

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA - VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN “EVOLUZIONE BIOLOGICA
E BIOCHIMICA” – XIX CICLO**

Tesi:

**“Dissezione dei meccanismi di riparazione implicati nella
rimozione delle lesioni indotte dagli Idrocarburi
Policiclici Aromatici”**

BIO/18

**Coordinatore del corso:
Prof.ssa Lucia Mastrolia**

**Tutor:
Prof. Fabrizio Palitti**

Firma

Firma

Dottorando: Dott.ssa Edvige Marotta
Firma

Durata del corso: 2004-2007

INDICE

- RIASSUNTO	_____	pag. 1
-------------	-------	--------

PARTE GENERALE

- INTRODUZIONE	_____	pag. 4
- Descrizione degli IPA	_____	pag. 23
- Metabolismo degli IPA	_____	pag. 26
- Benzo[a]pirene	_____	pag. 29
- Dibenzo[a,l]pirene	_____	pag. 31
- Addotti dei carcinogeni al DNA	_____	pag. 33
- Ruolo del TCR nella rimozione degli addotti	_____	pag. 34
- Aberrazioni Cromosomiche	_____	pag. 36
- Teorie sulla formazione delle Aberrazioni cromosomiche indotte dalla radiazione ionizzante:	_____	pag. 40
• Teoria della rottura e riunione	_____	pag. 40
• Teoria dello Scambio	_____	pag. 40
- Scambi fra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchanges, SCEs)	_____	pag. 42
- Apoptosi	_____	pag. 45
- Meccanismo Apoptotico	_____	pag. 48

PARTE SPERIMENTALE

- SCOPO DELLA RICERCA	_____	pag. 51
- INTRODUZIONE	_____	pag. 52
- MATERIALI E METODI	_____	pag. 56
• Linee cellulari e condizioni di crescita	_____	pag. 56
• Reagenti	_____	pag. 56
• Trattamento delle colture cellulari	_____	pag. 57
• Fissaggio ed allestimento dei preparati	_____	pag. 58
• Colorazione dei vetrini	_____	pag. 59

•	<i>Analisi della morfologia apoptotica</i>	pag. 59
•	<i>Analisi al microscopio</i>	pag. 60
•	<i>Analisi Statistica</i>	pag. 60
-	RISULTATI	pag. 61
-	Trattamento con il BPDE	pag. 61
•	<i>Aberrazioni Cromosomiche</i>	pag. 61
•	<i>Scambi fra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchanges, SCEs)</i>	pag. 65
•	<i>Apoptosi</i>	pag. 70
-	Trattamento con il DBPDE	pag. 71
•	<i>Aberrazioni Cromosomiche</i>	pag. 71
•	<i>Scambi fra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchanges, SCEs)</i>	pag. 75
•	<i>Apoptosi</i>	pag. 80
-	DISCUSSIONE E COCLUSIONI	pag. 81
-	BIBLIOGRAFIA	pag. 91

RIASSUNTO

Si definisce cancerogena qualsiasi sostanza chimica in grado di alterare il DNA cellulare causando, spesso, danni irreversibili o mutazioni che possono portare all'insorgenza del cancro. L'uomo è continuamente esposto a tali sostanze che, presenti nell'ambiente, ritroviamo anche nel cibo e nell'acqua. Tra di esse ricordiamo gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), una classe di composti altamente liposolubili che possono essere presenti sia in forma gassosa che come particolato e sono caratterizzati, strutturalmente, dalla presenza di due o più anelli aromatici (anelli esagonali del benzene) condensati fra loro. Per poter interagire col DNA, questi composti, debbono essere attivati metabolicamente dando, così, origine ad addotti voluminosi la cui presenza porta alla formazione di accoppiamenti errati che, alla replicazione successiva, si convertiranno in mutazioni del tipo trasversioni e/o transizioni.

Per garantire l'integrità genomica, nel corso dell'evoluzione, le cellule hanno elaborato complessi sistemi enzimatici di riparazione in grado di riconoscere e rimuovere differenti tipi di lesioni. Queste vie metaboliche sono dette "Base Excision Repair" (BER), "Nucleotid Excision Repair" (NER), "Transcription Coupled Repair" (TCR), "Homologous Recombination Repair" (HRR) e "Non Homologous End-Joining" (NHEJ).

Lo scopo degli esperimenti da me condotti, in questi tre anni di dottorato, è stato quello di studiare quali di tali meccanismi di riparazione siano implicati nella rimozione delle lesioni indotte dagli idrocarburi policiclici aromatici ed, in particolare, quelli derivanti dalle forme metabolicamente attive (dioli epossidi) del Benzo[a]Pirene (BPDE) e del Dibenzo[a,l]Pirene (DBPDE). A tal proposito, la ricerca è stata condotta impiegando diverse linee cellulari di ovario di hamster Cinese tutte derivanti da una linea parentale comune (AA8) e ciascuna difettiva in uno dei meccanismi di riparazione sopra descritti (UV4, UV5, UV61, *irs1SF*, EM9 e V3-3).

Per questi esperimenti sono state utilizzate tecniche citogenetiche quali il test delle aberrazioni cromosomiche (AC) e quello degli scambi fra cromatidi fratelli (SCEs), considerati avere un ruolo importante nell'analisi degli effetti biologici sia alle basse (AC ed SCEs) che alle alte (SCEs) dosi di cancerogeni. Abbiamo adottato due protocolli sperimentali, in uno dei quali, per l'analisi sia delle

aberrazioni cromosomiche che degli SCEs, cellule asincrone sono state fatte crescere per circa un ciclo cellulare in presenza solo di BrdUrd, quindi trattate con differenti dosi della sostanza in esame e fissate a diversi tempi in base alla durata del loro ciclo cellulare, mentre nell'altro, che è il protocollo classico per l'analisi degli SCEs, cellule asincrone sono state trattate con differenti dosi della sostanza in esame e fatte crescere in continuo per due cicli cellulari in presenza di BrdUrd e poi fissate a differenti tempi in base alla durata del loro ciclo cellulare.

L'ordine di sensibilità all'induzione delle aberrazioni cromosomiche, dopo trattamento con il BPDE, è risultato essere il seguente: UV4, irs1SF, UV5, UV61, EM9, V3-3 e AA8 in ordine decrescente, mentre per ciò che riguarda l'induzione degli SCEs l'ordine di sensibilità è risultato essere: UV5, UV4, V3-3, AA8, UV61, EM9 e irs1SF (in ordine decrescente), per ciò che riguarda gli SCEs indotti dal BPDE dopo un ciclo cellulare, e: AA8, UV5, UV4, UV61, V3-3, EM9 e irs1SF (in ordine decrescente), per ciò che riguarda gli SCEs indotti, dopo due cicli cellulari, in presenza del BPDE.

Dopo trattamento col DBPDE, invece, l'ordine di sensibilità risultante, nelle diverse linee cellulari, per ciò che riguarda le aberrazioni cromosomiche indotte da tale sostanza è stato: EM9, irs1SF, UV4, UV5, AA8, UV61 e V3-3, in ordine decrescente. Per gli SCEs indotti a seguito del trattamento col DBPDE per un solo ciclo cellulare, l'ordine di sensibilità è risultato essere il seguente: EM9, V3-3, UV61, UV4, AA8, UV5 e irs1SF (in ordine decrescente) e, dopo due cicli cellulari, invece, è risultato essere: V3-3, UV61, UV5, AA8, UV4, EM9 e irs1SF (in ordine decrescente).

Tali dati suggeriscono l'importanza del NER per la resistenza cellulare al BPDE nell'induzione sia di aberrazioni cromosomiche che degli SCEs. Inoltre, evidenziano un possibile ruolo della ricombinazione omologa nella resistenza cellulare al BPDE solamente per ciò che riguarda le aberrazioni cromosomiche e del NHEJ solamente per ciò che riguarda gli SCEs. Nel trattamento col DBPDE sembra, invece, che il BER sia essenziale per la resistenza cellulare a questo composto nell'induzione sia di aberrazioni cromosomiche che degli SCEs, mentre il NHEJ svolge un ruolo importante per ciò che riguarda la resistenza soltanto agli SCEs e l'HRR solamente alle aberrazioni cromosomiche.

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

La capacità delle cellule di mantenere integro il proprio genoma è un elemento importante per garantire la sopravvivenza del singolo individuo. Le cellule sono continuamente esposte ad una varietà di insulti sia di natura chimica (mutageni e farmaci) che fisica (radiazione ultravioletta e radiazione ionizzante) presenti nell'ambiente. I danni indotti da tali agenti, se non riconosciuti e riparati, possono compromettere il funzionamento cellulare portando a riarrangiamenti cromosomici, perdita di materiale genomico, trasformazioni neoplastiche e morte cellulare. Per contrastare gli effetti deleteri di tali agenti, nel corso dell'evoluzione, le cellule hanno elaborato sofisticati sistemi di riparazione in grado di riconoscere e riparare i diversi tipi di danno. Tali meccanismi sono: il *Base Excision Repair (BER)* ed il *Nucleotide Excision Repair (NER)*, essenziali nella riparazione di basi inappropriate o danneggiate; il *Mismatch Repair (MMR)*, essenziale nella correzione di basi mal'appaiate durante la replicazione e la *Riparazione per Ricombinazione*, essenziale per riparare le rotture a doppio filamento (DSBs).

