



DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA
(XXIII Ciclo)**

“Ruolo della riparazione del danno al DNA da parte di agenti genotossici.”

BIO/18

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi

Tutor: Prof. Fabrizio Palitti

Dottorando:

Dott.ssa Katarzyna Agnieszka Kobos

Tutor: Dott. Roberto Amendola

a Giovanni

RIASSUNTO

Numerose sostanze presenti nell'ambiente sono di natura genotossica, in quanto hanno la capacità di interagire con il materiale genetico, per via diretta o mediante attivazione metabolica. Tale interazione può portare alla modifica del materiale genetico tramite l'alterazione strutturale della molecola del DNA e si può manifestare come addotti, alterazione chimica delle basi azotate, legami crociati e rotture del singolo e del doppio filamento. Questi tipi di alterazioni vengono generalmente riparati da diversi sistemi cellulari di riparazione. Mentre le lesioni che non vengono riparate correttamente possono condurre ad anomalie del materiale genetico quali aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche e neoplasie.

Il progetto di questo dottorato di ricerca aveva come obiettivo generale quello di indagare sulla risposta cellulare al danno al DNA da parte di agenti genotossici.

Nel primo anno di dottorato questo studio si è focalizzato sul ruolo della riparazione del danno indotto da un agente mutageno, l'acetaldeide (AA) nelle cellule di ovario di Hamster cinese (CHO) difettive nei meccanismi di riparazione. In particolare, lo scopo di questa ricerca è stata la verifica dell'effettiva induzione dei *cross-links* da parte dell'acetaldeide utilizzando il *Comet Assay* modificato per la risoluzione dei *cross-links* e la caratterizzazione del tipo di *cross-links* indotto da questa sostanza.

Inoltre, le linee di CHO difettive nel *Nucleotide Excision Repair* (NER), *Transcription Coupled Repair* (TCR) e nella riparazione dei *cross-links* (Fanconi like) sono state analizzate per il danno cromosomico: aberrazioni cromosomiche (CAs) e scambi tra cromatidi fratelli (SCEs). I risultati ottenuti dimostrano che l'acetaldeide induce *cross-links* in modo dose dipendente. Il tipo di *cross-links* indotto principalmente è il DNA-proteina. Dai nostri risultati si evince che il *cross-link* DNA-proteina produce principalmente CAs. Per quanto riguarda invece la relazione tra induzione di *cross-links* e SCEs i nostri dati indicano che dipende dal tipo di *cross-link* indotto.

Le linee cellulari più sensibili all'acetaldeide sono le difettive nella riparazione dei *cross-links* (Fanconi like; KO40) e le difettive in NER (UV4).

Questo lavoro è stato pubblicato presso una rivista internazionale Mutation Research: Lorenti Garcia et al., 2009, "Relationship between DNA lesions, DNA repair and

chromosomal damage induced by acetaldehyde”.

Nei due anni successivi, poiché sono risultata vincitrice della borsa di studio "ENEA International Fellowship Programme 2008", con tutor assegnato il dott. Roberto Amendola (Laboratorio in Biotecnologie e Scienze Biomediche, BIOTEC MED del Centro Ricerche ENEA Casaccia), abbiamo valutato le risposte al danno del DNA utilizzando basse dosi di radiazioni ionizzanti nelle linee cellulari CHO difettive nei diversi sistemi di riparazione nelle quali viene indotto un danno sub-letale cronico provocato da aumento dello stress ossidativo tramite sovraespressione dell'enzima Spermina Ossidasi (SMO). La SMO è un enzima presente in tutti gli organismi superiori, in grado di catabolizzare la Spermina (SPM) a Spermidina (SPD) con produzione di perossido di idrogeno. La sovraespressione della SMO ha indotto una radiosensibilità a dosi relativamente alte di radiazioni ionizzanti in neuroblastoma (NB) di topo mediante un aumento dei livelli di stress ossidativo a carico del DNA (Amendola et al., 2005; Bianchi et al., 2007).

In relazione a questi risultati si è voluto verificare se la sovraespressione di SMO potesse alterare il danno genotossico in linee cellulari difettive per i meccanismi di riparazione *Nucleotide Excision Repair* e *Base Excision Repair*. I risultati ottenuti sono controversi. Se da un punto di vista sperimentale non abbiamo potuto determinare nessuna differente risposta alle dosi ed alle finestre temporali utilizzate, da un punto di vista della risposta dei sistemi biologici alle basse dosi di radiazioni ionizzanti, questa assenza di risposta può essere interpretata come un'ulteriore indicazione della presenza di risposte non associabili solo e soltanto al danno al DNA.

SUMMARY

In the environment many substances have a genotoxic character as they are able to interact with genetic material either directly or through metabolic activation. This interaction can lead to the modification of genetic material through structural alteration of the DNA molecule and can be expressed as adducts, chemical alteration of nitrogen bases, *cross-links* and break of the single and double strand. Generally, these types of alterations can be repaired by various cellular repair systems. However, the lesions that are not repaired correctly can lead to abnormalities of the genetic material such as chromosomal aberrations, gene mutations and neoplasias.

The aim of the present PhD thesis was to investigate the cellular response to DNA damage caused by genotoxic agents.

In the first year, the research was focused on the role of repairing the damage induced by a mutagen agent, acetaldehyde (AA), in the repair deficient Chinese hamster ovary (CHO) cells. In particular, the aim of this research was to verify the effective induction of *cross-links* by acetaldehyde using the *Comet Assay* modified for the resolution of the *cross-links* and characterization of the *cross-link* type induced by this substance.

In addition, the CHO lines with defect in *Nucleotide Excision Repair* (NER), *Transcription Coupled Repair* (TCR) and in the *cross-links* (Fanconi like) repairing were analyzed for the chromosomal damage: chromosomal aberrations (CAs) and sister chromatid exchanges (SCEs).

The results show that the induction of the *cross-links* by acetaldehyde is a dose-dependent. DNA-protein is the prevalent type of the induced *cross-links*. Moreover, the results indicate that the *cross-link* DNA-protein produces mainly CAs. The relationship between induction of *cross-links* and SCEs depends on the type of *cross-link* induced.

The cell lines most sensitive to acetaldehyde are those with defect in *cross-links* (Fanconi like; KO40) repair and defect in NER (UV4).

This work was published in an international journal, Mutation Research: Lorenti Garcia et al., 2009, "Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde."

The following two-year research was performed in the frame of the "ENEA International

Fellowship Programme 2008", with the assigned tutor dr. Roberto Amendola (Laboratory of Biotechnology and Biomedical Sciences, BIOTEC MED, ENEA Casaccia Research Center). We evaluated the responses to DNA damage caused by low doses of ionizing radiation in repair deficient CHO cell lines. Thus, a chronic sublethal damage caused by increase of the oxidative stress through overexpression of the spermine oxidase (SMO) enzyme is induced in the repair deficient CHO cell lines. The SMO is an enzyme found in all higher organisms, that can catabolize the spermine (SPM) to spermidine (SPD) producing the hydrogen peroxide. The overexpression of SMO induced the radiosensitivity at relatively high doses of ionizing radiation in mouse neuroblastoma (NB) by increasing DNA oxidative stress levels (Amendola et al., 2005, Bianchi et al., 2007).

In relation to these results, the possible involvement of the overexpression of SMO in alteration of the genotoxic damage in cell lines defective in repair mechanisms such as *Nucleotide Excision Repair* and *Base Excision Repair* was investigated. The results are not explicit. From the experimental point of view, no significantly different response to various doses applied over the time was determined. However, considering the response of the biological systems to the low doses of the ionizing radiations, the absence of the significant response suggests the involvement of another kind of the response associated not only to the DNA damage.

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	1
AGENTI GENOTOSSICI	2
Agenti chimici	2
Agenti fisici	2
RIPARAZIONE DEL DNA	3
TIPI DEL DANNO AL DNA	3
DANNO CROMOSOMICO: ABERRAZIONI CROMOSOMICHE E SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI	6
Aberrazioni di tipo cromosomico	7
Aberrazioni di tipo cromatidico	7
Interscambio di DNA tra cromatidi fratelli	10
RISPOSTA AL DANNO, SISTEMI DI RIPARAZIONE	12
CROSS-LINKS E LORO RIPARAZIONE	21
Riparazione di <i>interstrand cross-link</i>	21
Riparazione di <i>interstrand cross-link</i> nei mammiferi	25
RELAZIONE TRA DANNO AL DNA, RIPARAZIONE DEL DNA E DANNO CROMOSOMICO INDOTTO DALL'ACETALDEIDE	27
OBIETTIVO DELLA RICERCA	27
ALCOL E NEOPLASIE	28
ACETALDEIDE	31
MATERIALI E METODI	33
COLTURE CELLULARI	33
REAGENTI CHIMICI E TRATTAMENTO DELLE LINEE CELLULARI	34
ANALISI CITOGENETICA DELLE CAs E SCEs	34
DETERMINAZIONE DEI <i>CROSS-LINKS</i> TRAMITE <i>COMET ASSAY</i>	35
ANALISI STATISTICA	38
PUBBLICAZIONE: Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde	39
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	46

RELAZIONE TRA DANNO AL DNA, RIPARAZIONE DEL DNA E DANNO OSSIDATIVO INDOTTO DALLA SPERMINA OSSIDASI	49
STRESS OSSIDATIVO	49
Radicali ossidanti e loro vie di produzione	49
Danni provocati dalle specie radicali ossidanti	50
Meccanismi di difesa contro l'ossidazione	51
Equilibrio pro/antiossidanti	54
MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DANNO OSSIDATIVO AL DNA	55
EFFETTI BIOLOGICI DAL DANNO OSSIDATIVO INDOTTO DALLE RADIAZIONI IONIZZANTI	57
RISPOSTA CELLULARE ALLE ALTE E BASSE DOSI DI RADIAZIONI	60
POLIAMMINE	64
METABOLISMO DELLE POLIAMMINE	65
Omeostasi delle poliammine	65
RUOLO DELLE POLIAMMINE NELLE CELLULE	69
Poliammine e proliferazione cellulare	70
Poliammine e morte cellulare	71
SPERMINA OSSIDASI	73
METABOLISMO DELLA SPERMINA, INFIAMMAZIONE E CANCRO	74
OBIETTIVO DELLA RICERCA	76
MATERIALI E METODI	77
PLASMIDI	77
Preparazione di cellule competenti	77
Trasformazione in batteri competenti	77
Maxi-preparazione di DNA plasmidico	78
Digestione con enzimi di restrizione	78
Elettroforesi del DNA su gel di agarosio	79
COLTURE CELLULARI	79
TRASFEZIONE DELLE LINEE CELLULARI CON VETTORE RETROVIRALE	80
VALUTAZIONE DEL GRADO DI INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA mSMO α	81
Estrazione RNA _{tot} dalle cellule	81
Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA	81
Reazione di Trascrizione inversa, RT-PCR	82
TRATTAMENTO DELLE COLTURI CELLULARI ED ANALISI	83
Analisi citofluorimetrica della produzione endogena dei ROS	84
Test della vitalità e crescita cellulare: MTT Assay	84

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	85
Frammentazione del DNA: saggio TUNEL	85
Fosforilazione dell'istone H2AX	86
Saggio della catalasi	86
Valutazione del danno ossidativo al DNA: <i>Comet Assay</i>	87
Analisi statistica	88
RISULTATI	89
ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI mSMO α MEDIANTE RT-PCR	89
VITALITA' E PROLIFERAZIONE CELLULARE	90
SAGGIO CITOFLUORIMETRICO DELLA PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE	91
APOPTOSI	91
ANALISI DELLA PRODUZIONE ENDOGENA DEI ROS	93
ANALISI DELL'OSSIDAZIONE DEL DNA	95
ANALISI DELLA CATALASI	99
ANALISI DELL'ISTONE H2AX	99
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	101
BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUZIONE GENERALE

Il mantenimento dell'integrità genomica è di grande importanza per garantire una continuità della progenie sia al livello cellulare che della specie. Il genoma è costantemente esposto ad una varietà di agenti che danneggiano il DNA, quali per esempio, radiazioni solari, sostanze chimiche genotossiche, ed anche radicali liberi dell'ossigeno che possono derivare dal normale metabolismo cellulare. Pertanto possono generarsi vari tipi di lesioni al DNA che se non vengono corrette pregiudicano la vita della cellula causando mutazioni, rotture cromosomiche o altri tipi di alterazioni (epigenetiche) al DNA che a loro volta conducono ad instabilità genomica, predisposizione al cancro, ed in alcuni casi, alla morte cellulare (Kastan et al., 2004).

Per combattere tale rischio, le cellule hanno sviluppato molteplici meccanismi di difesa noti come la "risposta al danno al DNA" (Kastan et al., 2004; Lukas et al., 2004).

Attraverso questi meccanismi la cellula può:

- fermare il ciclo cellulare e riparare il DNA danneggiato
- continuare a funzionare nonostante le lesioni al DNA, aumentando il rischio di introdurre altre lesioni
- iniziare il programma apoptotico che conduce a morte cellulare

La prima ipotesi è la più appropriata e per favorire questo meccanismo di risposta le cellule hanno sviluppato sia sistemi di controllo della proliferazione cellulare, che rallentano o arrestano il ciclo cellulare, sia importanti meccanismi di riparazione del DNA in grado di riparare numerosi tipi di lesioni al genoma (Hoeijmakers, 2001; Mitchell et al., 2003).

AGENTI GENOTOSSICI

Nel corso della vita cellulare, il DNA è costantemente esposto a diversi tipi di agenti genotossici che possono essere classificati a seconda della loro natura fisica (radiazione ultravioletta e radiazione ionizzante) o chimica (sostanze mutagene, alchilanti intercalanti), della loro origine (esogena ed endogena) e dal tipo di lesione che inducono (modificazioni delle basi, legami covalenti, rotture del filamento, etc.) (Hoeijmaekers, 2001).

Numerose sono le sostanze esogene che possono indurre danno al DNA.

Agenti chimici

Gli agenti mutageni chimici hanno normalmente proprietà elettrofile ed alcuni di essi, come gli analoghi delle basi, gli agenti alchilanti e intercalanti possono interagire con il DNA per via diretta. Altre sostanze, come gli idrocarburi policiclici aromatici, pur non essendo reattive possono essere trasformate in derivati reattivi attraverso diverse vie metaboliche. I mutageni indiretti invece hanno la capacità di formare specie reattive dell'ossigeno o che interagiscono con la replicazione, la sintesi o il mantenimento della struttura del DNA. Alcuni di questi agenti, come la mitomicina C, sono utilizzati come farmaci antineoplastici.

Agenti fisici

L'azione degli agenti fisici sugli esseri viventi è indipendente dal metabolismo e dalla complessità dell'organismo esposto. Gli agenti fisici più noti sono le radiazioni ionizzanti, tra cui protoni e raggi α che agiscono direttamente sulla molecola di DNA causando la ionizzazione o l'eccitazione degli atomi che la formano. Al contrario nell'azione indiretta, tipica delle radiazioni elettromagnetiche ad alto contenuto energetico (raggi X e gamma), le molecole sono danneggiate da altre molecole precedentemente ionizzate direttamente. In questo tipo di meccanismo, le radiazioni agiscono attraverso la produzione di radicali liberi in grado di diffondere attraverso la cellula e raggiungere e danneggiare le molecole biologicamente attive. I danni indotti possono essere di vario tipo: ossidazione delle basi azotate, rotture a singolo e a doppio filamento, "crosslinks" inter- e intra-filamento, "crosslinks" tra DNA e proteine, frammentazione degli anelli di desossiribosio.

Gli agenti genotossici causano direttamente o indirettamente danni al DNA. Possono alterare la struttura del DNA, e se tali alterazioni non vengono riparate, possono portare a mutazioni e induzione dell'insorgenza di cancro.

RIPARAZIONE DEL DNA

La stabilità del genoma di ogni essere vivente dipende dalle capacità di tramandare il proprio patrimonio genetico alla sua progenie. Tale risultato è ottenuto grazie all'azione incessante di enzimi coinvolti nella riparazione dei danni al DNA. La riparazione del DNA avviene attraverso un complesso meccanismo in grado di ripristinare la struttura del DNA danneggiato. Questa riparazione deve essere correlata con la replicazione, la trascrizione ed il ciclo cellulare.

Le cellule possono tollerare il danno senza che vengano pregiudicate le loro funzionalità fino ad un valore soglia, oltre il quale le lesioni non sono più riparabili e le cellule vanno in apoptosi.

Molteplici patologie, ma anche instabilità genomica, neurodegenerazione, invecchiamento precoce, immunodeficienza e predisposizione alle neoplasie sono causati di frequente da difetti nella riparazione del DNA, a loro volta dovuti alle mutazioni dei geni che codificano le proteine del riparo.

TIPI DEL DANNO AL DNA

Il DNA è costantemente esposto a diversi tipi di fattori che lo danneggiano, essi possono avere un'origine esogena o endogena. Tra i fattori esogeni, che più frequentemente causano lesioni al DNA, vanno annoverate le radiazioni ionizzanti e i mutageni chimici, mentre i fattori endogeni più noti sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Esistono diversi tipi di lesioni al DNA:

- La lesione dovuta all'eliminazione delle basi azotate in un sito specifico, purina o pirimidina, e la nascita di un sito denominato abasico. Tali siti apurinici/apirimidinici (AP) possono generarsi in modo spontaneo oppure nel corso del normale processo di riparazione del DNA (Lindahl 1993). I siti AP sono dovuti soprattutto all'azione dei

ROS, che colpendo lo scheletro della molecola di DNA, possono rilasciare basi azotate.

- La lesione dovuta all'interazione tra la molecola di DNA e una molecola endogena o esogena, porta allo sviluppo di un addotto di Lewis. Questo addotto stabile, include un legame dativo (o di coordinazione), che in condizioni fisiologiche ha sufficiente energia per essere reputato irreversibile. Questo tipo di lesione sembra essere connesso alla formazione di neoplasie (Li et al., 1999).
- La lesione originata dalla generazione di complessi DNA-proteina è detta *cross-link* DNA-proteina. Tale lesione è solitamente dovuta a vari agenti chimici come ad esempio l'arsenico, molti dei quali sono noti cancerogeni, ed anche da droghe con azione citostatica come il cisplatino. Questo tipo di danni è in grado di interferire con i processi di trascrizione e replicazione del DNA.
- L'ossidazione delle basi di guanina e adenina. La principale base premutagena dovuta allo stress ossidativo è la 8-oxo-7,8- diidro-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG), che può appaiarsi con l'adenina (A) (Michaels et al., 1991). Se essa non viene rimossa dal DNA, la replicazione della sequenza danneggiata porta alla trasversione G→T (Nakabeppu et al., 2004). Un altro meccanismo di mutagenesi dell'8-oxo-dG è l'incorporazione di questa base modificata, del pool di nucleotidi, nella posizione complementare all'adenina durante la replicazione o la riparazione. Tale tipo di incorporazione errata conduce ad una trasversione A→G attraverso l'attivazione del pathway di riparazione dei *mismatch*. Durante tale meccanismo la A complementare all'8-oxo-dG viene rimossa e sostituita con la C. Questa copia di basi viene riparata, in seguito, dal BER che rimuove l'8-oxo-dG opposta a C e la sostituisce con G (Tsuzuki et al., 2001).
- La rottura dello scheletro di deossiribosio-fosfato, che è l'elemento costitutivo della doppia elica, è considerata la lesione più rilevante dal punto di vista genotossico, perché è in grado di interrompere la continuità della molecola di DNA.

Si possono distinguere due tipologie di rottura, quelle a singolo filamento (*Single Strand Breaks*, SSBs) e quelle a doppio filamento (*Double Strand Breaks*, DSBs).

Migliaia di rotture a singolo filamento compaiono quotidianamente nelle cellule e se non riparate adeguatamente possono arrestare i processi di trascrizione e replicazione e condurre alle ancor più dannose rotture a doppio filamento. Le rotture a singolo filamento del DNA si formano a causa di agenti endogeni o esogeni, che

colpendo scheletro di deossiribosio-fosfato del DNA, tagliano il legame fosfodiesterico creando una discontinuità nella doppia elica.

L'esito di questo processo è la creazione di estremità libere a singolo filamento, che di solito contengono terminazioni non canoniche, ad esempio i SSBs prodotte dall'azione dei ROS o dalle radiazioni ionizzanti, quasi sempre contengono gruppi monofosfato o fosfoglicolato (Fortini et al., 2007). I SSBs possono essere generati anche indirettamente nel corso della riparazione del danno al DNA come conseguenza di una scorretta elaborazione delle basi azotate, ad esempio nella rimozione dei siti abasici o le basi ossidate.

Tra le diverse lesioni al DNA, la rottura della doppia elica è considerata la lesione più grave per la stabilità genomica. I DSBs possono avvenire in seguito all'esposizione a radiazioni ionizzanti, ma possono essere causati anche dai radicali liberi prodotti dal metabolismo cellulare. Tali lesioni si possono generare dalla riparazione dei SSBs o dai danni alle basi, durante il processo di ricombinazione meiotica e il riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline (Gellert et al., 2002). I DSBs si formano anche quando le forche replicative dedite alla duplicazione del DNA, vengono in contatto con lesioni sulle basi azotate che ne bloccano l'avanzamento lungo il cromosoma. In questo modo si crea uno stallo che conduce al collasso della forza replicativa e alla formazione di una rottura a doppio filamento. Inoltre si è visto (Guirouilh-Barbat et al., 2008) che i DSBs possono essere generati anche durante la riparazione associata alla trascrizione TCR (*Transcription Coupled Repair*), e che tale meccanismo può impegnare geni associati alla riparazione delle rotture a doppio filamento.

I DSBs se non riparati, provocano molteplici alterazioni genetiche, come delezioni, traslocazioni, perdita di interi cromosomi.

DANNO CROMOSOMICO: ABERRAZIONI CROMOSOMICHE E SCAMBI TRA CROMATIDI FRATELLI

L'azione espletata dai diversi agenti genotossici sul DNA cellulare, che rappresenta la molecola bersaglio, varia a seconda della loro natura nonché dello stadio in cui si trova la cellula bersaglio.

Le aberrazioni cromosomiche (CAs) si dividono in numeriche e strutturali, nel primo caso le variazioni avvengono nel numero di cromosomi, mentre nel secondo caso le alterazioni riguardano morfologia.

Le aberrazioni cromosomiche strutturali derivano dalla rottura diretta del DNA, dalla replicazione di un filamento stampo danneggiato, dall'inibizione della sintesi del DNA e da altri meccanismi. Le mutazioni cromosomiche numeriche scaturiscono da una modificazione del numero di cromosomi in seguito ad alterazioni nella divisione cellulare. Le cellule con un ridotto numero di cromosomi vengono chiamate aneuploidi, mentre sono dette poliploidi quelle con un numero accresciuto rispetto al normale corredo cromosomico.

Tra gli agenti in grado di indurre un danno diretto al DNA vi sono le radiazioni ionizzanti. Essi, chiamati clastogeni S-indipendenti, inducono due tipi di aberrazioni. Il primo di tipo cromosomico (che coinvolge entrambi i cromatidi) viene indotto nelle cellule che si trovano in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare, invece il secondo, di tipo cromatidico, nelle cellule in fase S/G_2 (Albertini, 2000). La maggior parte dei mutageni chimici e le radiazioni UV agiscono invece come clastogeni S-dipendenti ed attuano il danno al DNA quando la cellula si trova in fase di sintesi. Le aberrazioni indotte da questi agenti emergono come errori di replicazione del DNA, in un processo definito "*misreplication*" (Evans et al., 1977) e formano aberrazioni di tipo cromatidico.

A seconda del tipo di agente genotossico e a seconda della fase del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule durante l'esposizione, le aberrazioni cromosomiche possono essere suddivise in base all'unità strutturale coinvolta nel cambiamento in:

- ☉ cromosomiche, vengono indotte nella fase G_1 del ciclo cellulare, interessano rotture e/o scambi che coinvolgono entrambi i cromatidi,
- ☉ cromatidiche, si formano in fase S o G_2 , cioè durante o dopo la replicazione dei cromosomi anche se la lesione al DNA è avvenuta in fase G_1 , ed in metafase appaiono come rotture e/o scambi che interessano un singolo cromatidio,

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

Aberrazioni di tipo cromosomico comprendono:

Intrascambi cromosomici

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

Interscambi cromosomici

- ↳ Traslocazioni reciproche visibili soltanto attraverso il bandeggio,
- ↳ Dicentrici o cromosomi policentrici si creano da scambi tra due o più cromosomi che si uniscono a formare cromosomi con due o più centromeri. Di solito sono accompagnati da frammenti acentrici uno per ogni dicentrico.

Aberrazioni di tipo cromatidico comprendono:

Intrascambi cromatidici

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

Interscambi cromatidici

- ↳ Scambi simmetrici, riguardano uno scambio tra due o più cromosomi. Il più semplice che si può osservare appare in una configurazione a quattro braccia definito “quadriradiale”,
- ↳ Scambi asimmetrici, si tratta di uno scambio tra due o più cromosomi che danno luogo ad un cromatidio dicentrico.

Un particolare tipo di aberrazioni cromatidiche riguarda la formazione dei “triradiali” che sono un’aberrazione a tre rotture che derivano dall’interazione di uno scambio isocromatidico con una delezione terminale e sono poco frequenti.

Le aberrazioni possono essere classificate in instabili o stabili a seconda della loro capacità di persistere nella progenie cellulare.

Le aberrazioni instabili consistono di dicentrici, rings, acentrici o altri riarrangiamenti asimmetrici, e possono portare a morte cellulare se il DNA e, di conseguenza, i cromosomi si frammentano fino ad andare incontro ad apoptosi. Le cellule che sopravvivono, pur con aberrazioni cromosomiche, danno vita ad una progenie con delezione di materiale genetico; questa di norma non viene tollerata in cellule che vanno incontro a divisione, a meno che non si tratti di cellule trasformate.

Le aberrazioni stabili, trasmissibili alla progenie cellulare, consistono in traslocazioni bilanciate, inversioni, e altri riarrangiamenti simmetrici, ed hanno più o meno la stessa frequenza nel formarsi degli altri riarrangiamenti asimmetrici (Figura 1).

Cromosomi originari	Rotture	Cromosomi finali	Aberrazione
			traslocazione semplice
			traslocazione reciproca eucentrica
			traslocazione reciproca aneucentrica
			shift
			trasposizione
			delezione terminale
			delezione interstiziale
			cromosoma ad anello
			inversione pericentrica
			inversione paracentrica
			isocromosoma

Figura 1: Principali tipi di aberrazioni cromosomiche (Castello & Silvestri, 1999).

Interscambio di DNA tra cromatidi fratelli

Gli SCEs (Sister Chromatid Exchanges) sono generati dallo scambio reciproco di DNA tra due cromatidi fratelli in seguito alla replicazione. Tale processo accade normalmente nelle cellule, ma il suo meccanismo non è del tutto noto. Il numero degli SCEs nelle cellule normali umane varia a seconda della tipologia delle cellule prese in considerazione. Il range per cellula varia da 2 a 20 e mediamente è compreso tra 5 e 8 SCEs (Carrano, 1980). Il numero degli SCEs varia in base a fattori esogeni ed endogeni, ed è diviene elevato con l'esposizione ad agenti genotossici.

Molto probabilmente il fenomeno è associato al processo di riparazione del DNA mediante ricombinazione omologa (HR) che si verifica quando la bolla di replicazione incontra un'interruzione in uno dei due filamenti stampo di DNA. Ogni composto o situazione che causa l'incremento di rotture a singolo filamento del DNA induce SCEs (Wilson & Thompson, 2007).

Gli SCEs non sono altro che una sottoclasse di aberrazioni cromosomiche, di tipo cromatidico che sono causate da agenti mutageni S-dipendenti, quali gli agenti alchilanti e le radiazioni UV, perchè necessitano di agire durante la fase S del ciclo cellulare. Invece gli agenti genotossici S-indipendenti, come ad esempio i raggi X, non incrementano il numero degli SCEs. La persistenza del danno che porta alla formazione di SCEs è di minor durata, per cui sono considerati indicatori sensibili del danno cromosomico e quindi possono essere utili per studiare l'effetto mutageno di composti chimici e ambientali mettendo in evidenza l'avvenuto danno al DNA.

La capacità degli agenti alchilanti e delle proflavine di indurre gli SCEs è stata descritta da Kato (1974), attraverso l'autoradiografia. L'alcol, il fumo ed alcuni inquinanti provocano un incremento degli scambi tra cromatidi fratelli (Kao-Shan et al., 1987; Lazutka et al., 1992). Anche l'età è un fattore che fa aumentare la frequenza di scambi cromatidici, raggiungendo il culmine tra i 30 e i 40 anni (De Arce, 1981).

Fu Taylor il primo, nel 1958, a riscontrare gli scambi tra cromatidi fratelli mentre coltivava cellule della *Bellevalia romana* per due cicli replicativi in presenza di timidina triziata (3H) e per successivi cicli senza trizio. Ricorrendo all'autoradiografia egli si accorse non solo di una differente quantità di incorporazione tra i due cromatidi ma anche degli scambi di frammenti di DNA tra i cromatidi fratelli.

In seguito fu scoperto che l'incorporazione della 5'bromodeossiuridina (BrdUrd), un analogo

della timina, per due cicli di replicazione combinata alla colorazione con Bisbenzimidide (Hoechst 33258) colorava in modo differenziale i cromatidi permettendo di evidenziare gli SCEs (Latt,1973). La replicazione del DNA essendo, infatti, semiconservativa, dopo un ciclo di replicazione solo un filamento di DNA dei due cromatidi di ciascun cromosoma metafaseico avrà incorporato la 5'BrdUrd, mentre al secondo ciclo replicativo uno dei cromatidi sarà monosostituito e l'altro risulterà bisostituito. In tal modo tutti i filamenti avranno l'analogo della timina.

La 5'BrdUrd smorza la fluorescenza del Hoechst sicché i cromatidi bisostituiti presenteranno una colorazione più debole rispetto ai cromatidi monosostituiti. Tale colorazione, rafforzata dalla sovra colorazione con Giemsa, FPG (Fluorescence Plus Giemsa), consente di differenziare i due cromatidi alla seconda divisione mitotica (Perry & Wolff, 1974).

Ancor oggi, grazie alla particolare sensibilità e facilità d'esecuzione, il test degli SCEs viene utilizzato come biomarker d'esposizione ad agenti ambientali o occupazionali potenzialmente genotossici.

RISPOSTA AL DANNO, SISTEMI DI RIPARAZIONE

La cellula è continuamente sottoposta all'azione genotossica di molte sostanze, sia endogene che esogene. Tale azione genera vari tipi di lesioni al DNA che vengono riconosciute e prontamente viene attivato un processo detto risposta al danno al DNA (DDR) (Figura 2).

La risposta al danno si conclude con l'attivazione dei checkpoint cellulari e dell'adeguato sistema di riparazione, oppure talvolta, con l'innesco di un programma di morte (Jackson & Bartek, 2009). La DDR è un processo che avviene in diverse fasi. Anzitutto si verifica l'identificazione del danno sul DNA grazie ad alcune proteine specializzate note come sensori (DDRS). Un altro tipo di proteine chiamate trasduttori (DDRT), intervengono dopo il riconoscimento del danno e sono reclutate sul sito della lesione per trasmettere il segnale ad un'ultima serie di proteine coinvolte, dette effettori (DDRE). Esse hanno molteplici compiti, come riparare materialmente il danno, regolare il ciclo cellulare durante la riparazione, modificare la trascrizione genica e se il danno è irreparabile avviare un programma di morte (Khanna & Jackson, 2001).

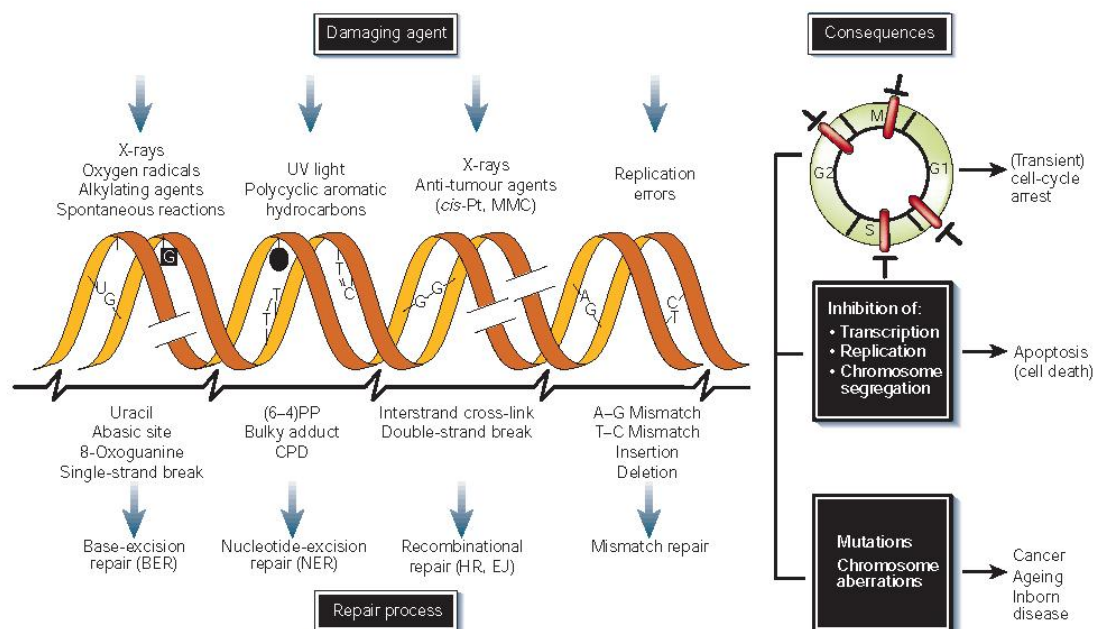


Figura 2: Agenti che danneggiano il DNA e relativi sistemi di riparazione (Hoeijmakers, 2001).

Per contrapporsi alle molteplici tipologie di lesioni al DNA, le cellule hanno prodotto numerosi sistemi di riparazione specializzati (Figura 2). Questi includono:

✖ La riparazione per escissione nucleotidica (***Nucleotide Excision Repair, NER***),

un sistema molto duttile in grado di rimuovere una gran numero di lesioni. Il danno riparato dal sistema NER riguarda filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi con evidenti distorsioni della doppia elica, come quelle causate da dimeri di pirimidina e addotti, ed alcuni tipi di fotoprodotto generati da radiazioni ultraviolette.

Il NER è composto da due sottosistemi di riparazione: *Transcription Coupled Repair* (TCR) quando la lesione è localizzata nelle regioni trascritte oppure *Global Genome Repair* (GGR) quando la lesione si trova in regioni non trascritte del genoma (Hoeijmakers 2001; Tornaletti et al., 1997).

La rilevanza biologica del NER è accentuata in malattie genetiche come ad esempio lo Xeroderma Pigmentosum (XP), la Sindrome di Cockayne (CS), la Tricotiodistrofia (TTD) causate da difetti di questo sistema di riparazione. La sequenza enzimatica su cui si basa il NER può essere sintetizzata dalle XPA e XPE (endonucleasi), che riconoscono il sito da correggere; dalle XPB e XPD (elicasi), che demarcano la lesione; dalle XPG e XPF (endonucleasi,) che incidono e rimuovono il nucleotide; dal DNA-polimerasi, che aggiunge il nuovo nucleotide; dalla ligasi, che "ricuce" il filamento riparato.

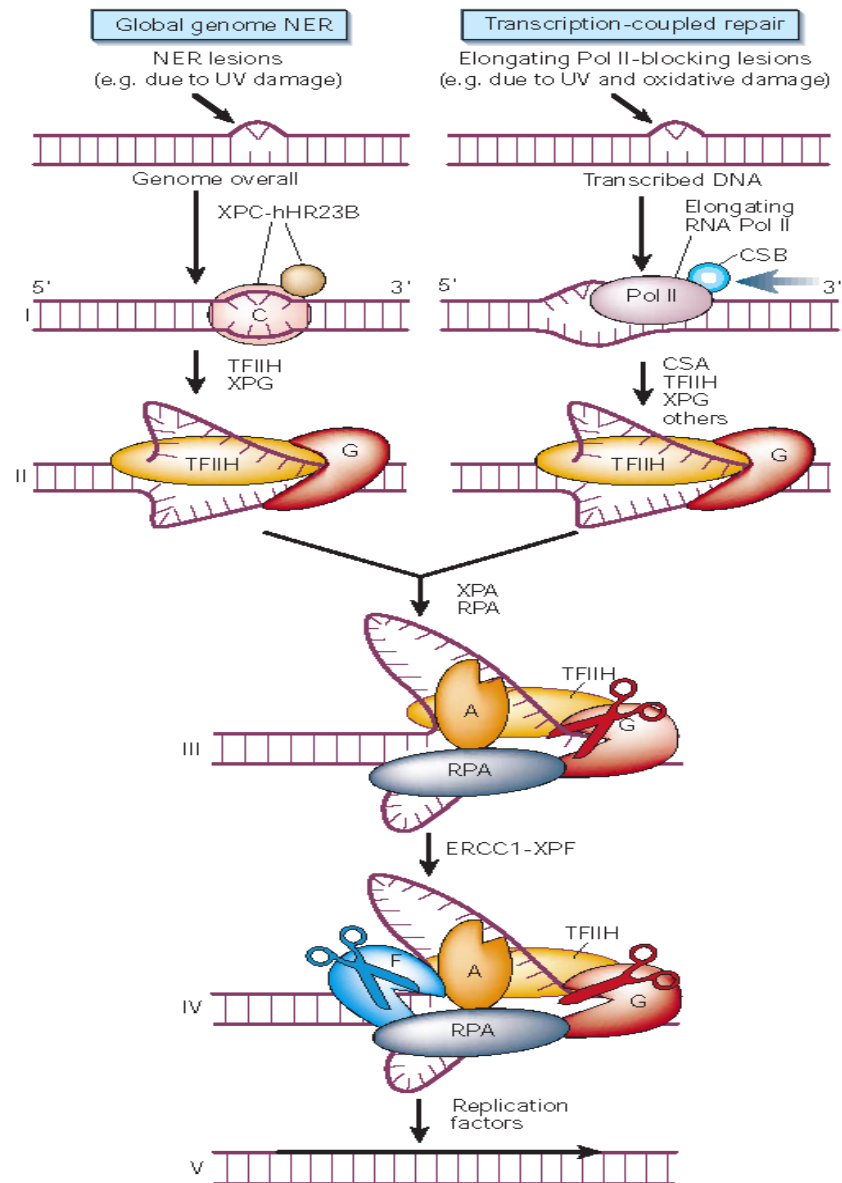


Figura 3: Meccanismo del *Nucleotide Excision Repair* (Hoeijmakers, 2001).

