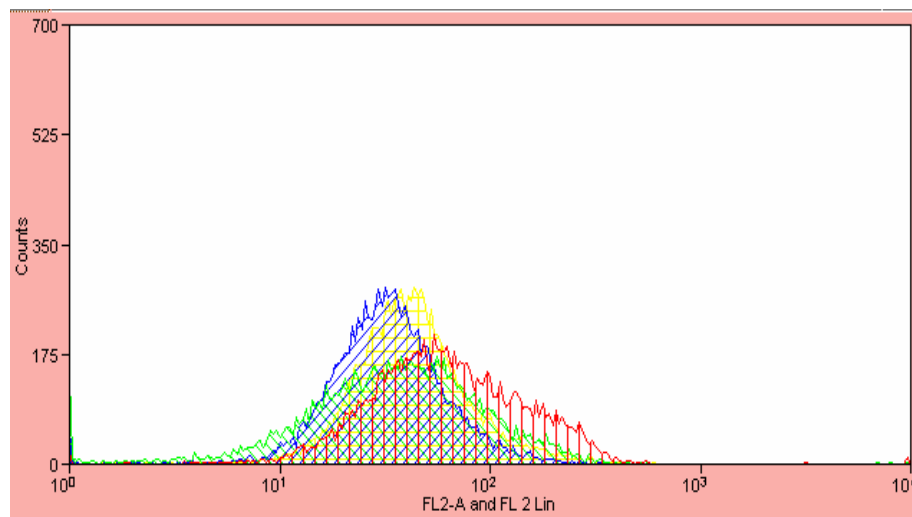


Figura 40: Analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina p53 effettuata a 0 h (blu), 2 h (rossa), 4 h (verde), 8 h (giallo) dall'irradiazione (3 Gy), in fibroblasti umani primari.

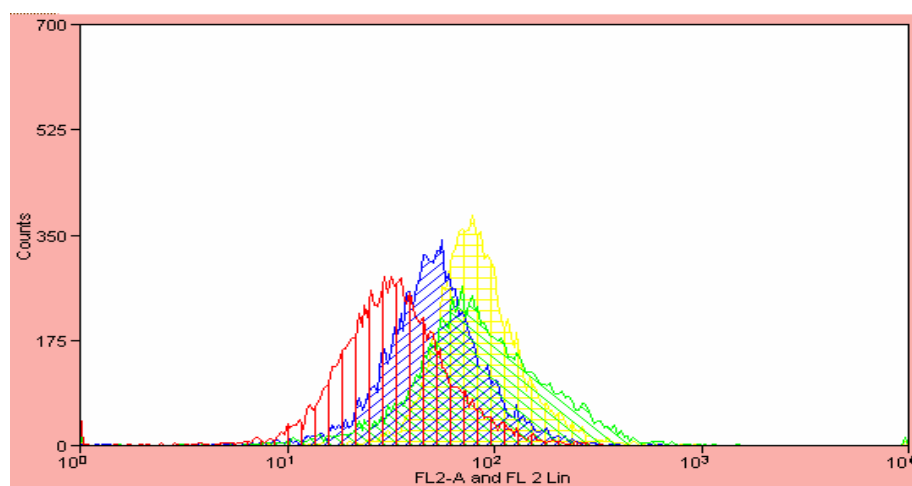


Figura 41: Analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina p53 a 0 h (rosso), 24 h (verde), 32 h (blu), 48 h (giallo) dall'irradiazione (3 Gy), in fibroblasti umani primari.

La morte cellulare per apoptosi è stata analizzata tramite un approccio citologico basato sulla valutazione della morfologia cellulare mediante fluorescenza ed uno molecolare che consente l'osservazione della formazione dei frammenti di DNA ad alto peso molecolare, mediante elettroforesi su gel di agarosio in campo pulsato (PFGE). I dati ottenuti, con entrambi i metodi di valutazione, sia a tempi brevi (2, 4, 8 h) sia quelli più tardivi (24, 32, 48, 72, 96 h) dall'irradiazione mostrano l'assenza di apoptosi nei fibroblasti irradiati in G1 (Tabella 5, Figura 42).

Trattamento	Cellule normali	Necrosi	Apoptosi
K 2 h	83%	17%	0%
K 4 h	92%	8%	0%
K 8 h	85%	15%	0%
K 24 h	76%	21%	3%
K 32 h	78%	21%	1%
K 48 h	86%	14%	0%
3Gy 2 h	69%	31%	0%
3Gy 4 h	80%	20%	0%
3Gy 8 h	80,3%	19,4%	0,3%
3Gy 24 h	78%	18%	4%
3Gy 32 h	76,4%	20,1%	3,5%
3Gy 48 h	87,2%	8,5%	4,3%

Tabella 5: Percentuale di apoptosi nei fibroblasti irradiati in G1 e fissati a vari tempi di recupero.

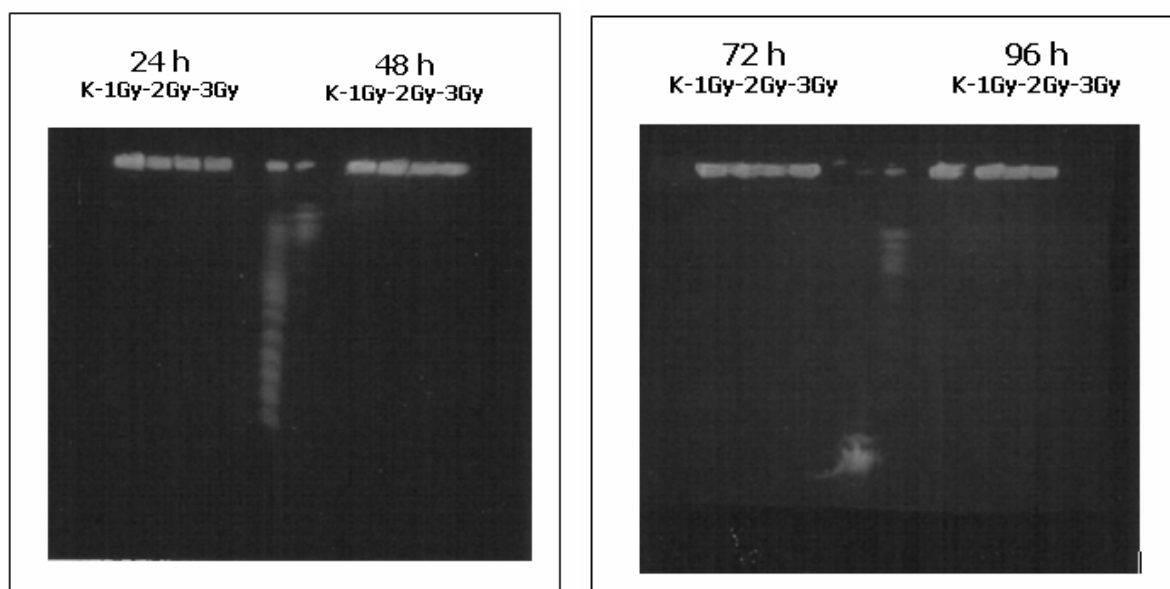


Figura 42: Analisi della formazione dei frammenti di DNA ad alto peso molecolare tramite PFGE nei fibroblasti irradiati in G1 e fissati a vari tempi di recupero.

8.4 Risultati linee cellulari di hamster Cinese

Sono di seguito riportati i risultati dell'analisi dell'induzione dell'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX) da parte di diversi agenti sia chimici che fisici che differiscono per il tipo di danno indotto al DNA, allo scopo di mettere in relazione il tipo di danno indotto dai diversi agenti, la sua segnalazione e la sua conseguente riparazione con il fine di determinare il coinvolgimento dell'istone H2AX nelle varie fasi che portano alla risoluzione del danno al DNA.

Tale analisi è stata effettuata in due linee parentali cellulari di hamster cinese, le AA8 e le V79. Le AA8 sono state usate inizialmente per mettere a punto la tecnica; successivamente abbiamo utilizzato la linea V79 poiché è subentrata l'esigenza di avere una linea cellulare sincrona e quindi più stabile in condizioni di confluenza. Abbiamo analizzato diversi agenti che inducono danno al DNA sia S-dipendenti che S-indipendenti e tutti sono stati esaminati un'ora dopo il trattamento.

Per quanto riguarda ogni singolo agente abbiamo valutato il suo effetto nella formazione dei foci γ -H2AX. I singoli risultati sono qui di seguito elencati.

Nella Figura 43 e Figura 44 è riportato l'effetto dei raggi X in cui possiamo osservare una induzione dose-dipendente dei foci γ -H2AX presenti in tutte le cellule; tale dato conferma quanto presente in letteratura; l'analisi è stata effettuata sia con l'ausilio del software specifico (Focicounter), sia occhiometrica dividendo le cellule positive in diverse classi in base al numero di foci γ -H2AX presenti (0-5, circa 10, circa 20, circa 30); le cellule che non presentavano foci γ -H2AX sono state riportate come negative; nella Figura 43 è riportata l'analisi dell'effetto dei raggi X effettuata tramite il software Focicounter, mentre l'analisi occhiometrica è riportata nella Figura 44.

Per quanto riguarda i raggi UV dopo un'ora dall'irradiazione non è stato possibile analizzarne l'effetto dato l'aspetto particolare delle cellule in interfase che presentano tanti foci molto piccoli e quindi non contabili (Figura 45).

Gli enzimi di restrizione (Figura 46) hanno un effetto dose-dipendente sull'induzione dei foci di γ -H2AX; tale effetto è minore rispetto ai raggi X in termini sia di numero di foci per cellula sia di cellule γ -H2AX positive.

L'effetto del VP16 sull'induzione dei foci di γ -H2AX è dose-dipendente (Figura 47) con la maggior parte delle cellule positive comprese nella classe con un numero di foci γ -H2AX tra 0-5.

La CPT induce foci γ -H2AX; tuttavia il suo effetto non è chiaro poiché non vi è una chiara relazione con la dose se si considera la classe con un numero di foci tra 0-5 mentre è possibile osservare un andamento dose dipendente se si considera la classe con un numero di foci di circa 10 (Figura 48).

Nei grafici inoltre sono menzionate le cellule dette “verdi” dove non erano rilevabili dei foci γ -H2AX distinti e discreti, ma presentavano appunto una fluorescenza verde uniforme e diffusa; queste cellule corrispondono alla percentuale di cellule apoptotiche in quanto, confrontandole con la colorazione col DAPI, avevano la tipica morfologia apoptotica con i nuclei condensati e i corpi apoptotici del nucleo frammentato.

Il confronto dell’effetto dei vari agenti nell’induzione dei foci γ -H2AX è illustrato nella Figura 49 e Figura 50. Nella Figura 49, per ogni agente, le cellule sono state suddivise solo in negative e positive ai foci γ -H2AX. In tale grafico notiamo che solo nel trattamento con i raggi X tutte le cellule risultano positive a tutte le dosi analizzate, sebbene non sia più evidente la risposta dose effetto. Nella Figura 50 le cellule sono divise in negative e nelle diverse classi di positività ai foci γ -H2AX.

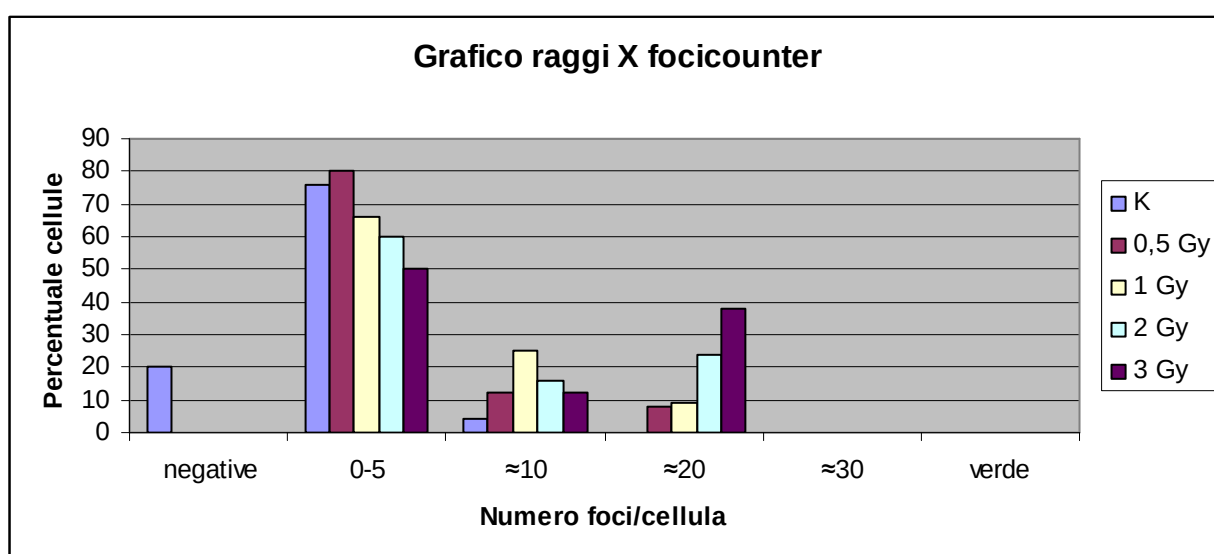


Figura 43: Induzione dei foci γ -H2AX dopo diverse dosi di raggi X con lettura tramite Focicounter.