1) Il *BER* è importante nella riparazione dei danni indotti dalle radiazioni ionizzanti e dagli agenti alchilanti. E' un processo in cui operano specifiche glicosilasi in grado di idrolizzare il legame glicosidico tra la base chimicamente alterata e l'ossatura fosfodiesterica, permettendo la rimozione della base danneggiata, con formazione di un sito apurinico o apirimidinico (AP). Quest'ultimo può essere processato attraverso due sotto vie del BER denominate "short-patch" BER (SP-BER) e "long-patch" BER (LP-BER) (Figura 1). *SP-BER* consiste nell'incisione di un singolo nucleotide dall'ossatura zucchero-fosfato, ad opera di una specifica endonucleasi AP (APE1), a monte dei siti apurinici/apirimidinici, che da' origine ad un residuo di deossiribosio con estremità 5' libere. Questo residuo verrà, poi, rimosso attraverso l'attività di una deossiribofosfatasi 5' (dRPase) specifica e, nei mammiferi, questa attività viene svolta dalla DNA polimerasi β (Pol- β) (Srivastava et al., 1998). La chiusura del rimanente taglio avviene attraverso l'attività del complesso XRCC1-ligasi III. *LP-BER* avviene, invece, attraverso l'escissione di un minimo di 2 nucleotidi fino ad un massimo di 6-13 nucleotidi e la sintesi del DNA viene catalizzata dalla polimerasi β oppure dalla polimerasi δ/ϵ (Fortini et al., 1998; Klungland e

Lindahl, 1997; Pascucci et al., 1999). Il “long-patch” BER è dipendente anche dalla proteina antigene nucleare delle cellule proliferanti (PCNA), che assieme alle DNA polimerasi è essenziale nel processo di sintesi, dall’endonucleasi FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1), che rimuove il DNA danneggiato e dalla DNA ligasi I, essenziale per sigillare le estremità riparate. Altre due proteine che si pensa siano essenziali per proteggere e sistemare le estremità per la sintesi riparativa, nel momento in cui il BER è iniziato da una rottura a singolo filamento (SSB), sono la poli-(ADP-ribosio)-polimerasi (PARP), che lega ed è attivata dalle rotture nel filamento di DNA e la polinucleotide chinasi (PNK) (Whitehouse et al., 2001).

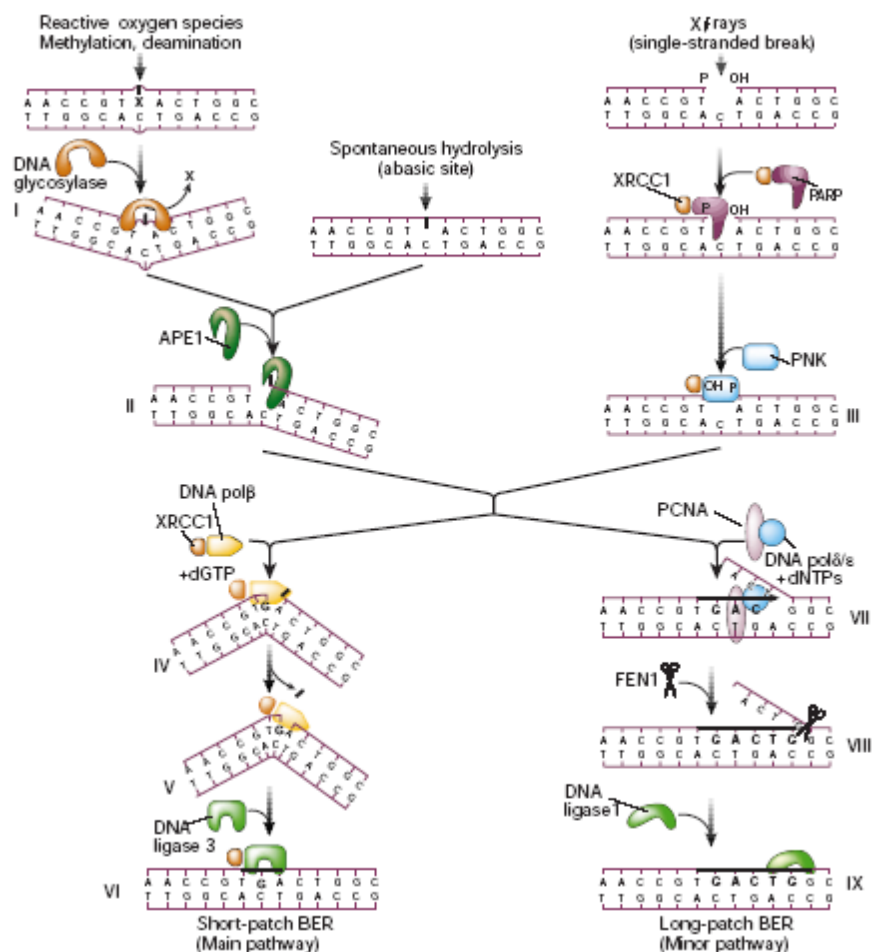


Fig. (1). Meccanismo di riparazione per escissione di basi (BER)

[Da:Hoeijmakers, 2001].

2) Il *NER* riconosce addotti voluminosi nel DNA, come il ciclobutano del dimero di pirimidina (CPD) e il 6-4PP, indotti dalla radiazione UV. Esso si suddivide in due sottovie di cui una meno specifica e più lenta, che ripara il danno sull'intero genoma, detta *Global Genome Repair (GGR)*, e l'altra più specifica, in quanto ripara il danno sul filamento trascritto dei geni attivi, detta *Transcription Coupled Repair (TCR)*; queste due sottovie differiscono solo per lo step iniziale di riconoscimento del danno. Infatti, mentre nel GGR vi è un complesso eterodimerico che lega il sito danneggiato reclutando, poi, l'intero apparato di proteine di riparazione in prossimità del danno, nel TCR questa funzione è mediata dall'RNA polimerasi II bloccata al sito danneggiato.

In tutti gli organismi il NER si evolve in fasi successive che sono:

- riconoscimento del danno;
- legame di un complesso multi-proteico al sito danneggiato;
- doppia incisione del filamento danneggiato alcuni nucleotidi lontano dal sito di danno e ad entrambe le estremità 5' e 3';
- rimozione dell'oligonucleotide, contenente il danno, in prossimità dei tagli;
- riempimento della risultante gap ad opera di una DNA polimerasi;
- ligazione.

Le proteine implicate nel NER sono le seguenti:

- **ERCC1**: questa proteina di 33 kDa forma, con la proteina **XPF** (di 103 kDa), un complesso stabile endonucleasico che è responsabile dell'incisione all'estremità 5' del sito danneggiato. Le cellule deficienti di questo complesso presentano un aumento di instabilità genomica ed una ridotta percentuale di scambi cromatidici dipendenti dalla fase S, dovuti ad un invecchiamento precoce e a difetti nella riparazione (Melton et al., 1998).

- **XPA**: è una metallo proteina necessaria al riconoscimento del danno nella fase iniziale del NER (Araujo e Wood, 1999) ed il suo legame al DNA è reso possibile grazie alla presenza di una regione a dita di Zinco (Jones e Wood, 1993). Il suo ruolo è quello di verificare la presenza di lesioni nel DNA, di riconoscere tipi differenti di danno e gioca un ruolo importante anche nel permettere un corretto posizionamento del macchinario di riparazione attorno la lesione (Park e Sancar, 1994).

- ***XPB/ERCC3***: il gene XPB codifica per un'ATPasi DNA dipendente e per un'elicasi. Il suo ruolo è quello di svolgere l'elica di DNA in direzione 3'→5', mentre la proteina XPD svolge la stessa funzione in senso opposto.
- ***XPD/ERCC2***: il gene XPD codifica per un'elicasi che entra a far parte della costituzione del *fattore di trascrizione II H (TFIIH)* ed è, quindi, essenziale sia alla trascrizione che al NER (Coin et al., 1998). Mutazioni nel gene XPD prevengono il legame di questa proteina con un'altra, anch'essa costituente del TFIIH, la ***p44*** (Reardon et al., 1996), con conseguente diminuzione dell'attività elicastica e quindi difetto nel meccanismo NER.
- ***XPC***: gioca un ruolo importante nel riconoscimento del danno durante il NER (Khan et al., 2002; Legerski e Peterson, 1992) e forma un complesso, con la proteina ***hHR23B***, essenziale a legare il danno al DNA. XPC da sola non è essenziale al TCR ma è fondamentale nel GGR (Venema et al., 1990, van Hoffen et al., 1995).
- ***XPE/DDB1/2***: XPE è una proteina essenziale al NER solo in vivo e non in vitro e pazienti in cui questa proteina è deficiente mancano anche della funzionalità del *fattore nucleare legante il danno al DNA (DDB)* che lega il DNA danneggiato dalla radiazione ultravioletta (UV) e riconosce un ampio spettro di lesioni (Fujiwara et al., 1999). DDB forma eterodimeri con le proteine *p127 (DDB1)* e *p48 (DDB2)* ed entrambe le subunità sono richieste per la sua attività. E' stato riportato che i livelli dell'mRNA di p48 e non di p127, dipendono fortemente da p53 ed incrementano ulteriormente dopo danno al DNA in maniera p53 dipendente. Studi su cellule in vivo hanno messo in evidenza che XPE è essenziale al GGR (Hwang et al., 1999).
- ***XPF/ERCC4***: il gene XPF codifica per una proteina che interagisce con la proteina ERCC1 formando eterodimeri attraverso l'interazione dei loro domini C-terminali (de Laat et al., 1998b). Questi domini contengono dei motivi elica-forcina-elica normalmente presenti in proteine che legano strutture distorte del DNA (Sijbers et al., 1996b; Gaillard e Wood, 2001). La delezione di XPF/ERCC4 o di ERCC1 può essere letale (de Laat et al., 1998b).
- ***XPG/ERCC5***: XPG è un membro della famiglia FEN-1, endonucleasi struttura specifiche che incidono il sito danneggiato all'estremità 3' durante il NER (O'Donovan et al., 1994). L'incisione al 3' mediata da XPG precede l'incisione al 5' mediata dal complesso XPF/ERCC1 (Mu et al., 1996). XPG svolge un ruolo

importante anche nell'assemblaggio dei complessi proteici contenenti XPC/hHR23B, TFIIH, XPA e l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (RPA) (Mu e Sancar, 1997), una proteina implicata nella riparazione del DNA ma non essenziale alla fase di incisione nel NER (Shivji et al., 1992).