- ✖ La riparazione per escissione di basi (**Base Excision Repair, BER**), un meccanismo preposto alla riparazione del danno causato da ossidazione, alchilazione, idrolisi e deaminazione di basi azotate. Vi sono due sub-pathways del BER che si differenziano per il numero totale di nucleotidi che vengono sostituiti sul filamento di DNA danneggiato. Il primo concerne la riparazione di un singolo nucleotide *short-patch* BER (SP-BER), mentre il secondo riguarda la sostituzione di due o più nucleotidi ed è detto *long-patch* BER (LP-BER) (Liu et al., 2007).

Nel processo di BER sono coinvolte numerose glicosilasi con la capacità di rimuovere le basi ossidate danneggiate sia nei batteri (proteine MutY e MutM) che in organismi superiori (per esempio le proteine OGG1 e OGG2).

Di solito il SP-BER inizia con il riconoscimento della base danneggiata da parte di una DNA glicosilasi, che idrolizza il legame N-glicosidico della base danneggiata generando così un sito abasico (Lindahl, 1993; Lindahl, 1982). In seguito una endonucleasi apurinica/apirimidinica (APE) taglia il filamento di DNA danneggiato, al 5' del sito abasico, formando un gap sul DNA. Quindi la DNA polimerasi β (Pol β) riempie il gap togliendo la base danneggiata (Srivastava et al., 1998; Piersen et al., 1996). Al termine del processo il DNA neosintetizzato viene saldato da una DNA ligasi.

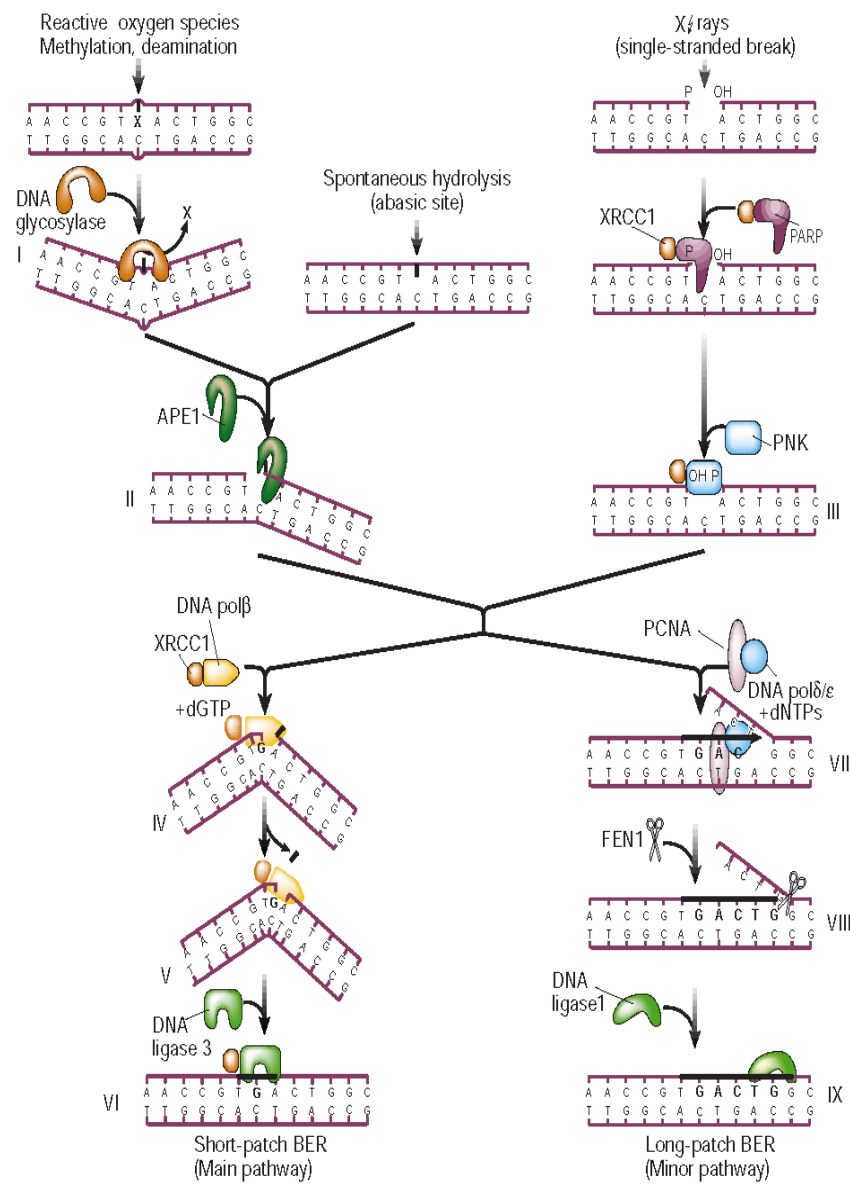


Figura 4: Meccanismo di *Base Excision Repair* (Hoeijmakers, 2001).

- ✖ La riparazione di appaiamenti errati (**Mismatch Repair, MMR**) è un processo di riparazione del DNA di tipo post-replicativo, che interviene nella rimozione di appaiamenti errati delle basi, sfuggiti alla correzione da parte dell'attività esonucleasica 3' → 5' delle DNA polimerasi (Buermeyer et al., 1999). Tale meccanismo di riparazione riveste un ruolo fondamentale nel controllo dell'integrità del genoma in tutti gli organismi, sia correggendo i mismatch, sia eliminando eventuali anse extra-elica più o meno ampie che rappresentano i precursori delle mutazioni "frameshift", sia precludendo la ricombinazione tra sequenze omologhe, ma non identiche di DNA. Il sistema di riparazione è suddiviso nei seguenti passi:
(a) riconoscimento del substrato; (b) rimozione del filamento contenente l'errore;
(c) resintesi del filamento corretto; (d) saldatura dei due filamenti.

Nelle cellule di mammifero il riconoscimento del mismatch avviene grazie al complesso eterodimerico MutS α , costituito da hMSH2 e hMSH6, il cui legame al mismatch è stabilizzato dall'eterodimero di hMLH1 e hPMS2 (complesso MutL α) (Kunkel & Erie, 2005). Gli altri fattori coinvolti nel MMR sono PCNA (antigene nucleare della proliferazione cellulare), RPA (proteina di replicazione A), RFC (fattore di replicazione C), l'esonucleasi I, le DNA polimerasi δ e ϵ , l'endonucleasi FEN1 (Buermeyer et al., 1999). La mancata presenza di tale sistema di riparazione mostra un incremento delle mutazioni spontanee, tra cui un aumento nelle mutazioni "frameshift" con conseguente instabilità di sequenze ripetute come i microsatelliti (MSI).

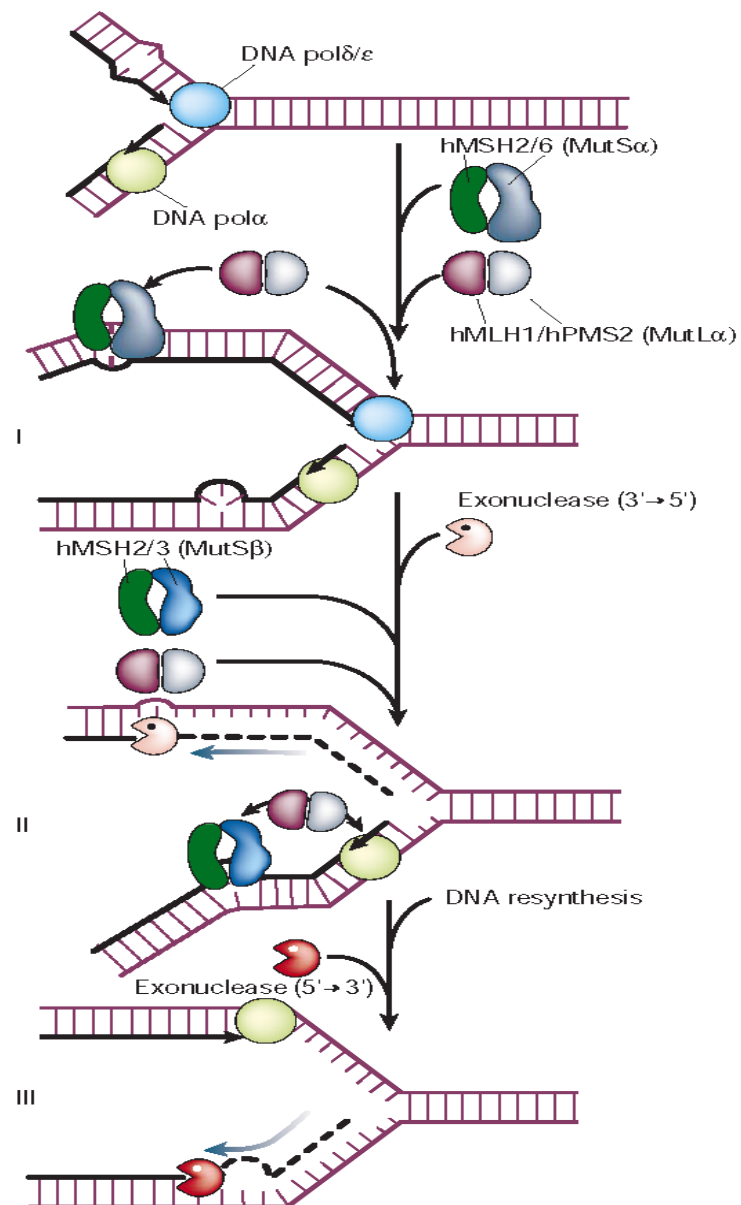


Figura 5: Modello di *Mismatch Repair* (Hoeijmakers, 2001).

- ✖ La riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA, risultano il tipo di lesioni più rischiose per l'integrità del genoma. I DSBs vengono riparati nelle cellule attraverso due diversi sistemi di riparazione, la ricombinazione omologa (***Homologous Recombination, HR***) e la ricombinazione non omologa (***Non Homologous End-Joining, NHEJ***).

I DSBs indotti dalle radiazioni ionizzanti o dall'azione delle nucleasi possono essere riparate da entrambi i sistemi di riparazione, invece le rotture causate da un collasso della forza replicativa sono riparate sostanzialmente dal sistema della HR (Rothstein et al., 2000). La HR viene utilizzata per far partire nuovamente le forche di replicazione in stallo e per effettuare la riparazione dei *cross-links* di DNA.

Il meccanismo di riparazione dei DSBs varia a seconda delle diverse specie animali e dei diversi tipi cellulari e dipende fortemente dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula quando si verifica il danno al DNA. La NHEJ determina una correzione dei DSBs in modo da essere soggetta ad errore (*error-prone*) ed opera in qualsiasi fase del ciclo cellulare, mentre la HR, immune agli errori (*error-free*), è fondamentalmente limitata alle fasi S e G₂ del ciclo cellulare. Ciò è dovuto alla necessità della presenza nella HR del cromatidio fratello di cui sfrutta la sequenza che funge da modello per resintetizzare la sequenza persa a causa della rottura dei filamenti. Nella NHEJ, i DSBs sono percepite dall'eterodimero Ku70/Ku80 (Featherstone & Jackson, 1999) che legandosi alla proteina chinasi DNA dipendente (DNA-PKcs), costituiscono il complesso enzimatico DNA-PK, che innesca gli altri fattori di riparazione che processano e riuniscono il doppio filamento rotto.

Pur essendoci molteplici *sub-pathway* di HR (San Filippo et al., 2008), solitamente essa è iniziata grazie al processamento di un singolo filamento di DNA (ssDNA).

Questo processo è sostenuto da diverse proteine, tra cui il complesso MRE11/RAD50/NBS1 (Haber, 1998; Petrini, 2000). Nell'evento catalizzato da RAD51 e dalle proteine BRCA1 e BRCA2 (proteine di suscettibilità al cancro della mammella tipo 1 e 2), il ssDNA penetra la sequenza che fa da *template* e successivamente intervengono le polimerasi, nucleasi, elicasi ed altre componenti che riparano la struttura, ricongiungendo le estremità rotte.

I fattori di riparazione impiegati nella HR e nella NHEJ sono specifici per ciascuno di loro, tuttavia alcune proteine di cui necessitano sono le stesse per entrambi i sistemi,

come ad esempio il complesso MRN, BRCA1, l'istone H2AX, PARP1, RAD18, DNA-PKcs e ATM (*Ataxia telengectasia mutata*). La DNA-PKcs, che gioca un ruolo cruciale nella NHEJ, ha la capacità di determinare la HR tramite una rete molto complessa di regolazioni che interessa anche l'ATM e altre proteine implicate nella HR, fosforilate sia dalla DNA-PKcs che dall'ATM.

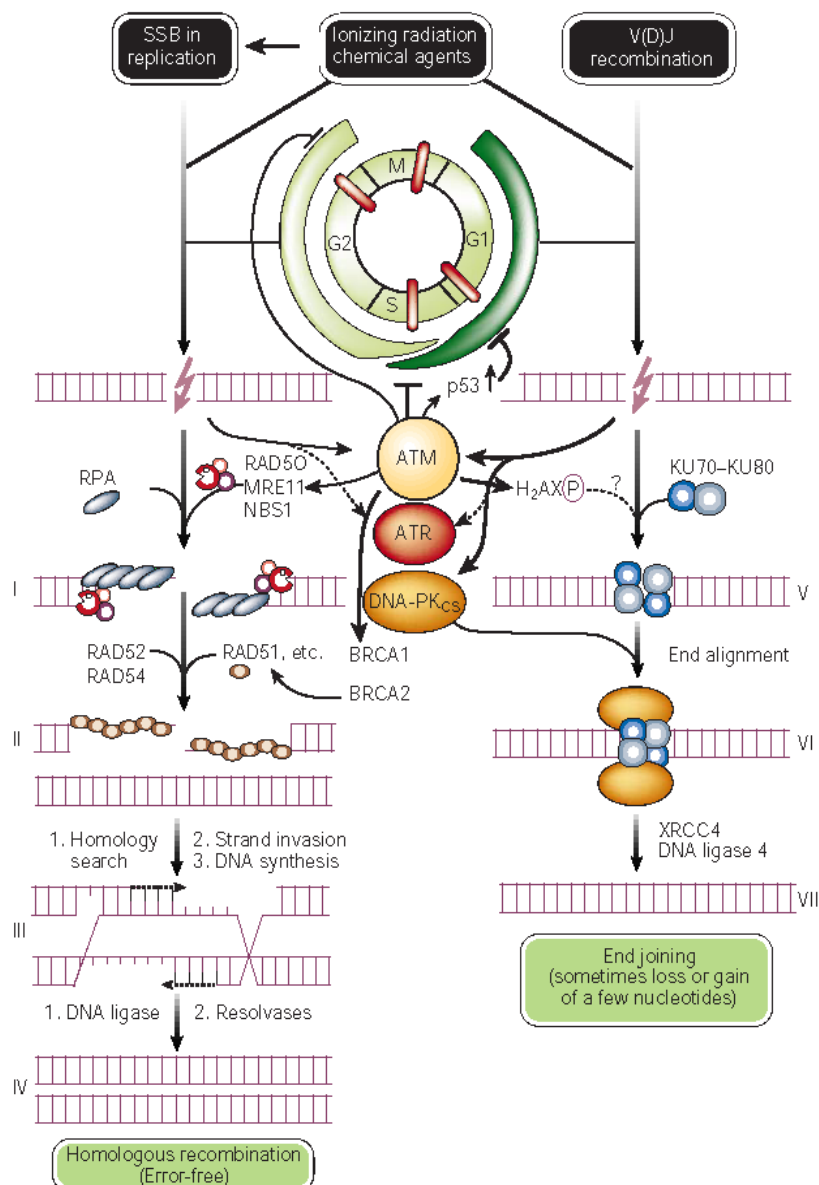


Figura 6: Sistema di riparazione omologa e non-omologa (Hoeijmakers, 2001).

CROSS-LINKS E LORO RIPARAZIONE

Gli agenti alchilanti sono composti che agiscono a livello della catena del DNA provocando appaiamenti errati e rotture all'interno dei filamenti, che possono generare errori durante la fase di replicazione cellulare, ed hanno quindi un effetto genotossico.

Gli alchilanti bifunzionali possono formare legami covalenti (*cross-links*) tra DNA e proteina (*cross-links* DNA-proteina, DPCs), tra due filamenti complementari del DNA (*interstrand cross-links*, ICLs) o anche all'interno dello stesso filamento (*intrastrand cross-links*) provocando la rottura completa della molecola di DNA oppure un blocco della trascrizione e della duplicazione.

Al gruppo degli agenti alchilanti appartengono numerosi farmaci chemioterapici comunemente impiegati nella pratica clinica, come la mostarda azotata, il carboplatino, il cisplatino o la mitomicina C.

Interstrand cross-link

Gli ICLs sono solo una piccola frazione delle lesioni che un agente alchilante genera sul DNA di una cellula ma essi risultano essere le lesioni più tossiche, poiché sono responsabili della inibizione della separazione del doppio filamento di DNA durante processi fondamentali come la replicazione e la trascrizione del DNA, la segregazione cromosomica etc.

Cross-link DNA-proteina

Questo tipo di danno è generalmente provocato da vari tipi di agenti chimici, molti dei quali sono noti essere cancerogeni, e da droghe con azione citostatica come il cisplatino.

I DPCs possono anche essere prodotti attraverso la reazione degli aldeidi con le proteine di siti apurinici. I legami non covalenti, ma forti, dei complessi DNA-proteina non sono considerati un danno in senso stretto, tuttavia in alcuni casi estremi tali complessi forti possono dare la stessa risposta cellulare delle lesioni covalenti, fino a bloccare la trascrizione o la replicazione del DNA.

Riparazione di *interstrand cross-link*

Molte sostanze chemioterapiche ed agenti bifunzionali, dannosi per il DNA, inducono *interstrand cross-links*.

Esistono due essenziali processi attraverso i quali vengono riparati *interstrand cross-links*. Il

primo è un processo *error-free* che dipende da *Homologous Recombination* mentre il secondo è *error-prone* e dipendente da *translesion synthesis*. Sia il processo *error-free* che quello *error-prone* sono basati in larga misura su proteine che giocano un ruolo ben noto nel NER, HR e *translesion DNA synthesis* (Noll et al., 2006).

Nucleotide Excision Repair. Il NER è stato scoperto per la prima volta in *Escherichia coli* come meccanismo coinvolto nella riparazione del danno al DNA indotto dalle radiazioni UV.

Successivamente è stato mostrato il suo coinvolgimento nella riparazione degli addotti al DNA indotti dalle radiazioni UV e dalle modificazioni chimiche in tutti gli organismi.

Numerosi studi approfondiscono il ruolo del NER nei batteri, nei lieviti e nelle cellule di mammifero (Sancar, 1995; Sancar et al., 2004; Prakash, 2000).

Il *pathway* del NER è suddiviso in quattro livelli: 1) riconoscimento del danno e formazione di un complesso di preincisione, 2) incisioni asimmetriche dei siti 5' e 3' del DNA danneggiato, per produrre un breve frammento di DNA contenente un addotto, 3) sintesi della riparazione del DNA attraverso un filamento template non danneggiato e 4) ligasi per completare la riparazione del DNA.

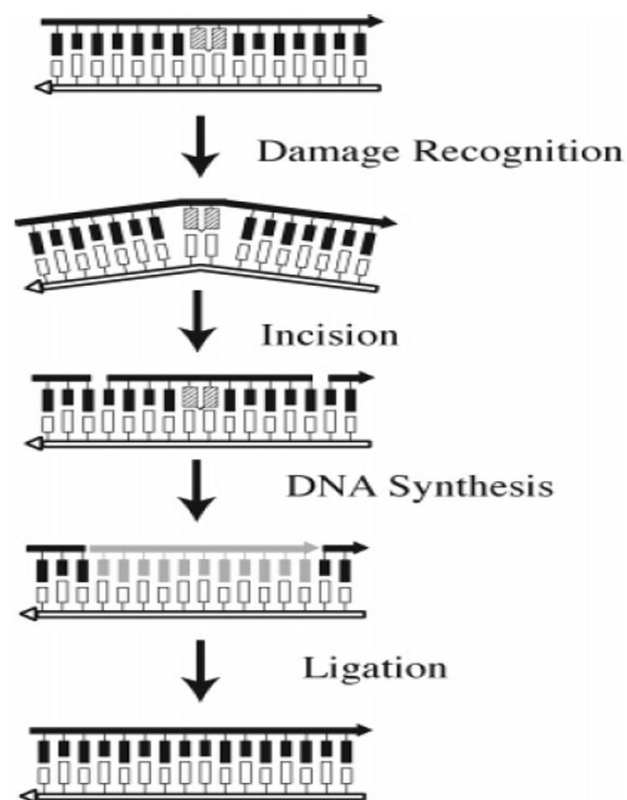


Figura 7: *Nucleotide Excision Repair* in *E. coli* (Noll et al., 2006).

Homologous Recombination. La funzione fondamentale dell'HR è la riparazione delle rotture a doppio o singolo filamento del DNA che si formano come risultato del collasso della forza replicativa e/o l'esposizione del DNA agli agenti che inducono il danno. Il processo di riparazione tramite HR avviene in quattro passi nei batteri, nei lieviti e nelle cellule di mammifero: 1) riconoscimento della doppia rottura seguito dalla produzione dell'estremità 3' del singolo filamento del DNA, 2) invasione del filamento del DNA danneggiato da parte delle proteine (RecA) che permettono la ricombinazione con DNA omologo, 3) sintesi del DNA, che rigenera il DNA degradato utilizzando il cromosoma omologo non danneggiato come *template* e 4) risoluzione della giunzione di *Holliday* tramite una seconda incisione che genera il rilascio del filamento di doppia elica di DNA contenente l'ICL.

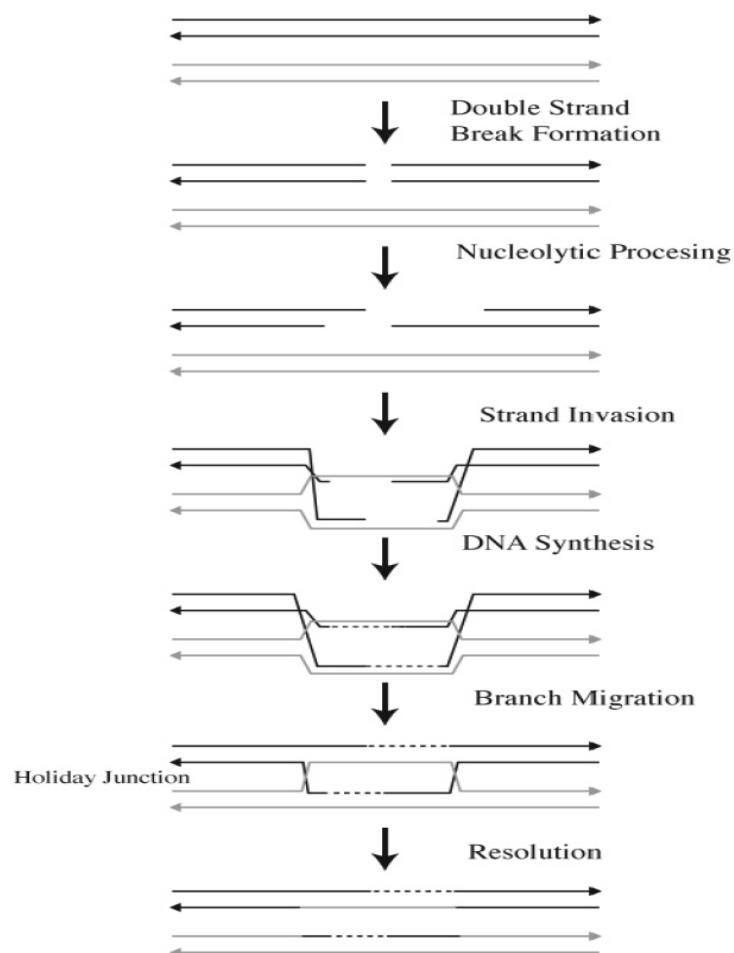


Figura 8: *Homologous Recombination* (Noll et al., 2006).

Translesion Synthesis. Il ruolo principale della *translesion DNA synthesis* è di agevolare la replicazione delle preesistenti lesioni al DNA malgrado vi sia il blocco della replicazione. Il meccanismo dei processi di riparazione del DNA quali reversione diretta, BER e NER, pur essendo notevolmente evoluto, non risulta completamente efficiente. Per evitare l'effetto letale del blocco della replicazione, la *translesion DNA synthesis* permette la replicazione del DNA contenente lesioni persistenti al DNA.

Il meccanismo di *translesion DNA synthesis* nei batteri, nei lieviti e nelle cellule di mammifero si articola in tre livelli: 1) la normale replicazione bidirezionale del DNA viene interrotta in presenza di una lesione al DNA e viene rilasciata la polimerasi replicativa, 2) una specifica polimerasi è caricata nel sito e replicata in prossimità della lesione, 3) la *translesion polimerasi* è rimpiazzata dalla polimerasi replicativa del DNA che continua la replicazione. In tal modo la *translesion synthesis* rigenera il doppio filamento del DNA in modo *error-free* o *error-prone* in base al tipo di lesione.

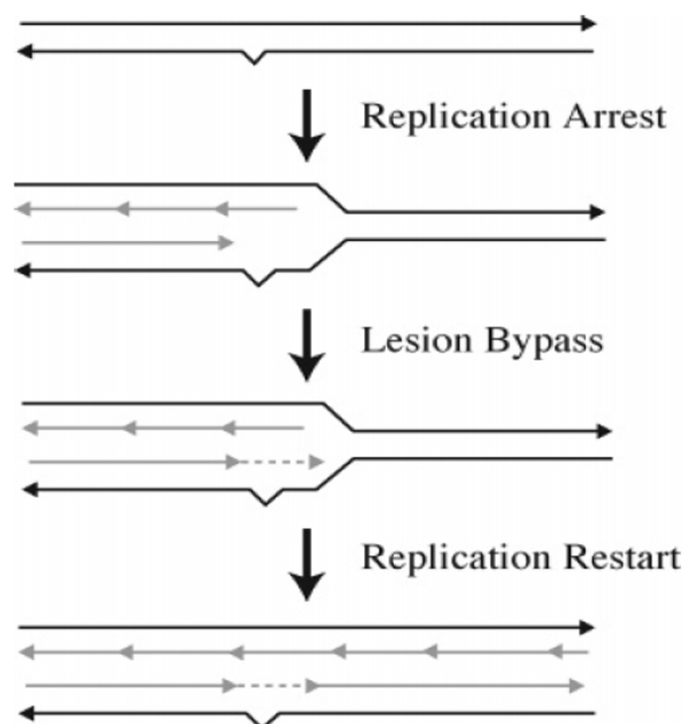


Figura 9: *Translesion DNA Synthesis* (Noll et al., 2006).

Riparazione di *interstrand cross-link* nei mammiferi

Il preciso meccanismo con cui le cellule di mammifero riparano gli *interstrand cross-links* non è completamente conosciuto, sebbene si pensi che vi siano coinvolti il sistema di riparazione NER e HR come in *Saccharomyces cerevisiae* e in *Escherichia coli* (Dronkert & Kanaar, 2001).

Gran parte degli studi sulla riparazione degli *interstrand cross-links* nelle cellule di mammifero è stata effettuata utilizzando molteplici saggi, substrati e linee cellulari.

La riparazione degli ICLs nei mammiferi si è compresa appieno grazie all'utilizzo di linee cellulari di Hamster cinese che sono deficienti in proteine coinvolte nel NER e nell'HR, quindi possono essere considerate degli ottimi sistemi sperimentali di studio per la comprensione dell'importanza di questi sistemi di riparazione nella rimozione degli ICLs.

Le linee cellulari di CHO mutate in XPF (ERCC4) e in ERCC1 risultano estremamente sensibili agli agenti *crosslinking*, mentre tali agenti hanno effetti meno drastici nelle cellule mutanti in altri geni nella riparazione per escissione (Hoy et al., 1985).

Risulta quindi evidente che XPF e ERCC1 rivestono un ruolo speciale nella riparazione dei *cross-links* oltre alla loro funzione nel NER, infatti esse costituiscono un complesso con attività esonucleasica che causa le rotture a doppia elica in prossimità dell'ICL.

Successivamente alla rottura a doppia elica l'HR prosegue nel processo di riparazione. Dopo l'azione dell'HR per eliminare l'ICL, il complesso delle proteine XPF-ERCC1 espleta un'ulteriore funzione di incisione sul filamento del DNA che contiene gli ICLs.

Altre ricerche evidenziano la rilevanza della fase S del ciclo cellulare nella riparazione degli ICLs (McHugh et al., 2001). Infatti nel caso in cui la forza replicativa incontra l'ICL, essa subisce un blocco che provoca uno stress torsionale che a sua volta conduce al collasso della forza replicativa nella fase di sintesi del DNA e genera una rottura a doppia elica. Il risultato di tale processo è la formazione di una struttura intermedia di DNA rilassato che è un substrato per il complesso XPF-ERCC1 più RPA (*Replication Protein A*).

I vari sistemi di riparazione possono condividere tra loro enzimi e reazioni intermedie. Per contro, particolari lesioni possono essere riparate da più di un sistema di riparazione. In particolare vari *pathways* possono competere per lo stesso substrato, interferendo l'uno con le funzioni dell'altro oppure possono cooperare per rimuovere la lesione. Tuttavia non è ben chiaro se una particolare proteina può agire come sito nucleico per più di un *pathway* di riparazione. Ad esempio la O⁶-metilguanina può essere riparata mediante reversione diretta

del danno, *Base Excision Repair* o *Nucleotide Excision Repair*. Non è noto però se la proteina RPA legata alla lesione avvia la riparazione tramite NER, interferendo oppure stimolando i *pathways* di riparazione diretta e BER. Analogamente non è ancora chiaro se le proteine di riparo del DNA partecipano direttamente nei *checkpoint* della risposta del danno al DNA (Sancar et al., 2004).

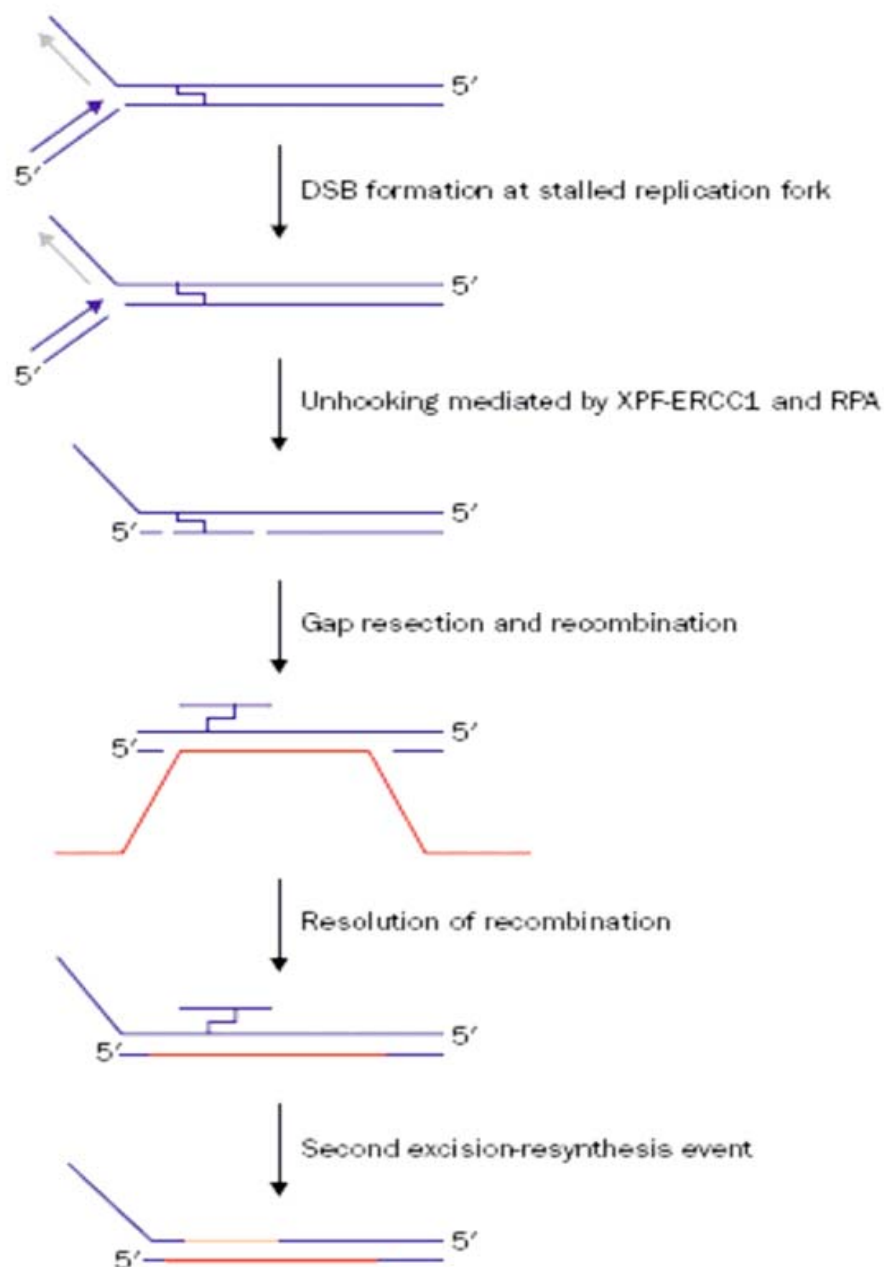


Figura 10: Riparazione degli ICLs nei mammiferi durante la fase S del ciclo cellulare (McHugh et al., 2001).

RELAZIONE TRA DANNO AL DNA, RIPARAZIONE DEL DNA E DANNO CROMOSOMICO INDOTTO DALL'ACETALDEIDE

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Molti composti presenti nell'ambiente hanno un'azione genotossica, poiché possono interagire con materiale genetico alterandolo. Gli elementi che caratterizzano il danno genetico in un organismo sottoposto a sostanze mutagene sono: la distribuzione e la concentrazione dell'agente nell'organismo, la sua reattività chimica e le capacità di metabolizzare la sostanza da parte dei tessuti, il grado di reattività della sostanza e dei suoi metaboliti, la capacità delle cellule di ripartire o amplificare il danno, l'opportunità di espressione del danno genetico, l'abilità del tessuto bersaglio di riconoscere e sopprimere la moltiplicazione di cellule con proprietà aberranti.

Gli effetti biologici generati da composti in grado di alterare il DNA sono mutazioni, alterazioni dell'espressione genica, aneuploidie, aberrazioni cromosomiche, scambi di cromatidi fratelli e formazione di micronuclei.

Le sostanze mutagene possono dare origine a due generi di rischi, il primo dovuto ad un incremento di mutazioni delle cellule germinali, accrescendo la frequenza di malattie genetiche nelle generazioni successive. Il secondo rischio è legato alle mutazioni in cellule somatiche che possono causare neoplasie.

Questo studio consiste nella valutazione della risposta cellulare al danno al DNA indotto da un agente genotossico, l'acetaldeide, nelle linee cellulari di ovario di Hamster cinese difettive in diversi meccanismi di riparazione. In particolare, si è studiata l'induzione dei *cross-links* da parte di questa sostanza.

ALCOL E NEOPLASIE

Una evidente dimostrazione epidemiologica conferma l'ipotesi di un ruolo, nel processo carcinogenetico, dell'etanolo da solo o in associazione con altre sostanze, a livello di vari organi ed apparati.

Numerosi studi hanno evidenziato come le bevande alcoliche incrementino il rischio di patologie neoplastiche nell'uomo, soprattutto a livello del primo tratto aero-digestivo (tumori della cavità orale, della faringe, della laringe e del carcinoma dell'esofago) e siano responsabili dei tumori primitivi del fegato (IARC, 1988).

Pur non essendo noti esattamente i processi per cui il consumo abituale di bevande alcoliche stimola la carcinogenesi, gli studi sperimentali hanno dimostrato che l'etanolo anche se non è un agente cancerogeno, in determinate condizioni sperimentali è un co-carcinogeno e/o (specie nel fegato) un promotore del tumore.

Si suppone che vi siano diverse modalità con le quali l'etanolo possa dare origine alle neoplasie, quali la presenza di contaminanti cancerogeni, l'azione di metaboliti cancerogeni dell'etanolo (acetaldeide), un'attività solvente, la riduzione della captazione e della biodisponibilità di sostanze inibenti, un aumento di deficit nutrizionali, l'inibizione della detossificazione e l'attivazione di cancerogeni, le modificazioni ormonali, un aumento dell'esposizione ad ossidanti.

Tuttavia non si può escludere che vi siano delle neoplasie umane indotte dall'alcol attraverso l'azione di vari meccanismi.

La combinazione del consumo di alcol e del fumo di sigaretta incrementa il rischio di questi tumori con un effetto moltiplicativo (IARC 1986, 1988). Comunque il consumo di alcol, anche nel caso in cui non vi sia fumo di sigaretta, incrementa il rischio delle neoplasie del tratto superiore delle vie aero-digestive.

La frequenza di questo tipo di tumori è di circa 10-100 volte maggiore nelle persone che bevono e fumano pesantemente, infatti l'incidenza di tumori del cavo orale, della faringe, della laringe e del tumore dell'esofago è estremamente bassa nei soggetti astemi e non fumatori. Inoltre, tali neoplasie rappresentano circa il 10% di tutti tipi di cancro che si manifestano nella popolazione europea di sesso maschile. L'incidenza e la mortalità di cancro laringeo negli individui di sesso maschile è in aumento nell'Europa centrale e nell'Europa dell'est (Levi et al., 1999).