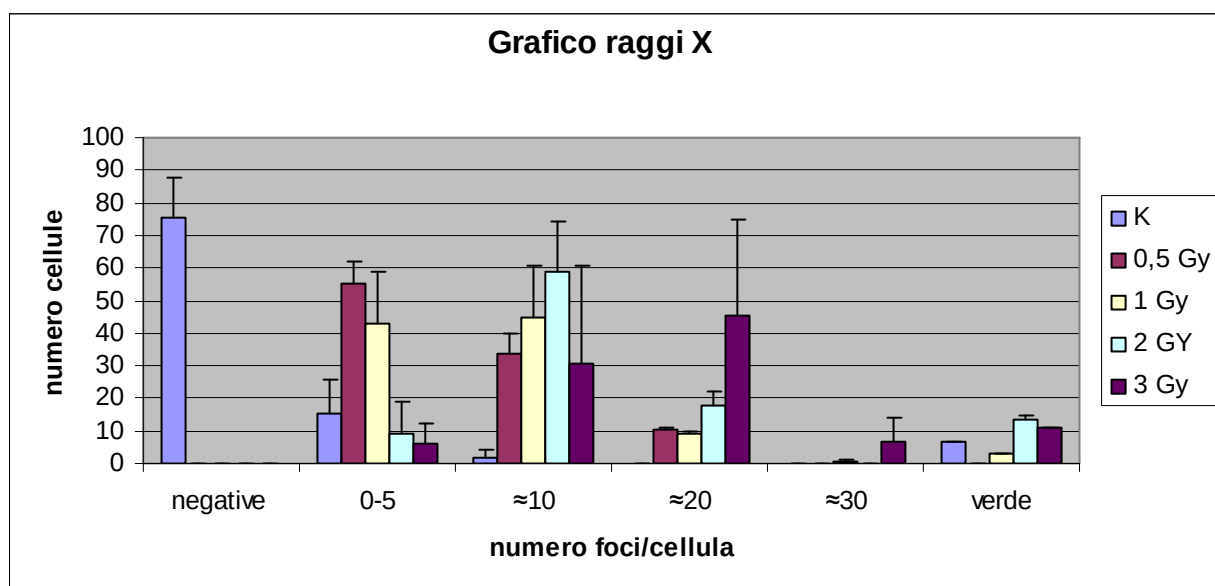


Figura 44: Induzione dei foci γ -H2AX dopo diverse dosi di raggi X con lettura occhiometrica.

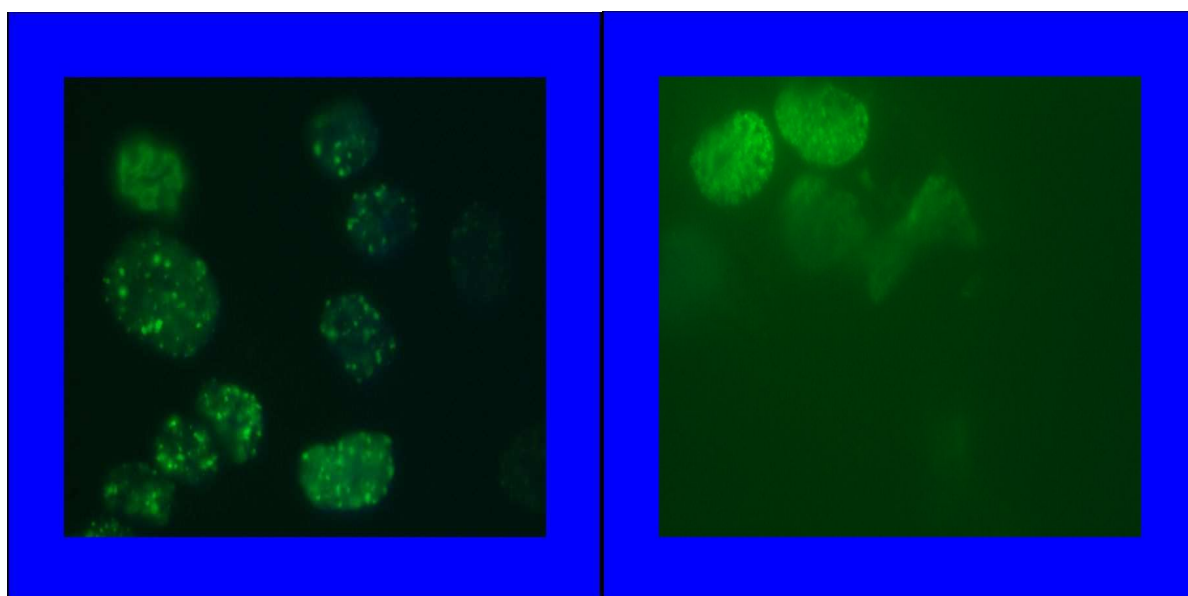


Figura 45: A sinistra immagine dei foci γ -H2AX in cellule esposte ai raggi X e a destra immagine dei foci γ -H2AX in cellule irradiate con gli UV.

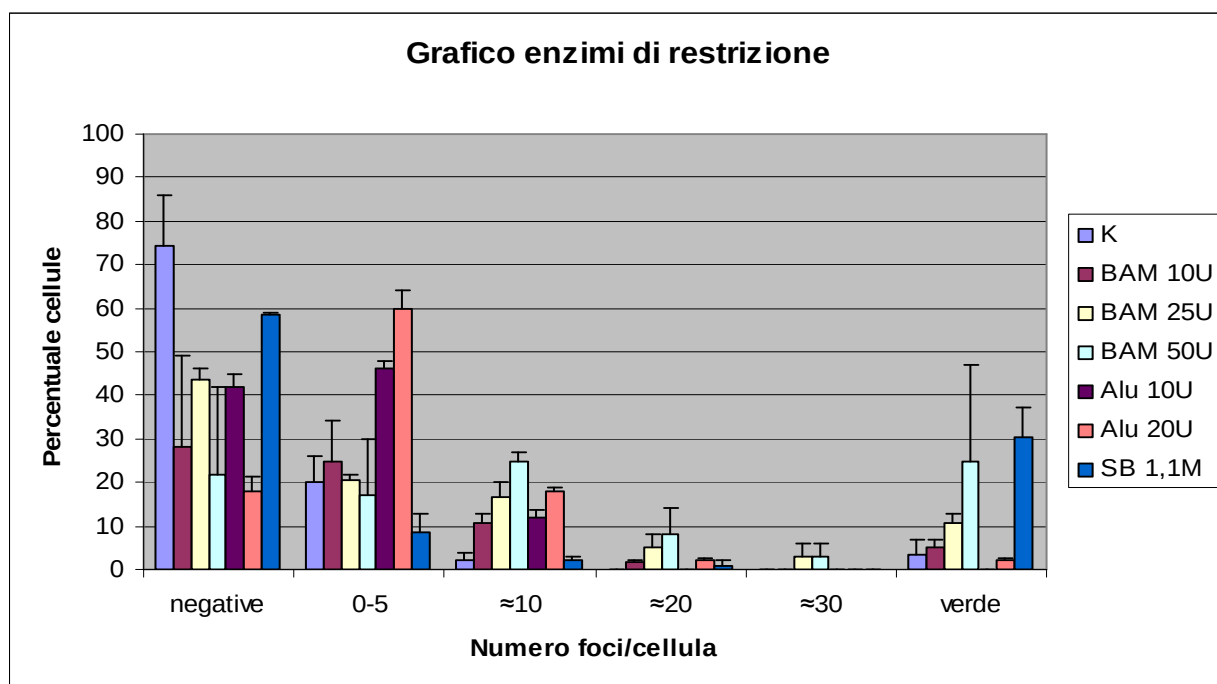


Figura 46: Induzione dei foci γ -H2AX dopo trattamento con enzimi di restrizione.

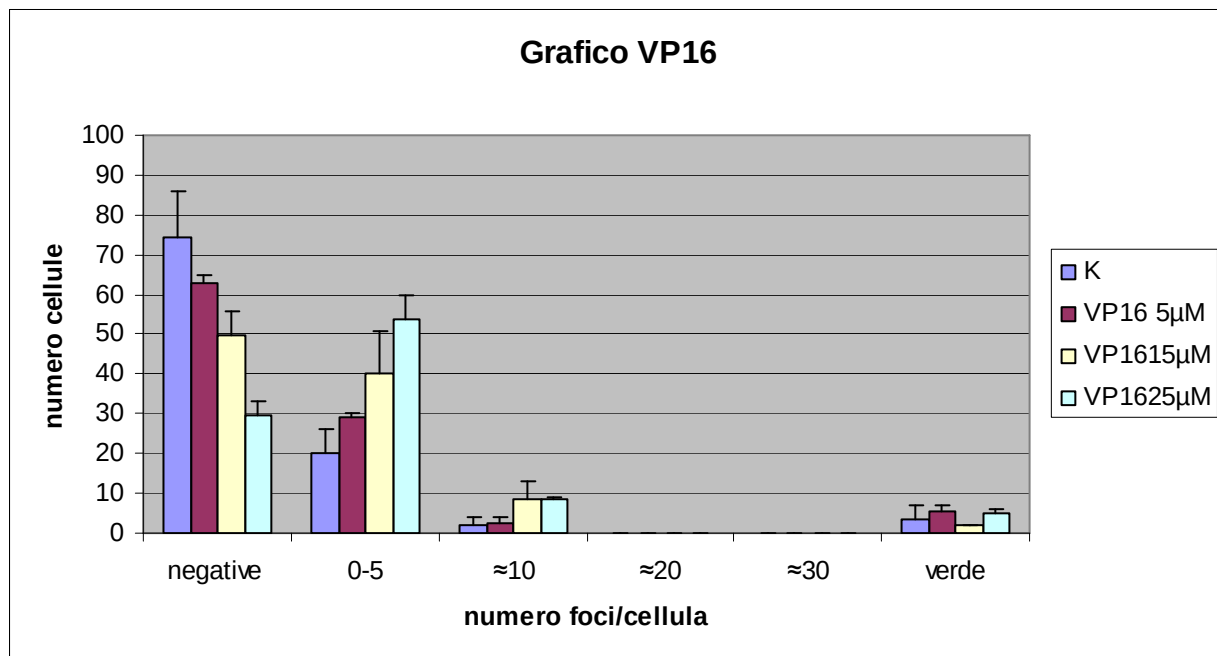


Figura 47: Induzione dei foci γ -H2AX dopo trattamento con VP16.

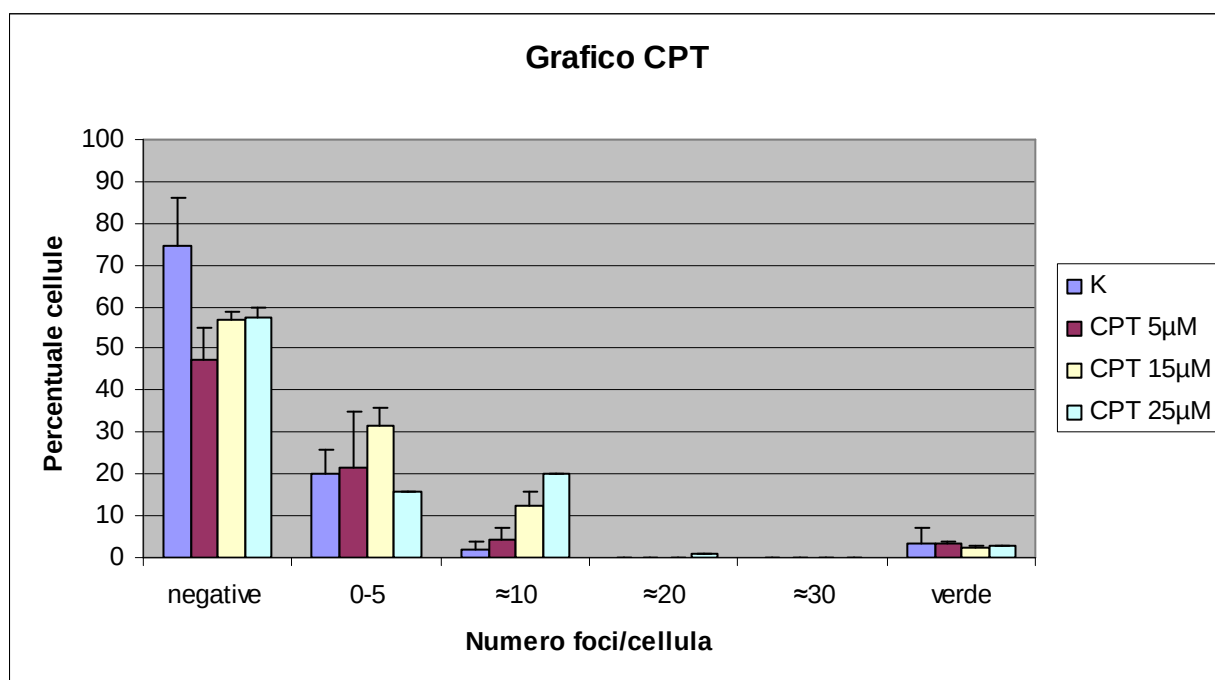


Figura 48: Induzione dei foci γ -H2AX dopo trattamento con CPT.