- **TFIIH**: il TFIIH gioca un ruolo molto importante sia nel processo di trascrizione che di riparazione del DNA. Esso è composto di 9 subunità comprese nell'intervallo tra i 90 e i 30 kDa ed è organizzato in una struttura ad anello, con un foro in grado di ospitare una molecola di DNA a doppio filamento, dalla quale protrude una sporgenza di forma sferica (Schultz, et al., 2000; Chang e Kornberg, 2000), composta di proteine. Il core del TFIIH è composto di 5 subunità che sono, XPB, p62, p52, p44 e p34 ed ha un'architettura circolare; la porzione sporgente, invece, è composta di una chinasi attivante cdk (CAK), la quale comprende cdk7, la ciclina H e MAT1. La rimanente subunità, cioè l'elicasi XPD, si può trovare in associazione o con il core di TFIIH o con CAK e si pensa che funga da ponte che tiene uniti questi due complessi. XPD, grazie alla sua attività elicasica, permette l'ancoraggio di CAK al core di TFIIH, attraverso l'interazione con p44 (Coin et al., 1998). Ciò comporta un aumento dell'attività di XPD e, a differenza di XPB, XPD è indispensabile per la reazione di trascrizione (Figura 2).

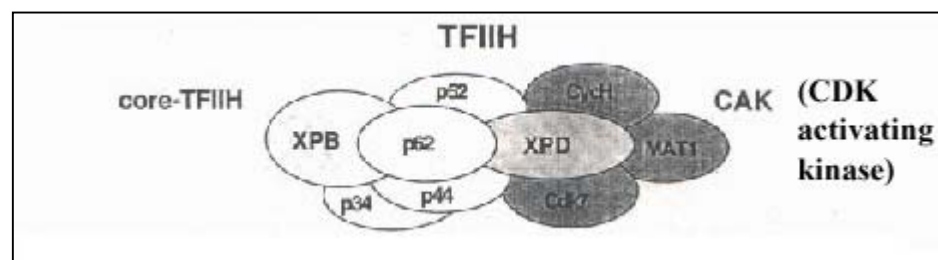


Fig. (2). Struttura del TFIIH. [Da: Frit (1999)]

Informazioni riguardo il NER eucariotico sono emerse, principalmente, da studi effettuati su rare malattie genetiche come lo Xeroderma pigmentosum. Studi di ibridazione somatica hanno messo in evidenza sette gruppi di complementazione di XP (A-G) ed un gruppo di complementazione noto come XP variante (XP V). Il clonaggio dei geni XP e l'isolamento delle proteine da essi codificate, hanno portato alla comprensione delle reazioni NER ed alla ricostruzione in vitro del processo riparativo (Aboussekhra et al., 1995).

Per semplicità, per spiegare il meccanismo NER eucariotico, utilizzeremo i nomi delle proteine umane.

La fase iniziale dipende da dove è localizzato il danno a seconda se esso si trova all'interno di una regione attivamente trascritta di un gene o altrove nel genoma.

- Se il danno non è in una regione attivamente trascritta del gene, esso viene riconosciuto e circondato da un eterodimero consistente delle proteine XPC e hHR23B; questo complesso (XPC/hHR23B) è responsabile del riconoscimento del danno al DNA su tutto il genoma (Sugasawa et al., 1998) ed il legame di questo eterodimero inizia il processo del “Global Genome Repair” (GGR), (cioè riparazione lungo tutto il genoma). Il dimero XPC/hHR23B sembra che riconosca il danno sul DNA basandosi sull'estensione della distorsione della normale struttura dell'elica di DNA. Legandosi alla regione danneggiata, il dimero XPC/hHR23B incrementa ulteriormente l'estensione della distorsione strutturale (Figura 3).

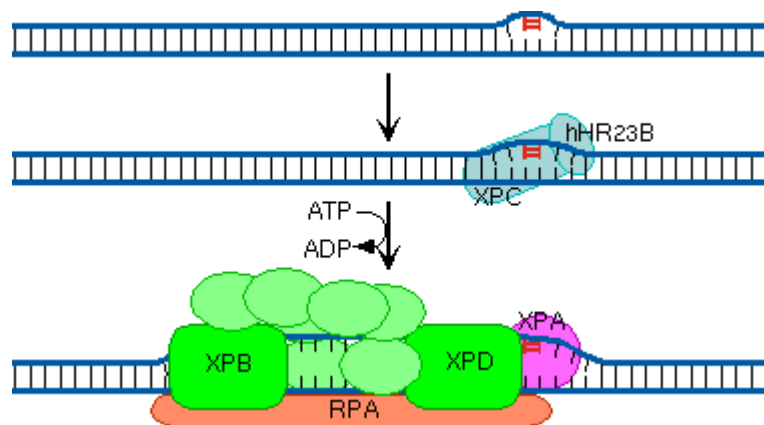


Fig. (3). Meccanismo d'azione del “ Global Genome Repair” (GGR) nell'uomo. In verde è rappresentato il TFIIH. [Da: Hoeijmakers (2001)].

Questo ulteriore incremento permette l'entrata ed il legame di tre proteine aggiuntive o complessi proteici. Uno di questi è il fattore di trascrizione generale o TFIIH, il quale si compone di nove subunità due delle quali (XPB e XPD) sono *elicasi*, che legano il filamento danneggiato cooperando tra loro e con le proteine

RPA (un complesso di proteine eucariotiche leganti il singolo filamento di DNA) e con XPA, per generare uno svolgimento di circa 20-30 nucleotidi includente anche il sito danneggiato. XPA è essenziale per completare lo svolgimento dell'elica e per il NER ma il suo preciso ruolo non è ancora chiaro. Essa sicuramente coopera con il dimero XPC/hHR23B per il reclutamento di TFIIH e di RPA in prossimità della regione danneggiata ed un altro suo ruolo potrebbe essere quello di aiutare a posizionare le altre proteine in maniera corretta rispetto al sito danneggiato.

Recenti esperimenti suggeriscono che per il riconoscimento del danno durante il NER, sono richiesti due fattori:

- a) in primo luogo vi deve essere la distorsione strutturale del DNA;
- b) in secondo luogo vi deve essere anche un'alterazione della struttura chimica del DNA. Per esempio, un appaiamento errato che implica, però, normali nucleotidi (ad esempio un appaiamento errato C-T), produce una distorsione strutturale ma non altera la natura chimica del DNA. Quindi alcuni appaiamenti errati non vengono riconosciuti dal macchinario NER.

- Prima di procedere alla prossima tappa (rottura a doppio filamento), dobbiamo definire un secondo tipo di NER, detto “Transcription-Coupled Repair” o (TCR) il quale viene innescato quando il danno si trova all'interno di regioni attivamente trascritte del gene e numerosi esperimenti hanno messo in evidenza che i danni all'interno di tali regioni vengono riparati più rapidamente rispetto a quelli che si verificano in regioni non trascritte del gene o in regioni non geniche. Il TCR richiede tutte le proteine che partecipano al GGR ad eccezione di XPC, suggerendo che vi è implicato un differente meccanismo per il riconoscimento del danno nel filamento trascritto. Numerosi esperimenti suggeriscono che questo differente meccanismo implica *il blocco della RNA polimerasi al sito di danno* (Figura 4).

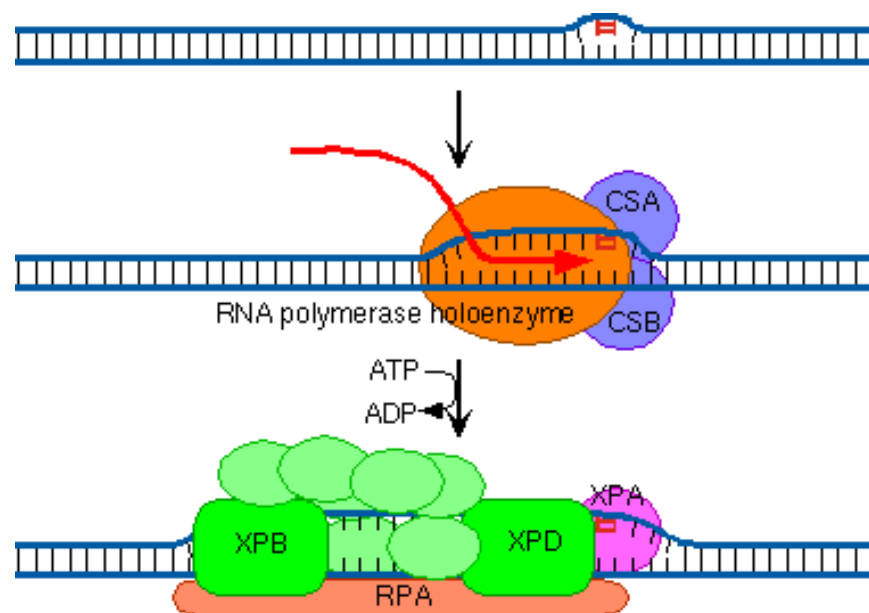


Fig. (4). Meccanismo d'azione del "Transcription Coupled Repair" (TCR) nell'uomo. In verde è rappresentato il TFIIF. [Da: Hoeijmakers (2001)].