Un possibile cancerogeno presente nelle bevande alcoliche è l'acetaldeide, il primo metabolita dell'etanolo (molecola che si forma durante un processo chimico nell'organismo umano). L'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide avviene nel fegato (Figura 11).

Gli enzimi deidrogenasici operano come principale processo metabolico, in particolare sono due deidrogenasi ad agire in sequenza:

- 1) alcol deidrogenasi (ADH)
- 2) aldeide deidrogenasi (ALDH)

Questo meccanismo avviene nel citosol delle cellule epatiche e consente la metabolizzazione di oltre il 90% dell'alcol che raggiunge il fegato. La prima reazione mediata dall'enzima ADH trasforma l'alcol in acetaldeide con liberazione di idrogeno e consumo di Nicotinamide Adenin dinucleotide (NAD^+). La seconda, tramite il ALDH che lavora principalmente al livello mitocondriale (von Wartburg, 1980), trasforma l'acetaldeide in acetato con liberazione di H^+ e ulteriore consumo di NAD^+ . Nel caso in cui la quantità di alcol sia eccessiva, il fegato non riesce a smaltire tutto l'etanolo e riversa in circolo anche l'acetaldeide, sostanza nociva per tutto l'organismo.

Un secondo sistema ossidativo è rappresentato da enzimi microsomiali o MEOS (*Microsomal Ethanol-Oxidising System*), rappresentato in maggioranza da una NADPH-ossidasi. Il citocromo P450 ha un'alta affinità per l'alcol, che viene anche in questo caso metabolizzato in acetaldeide e acqua. Questo enzima è presente a livello del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti, che si presenta ipertrofico negli etilisti.

Differentemente dal meccanismo delle deidrogenasi, il MEOS è un sistema inducibile dall'ETOH, ovvero all'aumentare dell'assunzione dell'alcol esso tende a diventare più attivo.

Poiché il MEOS è anche in grado di metabolizzare molti farmaci, se il bevitore abituale assume farmaci in condizione di sobrietà deve ricorrere a dosi più elevate per avere lo stesso effetto terapeutico. Invece, nel caso in cui l'alcolista assuma un farmaco in stato di ebbrezza, sia il farmaco che l'etanolo competeranno per lo stesso sistema enzimatico; quindi a parità di dosaggio il farmaco verrà metabolizzato più lentamente e gli effetti terapeutici ottenuti saranno decisamente superiori.

L'abuso cronico di alcol comporta l'eccessiva stimolazione del citocromo P450 e più in generale della catena respiratoria mitocondriale, che a sua volta conduce ad un eccesso di radicali liberi nella cellula, quali lo ione superossido, i radicali idrossilici e il perossido di

idrogeno. Tali sostanze possono causare gravi alterazioni a livello cellulare nella permeabilità di membrana, nei segnali intracellulari e nella sintesi proteica.

Infine, esiste una terza via metabolica mediata dall'enzima catalasi (enzima che si trova nella frazione perossisomiale ed è espresso soprattutto a livello del sistema nervoso centrale). Si tratta comunque di un meccanismo di importanza marginale rispetto agli altri due.

Vi sono molteplici isoenzimi sia dell'alcol deidrogenasi (ADH) che dell'acetaldeide-deidrogenasi (ALD) e il loro corredo cromosomico è imposto geneticamente. Tale influenza genetica spiegherebbe la tolleranza alle bevande alcoliche di ogni singolo individuo o di alcune popolazioni.

Tuttavia altri elementi possono influenzare questi processi metabolici, come ad esempio l'età, il sesso, l'abuso di farmaci psicotropi e la presenza di patologie. Generalmente gruppi etnici differenti hanno capacità metaboliche diverse. Ad esempio nelle popolazioni asiatiche sono presenti delle isoforme dell'aldeide deidrogenasi o inattive oppure con ridotta attività, ciò implica minor tolleranza all'alcol anche a dosi molto basse.

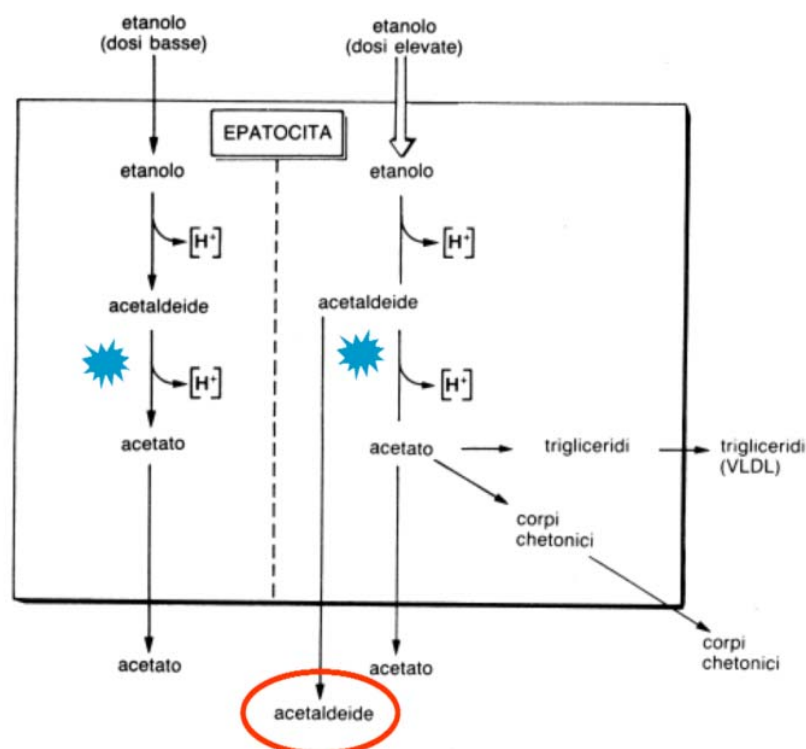


Figura 11: Prodotti del metabolismo dell'etanolo rilasciati dal fegato dopo assunzione dell'etanolo.

ACETALDEIDE

L'acetaldeide, detta anche etanale o aldeide acetica (CH_3CHO), è un composto volatile presente comunemente in molti cibi, frutta e bevande, nelle spezie, negli aromatizzanti, nei profumi, nel fumo di tabacco e nello scarico dei veicoli (IARC, 1985) dove rappresenta un sottoprodotto della fermentazione dei lieviti. Viene utilizzata per la manifattura di molti prodotti industriali come l'acido acetico, gli esplosivi, i reagenti fotografici, gli antiossidanti, la plastica, gli indumenti sintetici.

A temperatura ambiente è un liquido incolore volatile e infiammabile, dall'odore pungente e irritante. E' solubile in acqua e nella maggior parte dei solventi organici.

Nell'essere umano l'acetaldeide è viene generata grazie all'alcol deidrogenasi, che agisce a livello periferico, e dalla catalasi, che invece agisce a livello del sistema nervoso centrale ed in seguito viene trasformata in acetato.

In passato l'AA era conosciuta esclusivamente come sostanza tossica, infatti per più di 55 anni ha costituito il razionale biochimico dell'utilizzo del disulfiram, primo farmaco utilizzato nella terapia della dipendenza da alcol. Infatti il disulfiram, bloccando l'azione dell'ALDH2 epatica determina accumulo di acetaldeide a livello periferico. L'effetto clinico di questo accumulo è la cosiddetta "flushing syndrome", che induce stati depressivi ed è contraddistinta da vistosi arrossamenti del viso. L'obiettivo di tale strategia farmacologica è di suscitare una certa repulsione all'alcol nei bevitori abituali. Negli ultimi anni alcune ricerche hanno evidenziato invece che l'acetaldeide è una sostanza psicoattiva che causa molteplici effetti comportamentali. Inoltre alcuni studi hanno ipotizzato che l'acetaldeide rivesta un ruolo decisivo nelle caratteristiche farmacologiche e comportamentali dell'etanolo e nello sviluppo dell'alcolismo (Quertemont 2004).

I prodotti del metabolismo dell'etanolo sono l'acetaldeide e i radicali liberi, tali composti molto reattivi si legano rapidamente ai componenti delle cellule ed anche al DNA.

L'acetaldeide riduce il meccanismo di riparo del DNA e la sua metilazione della citosina, inoltre contribuisce al blocco del glutatione, un peptide determinante per la disintossicazione.

L'acetaldeide è classificata come un probabile cancerogeno umano (B2) dall'*US Environmental Protection Agency* (IRIS, 1996) sulla base dell'aumento dell'incidenza dei tumori della cavità nasale nei ratti e dei tumori della laringe in Hamster dopo esposizione per inalazione (IARC, 1999; Morris, 1997; Woutersen et al., 1986).

La sua molecola contiene un carbonio carbonilico che reagisce con i gruppi nucleofili di numerose molecole come gli acidi nucleici, le proteine e i fosfolipidi, per formare gli addotti che possono trasformarsi in lesioni molto dannose: i *cross-links*.

Studi precedenti condotti nei sistemi non cellulari hanno mostrato che l'interazione dell'AA con le basi del DNA porta alla formazione di molteplici addotti. Una delle lesioni al DNA che si ottiene dalla reazione dell'AA con la deossiguanosina è N²-etil-2'-deossiguanosina (Vaca et al., 1995).

Un'altra lesione particolarmente significativa è l'addotto 1,N²-propano-2'-deossiguanosina, che oltre ad essere una lesione molto letale, può manifestarsi in diverse forme (*ring-opened* e *ring-closed*) in base alla struttura del DNA (Wang et al., 2000; De los Santos et al., 2001; Brooks & Theruvathu, 2005).

Gli studi effettuati *in vivo* e *in vitro* suggeriscono che l'AA può formare *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteina (Ristow & Obe, 1978; Hecht et al., 2001; Lambert et al., 1985).

Molti tipi di addotti al DNA formati dall'AA e la loro riparazione sono stati ben caratterizzati. *Nucleotide Excision Repair*, *Homologous Recombination Repair* e *Replication-coupled Repair* risultano essere coinvolti nella riparazione di *interstrand cross-links* indotti dall'acetaldeide o da altri agenti *crosslinking* (De Silva et al., 2000).

L'AA è genotossica e induce un ampio spettro di effetti genetici quali mutazioni, aberrazioni cromosomiche, scambi tra cromatidi fratelli, micronuclei e aneuploidie nelle colture cellulari di mammifero, inclusi i linfociti umani (Ristow e Obe, 1978; Obe et al., 1979; Bird et al., 1982; Dulout & Furnus, 1988). Un incremento della frequenza dei *gaps*, rotture cromatidiche e scambi cromatidici è stato osservato nei linfociti umani di pazienti affetti da Anemia di Fanconi in seguito al trattamento con AA (Obe et al., 1979).

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di ovario di Hamster cinese (CHO):

- ↳ AA8 - linea wild type,
- ↳ UV4 e UV5 - linee difettive in *Nucleotide Excision Repair* (NER),
- ↳ UV61 - linea difettiva in *Transcription Coupled Repair* (TCR),
- ↳ KO40 – linea difettiva nella capacità di riparare *cross-links* al DNA.

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state isolate e gentilmente fornite L. H. Thompson.

<i>Cell lines</i>	<i>Genotype</i>	<i>Defect</i>	<i>Human Homologous</i>
<i>AA8</i>	<i>WT</i>	<i>WT</i>	
<i>UV4</i>	<i>ERCC1-</i>	<i>Deficient in NER</i>	<i>XPF</i>
<i>UV5</i>	<i>ERCC2-</i>	<i>Deficient in NER</i>	<i>XPB</i>
<i>UV61</i>	<i>ERCC6-</i>	<i>Deficient in TCR</i>	<i>CSB</i>
<i>KO40</i>	<i>FANCG-</i>	<i>Deficient in cross links repair</i>	<i>FANCG</i>

Le linee cellulari AA8 e KO40 sono state coltivate in terreno MEM (Minimal Essential Medium) (GIBCO, Italy); le linee UV4 e UV5 sono state coltivate in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO, Italy); la linea cellulare UV61 è stata coltivata in HAM's F10 (GIBCO, Italy) ad una temperatura di 37°C, 95% di umidità e lo 5% di CO₂. Tutti i terreni di coltura sono stati integrati con il 10% di siero fetale di Bovino (Gibco, Italy), 1% di glutammina e 1% penicillina e streptomicina (Gibco, Italy).

REAGENTI CHIMICI E TRATTAMENTO DELLE LINEE CELLULARI

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

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

Acetaldeide (AA) (*Carlo Erba*): immediatamente prima del trattamento è stata diluita in PBS freddo (4°C) fino alla concentrazione di 120mM in un tubo di vetro immerso nel ghiaccio per tutta la durata dell'esperimento. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni finali (1, 1.8, 2.5 and 3.6mM), e per evitare l'evaporazione della sostanza testata i tappi delle bottiglie sono stati chiusi per tutto il periodo di incubazione (2h a 37°C).

Mitomicina C (MMC) (*Sigma, Italy*): è stata sciolta in PBS, aliquotata e conservata a -20°C. Per evitare la degradazione della sostanza ad ogni esperimento è stata scongelata una nuova aliquota. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni finali (0.5, 1 e 3.5µM) per 1h a 37°C.

Formaldeide (FA) (*Sigma, Italy*): è stata diluita in PBS. Le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni finali (150, 200, 250 e 300µM) per 2h a 37°C.

ANALISI CITOGENETICA DELLE CAs E SCEs

E' stato utilizzato un protocollo che permette di analizzare sia le aberrazioni cromosomiche sia gli scambi tra cromatidi fratelli nella prima mitosi dopo il trattamento (Palitti & Becchetti, 1977; Natarajan et al., 1983). Le cellule in crescita esponenziale sono state tenute per un ciclo in terreno con BrdUrd, in seguito sono state trattate con uno degli agenti chimici (AA, MMC, FA), lavate due volte in PBS e recuperate a tempi differenti, in funzione del tempo di replicazione della linea cellulare.

Tre ore prima del fissaggio è stato aggiunto il colcemid al fine di fermare le cellule in metafase.

Le cellule sono state staccate dalle *flask* di coltura, trasferite in tubi da fissaggio e raccolte mediante centrifugazione. Sono state quindi esposte per 8 minuti a una soluzione ipotonica

(1% acido citrico) a 37 °C ed infine fissate in metanolo : acido acetico (3:1). Le cellule risospese in fissativo fresco sono state seminate su vetrini. I vetrini sono stati lasciati asciugare all'aria, al buio, per almeno 3 giorni prima di essere colorati utilizzando il metodo FPG (Flouorochrome più Giemsa) di Perry and Wolff (1974) che permette di valutare la progressione del ciclo cellulare e contemporaneamente di analizzare sia le CAs che gli SCEs. Questa tecnica si basa sulla capacità della BrdUrd di ridurre la fluorescenza del fluorocromo Hoechst 33258 ottenendo quindi la fluorescenza dei cromatidi privi di BrdUrd e l'opacità dei cromatidi che l'hanno incorporata. La metodica consiste nell'immergere orizzontalmente i vetrini in una soluzione acquosa al 2% di Hoechts 33258 per 30 minuti. Subito dopo i vetrini vengono trasferiti in acqua distillata ed esposti per 30 minuti alla luce di una lampada solare Osram (300 Watt). Quindi i vetrini vanno colorati con una soluzione di Giemsa al 3% nella quale vanno immersi e lasciati per 7 minuti. Infine vanno lavati in acqua per 2-3 volte e lasciati asciugare all'aria.

Le letture delle CAs e degli SCEs sono state effettuate rispettivamente su 100 e 25 metafasi complete scelte casualmente per ogni punto sperimentale. Per determinare l'indice di proliferazione per ogni punto sperimentale sono state analizzate 100 metafasi e distinte in funzione della loro colorazione. L'indice mitotico è stato calcolato su 1000 cellule. Tutte le analisi sono state condotte su vetrini codificati al fine di non essere influenzati nella valutazione dall'eventuale trattamento subito.

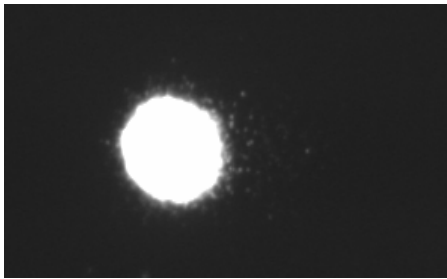
DETERMINAZIONE DEI *CROSS-LINKS* TRAMITE *COMET ASSAY*

Il *Comet Assay* o gel elettroforesi a singola cellula (SCGE) è un approccio per analizzare le rotture di DNA a doppio o singolo filamento, siti alcalino labili e legami crociati DNA-DNA e DNA-proteine di qualunque tipo di cellula eucariotica *in vivo* ed *in vitro*. Questa tecnica semplice e sensibile, da molti anni viene adottata in diverse aree di studio, specie per realizzare test di genotossicità, biomonitoraggio e studio dei sistemi di riparazione del DNA (Angelis et al., 1999; Rojas et al., 1999; Collins, 2004).

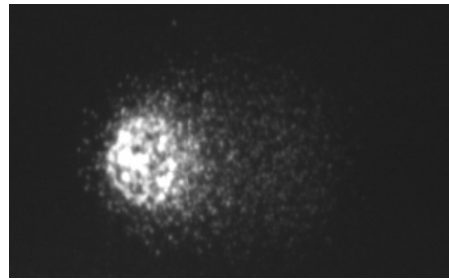
Tale test si basa sulla capacità di DNA di migrare, in presenza di un campo elettrico, fuori dalla cellula. Il DNA di cellule danneggiate, visualizzato al microscopio, appare come una cometa con la testa (regione nucleare) e una coda determinata dai frammenti o filamenti di DNA che migrano più velocemente nella direzione dell'anodo; il DNA non danneggiato migra

invece molto poco e rimane prevalentemente ai confini del nucleo. Le cellule mostrate in figura 12 hanno un differente grado di frammentazione. Le cellule sane hanno un DNA integro quindi l'immagine che ne deriva è priva di coda (a); quelle con un grado di frammentazione intermedio hanno un'immagine in cui sono presenti testa e coda con dimensioni diverse a seconda del grado di danneggiamento (b); invece le cellule molto danneggiate hanno il DNA completamente frammentato, l'immagine che ne deriva è priva di nucleo (c). La lunghezza della coda dipende dalle dimensioni dei frammenti di DNA, più sono piccoli più migrano lontano.

a)



b)



c)

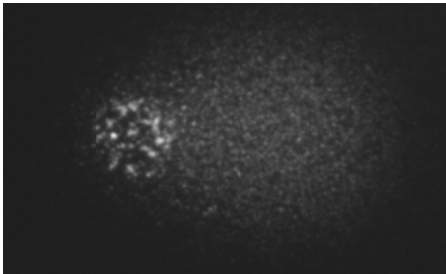


Figura 12: Immagini di cellule con differenti gradi di frammentazione del DNA.

Il saggio della cometa può essere condotto in condizioni alcaline (denaturanti) per rilevare rotture a singola elica del DNA e siti alcalino-labili, oppure in condizioni neutre (non denaturanti) per misurare rotture a doppia elica del DNA.

Attraverso modificazioni del protocollo standard, tale test può evidenziare anche una diminuzione di migrazione del DNA dovuta alla presenza di legami crociati DNA-DNA ed interazioni DNA-proteine.

Per rilevare i *cross-links* è stata messa a punto una versione modificata del *Comet Assay* da

Merk e Speit nel 1998. La linea cellulare parentale AA8 è stata trattata con uno dei tre diversi agenti induttori di *cross-links*. Circa 10^4 cellule (controllo e trattate) in $10\mu\text{l}$ sono state diluite in $120\mu\text{l}$ di agarosio a basso punto di fusione (Agarosio Low Melting 0,5 %) e sono state seminate su vetrini precedentemente gelatinizzati con Agarosio Normal Melting all'1%.

In seguito i vetrini sono stati immersi in una soluzione di lisi (2,5mM NaCl, 100mM EDTA, 10% Tris, pH 10, e 10% di DMSO, 1% di Triton X-100 aggiunti 1 ora prima) *overnight* a $+4^\circ\text{C}$.

Dopo la lisi i vetrini sono stati esposti alla dose di 5Gy di raggi X, (250 KV e 6mA Gilardoni MGL200/8D, "*dose rate*" 60cGy/min) e successivamente disposti in una camera elettroforetica, ricoperti con la soluzione di denaturazione (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH 13) per 30 minuti e corsi per 30 minuti a 25V (0,86 V/cm) e 300mA.

Una volta effettuata l'elettroforesi i vetrini sono stati neutralizzati (0,4M Tris pH 7,5) asciugati, colorati con bromuro di etidio ($20\mu\text{g}/\text{ml}$) e analizzati con un microscopio a fluorescenza (Eclipse E400; Nikon) e un software di analisi delle immagini (*Comet Assay III*; *Perceptive Instrumentes*, UK). Per ogni vetrino è stata calcolata la media della lunghezza della coda (*tail moment*, TM) su 100 cellule. La lunghezza della coda relativa (*relative tail moment*, RTM) è stata utilizzata come parametro per misurare il danno dovuto ai *cross-links* (*cross-links* DNA-proteina, DPCs e *interstrand cross-links* DNA-DNA, ILCs).

La presenza di *cross-links* è stata analizzata confrontando il TM di cellule irradiate e trattate con i tre agenti, con quello di cellule controllo irradiate. Il *relative tail moment* è stato misurato usando la formula:

$$[1 - (\text{TM}_{\text{TRATTATO IRRADIATO}} - \text{TM}_{\text{TRATTATO NON IRRADIATO}}) / \text{TM}_{\text{CONTROLLO IRRADIATO}} - \text{TM}_{\text{CONTROLLO NON IRRADIATO}}] \times 100$$

Per distinguere tra DPCs e ICLs è stato messo a punto un protocollo che prevede il trattamento con la proteinasi-K. In seguito all'irradiazione i vetrini sono stati lavati tre volte con PBS, ricoperti con $100\mu\text{l}$ di proteinasi-K ($0,5\text{mg}/\text{ml}$ in soluzione di lisi e 1% di Triton X-100) e incubati a 37°C in camera umida per 1 ora. I controlli sono stati incubati con $100\mu\text{l}$ soluzione di lisi e 1% Triton X-100. Successivamente i vetrini sono stati processati ed analizzati nel modo descritto sopra.

ANALISI STATISTICA

I dati di tre esperimenti indipendenti sono stati espressi come valori medi $\pm$ deviazione standard.

Per la valutazione statistica delle differenze osservate tra i vari punti sperimentali, in induzione di CAs e SCEs ed in riduzione del *tail moment*, è stato utilizzato il test di Student adottando una soglia minima di significatività pari a $p < 0,001^*$ e $p < 0,05^{**}$.



Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde

Claudia Lorenti Garcia¹, Manuela Mechilli¹, Luca Proietti De Santis, Angelo Schinoppi, Katarzyna Kobos, Fabrizio Palitti*

Department of Agrobiologia and Agrochemistry, University of Tuscia, Via S. C. De Lellis snc, I-01100 Viterbo, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2008

Received in revised form

14 November 2008

Accepted 14 November 2008

Available online 25 November 2008

Keywords:

Acetaldehyde

Comet assay

DNA repair

Chromosomal damage

DNA–protein crosslink

DNA–DNA crosslink

ABSTRACT

Acetaldehyde (AA) was tested along with two other crosslinking agents: formaldehyde (FA), an inducer of DNA–protein crosslinks (DPCs) and mitomycin C (MMC), an inducer of interstrand crosslinks (ICLs), to find out whether the mechanism of action of AA resembles more MMC or FA.

Using a modification of the standard protocol for comet assay we demonstrate that AA induces crosslinks. Using a combination of alkaline comet version and proteinase-K, a clear abrogation of AA-induced reduction in DNA migration, like after FA treatment, was observed demonstrating that both agents induce DPCs, whereas MMC induces predominantly ICLs.

A possible correlation between the types of induced crosslink and the induction chromosome damage in different repair deficient mutant Chinese hamster ovary cell lines treated with AA, MMC and FA was investigated. TCR/NER pathways are involved in repairing FA induced DPCs, but less in AA-induced DPCs. Our preliminary data suggest that DPCs are weaker inducers of SCEs in comparison with ICLs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

DNA crosslinking agents are among the most widely used and most effective anticancer agents, either as single agent or as part of many combination chemotherapy regimens [1]. DNA crosslinking agents are clastogenic causing damage at the chromosomal level and produce chromosome loss [2]. The molecular mechanisms of crosslinks repair in mammalian cells are not completely understood.

Acetaldehyde (AA) is the primary metabolite of ethanol *in vivo* and is also an intermediate in the metabolism of sugars. AA is classified as a probable human carcinogen (B2) by the US Environmental Protection Agency [3] based on the increased incidence of nasal tumours in rats and laryngeal tumours in hamsters after chronic inhalation exposure [4–6].

AA is genotoxic and induces a broad spectrum of genetic effects. It induces mutations, chromosomal aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei and aneuploidy in cultured mammalian cells including human lymphocytes [7–11].

The reactive properties of AA are due to the electrophilic nature of its carbonyl carbon that can react readily with nucleophiles in

a variety of macromolecules, such as nucleic acids, protein and phospholipids [8,12,13].

Earlier studies performed in non-cellular system showed that AA reacts with DNA bases to form different adducts. The principal adduct was shown to be N2-ethyl-deoxiguanosine but a more lethal lesion was represented by the adduct N2-propanodeoxiguanosine that represent a precursor lesion to DNA–DNA or DNA–protein crosslinks. Among these a more lethal lesion was represented by the adduct N²-propano-deoxiguanosine (PdG). The PdG adducts are particularly interesting because they can exist in different forms (ring-opened and ring-closed) depending on the state and the structure of the DNA [14,15]. The existence of free aldehyde group, in the ring-opened form, allows the possibility to form additional, more complex DNA lesions, including DNA–DNA crosslinks and DNA–protein crosslinks (DPCs). In fact, the ring-opened form of these adducts can link the two complementary strands of DNA, leading to the formation of interstrand crosslinks, when they are located in a 5'CpG sequence [16,17]. Furthermore, the ring-opened form can also react with peptides containing lysine leading to the formation of DPCs [18]. Crosslinks are known to cause lethal consequences for a cell if unrepaired. Both ICLs and DPCs are expected to interrupt DNA metabolic processes such as replication, repair, recombination, transcription and chromatin remodelling.

However, among all the different DNA lesions induced by AA it is not clear yet the role of AA-induced crosslinks in mutagenesis and carcinogenesis. Indirect evidences, using mutant cell lines, sug-

* Corresponding author. Tel.: +39 0761357206; fax: +39 0761 357242.

E-mail address: palitti@unitus.it (F. Palitti).

¹ They contributed equally to this work.

Table 1
Cell lines used.

Cell line	Genotype	Defect	Human homologous	References
AA8	Parental			
UV4	ERCC1-	Deficient in NER	XPF	[27]
UV5	ERCC2-	Deficient in NER	XPD	[28]
UV61	ERCC6-	Deficient in TCR	CSB	[29]
KO40	FANCG-	Deficient in crosslinks repair	FANCG	[30]

gested that AA could form crosslinks *in vivo* [13,19,20]. Recently it has been shown that cells deficient in homologous recombination repair (HRR) and Fanconi anemia like (KO40) cells were more sensitive to AA, suggesting that these pathways are very important for the repair of AA-induced lesions, confirming the evidence that this agent may induce crosslinks [21].

In this paper we have used a modification of the standard protocol for comet assay [22] to verify the effective induction of crosslinks by AA. Furthermore, we comparatively tested AA with two other crosslinking agents: formaldehyde (FA) and mitomycin C (MMC) to find out whether the mechanisms of action of AA resemble more MMC or FA. FA reacts with DNA producing DNA–protein crosslinks as a primary DNA lesion [23,24] whereas MMC form DNA–DNA crosslinks (ICL) between the N-2 of guanines at (CpG) sequences in addition to monoadducts at the N-7 and N-2 of guanine [25,26].

In addition, we investigated a possible correlation between the types of induced crosslinks, the relative importance of their repair in resolving the lesions and the induction of chromosome damage in different repair deficient mutant Chinese hamster ovary cell lines treated with AA, MMC and FA.

2. Material and methods

2.1. Cell lines

Parental CHO cells (AA8) and their mutants deficient in different DNA repair pathways: nucleotide excision repair (UV4 and UV5), transcription coupled repair (UV61) and repair of crosslinks (KO40) were used (Table 1). These cell lines were isolated and kindly provided by Dr. L.H. Thompson.

2.2. Cell culture and treatment

AA8, UV5 and UV61 cells were cultured in F10 medium (GIBCO, Italy), UV4 cell was cultured in D-MEM medium (GIBCO, Italy), KO40 was cultured in MEM. All the media were supplemented with 10% foetal calf serum (GIBCO, Italy) and antibiotics (Biowhittaker, Cambrex, Italy). 5-Bromodeoxyuridine (BrdUrd) was purchased from Sigma (Italy), AA from Carlo Erba, FA from Sigma (Italy) and MMC from Sigma (Italy). Preliminary experiments were performed to define the appropriate treatment conditions; for all three chemicals (clonogenic assay, data not shown). The following protocol, allowing the scoring of both chromosomal aberrations (CAs) and sister chromatid exchanges (SCEs) in the first mitosis after treatment [31,32], was employed. Cells were grown in medium containing BrdUrd (6 µg/ml) for one cell cycle prior to the specific treatment.

For treatment, AA was diluted in cold (+4 °C) phosphate-buffered saline solution (PBS) in glass tube and maintained on ice till use to prevent premature evaporation of AA which boils at 20.2 °C. The cells were washed two times with PBS and transferred to fresh complete medium (medium with 10% foetal calf serum) at room temperature (18 °C). The cells were treated with four different final concentrations (1.0, 1.8, 2.5 and 3.6 mM). The treatment was performed at 37 °C in an incubator in culture bottles with caps closed for 2 h. Under these experimental conditions, reproducible results could be obtained.

For the FA treatment the chemical was diluted in PBS in glass tube before treatment. The cells were washed two times with PBS, transferred to fresh complete medium and then treated with four different final concentrations (150, 200, 250 and 300 µM) for 2 h at 37 °C.

For the MMC treatment the chemical was diluted in sterile distilled water in glass tube, to obtained aliquot of stock solution stored at –20 °C. The cells were washed two times with PBS, transferred to fresh complete medium and then treated with three different final concentrations (0.5, 1 and 3.5 µM) for 1 h at 37 °C.

After the treatment the cells were washed two times in PBS and allowed to recover for different times depending on the cell line to compensate for cell cycle delay encountered in the mutant cells.

2.3. Cytological preparations

Colcemid (0.2 µg/ml) was added for the final 3 h before cell harvesting. Cells were then detached from the flasks, collected by centrifugation, exposed to hypotonic salt solution (1% citric acid) for 8 min, and fixed in methanol: acetic acid (3:1). Cells in fresh fixative were dropped onto clean slides and allowed to dry. Air-dried slides were processed according to the FPG (Fluorochrome Plus Giemsa) method [33] to evaluate cell cycle progression and the frequencies of both CAs and SCEs.

Scoring of CAs and SCEs was made on 100 and 25 randomly selected complete metaphases from each culture, respectively. In some mutant cell lines, in some cases only 50 cells was scored due to low mitotic indexes, especially at higher doses (Table 2). To determine the proliferation, 100 metaphases from each culture were scored with regard to staining pattern to determine the percentages of second mitoses (M₂). Mitotic index (MI) was calculated on 1000 cells. All analyses were carried out on coded slides.

Resulted are presented a mean values of pooled data from three independent experiments ±SE of the mean.

Statistical analysis was made employing Student's *t*-test for determining the significance of differences between the in the frequencies of CAs following treatment with different concentrations of agents.

2.4. Comet assay

The comet assay is based on the difference in electrophoresis mobility of super coiled and relaxed (by breaks) loops of genomic DNA from single cells. The DNA in relaxed loops migrates in an electrophoresis field forming a tail relative to the “head” of non-migrating unbroken DNA [34,35].

For the detection of crosslinks, a modification of alkaline version of the comet assay was performed [22]. Cultures (treated with a crosslinking agent or untreated controls) were detached from the flasks and kept on ice to inhibit repair. About 10⁴ cells in 10 µl were mixed with 120 µl of LMA (0.5%) and added to a slide percolated with agarose. Lysis (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10% Tris, pH 10; 1% Triton and 10% DMSO were added fresh) was performed overnight at 4 °C. The slide were then exposed to 5 Gy with 250 kV and 6 mA (Gilardoni MGL200/8D X-ray apparatus) at a dose rate of 60 cGy/min. Slides were then placed in an electrophoresis chamber, exposed to alkali (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 30 min, then electrophoresis was performed for 30 min at 25 V (0.86 V/cm) and 300 mA. Slides were neutralized, dried, stained with ethidium bromide (20 µg/ml), and analyzed using a fluorescence microscope (Axioskop 2, Zeiss) and image analysis (Comet Assay III; Perceptive Instrumentes, UK). 100 cells per slide were evaluated and the mean of tail moment (TM) was determined. The value of reduction of the TM, caused by crosslink was expressed as percentage relative to damage induced by 5 Gy X-radiation, representing the 100%. This value was reported as relative tail moment (RTM). The RTM was used as a measure of DNA crosslink damage (ICLs and DPCs). The induction of crosslink was analysed by comparing the tail moment of the irradiated treated AA8 cells with that of only irradiated control cells. To discriminate between DPC and ICLs, we performed a proteinase-K treatment [22]. After irradiation, slides were washed three times with PBS, then covered with 100 µl proteinase-K (0.5 mg/ml in lysis solution and 1% Triton) and incubated for 1 h in a moist chamber at 37 °C. Controls were incubated with 100 µl of lysis solution and 1% Triton only. After removing the cover slip, slides were processed as usual.

The experiments were performed three times under the same conditions and each time the slides were coded before evaluation. Furthermore, for each series of experiments, differences between the effects of different agent concentrations were tested for statistical significance using one-way ANOVA followed by a Student's *t*-test for comparison of chemical exposed cultures with the control (X-irradiated sample minus unirradiated untreated sample). Statistical analysis is based on the cell culture as experimental unit.

3. Results

3.1. AA mainly induces DNA–protein crosslinks

The comet assay allows a sensitive detection of DNA damage at the level of individual cells, but standard comet assay protocols are not able to reliably detect crosslinks. To address this limitation, modifications to the standard alkaline comet protocol have been proposed, in which cells are treated with a combination of crosslinking agents and agents that induce DNA strand breaks. Hence, the extent of DNA crosslinking by a particular agent can be indirectly measured by analysing the relative reduction of DNA migration induced by a strand-breaking agent [36,37]. This methodology has been successfully used to investigate the induction of crosslinks by FA and MMC [38].

Using this methodology we compared the reduction of DNA migration, induced by AA, in AA8 cell line, with that induced by two other crosslinking agents, such as FA and MMC.

Table 2Frequencies of CAs, second division cells (M₂) and mitotic indexes (MI) following treatment of cells with crosslinking agents.

	AA	%Abnormal cells	Chromatid breaks	Chromatid exchanges	Isochromatid breaks	Aberr./cell	%MI	%M2 cells
AA8	C	1	1	0	0	0.01	16	99
	1 mM	14	6	8	2	0.16*	15	90
	1.8 mM	16	6	12	2	0.2*	12	72
	2.5 mM	50	5	47	4	0.56*	10	58
	3.6 mM						6	No M2
UV4	C	5	3	1	1	0.05	18	100
	1 mM	41	5	39	5	0.49*	10	78
	1.8 mM	60	8	64	8	0.8*	9	47
	2.5 mM						7	No M2
	3.6 mM						3	No M2
UV5	C	4	2	1	1	0.04	13	100
	1 mM	7	1	5	2	0.08	8	66
	1.8 mM	14	6	6	4	0.16**	8	40
	2.5 mM						7	No M2
	3.6 mM						1	No M2
UV61	C	3	3	0	0	0.03	15	100
	1 mM	7	2	6	1	0.09	13	99
	1.8 mM	17	6	11	3	0.2*	10	91
	2.5 mM	37	13	30	3	0.46*	6	58
	3.6 mM						2	No M2
KO40	C	3	3	0	0	0.03	13	100
	1 mM	32	10	32	9	0.51*	8	97
	1.8 mM	65	27	72	11	1.1*	6	94
	2.5 mM	66	15	95	26	1.36*	5	40
	3.6 mM						2	12
AA8	C	1	1	0	0	0.01	16	99
	150 µM	11	2	8	5	0.15**	13	98
	200 µM	15	5	25	1	0.31*	13	85
	250 µM	16	6	27	2	0.35*	13	62
	300 µM	26	2	59	8	0.69*	8	25
UV4	C	5	3	1	1	0.05	18	100
	150 µM	17	2	18	3	0.23**	18	100
	200 µM	41	10	60	7	0.77*	17	98
	250 µM	50	4	85	6	0.95*	17	92
	300 µM	65	4	157	20	1.81*	15	87
UV5	C	4	2	1	1	0.04	13	100
	150 µM	15	2	19	1	0.22**	13	97
	200 µM	27	3	31	6	0.4*	11	48
	250 µM	31	3	42	7	0.52*	8	23
	300 µM						3	No M2
UV61	C	3	3	0	0	0.03	15	100
	150 µM	15	3	21	3	0.27**	12	100
	200 µM	41	3	38	3	0.44*	11	98
	250 µM							No M2
	300 µM							No M2
KO40	C	3	3	0	0	0.03	13	100
	150 µM	5	2	7	0	0.09	13	100
	200 µM	19	2	23	5	0.3*	11	100
	250 µM	31	7	45	4	0.56*	11	98
	300 µM	43	2	75	4	0.81*	9	95
AA8	C	1	1	0	0	0.01	16	99
	0.5 µM	8	3	6	1	0.1**	9	80
	1 µM	8	0	10	0	0.1**	9	80
	3.5 µM					Unscorable	7	45
UV4	C	5	3	1	1	0.05	18	100
	0.5 µM	98	66	228	0	5.88*	7	93
	1 µM					Unscorable	4	90
	3.5 µM					Unscorable	2	70
UV5	C	4	2	1	1	0.04	13	100
	0.5 µM	25	9	23	2	0.34*	7	100
	1 µM	65	21	96	2	1.09*	4	80
	3.5 µM					Unscorable	1	50

Table 2 (Continued)

	AA	%Abnormal cells	Chromatid breaks	Chromatid exchanges	Isochromatid breaks	Aberr./cell	%MI	%M2 cells
UV61	C	3	3	0	0	0.03	15	100
	0.5 μ M	25	21	21	1	0.43*	11	100
	1 μ M	32	11	43	2	0.56*	5	98
	3.5 μ M					Unscorable	4	97
KO40	C	3	3	0	0	0.03	13	100
	0.5 μ M	15	2	35	0	0.37*	12	96
	1 μ M	54	2	101	2	1.05*	11	94
	3.5 μ M					Unscorable	5	90

Results are expressed as mean of three independent experiments.