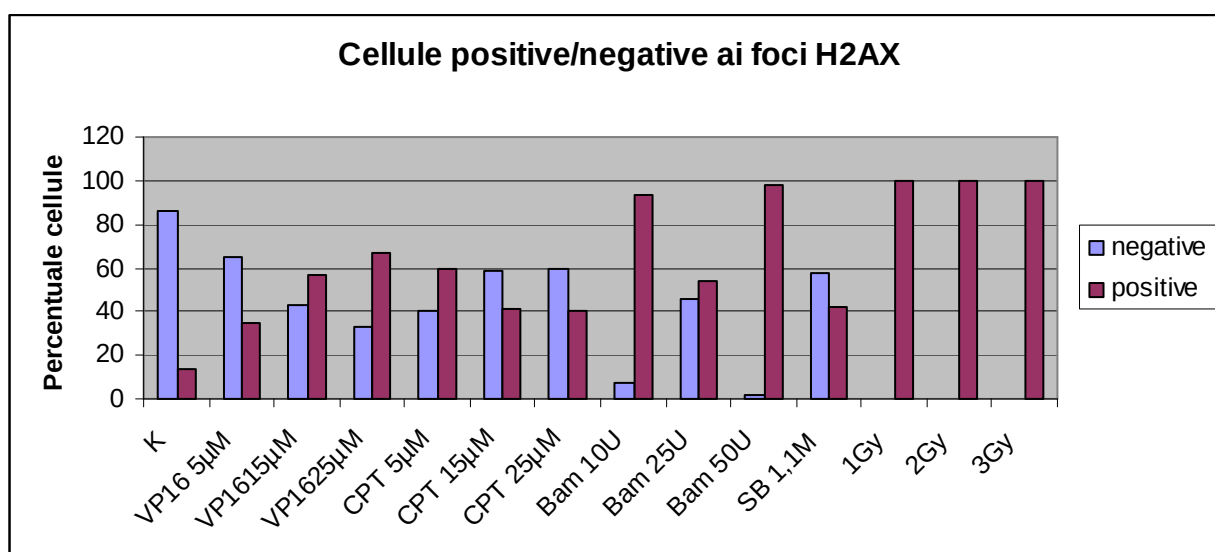


Figura 49: Confronto tra i vari agenti in termini di percentuale di cellule positive/negative ai foci γ -H2AX.

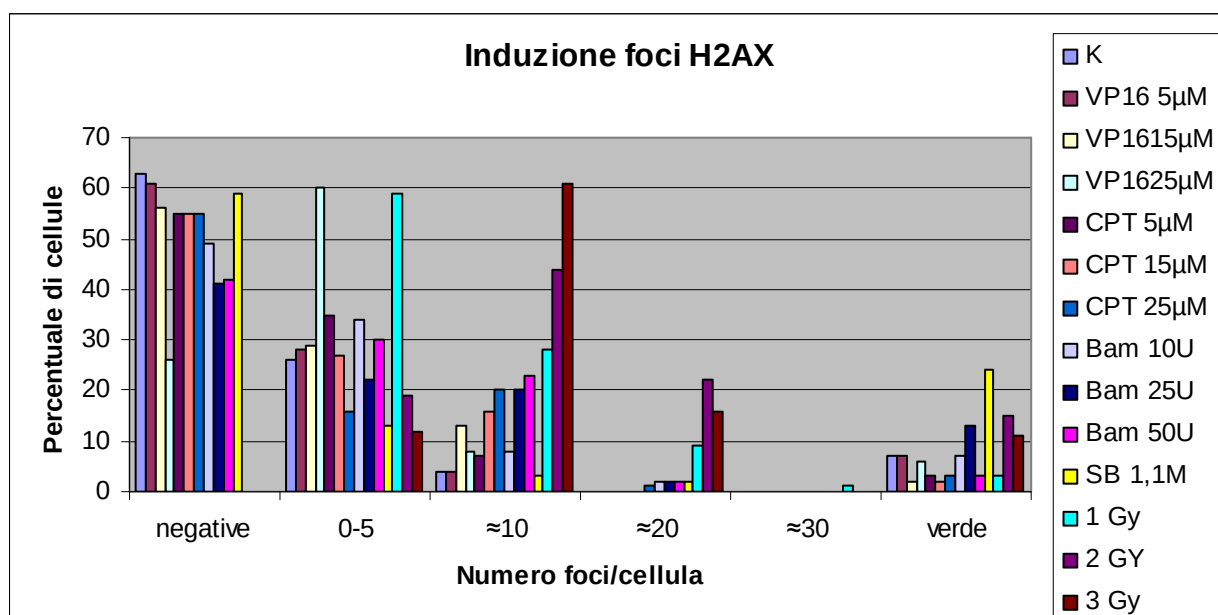


Figura 50: Confronto tra i vari agenti nell'induzione dei foci γ -H2AX. Le cellule positive sono state suddivise in diverse classi in base al numero di foci γ -H2AX presenti.

CAPITOLO 9: DISCUSSIONE

9.1 *Linee cellulari di Ataxia Telangiesctasia*

Dai risultati ottenuti in studi precedenti e riassunti nel capitolo dei risultati rimaneva da stabilire quale, o quali siano i meccanismi con cui si verificava la stimolazione della riparazione delle DSBs e verso quali “target” si indirizzava l’attività della PFT- α , nelle linee cellulari linfoblastoidi di AT, oggetto dell’analisi.

Lo studio “step by step” dell’induzione e della localizzazione di proteine coinvolte nei due processi di riparazione delle DSBs, l’HR e il NHEJ, in presenza di PFT- α pensiamo sia l’approccio adatto per svelare questo interrogativo.

In questa tesi ci siamo quindi occupati di esaminare l’induzione dell’espressione delle proteine p53, p53^{ser15} e RAD51, questa ultima direttamente coinvolta nella pathway di riparazione per ricombinazione omologa. I livelli di espressione sono stati analizzati tramite western blotting dopo l’esposizione ai raggi X in presenza ed in assenza di PFT- α delle linee linfoblastoidi di AT (Figura 35).

L’induzione dell’espressione della proteina p53 nei campioni irradiati e la sua inibizione da parte della PFT- α è confermata dai risultati del western blotting soltanto per la linea wild-type e per la linea AT21RM. In queste due linee perciò l’aumento sia del mean tail moment sia delle aberrazioni per cellula (dati ottenuti dagli studi precedenti) può essere correlato con l’effetto inibitorio della PFT- α sulla p53. Nella linea AT28RM non si riscontra, tramite western blotting, attivazione di p53 dopo irradiazione, ma l’aumento sia del mean tail moment sia delle aberrazioni per cellula (dati ottenuti dagli studi precedenti) riscontrato nei campioni co-trattati con PFT- α suggerisce che, in qualche modo, l’intervento della p53 venga modulato dalla PFT- α anche in questa linea. Invece, la mancata attivazione della p53 in seguito ad irradiazione nella linea AT97RM, osservata mediante western blotting, sembra sostenere la nostra ipotesi che spiega il mancato effetto inibitorio della PFT- α sulla p53 con la mancata induzione della proteina stessa. Per questa linea abbiamo supposto un “target alternativo” per la PFT- α in assenza di espressione di p53.

I risultati di p53^{ser15}, che mostrano un aumento della sua espressione dopo il trattamento con i raggi X e una riduzione dopo il trattamento con raggi X e PFT- α in tutte le linee cellulari eccetto che nella AT97RM dove non è stato osservato alcun cambiamento

nell'espressione di p53^{ser15}, confermano quanto già supposto in seguito all'analisi dell'espressione di p53.

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

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

9.2 Linfociti umani

L'analisi della proliferazione cellulare effettuata nei linfociti umani irradiati nella fase G2 conferma come la radiazione ionizzante rallenti la progressione del ciclo cellulare in seguito all'arresto dello stesso. Per quanto concerne l'effetto del trattamento con l'inibitore della proteina p53, PFT- α , non si osservano differenze tra la sua presenza o assenza nella proliferazione cellulare (Figura 36). Possiamo quindi concludere che questo inibitore non influenzi il ciclo cellulare e la proteina p53 non abbia un ruolo nel mediare l'arresto in fase G2 in tale sistema sperimentale. Ciò è in accordo con la proposta di diverse e sovrapponibili vie sia p53-dipendenti sia indipendenti che regolino la transizione G2/M in risposta agli stress genotossici (Taylor and Stark, 2001). Questo risultato ha consentito di analizzare l'induzione di apoptosi, delle aberrazioni cromosomiche e l'espressione della proteina p53 ai medesimi tempi di recupero sia nei campioni trattati con i raggi X sia nei campioni non trattati.

L'analisi dell'apoptosi indotta dai raggi X mostra un aumento statisticamente significativo delle cellule apoptotiche negative alla BrdUrd solo a 4 h dall'irradiazione (Figura 37). L'apoptosi, definita dalla sua tipica morfologia con il nucleo o condensato o frammentato (Wyllie et al. 1980; Hewitson and Darby, 2010) può essere attribuita solo alla fase G2 proprio tramite l'uso del pulse di marcatura con BrdUrd. E' da sottolineare che le

cellule in G1 eventualmente presenti non entrano nel programma apoptotico prima delle 12-24 h dopo il trattamento genotossico (Carloni et al. 2001; Bassi et al. 2003). Inoltre, sia nei campioni trattati con i soli raggi X sia in quelli trattati con raggi X e PFT- α si osserva circa la stessa percentuale di induzione di apoptosi. Quindi, la presenza della PFT- α non influenza la percentuale di cellule apoptotiche. Questi dati suggeriscono una via apoptotica p53-indipendente che agisce in G2 a tempi brevi dall'esposizione alle radiazioni ionizzanti. L'analisi citofluorimetrica conferma tale risultato poiché non ha rilevato l'espressione della proteina p53 a tempi brevi dall'irradiazione (Figura 38).

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche indotte nella fase G2 mostra un leggero aumento delle rotture cromatidiche ai tempi di recupero di 2 e 4 h dopo l'irradiazione, mentre alle 6 h si osserva una forte riduzione; inoltre, a tutti i tempi di recupero (1, 2, 4, 6 h) non si è riscontrata una differenza di induzione delle rottura cromatidiche tra i campioni trattati con i soli raggi X e quelli trattati con raggi X e PFT- α (Tabella 3). Quindi, la presenza della PFT- α non influenza l'induzione del danno cromosomico e la forte riduzione delle rotture cromatidiche osservata a 6 h dopo l'irradiazione può essere correlata con l'aumento statisticamente significativo delle cellule apoptotiche in G2 osservato a 4 h dopo l'esposizione ai raggi X sia in presenza sia in assenza di PFT- α . Differentemente, sia Bassi e collaboratori (2002) sia Meschini e collaboratori (2010) hanno proposto che la soppressione della p53 può incrementare il rischio di accumulo dell'instabilità genomica come conseguenza dell'inibizione del processo apoptotico. Nei linfociti irradiati in G2 non è stata riscontrata, invece, alcuna correlazione tra l'inibizione dell'apoptosi tramite PFT- α e il contemporaneo aumento delle aberrazioni cromatidiche, confermando, in tale sistema sperimentale, l'indipendenza dall'azione della proteina p53 della via apoptotica che agisce in G2.