In questa figura sono mostrate anche altre due proteine che si trovano associate alla RNA polimerasi e che sono dette CSA e CSB. La funzione di queste due proteine è molto importante per il corretto funzionamento del TCR e si presume che aiutano al reclutamento delle proteine TFIIF, RPA e XPA al sito danneggiato ed aiutano anche a spostare la RNA polimerasi in maniera sufficiente da permettere alle tre proteine di accedere al sito danneggiato. Come per il GGR, nel TCR, dopo il reclutamento di queste tre proteine, si ha uno svolgimento dell'elica di circa 20-30 nucleotidi vicino la regione danneggiata. Molto probabilmente la regione parzialmente svolta prodotta dalla RNA polimerasi assiste all'accesso delle proteine TFIIF, XPA e RPA e proprio la RNA polimerasi bloccata, che produce una piccola regione svolta, è il motivo per cui la proteina XPC non è necessaria per il TCR.

La successiva tappa è uguale sia per il GGR che per il TCR e prevede l'intervento di due elicasi con direzionalità opposta, XPB e XPD, le quali svolgono il DNA intorno al sito della lesione permettendo, così, l'incisione e la rimozione del DNA

danneggiato (Shaffer et al., 1993, 1994). L'incisione avviene ad opera di due endonucleasi struttura specifiche dette XPG e XPF/ERCC1 (In giallo in Figura 5).

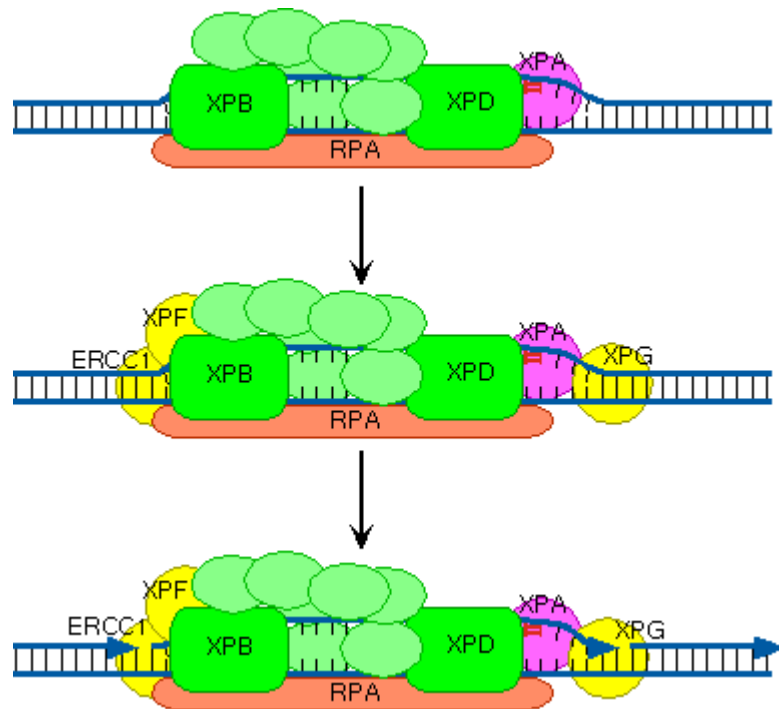


Fig. (5). Meccanismo d'azione comune al “ Global Genome Repair” (GGR) ed al “Transcription Coupled Repair” (TCR) nell'uomo. In verde è rappresentato il TFIIH. [Da: Hoeijmakers (2001)]

Entrambe le endonucleasi sono specifiche per l'unione tra molecole di DNA a singolo e doppio filamento. XPG taglia all'estremità 3' della lesione, mentre XPF/ERCC1 (un complesso proteico eterodimerico) taglia all'estremità 5'. Studi biochimici indicano che il taglio di XPG precede l'incisione del complesso XPF/ERCC1. XPG taglia a 2-8 nucleotidi dalla lesione, mentre XPF/ERCC1, taglia 15-24 nucleotidi dalla lesione. Il meccanismo con il quale viene spostato l'oligonucleotide contenente il danno non è chiaro. Probabilmente le elicasi XPB/XPD assistono a tale funzione. In ogni caso, dopo che l'oligonucleotide è stato rimosso, la risultante gap viene riempita dalla DNA polimerasi ϵ o δ , assistita dalla proteina PCNA, e ricongiunta dalla DNA ligasi I.

3) Il *MMR* è un sistema di riparazione che elimina le basi non correttamente appaiate, che si possono formare durante la replicazione, la ricombinazione genetica o come risultato di un danno al DNA.

In *E. coli* questo sistema è detto Mut HLS. Normalmente il DNA di *coli* è metilato enzimaticamente, attraverso l'azione dell'enzima *adenina metilasi*, in prossimità degli atomi di azoto 6 dei residui di adenina della sequenza GATC. Subito dopo la replicazione, la sequenza GATC del filamento neosintetizzato si trova momentaneamente in una condizione di semi-metilazione, la quale serve da segnale per distinguere il filamento neosintetizzato da quello parentale. Le fasi di riparazione sono le seguenti: prima di tutto si verifica l'incisione del filamento non metilato della molecola duplex semi-metilata, in prossimità del sito danneggiato, poi si ha l'eliminazione della base errata e la successiva risintesi. In *E. coli*, la proteina Mut S si lega al DNA in prossimità della base non correttamente appaiata e poi subentra la proteina Mut L, la quale, legandosi a Mut S, attiva una terza proteina, detta Mut H. Quest'ultima è un endonucleasi, specifica per il DNA semi-metilato, che taglia in prossimità del filamento non metilato. La seguente reazione di escissione richiede la partecipazione di una esonucleasi e di una elicasi; completata l'escissione, si ha la risintesi del DNA mancante ad opera della DNA polimerasi III e della ligasi (Figura 6) (Loeb, 1994; Modrich, 1994). Nei lieviti e nei mammiferi, l'esistenza di omologhi multipli delle proteine MutS e MutL, riflette la conservazione del sistema di riparazione MMR. Nelle cellule umane sono state trovate alcune proteine omologhe di Mut S e Mut L di *E. coli* rappresentate dalle proteine hMSH2, hMLH1, hPMS1 e hPMS2 (Fishel et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994; Bronner et al., 1994). La natura del segnale nel filamento non è stato ancora identificato negli eucarioti ma le basi non correttamente appaiate sembrano essere riconosciute da un complesso di hMSH2 con un secondo omologo di Mut S, seguito dal legame di un secondo complesso contenente hMLH1, la quale recluta altre proteine coinvolte nelle successive fasi di escissione e risintesi. Tra queste ultime proteine possiamo ritrovare la DNA polimerasi δ . Un possibile meccanismo vede coinvolta la proteina PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen = Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare), la quale può interagire con gli omologhi MutS e MutH sia di lievito che umani (Johnson et al., 1996).

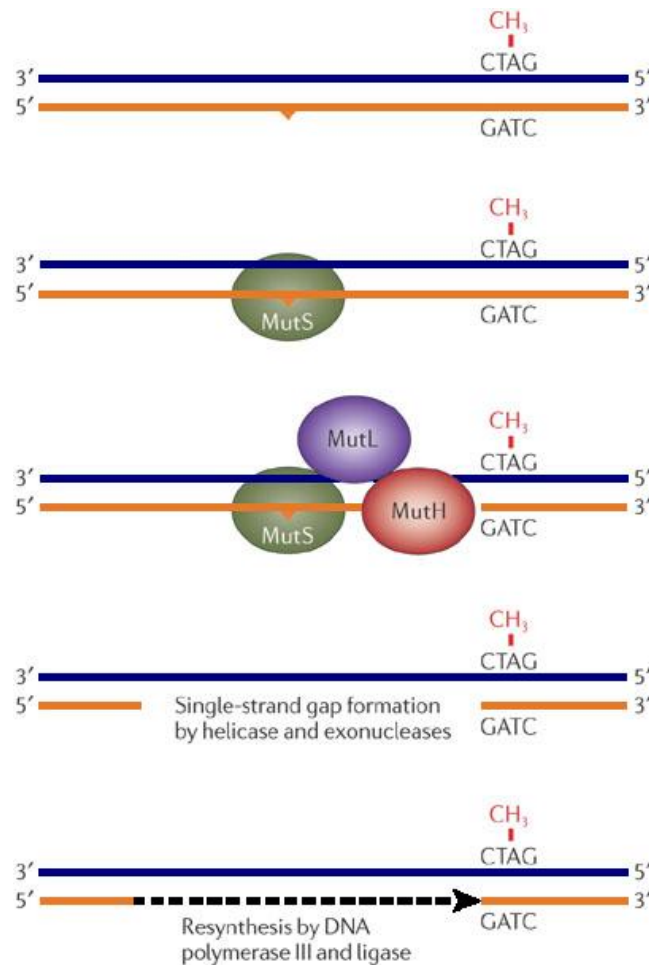


Fig. (6). Meccanismo del MisMatch Repair [Da: Wion e Casadeus, 2006]

4) Le rotture a doppio filamento (DSBs) possono essere prodotte endogenamente, durante la replicazione e la meiosi, oppure attraverso agenti esogeni, quali la radiazione ionizzante. Esse rappresentano la forma più distruttiva di danno al DNA e, se non riparate, possono portare a perdita di informazione genetica e morte cellulare (Olive, 1998), mentre se mal riparate possono portare a carcinogenesi in maniera diretta oppure attraverso traslocazioni, inversioni o delezioni (Morgan et al., 1998).