* $p < 0.001$.

** $p < 0.05$.

A clear reduction in DNA migration was observed with increasing doses of AA (Fig. 1a). A statistically significant reduction was observed starting at 0.6 mM.

Fig. 1b shows a dose–response curve of AA8 cell line treated with different doses of FA. FA caused a concentration-related decrease in X-irradiation induced DNA migration with a statistically significant reduction at 125 μ M. At 300 μ M FA, DNA migration was almost completely inhibited.

Fig. 1c shows a dose response of AA8 cells treated with different doses of MMC. MMC caused a concentration-related decrease in X-irradiation induced DNA migration with a statistically significant reduction at 3.5 μ M.

The results in Fig. 1 confirm that AA, as well as FA and MMC, induced crosslinks. For all the three agents studied, a dose effect in reduction of tail movement was observed, even if the reduction of radiation-induced DNA migration produced by the treatment with 3.6 mM of AA was statistically significant the crosslinking effect of FA was much stronger. To further discriminate the nature of crosslinks induced by AA we used a proteinase-K (PK) treatment.

Fig. 2 shows the effect of treatment with PK on the DNA migration of irradiated AA8 cells pre-treated with different crosslinking agents. The doses used for the three chemicals were, 2.5 mM AA, 125 μ M FA and 3.5 μ M MMC. At these doses the reduction of the relative tail moment was at least 30%.

The PK treatment partially abolishes FA and AA-induced reduction in DNA migration, but it has no effects on MMC induced migration. Treatment with PK alone had no effect on DNA migration.

3.2. Chromosomal aberrations

We analyzed the induction of CAs to find out if there is a correlation between chromosomal damage and the type of crosslink induced. We compared the AA-induced CAs with those induced by the other two crosslinking agents.

The spontaneous frequency of CAs was different between cell lines, DNA repair deficient cells having higher frequencies than the parental ones (AA8). AA8 cells had a mean of 1 aberration, per 100 cells. A mean of 5, 4, 3 and 3 aberrations per 100 cells were observed in UV4, UV5, UV61 and KO40, respectively.

The results on the frequencies of CAs, mitotic indices and the percentage of second mitoses (M_2) induced by AA, FA and MMC are presented in Table 2. The percentage of M_2 was compared between AA and the other two chemicals, FA and MMC, in all the mutant cell lines. This value decreased in a similar manner in the parental cell line (AA8) whereas significant differences were observed in mutant cell lines. A pronounced reduction in proliferation index was observed in NER/TCR mutant cell lines (UV5, UV61) when treated with AA and FA, whereas MMC treatment did not cause any reduction in proliferation at the doses used.

Concerning the type of CAs induced by ICLs or DPCs we found no differences. All the three chemicals, behave as typically S depen-

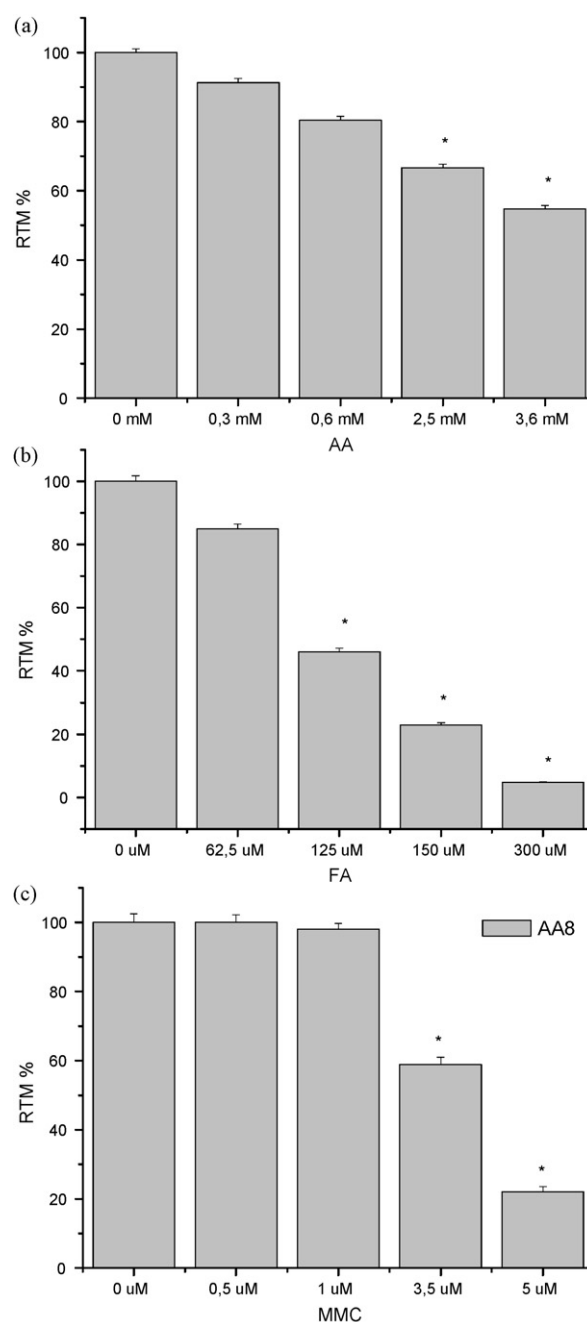


Fig. 1. Detection of treatment-induced crosslinks in AA8 cells by the comet assay. Reduction of X-ray-induced (5 Gy) DNA migration after a 2 h treatment with AA (a), 2 h treatment with FA (b) and 1 h treatment with MMC (c). Results are expressed as a percentage, i.e. 100% represents the effect of irradiation alone. * $p < 0.001$.

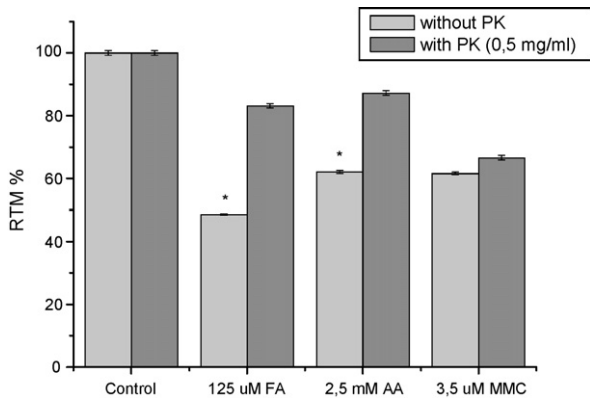


Fig. 2. The effect of treatment with proteinase-K (PK) on DNA migration of irradiated AA8 cells pre-treated with different crosslinkers. Results are expressed as a percentage, i.e. 100% represents the effect of irradiation alone. * $p < 0.001$.

dent agents, the chromosomal aberrations induced were only of chromatid-type and among these the chromatid-type exchanges were the most frequent.

Concerning AA treatment, there was a dose dependent increase in CAs in all cell lines. However, only UV4 and KO40 cells showed a dramatic sensitivity when compared with the parental cells AA8.

We obtained a dose dependent increase in all cell lines after treatment with FA. Interestingly, the UV4 cells were the most sensitive to this agent, while the other mutant cell lines showed a mild sensitivity when compared to the parental one. Finally, all the mutant cell lines evidenced a strong sensitivity to MMC, when compared to AA8 cells.

In order to evaluate the relative sensitivity of CAs induction in different cell lines treated with the same agent and to better compare the effect of three different agents on the same cell line we used the sensitivity formula (F_{Ab}).

$$F_{Ab} = \frac{\text{Total Ab. } X_{\text{cell line (treated)}} - \text{Total Ab. } X_{\text{cell line (C)}}}{\text{Total Ab. AA8 (treated)} - \text{Total Ab. AA8 (C)}}$$

The F_{Ab} was calculated in the following way: the increase of abnormal cells in the mutant cell line (X) over the corresponding control (C) in comparison to the increase of abnormal cells in the parental cell line over their control (C).

We chose a dose that for the three chemicals induced a similar reduction (<20%) of the proliferation in the wild type cell line and proliferation at least higher than 35% in the other cell lines. For what concerns the AA we considered the 1 mM dose, for FA 200 μ M and for MMC 1 μ M. The application of the formula gives the ranking reported in Table 3. The ranking showed a significant difference in the sensitivity of the different cell lines to the three chemicals. UV4 cell line, resulted hypersensitive to MMC, and also to the other two chemicals, confirming the involvement of ERCC1 in the resolution of ICLs [39] and of DPCs.

3.3. Sister chromatid exchanges

We studied the induction of SCEs to investigate a possible correlation between the type of crosslinks and recombination events. The frequencies of SCEs induced by the three chemicals in the different cell lines are presented in Fig. 3a–c. Respective control values were deducted for each cell lines. The frequency of SCEs is increased after treatment with AA, MMC, FA in a dose-related manner.

Fig. 3a showed the induction of SCEs in all cell lines after AA treatment. AA8, UV61, UV5 and KO40 cell lines show a dose related increase in the frequencies of SCEs. Interestingly, UV4 cells do not exhibit any increase in SCEs compared to the parental cell lines. At 2.5 mM no cells in second division were found in UV4 and UV5 cell

Table 3

(a) Relative sensitivity values for induction of CAs and SCEs with crosslinking drugs and (b) ranking for the induction of CAs.

	F(Ab)		FA
	AA	MMC	
(a)			
AA8	1	1	1
UV4	2.75	∞	2.4
UV5	0.25	11.67	1.2
UV61	0.37	5.89	1.37
KO40	3	11.34	0.9
	F(SCE)		FA
	AA	MMC	
(a)			
AA8	1	1	1
UV4	0.89	∞	1.24
UV5	1.44	1.28	1.22
UV61	1.32	1.66	1.13
KO40	1.14	1.77	0.98
(b)			
KO40 _{AA} ~ UV4 _{AA} > AA8 > UV61 _{AA} ~ UV5 _{AA}			
UV4 _{FA} > UV61 _{FA} ~ UV5 _{FA} > AA8 > KO40 _{FA}			
UV4 _{MMC} ≫ UV5 _{MMC} ~ KO40 _{MMC} > UV61 _{MMC} > AA8			

lines, the former being highly damaged and the latter presumably delayed in the progression through the cell cycle.

Fig. 3b and c shows the frequencies of SCEs after treatment with FA and MMC, respectively. Both treatments induced a dose related increase in the frequencies of SCEs in all cell lines, except KO40 that showed only a marginal enhancement when treated with FA.

In order to evaluate the relative sensitivity of SCEs induction in different cell lines treated with the same agent and to better compare the effect of three different agents on the same cell line we used the sensitivity formula (F_{SCE}).

We compared the sensitivity to the induction of SCEs using the same concentration chosen to analyse the chromosomal aberrations. At these doses, 1 mM, 1 μ M and 200 μ M, respectively, for AA, MMC and FA the sensitivity formula for SCEs (F_{SCE}) (increase in treated induced frequencies of SCEs in the mutant cell lines (X) over its control (C) in comparison to the increase in treated induced SCEs in the parental cell lines AA8 over its control (C)) was applied.

$$F_{SCE} = \frac{\text{SCE } X_{\text{cell line (treated)}} - \text{SCE } X_{\text{cell line (C)}}}{\text{SCE AA8 (treated)} - \text{SCE AA8 (C)}}$$

Except for the UV4 cells treated with MMC only marginal differences in sensitivity (from 0.89 to 1.77 times) (Table 3) were found among the different cell lines.

Among the crosslinking agents studied, MMC was the strongest inducer of SCE; in all cell lines at 1 μ M we obtained a dramatic increase of SCEs/cell compared to the equitoxic dose of FA and AA (200 μ M and 1 mM, respectively, Fig. 3).

In AA8 cell line we found an increase of 32.76 SCE/cell after MMC treatment, an increase of 9.7 SCE/cell after AA and 7.76 after FA. In UV4 cell line we found an increase of 8.6; 9.6; >40 SCE/cell after treatment with AA, FA and MMC, respectively. In UV5 cell line an increase of 14; 9.52 and 41.96 SCEs/cell is found whereas in UV61 the increase is 12.8; 8.76 and 54.4 SCE/cell and in KO40 was 11.1; 7.64 and 58 SCEs/cell after treatment with AA, FA and MMC, respectively.

4. Discussion

The molecular mechanisms of DNA crosslinks repair in mammalian cells are not completely understood. In this regard, AA is

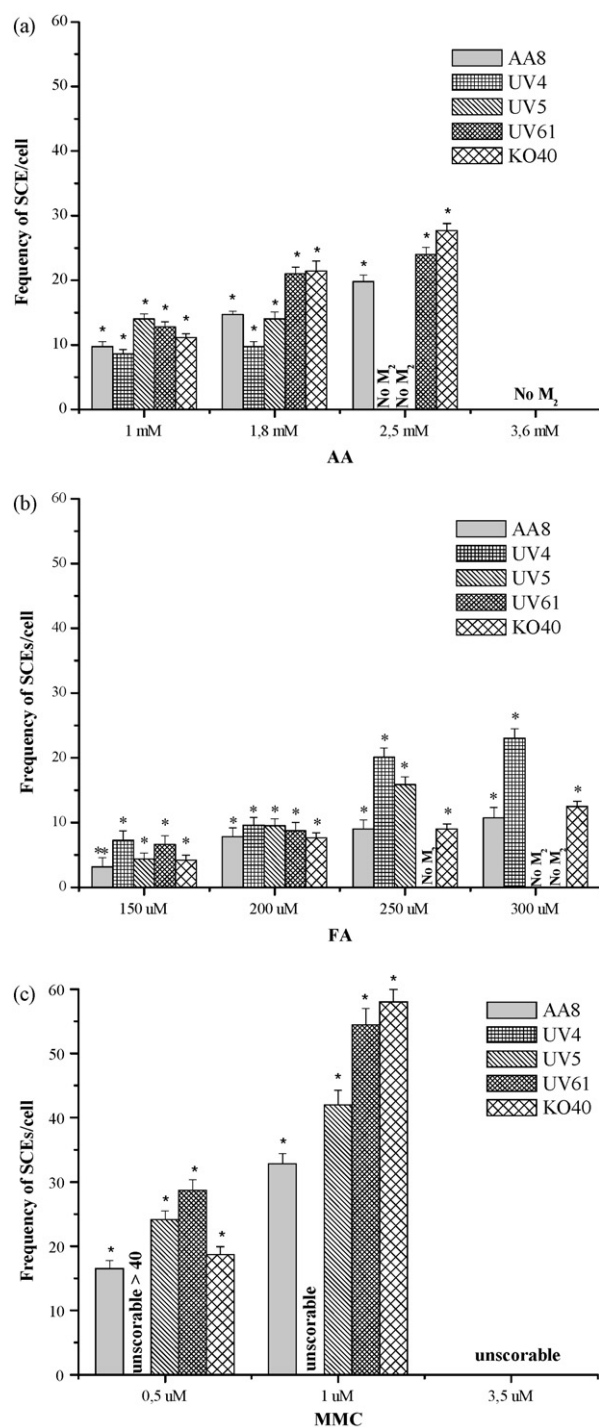


Fig. 3. A comparative study of induction of SCEs after 2 h treatment with AA (a), 2 h treatment with FA (b) and 1 h treatment with MMC (c). Control values were deducted. Results are expressed as mean of three independent experiments $\pm$ SEM; * $p < 0.001$; ** $p < 0.05$.

considered a putative inducer of DNA crosslinks even though none of these data have arisen from direct experimental evidences using a cellular system. The nature of the crosslinks induced by AA, and their biological significance are not clear.

At present, the possibilities to detect DNA crosslinks is not easy because either, the methods used, alkaline elution technique and comet assay, are characterized by a low sensitivity or crosslinking agents induce also other types of DNA lesions. Using a modified protocol of comet assay, we showed that AA induces DNA crosslinks.

AA treatment caused a decrease in tail moment although in comparison to FA and MMC, well-known crosslinking agents [40–42], was much less pronounced.

In the literature several reports exist that suggested that AA can induced both DPCs and ICLs. Morris [4] has shown that AA reacts with nasal DNA to form DPCs and DNA–DNA crosslinks. Furthermore, chemical evidences suggested that the open ring of PdG adduct, one of the product of reaction of AA and DNA, can react with both DNA and peptides leading to the formation of ICLs and DPCs, respectively [18]. In order to discriminate the type of crosslinks induced by AA we used a combination of alkaline comet version and proteinase-K. Proteinase-K, eliminating DPCs, restores DNA migration in comet assay.

We found that proteinase-K treatment clearly abolishes AA and FA induced reduction in DNA migration, whereas it had no effect on DNA migration in MMC treated cells (Fig. 2). It might then be concluded that the main type of induced crosslink by AA is the DPC. Data regarding FA and MMC are in agreement with those obtained by Merk and Speit [38].

Up to now not much is known about the repair of DPCs in mammalian cells and it is unclear whether different types of DPCs are repaired in a similar manner.

Assuming that chromosomal aberrations are the results of DNA misrepair, employing mutant cell lines deficient in different DNA repair pathways, such as TCR, NER and crosslink repair (Fanconi anemia like, fanc G) we found that TCR/NER pathways are involved in repairing FA induced DPCs, but less in AA-induced DPCs (Table 3). The chemical nature of the covalent linkage, the DNA structure at the site of the linkage and the identity of the crosslinked protein might explain the different behaviour of the two crosslinkers [43]. The increase of CAs induced by FA and MMC in NER deficient cell lines is in accordance with data obtained by Speit et al. [44] who found an enhancement of FA and MMC induced micronuclei in NER deficient cells.

The highest sensitivity showed by UV4 cell line to AA, FA and MMC could be ascribed to the fact that ERCC1 is not only involved in NER but also play universal role in the repair of any kind of crosslinks. This corresponds to what already known about the importance of ERCC1 and HR repair proteins in resolving mammalian DNA crosslink [45].

Furthermore the finding that Fanconi anemia like cells are very sensitive to AA but less to FA suggests that AA might also induce ICLs.

Despite all the three agents are high inducers of CAs; only MMC is a stronger inducer of SCEs. This suggests that DPCs are weaker inducer of SCEs in comparison with ICLs (Fig. 3 and Table 2).

Wolff and Afzal [46] indicated that SCEs are actually related to an unrepaired crosslinks. If SCEs induction by the three different types of crosslinking agents would be due to the production of DNA crosslinks, we would expect to find a reduction in tail moment (TM) at the doses at which increase in the frequencies of SCEs occurs. We found that MMC induces SCEs at doses much lower than those causing a reduction of the TM, this finding is not evident in the case of FA, where on the contrary TM reduction is not associated with increase of SCEs. Concerning the AA results, the association between reduction of TM and increase of SCEs is not well correlated.

All three chemicals were strong inducers of CAs, among these chromatid exchanges are the predominant type of induced chromosomal aberrations; and since the increase of this type of aberration does not follow the increase in SCEs, it indicates that the mechanisms involved in their formation must be different.

Our study points out that the biological effects of DNA crosslinking agents, measured as CAs and SCEs depend on the type of crosslink (DPCs and ICLs) and the DNA repair involved. Furthermore, sensitivity of the comet assay is dependent on the type of

lesion since SCEs are induced at doses of MMC that do not cause any reduction of TM.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

CLG and MM contributed equally to this work. This paper is dedicated to Prof. A.T. Natarajan on the occasion of his 80th birthday. This work was supported by AIRC grant and University of Tuscia.

References

- [1] P.J. McHugh, V.J. Spaniswich, J.A. Hartley, Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance, *Lancet Oncol.* 2 (8) (2001) 483–490 (Review).
- [2] E.W. Vogel, M.J. Nivard, L.A. Ballering, H. Bartsch, A. Barbin, J. Nair, M.A. Comendador, L.M. Sierra, L. Aguiñezabalaga, L. Tosal, J. Engelbergs, R.P. Fuchs, R. Janel-Bintz, G. Maenhaut-Michel, R. Montesano, J. Hall, H. Kang, M. Miele, J. Thomale, K. Bender, J. Engelbergs, M.F. Rajewsky, DNA damage and repair in mutagenesis and carcinogenesis: implication of structure-activity relationships for cross-species extrapolation, *Mutat. Res.* 353 (1996) 177–218.
- [3] IRIS, Acetaldehyde, in: Integrated Risk Information System, US E.P.A., 1996.
- [4] J.B. Morris, Dosimetry, toxicity and carcinogenicity of inspired acetaldehyde in the rat, *Mutat. Res.* 38 (1997) 113–124.
- [5] R.A. Woutersen, L.M. Appelman, A. Van Garderen-Hoetmer, V.J. Feron, Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study, *Toxicology* 41 (1986) 213–231.
- [6] V.J. Feron, A. Kruijsse, R.A. Woutersen, Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18 (1982) 13–31.
- [7] IARC, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human, Volume 71, Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide (Part Two), International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1999.
- [8] H. Ristow, G. Obe, Acetaldehyde induces cross-links in DNA and causes sister-chromatid exchanges in human cells, *Mutat. Res.* 58 (1978) 115–119.
- [9] G. Obe, A.T. Natarajan, M. Meyers, A. Den Hertog, Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCE's in bone-marrow cells in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde, *Mutat. Res.* 68 (1979) 291–294.
- [10] R.P. Bird, H.H. Draper, P.K. Basrur, Effect of malnaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells; production of micronuclei and chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* 101 (1982) 237–246.
- [11] F.N. Dulout, C.C. Furnus, Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells, *Mutagenesis* 3 (3) (1988) 207–211.
- [12] V.L. Dellarco, A mutagenicity assessment of acetaldehyde, *Mutat. Res.* 195 (1988) 1–20.
- [13] B. Lambert, Y. Chen, S.M. He, M. Sten, DNA cross-links in human leucocytes treated with vinyl acetate and acetaldehyde in vitro, *Mutat. Res.* 146 (1985) 301–303.
- [14] C. De los Santos, T. Zalitznyak, F. Johnson, NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct γ -OH-1,N²-propano-2'-deoxyguanosine, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 9077–9082.
- [15] H. Mao, N.C. Schnetz-Boutaud, J.P. Weisenseel, L.J. Marnett, M.P. Stone, Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 6615–6620.
- [16] I.D. Kozekov, L.V. Nechev, A. Sanchez, C.M. Harris, R.S. Loyd, T.M. Harris, Inter-chain cross-linking of DNA mediated by the principal adduct of acrolein, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1482–1485.
- [17] I.D. Kozekov, L.V. Nechev, M.S. Moseley, C.M. Harris, C.J. Rizzo, M.P. Stone, T.M. Harris, DNA interchain crosslinks formed by acrolein and crotonaldehyde, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 50–61.
- [18] A.J. Kurtz, R.S. Loyd, 1,N²-deoxyguanosine adducts of acrolein, crotonaldehyde, and trans-4-hydroxynonenal crosslink to peptides via Schiff base linkage, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5970–5976.
- [19] S.S. Hecht, E.J. McIontee, M. Wang, New DNA adduction of carbonaldehyde and acetaldehyde, *Toxicology* 165 (2001) 31–36.
- [20] X. Liu, Y. Lao, I.Y. Tang, S.S. Hecht, M. Moriya, Replication-coupled repair of crotonaldehyde/acetaldehyde-induced guanine-guanine interstrand cross-links and their mutagenicity, *Biochemistry* 45 (2006) 12898–12905.
- [21] M. Mechilli, A. Schinoppi, K. Kobos, A.T. Natarajan, F. Palitti, DNA repair deficiency and acetaldehyde-induced chromosomal alterations in CHO cells, *Mutagenesis* 23 (1) (2008) 51–56.
- [22] O. Merk, G. Speit, Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen.* 32 (1998) 260–268.
- [23] M. Casanova, K.T. Morgant, E.A. Gross, O.R. Moss, H.A. Heck, DNA-protein cross-links and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde, *Fundam. Appl. Toxicol.* 23 (4) (1994) 525–536.
- [24] C.C. Conaway, J. Whysner, L.K. Verna, G.M. Williams, Formaldehyde mechanistic data risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation, *Pharmacol. Ther.* 71 (1–2) (1996) 29–55, Review.
- [25] M. Tomatz, DNA adducts of the mitomycins, in: K. Hemminki, A. Dipple, D.E.G. Shuker, F.F. Kadlubar, D. Segerback, H. Bartsch (Eds.), *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, IARC, Lyon, 1994, pp. 349–357.
- [26] M. Tomatz, The mitomycins: natural cross-linkers of DNA, in: S. Neidle, M. Waring (Eds.), *Molecular Aspects of Anticancerdrug-DNA Interactions*, vol. 2, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, pp. 313–349.
- [27] A. Westerveld, J.H.J. Hoeijmaker, M. van Duin, J. de Wit, H. Odijk, A. Pastink, R.D. Wood, D. Bootsma, Molecular cloning of a human DNA repair gene, *Nature* 310 (1984) 425–429.
- [28] C.A. Weber, E.P. Salarzar, S.A. Stewart, L.H. Thompson, Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2 that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cells, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 1137–1146.
- [29] C. Troeslstra, H. Odijk, J. de Wit, A. Westerveld, L.H. Thompson, H. Bootsma, J.H.J. Hoeijmakers, Molecular cloning of the human DNA repair gene ERCC6, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 5806–5813.
- [30] R. Tebbis, J.M. Hinz, N.A. Yamada, J.B. Wilson, E.P. Salazar, C.B. Thomas, I.M. Jones, N.J. Jones, L.H. Thompson, New insights into the Fanconi anemia pathway from an isogenic FancG hamster CHO mutant, *DNA Repair* 4 (2005) 11–22.
- [31] F. Palitti, A. Becchetti, Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells, *Mutat. Res.* 45 (1977) 157–159.
- [32] A.T. Natarajan, A.D. Bates, M. Meijers, I. Neuteboom, N. de Vogel, Induction of sister chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells, an evaluation of methodology for detection of SCEs persistent DNA lesions towards the frequencies of observed SCEs, *Mutat. Res.* 121 (1983) 211–223.
- [33] P. Perry, S. Wolff, New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 251 (1974) 156–158.
- [34] K.J. Angelis, M. Dusinska, A.R. Collins, Single cell gel electrophoresis: detection of DANN damage at different levels of sensitivity, *Electrophoresis* 20 (1999) 2133–2138.
- [35] A. Rothfuss, M. Grompe, Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of Fanconi anemia/BRCA pathway, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 123–134.
- [36] P.L. Oive, D. Wlodek, R.E. Durand, J.P. Banath, Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Exp. Cell Res.* 198 (2) (1992) 259–267.
- [37] S. Pfuhler, U. Wolf, Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 196–201.
- [38] O. Merk, G. Speit, Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environ. Mol. Mutagen.* 33 (1999) 167–172.
- [39] I.U. De Silva, P.J. McHugh, P.H. Clingen, J.A. Hartley, Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 7980–7990.
- [40] M. Casanova, K.T. Morgan, W.H. Steinhagen, J.I. Everitt, J.A. Popp, H.D. Heck, Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the respiratory tract of rhesus monkey: pharmacokinetics, ratto-monkey interspecies scaling, and extrapolation to man, *Fundam. Appl. Toxicol.* 17 (1991) 409–420.
- [41] M. Tomasz, Mitomycin C: small fast and deadly (but very fast selective), *Chem. Biol.* 2 (1995) 575–579.
- [42] G.S. Kumar, R. Lipman, J. Cummings, M. Tomasz, Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase: revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C, *Biochemistry* 36 (1997) 14128–14136.
- [43] J.T. Reardon, Y. Cheng, A. Sancar, Repair of DNA-protein cross-links in mammalian cells, *Cell Cycle* 5 (13) (2006) 1366–1370 (Review).
- [44] G. Speit, P. Shutz, M. Oliver, Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines, *Mutagenesis* 15 (1) (2000) 85–90.
- [45] M. Cummings, K. Higginbottom, C. McGrk, O.G.W. Wong, B. Koberle, R.T.D. Oliver, J.R. Masters, XPA versus ERCC1 as chemosensing agents to cisplatin in homologous recombination repair, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 166–175.
- [46] S. Wolff, V. Afzal, Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreplicated cells to track sister-chromatid exchanges induced by cross-links, alkylations, or X-ray damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 5765–5769.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli agenti *cross-links* sono tra gli agenti anticancro più usati e più efficaci, sia singolarmente sia come parte di numerose combinazioni con altri reagenti chemioterapici. Gli agenti *cross-links* causano il danno a livello cromosomico. Il meccanismo molecolare della riparazione dei *cross-links* al DNA nelle cellule di mammifero non è completamente noto come anche gli agenti che inducono tali lesioni.

L'acetaldeide (AA) è il principale metabolita dell'etanolo, è genotossica e induce un'ampia gamma di effetti genetici come le mutazioni geniche, le aberrazioni cromosomiche, gli scambi cromatidici fratelli (SCE), i micronuclei ed eventi di aneuploidia in cellule di mammifero.

La natura dei *cross-links* indotti dall'AA e il loro significato biologico non sono ben chiari. Il rilevamento dei *cross-links* non è facile sia per via del metodo usato, *Comet Assay*, che è caratterizzato da una bassa sensibilità, sia perché gli agenti *crosslinking* possono indurre anche altri tipi di lesioni al DNA. Quindi, usando un protocollo modificato del *Comet Assay* abbiamo dimostrato l'induzione dei *cross-links* al DNA da parte dell'AA.

Inoltre, per distinguere tra l'ICLs e il DPCs, abbiamo usato una combinazione della versione alcalina del *Comet Assay* con la proteinasi K. La proteinasi K, digerendo le proteine legate covalentemente al DNA (DPCs), ripristina la migrazione del DNA nel *Comet Assay*. E' stato trovato che il trattamento con la proteinasi K elimina la riduzione della migrazione del DNA indotta da AA e FA, al contrario non ha alcun effetto nella migrazione del DNA nelle cellule trattate con MMC. Concludendo, dai nostri dati risulta che il principale tipo di *cross-link* indotto dall'AA è il DPC (Figura 13). Mentre i dati riguardanti FA e MMC concordano con quelli ottenuti da Merk e Speit (1999).

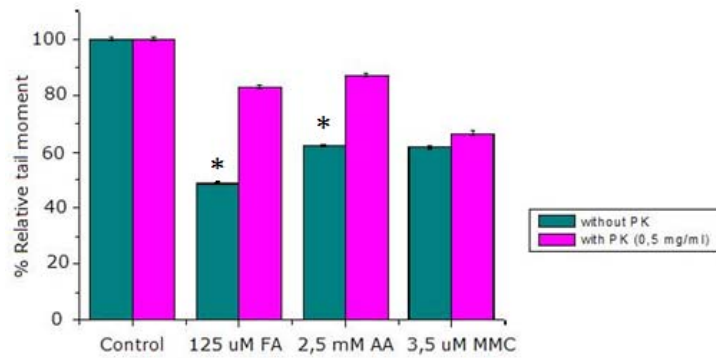


Figura 13: Effetto del trattamento con la proteinasi K sulla migrazione del DNA della linea cellulare AA8 pretrattata con differenti agenti induttori *cross-link*.

Supponendo che le aberrazioni cromosomiche siano l'effetto di un errata riparazione del DNA, dai nostri risultati emerge che le linee cellulari difettive nel TCR/NER sono coinvolte nella riparazione di DPCs indotti dalla FA, ma poco coinvolte nella riparazione di DPCs indotti dall'AA (Tabella 1).

La risposta contrastante delle due sostanze induttrici di *cross-links* può essere dovuta alla natura chimica del legame covalente, alla struttura del DNA nel punto di collegamento (Reardon et al., 2006).

Per quanto riguarda invece la relazione tra induzione di *cross-links* e SCEs i nostri dati indicano che essa dipende dal tipo di *cross-link* indotto. La mitomicina C è un forte induttore di SCEs rispetto alla formaldeide e all'acetaldeide sia nelle cellule parentali che nei mutanti da noi esaminati. Wolff e Afzar (1996) suggeriscono che gli SCEs sono il prodotto di *cross-links* non riparati.

In conclusione, il nostro studio ha evidenziato che gli effetti biologici degli agenti induttori *cross-links*, misurati come CAs e SCEs dipendono dal tipo di *cross-link* (DPCs e ICLs) e dal tipo di riparazione del DNA coinvolto.

a)

F (CAs)			
Cell line	Acetaldehyde	Mitomycin C	Formaldehyde
AA8	1	1	1
UV4	2.75	∞	2.4
UV5	0.25	11.67	1.2
UV61	0.37	5.89	1.37
KO40	3	11.34	0.9

KO40_{AA}~UV4_{AA}>AA8>UV61_{AA}~UV5_{AA}

UV4_{FA}>UV61_{FA}~UV5_{FA}>AA8>KO40_{FA}

UV4_{MMC}>>>UV5_{MMC}~KO40_{MMC}>UV61_{MMC}>AA8

b)

F (SCEs)			
Cell line	Acetaldehyde	Mitomycin C	Formaldehyde
AA8	1	1	1
UV4	0.89	∞	1.24
UV5	1.44	1.28	1.22
UV61	1.32	1.66	1.13
KO40	1.14	1.77	0.98

Tabella 1: Sensibilità relativa alle CAs (F_{CAs}) e agli SCEs (F_{SCEs}) nelle differenti linee cellulari trattati con agenti *crosslinking*.

RELAZIONE TRA DANNO AL DNA, RIPARAZIONE DEL DNA E DANNO OSSIDATIVO INDOTTO DALLA SPERMINA OSSIDASI

STRESS OSSIDATIVO

Le reazioni di ossidoriduzione avvengono in gran numero nel normale metabolismo cellulare. Tuttavia l'aumento delle specie chimiche elettronegative o l'asportazione di elettroni crea uno squilibrio nell'omeostasi della cellula che viene detto "stress ossidativo".

Lo stress ossidativo è definito come una modificazione dell'equilibrio tra fattori pro- e anti-ossidanti, in favore dei primi, che può determinare un potenziale danno (Sies, 1985; Sies, 1991).

Tuttavia risulta abbastanza arduo definire in breve lo stress ossidativo in modo esaustivo per le molteplici molecole, reazioni ed interazioni cellulari coinvolte in esso. Comunque è ormai assodata la correlazione tra lo stress ossidativo e l'insorgere di alcune patologie quali l'ipertensione arteriosa, l'ictus, l'infarto del miocardio, il morbo di Parkinson, le coliti, il diabete, la bronchite cronica, l'artrite reumatoide e numerosi tipi di neoplasie (Babior, 2000; Irani, 2000).

Radicali ossidanti e loro vie di produzione

I principali responsabili dello stress ossidativo sono radicali liberi e specie chimiche altamente reattive che hanno un alto potere ossidante. La particolarità di tali molecole è di essere instabili poiché possiedono uno o più elettroni spaiati in uno degli orbitali molecolari. La forte instabilità che contraddistingue tali molecole le induce a reagire con altre molecole per sottrarre loro un elettrone e trovare un equilibrio. I radicali ossidanti possono essere divisi in due classi in base alla loro composizione chimica: le specie radicali dell'ossigeno (ROS) e le specie radicali dell'azoto (RNS).

Anione superossido (O_2^-), perossido di idrogeno (H_2O_2), radicale ossidrilico ($OH^\cdot$) e acido ipocloroso ($HOCl$) sono le principali molecole che formano la classe di ROS. La categoria dei RNS, invece, è costituita fondamentalmente da NO e dalla specie radicale che si ottiene per ossidazione di NO, il perossinitrito ($ONOO^-$).

I ROS intracellulari possono essere prodotti da alcune reazioni metaboliche della cellula oppure dall'azione di enzimi specifici che li sintetizzano.

Gli enzimi che formano attivamente specie radicali sono:

- Ⓜ Xantina ossidasi catalizza la reazione di ossidazione della xantina ad acido urico producendo una molecola di O_2^- . In alcuni casi la xantina ossidasi riduce l' O_2 producendo H_2O_2 oltre al radicale O_2^-
- Ⓜ NADPH ossidasi genera l'anione superossido attraverso la reazione
$$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$$
- Ⓜ Superossido dismutasi (SOD) genera H_2O_2 secondo la reazione
$$2O_2^- + 2H^+ \leftrightarrow O_2 + H_2O_2$$
- Ⓜ Mieloperossidasi (MPO) utilizza H_2O_2 per produrre HOCl secondo la reazione
$$Cl^- + H_2O_2 \rightarrow OCl^- + H_2O$$
- Ⓜ Ossido nitrico sintasi (NOS) sintetizza NO a partire da L-Arg attraverso la reazione
$$L-Arg + O_2 + NADPH \rightarrow L-Citrullina + NO + NADP^+$$

La reazione di NO con O_2^- porta alla formazione di $ONOO^-$, uno dei radicali dell'azoto più reattivi.

Danni provocati dalle specie radicali ossidanti

I ROS, per via della loro natura chimica, possono interagire facilmente con l'ambiente circostante inducendo alcuni cambiamenti. Elevate concentrazioni di ROS possono comportare modificazioni chimiche che riguardano tutte le macromolecole che costituiscono le cellule provocando danni strutturali e funzionali.

Le modificazioni che hanno luogo possono interessare le proteine, i lipidi ed il DNA.