Schwartz e Jordan (1997) hanno suggerito che l'apoptosi ha un ruolo selettivo nell'eliminazione delle cellule che contengono aberrazioni di tipo instabile nei linfociti umani in fase G0. Successivamente, Bassi e collaboratori (2003) e Belloni e collaboratori (2005) hanno dimostrato, sempre in linfociti umani irradiati in G0, che la via apoptotica p53-dipendente elimina preferenzialmente le cellule che portano aberrazioni cromosomiche instabili quali i dicentrici. Al contrario, nei linfociti irradiati in G2, a tempi brevi dopo esposizione alle radiazioni, l'apoptosi è p53-indipendente e non si riscontra induzione di aberrazioni instabili come gli scambi cromatidici; questo dato può sembrare in contrasto con quanto precedentemente ottenuto nei linfociti umani irradiati in G0. Tuttavia, possiamo suggerire che la mancanza di induzione di scambi cromatidici nelle metafasi analizzate porti all'attivazione della via indipendente da p53. Questi risultati confermano ulteriormente, anche

se in via indiretta, che la via p53-dipendente è attivata dalla presenza del cromosoma dicentrico. Infatti, in una recente pubblicazione (Belloni et al. 2008) è stato dimostrato che nei linfociti in G0 il tipo di danno cromosomico influenza l'induzione dell'apoptosi, fornendo un'evidenza sperimentale diretta di come le cellule che contengono cromosomi dicentrici siano eliminate per apoptosi.

Poiché le aberrazioni cromosomiche sono causate da errori o nella riparazione del danno al DNA o durante la replicazione dello stesso, la proteina p53 potrebbe contribuire all'efficienza e alla fedeltà di uno o entrambi i processi. Nel corso dell'ultimo decennio, in letteratura è comparsa una vasta mole di dati concernenti il ruolo di p53 nella riparazione del danno al DNA. In particolare, alcune evidenze sperimentali suggeriscono un suo ruolo diretto nel controllo della fedeltà sia dell'HR sia del NHEJ, al fine di assicurare la riparazione del DNA. Tuttavia, l'osservazione della medesima frequenza di aberrazioni cromatidiche indotte sia nei campioni trattati con i soli raggi X sia in quelli trattati con raggi X e PFT- α suggerisce che nei linfociti umani irradiati in G2 la proteina p53 non giochi un ruolo nella riparazione delle DSBs. Differentemente, risultati precedenti avevano suggerito come l'inibizione della p53 tramite PFT- α influenzasse la cinetica di riparazione delle lesioni al DNA indotte dai raggi X nella fase G0/G1 del ciclo cellulare nei linfociti umani portando ad eventi di mis-riparazione e di conseguenza ad un incremento del danno citogenetico in queste cellule (Meschini et al. 2010). Quindi, dall'insieme dei dati, è possibile speculare che la proteina p53 sia coinvolta principalmente nel NHEJ, l'unico processo presente nella fase G0/G1, piuttosto che in risposta al danno al DNA indotto nella fase G2 del ciclo cellulare.

Concludendo, è noto che la risposta cellulare al danno al DNA richiede una stretta coordinazione tra il controllo del ciclo cellulare, la riparazione del danno al DNA e la morte cellulare per apoptosi. Conseguentemente, la fase del ciclo cellulare in cui avviene l'esposizione ai raggi X e il trattamento con l'inibitore chimico della p53, quale la PFT- α , gioca un ruolo fondamentale nel determinare la risposta cellulare.

9.3 *Fibroblasti umani primari*

Il danneggiamento indotto al DNA nucleare dalle radiazioni ionizzanti, così come da altri agenti genotossici, influenza il manifestarsi di vari tipi di risposta, tra cui, riparazione, arresto del ciclo e morte cellulare programmata, finalizzati al mantenimento dell'integrità genomica. Ciascuno di questi eventi mostra una forte dipendenza dalla fase del ciclo in cui si

trova la cellula al momento dell'esposizione, dalle condizioni ambientali, dalla consistenza del danno e dalla radiosensibilità del particolare sistema cellulare preso in esame.

Le radiazioni ionizzanti sono dei forti agenti clastogeni che nelle cellule esposte causano rotture nei cromosomi che risultano come aberrazioni citogenetiche (Natarajan and Obe, 1978, 1984; Goodhead, 1994).

Quando queste rotture sono impropriamente riparate o quando due o più cromosomi danneggiati interagiscono per risolverle possono originarsi aberrazioni stabili (traslocazioni, inversioni) o instabili (dicentrici, ring e frammenti acentrici). Le aberrazioni instabili, di cui il dicentrico è il tipo di aberrazione più rappresentativa, si configurano come aberrazioni letali per la cellula (Bauchinger et al. 1986) a causa dei problemi meccanici che si verificano al momento della divisione cellulare. In questa ottica, in uno studio è stato proposto il possibile ruolo dell'apoptosi come processo di salvaguardia dell'integrità genomica finalizzato alla selettiva eliminazione delle cellule che portano aberrazioni cromosomiche instabili, come dicentrici, ring e frammenti cromosomici rispetto alle cellule con aberrazioni stabili come le traslocazioni bilanciate (Schwartz and Jordan, 1997).

Precedenti studi condotti nel laboratorio di Citogenetica Molecolare e Mutagenesi (DABAC, Università della Tuscia) indicano che nei linfociti umani irradiati in G0 e immediatamente stimolati a proliferare, le cellule aventi cromosomi dicentrici muoiono mediante apoptosi con un meccanismo p53/survivina dipendente nella fase G2/M (Bassi et al. 2003). Quindi, l'analisi delle aberrazioni cromosomiche e dell'induzione della morte programmata, indica l'esistenza di una relazione tra i dicentrici e l'apoptosi, suggerendo che l'apoptosi è il processo di eliminazione selettiva e preferenziale delle cellule che presentano questo tipo di aberrazione rispetto alle cellule portatrici di traslocazioni stabili. Sempre nei linfociti umani irradiati in G0 e lasciati in stasi proliferativa, le cellule portatrici di dicentrici muoiono nella fase G0 del ciclo cellulare raggiungendo un picco massimo di apoptosi 48 ore dopo l'esposizione alla radiazione, seguendo un meccanismo apoptotico p53 dipendente (Belloni et al. 2005). Quindi, il danno indotto dalla radiazione può essere sottostimato a seconda del tempo che intercorre tra il momento dell'esposizione e l'induzione alla proliferazione. La conferma che l'apoptosi rimuove le cellule contenenti cromosomi dicentrici nei linfociti umani di sangue periferico è venuta da un ulteriore lavoro sperimentale condotto nel laboratorio di Citogenetica Molecolare e Mutagenesi (DABAC, Università della Tuscia) (Belloni et al. 2008). I risultati hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule apoptotiche, una volta indotte alla condensazione prematura dei cromosomi tramite la tecnica del PCC (Premature Chromosome Condensation), contenevano cromosomi dicentrici rilevati

per mezzo della tecnica del bandeggio cromosomico di tipo C. Questi risultati dimostrano che nel suddetto sistema cellulare e nelle condizioni sperimentali utilizzate, il tipo di danno cromosomico influenza l'induzione della morte cellulare programmata e fornisce un'evidenza diretta del fatto che le cellule contenenti cromosomi dicentrici sono di preferenza eliminate mediante morte apoptotica.

Nonostante le recenti evidenze sperimentali, l'indagine sulla relazione tra il danno al DNA e l'induzione del programma apoptotico necessita di studi e chiarimenti ulteriori. In particolare è da porre l'attenzione sull'andamento nel tempo della presenza del cromosoma dicentrico che si giustifica con gli importanti risultati sopra citati circa il ruolo di tale aberrazione come induttore primario del programma di morte cellulare, per verificare se anche in altri sistemi cellulari la relazione si mantiene o se invece, entrano in gioco altri meccanismi di mantenimento della stabilità genomica essendo stata più volte ribadita la radiosensibilità variabile dei vari tipi cellulari, e nel contesto di ogni categoria istologica, la diversa risposta delle varie linee cellulari considerate.

A tale scopo in questo lavoro sperimentale è stato condotto uno studio preliminare della relazione tra le aberrazioni cromosomiche e la morte cellulare radioindotte nei fibroblasti umani primari normali. I fibroblasti, infatti, costituiscono una linea cellulare di interesse radiobiologico e clinico nel momento in cui si considerano le implicazioni del danno genetico in ambito radioterapico oltre che in quello della normale esposizione ambientale.

Il sistema cellulare dei fibroblasti, da noi scelto per tale lavoro, fornisce la possibilità di comparare i risultati ottenuti con quelli già descritti nel sistema linfocitario poiché sono cellule umane normali, non immortalizzate, e si può sfruttare la confluenza, in cui la crescita si arresta per il fenomeno di inibizione da contatto, per mimare la fase G0 del ciclo cellulare.

L'esposizione dei fibroblasti umani primari alla dose di 3 Gy di raggi X è stata selezionata sulla base di un primo esperimento incentrato sulla costruzione di una curva dose effetto per la valutazione della frequenza del danno citogenetico radioindotto. Le cellule hanno risposto al crescere della dose di radiazione con un corrispondente aumento nella frequenza delle aberrazioni cromosomiche. Inoltre, alla dose di 3 Gy il danno citogenetico riscontrato è paragonabile a quello precedentemente ottenuto nei linfociti di sangue periferico (Bassi et al. 2003) alla medesima dose di radiazione. La scelta del dosaggio era dettata anche dalla necessità di indurre nel sistema cellulare uno stimolo di entità tale da determinare, eventualmente, l'innescio del processo apoptotico.

Nella seconda serie di esperimenti volti a determinare l'andamento del danno citogenetico nel tempo i risultati ottenuti indicano una forte induzione di aberrazioni

cromosomiche di tipo instabile quali i dicentrici e i ring. Le aberrazioni cromosomiche indotte dalla radiazione si mantengono pressoché costanti nel tempo come si evince dall'analisi dei campioni ai vari tempi di recupero successivi all'esposizione ai raggi X (Tabella 4). Inoltre, si osserva una forte riduzione dell'indice mitotico e l'assenza della colorazione differenziale dei cromatidi fratelli (M1) in tutti i campioni irradiati e a tutti i tempi di recupero analizzati. I tempi di fissaggio analizzati sono collocati intorno a due momenti fondamentali, quali 24 e 48 ore che corrispondono, con buona approssimazione, al momento della prima e della seconda divisione cellulare rispettivamente. Sebbene l'analisi nel tempo effettuata sia limitata, tali dati suggeriscono un rallentamento della proliferazione cellulare. I dati citogenetici sono in accordo con quanto riportato da Nasonova e collaboratori (2004) che hanno rilevato la presenza di un forte blocco del ciclo cellulare in fibroblasti umani primari in seguito all'esposizione delle cellule a dosi comprese in un intervallo tra 1-4 Gy di raggi X.

Mediante tecniche citofluorimetriche, lo studio della progressione del ciclo cellulare è stato condotto al momento della prima e seconda divisione cellulare e alle dosi di 1, 2 e 3 Gy di raggi X (Figura 39). I risultati ottenuti a 24 h di recupero dall'irradiazione indicano un normale andamento del ciclo alle dosi di 1 e 2 Gy e la presenza di un arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M alla dose di 3 Gy di radiazione. Numerose ricerche hanno dimostrato che le radiazioni ionizzanti producono un arresto in questa fase del ciclo cellulare. Contrariamente, alle 48 h di recupero dall'esposizione ai raggi X si osserva un normale profilo del ciclo cellulare nell'intervallo di dosi utilizzato. Tuttavia, è da notare un aumento della percentuale delle cellule in fase G1 e una diminuzione delle cellule in fase S del ciclo cellulare, rispetto ai campioni analizzati alle 24 h. I dati citofluorimetrici insieme a quelli citogenetici consentono di ipotizzare che dopo l'arresto del ciclo in fase G2 le cellule proseguano fino a raggiungere la prima divisione cellulare (M1), ma la progressione del ciclo rallenti alla G1 successiva impedendo il raggiungimento di una seconda fase di divisione cellulare (M2).

L'analisi citofluorimetrica ha, inoltre, confermato che le cellule si trovavano nella fase G1 del ciclo cellulare in conseguenza del mantenimento nello stato di confluenza al momento del trattamento con le radiazioni ionizzanti. Dalla sovrapposizione del profilo del ciclo delle cellule confluenti con quello di cellule non irradiate tripsinizzate immediatamente dopo la fase d'irraggiamento e analizzate dopo 48h si osserva una chiara ripresa del normale andamento del ciclo cellulare.