Si conoscono due sistemi di riparazione delle DSBs: la *Ricombinazione Omologa (HR)* ed il *Non Homologous End-Joining (NHEJ)*.

a) La *ricombinazione omologa (HR)* è considerato essere il meccanismo predominante di variabilità genetica e si verifica nelle cellule che si dividono mitoticamente. Nelle cellule di lievito, piante e mammiferi viene stimolata dalla formazione di DSBs sito specifiche (Rudin e Haber, 1988; McGill et al., 1993; Puchta et al., 1993; Route et al., 1994; Chouluka et al., 1995; Sargent et al., 1997;

Liang et al., 1998), ma anche da molti agenti danneggianti il DNA. E' per questo motivo che la HR può essere considerata anche un meccanismo di riparazione e, in quanto tale, è capace di riparare molte lesioni con un'elevata fedeltà. Questo si verifica quando la HR si presenta come un evento di conversione genica, cioè quando l'informazione genetica viene copiata da un allele ad un altro tra cromatidi fratelli o omologhi. Le vie che utilizzano la ricombinazione omologa per riparare le rotture a doppio filamento sono:

- *synthesis-dependent strand annealing (SDSA)* e
- *single-strand annealing (SSA)*

L'*SDSA* comporta la rottura a doppio filamento di uno dei due cromosomi omologhi. Ad opera di un'esonucleasi, che rimuove alcuni nucleotidi all'estremità 5', le estremità 3' vengono esposte e localizzate in regioni complementari nei cromosomi omologhi in un processo detto di "invasione dei filamenti". Queste estremità vengono utilizzate come primer per la sintesi di nuovo DNA ed i filamenti neosintetizzati vengono separati dal filamento stampo per permettere "l'associazione" con gli altri. Ogni gap, che risulta da questo processo, viene riempita da una specifica polimerasi ed il rimanente taglio viene sigillato da una ligasi. Anche nell'*SSA* si ha l'esposizione delle estremità 3' fiancheggiando le DSBs che, dopo rimozione della lesione e ligazione, vengono riparate, ma al prezzo di una delezione di un pezzo di DNA (Figura 7).

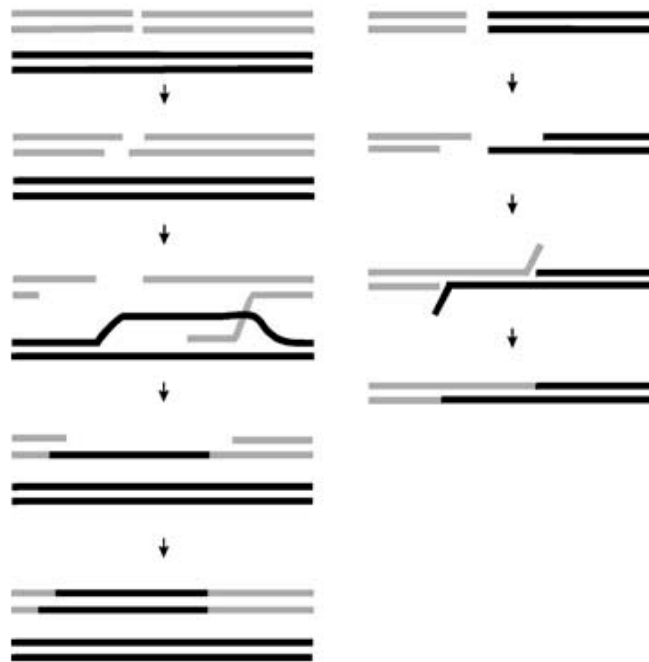


Fig. (7). Modello di riparazione delle rotture a doppio filamento attraverso il meccanismo di ricombinazione omologa (HR). A destra è descritto il meccanismo SSA, mentre a sinistra il meccanismo SDSA. [Da: Orel et al., 2003]

Le proteine implicate nella riparazione per ricombinazione omologa (HRR) sono definite come i prodotti di geni che derivano dal gruppo epistatico RAD52 del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (Symington, 2002). Nelle cellule umane queste includono gli omologhi prodotti dai geni: Rad51, Rad52, Rad54, XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C, Rad51D ed il complesso composto da Rad50, Mre11 e Nbs1. Nella HR sono coinvolti anche geni soppressori dei tumori come BRCA1 e BRCA2.

- **BRCA1** e **BRCA2**: queste due proteine svolgono molteplici ruoli nella risposta cellulare al danno al DNA, partecipando al processo che attiva i checkpoints del ciclo cellulare in risposta alle rotture a doppio filamento, aiutando a coordinare la riparazione di quest'ultime e facilitando la riparazione accoppiata alla trascrizione delle basi danneggiate (Gowen et al., 1998, Le Page et al., 2000). Sebbene BRCA1 e BRCA2 interagiscono fisicamente (Chen et al., 1998) esse si associano a proteine differenti ed hanno diverse funzionalità.

1. BRCA1 co-localizza con Rad51 durante la fase S nei saggi dei foci nucleari e si associa a BRCA2 e Rad51 in saggi di immunoprecipitazione (Chen

et al., 1998). E' stato suggerito che BRCA1 agisca da sensore del danno che aiuta a mediare la riparazione (Paull et al., 2001) e, in risposta alla irradiazione ionizzante (IR), viene prima fosforilata da ATM (Cortez et al., 1999; Gatei et al., 2001) e da Chk2 (Lee et al., 2000) e poi da ATR (Tibbetts et al., 2000). Questa serie di fosforilazioni fanno pensare che BRCA1 agisca da fattore di segnalazione fra il riconoscimento del danno ed il macchinario di riparazione del DNA. Uno dei ruoli di BRCA1 potrebbe essere quello di riparare le DSBs attraverso la HRR in quelle cellule che si trovano in un'appropriata fase del ciclo cellulare (S e G₂). Un'altra importante funzione potrebbe essere quella di contribuire, dopo irradiazione ionizzante (Xu, X. et al., 1999; Xu, B. et al., 2001), ai checkpoints del ciclo cellulare sia in fase S che in G₂ ed, in quest'ultimo caso, agisce attivando la chinasi Chk1a livello del sito danneggiato (Yarden et al., 2002). BRCA1 interagisce con un'ampia varietà di proteine tra cui il complesso Rad50/Mre11/Nbs1 per dirigere la riparazione delle DSBs attraverso la HRR mediando la resezione delle estremità danneggiate per generare lunghe molecole a singolo filamento essenziali per l'assemblaggio della nucleoproteina Rad51. Durante questo processamento si pensa che partecipi anche BRCA2, regolando l'assemblaggio di Rad51. Inoltre BRCA1 si associa alla RNA polimerasi II e sembra avere un importante ruolo nel controllo della trascrizione in quanto: (a) interagisce con proteine che rimodellano la struttura della cromatina (ad esempio SWI/SNF) (Bochar et al., 2000); (b) interagisce con p53 (Chai et al., 1999; MacLachlan et al., 2002), con ATF1 (Houvras et al., 2000) e con CtIP (Li et al., 2000; Yu et al., 1998; Li et al., 1999; Yu e Baer, 2000) per mezzo di geni transattivanti (ad esempio, p21/CDKN1A e GADD45, che vengono indotti dal DNA danneggiato); (c) interagisce con LMO4 (Sum et al., 2002) la quale reprime l'attività trascrizionale di BRCA1 e (d) agendo da corepressore della trascrizione (Zheng et al., 2000).

2. BRCA2 è la proteina che interagisce direttamente con Rad51 (Sharan et al., 1997; Wong et al., 1997; Marmorstein et al., 1998; Chen et al., 1998; Davies et al., 2001). Avendo anch'essa un ruolo importante nella HRR, le cellule che portano mutazioni in entrambi gli alleli del gene BRCA2, mostrano una moderata sensibilità alle radiazioni ionizzanti. In maniera simile a BRCA1 e Rad51, la perdita completa di questa proteina risulta incompatibile con la vitalità in cellule proliferanti. BRCA2 è presente solamente negli eucarioti superiori ed il

numero di proteine che interagiscono con essa è molto limitato se comparato a quelle che interagiscono con BRCA1. Anche se è stata riportata un'interazione tra BRCA1 e BRCA2 (Chen et al., 1998), questa non è stata riscontrata in altri studi (Wang et al., 2000) e ciò fa supporre che sia un'interazione transitoria che si verifica durante la riparazione delle DSBs. La regione N-terminale di BRCA2 contiene due domini che si pensa siano implicati nell'attivazione della trascrizione (Milner et al., 1997). BRCA2 interagisce con la proteina coattivatrice P/CAF (fattore associato p300/CBP), che possiede attività acetiltransferasica sugli istoni, regolando la trascrizione attraverso il reclutamento di P/CAF stessa (Fuks et al., 1998). BRCA2 ha un ruolo importante anche nel controllo del trasporto nucleare di Rad51 (Davies et al., 2001) e quindi può avere un'attività regolatoria sia positiva che negativa sui livelli di quest'ultima. Molte altre sono le proteine che interagiscono con BRCA2 e tra queste p53 inibendone la sua attività trascrizionale (Marmorstein et al., 1998).