Danno alle proteine. Per quanto riguarda le proteine la loro ossidazione può avvenire in due modi, da una parte può determinare un cambiamento della struttura tridimensionale della molecola impedendone il corretto funzionamento, dall'altra può modificare il sito catalitico di un enzima impedendo il legame con il substrato. In base alla tipologia delle proteine implicate si può verificare un malfunzionamento delle reazioni metaboliche cellulari, delle vie di trasduzione del segnale o dei gradienti di membrana di diverse sostanze.

Danno ai lipidi. La reazione chimica dovuta ai radicali dell'ossigeno che avviene sulle membrane cellulari è la perossidazione dei fosfolipidi. La struttura tridimensionale dei lipidi che formano la membrana cellulare viene modificata dall'ossidazione delle molecole di natura lipidica. Tale processo causa la modifica della fluidità e della permeabilità della membrana cellulare mettendone a rischio il funzionamento.

Danno al DNA. I cambiamenti chimici dei nucleotidi che generano errori nella replicazione e rotture del filamento sono i principali tipi di danno al DNA. Il radicale ossidrilico $\text{OH}^\cdot$ gioca un ruolo molto importante nel danno al DNA da parte dei ROS, ad esempio nel caso in cui il perossido di idrogeno (H_2O_2) si trovi all'interno del nucleo, esso reagisce con ioni metallici (Fe o Cu) per formare $\text{OH}^\cdot$ (Halliwell & Aruoma, 1991). La molecola $\text{OH}^\cdot$, data la sua reattività, interagisce con tutti i costituenti del DNA quali: deossiribosio, purine e pirimidine. La sua interazione con lo scheletro zucchero-fosfato può generare degli zuccheri radicali che spezzandosi in diversi punti creano discontinuità nella catena dell'acido nucleico. Una delle mutazioni più caratteristiche è l'aggiunta di radicale idrossile in particolare in posizione 8 su una adenina o guanina. Tale alterazione può trasformarsi tramite ossidazione in 8-idrossiadenina o 8-idrossiguanina. 8-OHdG è presente in grande quantità nel DNA e sovente viene impiegato come misura del danno ossidativo (Tarng et al., 2000).

Modifiche significative della struttura delle macromolecole cellulari sono determinanti per la vita della cellula, poiché mentre danni cellulari di scarsa entità vengono riparati da complessi enzimatici idonei a ripristinare la naturale struttura molecolare, nel caso di danni più consistenti la normale struttura cellulare viene meno e la cellula muore per necrosi. In taluni casi, il susseguirsi di molteplici rotture o mutazioni del DNA causa la morte cellulare per apoptosi.

Meccanismi di difesa contro l'ossidazione

La protezione delle cellule dal danno ossidativo avviene mediante alcuni processi antiossidanti che operano in diversi modi: riducendo gli idroperossidi formati o riparando le molecole danneggiate, eliminando direttamente i ROS limitando la produzione di superossido a livello mitocondriale. Tale protezione è resa possibile all'interno delle cellule e dei tessuti da enzimi e antiossidanti di basso peso molecolare.

I principali sistemi enzimatici coinvolti nella difesa antiossidante sono:

- ④ catalasi (CAT) è una emoproteina che degrada H_2O_2 formando H_2O ed ossigeno. Tale enzima presenta una notevole attività nel fegato, nei reni, negli eritrociti e nei mitocondri del cuore. Esso si trova in alcune particelle subcellulari dette perossisomi. Con l'aumento del perossido di idrogeno si ha un incremento dell'attività enzimatica della CAT;
- ④ superossido dismutasi (SOD) che trasforma la specie più reattiva, O_2^- in H_2O_2 .
La superossido dismutasi è presente fondamentalmente in tre forme: una Mn-dipendente, localizzata nei mitocondri dove interagisce con il superossido derivato dalla catena di trasferimento elettronico. L'altra, Cu e Zn-dipendente, è localizzata nel citosol cellulare, dove svolge una funzione catalitica più generica e, l'ultima, la SOD extracellulare (ECSOD).
Per ottenere una protezione efficace ad opera della SOD, è essenziale che il perossido d'idrogeno sia rapidamente trasformato in acqua, ostacolando in tal modo la conversione dell' H_2O_2 nell'altamente tossico OH^- da parte di ioni metallici;
- ④ glutazione perossidasi (GSH-Px) che converte il H_2O_2 in H_2O , implicando una contemporanea ossidazione del glutathione ridotto (GSH) nella sua forma ossidata (GSSG); la GSH-Px inoltre catalizza la reazione di riduzione dei lipidi perossidi ai loro rispettivi alcoli.

Le più importanti molecole *scavenger* sono il glutathione (GSH) che è un forte accettore di elettroni e alcune molecole a basso peso molecolare come ad esempio l'acido ascorbico, che combinandosi con le specie altamente reattive ne limitano l'instabilità e ne ostacolano l'interazione con le macromolecole (Descamps-Latscha et al., 2001).

Inoltre, vi sono altri composti non enzimatici aventi la funzione antiossidativa, come:

- ④ Proteine ad alto peso molecolare: l'albumina, la ceruloplasmina, la transferrina e l'aptoglobina, tutte proteine plasmatiche, che legandosi ai metalli, dotati di attività riducente, limitano la produzione, per catalisi metallica, dei radicali liberi (Halliwell & Aruoma, 1991). L'albumina e la ceruloplasmina, possono legarsi agli ioni rame, mentre la transferrina, si lega preferenzialmente al ferro libero. L'aptoglobina, si lega a proteine contenenti eme e può, quindi, eliminarle dal sangue. Sia le proteine libere

che quelle associate all'eme, hanno proprietà proossidanti, dovute alla loro reazione con il perossido di idrogeno che produce specie ferrile, iniziatrice della perossidazione lipidica (Kanner et al., 1987).

- Antiossidanti a basso peso molecolare: sono suddivisibili in antiossidanti liposolubili (tocoferolo, carotenoidi, chinoni, bilirubina e alcuni polifenoli) e antiossidanti idrosolubili (acido ascorbico, acido urico ed alcuni polifenoli). Agiscono ritardando o inibendo il danno cellulare, principalmente attraverso le loro proprietà di *scavengers* nei confronti dei radicali liberi.

Le cellule oltre alla capacità di tamponare le specie reattive, adottano altre strategie per limitare i danni dovuti alle sostanze ossidanti. Tali tattiche sono basate sulla riparazione o eventualmente sulla rimozione delle molecole danneggiate oppure sulla riduzione al minimo della produzione di specie reattive (Halliwell & Aruoma, 1991).

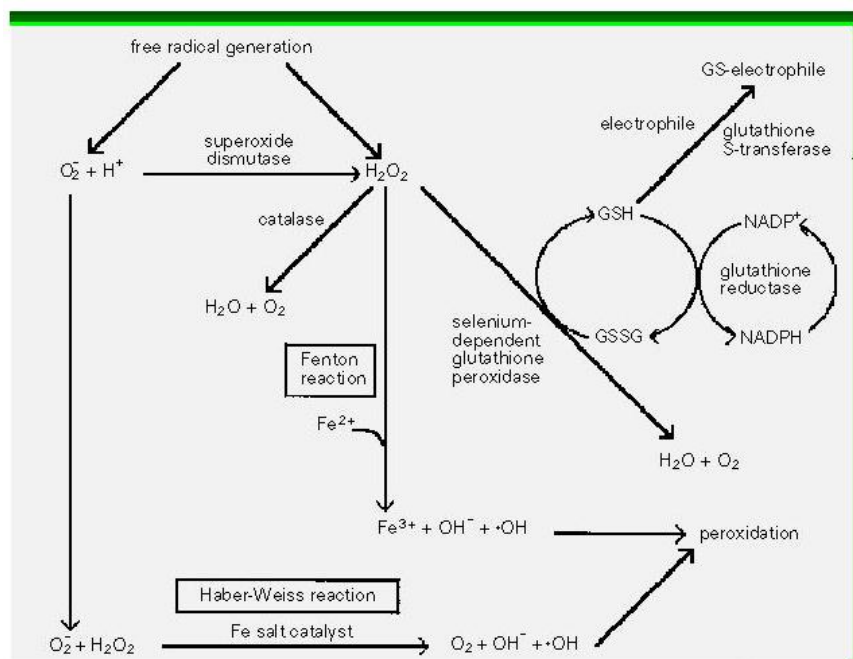


Figura 14: Principali vie di formazione dei ROS ed azione degli enzimi coinvolti nelle difese cellulari antiossidanti (Storey, 1996).

Equilibrio pro/antiossidanti

La produzione di sostanze proossidanti nelle cellule è equilibrata dai sistemi antiossidanti che limitano al minimo i danni ossidativi e consentono alla cellula di svolgere le normali attività a cui è preposta. Lo sbilanciamento di tale equilibrio a favore del sistema ossidante implica l'accumulo di lesioni ossidative che portano al malfunzionamento della cellula (Sies, 1985).

Questo sbilanciamento è causato da un incremento della concentrazione di ROS o da una riduzione nell'abilità nel bloccare i sistemi ossidanti. Nella prima ipotesi, l'aumento dei livelli di ROS può essere determinato da un accrescimento di O_2^- , dall'incremento dell'attivazione dei fagociti o dall'esposizione diretta a tossine esogene, come il fumo di sigaretta. Nella seconda ipotesi invece, la minore attività antiossidante può essere dovuta ad una riduzione dell'assunzione di antiossidanti con la dieta, aumento dell'escrezione di glutathione o mutazioni geniche di enzimi antiossidanti che ne causano il malfunzionamento.

MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DANNO OSSIDATIVO AL DNA

Le specie reattive dell'ossigeno sono prodotte dal normale metabolismo aerobico e da agenti ambientali (es. radiazioni) e sono fonte di danno per diverse componenti cellulari quali le membrane plasmatiche, proteine, carboidrati e acidi nucleici. Nel corso dell'evoluzione le cellule hanno sviluppato varie tattiche per prevenire gli effetti deleteri dell'ossidazione. La prima strategia prevede l'utilizzo di enzimi che hanno la capacità di disattivare le specie reattive più importanti che si trovano all'interno della cellula. I ROS che sfuggono all'azione catalitica degli enzimi antiossidanti inducono delle lesioni al DNA come la formazione delle basi ossidate, siti apurinici/apirimidinici (AP) e rotture del filamento del DNA.

Diversi meccanismi di riparazione sono coinvolti nel controllo dei livelli di ossidazione del DNA, inclusi il *Nucleotide Excision Repair* (NER) e il *Mismatch Repair* (MMR), ma il meccanismo principale per la riparazione del danno ossidativo è il *Base Excision Repair* (BER) (Boiteux & Radicella, 1999; Gros et al., 2002). Un esempio che illustra in modo eloquente l'azione del BER è quello della 8-oxo-dG, lesione molto diffusa e rischiosa per la cellula. Il BER agisce con due modalità che combinandosi minimizzano gli effetti tossici e mutageni della 8-oxo-dG.

L'enzima OGG1 è una DNA glicosilasi bifunzionale in grado di rimuovere specificamente l'8-oxoG e, mediante una reazione di β -eliminazione, di incidere in 3' rispetto al sito AP prodotto (Bjorås et al., 1997). Nel caso in cui durante la replicazione del DNA si inserisca un'adenina di fronte all'8-oxoG, la DNA glicosilasi MYH rimuove l'adenina ripristinando un appaiamento 8-oxoG:C, ricostituendo in tal modo un substrato per OGG1. Anche se fino ad ora non sono state descritte malattie associate a mutazioni nei geni coinvolti nel BER, recentemente sono state descritte mutazioni ereditarie nel gene MYH in pazienti affetti da carcinomi e adenomi multipli colon-rettali (Jones et al., 2002).

Alcuni studi hanno dimostrato una ridotta attività glicosilasica delle varianti identificate (Chmiel et al., 2003). Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso il ruolo giocato da alterazioni nell'espressione di enzimi del BER nell'insorgenza di alcune patologie. Recenti studi hanno evidenziato che pazienti colpiti da colite ulcerosa, contraddistinta da infiammazione cronica e sovrapproduzione di ROS, mostrano una maggiore espressione e attività degli enzimi specifici per le basi metilate (APE1 ed AAG) nei tessuti interessati

all'infiammazione (Hofseth et al., 2003). Tale fenomeno è associato alla presenza di instabilità dei microsatelliti (MSI) nei tessuti esaminati. Questi dati indicano che un generale disequilibrio degli enzimi coinvolti nel BER possa essere un nuovo meccanismo per l'induzione di instabilità genomica (Narciso & Dogliotti, 2005).

EFFETTI BIOLOGICI DAL DANNO OSSIDATIVO INDOTTO DALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

La formazione dei radicali liberi nelle cellule è indotta da molteplici fattori esogeni di natura chimico-fisica quali, il fumo, gli antibiotici, gli agenti tumorali, le radiazioni ionizzanti (α , β , γ e raggi X) (Figura 15).

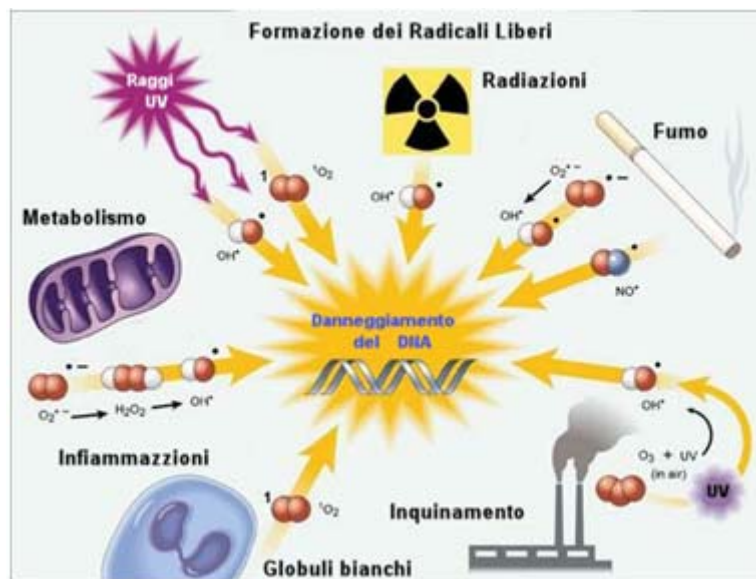


Figura 15: Fonti esogene di produzione di ROS.

L'interazione tra radiazioni ionizzanti e la materia biologica dà luogo ad eventi che possono essere studiati a diversi livelli: fisico, chimico, tissutale, di organismo e che possono manifestarsi secondo una scala temporale molto ampia a seconda della tipologia di danno e delle strutture coinvolte.

A livello del DNA si riscontra la comparsa di rottura a singolo e a doppio filamento causate sia dall'azione diretta che dalla produzione di radicali liberi per radiolisi dell'acqua; il radicale ossidrilico, infatti, può attaccare lo scheletro zuccherio-fosfato rimuovendo un atomo di idrogeno dal C₄ del deossiribosio oppure può reagire con il legame π che lo lega alla base determinando la formazione di un sito AP o, ancora, può determinare l'eliminazione di un gruppo fosfato e rottura del filamento di DNA. Un ulteriore effetto dovuto alla contemporanea produzione di gruppi radicalici su molecole di DNA e proteine, è la

formazione di legami crociati tra una base azotata e un amminoacido aromatico, generalmente una tirosina.

L'errata riparazione di rotture a doppio filamento (errata giunzione delle estremità libere) sia nello stesso cromosoma che fra cromosomi differenti, può causare la comparsa di delezioni o riarrangiamenti cromosomici quali cromosomi dicentrici, frammenti acentrici, traslocazioni e inversioni. Generalmente i cromosomi dicentrici e acentrici determinano la perdita di materiale genetico durante cicli successivi di divisione cellulare e non sono compatibili con la vita, mentre alterazioni quali traslocazioni e inversioni persistono nei successivi cicli di replicazione. La stabilità delle traslocazioni fa di queste aberrazioni i *biomarkers* preferenziali per le esposizioni croniche o avvenute in tempi precedenti, al contrario, la relativa labilità dei cromosomi dicentrici ne permette l'utilizzo come *biomarkers* solo per esposizioni recenti dell'ordine di mesi o settimane (Tucker, 2008).

Tra i fattori biologici va certamente ricordata l'attività mitotica: le cellule più radiosensibili sono quelle mitoticamente attive e indifferenziate da un punto di vista morfologico e funzionale (cellule basali della pelle, cellule ematopoietiche, epitelio intestinale); la fase M e la transizione dalla fase G₁ alla fase S risultano infatti estremamente sensibili all'irraggiamento.

L'azione lesiva delle radiazioni si estende anche a livello di fosfolipidi di membrana e proteine. Le porzioni più radiosensibili delle proteine sono le catene laterali e il gruppo amminico, ma le radiazioni possono determinare la rottura di legami idrogeno o ponti disolfuro responsabili della struttura secondaria e terziaria compromettendo, in questo modo, la funzione della proteina stessa. Per quanto concerne la membrana cellulare, i danni dovuti ai gruppi radicalici sono a carico degli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi che possono innescare la produzione di specie reattive (malondialdeide) in grado di indurre la formazione di legami crociati tra DNA e proteine. Allo stesso modo, l'azione radicalica può danneggiare i canali ionici del Ca²⁺ e del K⁺, compromettendo la permeabilità della membrana plasmatica necessaria al mantenimento dell'omeostasi cellulare. Tra i fattori chimici è importante annoverare l'effetto ossigeno che rende le cellule più sensibili all'irraggiamento in quanto amplifica l'effetto delle radiazioni ionizzanti. Questo effetto è decisamente più marcato in presenza di radiazioni a basso LET (*Linear Energy Transfer*) come particelle alfa, protoni e neutroni, ed è dovuto alle reazioni con i radicali liberi e al conseguente aumento della probabilità di alterazione delle molecole bersaglio.

Gli effetti delle radiazioni sul corpo umano possono essere distinti in due grandi categorie: effetti deterministici ed effetti stocastici (somatici e ereditari).

Gli effetti deterministici sono effetti biologici somatici che possono essere posti direttamente in relazione con la dose ricevuta. Tali effetti sono soggetti a soglia, al di sotto della quale non si verifica il danno. La gravità varia con la dose e generalmente presentano un periodo di latenza breve, quindi gli effetti sono riscontrabili poco tempo dopo l'irraggiamento (minuti, ore, settimane). Al contrario gli effetti stocastici sono effetti probabilistici la cui frequenza nella popolazione è legata alla dose totale ricevuta dall'intera popolazione. Per queste tipologie di effetti non esiste una dose soglia, per cui si assume che siano riscontrabili anche a dosi prossime allo zero. Essendo di tipo probabilistico, quindi non tutti gli individui mostrano lo stesso effetto e la frequenza della loro comparsa aumenta con la dose. L'induzione di tumori è un effetto somatico stocastico che può verificarsi a seguito dell'irraggiamento di un organo o di un tessuto dopo un periodo di latenza considerevole. Allo stesso modo anche gli effetti ereditari sono effetti stocastici sebbene non somatici. La cancerogenesi è considerata oggi il rischio somatico più importante dell'irradiazione a dosi basse e, di conseguenza, essa costituisce il problema principale della radioprotezione. Tuttavia recenti evidenze epidemiologiche (www.cardiorisk.eu) hanno suggerito che basse o moderate dosi di radiazioni possono provocare un moderato, ma significativo, aumento del danno cardiovascolare.

RISPOSTA CELLULARE ALLE ALTE E BASSE DOSI DI RADIAZIONI

Secondo il paradigma classico della radiobiologia ("target paradigm"), sulla base del quale la ICRP (International Commission on Radiological Protection) ha redatto le norme attualmente utilizzate nella radioprotezione e nella valutazione del rischio conseguente all'esposizione alle radiazioni, gli effetti indotti dalle radiazioni come aberrazioni cromosomiche, perdita della capacità riproduttiva e morte cellulare, sono il risultato di un danno diretto al DNA nelle singole cellule. Esiste, perciò, la possibilità che la singola cellula aberrante, ma ancora vitale, possa andare incontro a trasformazione tumorale o che essa possa trasmettere la mutazione alla progenie se il danno avviene nelle cellule germinali.

Questo tipo di risposta viene generalmente osservata per l'esposizione ad alte dosi. Il modello LNT (*Linear Non Threshold*, lineare senza soglia) infatti, trova fondamento sia sui meccanismi cellulari associati a tale risposta sia sui dati epidemiologici raccolti sulla popolazione sopravvissuta al fallout nucleare di Hiroshima e Nagasaki. Secondo tale modello, il danno indotto dalle radiazioni ionizzanti cresce linearmente al crescere della dose assorbita e per qualsiasi valore di dose; pertanto, non esiste un valore soglia di esposizione al di sotto o al di sopra della quale il danno cessa di essere lineare.

Negli ultimi decenni, tuttavia, si sono accumulate evidenze sperimentali che affiancano al paradigma classico e alla concezione DNA-centrica del danno, una serie di risposte cellulari che si manifestano attraverso complesse vie di segnalazione all'interno della cellula e a livello di popolazione cellulare (Figura 16). A queste risposte al danno si dà il nome di "non targeted effect", proprio per evidenziare il concetto che le radiazioni sono in grado di indurre effetti biologici rilevanti anche nella frazione di cellule che non viene direttamente attraversata dall'energia radiante o a seguito di esposizioni a dosi minori di 0,5Gy che coinvolgono meccanismi di risposta che prescindono dal danno al DNA. Risposte di questo tipo sono: l'effetto *bystander*, la risposta adattativa, l'ipersensibilità alle basse dosi e l'instabilità genomica (Prise et al., 2005). Sembrerebbe, inoltre, che questo tipo di meccanismi cellulari siano alla base delle risposte tardive osservate nei pazienti che si espongono alle radioterapie (Schwartz, 2006). La comprensione dei meccanismi molecolari, sottesi a questo tipo di risposta è, perciò, di notevole importanza sia perché questo tipo di effetti non diretti predominano sul danno diretto relativo all'esposizione a basse dosi, sia per definire quali siano i rischi conseguenti a questi livelli di esposizione.

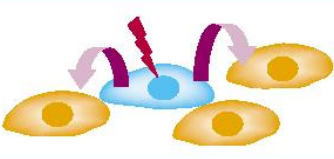
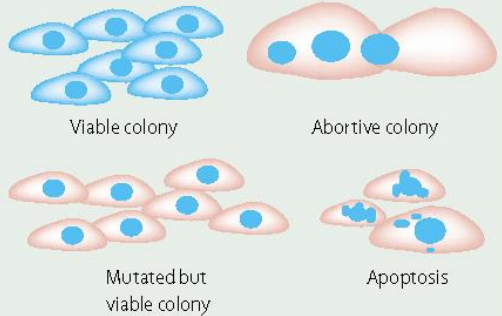
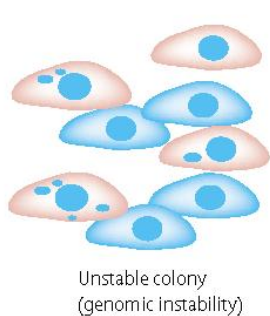
	Old paradigm	New paradigm	
Radiation target	Nuclear DNA	Membrane/cytoplasm	Few cells, any target
Signalling pathway			
Cell death pathway	 Viable colony Abortive colony Mutated but viable colony Apoptosis		 Unstable colony (genomic instability)

Figura 16: Secondo il paradigma classico della radiobiologia il danno diretto al DNA, se non correttamente riparato, porta alla formazione di cellule non vitali e colonie aberranti. Se l'entità del danno è troppo estesa, la cellula va incontro a morte cellulare per apoptosi. Nel nuovo modello targets extranucleari e risposta tissutale rivestono un ruolo importante nella segnalazione del danno; inoltre la morte cellulare può essere ritardata come il risultato di instabilità genomica dovuta all'effetto delle radiazioni (Prise et al., 2005).

Ad oggi, infatti, i rischi connessi alle basse dosi (<100 mS) vengono ancora estrapolati da quelli riscontrati per le alte dosi tramite il modello LNT, tuttavia, l'esistenza delle risposte cellulari descritte precedentemente rendono inappropriato questo tipo di modello perché un suo utilizzo per le basse dosi potrebbe portare ad una sovra o sottostima dei rischi calcolati linearmente (Brenner et al., 2003; ICRP Draft report of Committee I, 2004). E' stato, infatti, documentato che una pre-esposizione a basse dosi può ridurre gli effetti di una successiva esposizione a dosi maggiori. Questo tipo di risposta, a cui si dà il nome di risposta adattativa, venne descritta per la prima volta nel 1984 da Olivieri e colleghi, i quali riportarono che la frequenza di aberrazioni cromosomiche in linfociti umani esposti a raggi X, si riduceva se essi erano precedentemente marcati con timidina triziata. Questo tipo di

risposta, oltre ad essere in contraddizione con la relazione di proporzionalità diretta del danno postulato dalla LNT, è osservata solo per alcuni valori di dose compresi tra 0,01-0,2Gy (Matsumoto et al., 2007; Schwartz, 2006).

I meccanismi che regolano la risposta adattativa non sono stati ancora definiti in dettaglio, sebbene sembri che un ruolo decisivo sia dovuto alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto che inducono la sintesi *de novo* di fattori coinvolti nella riparazione del danno e nella regolazione del ciclo cellulare: DNA-PK, ATM, P53 (Matsumoto et al., 2007). Viceversa esistono meccanismi, quali l'effetto *bystander*, in grado di amplificare gli effetti delle radiazioni. Numerosi studi, infatti, riportano l'induzione di effetti biologici in cellule che non sono state direttamente colpite dalla radiazione ma che si trovano nelle vicinanze di cellule irraggiate o che ne condividono il terreno di coltura. Questo effetto, per la prima volta nel 1992, è stato descritto quando Nagasawa e Little irraggiarono cellule di Hamster cinese con particelle α e osservarono una frequenza di scambi tra i cromatidi fratelli inaspettatamente alta: solo lo 0,1-1,0% dei nuclei veniva effettivamente attraversato dalla radiazione mentre l'aumento nella frequenza di SCE veniva riscontrato nel 20-40% delle cellule.

Gli effetti biologici osservati nelle cellule non irraggiate sono molteplici: aumento della frequenza di micronuclei, aumento di scambi tra cromatidi fratelli, riduzione della sopravvivenza clonogenica e apoptosi. I meccanismi più accreditati alla base di questo processo sembrano essere: la secrezione di fattori solubili (TNF, citochine, ROS), da parte delle cellule irraggiate, nel terreno di coltura, o la diffusione di molecole di risposta al danno alle cellule circostanti mediante le giunzioni *gap* (Lorimore et al., 2003; Little, 2003). Inoltre questo tipo di risposta viene attivata anche quando il solo citoplasma è irradiato (Prise et al., 2005); tale osservazione sembra, quindi, consolidare le ipotesi che vedono nel modello LNT un modello inadatto alle basse dosi.

Un meccanismo correlato all'effetto *bystander* è l'instabilità genetica: in questo tipo di risposta la cellula irraggiata non presenta aberrazioni cromosomiche che, invece, si manifestano nella progenie derivante da questo clone molte generazioni dopo l'insulto iniziale. Il persistere di questa instabilità sembra basarsi su meccanismi di tipo epigenetico (Mothersill & Seymour, 2006) e sembra essere indotta dagli stessi mediatori coinvolti nell'effetto *bystander*. Secondo tale modello l'irraggiamento determina la produzione di ROS e citochine che inducono uno stato di infiammazione cronico che contribuisce a perpetuare il

fenotipo instabile (Morgan, 2003).

Infine è stato riportato che molte linee cellulari sembrano rispondere a dosi singole molto basse con un'eccessiva suscettibilità (HSR, *Hyper Radio Sensitivity*), ma si dimostrano più resistenti (per unità di dose) a dosi singole più elevate (Joiner et al., 2001). La radioresistenza (IRR, *Induced Radio Resistance*) viene innescata al superamento di una soglia di 0,1 – 0,3Gy, variabile a seconda della linea cellulare, e sembra operare incrementando la riparazione del DNA, come dimostra il coinvolgimento della chinasi DNA-PK (Marples et al., 2002). Cellule caratterizzate da HSR/IRR a questi valori di soglia, inoltre, sembrano ritardare l'entrata in G₂, probabilmente per permettere una più efficace riparazione del danno indotto dalle radiazioni (Prise et al., 2005). Come per le precedenti, anche questa risposta a due fasi risulta impossibile da prevedere basandosi sull'estrapolazione dagli effetti delle alte dosi (Figura17).

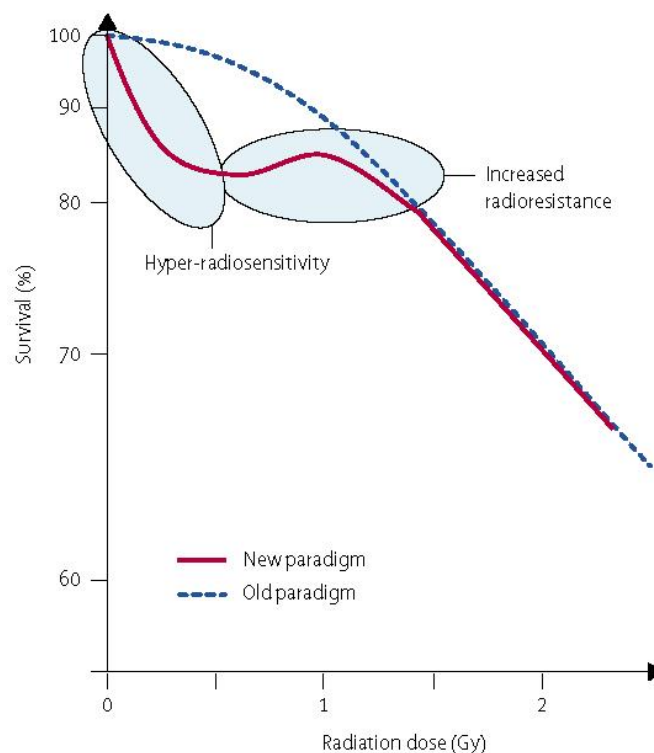


Figura 17: Sopravvivenza cellulare in seguito ad esposizione a basse dosi di radiazione ionizzanti: le cellule esibiscono un'ipersensibilità a dosi molto basse (HSR), seguita da un incremento di radioresistenza (IRR) per dosi fino a 1Gy (Prise et al.,2005).

POLIAMMINE

Con il termine “poliammine” si indica generalmente un gruppo di piccole molecole organiche alifatiche policationiche. Le più note sono putrescina PUT (una diammina), spermidina SPD (una triammina) e spermina SPM (una tetrammina) (Figura 18). Si tratta di componenti cellulari ubiquitarie con funzioni multiple, presenti in quasi tutte le specie viventi, sia eucariotiche che procariotiche, segno di un’alta conservazione durante l’evoluzione. La maggior parte delle poliammine libere è legata a varie strutture cellulari, quindi la sua concentrazione è molto bassa, tuttavia la sua concentrazione intracellulare totale è nell’ordine del millimolare (Casero & Marton, 2007). In condizioni di pH fisiologico queste sostanze sono cariche positivamente e si ha un’azione reciproca con le cariche elettriche di segno opposto, ciò è responsabile per alcune delle loro azioni cellulari. La complessità della sintesi e del loro metabolismo, e l’intricato controllo della loro omeostasi evidenziano il ruolo critico che queste sostanze rivestono nella cellula (Wallace et al., 2003). Le poliammine, pur essendo note da qualche secolo, soltanto negli anni 70 hanno destato l’attenzione dei ricercatori. Nel corso degli anni molti studi hanno mostrato il loro ruolo determinante in quasi tutti gli aspetti del metabolismo cellulare (Wallace et al., 2003).

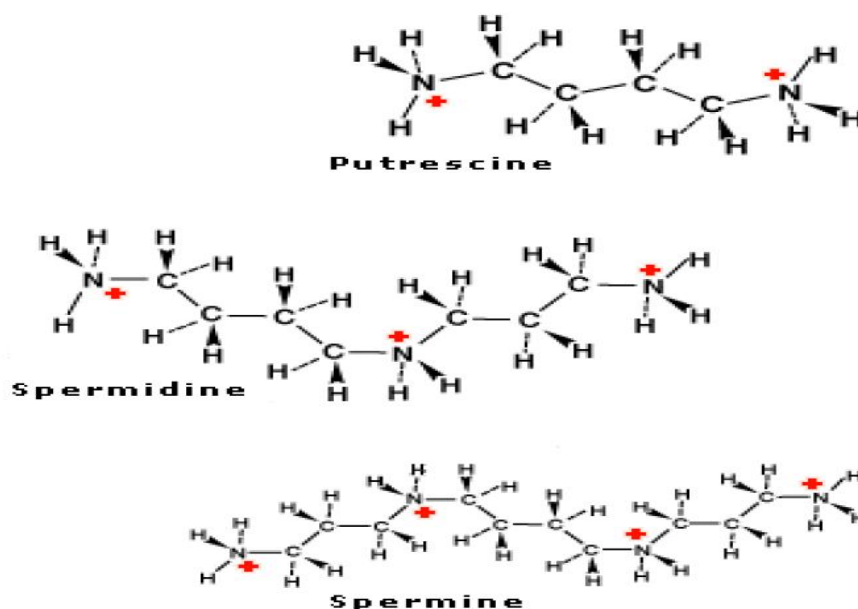


Figura 18: Struttura chimica delle poliammine.

Le poliammine rivestono un ruolo centrale in un gran numero di processi biologici essenziali come la regolazione della crescita e dello sviluppo, la progressione del ciclo cellulare, la mediazione dell'azione ormonale ed il mantenimento del bilancio ionico (Tabor & Tabor, 1984; Smith, 1985b; Evans & Malberg, 1989). Nelle cellule di mammifero è stato osservato che i mutanti privi della capacità di sintetizzare le poliammine presentano una crescita ed uno sviluppo anomalo (Tabor & Tabor, 1984). Perciò, per il buon funzionamento della cellula è cruciale mantenere un'adeguata concentrazione di questi policationi, infatti una loro deplezione causa la crescita stentata delle cellule o addirittura porta alla morte cellulare mentre un loro accumulo ne causa la trasformazione. Inoltre, un contenuto eccessivo di poliammine risulta tossico per le cellule e può portare ad apoptosi (Xie et al., 1997). La loro concentrazione fisiologica è mantenuta pressoché costante grazie all'attività di due enzimi regolatori della via biosintetica, l'ornitina decarbossilasi (ODC) e l'adenosilmetionina decarbossilasi (AdoMetDC) e all'attività della spermidina/spermina N1-acetiltrasferasi (SSAT) che regola il processo catabolico.

METABOLISMO DELLE POLIAMMINE

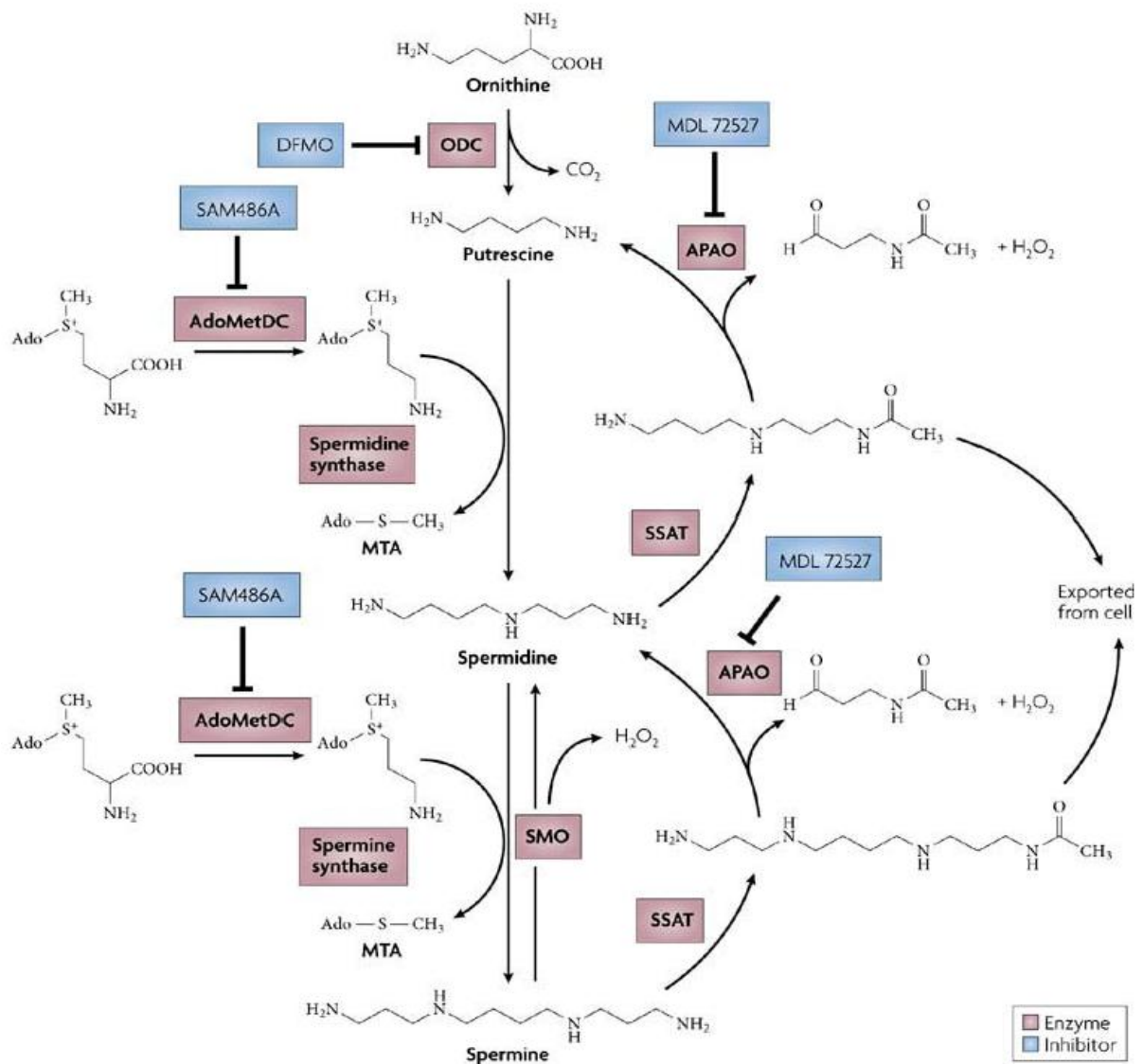
Omeostasi delle poliammine

Per il buon funzionamento della cellula è fondamentale mantenere un'adeguata concentrazione di poliammine. Le vie metaboliche per l'omeostasi di questi policationi sono altamente conservate in tutte le cellule eucariotiche. Questo dato conferma la centralità delle poliammine e delle loro concentrazioni cellulari in molti aspetti della fisiologia cellulare. Le loro concentrazioni sono alte in cellule attivamente proliferanti, durante periodi di crescita tissutale e in tessuti maturi caratterizzati da alta sintesi proteica. L'omeostasi delle poliammine dipende dalla loro biosintesi, dalla loro degradazione e dal loro trasporto.