Contemporaneamente all'analisi del ciclo è stato effettuato lo studio dell'induzione dell'espressione della proteina p53, il "guardiano del genoma", da cui dipende l'attivazione

dei processi di arresto del ciclo cellulare e di apoptosi. I risultati non hanno evidenziato un'aumentata espressione della proteina ai tempi brevi (2, 4, 8 h) (Figura 40) dall'irradiazione mentre si nota una discreta espressione nei tempi più tardivi (24, 32, 48 h) (Figura 41). L'espressione della proteina p53 si verifica, quindi, in coincidenza con l'arresto del ciclo cellulare osservato ai medesimi tempi di recupero.

Lo scopo di questo lavoro sperimentale era quello di studiare la relazione tra le aberrazioni cromosomiche e la morte cellulare radioindotte nei fibroblasti umani primari. La morte cellulare per apoptosi è stata analizzata tramite un approccio citologico basato sulla valutazione della morfologia cellulare mediante fluorescenza ed uno molecolare che consente l'osservazione della formazione dei frammenti di DNA ad alto peso molecolare, mediante elettroforesi su gel di agarosio in campo pulsato. Con il primo metodo sono stati analizzati sia i campioni a tempi brevi dall'irradiazione (2, 4, 8 h) sia quelli a tempi più tardivi (24, 32, 48 h) senza rilevare una sostanziale induzione di apoptosi (Tabella 5, Figura 42). I dati ottenuti ai tempi di 24 e 48 h confermano l'assenza di apoptosi in accordo con la valutazione morfologica. L'osservazione dei profili citofluorimetrici del ciclo cellulare fornisce un'ulteriore prova dell'assenza di apoptosi non essendo visibile il caratteristico picco ipodiploide a nessuno dei due tempi di recupero. Nel tentativo di verificare se l'innesco del processo apoptotico avvenisse più tardivamente, con il secondo metodo, oltre ai campioni ai tempi di 24 e 48 h, sono stati analizzati anche campioni ai tempi di 72 e 96 h dall'esposizione ai raggi X. L'induzione di apoptosi non si riscontra neanche a questi tempi, sebbene sia possibile che l'attivazione del processo, nel sistema cellulare in esame, sia ancora più tardiva come riportato in letteratura da Belyakov e collaboratori (1999).

Concludendo, l'insieme dei dati suggerisce che non vi sia relazione tra l'innesco del processo apoptotico e il danno citogenetico nei fibroblasti umani primari nelle condizioni sperimentali utilizzate. Tuttavia, è da tener presente che per poter confermare tale tesi il lavoro sperimentale fin qui svolto richiederebbe di essere ampliato, procedendo ad una analisi che segua il comportamento del sistema cellulare per periodi di tempo più lunghi. Comparando quanto ottenuto nei fibroblasti umani primari con i dati relativi ai linfociti umani di sangue periferico si può quindi affermare l'esistenza di una differenza nella risposta cellulare, in termini di relazione tra apoptosi e aberrazioni cromosomiche, in seguito all'esposizione alle radiazioni ionizzanti.

Infatti, va tenuto conto di come i due sistemi cellulari siano profondamente diversi dal punto di vista anatomico, istologico e funzionale. Tali differenze si riflettono anche nei rispettivi fenotipi neoplastici nei quali si osserva che i tumori del sistema ematopoietico sono

caratterizzati da specifici riarrangiamenti cromosomici, le traslocazioni come nel caso del Linfoma di Burkitt in cui la traslocazione cromosomica fonde il gene c-myc sul cromosoma 8q24 con il locus di una delle catene κ o λ dei geni delle immunoglobuline sui cromosomi 14q23, 2p12 e 22q11; invece i tumori solidi risultano maggiormente associati ad eventi di aneuploidia e mostrano quindi una estrema eterogeneità per quel che riguarda le alterazioni cromosomiche presenti. Questo fenomeno conferma la variabilità nella correlazione tra danno genetico e vitalità cellulare presente nei diversi sistemi cellulari.

9.4 Linee cellulari di hamster Cinese

Questi studi preliminari ci hanno permesso di valutare il danno indotto da ogni singolo agente in termini di induzione dei foci dell'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX).

L'analisi dell'effetto delle radiazioni ionizzanti, già ampiamente trattato in letteratura, conferma come queste siano l'agente che induce in maggior numero e soprattutto in tutte le cellule i foci γ -H2AX. Quindi tale agente è stato usato come controllo positivo in tutti gli esperimenti. Tuttavia dal confronto tra i risultati dell'analisi tramite software Focicounter (Figura 43) e occhiometrica l'induzione di una curva dose effetto risulta più chiara in tutte le classi di induzione (0-5, circa 10, circa 20, circa 30) in seguito alla lettura occhiometrica (Figura 44). Differentemente, nel caso della lettura con Focicounter l'effetto di dipendenza dalla dose si rileva solo se si considera la classe con un numero di foci di circa 20. Inoltre, è da notare la minore percentuale di cellule positive in ognuna delle diverse classi di induzione a tutte le dosi analizzate da attribuire alla lettura di un unico piano focale da parte del software, mentre la lettura occhiometrica può essere effettuata dall'operatore sui diversi piani. Infine, il software rileva come negative solo le cellule che non presentano alcun focus, creando una sovrastima della percentuale delle cellule positive nella classe 0-5.

Sulla base di questo confronto tra i due sistemi di lettura, per gli altri agenti analizzati è stata riportata solo la lettura occhiometrica.

Per quanto riguarda la radiazione ultravioletta in letteratura sono presenti dati contrastanti che riportano o come i foci dell'istone γ -H2AX si formino durante la fase S nelle cellule irradiate con UV, suggerendo che il blocco della forza replicativa inneschi la fosforilazione dell'H2AX (Ward et al. 2001; Ward et al. 2004) o, differentemente, un effetto negativo sulla fosforilazione dell'H2AX dopo l'irradiazione UV (Rogakou et al. 1998; Burma et al. 2001; Limoli et al. 2002). I nostri risultati che mostrano un peculiare aspetto delle cellule in cui il segnale per γ -H2AX non è organizzato in foci distinti e discreti osservato dopo

1 ora dall'esposizione agli UV (Figura 45) potrebbe essere spiegato con la transiente decondensazione della cromatina causata dalla radiazione stessa (Smerdon et al. 1982). In tal caso il segnale rilevato non è da correlare alla presenza di DSBs.

Per quanto riguarda lo studio degli enzimi di restrizione, questi sono stati analizzati poiché sia le rotture a doppio filamento sia le aberrazioni cromosomiche da essi indotte può essere presa come modello dell'azione delle radiazioni ionizzanti, sebbene la struttura molecolare delle DSBs prodotte dagli enzimi di restrizione e dalle radiazioni ionizzanti siano differenti. Infatti, i risultati della nostra analisi mostrano come i foci dell'istone γ -H2AX aumentino all'aumentare della dose utilizzata come si verifica anche per la radiazione ionizzante; tuttavia, diversamente dai raggi X, non in tutte le cellule è stato possibile osservare il segnale per l'istone γ -H2AX in quanto probabilmente gli enzimi non sono riusciti a penetrare in maniera uniforme in tutte le cellule (Figura 46).

I risultati dell'analisi dell'effetto del VP16 e della CPT sull'induzione dei foci di γ -H2AX non sono ben chiari (Figura 47, Figura 48). Infatti, vari studi presenti in letteratura dimostrano che i foci γ -H2AX possono essere indotti anche da diversi agenti chimici, sebbene in tempi differenti. La differenza nel tempo di induzione può anche riflettere il differente meccanismo per l'agente genotossico, essendo γ -H2AX specifico per le DSBs. Quindi, per gli agenti che inducono immediatamente DSBs, come i raggi X, i tempi in cui appaiono i foci γ -H2AX sono veloci, mentre per gli agenti che non inducono direttamente DSBs potrebbe essere ritardati. Infatti, per questo gruppo di agenti genotossici la generazione delle DSBs potrebbe essere dovuta ai processi di riparazione o alla replicazione del DNA danneggiato, che può spiegare il motivo per cui alcuni agenti inducono foci γ -H2AX in maniera ciclo dipendente (Furuta et al. 2003; Huang et al. 2003; MacPhail et al. 2003; Ha et al. 2004; Huang et al. 2004; Halicka et al. 2005; Zhou et al. 2006).

Questi studi preliminari, condotti tutti un'ora dopo il trattamento, dovranno essere messi in relazione con una cinetica di riparazione che può permetterci di capire i tempi sia di induzione che di riparazione del danno indotto dai diversi agenti genotossici. Inoltre, i vari agenti potranno anche essere testati in linee difettive per i diversi meccanismi di riparazione al fine di comprendere il coinvolgimento dell'istone H2AX fosforilato nelle varie pathways riparative.

Infine, per attribuire in maniera inequivocabile i foci γ -H2AX alle DSBs è necessario rilevarne l'induzione *in situ* o su cromosomi condensati prematuramente (PCC) o su cromosomi metafasici in concomitanza con la presenza di rotture cromosomiche.

9.5 Conclusioni generali

In questa tesi di dottorato i diversi sensori della risposta al danno al DNA quali ATM, p53 e la variante istonica H2AX sono stati analizzati in vari e differenti sistemi cellulari di mammifero come le linee linfoblastoidi di Ataxia Telangiectasia, i linfociti e i fibroblasti umani primari e linee di hamster Cinese. Dall'insieme dei dati possiamo concludere che la risposta cellulare si diversifica a seconda del tipo cellulare, della fase del ciclo in cui avviene il danno al DNA, dell'agente utilizzato per la sua induzione e della mutazione presente nel gene difettivo. Da questo studio emerge quindi chiaramente l'importanza dello studio della risposta cellulare e di come questa controlla la stabilità genomica. Tutto ciò ha una rilevanza non solo nella ricerca di base ma anche nel campo delle potenziali terapie sia antitumorali sia per le sindromi genetiche ad instabilità genomica, quali l'Ataxia Telangiectasia.

BIBLIOGRAFIA

Abraham RT, PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. 3(8-9) 883-887 (2004).

Adair GM, Roling RL, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nair RS, Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *The EMBO Journal* 19, 5552-5561 (2000).

Alberts B. *Biologia molecolare della cellula*. 4^a edizione, Zanichelli, Bologna (2004).

Albino AP, Huang X, Jorgensen E, Yang J, Gietl D, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Induction of H2AX phosphorylation in pulmonary cell by tobacco smoke. *Cell Cycle*, 3, 1062-1068 (2004).

Allen DM, Van Praag H, Ray J, Weaver Z, Winrow CJ, Carter TA, Braquet R, Harrington E, Ried T, Brown KD, Gage FH, Barlow C, Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis. *Genes Dev.* (5) 554-566 (2001).

Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coackley C, Folkard M, Xu Y, Chen BP, Chen DJ, Lilge L, Prise KM, Bazett Jones DP, Bristow RG. Evidence for the Direct Binding of Phosphorylated p53 to Sites of DNA Breaks In vivo. *Cancer Research*. 65 10810-10821 (2005).

Alvarez-Salas LM, Arpawong TE, Di Paolo JA, Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9, 441-450 (1999).

Alves Da Costa C, Mattson MP, Ancolio K, Checler F, The C-terminal fragment of presenilin 2 triggers p53-mediated staurosporine- induced apoptosis, a function independent of the presenilinase-derived N-terminal counterpart. *J. Biol. Chem.* 278, 12064-12069 (2003).

Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G, Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 38224–38230 (2001).

Andreassi MG, Picano E, I possibili rischi delle radiazioni mediche: dall'epidemiologia al danno biologico. *Radiazioni ricerca e applicazioni*, XII, 4-8 (2009).

Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 29, 559-573 (1997).

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

Aten JA, Stap J, Krawczyk PM, van Owen CH, Hoebe RA, Essers J, Kanaar R, Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science*, 303 (5654), 92-95 (2004).