- **Complesso Rad50-Mre11**: può legare sia DNA lineare che circolare ma l'assemblaggio di oligomeri voluminosi può verificarsi solamente su filamenti lineari (de Jager et al., 2001). La formazione degli oligomeri Rad50-Mre11 su DNA con differenti strutture terminali è modulata dal legame con l'ATP, che favorisce la formazione di oligomeri che si assembleranno preferibilmente su filamenti di DNA con estremità 3' sporgenti (de Jager et al., 2002).

- **Rad51**: è la proteina di trasferimento del filamento più importante nelle cellule eucariotiche e, nella ricombinazione, è associata a Rad52, Rad54 e a Rad54B ed ai paraloghi Rad51. Essa interagisce con numerose molecole proteiche che includono c-Abl, BRCA2, REPA, BLM, Rad52, Rad54 ed XRCC3 (Thompson e Schild, 2001). *In vitro* Rad51 ha attività ATPasica mentre non chiaro è il suo ruolo *in vivo*. In cellule mitotiche umane oltre a Rad51 esistono altre 5 proteine relazionate ad essa (paraloghi) che sono: XRCC2, XRCC3, Rad51B/Rad51L1, Rad51C/Rad51L2 e Rad51D/Rad51L3; queste proteine mostrano un'identità di sequenza del 20-30 % con Rad51 e tra di loro e probabilmente, insorgono da duplicazioni geniche seguite dall'evolversi di nuove funzioni. I paraloghi di Rad51 nell'uomo sono, molto probabilmente, fattori accessori, anche se ancora non è ben chiara la loro precisa funzione. Recentemente è stato definito che i paraloghi di Rad51 formano due differenti complessi (l'eterodimero Rad51C/XRCC3 e l'eterotetramero Rad51B-C-D/XRCC2) in differenti linee

cellulari umane testate (Masson et al., 2001; Wiese et al., 2002; Liu et al., 2002; Miller et al., 2002).

- **Rad52**: è stato dimostrato *in vitro* che questa proteina lega sia DNA a singolo che a doppio filamento (Van Dyck et al., 1998) e che interagisce con due proteine spesso richieste nella HR che sono RPA e Rad51. Il ruolo di Rad52 è quello di aggregare molecole di DNA e promuovere l'appaiamento di filamenti singoli di DNA complementari (Mortensen et al., 1996). Il suo dominio di legame ha la forma di un anello in cui il DNA a singolo filamento in esso accomodato si presenta con le basi esposte e pronte per l'appaiamento (Singleton et al., 2002). Rad52 è considerato il “portinaio” della HR e secondo questo modello il legame di questa proteina al DNA preclude il NHEJ iniziando una cascata di eventi che culminano nella riparazione attraverso la HR. Durante le fasi precoci della HRR, Rad52 assiste Rad51 spostando le proteine RPA dal DNA a singolo filamento (Benson et al., 1998; Mellwraith et al., 2000; Kagawa et al., 2001).

c) Il **NHEJ** è il meccanismo predominante di riparazione delle DSBs nelle cellule di mammifero ed inizia con il legame di specifiche proteine alle estremità rotte del DNA, un processo fondamentale in quanto tende a limitare la degradazione nucleotidica che potrebbe risultare nella perdita di materiale genetico. Il punto chiave del NHEJ è la giustapposizione fisica delle estremità del DNA e siccome questa fase non è mediata da omologia di sequenza, si pensa che queste proteine fungano da ponti tra le due estremità rotte (Pfeiffer e Vielmetter, 1988; Thode et al., 1990). Se le estremità giustapposte possono essere legate direttamente, allora il sistema di riparazione richiede solo l'attivazione della DNA ligasi per il completamento. Tuttavia le rotture generate dalla maggior parte degli agenti danneggianti il DNA non hanno estremità legabili e quindi debbono essere processate prima della ligazione. Innanzitutto le estremità rotte debbono essere allineate con corte sequenze complementari (1-4 nucleotidi), dette microomologie (Kramer et al., 1994; Moore e Haber, 1996; Roth e Wilson, 1986). Ciò suggerisce che dopo che le estremità vengono messe a contatto da ponti proteici, vi è una fase di allineamento in cui le sequenze vengono comparate e poi allineate. Le proteine che partecipano a questo meccanismo di riparazione sono le seguenti:

- **Complesso Eterodimerico Ku**: si compone di due subunità denominate Ku70 (69 kDa) e Ku86 (83 kDa), due proteine altamente conservate presenti in tutti gli eucarioti. Entrambe le subunità legano le rotture a doppio filamento (DSBs) con

elevata affinità. Il complesso Ku ha una forma toroidale con un anello centrale grande abbastanza da permettere l'accomodamento della doppia elica di DNA (Walker et al., 2001) ed il suo anello interno è costituito di aminoacidi carichi positivamente che permettono l'interazione con le cariche negative dei gruppi fosfato della doppia elica. Il ruolo del complesso Ku, in molti sistemi eucariotici, è quello di reclutare la subunità catalitica della protein chinasi DNA dipendente (DNA-PKcs), essenziale al processo riparativo. L'attività di Ku è dipendente dal suo legame con l'inositolo-6-fosfato (IP6) (Hanakahi et al., 2000; Hanakahi e West, 2002; Ma e Lieber, 2002).

- **Chinasi DNA dipendente (DNA-PK):** è costituita dalla subunità catalitica DNA-PKcs e da Ku assemblate a livello delle estremità rotte del DNA (Dvir et al., 1992; Gottlieb e Jackson, 1993). Molti studi hanno dimostrato che la DNA-PKcs promuove la ligazione intramolecolare mediata dal complesso DNA ligasi IV/XRCC4 (Chen et al., 2000) ed infatti il ruolo della DNA-PK è quello di reclutare gli altri fattori di riparazione e di assistere al processamento e riparazione della lesione. Diversi sono i substrati della DNA-PKcs: (a) essa fosforila se stessa a livello della Serina 2609 ed in molti altri siti ed anche se non si conosce l'esatto ruolo di questa autofosforilazione, si pensa che essa sia fondamentale per destabilizzare il suo legame col DNA per facilitare, così, l'accesso di altre proteine alle estremità del DNA stesso. L'autofosforilazione della DNA-PKcs, inibisce l'attività della DNA-PK portando alla dissociazione del complesso (Chan e Lees-Miller, 1996; Douglas et al., 2001; Chan et al., 2002; Merkle et al., 2002; Ding et al., 2003; Reddy et al., 2004; Block et al., 2004); (b) la DNA-PKcs fosforila anche un'altra proteina essenziale al NHEJ, che è la proteina XRCC4, la quale lega e aumenta l'attività della DNA ligasi IV. In vivo la fosforilazione di XRCC4, che avviene in prossimità della porzione C-terminale della proteina, si verifica in risposta alla radiazione ionizzante ed in maniera DNA-PKcs dipendente; (c) un altro substrato della DNA-PKcs e che svolge un ruolo essenziale nel NHEJ e nella ricombinazione V(D)J, è la proteina Artemis, un'endonucleasi struttura specifica essenziale nell'apertura di una struttura a forcina che si forma durante la ricombinazione V(D)J.

- **Artemis:** le proteine centrali del NHEJ sono fondamentali anche nel processo di complementazione della ricombinazione V(D)J, un meccanismo iniziato da specifiche endonucleasi dette RAG1/RAG2. Una proteina essenziale a tale

meccanismo e che interagisce con la DNA-PKcs, sia *in vivo* che *in vitro*, è la proteina Artemis. Artemis singolarmente è una esonucleasi che interagisce con le estremità 5' e 3' del DNA a singolo filamento (Ma et al., 2002) invece, nel complesso DNA-PKcs/Artemis, ha un'attività endonucleasica sia a livello delle estremità 5' che 3' sporgenti. Mentre nel contesto della ricombinazione V(D)J, Artemis ha il ruolo di tagliare le strutture a forcina generate dalle endonucleasi RAG1/RAG2, nel NHEJ sembra essere importante nel processamento delle estremità del DNA riconoscendo la discontinuità strutturale tra DNA a singolo e doppio filamento. Se l'attività di questa proteina non viene controllata correttamente, essa potrebbe portare ad instabilità genetica in quanto alcuni intermedi metabolici del DNA, come quelli che si generano durante la replicazione, la trascrizione e la ricombinazione (tutti implicati nella separazione dei due filamenti di DNA e nella generazione di transizioni tra singolo e doppio filamento del DNA), potrebbero mimare i normali substrati di Artemis ed essere riconosciuti da essa.