Biosintesi delle poliammine

Nelle cellule eucariotiche le poliammine vengono sintetizzate da due aminoacidi L-arginina e L-metionina grazie ad una serie di reazioni enzimatiche che interagiscono tra loro.

Dal taglio della L-arginina ad opera dell'enzima arginasi II viene prodotta la L-oritina precursore della putrescina. Invece la L-metionina è un donatore di gruppi aminopropilici per la sintesi di spermidina e spermina.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 19: Target nel pathway del metabolismo delle poliammine (Casero & Marton, 2007).

Nei mammiferi e nei funghi dalla decarbossilazione dell'ornitina, reazione catalizzata dall'enzima ornitina decarbossilasi (ODC), si forma la putrescina, che in seguito è trasformata in spermidina dall'enzima SPD-sintasi ed infine in spermina grazie all'azione dell'enzima SPM-sintasi (Pegg, 1986).

Tali enzimi utilizzano entrambi come donatore di gruppi amminopropilici la S-adenosilmetionina decarbossilata, che è il risultato della decarbossilazione della S-adenosilmetionina, che a sua volta viene catalizzata dall'enzima S-adenosilmetionina decarbossilasi (S-AdoMetDC).

Le decarbossilasi (ODC e S-AdoMetDC) sono contraddistinte da un tempo di emivita brevissimo, da una presenza molto esigua nelle cellule e sono altamente inducibili. Tale caratteristica permette alle cellule di rispondere ai vari stimoli con un aumento repentino della sintesi delle poliammine stesse. La produzione di putrescina da parte dell'enzima ODC è la prima reazione che limita la biosintesi delle poliammine. L'enzima ODC richiede piridossal-fosfato come cofattore ed agenti riducenti contenenti gruppi tiolici (Pegg, 2006; Casero & Marton, 2007). L'ODC è un omodimero e a differenza di altre proteine che affrontano la degradazione proteosomiale, non viene prima ubiquitinata, ma una proteina regolatoria specifica, detta Antizima (AZ), interagisce con la forma monomerica dell'enzima ODC per generare un complesso ODC-Antizima (ODC-A) e lo espone al proteosoma per l'eliminazione. L'ODC può essere prodotta dall'ODC-AZ per merito di un'altra proteina detta "inibitore dell'antizima" (AZI), che si lega ad AZ con un'affinità molto superiore dell'ODC (Cohen, 1998).

Inoltre l'ODC è attivato da un fattore trascrizionale formato dal complesso dell'oncogene MYC e dalla proteina MAX (MYC-MAX), ciò dimostra lo stretto legame tra le poliammine e le vie che promuovono la crescita cellulare.

Catabolismo delle poliammine

Una caratteristica importante della via biosintetica delle poliammine è che le reazioni catalizzate dalla spermina sintasi e dalla spermidina sintasi sono totalmente irreversibili. Tuttavia la spermina e la spermidina sono riconvertibili in putrescina *in vivo*, dimostrando quindi la presenza di una o più vie cataboliche che si occupano della degradazione di questi composti.

La prima via catabolica prevede un processo preliminare di acetilazione mediato dall'enzima

citosolico spermina/spermidina N1-acetiltransferasi (SSAT). Questa proteina ritenuta l'enzima chiave del catabolismo delle proteine, usa l'acetil-coenzimaA per produrre N1-acetil-spermidina e N1-acetil-spermina, che sono substrati della N1-acetil poliamminossidasi (PAO).

La PAO ossida SPM e SPD producendo SPD più 3-acetamidopropanale e H_2O_2 , e PUT più 3-amminopropanale e H_2O_2 , rispettivamente (Seiler, 1995). Anche se la PAO è in grado di utilizzare con minor efficienza spermina e spermidina non acetilate, le forme acetilate sono il substrato preferenziale e vengono degradate molto velocemente. Perciò l'acetilazione di queste poliammine è il passaggio limitante la velocità del catabolismo, e SSAT è un enzima altamente regolato e inducibile con un emivita molto breve paragonabile a quelle di ODC e S-AdoMetDC (Seiler, 2004).

Gli studi odierni si stanno focalizzando sulle poliammine acetilate per chiarire se siano sostanze metabolicamente attive o forme di escrezione. Alcune ricerche ritengono che l'acetilazione possa neutralizzare in parte le caratteristiche dovute alla carica positiva delle poliammine, supponendo che questa reazione privi la molecola di una sua carica. Inoltre la forma acetilata delle poliammine potrebbe facilitare la loro escrezione dalla cellula poiché si ipotizza che essa possa transitare attraverso le membrane. Nelle cellule normali le poliammine acetilate sono presenti sporadicamente, al contrario nelle cellule tumorali esse si trovano in alte concentrazioni, mettendo in relazione il meccanismo della cancerogenesi con le alterazioni del metabolismo delle poliammine (Fallace et al., 2000). La seconda via catabolica permette di saltare il passaggio di acetilazione mediato da SSAT e consente la degradazione diretta della spermina grazie alla spermina ossidasi (SMO), un enzima inducibile localizzato a livello citosolico (Wang et al., 2001). Infatti la SMO è in grado di ossidare in modo preferenziale la spermina non acetilata, producendo la spermidina, 3-amminopropanale e H_2O_2 . La SMO sta destando un vivo interesse in quanto sembra espletare un ruolo notevole nei processi infiammatori ed in generale nelle patologie correlate allo stress ossidativo (Babbar et al., 2007).

Trasporto delle poliammine

Come già detto in precedenza, l'omeostasi delle poliammine nelle cellule dipende dalla loro biosintesi, dalla loro degradazione e dal loro trasporto. Le principali fonti di poliammine

esogene sono rappresentate dalla dieta (Bardocz, 1993) e dalla flora batterica (Hessels et al., 1989).

I sistemi di trasporto delle poliammine nelle cellule di mammifero non sono ancora ben caratterizzati. Il processo di assunzione delle poliammine è realizzato da alcuni trasportatori in maniera energia-dipendente e saturabile (Pegg, 1988; Seiler & Dezeure, 1990). La gran parte delle cellule presenta due tipologie di trasportatori di cui uno specifico per la PUT, l'altro invece specifico per la SPD e SPM (Seiler et al., 1996).

Lo stato di crescita delle cellule regola invece il trasporto verso l'esterno che è un processo selettivo avviato dall'abbassamento della velocità di crescita e fermato dallo stimolo opposto (Fallace, 1981).

RUOLO DELLE POLIAMMINE NELLE CELLULE

Le poliammine definiscono l'attività degli organelli e di alcuni enzimi. Mediante interazione elettrostatica esse si legano ai fosfolipidi, alle proteine e agli acidi nucleici che contengono gruppi carichi negativamente. Inoltre esse interagiscono anche mediante interazioni idrofobiche e legami idrogeno. La spermina interagisce con due gruppi fosforici di ogni filamento di DNA.

In tal modo le poliammine normalizzano la doppia elica contro il danno indotto da radiazioni e da alterazioni dovute alla temperatura e formano unità sovramolecolari più compatte del DNA che si evidenziano durante la mitosi. Le poliammine sono note ormai da tempo come notevoli mediatori della crescita e della divisione cellulare a causa della loro attitudine a legare direttamente il DNA e a regolare l'interazione DNA-proteine. Un'ulteriore attività delle poliammine è la stabilizzazione delle strutture a doppia elica presenti nel RNA ribosomiale o in alcuni RNA transfer, tramite legami a siti specifici. Infine alcuni studi realizzati su cellule integre e nuclei isolati hanno messo in evidenza l'importanza delle poliammine nella trascrizione di geni correlati alla crescita, come i protooncogeni c-myc e c-fos.

Per comprendere meglio l'importanza delle poliammine sia a livello fisiologico che patologico sono stati realizzati dei modelli murini nei quali il contenuto di poliammine è stato perturbato in alcuni tessuti grazie all'espressione transgenica delle proteine che hanno la capacità di modificare il metabolismo di tali composti (Thomas & Thomas, 2001).

Poliammine e proliferazione cellulare

Le poliammine oltre a regolare lo sviluppo sono coinvolte anche nella progressione del ciclo cellulare. Diversi studi indicano che i livelli delle poliammine aumentano durante le fasi G₁ e S del ciclo cellulare e che la mancanza di poliammine inibisce la transizione dalla fase G₁ alla fase S del ciclo stesso (Heby et al., 1973). In particolare, in cellule ovariche di Hamster cinese, il contenuto di PUT, SPD e SPM aumenta di due volte durante il ciclo cellulare (Fredlund et al., 1995).

Alcune proteine chinasi, sono costituite da una molecola proteica catalitica e da una regolatrice, sono deputate alla regolazione delle fasi di transizione del ciclo cellulare.

Le subunità regolatrici sono dette cicline e si legano ad un sito specifico delle subunità catalitiche, dette chinasi, provocandone l'attivazione, perciò le cicline A,B,D e le corrispettive chinasi si accrescono e si riducono ordinatamente durante tutte le fasi del ciclo cellulare.

Inoltre vi sono alcune proteine che hanno un'azione inibitrice e possono regolare negativamente l'attività delle cicline. La sintesi di tali proteine inibitrici viene indotta da stimoli quali il danneggiamento del DNA, la senescenza e l'inibizione da contatto e in questo modo bloccano il ciclo cellulare. Come risulta da alcune ricerche condotte su colture cellulari *in vitro*, nel corso del ciclo cellulare avvengono dei mutamenti anche nell'attività di ODC e nella concentrazione delle poliammine. Tali studi evidenziano che nella fase di transizione G₁/S ci sia un incremento dell'ODC e quindi del contenuto di putrescina, che induce la cellula ad uscire dalla fase G₁ che precede la sintesi del DNA, divenendo cruciale per l'accesso della cellula nella fase S. Anche la SSAT subisce un incremento, ma durante il passaggio dalla fase S alla fase G₂. Il decremento di poliammine, specie nella fase G₁, provoca un accumulo delle proteine inibitrici p21, p27 e p53 e di conseguenza si verifica il blocco della crescita (Thomas & Thomas, 2001).

Diversi studi hanno confermato che un incremento nell'attività dell'ODC ed il successivo incremento nella concentrazione intracellulare delle poliammine è un evento precoce nella carcinogenesi (Wallace et al., 2001). Sebbene, in seguito alla trasformazione cellulare con agenti cancerogeni (Gilmour et al., 1987), virus (Haddox et al., 1980) ed oncogeni (Sistonen et al., 1989) si verifichi un'attivazione costitutiva dell'ODC, il solo aumento dell'attività di tale enzima non è sufficiente a trasformare le cellule in assenza di un fattore di inizio (Hibshoosh et al., 1991).

Una particolare attenzione è stata rivolta allo studio degli inibitori specifici implicati nella

biosintesi delle poliammine, poiché esse rivestono un ruolo cruciale nella proliferazione cellulare e sono implicate nella cancerogenesi. Tramite l'uso di un inibitore irreversibile dell'ODC, l' α -difluorometilornitina (DFMO), si decrementa il contenuto di poliammine nelle cellule, in particolare della putrescina e della spermidina, che a sua volta provoca il blocco nella crescita (Metcalf et al., 1978). L'applicazione di DFMO può avere effetti rilevanti anche sul differenziamento di alcuni tipi cellulari. Inoltre il DFMO è risultato un valido inibitore della crescita di tumori generati in animali da laboratorio, tuttavia i test effettuati sull'uomo utilizzando il DFMO come singolo agente antitumorale o in combinazione con altri antitumorali non hanno offerto esiti duraturi (Wallace et al., 2003).

Poliammine e morte cellulare

Oltre ad essere implicate nella proliferazione cellulare, le poliammine intervengono nella forma di morte cellulare programmata (*Programmed Cellular Death*) nota come apoptosi. L'accumulo eccessivo di poliammine stimola la loro via catabolica che dà origine alla produzione di metaboliti in grado di indurre la morte cellulare. L'ossidazione delle poliammine, catalizzata dalla PAO con la SSAT e dalla SMO, porta alla produzione di perossido di idrogeno ed aminoaldeidi che sono implicate nell'induzione dell'apoptosi (Schipper et al., 2000).

Durante la morte cellulare programmata si verifica una diminuzione nei livelli di SPD e SPM, causata dall'incapacità dell'enzima ODC di mantenere elevati livelli di poliammine, ciò sembra essere dovuto alla precoce degradazione di questo enzima, indotta dall'antizima, durante il processo di morte cellulare (Mitchell & Judd, 1998).

L'abbassamento dei livelli di SPM e SPD osservato durante l'apoptosi mostra come questi poliammine svolgano, in realtà, un'azione protettiva. La SPM, in particolare, inibisce l'incremento dell'attività della caspasi-3 che generalmente precede l'apoptosi.

Studi con inibitori della S-adenosilmetionina decarbossilasi rafforzano l'idea che la SPM sia implicata nel conferire resistenza all'apoptosi. È probabile che l'azione protettiva della SPM sia dovuta alla capacità di inibire le endonucleasi (Ribeiro & Carson, 1993) e di stabilizzare importanti componenti cellulari come la membrana e la cromatina (Brooks, 1995; Basu et al., 1997) e di proteggere il DNA da stress ossidativo (Muscari et al., 1995). In alcuni tipi cellulari,

inoltre, la carenza di SPM aumenta la suscettibilità cellulare ad agenti che danneggiano il DNA, quali i raggi UV (Stefanelli et al., 2001).

Eccessivi livelli intracellulari di poliammine nelle cellule che ne hanno una sovrapproduzione o che ne subiscono una somministrazione esogena possono indurre l'apoptosi, mentre la deplezione di poliammine conseguita mediante un inibitore, come DFMO, ha un effetto citostatico sulle cellule ma difficilmente citotossico.

Tale risultato impedisce di avvalersi di questi inibitori nella terapia anticancro ma si rivela decisamente efficace negli scenari caratterizzati da un eccesso di apoptosi, ad esempio le malattie cardiovascolari dove la perdita di tessuto cardiaco è dovuta almeno in parte all'apoptosi dei miociti cardiaci (Kitsis & Mann, 2005), l'osteoartrite in cui l'apoptosi dei condrociti contribuisce al danno della cartilagine articolare (Goggs et al., 2003) ed altre patologie.

SPERMINA OSSIDASI

Negli ultimi anni l'interesse rivolto al catabolismo delle poliammine è aumentato anche in relazione alla risposta citotossica, in diversi tipi di tumore, espletata da analoghi strutturali delle poliammine. Nei mammiferi, il catabolismo delle poliammine è stato considerato in passato come una via a due stadi regolata dall'enzima SSAT (spermidina/spermina N¹-acetiltrasferasi) che produce i substrati acetilati per la PAO (poliammina ossidasi). Per questo motivo la maggior parte degli studi sulla possibile attività antitumorale degli analoghi delle poliammine erano rivolti all'analisi della loro interazione con l'enzima SSAT. Recentemente è stata scoperta e caratterizzata la flavoproteina spermina ossidasi (SMO), ulteriore enzima coinvolto nella ossidazione delle poliammine. I dati riguardanti la caratterizzazione della SMO, suggeriscono che questo enzima possa anch'esso contribuire all'omeostasi delle poliammine e alla risposta cellulare al trattamento con farmaci.

La SMO è un enzima presente in tutti gli organismi superiori, in grado di catabolizzare la Spermina (SPM) a Spermidina (SPD) con produzione di perossido di idrogeno.

La SMO umana è codificata da una sequenza che si trova sul cromosoma 20, è costituita da 555 amminoacidi ed ha un peso molecolare di 61.8 kDa.

Il gene della SMO murina (mSMO) è presente in singola copia nel genoma di topo ma codifica per almeno nove varianti di *splicing*, denominate α , μ , γ , δ , β , ϵ , ϕ , ω e η (Cervelli et al., 2004), delle quali è stata definita la sequenza amminoacidica. Le isoforme α e μ sono enzimaticamente attive. Tramite esperimenti di immunofluorescenza in cellule murine (Cervelli et al., 2004), si è visto che la SMO α presenta una localizzazione citoplasmatica mentre la SMO μ presenta una localizzazione anche nucleare. La SMO μ differisce dall'isoforma α per la presenza di 30 amminoacidi codificati dall'esone VIa.

L'attività dell'enzima SMO porta a predisposizione all'apoptosi e radiosensibilità, infatti la sovra-espressione delle isoforme attive di SMO, SMO α e SMO μ , nelle cellule di neuroblastoma di topo dimostra la prima evidenza di un danno ossidativo al DNA causato dall'attività di questo enzima, sia da solo che, in particolar modo, se associato ad esposizione a radiazioni (Amendola et al., 2005).

La sovraespressione della SMO indotta sia al livello esogeno che endogeno, riduce la SPM e di conseguenza la funzione di *shielding* del DNA portando alla radiosensibilità ed aumentando la mutagenesi e la morte cellulare. Non è ancora chiaro se questi effetti siano dovuti alla produzione metabolica dei ROS o alla riduzione di SPM come *scavenger* delle specie reattive

dell'ossigeno e dello *shielding* molecolare del DNA.

Abbinando gli analoghi delle poliammine con la radioterapia in presenza di sovra-attività della SMO si ottiene uno stimolo apoptotico che ha effetti terapeutici. In particolare nel cancro del tratto respiratorio, nel carcinoma del colon, nel cancro colon-rettale e in molti mielomi è stato misurato un alto contenuto di SPM ed invece è stata osservata una bassa attività della PAO. Per cui l'induzione di SMO e di PAO e risposta ad un agente chemioterapeutico può essere un approccio combinato per il trattamento del cancro (Wallace & Fraser, 2004).

METABOLISMO DELLA SPERMINA, INFIAMMAZIONE E CANCRO

La maggior parte dei tumori nell'uomo sono direttamente associati alle infiammazioni croniche (Mueller & Fusenig, 2004). Infiammazione può agire come una limitata risposta adattativa. Tuttavia una cura insufficiente di una lesione spesso conduce a varie malattie compreso il cancro (Schottenfeld, 2006). Ad esempio i disordini infiammatori dell'intestino come le coliti ulcerose e la malattia di Crohn portano al cancro colon-rettale (Seril et al., 2003), mentre il trattamento con antiinfiammatori riduce l'incidenza del cancro (Eaden et al., 2000). Durante le infiammazioni e nella gran parte delle malattie degenerative gli ossidanti prodotti dal metabolismo cellulare causano stress ossidativo, che è uno sbilanciamento tra produzione di ROS e la detossificazione. L'aumento dei livelli di ROS generato dall'infiammazione è ritenuto responsabile della carcinogenesi (Kundu & Surh, 2008). Tuttavia, tranne la risposta infiammatoria, il bilanciamento del livello di ROS induce un effetto benefico (*hormesis*) (Goldman, 1996) come dimostrato nella terapia iperbarica nell'uomo (Dennog et al., 1996) e nel danno ossidativo dopo esposizione alle radiazioni gamma nei ratti. Al contrario, alti livelli di ROS, che sfuggono ai meccanismi di detossificazione risultano mutageni e causano la morte cellulare e l'apoptosi. Quindi, l'esposizione esogena ed endogena ai ROS riveste un ruolo fondamentale nel comportamento delle cellule.

Recentemente è stato trovato che la citocina TNF- α , che ha un ruolo importante come promotore infiammatorio in seguito allo stress cellulare (Beutler, 1999), incrementa l'espressione della SMO nelle linee cellulari epiteliali del polmone umano (Babbar & Casero, 2006). E' interessante notare che la TNF- α incide sul metabolismo delle poliammine

migliorando livello di trascrizione della PAO, della SSAT e della SMO, ma aumenta solamente l'attività della SMO. Poiché il metabolismo della SMO produce acqua ossigenata, è stato assunto che il collegamento tra infiammazione e cancro potrebbe essere inerente alla sovrapproduzione di ROS dovuta alla sovra attività della SMO.

Il danno al DNA indotto dai ROS causa instabilità genomica ed errori di replicazione che sono entrambi marker di stadi precoci della trasformazione tumorale (Cooke et al., 2003). Infatti il marker biochimico del danno ossidativo del DNA, 8-Oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG), aumenta nei tumori gastrici indotti dal *Helicobacter pylori* (Xu et al., 2004), nella carcinogenesi polmonale indotta da TNF- α (Babbar & Casero, 2006) e nella linea cellulare di neuroblastoma di topo in cui l'attività della SMO è stata indotta esogenamente (Amendola et al., 2005; Amendola et al., 2009).

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Nella maggior parte dei processi degenerativi, le sostanze ossidanti prodotte dal metabolismo cellulare portano allo stress ossidativo, che è uno sbilanciamento tra la produzione dei ROS e la loro detossificazione. Lo stress ossidativo gioca un ruolo fondamentale sia nella proliferazione cellulare sia nella morte cellulare.

Negli ultimi anni si è osservato che il metabolismo catabolico della spermina è strettamente correlato all'ossidazione del DNA e all'apoptosi tramite la produzione di perossido di idrogeno in molti modelli cellulari.

In una linea cellulare di neuroblastoma di topo si è evidenziato che la sovraespressione della SMO causa un aumento del danno ossidativo al DNA ma non incrementa la morte cellulare e non supera la soglia di attivazione di arresto del ciclo cellulare. La sovraespressione della SMO induce un danno al DNA cronico sub-letale che a sua volta non è capace di stimolare una risposta adattiva.

Al contrario, le radiazioni aumentano drasticamente la morte cellulare nelle cellule che esprimono la SMO indicando una acquisita ipersensibilità alle radiazioni (Amendola et al., 2005; Bianchi et al., 2007).

Lo scopo di questo progetto di ricerca è stato quello di stabilire l'esistenza di un ipotetico valore soglia del danno ossidativo al DNA che possa indirizzare la risposta cellulare o verso la riparazione del DNA o verso l'apoptosi.

Bassi livelli costitutivi di danno al DNA sono stati ottenuti mediante l'espressione esogena dell'enzima Spermina Ossidasi murina (mSMO).

Utilizzando basse dosi di radiazioni ionizzanti abbiamo valutato le risposte al danno del DNA nelle linee cellulari CHO difettive nei diversi sistemi di riparazione nelle quali è stato indotto un danno sub-letale cronico provocato da aumento dello stress ossidativo tramite sovraespressione dell'enzima Spermina Ossidasi.

MATERIALI E METODI

PLASMIDI

E' stato usato il plasmide retro-virale pBABE puro e pBABE contenente la SMO murina conferente la puomicino-resistenza, entrambi già disponibili in laboratorio. 20-50 ng di ciascun plasmide sono stati utilizzati per trasformare i batteri competenti. Le colonie sono state cresciute a 37°C in terreno Luria Bertani (LB) contenente ampicillina; i plasmidi sono stati estratti e purificati mediante maxiprep. Il DNA plasmidico ottenuto è stato controllato mediante digestione enzimatica.

Preparazione di cellule competenti

100 ml di terreno di Luria Bertani (LB: 10 g NaCl, 5 g estratto di lievito e 10 g di bacto triptone per un litro di soluzione pH 7.8) sono stati inoculati con una singola colonia di cellule precedentemente strisciate su piastra LB agar 1% (10 g agar per litro di LB). La coltura è stata incubata a 37°C con agitazione *overnight*. Quando le cellule hanno raggiunto 0.3-0.6 O.D. a 600nm, sono state raffreddate in ghiaccio per 30 minuti e centrifugate per 10 minuti a 1000 x g.

Il pellet è stato risospeso in 10ml in un buffer di trasformazione e stoccaggio TSB (LB contenente 10% PEG, 5% DMSO, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄) e incubato in ghiaccio per 10 minuti. Le cellule sono state quindi aliquotate (100µl in vials da 1,5ml) e conservate a -80°C.

Trasformazione in batteri competenti

La miscela di reazione contenente 100 µg/µl di plasmide, è stata aggiunta a 200µl di cellule competenti scongelate lentamente in ghiaccio, poi è stato provocato uno shock termico per permettere la permeabilizzazione delle membrane e l'ingresso del DNA nelle cellule batteriche:

- 30' in ghiaccio;
- 90'' a 42°C;
- 1' in ghiaccio.

Terminato lo shock termico sono state aggiunte alla soluzione 800µl di SOC (SOB addizionato di glucosio 10mM) e incubate per 45 minuti a 37°C in agitazione. Circa 500µl di batteri sono stati poi piastrati su terreno solido di LB Agar 1% addizionato con ampicillina (50µg/ml) e

incubati a 37°C *overnight*.

Maxi-preparazione di DNA plasmidico

Una singola colonia è stata inoculata in 3 ml di LB contenente ampicillina (50µg/ml), e lasciata in agitazione per 4-5 ore a 37°C. Questa sospensione batterica è stata usata come preinoculo per

500 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml) e l'inoculo risultante è stato incubato a 37°C con agitazione *overnight*. La mattina seguente la coltura è stata centrifugata a 5000 x g per 15 minuti ed il pellet è stato risospeso gentilmente in 40ml di 10mM EDTA pH 8.0 e incubato a temperatura ambiente per 5min. Alla sospensione batterica così ottenuta sono stati aggiunti 80ml di soluzione di lisi alcalina (0,2N NaOH e 1% SDS), e dopo mescolamento, è stata incubata a temperatura ambiente per 5min. Alla miscela sono stati aggiunti 52,5ml di 3M NaOAc, pH 4.8, la soluzione è stata agitata per inversione e incubata in ghiaccio per non più di 15min. Infine, è stata centrifugata per 30 minuti a 9000 x g ed il sovrnatante è stato incubato con 20µg/ml di RNasi A per 1h a 37°C. Il sovrnatante è stato diviso in due falcon ed è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo ed è stato mescolato per inversione, incubato per 5min a temperatura ambiente e centrifugato a 9000 x g per 20min. Dopo rimozione del sovrnatante, il pellet è stato lasciato ad asciugare.

In seguito il pellet è stato risospeso in 18ml di soluzione TE (10mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM EDTA pH 8.0) ed alla sospensione sono stati aggiunti 4,5ml di 7,5M KOAc. Dopo mescolamento la sospensione è stata messa a -70°C per 30min. Trascorsi 30min la soluzione è stata scongelata e centrifugata a 2000 x g per 10min. Il sovrnatante è stato recuperato e sono stati aggiunti 30ml di etanolo 100% freddo, mescolandolo per inversione, ed è stato incubato a 4°C *overnight*. In seguito, la miscela è stata centrifugata a 9000 x g per 25min, dopo rimozione del sovrnatante, il pellet è stato lavato con 30ml di etanolo al 70%, centrifugato, asciugato e risospeso in un volume opportuno di soluzione TE.

La concentrazione/purezza sono stati determinati mediante misurazione dell'O.D. (densità ottica) a 260/280nm utilizzando lo spettrofotometro.

Digestione con enzimi di restrizione

La reazione di digestione è stata effettuata utilizzando l'enzima di restrizione: Eco RI. Per la digestione sono stati utilizzati 5µg di DNA con 1µl di enzima di restrizione (10U/µl), 2µl del buffer 10X fornito dalla ditta produttrice in un volume finale di 20µl con acqua. Così

preparata la digestione è stata incubata a 37°C per 1 ora.

Elettroforesi del DNA su gel di agarosio

L'elettroforesi per la separazione dei frammenti di DNA di diversa lunghezza (tra le 100 bp e 30 kbp) è stata effettuata su gel di agarosio all'1% (peso/volume) in presenza di un opportuno marker di peso molecolare (Lambda Pst1 Marker). Per la preparazione del gel, 1 g di agarosio è stato sciolto in 100ml di TAE (40mM Tris-base, 1mM acido acetico e 10mM EDTA, pH 8.0). Quando la soluzione era sufficientemente fredda, è stato aggiunto bromuro di etidio (1µg/ml) che permette la visualizzazione del DNA se lo si espone ad una lampada UV. Ai campioni da sottoporre ad analisi elettroforetica è stata aggiunta una quantità di Ficoll BPB 6X (Ficoll 30%, BPB 0.1% ed EDTA 50mM).

COLTURE CELLULARI

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di ovario di Hamster cinese (CHO):

- ↳ AA8 - linea wild type,
- ↳ EM9 - linea difettiva in *Base Excision Repair*,
- ↳ UV61 - linea difettiva in *Transcription Coupled Repair/ Nucleotide Excision Repair*.

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state isolate e gentilmente fornite L. H. Thompson.

<i>Cell lines</i>	<i>Genotype</i>	<i>Defect</i>	<i>Human Homologous</i>
AA8	WT	WT	
EM9	XRCC1 -	Deficient in BER	DNA ligase III
UV61	ERCC6-	Deficient in TCR	CSB

Le linee cellulari di Hamster cinese sono state coltivate in terreno D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO, Italy) supplementato con il 10% di siero fetale di Bovino (Gibco, Italy), 1% di glutammina e 1% penicillina e streptomicina (Gibco, Italy) ad una temperatura di 37°C,

95% di umidità e lo 5% di CO₂.

Le cellule sono state trasfettate con vettore retro-virale pBABE puro e pBABE mSMO alfa.

TRASFEZIONE DELLE LINEE CELLULARI CON VETTORE RETROVIRALE

Per la trasfezione delle cellule è stato utilizzato il seguente protocollo:

Produzione dello stock virale

- seminare 2×10^5 cellule per packaging BOSC 23 su piastre Petri in D-MEM con 10% di siero fetale bovino (una piastra per plasmide + inserto, una per controllo senza inserto), incubare a 37°C per 24 ore,
- 5min prima della trasfezione sostituire il terreno con del nuovo contenente clorochina 25µM (per inibire la degradazione del DNA da parte delle idrolisi lisosomiali); preparare la mix di trasfezione: 10µg del plasmide, 2M CaCl₂·2H₂O, 2X HBS (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na₂PO₄, 12mM D-glucosio e 50mM HEPES, pH 7.05); aggiungere immediatamente la mix alla piastra contenente le BOSC 23, incubare a 37°C per 6-9 ore, quindi sostituire il terreno con D-MEM completo e incubare a 37°C *overnight*,
- sostituire il terreno con del nuovo e incubare a 37°C altre 8 ore, dopodiché raccogliere il terreno con i capsidi virali contenenti il plasmide e filtrarlo su un filtro 0,45µm.

Infezione delle cellule bersaglio

- aggiungere 4µg/ml di polibrene (bromuro di esadimetrina) allo stock virale microfiltrato al fine di facilitare l'ingresso del virus nelle cellule bersaglio, seminate precedentemente sulle piastre Petri in quantità corrispondente al 25% di confluenza, e incubare a 37°C *overnight*,
- sostituire il terreno di trasfezione con del D-MEM completo e incubare per altre 24 ore,
- sostituire il terreno con del nuovo contenente l'antibiotico puromicina (*SIGMA-ALDRICH, Italy*) (7,5µg/ml per le AA8 e EM9, 10µg/ml per le UV61),
- la selezione è stata protratta per 2-4 settimane (cambiando il terreno selettivo circa ogni 3-5 giorni), al termine delle quali è stato possibile isolare e raccogliere le colonie

cellulari sviluppatesi,

- i cloni cellulari così ottenuti sono stati mantenuti in selezione con la puromicina alla concentrazione di 5µg/ml.

VALUTAZIONE DEL GRADO DI INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA mSMOα

Estrazione RNA_{tot} dalle cellule

Le cellule sono state recuperate mediante tripsinizzazione, centrifugate a 600 g e il pellet ottenuto è stato congelato in azoto liquido. Poi si è proceduto all'estrazione dell'RNA totale servendosi della tecnologia QIAGEN RNeasy Mini Kit. Come prima cosa sono stati aggiunti 600µl di Tampone RTL, contenente β-mercaptoetanolio all'1%. Il campione è stato omogeneizzato passandolo minimo 5 volte attraverso un ago da siringa da 20-G (Ø 0.9mm). E' stato aggiunto un volume di etanolo al 70% all'omogeneizzato ed è stato applicato su una colonnina da estrazione (RNeasy mini spin column) posta su un tubo da raccolta, è stato centrifugato per 15 secondi a 10000 rpm. Quindi è stato eliminato l'eluato dal tubo di raccolta, sono stati caricati sulla colonnina 700µl di Tampone RW1 ed è stata effettuata una centrifuga per 15 secondi a 10000 rpm per un primo lavaggio. La colonnina è stata trasferita in un nuovo tubo, sono stati pipettati 500 µl di Tampone RPE, e centrifugata di nuovo per 15 secondi a 10000 rpm per un secondo lavaggio. Sono stati pipettati ancora 500µl di Tampone RPE ed è stata effettuata una centrifuga per 2 minuti a 14000 rpm per asciugare la membrana della colonnina. La colonnina è stata trasferita in una eppendorf da 1,5ml opportunamente marcata e sono stati pipettati nella colonnina 30µl di H₂O RNase-free, è stata effettuata una centrifuga per 1 minuto a 10000 rpm. L'eluato ottenuto è stato analizzato per verificarne la quantità e la qualità dell'RNA.

Analisi qualitativa e quantitativa dell'RNA

Per determinare la concentrazione dell'RNA, i campioni sono stati diluiti in H₂O_{DEPC} e analizzati allo spettrofotometro utilizzando la seguente formula:

$$[\text{RNA}] = \text{O.D. } 260\text{nm} \times 40 \times \text{Fattore di diluizione}$$

L'O.D. (l'unità di densità ottica) dell' RNA in H₂O_{DEPC} ad una lunghezza d'onda di 260nm, equivale ad una concentrazione di 40µg/ml. Il rapporto tra l'assorbanza a 260 e a 280nm è un indice della purezza del campione. In assenza di contaminazioni da fenolo e/o proteine il

rapporto delle assorbanze (A_{260}/A_{280}) non deve essere inferiore a 1.8 – 2.0.

Reazione di Trascrizione inversa, RT-PCR

La tecnica di RT-PCR è una metodica che consente di visualizzare l'espressione di uno specifico gene grazie all'attività della trascrittasi inversa in combinazione con la Taq polimerasi. Il procedimento classico prevede un primo passaggio di retrotrascrizione seguito dall'amplificazione di specifiche sequenze del cDNA ottenuto. Le reazioni di retrotrascrizione sono state eseguite in un volume finale di 20 μ l utilizzando l'enzima "SuperScript II reverse transcriptase" della Invitrogen, con relativo tampone di reazione 5x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), antiossidante DTT (0.1 M) e inibitore dell'RNasi (RNase OUT).

E' stata preparata una miscela di reazione composta da:

- Random esaprimers 50-250ng
- RNA stampo 1 μ g
- dNTPs 0.5mM
- H₂O_{DEPC} fino a 12 μ l

Questa miscela è stata posta, per permettere la denaturazione dell'RNA, a 65°C per 5 min e poi in ghiaccio per 2 min. Quindi sono stati aggiunti:

- Tampone 5 x 4 μ l
- DTT 2 μ l
- RNase OUT (40U/ μ l) 1 μ l

A questo punto la miscela di reazione è stata lasciata 2 minuti a 25°C prima di aggiungere 1 μ l (200U) di "SuperScript II reverse transcriptase". Le condizioni di reazione sono:

- Appaiamento dei primers: 10' a 25°C.
- Trascrizione inversa: 50' a 42°C.
- Inattivazione della reazione: 15' a 70°C.

Per degradare l'RNA formante ibridi con il DNA, al prodotto di reazione può essere aggiunta RNasi A (2U), che è stata lasciata agire a 37°C per 20-30 minuti. Le reazioni di amplificazione del cDNA ottenuto sono state eseguite in un volume finale di 50 μ l utilizzando la DNA polimerasi della Biotools, con relativo tampone di reazione 10x (75mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 20mM (NH₄)SO₄) e MgCl₂ (50mM).

La miscela di reazione è composta da:

- cDNA stampo 2µl (100ng)
- Primer forward 100ng e Primer reverse 100ng
- Tampone 10 x 5µl
- MgCl₂ 1.5mM
- DNA polimerasi 1.75U
- dNTPs 0.2mM
- H₂O milliQ fino a 25µl

Le condizioni di amplificazione sono:

- Denaturazione iniziale del template: 4' a 95°C.
- 35 cicli caratterizzati da: 30'' a 94°C; 30'' alla temperatura di appaiamento che, nel caso dei primers utilizzati, corrisponde a 53°C; 60'' a 72°C.

Lo strumento utilizzato per i cicli di reazione è il "Gene Amp PCR System 2400" della Perkin Elmer.

Elettroforesi su gel di agarosio

Il DNA è stato fatto correre su gel d'agarosio orizzontale al 1.2% o al 2% (secondo le esigenze sperimentali) con bromuro d'etidio 0,5µg/ml in tampone TAE (Tris 40mM, acido acetico 0.1% ed EDTA 1mM). Come tampone di caricamento è stato impiegato Ficoll BPB 6X (Ficoll 30%, BPB 0.1% ed EDTA 50mM) e per valutare le dimensioni del DNA analizzato si è utilizzato il marcatore di peso molecolare λ DNA/*Hind* III Marker. Terminata l'elettroforesi il DNA è stato visualizzato su un transilluminatore a luce UV.

TRATTAMENTO DELLE COLTURI CELLULARI ED ANALISI

Le linee cellulari trasfettate con vettore retro-virale pBABE puro e pBABE contenente la mSMO alfa sono state esposte alle radiazioni ionizzanti, alle dosi di 0,1 e 0,01Gy (Gilardoni MGL 200/8D operante a 250Kvp e 6mA ("*dose rate*" 60cGy/min) e recuperate ed analizzate a differenti intervalli di tempo (0, 6 e 24 ore) dall'irradiazione.