- Audebert M, Salles B, Calsou P, Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 369, 982-988 (2008).
- Bakkenist CJ, Kastan MB, DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499–506 (2003).
- Banath JP, Olive PL, Expression of phosphorylated histoneH2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. *Cancer Research*, 63, 4347-4350 (2003).
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y, Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281(5383) 1674-1677 (1998).
- Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, Podskalny J, Roth J, Muggeo M, Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. *N Engl J Med*. 298(21) 1164-1171 (1978).
- Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C, A proteolytic fragment from the central region of the p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild type but not from an oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*. 7, 2565-2574 (1993).
- Barlow C, Dennery PA, Shigenaga MK, Smith MA, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Wynshaw-Boris A, Levine RL, Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17) 9915-9919 (1999).
- Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, Larson D, Harrington EA, Haeberle AM, Mariani J, Eckhaus M, Herrup K, Bailly Y, Wynshaw-Boris A, ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(2) 871-876 (2000).
- Bartek J, Falck J, Lukas J, CHK2 kinase, a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(12) 877-886 (2001).
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J, DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*, 26(56) 7773-7779 (2007).
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J, DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434(7035) 864-870 (2005).
- Barzilai A, Yamamoto K, DNA damage response to oxidative stress. *DNA Repair*, 3, 1109-1115; (2004).
- Bassi L, Carloni M, Fonti E, Palma De La Peña N, Meschini R, Palitti F, Pifithrin- α , an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro. *Mutat. Res*. 499 163-176 (2002).
- Bassi, L, Carloni M, Meschini R, Fonti E, Palitti F, X-irradiated human lymphocytes with unstable aberration and their preferential elimination by p53/survivina-dependent apoptosis *Int. J. Radiat. Biol*. 79, 943-954 (2003).

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW, Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(12) 8173-8178 (2002).

Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H, Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat. Environ. Biophys.* 25(4) 253-260 (1986).

Beamish H, Lavin MF, Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int J Radiat Biol.* 65(2) 175-184 (1994).

Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, Wang Z, Sun X, Sanal O, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Chessa L, Lee EY, Gatti RA, Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Mol Genet Metab.* 70(2) 122-133 (2000).

Belloni P, Meschini R, Czene S, Harms-Ringdahl M, Palitti F, Studies on radiation-induced apoptosis in G0 human lymphocytes. *Int. Radiat. Biol.* 81, 8, 587-599 (2005).

Belloni P, Meschini R, Lewinska D, Palitti F, Apoptosis preferentially eliminates irradiated G0 Human Lymphocytes bearing dicentric chromosomes. *Radiation Research*, 169, 181-187 (2008).

Belyakov OV, Prise MK, Trott KR, Michael BD, Delayed lethality, apoptosis and micronucleus formation in human fibroblast irradiated with X-Rays or α -particles. *Int. J. Radiat. Biol.* 75,8 985-993 (1999).

Bencokova Z, Kaufmann MR, Pires IM, Lecane PS, Giaccia AJ, Hammond EM, ATM activation and signalling under hypoxic conditions. *Molecular Cell Biology*, 29, 526-537 (2008).

Bender MA, Griggs HG, Bedford JS, Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation. *Mutation Research* 23, 197-212 (1974).

Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, Vaughan AT, Apoptotic triggers initiate translocation within the MLL gene involving the nonhomologous end joining repair system. *Cancer Research*, 61, 4550-4555 (2001).

Biton S, Gropp M, Itsykson P, Pereg Y, Mittelman L, Johe K, Reubinoff B, Shiloh Y, ATM-mediated response to DNA double strand breaks in human neurons derived from stem cells. *DNA Repair* 6(1) 128-134 (2006).

Boffetta P, Van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskailerova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R, Bonassi S. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *American Journal of Epidemiology*, 165, 36-43 (2007).

Bonilla CY, Melo JA, Toczyski DP, Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage. *Molecular Cell*, 30, 267-276 (2008).

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ, A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-530 (1983).

- Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski N, May E, Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene*, 19, 649-660 (2000).
- Brugmans L, Kanaar R, Essers J, Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutation Research* 614, 95-108 (2007).
- Bullock AN, Fersht AR, Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer*, 1, 68-76 (2001).
- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, Albitar M, Reed JC, Croce CM, ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 59(1) 24-27 (1999).
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ, ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467 (2001).
- Camacho E, Hernández L, Hernández S, Tort F, Bellosillo B, Beà S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernández PL, Campo E, ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood*. 99(1) 238-244 (2002).
- Carlioni M, Meschini R, Ovidi L, Palitti F, PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from X-rays-induced apoptosis. *Mutagenesis*, 16, 115-120 (2001).
- Chadwick BP, Lane TF, BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma*, 114, 432-439 (2005).
- Chen S, Inamdar KV, Pfeiffer P, Feldmann E, Hannah MF, Yu Y, Lee JW, Zhou T, Lees-Miller SP, Povirk LF, Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 24323-24330 (2001).
- Chen P, Peng C, Luff J, Spring K, Watters D, Bottle S, Furuya S, Lavin MF, Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. *J Neurosci.* 23(36) 11453-11460 (2003).
- Chumakov PM, Function of the p53 gene: choice between life and death. *Biochemistry*, 65, 28-40 (2000).
- Clingen PH, Wu JYH, Miller J, Mistry N, Chin F, Wynne P, Prise KM, Hartley JA, Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy. *Biochem Pharmacol*, 76, 19-27 (2008).
- Cologne JB, Preston DL, Longevity of atomic bomb survivors. *Lancet*, 356, 303-307 (2000).
- Cote J, Ruiz-Carrillo A, Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science*. 261, 765-769 (1993).

Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ, gammaH2AX foci form preferentially in euchromatic after ionising-radiation, Public Library of Science, 2, e1057 (2007).

Cronauer MV, Shulz WA, Burchardt T, Ackermann R, Burchardt M, Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene*, 23 3541-3549 (2004).

D'Amours D, Jackson SP, The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5) 317-327 (2002).

Dauth I, Krüger J, Hofmann TG, Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.* 67(5) 2274-2279 (2007).

De la Chapelle A, Peltomäki P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu. Rev. Genet.* 29, 329-348 (1995).

Delacôte F, Lopez BS, Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*, 7, 33-8 (2008).

De La Monte SM, Sohn YK, Ganju N, Wands JR, p53 and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab. Invest.* 78, 401-411 (1998).

Desai N, Davis E, O'Neill P, Durante M, Cucinotta FA, Wu H, Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE particle radiation. *Radiation Research*, 164 (4Pt2), 518-522 (2005).

Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM, Morgan MB, Fulton L, Fulton RS, Zhang Q, Wendl MC, Lawrence MS, Larson DE, Chen K, Dooling DJ, Sabo A, Hawes AC, Shen H, Jhangiani SN, Lewis LR, Hall O, Zhu Y, Mathew T, Ren Y, Yao J, Scherer SE, Clerc K, Metcalf GA, Ng B, Milosavljevic A, Gonzalez-Garay ML, Osborne JR, Meyer R, Shi X, Tang Y, Koboldt DC, Lin L, Abbott R, Miner TL, Pohl C, Fewell G, Haipke C, Schmidt H, Dunford-Shore BH, Kraja A, Crosby SD, Sawyer CS, Vickery T, Sander S, Robinson J, Winckler W, Baldwin J, Chirieac LR, Dutt A, Fennell T, Hanna M, Johnson BE, Onofrio RC, Thomas RK, Tonon G, Weir BA, Zhao X, Ziaugra L, Zody MC, Giordano T, Orringer MB, Roth JA, Spitz MR, Wistuba II, Ozenberger B, Good PJ, Chang AC, Beer DG, Watson MA, Ladanyi M, Broderick S, Yoshizawa A, Travis WD, Pao W, Province MA, Weinstock GM, Varmus HE, Gabriel SB, Lander ES, Gibbs RA, Meyerson M, Wilson RK, Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455(7216) 1069-1075 (2008).

Downs JA, Lowndes NF, Jackson SP, A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408, 1001-1004 (2002).

Dynlacht BD, Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature*, 389, 149-152 (1997).

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata A, A caspase- activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature Genet.* 30, 290-294 (1998).

- Eng L, Coutinho G, Nahas S, Yeo G, Tanouye R, Babaei M, Dörk T, Burge C, Gatti RA, Nonclassical splicing mutations in the coding and noncoding regions of the ATM gene: maximum entropy estimates of splice junction strengths. *Hum Mutat*, 23, 67-76 (2004).
- Erster S, Moll U, Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 843-850 (2005).
- Fei P, El-Deiry WS, p53 and radiation responses. *Oncogene*, 22, 5774-5783 (2003).
- Feldher CM, Akin D, Cohen RJ, Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 114 4621-4627 (2001).
- Fernandes N, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC, Price BD, DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem.* 280(15) 15158-15164 (2005).
- Fernandez-Capetillo O, Chen H-T, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.*, 4, 993-997 (2002).
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A, H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair*, 3, 956-967 (2004).
- Frank KM, Sekiguchi JM, Seidl KJ, Swat W, Rathbun GA, Cheng HL, Davidson L, Kangaloo L, Alt FW, Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396, 173-177 (1998).
- Frankenberg-Schwager M, Gebauer A, Koppe C, Wolf H, Pralle E, Frankenberg D, Single-strand Annealing, Conservative Homologous Recombination, Nonhomologous DNA End Joining, and the cell cycle-dependent repair of DNA double-strand breaks induced by sparsely or densely ionizing radiation. *Radiation Research*, 171, 265-273, (2009).
- Fujimori A, Tachiiri S, Sonoda E, Thompson LH, Dhar PK, Hiraoka M, Takeda S, Zhang Y, Reth M, Takata M, Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal* 20, 5513-5520 (2001).
- Furuta T, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y, Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 20303-20312 (2003).
- Gao Y, Chaudhuri J, Zhu C, Davidson L, Weaver DT, Alt FW, A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity*, 9, 367-376 (1998).
- Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, Chaudhuri J, Horner J, Depinho RA, Alt FW, Interplay of p53 and DNA- repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*, 404, 897-900 (2000).

Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK, Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res.* 60(12) 3299-3304 (2000).

Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K, et al. Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature.* 336(6199) 577-580 (1988).

Gatti RA, Tward A, Concannon P, Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab.* 68(4) 419-23 (1999).

Gatti RA, Pollard J, Du L. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 6007–6012; (2007).

Gewirtz DA, Growth arrest and cell death in the breast tumor cell in response to ionizing radiation and chemotherapeutic agents which induce DNA damage. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62, 223-235 (2000).

Gilman CP, Chan SL, Guo Z, Zhu X, Greig N, Mattson MP, p53 is present in synapses where it mediates mitochondrial dysfunction and synaptic degeneration in response to DNA damage, and oxidative and excitotoxic insults. *Neuromol. Med.* 3 159-172 (2003).

Giono LE, Manfredi JJ, The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J. of Cellular Physiology.* 209, 13-20 (2006).

Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK, Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 23(22) 4451-4461 (2004).

Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA, ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterocromatin. *Molecular Cell*, 31, 167-177 (2008).

Goodhead DT, Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65(1) 7-17 (1994).

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinatas A, Kletsas D, Mariatos G, Zoumpourlis V, Ryan KM, Kittas C, Papavassiliou AG, p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB independent manner. *EMBO J.* 22 1567-1578 (2003).

Green DR, Kroemer G, The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8, 267-271 (1998).

Green DR, Reed JC, Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312 (1998).

Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW, Ku-deficient embryonic stem cell have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proceeding of The National Academy of Sciences U.S.A.*, 94, 8076-8081 (1997).

- Gudkov A, Komarova EA, Isolation of p53 inhibitors by screening chemical libraries in cell-based readout system. *Methods Mol Biol.* 223 635-648 (2003).
- Gudkov AV, Komarova EA, Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(3) 726-736 (2005).
- Gumy Pause F, Wacker P, Maillet P, Betts D, Sappino AP, ATM gene alterations in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mutat.* 21(5) 554 (2003).
- Gumy-Pause F, Wacker P, Sappino AP, ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia*, 18(2) 238-242 (2004).
- Ha L, Ceryak S, Patierno SR, Generation of S phase-dependent DNA double-strand breaks by Cr(VI) exposure: involvement of ATM in Cr(VI) induction of gamma-H2AX. *Carcinogenesis*, 25, 2265–2274 (2004).
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC, Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 92, 2298-2302 (1995).
- Haber JE, Leung WY, Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proceeding of The National Academy of Sciences U.S.A.* 93, 13949-13954 (1996).
- Halicka HD, Huang X, Traganos F, King MA, Dai W, Darzynkiewicz Z, Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle* 4, 339–345 (2005).
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T, Expression of bcl-2, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11318-11323 (2001).
- Hahn WC, Weinberg RA, Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev. Cancer*, 2, 331-341 (2002).
- Halozoneitis TD, Gorgoulis VG, Bartek J, An oncogene- induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 319, 1352-1355 (2008).
- Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70 (2000).
- Hanasoge S, Ljungman M, H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28, 2298–2304 (2007).
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF, The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 123, 61-118 (1983).
- Hewitson TD, Darby IA, In situ localization of apoptosis using TUNEL. *Methods Mol Biol.* 611 161-170 (2010).

- Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M, Zhang XP, Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Research*, 34, 4115-4125 (2006).
- Hoeijmakers JH, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374 (2001).
- Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis. *Cell Cycle* 2, 614–619 (2003).
- Huang X, Okafuji M, Traganos F, Luther E, Holden E, Darzynkiewicz Z, Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry*. 58A 99–110 (2004).
- Huertas D, Sendra R, Purificación M, Chromatin dynamics couplet to DNA repair. *Epigenetics*, 4 (1), 31-42 (2009).
- Hupp TR, Lane DP, Two distinct signalling pathways activate the latent DNA-binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. *J. Biol. Chem.* 270, 18165-18174 (1994).
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H, DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22, 5834-5847 (2003).
- Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G, Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.*, 104, 14-20 (2004).
- Ishiguro K, Seow HA, Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC, Mode of action of the chloroethylating and carbamoylating moieties of the prodrug cloretazine. *Molecular Cancer Ther*, 5, 969-976 (2006).
- Ismail IH, Wadhwa TI, Hammarsten O, An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acid Research*, 1-10 (2007).
- Israels ED, Israels LG, The cell cycle. *The Oncologist*, 5, 510-513 (2000).
- Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP, Crystal structure of the tetramerization domain of p53 tumor suppressor at 1,7 angstroms. *Science*, 276, 1498-1502 (1995).
- Jenner P, Olanow CW, Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 44, S72-S84 (1998).
- Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD, The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J Biol Chem*. 281(23) 5741-15746 (2006).
- Jirieny J, Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO Journal*, 17, 6427-6436 (1998).

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*. 321(5897) 1801-1806 (2008).

Jong-Soo K, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AMR, Yokomori K, Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *The J. of cell Biology*, 170, 3, 341-347 (2005).

Joseph TW, Zaika A, Moll UM, Nuclear and cytoplasmic degradation of endogenous p53 and DM2 occurs during downregulation of the p53 response after multiple types of DNA damage. *Faseb J*. 17, 1622-1630 (2003).

Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, Lisowska H, Wojcik A, Wojewodzka M, Lankoff A, FociCounter: A freely available PC programme for quantitative and qualitative analysis of gamma-H2AX foci. *Mutation Research*, 696 (1) 16-20 (2010).

Kaelin WG Jr, The emerging p53 gene family. *J. of the National Cancer Institute*, 91, 594-598 (1999).

Kanaar R, Hoeijmakers JHJ, Van Gent DC, Molecular mechanism of DNA double strand break repair. *Trends Cells Biol*. 8, 483-489 (1998).

Kanaar R, Wyman C, Rotstein R, Quality control of DNA break metabolism: in the “end”, it’s a good thing. *EMBO Journal*, 27, 581-588 (2008).

Kastan MB, Radin AJ, Kuerbitz SJ, Vogelstein B, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y, Craig RW, Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res*. 51 4279-4286 (1991).

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW, Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 51 6304-6311 (1991).

Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr, A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*. 71(4) 587-597 (1992).

Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y, Craig RW. Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res*. 51(16) 4279-4286 (2001).

Kato TA, Okayasu R, Bedford JS, Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and γ -H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells. *Mutation Research*, 639, 108-112 (2007).

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4) 239-257 (1972).

Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF, ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 20(4) 398-400 (1998).

Khanna KK, Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst.* 92(10) 795-802 (2000).

Khanna KK, Jackson SP, DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 27(3) 247-254 (2001).

Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D, Rapid ATM dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(26) 14973-14977 (1999).

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G, γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acid Research*, 36, 17, 5678-5694 (2008).

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* 285(5434) 1733-1737 (1999).

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

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

Kubbubut MHG, Jones SN, Vousden KH, Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature*, 387, 299-303 (1997).

Kurz EU, Lees-Miller SP, DNA damage-induced activation of ATM and ATMdependent signaling pathways. *DNA Repair*, 3(8-9) 889-900 (2004).

Lai CH, Chun HH, Nahas SA Mitui M, Gamo KM, Du L, Gatti RA, Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 15676-15681 (2004).

Lain S, Lane D, Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *Eur. J. Cancer*, 39, 1053-1060 (2003).

Lavin MF, Gueven N, The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* 13(6) 941-950 (2006).

Lavin MF, Gueven N, Bottle S, Gatti RA, Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br. Med. Bull.* 81-82, 129-147 (2007).

Lavin MF, Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(10) 759-769 (2008).

Leatherbarrow EL, Harper JV, Cucinotta FA, O'Neill P, Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 82(2) 111-118 (2006).

Lederman HM, Crawford TO, McGrath-Morrow S, Lefton-Greif M, Rosquist K, Meyer A, Oxidative stress in ataxia-telangiectasia. International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (A-T) and ATM. Banff, Canada, September (2006).

Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J, p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, 81, 1013-1020 (1995).

Lee JH, Paull TT, ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721) 551-554 (2005).

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

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

Lewis SM, The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses, *Advances in Immunology*, 56, 27-150, (1999).

Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M,. Chromosomal double strand breaks repair in Ku80-deficient cells. *Proceeding of The National Academy of Sciences U.S.A.* 93 (17), 8929-8933 (1996).

Liberzon E, Avigad S, Yaniv I, Stark B, Avrahami G, Goshen Y, Zaizov R, Molecular variants of the ATM gene in Hodgkin's disease in children. *Br J Cancer*. 90(2) 522-525 (2004).

Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB, ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(17) 10146-10151 (1998).

Limoli CL, Giedzinski E, Bonner WM, Cleaver JE, UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, γ -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 233–238 (2002).

Liu TY, Chen CL, Chi CW, Oxidative damage to DNA induced by areca nut extract. *Mutat. Res.* 367, 25-31 (1996).

Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY, Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 96(23) 1769-1780 (2004).

Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, In vivo formation and repair of DANN double-strand breaks after computed tomography examinations. *PNAS*, 102, 25, 8984-8989 (2005).

Loeb LA, Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51, 3075-3079 (1991).

Lorenzo E, Ruiz-Ruiz C, Quesada AJ, Hernandez G, Rodriguez A, Lopez-Rivas A, Redondo JM, Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cells through a p53-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 277 10883-10892 (2002).

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

Lukas C, Bartek J, Lukas J, Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny “local” lesions pose great “global” challenges. *Chromosoma*, 114, 146-154 (2005).

MacPhail SH, Banath JP, Yu Y, Chu E, Olive PL, Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G(1)-phase cells. *Radiation Research*, 159, 759-767 (2003).

Mancuso MT, Pasquali E, Leonardi S, Tanori M, Rebessi S, Di Majo V, Pazzaglia S, Toni MP, Pimpinella M, Covelli V, Saran A. Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (34), 12445-12450 (2008).

Mannironi C, Bonner WM, Hatch CL, H2AX, a histone isoprotein with conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acid Research*, 17, 9113-9126. (1989).

Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, Wyrobek AJ, Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 82, 9, 605-639 (2006).

Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH, hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Molecular Cell Biology*, 17, 6087-6096 (1997).

Matei IR, Guidos CJ, Danska JS, ATM-dependent DNA damage surveillance in T-cell development and leukemogenesis: the DSB connection. *Immunol Rev*, 209 142-158 (2006).

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 316(5828) 1160-1166 (2007).

Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RL, Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10, 243-254 (1993).

Mattsson A, Jernström B, Cotgreave IA, Bajak E, H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene diol epoxides. *Chemico-Biological Interactions*, 177, 40-47 (2009).

May P, May E, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, 18, 7621-7636, (1999).

McKinnon PJ, Burgoyne LA, Evidence for the existence of an actin-derived protein in ataxia-telangiectasia lymphoblastoid cell lines. *Exp Cell Res*. 158(2) 413-422 (1985).

McKinnon PJ. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep*. 5(8) 772-776 (2004).

Meeker AK, De Marzo AM, Recent advances in telomere biology. Implications for human cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 16, 32-38 (2004).

- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, Knight RA, Green DR, Thompson C, Vousden KH, p73 induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J.Biol. Chem.* 279, 8076-8083 (2004).
- Meschini R, Berni A, Ortenzi V, Mancinelli P, Palitti F, Relation between DNA repair, apoptosis and chromosomal aberrations in presence of pifithrin-alpha, an inhibitor of p53. *Mutation Research*, 701(1) 92-97 (2010).
- Migliore L, *Mutagenesi ambientale*, Zanichelli, Bologna (2004).
- Misteli T, Soutoglou E, The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10 (4), 243-254 (2009).
- Mol CD, Parikh SS, Putnam CD, Lo TP, Tainer JA, DNA repair mechanism for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, 101-128 (1999).
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S, DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*. 5(5) 575-590 (2006).
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SI, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH, p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med*, 188, 2033-2045 (1998).
- Murga M, Jaco I, Fan Y, Soria R, Martinez-Pastor B, Cuadrado M, Yang SM, Blasco MA, Skoultschi AI, Fernandez-Capetillo O, Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *Journal Cell Biology*, 178, 1101-1108 (2007).
- Nagata S, Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12-18 (2000).
- Nakada S, Chen GI, Gingras A-C, Durocher D, PP4 is a γ -H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Reports.*, 9, 1019-1026 (2008).
- Nakamura A, Sedelnikova OA, Redon C, Pilch DR, Sinogeeva NI, Shroff R, Lichten M, Bonner WM, Techniques for γ -H2AX detection. *Methods in Enzymology*, 409, 236-250 (2006).
- Nasonova E, Fussel K, Berger S, Gudowska-Nowak E, Ritter S, Cell cycle arrest and aberration yield in normal fibroblasts. Effect of X-Rays and $^{195}\text{MeV}^{-1}\text{C}$ ions. *Int. J. Radiat. Biol.* 80, 9, 621-634 (2004)
- Natarajan AT, Obe G, Molecular mechanism involved in the production of chromosomal aberration. I. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 52, 137-149 (1978).
- Natarajan AT, Obe G, Molecular mechanisms involved in the production of chromosome aberration III. Restriction endonuclease. *Chromosoma*, 90, 120-127 (1984).
- Natarajan AT, Obe G, Van Zeeland AA, Palitti F, Meijers M, Verdegaal-Immerzeel.. Molecular mechanism involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutation Research* 69, 293-305 (1980).

Natarajan AT, Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504, 3-16 (2002).

Natarajan AT, Berni A, Marimuthu KM, Palitti F, The type and yield of ionising radiation induced chromosomal aberrations depend on the efficiency of different DSB repair pathways in mammalian cells. *Mutation Research*, 642, 80-85 (2008).

Natarajan AT, Palitti F, DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research*, 657, 3-7 (2008).

Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W, Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40 (2003).

Nowell PC, The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 194, 23-28 (1976).

Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA, Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617-656 (2002).

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Remoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288, 1053-1058 (2000).

Oguchi K, Takagi M, Tsuchida R, Taya Y, Ito E, Isoyama K, Ishii E, Zannini L, Delia D, Mizutani S, Missense mutation and defective function of ATM in a childhood acute leukemia patient with MLL gene rearrangement. *Blood*. 101(9) 3622-3627 (2003).

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

Olive PL, Banath JP, Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Clinical Cytometry (Cytometry Part B)*, 76B, 79-90 (2009).

Pandita TK, Hall EJ, Hei TK, Piatyszek MA, Wright WE, Piao CQ, Pandita RK, Willey JC, Geard CR, Kastan MB, Shay JW, Chromosome end-to-end associations and telomerase activity during cancer progression in human cells after treatment with alpha-particles simulating radon progeny. *Oncogene*, 13(7) 1423-1430 (1996).

Pandita TK, Dhar S, Influence of ATM function on interactions between telomeres and nuclear matrix. *Radiat Res.* 154(2) 133-139 (2000).

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 321 (5897) :1807-1812 (2008).

Paulsen RD, Cimprich KA, The ATR pathway: finetuning the fork. *DNA Repair (Amst.)*, 6, 953-966 (2007).

- Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM, A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895 (2000).
- Pawlik TM, Keyomarsi K, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 59, 928-942 (2004).
- Perry P, Wolff S, New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251(5471) 156-158 (1974).
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G, Mechanisms of DNA double strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagen*, 15, 289-302 (2000).
- Prives C, Hall PA, The p53 pathway. *J. Pathol.*, 187, 112-126 (1999).
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 12(2) 162-169 (2002).
- Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, McGuffog L, Evans DG, Eccles D, Easton DF, Stratton MR, The Breast Cancer Susceptibility Collaboration (UK), Rahman N. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature Genetics* 38, 873 – 875; (2006).
- Revell SH, A new hypothesis for “chromatid” exchanges, in: Bacq A.M, Alexander P. (Eds.), *Proceeding of the radiology Symposium Liege 1954*, Butterworths, London, 243-252 (1955).
- Revell SH, The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionising radiation, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 150, 563-599 (1959).
- Revy P, Buck D, Le Deist F, De Villartay JP, The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv Immunol.* 87 237-295 (2005).
- Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S. HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol.* 85(4) 411-418 (2007).
- Rodrigue A, Lafrance M, Gauthier MC, McDonald D, Hendzel M, West SC, Jasin M, Masson JY, Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo. *The EMBO Journal*, 25, 222-231 (2006).
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273, 5858–5868 (1998).
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM, Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–915 (1999).
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM, Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 9390-9395 (2000).

- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M, Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 23, 5706-5715 (2003).
- Rothkamm K, Lobrich M, Evidence of a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low X-ray doses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 5057–5062, (2003).
- Rotman G, Shiloh Y, ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*. 18(45) 6135-6144 (1999).
- Rouse J, Jackson SP, Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 297, 547–551 (2002).
- Salvesen GS, Dixit VM, Caspase: intracellular signalling by proteolysis. *Cell*, 91, 443-446 (1997).
- Salvesen GS, Duckett, CS, IAP protein: blocking the road to death's door. *Nature*, 3, 401-410 (2002).
- Savage JRK, Classification and relationships of induced chromosomal structural changes, *J. Med. Genet.* 13 103-122 (1975).
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218) 1749-1753 (1995).
- Sax K, Types and frequencies chromosomal aberrations anduced by X-rays. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 9, 93-101(1941).
- Schoonderwaldt H, Joosten E, Gabreëls F, Gabreëls-Festen A, Notermans SL, Korten JJ, Ataxia-telangiectasia (Louis Bar syndrome): with special reference to findings in the peripheral nervous system. *Psychiatr Neurol Neurochir.* 76(6) 459-472 (1973).
- Schwartz JL, Jordan R, Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by p53-dependent apoptosis. *Carcinogenesis*, 18, 201-205 (1997).
- Scott D, Evans HJ, X-ray-induced chromosomal aberrations in vicia faba: changes in response during the cell cycle. *Mutat Res.* 4(5) 579-599 (1967).
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM, Quantitative detection of 125IdU-induced DNA double strand breaks with g-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158, 486–492 (2002).
- Shaulian E, Zauberman A, Ginsberg D, Oren M, Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5581-5592 (1992).
- Shiloh Y, Tabor E, Becker Y, Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. *Exp Cell Res.* 140(1) 191-199 (1982).

Shiloh Y, ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11(1) 71-77 (2001).

Shiloh Y, Kastan MB, ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res.* 83 209-254 (2001).

Shiloh Y, ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 3(3) 155-168 (2003).

Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF, Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature.* 387(6632) 520-523 (1997).

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314, 268-274 (2006).

Soussi T, Dehouche K, Beroud C, p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer : forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 15, 105-113 (2000).

Soutoglou E, Misteli T, Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science*, 320, 1507-1510 (2008).

Smerdon MJ, Lan SY, Calza RE, Reeves R, Sodium butyrate stimulates DNA repair in UV-irradiated normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts. *Biol Chem.* 257 (22), 13441-13447 (1982).

Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM, ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet.* 62(2) 334-345 (1998).

Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM, Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 353(9146) 26-29 (1999).

Starczynski J, Simmons W, Flavell JR, Byrd PJ, Stewart GS, Kullar HS, Groom A, Crocker J, Moss PA, Reynolds GM, Glavina-Durdov M, Taylor AM, Fegan C, Stankovic T, Murray PG, Variations in ATM protein expression during normal lymphoid differentiation and among B-cell-derived neoplasias. *Am J Pathol.* 163(2) 423-432 (2003).

Stenger JE, Tegtmeyer P, Mayr GA, Reed M, Wang Y, Wang P, Hough V, Mastrangelo IA, p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J.* 13, 6011-6020 (1994).

Stern N, Hochman A, Zemach N, Weizman N, Hammel I, Shiloh Y, Rotman G, Barzilai A, Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277(1) 602-608 (2002).

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA, ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64, 2390-2396 (2004).

Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I, Bosykh DA, Burdelya LG, Macklis RM, Skaliter R, Komarova EA, Gudkov AV, Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol.* 2(9) 474-479 (2006).

Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP, MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123, 1213-1226 (2005).

Stucki M, Jackson SP, gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair*, 5(5) 534-543 (2006).

Sugawara N, Ira G, Haber JE, DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5300-5309 (2000).

Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD, A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(37) 13182-13187 (2005).

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446 (1999).

Takagi M, Tsuchida R, Oguchi K, Shigeta T, Nakada S, Shimizu K, Ohki M, Delia D, Chessa L, Taya Y, Nakanishi M, Tsunematsu Y, Bessho F, Itoyama K, Hayashi Y, Kudo K, Okamura J, Mizutani S, Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood.* 103(1) 283-290 (2004).

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S, Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO Journal*, 17, 5497-5508 (1998).

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

Tamburini BA, Tyler JK, Localized histone acetylation and deacetylation triggered by the homologous recombination pathway of double-strand DNA repair. *Molecular Cell Biology*, 25, 4903-4913 (2005).

Tan TL, Kanaar R, Wyman C, Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination. *DNA Repair*, 2, 87-94 (2003).

- Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z, Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 71, 648-661 (2007).
- Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF, Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*. 87(2) 423-438 (1996).
- Taylor AM, Byrd PJ, Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol*, 58, 1009-1015 (2005).
- Taylor WR, Stark GR, Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, 1803-1815 (2001).
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengüt S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P, Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet*. 64(6) 617- 1631 (1999).
- Thut C, Chen JL, Klemm R, Tijian T, p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF1140 and TAF1160. *Science*, 267, 100-104 (1995).
- Toledo LI, Murga M, Gutierrez-Martinez P, Soria R, Fernandez-Capetillo O, ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes and Development*, 22, 297-302 (2008).
- Tornaletti S, Hanawalt PC, Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimic*, 81, 139-148 (1999).
- Traven A, Heierhorst J, SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *Bioessays*. 27(4) 397-407 (2005).
- Turenne GA, Paul P, Laflair L, Price BD, Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene*. 20(37) 5100-5110 (2001).
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y, Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. 22(20) 5612-5621(2003).
- Vayssière JL, Petit PX, Rister Y, Mignotte B, Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 22, 91 (24), 11752-11756 (1994).
- Van Attikum H, Gasser SM, The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Molecular Cell Biology*, 6, 757-765 (2005).
- Van Dick E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC, Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single strand annealing. *EMBO J. Rep.*, 2, 905-909 (2001).
- Vousden KH, Lu X, Live or let die: cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 594-604 (2002).

Wang H, Zeng ZC, Bui TA, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Iliakis G, Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 20, 2212-2224 (2001).

Wang H, Wang M, Wang H, Bocker W, Iliakis G, Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell. Physiol.* 202, 492-502 (2005).

Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, Elledge SJ, Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*, 316, 1194-1198 (2007).

Ward IM, Chen J, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276, 47759–47762 (2001).

Wasco MJ, Pu RT, Utility of antiphosphorylated H2AX antibody (gammaH2AX) in diagnosing metastatic renal cell carcinoma. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 16, 349-356 (2008).

Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M, Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene*. 14(16) 1911-21 (1997).

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

West MH, Bonner WM, Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 19, 3238-3245 (1980).

Winegar RA, Preston RJ, The induction of chromosome aberrations by restriction endonucleases that produce blunt-end or cohesive-end double-strand breaks. *Mutation Research*, 225, 49-53 (1988).

Wojcik A, Opalka B., Obe G, Analysis of inversions and sister chromatid exchanges in chromosome 3 of human lymphocytes exposed to X-rays. *Mutagenesis*, 14, 633-637 (1996).

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR, Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-303 (1980).

Woods DB, Vousden KH, Regulation of p53 function. *Exp. Cell. Res.* 264, 56-66 (2001).

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyansky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 318(5853) 1108-1113 (2007).

Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S, Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, 311(5764) 1141-1146 (2006).

- Yang DQ, Kastan MB, Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol*, 2(12) 893-898 (2000).
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ, The transcriptional program following p53 activation. *Genes Dev*. 14, 981-993 (2000).
- Zhivotovsky B, Burgess DH, Orrenius S, Proteases in apoptosis. *Experientia*. 52 (10-11) 968-978. (1996).
- Zhivotovsky B, Kroemer G, Apoptosis and genomic instability. *Nature*, 5, 752-762 (2004).
- Zhou BB, Elledge SJ, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408, 433–439 (2000).
- Zhou C, Li Z, Diao H, Yu T, Zhu W, Dai Y, Chen FF, Yang J, DNA damage evaluated by gammaH2ax foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutation Research*, 604, 8-18 (2006).
- Zhu X, Yu QS, Cutler RG, Culmsee CW, Holloway HW, Lahiri DK, Mattson MP, Greig NH, Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2, 3, 4, 5, 6, 7- hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2, 3, 4, 5, 6, 7- hexahydrobenzoxazole derivatives. *J. Med. Chem.* 45 5090-5097 (2002).

PARTECIPAZIONE A CORSI E CONVEGNI

- X Congresso FISV Riva del Garda, 24-27 Settembre 2008.
- "Advanced Lectures on Protection of Humans and their Environment against Ionising Radiation", Bad Honnef (Germany), 9-18 Febbraio 2009 organizzato da *Helmutz Zentrum Munchen*.
- "Corso Cortona", 4-6 Giugno 2008, organizzato dall'*Associazione Genetica Italiana*.
- "New Pesticide Regulation: Innovative aspects and Emerging Problems", Joint Meeting SITMA-SITOX, Rome (Italy), 5 Ottobre 2010, organizzato dall'*Istituto Superiore di Sanità*.
- Simposio SIMA 2010, "Instabilità genetica e riparazione del DNA: nuovi paradigmi per la ricerca traslazionale.", Istituto Superiore di Sanità, Roma 15-16 Novembre 2010.

PUBBLICAZIONI

Meschini R., Berni A., Ortenzi V., Mancinelli P., Palitti F., "Relation between DNA repair, apoptosis and chromosomal aberrations in presence of pifithrin- α , an inhibitor of p53", *Mutation Research*, 2010 Aug 14;701(1):, pp. 92-97. Epub 2010 Mar 27.

Ortenzi V., Meschini R., Berni A., Mancinelli P., Palitti F., "Studies on X-rays-induced apoptosis and chromosomal damage in G2 human lymphocytes in presence of an inhibitor of p53, pifithrin- α " " , *Mutation Research*, 2010. (submitted).

Ortenzi V., Berni A., Chessa L. , Palitti F. and Meschini R., "Effect of pifithrin- α (PFT- α), a p53 inhibitor, in AT cell lines and its involvement in genomic instability", poster presentato a "Advanced Lectures on Protection of Humans and their Environment against Ionising Radiation", Bad Honnef (Germany), 9-18 Febbraio 2009 (poster).

Ortenzi V., Berni A., Chessa L. , Palitti F. and Meschini R., "Effect of p53 inhibitor PFT- α on G2 cell-cycle checkpoint in AT cell lines, and its involvement in genomic instability", FISV 10th National Congress, 24-27 Settembre 2008 (poster).

Mancinelli P., Palitti F., Ortenzi V., Meschini R., "Inhibition of p53-mediated apoptosis promotes the enhancement of chromosomal aberrations in G₀ irradiated lymphocytes", FISV 8th National Congress, 2006 (poster).

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Fabrizio Palitti per avermi accolto nel Suo Laboratorio dove ho vissuto un'esperienza altamente formativa, dandomi un'opportunità di crescita sia scientifica che personale. Lo ringrazio inoltre per avermi consentito un incontro umano e scientifico con il Prof. A.T. Natarajan.

Ringrazio la Prof.ssa Roberta Meschini per la collaborazione, la comprensione e l'incoraggiamento quotidiano.

Per l'aiuto nello svolgimento degli esperimenti ringrazio Flavia e Luisa, la "calabrona" che sta avanti.

Inoltre, vorrei ringraziare tutte le persone del Laboratorio di Citogenetica Molecolare e Mutagenesi per i momenti divertenti e collaborativi che abbiamo trascorso insieme: Andrea: "Di tutto un po' " è un po' anche tua; Angelo, il "Supertecnico" che mi ha dedicato la canzone; e Manuela; Gaetano, Silvia, Claudia, Pounami (my english Teacher), Sai, Wilner, il nostro "capro espiatorio", Katherzyna, Tushara, Vivek, Paola, Manuela, Serena,, il "corgà" Josè, Rosaria che è contenta di pensare come me.

Di Luca detto "Pavo" che dire?!.....Grazie!!!!

Un grazie particolare a Raffaella e alla nostra amicizia di conforto, speriamo vicendevole!

E poi grazie a papà e Floriana che mi sopportano ancora, a Luciana (speriamo che abbiamo imparato la formattazione!), il compare Francesco, Giulia; e agli amici Luana, Francesca, Katiusia e Marco.