- **DNA Polimerasi:** dopo l'allineamento e il processamento delle estremità rotte del DNA, resta una piccola gap che viene riempita da specifiche DNA polimerasi che, nei mammiferi, sono rappresentate dalle DNA polimerasi μ e λ , entrambe trovate associate a Ku (Mahajan et al., 2002; Lee, et al., 2004; Ma et al., 2004).

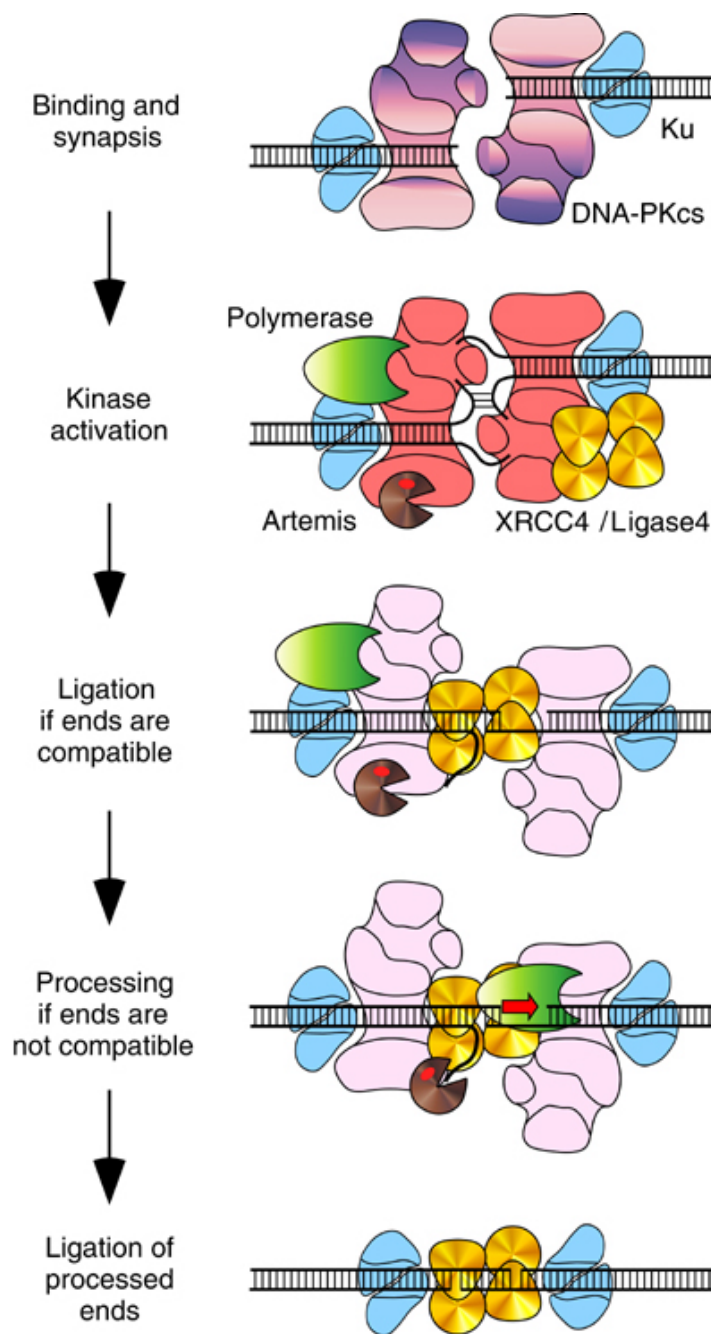


Fig. (8). Meccanismo del Non Homologous End-Joining [Da: Budman e Chu, 2005]

Oltre a questi fattori partecipano al processo del NHEJ anche altri complessi proteici che comprendono proteine quali Mre11 e Rad50 che, nel lievito, insieme alla proteina Xrs2 formano un complesso detto MRX. Studi di Goedecke e collaboratori (1999) su Mre11 e Ku70 in cellule meiotiche e mitotiche di topo, hanno messo in evidenza che in cellule mitotiche queste due proteine interagiscono tra loro attraverso l'interazione tra i domini C- ed N-terminali di Ku70 con il

dominio N-terminale di Mre11 ed, inoltre, l'assenza di Ku70 blocca la proteina Mre11 in foci cromosomali discreti che si pensano essere siti di riparazione del DNA. In cellule meiotiche, invece, Ku70 è presente in quantità variabili, mentre Mre11 e Rad50 sono presenti in abbondanza ed agiscono in maniera Ku indipendente. Si pensa che Mre11 e Rad50 siano implicate nella preparazione delle cellule per la formazione e processamento delle DSBs e che la regolazione della quantità di Ku70 agisca da controllo per la determinazione dell'attività del NHEJ (Figura 9).

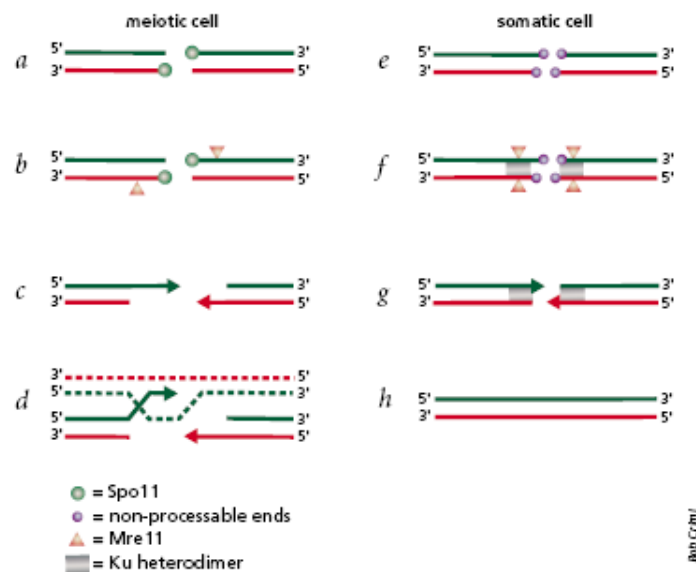


Fig. (9). Modello di regolazione della proteina Ku70 in meiosi e mitosi.

[Da: Lustig, 1999]

Secondo questo modello le cellule meiotiche mancano di Ku70 durante il processo di ricombinazione e, quindi, la ricombinazione meiotica è indipendente dal NHEJ.

Descrizione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono tra i più comuni inquinanti ambientali ed in alcune città sono fortemente implicati nei disturbi della salute della popolazione. Essi derivano da fonti naturali come le eruzioni vulcaniche e gli incendi delle foreste, e da fonti artificiali quali i gas di scarico dei motori a diesel e

benzina, i processi industriali, il catrame, i fumi esalati durante la combustione incompleta di carbone o legno. Molti IPA sono stati ritrovati anche nel fumo di sigaretta, sebbene, per i non fumatori, la principale fonte di esposizione è attraverso la dieta (Phillips, 1999), ad esempio ingerendo cibi cotti alla brace o affumicati e le verdure a foglia larga (spinaci e lattuga) sulle quali questi composti si depositano. L'uomo può, inoltre, venire a contatto con queste sostanze soprattutto attraverso l'esposizione professionale che rappresenta la fonte maggiore di incidenza di varie patologie tra cui il cancro al polmone e gli epitelomi cutanei. A rischio maggiore sono coloro che lavorano nelle fonderie di ferro e acciaio, nelle industrie di produzione dell'alluminio, coloro che si occupano del processamento del combustibile fossile, della pavimentazione delle strade, ecc. (Boffeta et al., 1997).

Gli IPA sono costituiti dalla fusione di due o più anelli benzenici e gli anelli più vicini sono uniti tra loro tramite una coppia di atomi di carbonio condivisi; questi composti presentano diverse proprietà chimico fisiche tra cui elevata stabilità, struttura geometrica piana, scarsa solubilità in acqua, ottima solubilità nei lipidi ed in molti solventi organici (composti lipofili), bassa volatilità (ad eccezione dei composti più leggeri), punti di ebollizione e di fusione elevati e si presentano solidi a temperatura ambiente. La loro solubilità in acqua decresce con l'aumentare del peso molecolare, per cui gli IPA con più di quattro anelli si trovano sempre legati a sostanze particellate, mentre quelli con più basso peso molecolare (due o tre anelli) si possono trovare anche in forma libera nei sistemi acquosi. Questi composti hanno una tensione di vapore bassa che è inversamente proporzionale al numero di anelli contenuti, perciò nell'atmosfera si associano con il particolato aereo. Al diminuire della temperatura gli IPA che hanno un alto peso molecolare (≥ 4 anelli) e quindi una bassa tensione di vapore, si condensano rapidamente e vengono assorbiti sulla superficie delle particelle di fuliggine e di cenere, mentre quelli con un peso molecolare più basso (3 anelli) e con una tensione di vapore alta, restano parzialmente nella fase di vapore per poi condensare.

Gli IPA si formano attraverso processi di combustione incompleta di materiali organici contenenti carbonio. Il meccanismo consiste in una ripolimerizzazione di frammenti di idrocarburo che si formano durante un processo noto come "cracking", cioè la frammentazione delle molecole più grosse di combustibile in numerosi parti più piccole, quando vengono a contatto col fuoco. La ripolimerizzazione avviene in condizioni di carenza di ossigeno e proprio al

diminuire del rapporto ossigeno/combustibile, aumenta la velocità di formazione degli IPA. I frammenti ricchi in carbonio sono quelli che danno origine agli idrocarburi policiclici aromatici, che rappresentano la forma più stabile di molecole in quanto hanno un alto rapporto C/H.