Per l'analisi del danno ossidativo tramite il *Comet Assay* le cellule sono state irradiate anche ad una dose più elevata di raggi X (3Gy) e sono state recuperate a 0, 0.5, 1.5 ore dall'irradiazione.

Analisi citofluorimetrica della produzione endogena dei ROS

La formazione di ROS nelle colture cellulari è stata misurata attraverso lo studio della trasformazione della 2',7'-diclorodidrofluoresceina di acetato (DCFDA, *Molecular Probes*), una molecola che diviene fluorogenica quando un gruppo acetato viene rimosso dall'ossidazione. In questo modo, la quantità di ROS intracellulari può essere agevolmente misurata come picco di fluorescenza all'analisi citofluorimetrica.

Per questa analisi le cellule in coltura sono state staccate dalle piastre di Petri e risospese in PBS1x ad una concentrazione di 10^6 cells/ml. Le cellule sono state quindi marcate con 10 μ M DCFDA per 30 minuti a 37°C, 5% CO₂. L'ossidazione di DCFDA è stata misurata mediante analisi al citofluorimetro (FACScalibur instrument, Becton Dickinson) utilizzando le lunghezze d'onda di 488nm in eccitazione e 527nm in emissione. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante software WinMDI 2.9.

Test della vitalità e crescita cellulare: MTT Assay

Per valutare la proliferazione cellulare è stato utilizzato il test MTT che prevede l'utilizzo di un sale giallo di tetrazolio, MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro), che viene trasformato in cristalli di formazano, viola, dalle cellule metabolicamente attive. I cristalli di formazano vengono poi solubilizzati ottenendo una soluzione colorata di cui è possibile misurare l'assorbanza. Per quanto concerne il protocollo di utilizzo, le cellule sono state seminate in multiwell da 96 pozzetti. Ogni punto è stato seminato in quadruplo, inoculando 1500 cellule/pozzetto in 100 μ l di terreno completo. Il giorno successivo sono stati aggiunti 10 μ l di MTT (la concentrazione finale 0,5mg/ml, Roche) ad ogni pozzetto. Dopo 3-4 ore di incubazione a 37°C i cristalli di formazano sono stati solubilizzati mediante l'aggiunta di 100 μ l di una soluzione di solubilizzazione contenente 10% di SDS in 0,01M HCl e incubati *overnight* a 37°C.

La soluzione così ottenuta è stata analizzata spettrofotometricamente leggendo il valore

dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595nm utilizzando il lettore ELISA Microplate Reader.

Si legge inoltre l'assorbanza a 690nm (*background*); i valori di assorbanza finali sono dati dalla differenza tra il dato a 595nm e quello a 690nm.

La percentuale di cellule sopravvissute è così calcolata:

$$\frac{\text{Assorbanza pozzetto trattato con MTT kit}}{\text{Assorbanza pozzetto di controllo}} \times 100$$

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

La determinazione delle fasi del ciclo cellulare e dell'apoptosi è stata effettuata con il citofluorimetro, in seguito a colorazione con ioduro di propidio. Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA e permette perciò la valutazione della quantità di acidi nucleici delle cellule e del loro stato di ploidia.

Per l'analisi del ciclo cellulare le cellule (1×10^6), fissate precedentemente con etanolo al 70%, vengono colorate con il fluorocromo ioduro di propidio ($50 \mu\text{g/ml}$ in PBS + $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNasi A) e infine analizzate al citofluorimetro. La curva di fluorescenza ottenuta dall'elaborazione dei dati, detta Histogram Plot, presenta due picchi, il primo dei quali rappresenta la fase G_1 del ciclo cellulare, interposta tra la fine della mitosi e l'inizio della sintesi del DNA, ed il secondo picco è indicativo della fase G_2 pre-mitotica. La depressione tra i due picchi rappresenta la fase di sintesi del DNA o fase S. Se sono presenti cellule apoptotiche si possono trovare nel grafico picchi aneuploidi, antistanti il picco della fase G_1 . L'analisi dei dati è stata effettuata mediante software WinMDI 2.9.

Frammentazione del DNA: saggio TUNEL

Il saggio TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling) è un metodo utilizzato per la rivelazione della frammentazione del DNA in seguito alla cascata di attivazione enzimatica dopo induzione dell'apoptosi. Durante l'apoptosi, infatti, il DNA subisce dei tagli del filamento che possono essere identificati mediante marcatura delle estremità libere 3'OH

attraverso l'aggiunta di nucleotidi, in una reazione enzimatica catalizzata dalla Tdt (terminal deossinucleotidil transferase). Durante la prima fase avviene la marcatura dei filamenti ad opera della transferasi che catalizza l'aggiunta dei dUTPs che verranno marcati, nella seconda fase, con fluoresceina FITC (Fluoresceina Isotiocianato) la quale ne renderà possibile l'identificazione e la quantificazione attraverso il citofluorimetro.

Il protocollo prevede l'utilizzo di cellule fissate con paraformaldeide al 4%. Le cellule vengono incubate in 50µl di TUNEL-reaction mixture (*Roche*) per 1 ora a 37°C al buio e infine analizzate al citofluorimetro. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante software WinMDI 2.9.

Fosforilazione dell'istone H2AX

Per determinare la presenza del danno al DNA è stato utilizzato un test molto sensibile, quale la valutazione della fosforilazione dell'istone H2AX mediante tecniche di citometria a flusso.

La proteina istonica H2AX gioca un ruolo importante nella risposta ai danni alla doppia elica che derivano da diverse fonti, tra cui le radiazioni ionizzanti e lo stress ossidativo.

Le cellule, fissate precedentemente con etanolo al 70%, vengono lavate con PBS, risospese con 0,2% Triton X-100, 1% di BSA e PBS e incubate per 30 minuti in ghiaccio. Il pellet viene incubato con 2µg/ml di anticorpo monoclonale primario *Anti Phosphohistone H2AX (ser139)* e lasciato *overnight* a 4°C. Quindi, si effettua un lavaggio in PBS e si risospende in 100µl di anticorpo secondario *Mouse Monoclonal Anti-Rabbit FITC-conjugate* (diluito 1:20) (*Molecular Probes*) per 30 minuti a temperatura ambiente.

In seguito le cellule vengono controcolorate con ioduro di propidio (5µg/ml in PBS) contenente 100 µg/ml RNasi. La fluorescenza delle cellule viene misurata tramite il citofluorimetro. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante software WinMDI 2.9.

Saggio della catalasi

La catalasi è un enzima proteico presente nelle cellule di tutti gli organismi viventi che svolge la funzione di eliminare i composti reattivi dell'ossigeno (ROS) come l'acqua ossigenata e i radicali superossido, che risultano dannosi per le cellule provocando danni alle proteine e al

DNA.

La presenza della catalasi è stata determinata mediante il saggio allo spettrofotometro, utilizzando un mix contenente il buffer K-Fosfato, l'estratto proteico cellulare e perossido di idrogeno (H_2O_2). L'attività della catalasi è stata valutata seguendo il decremento dell'assorbanza del H_2O_2 aggiunto al campione a 240nm, ed espressa come differenza di assorbanza/min/mg di proteina.

Valutazione del danno ossidativo al DNA: *Comet Assay*

La combinazione del *Comet Assay* standard con enzimi che identificano i nucleotidi ossidati e incidono lo scheletro del DNA, ha fatto divenire questa metodologia un efficace sistema per l'analisi del danno ossidativo del DNA. La tecnica prevede di utilizzare cellule che sono incluse in agarosio e posizionate su un vetrino per essere trattate con un buffer che rimuova ogni componente cellulare ad eccezione del DNA. Il DNA così ottenuto viene sottoposto al trattamento con un enzima che, introducendo dei tagli in corrispondenza di nucleotidi ossidati, ne evidenzia la presenza.

Per stimare il danno ossidativo al DNA, per ogni campione di cellule vengono preparati due vetrini che seguono lo stesso procedimento di preparazione tranne nel punto in cui un vetrino è trattato con l'enzima che riconosce le basi ossidate mentre l'altro è trattato solo con una soluzione tampone. I valori di ossidazione si ottengono togliendo la % tailDNA del vetrino non trattato con l'enzima (che rappresenta la frammentazione di base del DNA) dalla % tailDNA del vetrino trattato con l'enzima. L'enzima da noi utilizzato è la formammido pirimidina DNA glicosilasi (*FPG*, *Sigma-Aldrich Co.*) che è normalmente presente nelle cellule ed è utilizzato per riparare il DNA ossidato riconoscendo la 8-OHdG e tagliando il filamento di DNA.

Protocollo *Comet Assay*

Per eseguire il *Comet Assay* circa 10^4 cellule in 10 μ l sono state diluite in 120 μ l di agarosio a basso punto di fusione (Agarosio Low Melting 0,75 %) e sono state seminate su vetrini precedentemente gelatinizzati con Agarosio Normal Melting all'1%. Dopo aver tenuto i vetrini a 4°C per permettere all'agarosio di solidificare essi vengono poi immersi in una soluzione di lisi costituita da sali e detergenti per la degradazione di tutte le membrane

cellulari (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, pH 10; e 10% di DMSO, 1% di Triton X-100 aggiunti 1 ora prima), per una notte a 4°C. In seguito al trattamento di lisi sui vetrini rimane solo il DNA che, dopo 3 lavaggi in Fpg Buffer, viene trattato con 80µl di enzima FPG (*Sigma-Aldrich Co.*) (concentrazione finale 1µg/ml) o tampone per evidenziare le basi ossidate, e incubati per 30min a 37°C. Tutti i vetrini vengono poi immersi in una soluzione alcalina (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA; pH 13) overnight a 4°C per denaturare il DNA (il DNA si srotola) e in seguito vengono sottoposti ad un campo elettrico per permettere la corsa elettroforetica dei frammenti di DNA (25V, 300mA; 20min). Alla fine dell'elettroforesi i vetrini vengono neutralizzati con 0,4 M Tris a pH 7.5, asciugati, colorati con bromuro di etidio (20µg/ml) che ci permette di poter valutare i campioni mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza (Eclipse E400; Nikon) e di un computer dotato del software di analisi delle immagini (*Comet Assay III; Perceptive Instrumentes, UK*) che quantifica il danno primario al DNA presente nelle singole cellule utilizzando un parametro definito *tail moment*. Questo parametro introdotto da Olive nel 1990 mette in relazione la lunghezza della coda e la % di DNA migrato. Il software lo misura effettuando il prodotto tra la distanza percorsa dal DNA (lunghezza della coda) e la quantità di DNA presente nella coda (intensità della coda). I valori di ossidazione si ricavano sottraendo la % tailDNA del vetrino non trattato con l'enzima (che rappresenta la frammentazione di base del DNA) dalla % tailDNA del vetrino trattato con l'enzima.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come valori medi $\pm$ deviazione standard/errore standard. Per la valutazione statistica delle differenze osservate tra i vari punti sperimentali sono stati utilizzati il test di Student e il test *one-way* ANOVA, adottando una soglia minima di significatività pari a $p < 0,05$.

RISULTATI

ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI mSMO α MEDIANTE RT-PCR

Per verificare l'espressione ectopica del gene di interesse, è stata utilizzata la tecnica di RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) con primer specifici per mSMO α .

Nelle cellule trasfettate con il vettore contenente l'inserto mSMO α , la dimensione degli amplificati è di 499 pb.

Come si vede il gene è espresso in tutte tre linee di CHO:

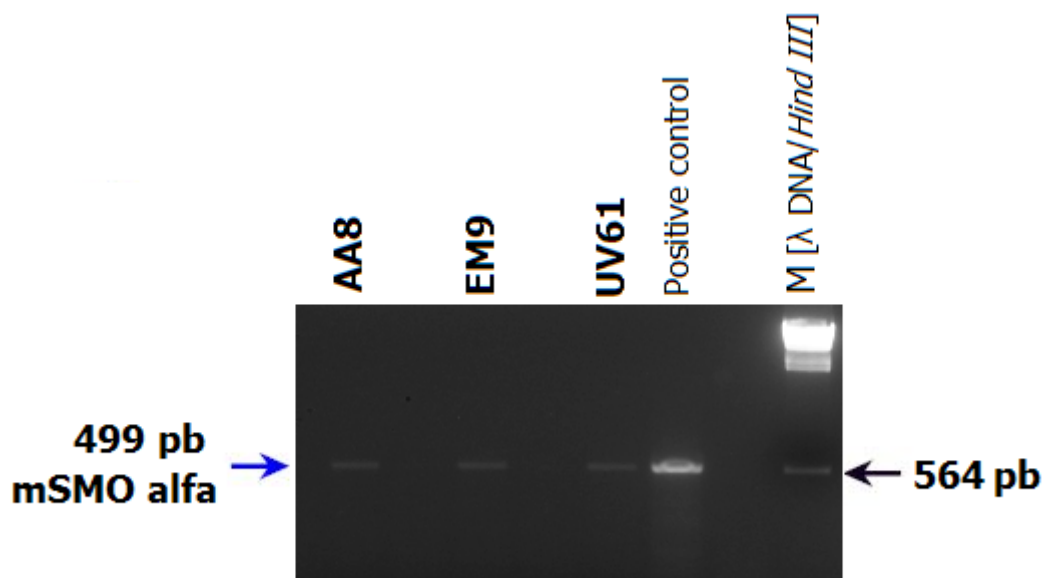
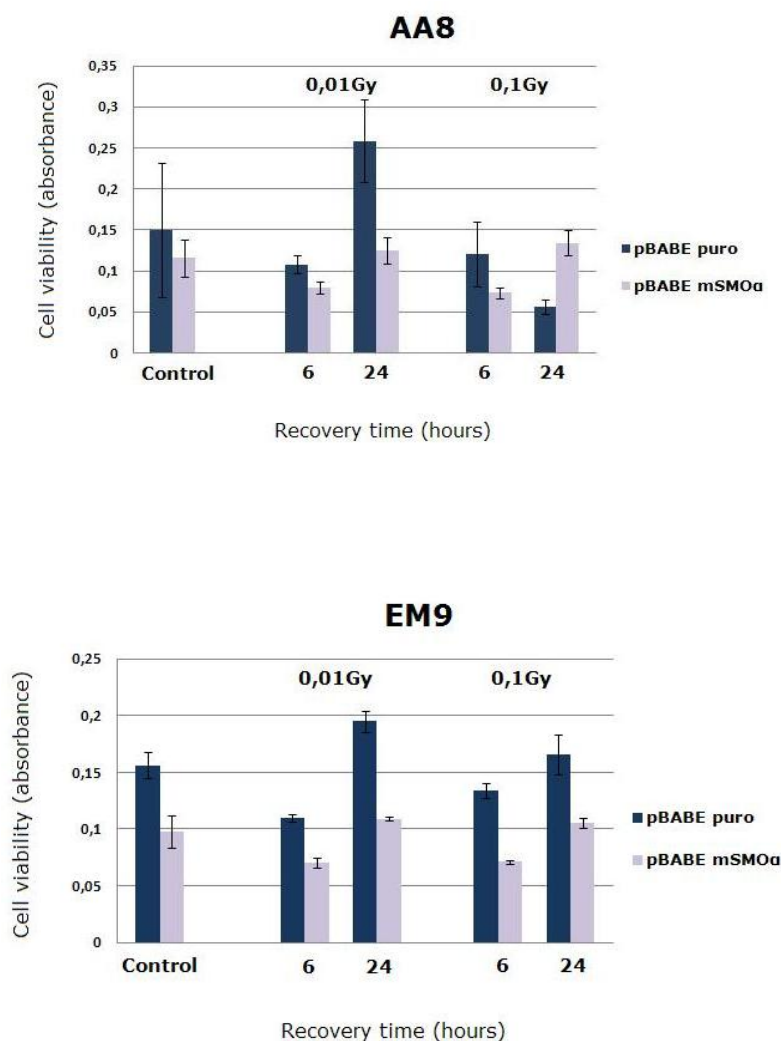


Figura 20: Espressione di mSMO α nelle AA8, EM9 e UV61.

VITALITA' E PROLIFERAZIONE CELLULARE

Per la valutazione della vitalità e proliferazione cellulare dopo l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, è stato utilizzato il test colorimetrico MTT. In questo test viene quantificata l'attività mitocondriale, segno di vitalità cellulare, misurando la formazione di cristalli di colore blu-violetto, che vengono a formarsi in seguito alla riduzione dell'anello tetrazolico, presente nella struttura del MTT. Questo test permette di valutare *in vitro* la capacità di un agente di inibire la crescita cellulare. La riduzione nel numero delle colonie può derivare sia dal blocco della proliferazione che dall'induzione di morte cellulare.

Nessuna differenza è stata riscontrata tra le cellule trasfettate sia con vettore vuoto sia con vettore contenente la mSMO esposte e non esposte ai raggi X.



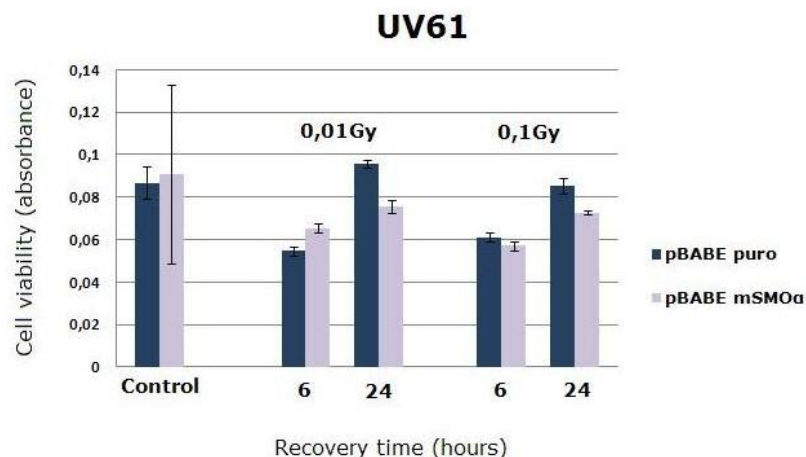


Figura 21: Analisi della vitalità e crescita cellulare dopo l'esposizione alle radiazioni ionizzanti.

SAGGIO CITOFLUORIMETRICO DELLA PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE

L'analisi citofluorimetrica, condotta a diversi tempi dall'esposizione alle radiazioni X (6 e 24 ore), ha dimostrato che le cellule con la mSMO espressa hanno un andamento normale del ciclo cellulare nell'intervallo di dosi utilizzate (0,1 e 0,01Gy) (Figura 22).

APOPTOSI

Una delle risposte cellulari a situazioni di "stress" è l'attivazione del programma di morte cellulare chiamato apoptosi, inizialmente con un intento "protettivo", ma che può diventare critico, al perdurare della condizione di stress.

Per evidenziare la possibile induzione di morte cellulare programmata è stata utilizzata la medesima tecnica di citometria a flusso: il saggio TUNEL, impiegato per la rivelazione della frammentazione del DNA in seguito alla cascata di attivazione enzimatica dopo induzione di apoptosi.

Il saggio TUNEL e l'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare non hanno evidenziato un aumento del tasso di apoptosi nelle cellule trasfettate con l'enzima mSMO ad entrambe le dosi di radiazioni (0,1 e 0,01Gy) ed ad entrambi i punti sperimentali (6 e 24 ore).

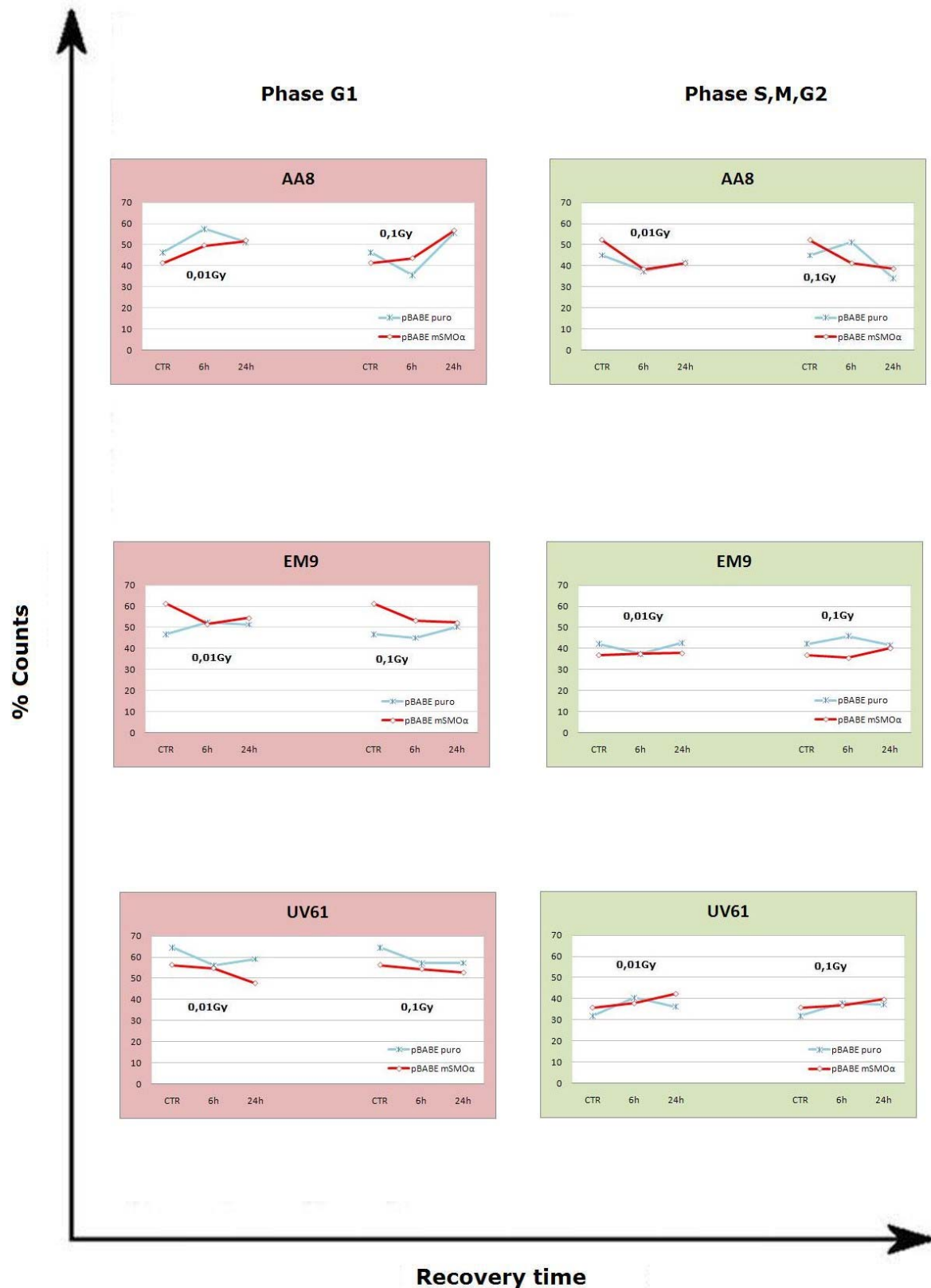


Figura 22: Grafici rappresentanti l'andamento del ciclo cellulare in seguito a irraggiamento a differenti tempi.

ANALISI DELLA PRODUZIONE ENDOGENA DEI ROS

Mediante l'utilizzo del citofluorimetro FACSCalibur sono stati analizzati i livelli di produzione endogena dei ROS nelle linee trasfettate con mSMO, AA8, EM9 e UV61. L'esperimento è stato effettuato a diverse dosi di raggi X e diversi intervalli di tempo per poter studiare la produzione dei ROS, nelle cellule che mostrano la sovraespressione della mSMO, in funzione dell'irradiazione e del tempo. L'analisi è stata effettuata su cellule vive che producevano ROS, mediante la marcatura con DCFDA.

I risultati mostrano che i livelli di ROS prodotti in tutte tre linee prese in esame, presentano un andamento irregolare, cioè non si evidenziano grandi differenze nelle tre linee cellulari. Solamente nei controlli trasfettati con mSMO nelle cellule mutate abbiamo un lieve aumento dei livelli di produzione endogena dei ROS.

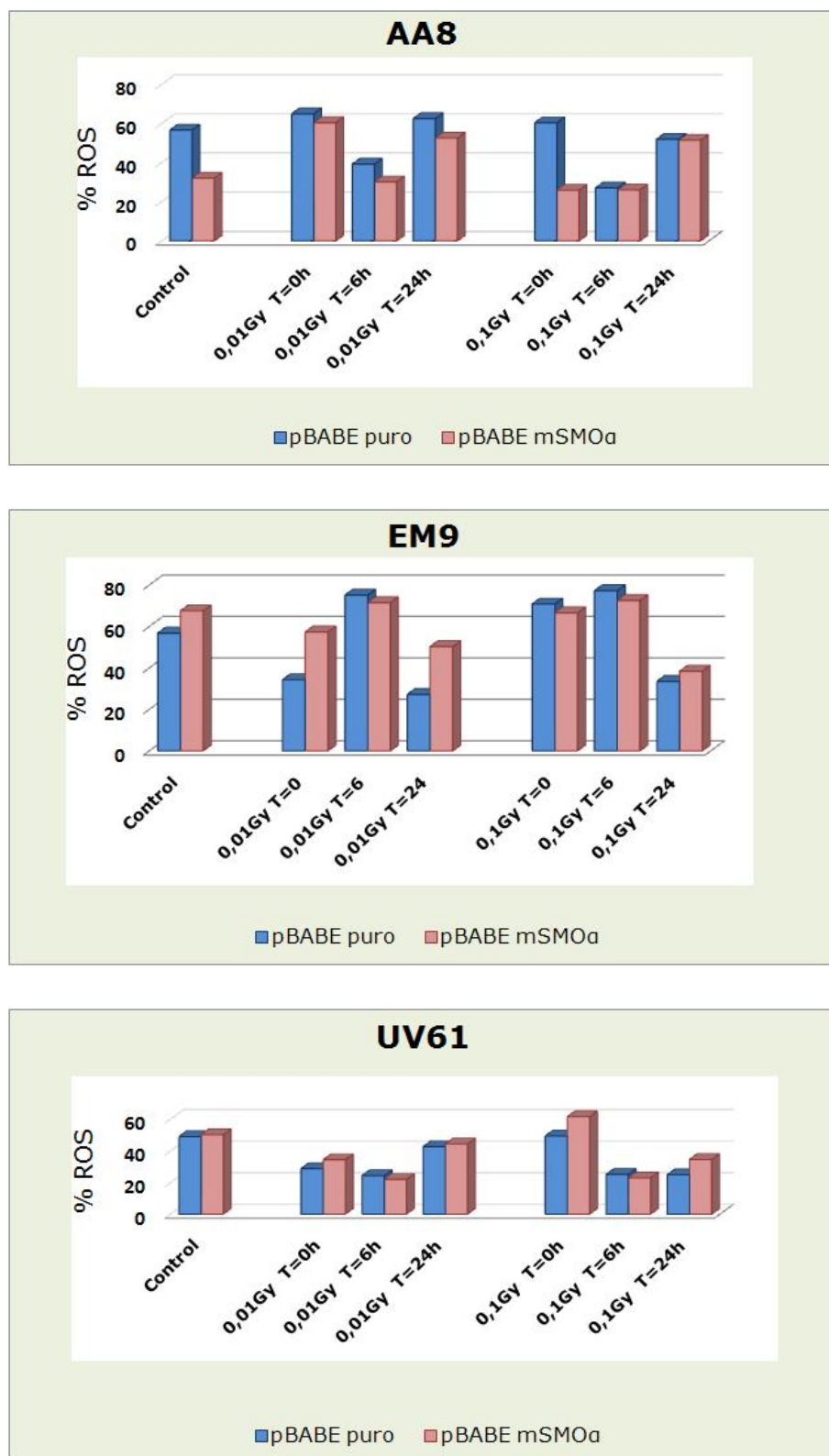


Figura 23: Analisi citofluorimetrica della produzione di ROS.

ANALISI DELL'OSSIDAZIONE DEL DNA

Il danno al DNA indotto dal trattamento con raggi X è stato determinato in cellule trasfettate con plasmide vuoto e quello contenente mSMO α mediante il metodo della Cometa, una tecnica di elevata sensibilità nell'evidenziare il danno precoce al DNA anche per esposizione a basse dosi di radiazioni.

I dati ottenuti sono stati processati mediante analisi della varianza univariata (ANOVA), tale analisi ha incluso il test di Duncan per confronti multipli. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il programma SPSS 16.0 per Windows. Tramite il test di Duncan ogni trattamento è stato confrontato con il controllo (Controllo= 0) e con il trattamento stesso nei diversi tempi di recupero. I relativi livelli di danno ossidativo sono stati normalizzati rispetto al controllo non irraggiato. Nelle figure i valori corrispondenti a lettere diverse differiscono tra loro significativamente per $p < 0,05$. Per la valutazione statistica delle differenze osservate tra pBABE puro e pBABE mSMO α è stato utilizzato il test di Student ($p < 0,05$), tuttavia i risultati ottenuti non sono statisticamente significativi.

L'analisi del danno al DNA ha mostrato un aumento dell'ossidazione nelle tre linee di CHO (AA8, EM9, UV61) trasfettate con mSMO α principalmente alla dose più elevata (3Gy) di radiazioni ionizzanti.

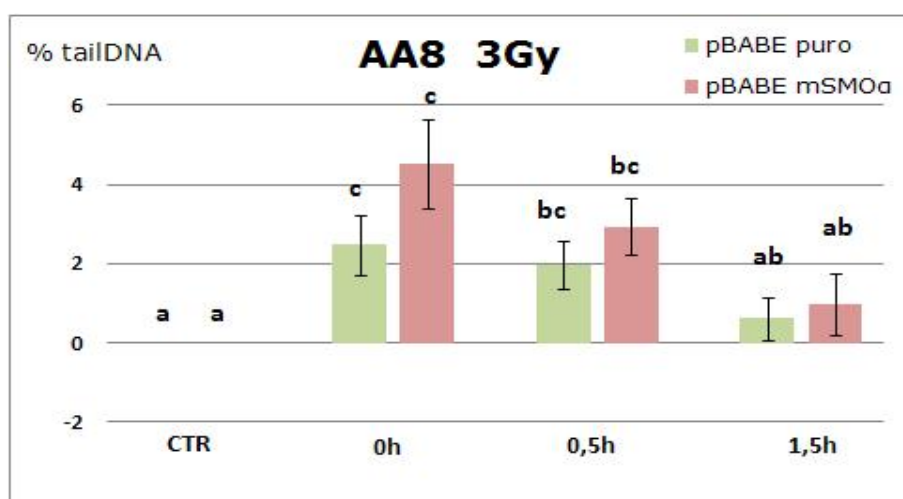
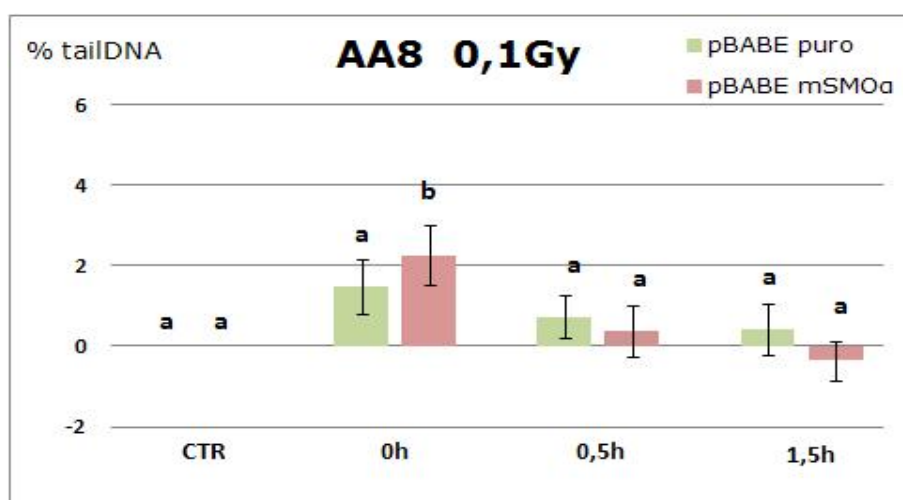
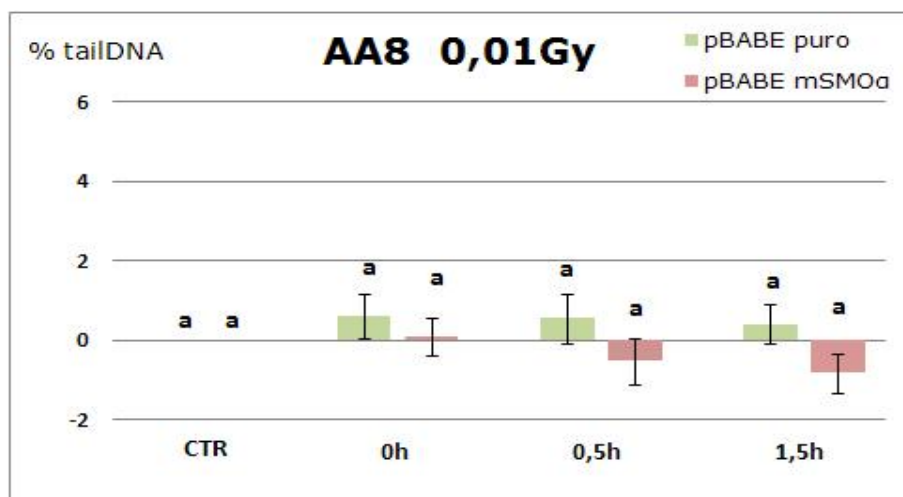


Figura 24: Danno al DNA valutato mediante *Fpg Comet Assay* nella linea parentale AA8.

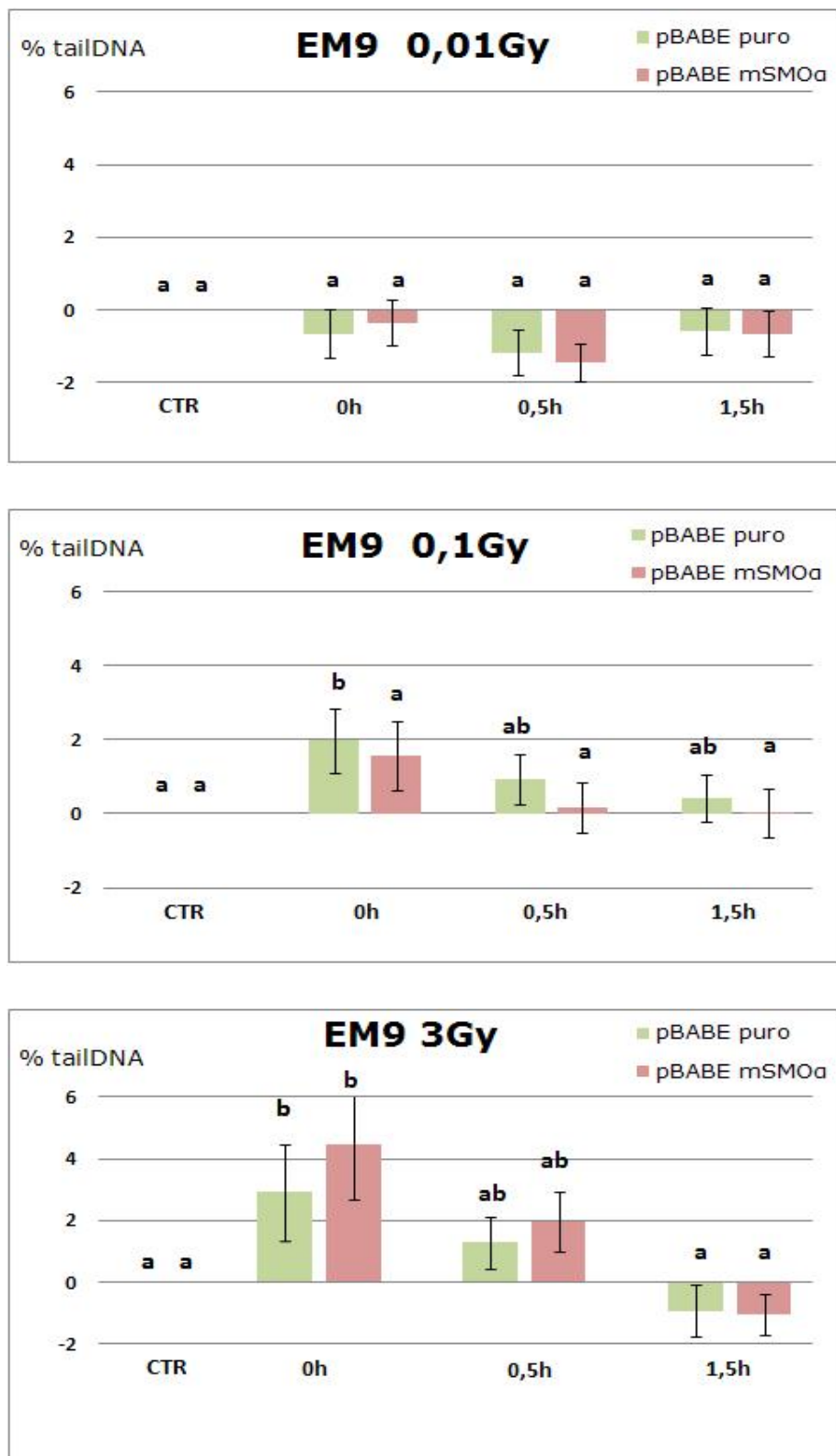


Figura 25: Danno al DNA valutato mediante *Fpg Comet Assay* nella linea difettiva EM9.

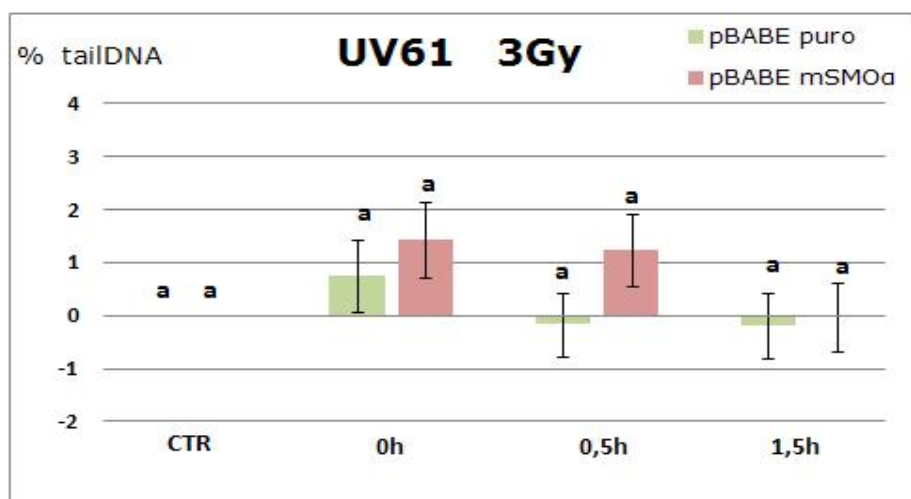
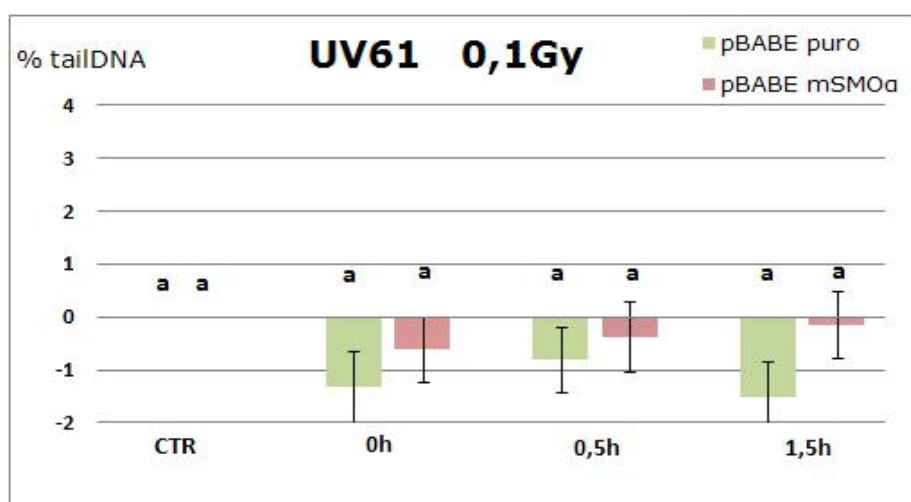
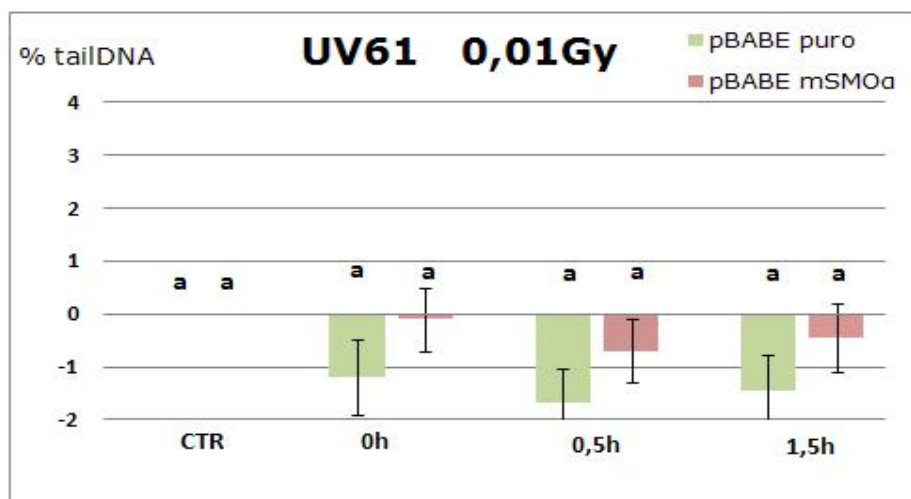


Figura 26: Danno al DNA valutato mediante *Fpg Comet Assay* nella linea difettiva UV61.

ANALISI DELLA CATALASI

Diversi enzimi antiossidanti contribuiscono alle difese della cellula, fra queste la catalasi.

La catalasi è una specie antiossidante il cui ruolo è quello di proteggere le macromolecole biologiche dal danno ossidativo.

L'analisi spettrofotometrica evidenzia che l'attività enzimatica della catalasi è più alta nelle linee mutate UV61 e EM9 che nelle linea parentale AA8.

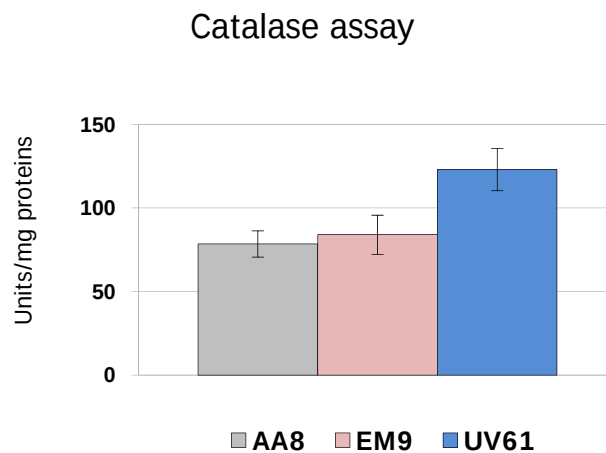


Figura 27: Livelli di catalasi nelle linee di CHO.

ANALISI DELL'ISTONE H2AX

Numerosi geni sono coinvolti nella risposta cellulare alle rotture al DNA, tra questi il gene per l'istone H2AX; la rapida fosforilazione di questa proteina è essenziale per una corretta rimozione di questi danni.

H2AX è un noto *marker* di danno al DNA dovuto a stress ossidativo. Questa tecnica consente, in linea di principio, di rilevare una singola DSB per cellula ed è quindi di estremo interesse per lo studio dell'induzione e della riparazione delle DSBs a seguito di esposizione a radiazioni ionizzanti. In particolare, la cinetica di fosforilazione-detossificazione dell'istone H2AX dopo esposizione a radiazioni ionizzanti può dare informazioni sulla radiosensibilità cellulare.

I risultati ottenuti mostrano un andamento univoco nelle tre linee cellulari prese in esame, non si osserva una maggiore presenza dell'istone H2AX fosforilato nelle cellule trasfettate con mSMO e irradiate (0,1 e 0,01Gy) rispetto al controllo e rispetto alle cellule trasfettate con vettore vuoto.

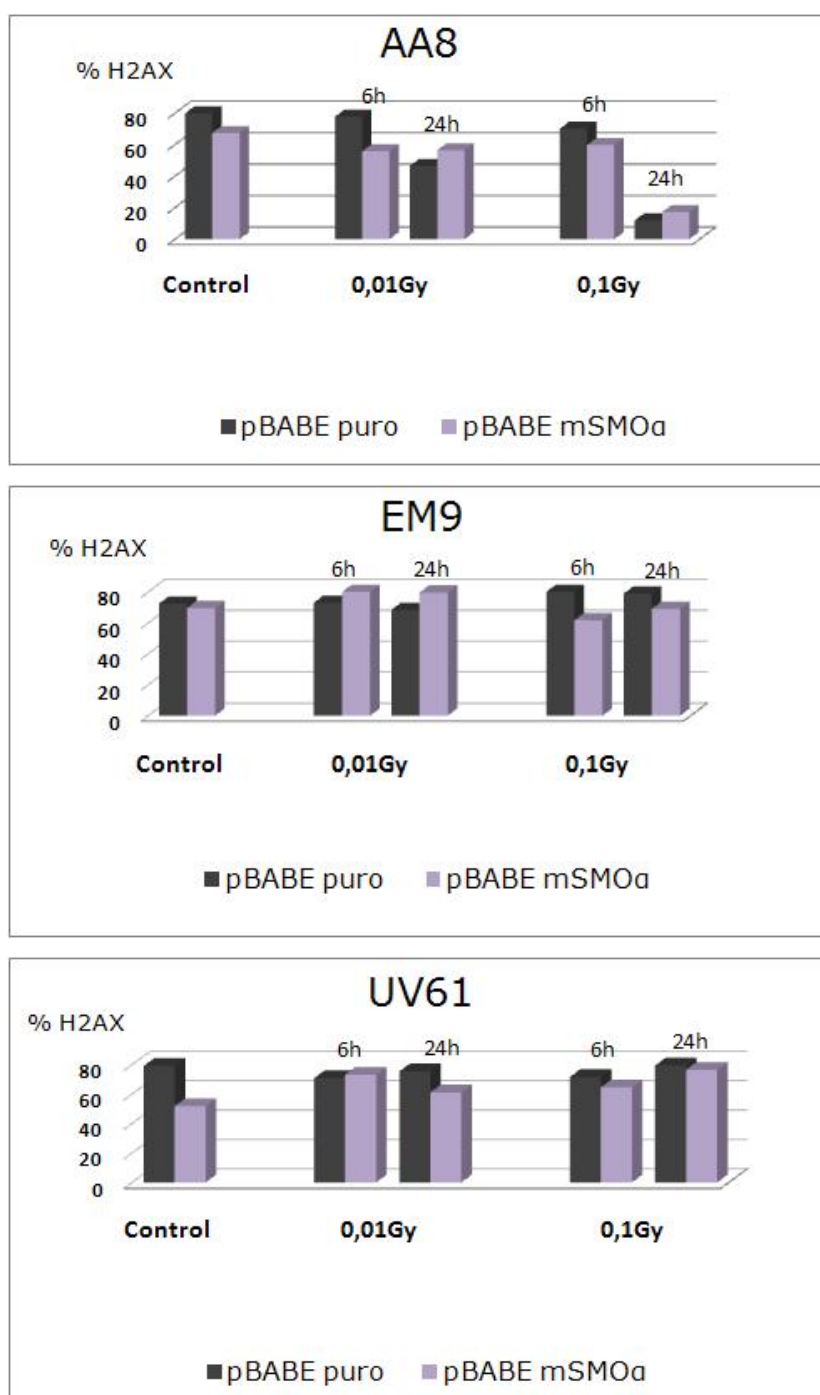


Figura 28: L'analisi citofluorimetrica dell'istone H2AX nelle linee cellulari di CHO.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo stress ossidativo, definito come squilibrio tra la produzione dei ROS e la loro detossificazione, è dovuto alle sostanze ossidanti generate dal metabolismo cellulare. Inoltre esso gioca un ruolo cruciale nella proliferazione e nella morte cellulare.

Studi recenti hanno rilevato che il metabolismo catabolico della spermina è strettamente correlato all'ossidazione del DNA e all'apoptosi attraverso la produzione di perossido di idrogeno come sottoprodotto della sua degradazione a spermidina.

In particolare, nella linea cellulare di neuroblastoma di topo, l'aumento di stress ossidativo porta alla presenza di un valore soglia del danno al DNA che pur non causando la morte cellulare, permette l'attivazione di alcuni meccanismi di riparo (H2AX e APE-1) che rende le cellule stesse predisposte ad andare in apoptosi in seguito ad un irraggiamento successivo, facendo di fatto aumentare la loro radiosensibilità (Amendola et al., 2005; Bianchi et al., 2007).

In questa ricerca abbiamo studiato il ruolo dell'effetto soglia indotto dall'enzima Spermina ossidasi murina nella risposta al danno ossidativo e alla esposizione alle basse dosi di radiazioni ionizzanti nelle linee cellulari di CHO difettive nei due meccanismi di riparazione BER e NER/TCR.

I risultati ottenuti da questo studio mostrano un effetto a dosi molto basse di radiazioni ionizzanti (0,1Gy e 0,01Gy) difficilmente valutabili a livello statistico. Pertanto, l'iperattività della mSMO non porta ad un incremento della radiosensibilità alle basse dosi di radiazioni, come ci si aspettava dai risultati ottenuti nella linea cellulare di neuroblastoma.

La valutazione dell'inibizione delle specie reattive dell'ossigeno in cellule trasfettate con mSMO e sottoposte a stress ossidativo generato da radiazioni ionizzanti non ha evidenziato grandi differenze nelle tre linee analizzate. Abbiamo avuto un aumento dei livelli di ROS indotto dalla SMO soltanto nelle condizioni di controllo non irraggiato nelle due linee cellulari mutanti.

Questi bassi livelli di ROS nelle linee cellulari studiate sono probabilmente dovuti ad una maggiore presenza di molecole *scavenger* o di enzimi antiossidanti, quali il glutatione perossidasi (Lapshina et al., 2005) o la catalasi. La maggior capacità di reagire allo stress ossidativo in queste linee deriva probabilmente dalla selezione adattativa a cui le linee

difettive per i meccanismi NER/TCR e BER sono state sottoposte.

Il danno al DNA valutato mediante *Comet Assay*, una metodica con elevata sensibilità nell'evidenziare il danno precoce al DNA anche per esposizione a basse dosi poiché riesce a individuare le differenze tra singole cellule, in questo studio ha mostrato un incremento dell'ossidazione nelle tre linee prese in esame sovra esprimenti la mSMO principalmente alla dose di 3Gy.

Pertanto nonostante le cellule siano esposte ad uno stress ossidativo endogeno, in questo caso, non mostrano cambiamenti nella loro radiosensibilità.

BIBLIOGRAFIA

- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R, Waters MD, Aitio A, (2000). **IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effect of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety.** *Mutat. Res.*, 463, 111-172.

- Amendola R, Bellini A, Cervelli M, Degan P, Marcocci L, Martini F, Mariottini P, (2005). **Direct oxidative DNA damage, apoptosis and radiosensitivity by spermine oxidase activities in mouse neuroblastoma cells.** *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 1775, 15-24.

- Amendola R, Cervelli M, Fratini E, Polticelli F, Sallustio DE, Mariottini P, (2009). **Spermine metabolism and anticancer therapy.** *Current Cancer Drug Targets*, 9, 118-130.

- Angelis KJ, Dusinska M and Collins AR, (1999). **Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity.** *Electrophoresis*, 20, 2133-2138.

- Babbar N, Casero RA Jr, (2006). **Tumor necrosis factor-alpha increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis.** *Cancer Res.*, 66, 11125-30.

- Babbar N, Murray-Stewart T, Casero RA Jr, (2007). **Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly.** *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 300-4.

- Babior BM, (2000). **Phagocytes and oxidative stress.** *Am. J. Med.*, 109, 33-44.

- Bardocz S, (1993). **The role of dietary polyamines.** *Eur. J. Clin. Nutr.*, 47, 683-690.

- Basu HS, Smirnov IV, Peng HF, Tiffany K, Jackson V, (1997). **Effects of spermine and its cytotoxic analogs on nucleosome formation on topologically stressed DNA *in vitro*.** *Eur. J. Biochem.*, 243, 247–258.

- Beutler BA, (1999). **The role of tumor necrosis factor in health and disease.** *J. Rheumatol. Suppl.*, 57, 16-21.

- Bianchi M, Bellini A, Cervelli M, Degan P, Marcocci L, Martini F, Scatteia M, Mariottini P, Amendola R, (2007). **Chronic sub-lethal oxidative stress by spermine oxidase overactivity induces continuous DNA repair and hypersensitivity to radiation exposure.** *Biochim. Biophys. Acta.*, 1773,774-83.

- Bird RP, Draper HH, Basrur PK, (1982). **Effect of malnaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells; production of micronuclei and chromosomal aberrations.** *Mutat. Res.*, 101, 237-246.

- Bjrås M, Luna L, Johnsen B, Hoff E, Haug T, Rognes T, Seeberg E, (1997). **Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites.** *EMBO J.*, 16, 6314-22.

- Boiteux S, Radicella JP, (1999). **Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress.** *Biochimie*, 81:59-67.

- Brenner DJ, Doll R, Goodhead DT, Hall EJ, Land CE, Little JB, Lubin JH, Preston DL, Preston RJ, Puskin JS, Ron E, Sachs RK, Samet JM, Setlow RB, Zaider M, (2003). **Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100, 13761–13766.

- Brooks WH, (1995). **Polyamine involvement in the cell cycle, apoptosis, and autoimmunity.** *Med. Hypotheses*, 44, 331-338.

- Brooks PJ, Theruvathu JA, (2005). **DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis.** *Alcohol*, 35, 187–193.

- Buermeier AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM, (1999). **Mammalian DNA mismatch repair.** *Annu. Rev. Genet.*, 33, 533-64.

- Carrano AV, Minkle JL, Stetka DG, Moore DH 2nd, (1980). **Variation in the baseline Sister Chromatid Exchange frequency in human lymphocytes.** *Environ. Mutag.*, 2, 325-337.

- Casero RA Jr, Marton LJ, (2007). **Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases.** *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 373-390.

- Castello G, Silvestri I, (1999). **Il linfocita quale dosimetro biologico.** *Caleidoscopio Italiano*, 130.

- Cervelli M, Bellini A, Bianchi M, Marcocci L, Nocera S, Polticelli F, Federico R, Amendola R, Mariottini P, (2004). **Mouse spermine oxidase gene splice variants - nuclear subcellular localization of a novel active isoform.** *Eur. J. Biochem.*, 271, 760-770.

- Chmiel NH, Livingston AL, David SS, (2003). **Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes.** *J. Mol. Biol.*, 327, 431-43.

- Cohen NN, (1998). **A guide to the polyamines.** *New York : Oxford.*

- Collins AR, (2004). **The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations.** *Mol. Biotechnol.*, 26, 249-261.

- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, (2003). **Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease.** *FASEB. J.*, 17, 1195-1214.

- De Arce MA, (1981). **The effect of donor sex and age on the number of Sister chromatid Exchanges in human lymphocytes growing in vitro.** *Hum. Genet.*, 57, 83-85.

- De los Santos C, Zaliznyak T, Johnson F, (2001). **NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct γ -OH-1,N2-propano-2'-deoxyguanosine.** *J. Biol. Chem.*, 276, 9077-9082.

- Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G, (1996). **Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy.** *Mutagenesis*, 11, 605-609.

- Descamps-Latscha, Drüeke T, Witko-Sarsat V, (2001). **Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy.** *Semin. Dial.*, 14, 193-199.

- De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA, (2000). **Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells.** *Mol. Cell. Biol.*, 20, 7980-7990.

- Dronkert MLG and Kanaar R, (2001). **Repair of DNA interstrand cross-links.** *Mutat. Res.*, 486, 217-47. Review.

- Dulout FN, Furnus CC, (1988). **Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells.** *Mutagenesis*, 3, 207-11.

- Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J, (2000). **Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study.** *Aliment Pharmacol. Ther.*, 14, 145-153.

- Evans LA, Kevin MJ and Jenkins EC, (1977). **Human sister chromatid exchange caused by methylazoxymethanol acetate.** *Mutat. Res.*, 56, 51-58.

- Evans PT & Malmberg RL, (1989). **Do polyamine have roles in plant development?** *Ann. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 235-269.

- Fallace HM, (1981). **Uptake and excretion of polyamines from baby hamster kidney cells (BHT-21/C13): the effect of serum of confluent cell cultures.** *Biochim. Biophys. Acta*, 676, 25-30.

- Fallace HM, Duthie J, Evans DM, Lamond S, Nicoll KM and Heys SD, (2000). **Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue.** *Clin. cancer Res.*, 6, 3657-3661.

- Featherstone C, Jackson SP, (1999). **Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions?** *Mutat. Res.*, 434, 3-15. Review.

- Fortini P and Dogliotti E, (2007). **Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways.** *DNA Repair (Amst)*, 6, 398-409.

- Fredlund JO, Johansson MC, Dahlberg E, Oredsson SM, (1995). **Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of Chinese hamster ovary cells.** *Exp. Cell Res.*, 216, 86-92.

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

- Gilmour SK, Verma AK, Madara T, O'Brien TG, (1987). **Regulation of ornithine decarboxylase gene expression in mouse epidermis and epidermal tumors during two-stage tumorigenesis.** *Cancer Res.*, 47, 1221–1225.

- Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, Shakibaei M, Mobasheri A, (2003). **Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis.** *Vet. J.*, 166, 140–158.

- Goldman M, (1996). **Cancer risk of low-level exposure.** *Since*, 271, 1821-1822.

- Gros L, Saparbaev M, Laval J, (2002). **Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage.** *Oncogene*, 21, 8905-25.

- Guirouilh-Barbat J, Redon C, Pommier Y, (2008). **Transcription-coupled DNA double-strand breaks are mediated via the nucleotide excision repair and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex.** *Mol. Biol. Cell.*, 19, 3969-81.

- Haber JE, (1998). **The many interfaces of Mre11.** *Cell.*, 95, 583-6. *Review.*

- Haddox MK, Magun BE and Russell DH, (1980). **Ornithine decarboxylase induction during B1 progression of normal and Rous sarcoma virus-transformed cells.** *Cancer Res.*, 40, 604–608.

- Halliwell, B and Aruoma OI, (1991). **DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems.** *FEBS Lett.*, 281, 9-19.

- Heby O, Sarna GP, Marton LJ, Omine M, Perry S, Russell DH, (1973). **Polyamine content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle.** *Cancer Res.*, 33, 2959-2964.

- Hecht SS, McLontee EJ, Wang M, (2001). **New DNA adduction of carbonaldehyde and acetaldehyde.** *Toxicology*, 165, 31–36.

- Hessels J, Kingma AW, Ferwerda H, Keij J, van der Berg GA, Muskiet FA, (1989). **Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effects of α -difluoromethylornithine in vivo.** *Int. J. Cancer*, 43, 1155-1164.

- Hibshoosh H, Johnston M, Weinstein IB, (1991). **Effects of overexpression of ornithine decarboxylase (ODC) on growth control and oncogene induced cell transformation.** *Oncogene*, 6, 739–743.

- Hoeijmakers I. I. H, (2001). **Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.** *Nature*, 411, 366-374.

- Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V, Samson LD, Harris CC, (2003). **The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation.** *J. Clin. Invest.*, 112, 1887-94.

- Hoy CA, Thompson LH, Mooney CL, Salazar EP, (1985). **Defective DNA cross-link removal in Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents.** *Cancer Res.*, 45, 1737-1743.

- IARC (1985). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human Volume 36. **Allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides.** International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- IARC (1986). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Volume 38. **Tobacco Smoking.** International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- IARC (1988). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Volume 44. **Alcohol drinking**. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- IARC (1999). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. Volume 71. **Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two)**. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- International Commission on Radiological Protection (2004). **Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting (WR)**. *ICRP Publication 92, Oxford, UK, Elsevier Science Ltd*.

- International Commission on Radiological Protection, ICRP draft report of Committee I/ Task Group (2004). **Low dose extrapolation of radiation related cancer risk**.

- Irani K, (2000). **Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival**. *Circulation Research*, 87, 179-183.

- IRIS (1996). **Acetaldehyde**. In: **Integrated Risk Information System**, US E.P.A.

- Jackson SP and Bartek J, (2009). **The DNA-damage response in human biology and disease**. *Nature*, 461, 1071-8.

- Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I, (2001). **Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms**. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1, 49, 379-89.

- Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP, (2002). **Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations.** *Hum. Mol. Genet.* 11, 2961-7.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE, (1987). **Initiation of lipid peroxidation in biological systems.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 25, 317-64.
- Kao-Shan CS, Fine RL, Whang-Peng J, Lee EC, Chabner BA, (1987). **Increased fragile sites and Sister Chromatid Exchanges in bone marrow and periferal blood of young; cigarette smokers.** *Cancer Res.*, 47, 6278-6282.
- Kastan MB, Bartek I, (2004). **Cell-cycle checkpoints and cancer.** *Nature*, 432, 316-323.
- Kato H, (1974). **Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relenvance to DNA repair.** *Exptl. Cell Res.*, 85, 239-247.
- Khanna KK and Jackson SP, (2001). **DNA double-trand breaks: signaling, repair and the cancer connection.** *Nat. Genet.*, 27, 247–254.
- Kitsis RN, Mann DL, (2005). **Apoptosis and the heart: a decade of progress.** *J. Mol. Cell Cardiol.*, 38, 1–2.
- Kundu JK, Surh YJ, (2008). **Inflammation: Gearing the journey to cancer.** *Mutat. Res.*, 659, 15-30.
- Kunkel TA and Erie DA, (2005). **DNA mismatch repair.** *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 681-710. *Review.*
- Lambert B, Chen Y, He SM, Sten M, (1985). **DNA cross-links in human leucocytes treated with vinyl acetate and acetaldehyde *in vitro*.** *Mutat. Res.*, 146, 301–303.

- Lapshina EA, Zavodnik IB, Labieniec M, Rekawiecka K, Bryszewska M, (2005). **Cytotoxic and genotoxic effects of tetr-butyl hydroperoxide on Chinese hamster B14 cells.** *Mutat. Res.*, 583, 189-197.

- Latt SA, (1973). **Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 3395-3399.

- Lazutka JR, Dedonyte V, Lekevicius RK, (1992). **Sister chromatid exchanges in lymphocytes of normal and alcoholic subjects.** *Experientia*, 48, 508-512 .

- Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P and La Vecchia C, (1999). **Cancer mortality in Europe, 1990-1994, and an overview of trends from 1955 to 1994.** *Eur. J. Cancer*, 10, 1477-1516.

- Li D, Zhang W, Sahin AA, Hittelman WN, (1999). **DNA adducts in normal tissue adjacent to breast cancer: a review.** *Cancer Detect Prev.*, 23, 454-62.

- Lindahl T, (1982). **DNA repair enzymes.** *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 61-87. Review.

- Lindahl T, (1993). **Instability and decay of the primary structure of DNA.** *Nature*, 362, 709-715. Review.

- Little JB, (2003). **Genomic instability and bystander effects: a historical perspective.** *Oncogene*, 22, 6978-6987.

- Liu Y, Prasad R, Beard WA, Kedar PS, Hou EW, Shock DD, Wilson SH, (2007). **Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta.** *J. Biol. Chem.*, 282, 13532-41.

- Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG, (2003). **Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation.** *Oncogene*, 22, 7058-7069.
- Lukas J, Lukas C, Bartek I, (2004). **Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.** *DNA Repair*, 3, 997-1007.
- Marples B, Cann NE, Mitchell CR, Johnston PJ, Joiner MC, (2002). **Evidence for the involvement of DNA-dependent protein kinase in the phenomena of low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance.** *Int. J. Radiat. Biol.*, 78, 1139-47.
- Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T, (2007). **Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses.** *Journal of Radiation Research*, 48, 97-106.
- McHugh PJ, Spaniswich VJ and Hartley JA, (2001). **Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance.** *Lancet. Oncol.*, 2, 483-490. Review.
- Merk O, and Speit G, (1998). **Significance of formaldehyde-induced DNA-Protein crosslinks for mutagenesis.** *Environmental and molecular mutagenesis*, 32, 260-268.
- Merk O, Speit G, (1999). **Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity.** *Environ. Mol. Mutagen*, 33, 167-172.
- Metcalf BW, Bey P, Danzin C, Jung MJ, Casara P and Vever JP, (1978). **Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.17) by substrate and product analogs.** *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2551–2553.

- Michaels ML, Pham L, Cruz C, Miller JH, (1991). **MutM, a protein that prevents G.C---T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase.** *Nucleic Acids Res.*, 19, 3629-32.

- Mitchell IR, Hoeijmakers IJH, Niedernhofer LJ, (2003). **Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 232-240.

- Mitchell JL, Judd GG, (1998). **Antizyme modifications affecting polyamine homoeostasis.** *Biochem. Soc. Trans.*, 26, 591–595.

- Morgan W, (2003). **Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation.** *Oncogene*, 22, 7094-7099.

- Morris JB, (1997). **Dosimetry toxicity and carcinogenicity of inspired acetaldehyde in the rat.** *Mutat. Res.*, 38, 113-124.

- Mothersill C, Seymour C, (2006). **Radiation-induced bystander effects: evidence for an adaptive response to low dose exposures?** *Dose Response*, 4, 283-90.

- Mueller MM, Fusenig NE, (2004). **Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer.** *Nat. Rev. Cancer*, 4, 839-849.

- Muscari C, Guarnieri C, Stefanelli C, Giaccari A, Caldarera CM, (1995). **Protective effect of spermine on DNA exposed to oxidative stress.** *Mol. Cell. Biochem.*, 144, 125-129.

- Nagasawa H, Little JB, (1992). **Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles.** *Cancer Res.*, 52, 6394-6.

- Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, Ohno M, Ide Y, Hirano S, Yoshimura D, Tominaga Y, Furuichi M, Sakumi K, (2004). **Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1011, 101-11.

- Narciso L, Dogliotti E, (2001). **Riparazione per escissione di basi del danno ossidativo: meccanismi e rilevanza biologica.** In: Free radicals, oxidative stress and health (Pietraforte D, Straface E, editors). Report ISTISAN, 05/40, 44-56.

- Natarajan AT, Tates AD, Meijers M, Neuteboom I, de Vogel N, (1983). **Induction of sister chromatid exchanges (SCEs) and chromosomal aberrations by mitomycin C and methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells, an evaluation of methodology for detection of SCEs persistent DNA lesions towards the frequencies of observed SCEs.** *Mutat. Res.*, 121, 211-223.

- Noll DM, Mason TM, Miller PS, (2006). **Formation and repair of interstrand cross-links in DNA.** *Chem. Rev.*, 106, 277-301.

- Obe G, Natarajan AT, Meyers M, Den Hertog A, (1979). **Induction of chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of human blood in vitro, and of SCE's in bone-marrow cells in vivo by ethanol and its metabolite acetaldehyde.** *Mutat. Res.*, 68, 291-294.

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

- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S, (1984). **Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine.** *Science*, 223, 594-597.

- Palitti F and Becchetti A, (1977). **Effect of caffeine on sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations induced by mutagens in Chinese hamster cells.** *Mutat. Res.*, 45, 157-159.

- Pegg AE, (1986). **Recent Advances in the biochemistry of polyamines in eukariotes.** *Biochem. J.*, 234, 249-262.

- Pegg AE, (1988). **Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy.** *Cancer Res.*, 48, 759–774.

- Pegg AE, (2006). **Regulation of ornithine decarboxylase.** *J. Biol. Chem.*, 281, 14529-14532.

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

- Petrini JH, (2000). **The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 293-6. Review.

- Piersen CE, Prasad R, Wilson SH, Lloyd RS, (1996). **Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate excision reaction.** *J. Biol. Chem.*, 271, 17811-5.

- Prakash S, Prakash L, (2000). **Nucleotide excision repair in yeast.** *Mutat. Res.*, 451, 13-24.

- Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held K, (2005). **New insights on cell death from radiation exposure.** *Lancet Oncol.*, 6, 520-28.

- Quertemont E, (2004). **Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism.** *Mol. Psychiatry*, 9, 570-81.

- Reardon JT, Cheng Y, Sancar A, (2006). **Repair of DNA-protein cross-links in mammalian cells.** *Cell Cycle* 5, 1366-1370. Review.

- Ribeiro JM, Carson DA, (1993). **Ca /Mg -dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis.** *Biochemistry*, 32, 9129-9136.

- Rojas E, Lopez MC, Valverde M, (1999). **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254.

- Rothstein R, Michel B, Gangloff S, (2000). **Replication fork pausing and recombination or "gimme a break".** *Genes Dev.*, 14, 1-10.

- San Filippo J, Sung P, Klein, (2008). **Mechanism of eukaryotic homologous recombination.** *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 229-57.

- Sancar A, (1995). **Excision repair in mammalian cells.** *J. Biol. Chem.*, 270, 15915-15918.

- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S, (2004). **Molecular mechanism of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.** *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 39-85.

- Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA, (2000). **Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?** *Semin. Cancer Biol.*, 10, 55-68.

- Schwartz JL, (2006). **Variability: The common factor linking low dose-induced genomic instability, adaptation and bystander effect.** *Mutat. Res.*, 616, 196-200.

- Seiler N, (1995). **Polyamine oxidase, properties and functions.** *Prog. Brain Res.*, 106, 333-344.

- Seiler N, (2004). **Catabolism of polyamines.** *Amino Acids*, 26, 217-33.

- Seiler M, Delcros JG and Moulinoux JP, (1996). **Polyamines transport in mammalian cells. An update.** *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28, 843-861.

- Seiler N, Dezeure F, (1990). **Polyamine transport in mammalian cells.** *Int. J. Biochem.*, 22, 211–218.

- Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS, (2003). **Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models.** *Carcinogenesis*, 24, 353-362.

- Sies H, (1985). **Oxidative Stress: Introductory remarks.** *Oxidative stress*, London, Academic Press, 1, 8.

- Sies H, (1991). **Role of Reactive Oxygen Species in Biological Processes.** *Klin. Wochenschr.*, 69, 965-968.

- Sistonen L, Holtta E, Lahvaslaiho H, Lahtola L and Alitalo K, (1989). **Activation of the neu tyrosine kinase induces fos/jun transcription factor complex, the glucose transporter and ornithine decarboxylase.** *J. Cell Biol.*, 109, 1911–1919.

- Smith TA, (1985b). **Polyamines.** *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 36, 117-143.

- Srivastava DK, Berg BJ, Prasad R, Molina JT, Beard WA, Tomkinson AE and Wilson SH, (1998). **Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps.** *J Biol Chem.*, 273, 21203–21209.

- Stefanelli C, Pignatti C, Tantini B, Fattori M, Stanic I, Mackintosh CA, Flamigni F, Guarnieri C, Caldarera CM, Pegg AE, (2001). **Effect of polyamine depletion on caspase activation: a study with spermine synthase-deficient cells.** *Biochem. J*, 355, 199-206.

- Storey KB, (1996). **Oxidative stress: animal adaptations in nature.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29, 1715-33.

- Tabor CW & Tabor H, (1984). **Polyamines.** *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749-790.

- Tarng DC, Huang TP, Wei YH, Liu TY, Chen HW, Wen Chen T, Yang WC, (2000). **8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients.** *Am. J. Kidney Dis.*, 36, 934-944.

- Taylor JH, (1958). **Sister Chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes.** *Genetics*, 43, 515-529.

- Thomas T, Thomas T J, (2001). **Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications.** *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 244–258.

- Tornaletti S, Donahue BA, Reines D, Hanawalt PC, (1997). **Nucleotide sequence context effect of a cyclobutane pyrimidine dimer upon RNA polymerase II transcription.** *J. Biol. Chem.*, 272, 31719-24.

- Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, Iwakuma T, Nakatsuru Y, Tominaga Y, Kawate H, Nakao K, Nakamura K, Ide F, Kura S, Nakabeppu Y, Katsuki M, Ishikawa T, Sekiguchi M, (2001). **Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98, 11456-61.

- Tucker JD, (2008). **Low-dose ionizing radiation and chromosome translocation: A review of the major considerations for the human biological dosimetry.** *Mutat. Res.*, 659, 211-220.

- Vaca CE, Fang JL, Schweda EK, (1995). **Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides.** *Chem. Biol. Interact.*, 98, 51–67.

- Von Wartburg JP, (1980). **Alcohol metabolism and alcoholism--pharmacogenetic considerations.** *Acta. Psychiatr. Scand. Suppl.*, 286, 179-88.

- Wallace HM, (2003). **Polyamines and their role in human disease – an introduction.** *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 354-5.

- Wallace HM and Fraser AV, (2004). **Inhibitors of polyamine metabolism: review article.** *Amino Acids*, 26, 353-365.

- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A, (2003). **A perspective of polyamine metabolism.** *Biochem. J.*, 376, 1–14.

- Wallace HM, Hughes A, Thompson K, (2001). **The potential chemotherapeutic and chemopreventative benefits of modulated polyamine biosynthesis.** In: Biogenically Active Amines in Food (D.M.L Morgan., V. Milovic, M. Krizek and A. White, eds). *European Commission, Brussels, vol. 4*, 29-36.

- Wang M, McIntee EJ, Cheng G, Shi Y, Villalta PW, Hecht SS, (2000). **Identification of DNA adducts of acetaldehyde.** *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 1149–1157.

- Wang Y, Devereux W, Woster PM, Stewart TM, Hacker A, Casero RA, (2001). **Cloning and characterization of a human polyamine oxidase that is inducible by polyamine analogue exposure.** *Cancer Res.*, 61, 5370-5373.

- Wilson DM 3rd, Thompson LH, (2007). **Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange.** *Mutat. Res.*, 616, 11–23.

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

- Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A, Feron VJ, (1986). **Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study.** *Toxicology* 41, 213-31.
- Xie X, Tome ME, Gerner EW, (1997). **Loss of intracellular putrescine pool-size regulation induces apoptosis.** *Exp. Cell. Res.*, 230, 386-392.
- Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, Potosky D, Meltzer SJ, Rhee JG, Kim SS, Moss SF, Hacker A, Wang Y, Casero RA Jr, Wilson KT (2004). **Spermine oxidation induced by Helicobacter pylori results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis.** *Cancer Res.*, 64, 8521-8525.

RINGRAZIAMENTI

Il percorso triennale che mi ha consentito di completare questo lavoro di ricerca, ha contribuito in modo determinante alla mia crescita scientifica, culturale ed umana.

Per questa esperienza straordinaria voglio ringraziare il professor Palitti che mi ha aperto le porte del suo laboratorio sin da quando ero una studentessa Erasmus, che mi ha incoraggiato nei momenti difficili e che mi ha trasmesso tutta la sua passione per questo lavoro.

Vorrei ringraziare il dott. Roberto Amendola per l'ospitalità che mi ha concesso presso il suo laboratorio, per la sua costante disponibilità e per i suoi preziosi consigli.

Un grazie speciale va a Wilner per il suo spirito critico e propositivo, per il suo aiuto tecnico e per la sua amicizia.

Un ringraziamento molto affettuoso va a tutte le persone che ho avuto la fortuna di conoscere e con cui ho potuto lavorare gomito a gomito nei laboratori dell'Università della Tuscia e dell'ENEA.

Ringrazio Eva e Teresa per la loro sincera amicizia, per il loro indispensabile aiuto e per i loro suggerimenti accademici e non.

Infine desidero ringraziare mia madre e mia sorella per il loro supporto in tutte le mie scelte e per la loro presenza vicina, nonostante la distanza geografica di questi ultimi anni.