In base alla loro struttura possiamo dividere gli IPA in due classi (Figura 10):

- non planari, con regione a fiordo (fjord region)
- planari, con regione a baia (bay region)

Le differenze, tra questi due tipi di regioni, sono le seguenti:

- la regione a fiordo è più distorta della regione a baia a causa dell'ingombro sterico tra le molecole (Katz et al., 1998; Little et al., 1999).
- i dioli epossidi con regione a fiordo, legano il DNA in maniera più estensiva delle regioni a baia e reagiscono, preferenzialmente con i residui di adenina anziché di guanina, nel DNA (Koreeda et al., 1978; Giles et al., 1995; Ralston et al., 1995).
- gli addotti dei dioli epossidi con regione a fiordo distorcono l'elica di DNA molto meno rispetto a quelli con la regione a baia e ciò porta ad una minore efficienza nel riconoscimento e rimozione dell'addotto da parte del macchinario di riparazione NER; ciò rende i dioli epossidi con regione a fiordo più tumorigenici di quelli a baia (Geacintov et al., 1997; Guo et al., 2003; Geacintov et al., 2005).
- il riconoscimento dell'addotto mediato da p53 e l'arresto del ciclo cellulare sembra essere differente tra le due classi di composti (Binkova et al., 2000; Lloyd e Hanawalt, 2002).

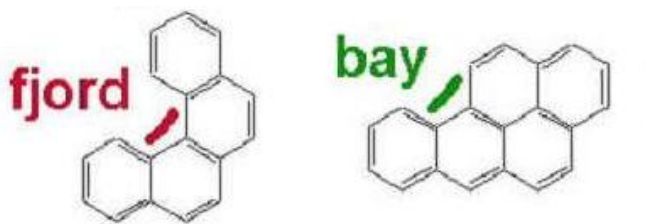


Fig. 10. Idrocarburi policiclici aromatici con regione a fiordo e a baia

Metabolismo degli idrocarburi policiclici aromatici

Molti IPA e loro analoghi eterociclici, sono stati trovati essere tumorigenici nell'uomo ed in animali da esperimento (Dipple et al., 1984; Harvey, 1991; IARC, 1973; IARC, 1983). Tuttavia numerosi studi hanno messo in evidenza che le molecole di IPA di per sé non sono agenti cancerogeni ma è richiesta la loro attivazione metabolica affinché possano esercitare i loro effetti mutagenici/carcinogenici (Harvey, 1991; Miller, 1978; Miller and Miller, 1966). Gli IPA vengono assorbiti dall'organismo umano per via inalatoria, gastrointestinale e cutanea e la loro biotrasformazione avviene in diversi organi, in particolare nel fegato seguito da polmoni, intestino, cute e reni.

La via metabolica principale a cui vanno incontro gli IPA è quella dei diidrodiole epossidi con regione baia (o fiordo); essa è considerata il meccanismo di carcinogenesi chimica dominante degli IPA (Hall e Grover, 1990; Harvey, 1991) e procede secondo due stadi principali: le reazioni di monossigenazione e le reazioni di coniugazione dette anche, rispettivamente, reazioni di Fase I e di Fase II.

Le reazioni di Fase I o di monossigenazione consistono nell'ossidazione degli IPA, catalizzata dagli isoenzimi della famiglia dei Citocromi P₄₅₀, che porta alla formazione di specie elettrofile biochimicamente reattive capaci di interagire con le macromolecole cellulari (in particolare con acidi nucleici e proteine). Partecipa alla Fase I anche la NADPH-citocromo-P₄₅₀-reduttasi.

- **Citocromi P₄₅₀ (CYPs)**: Il Citocromo P₄₅₀ è un emoproteina che contiene come gruppo prostetico la protoporfirina IX e costituisce una famiglia di diversi citocromi (Guengerich et al., 1982; Lu e West, 1978). Questi enzimi sono implicati nel metabolismo di numerose droghe, agenti xenobiotici e steroidi. Nell'uomo sono state identificate 17 famiglie di CYPs e, tra queste, quelle che giocano un ruolo importante nell'attivazione metabolica di un'ampia varietà di composti carcinogeni, troviamo i membri della famiglia CYP1, CYP2 e CYP3. CYP1A1 e CYP1B1 sono mono-ossigenasi capaci di convertire idrocarburi policiclici aromatici lipofili inerti in molecole elettrofile che possono essere coniugate ed escrete dalle cellule. E' proprio in questo processo di detossificazione che si potrebbero generare dioli epossidi capaci di legare il DNA. CYP1A1 e CYP1B1 sono substrati inducibili, infatti vengono indotti dal *recettore aril idrocarbure* (AHR) il quale lega gli

idrocarburi planari, come il Benzo[a]Pirene (B[a]P), in maniera più efficiente rispetto ai composti con una struttura più distorta quali , ad esempio, il Dibenzo[a,l]Pirene (DB[a,l]P). Questo recettore citosolico, dopo dimerizzazione con il *traslocatore nucleare aril idrocarbone (ARNT)* entra nel nucleo e va ad interagire con i geni contenenti un *elemento di risposta xenobiotica (XRE)*, risultante nell'induzione o soprarregolazione di proteine implicate nella detossificazione xenobiotica (Whitlock, 1999). CYP1A1 e CYP1B1 mostrano una simile ma non identica specificità di substrato che si riflette in una diversa efficienza a metabolizzare composti specifici (Shimada e Fujii-Kuriyama, 2004). Questi due enzimi vengono espressi negli organi extraepatici quando gli IPA vengono introdotti nel corpo degli animali (Shimada et al., 1996) e sono i loro principali catalizzatori nel metabolismo, anche se molti altri enzimi sono coinvolti nell'insorgenza di fenomeni di tumorigenesi.

- **NADPH-citocromo-P₄₅₀-reduttasi:** E' una proteina integrale di membrana contenente una regione idrofobica ed una idrofilica ancorata alla superficie citosolica del reticolo endoplasmatico tramite un corto peptide presente nella regione idrofobica; quest'ultima si trova a livello della porzione N-terminale della proteina ed è responsabile anche dell'interazione con il citocromo P₄₅₀ (Gum e Strobel, 1981). La reduttasi contiene anche una molecola di flavin-mononucleotide (FMN) ed una di flavinadenin-dinucleotide (FAD) per enzima (Dignam e Strobel, 1975). L'enzima trasferisce gli elettroni che provengono dal NADPH al citocromo P₄₅₀ per ridurlo ed è stato proposto che il flusso di elettroni attraverso il centro flavinico vada dal NADPH al FAD, da questo al FMN ed infine all'accettore di elettroni (Vermilion et al., 1981).

Le reazioni di Fase II o di coniugazione sono rappresentate dalla sintesi dei glucoronidi (O-, N- ed S- glucoronidi), sintesi dei solfati esterei, coniugazione con glutatione, coniugazione con glicina, metilazione (N-, O-, S-) e acetilazione. Essendo, di norma, i prodotti di coniugazione non tossici, queste reazioni sono anche dette di detossificazione. Infatti i composti xenobiotici (cioè sostanze estranee all'organismo) o i loro metaboliti, contenenti appropriati gruppi (ad es. - OH, -NH, carbossilici, epossidi) si combinano con substrati endogeni per formare coniugati non reattivi che vengono facilmente escreti. Numerosi enzimi contribuiscono alla detossificazione degli IPA tra cui la *eossido idrolasi (EH)*, la

glutathione-S-transferasi (GST), l'*uridina difosfato (UDP)*, la *glucoronil transferasi* e la *metil transferasi*.

- ***Le Epossido Idrolasi (EH)***: questa classe di proteine include enzimi che hanno la capacità di convertire gli epossidi in dioli vicinali (Arand e Oesch, 2002). Questo tipo di reazione è considerata essere un processo di detossificazione, in quanto gli epossidi spesso presentano potenzialità genotossiche a causa della loro reattività elettrofila (Oesch, 1973). La distribuzione negli organi dell'EH è vasta: la maggiore attività è stata riscontrata nel fegato, seguito dal testicolo, dal rene, dal polmone e da altri organi, ma la più alta attività specifica è stata rilevata nei microsomi dove l'enzima è effettivamente localizzato per poter funzionare in coordinazione col sistema della Citocromo P₄₅₀. L'enzima EH è un omodimero ed ogni subunità è composta di due domini. Un dominio C-terminale di 35-kDa che ospita il centro catalico per l'attività dell'enzima ed un dominio N-terminale di 25-kDa.

- ***Glutathione-S-transferasi (GST)***: Nella seconda fase di detossificazione degli intermedi metabolici reattivi avviene la coniugazione di composti possedenti centri elettrofili con la forma ridotta del glutathione (GSH), reazione catalizzata dalla famiglia della glutathione-S-transferasi (GST) (Jakoby e Habig, 1980). Questa superfamiglia di enzimi detossificanti si compone di diverse classi che si distinguono in base alla loro diversa specificità di substrato e alla loro localizzazione tissutale. I geni delle diverse classi della GST risultano polimorfici nelle popolazioni umane, sia in conseguenza di singole sostituzioni nucleotidiche che portano alla comparsa di diverse varianti alleliche, sia in seguito a delezione (di lunghezza e posizione variabile) all'interno della sequenza codificante.

- ***Sulfotransferasi***: E' localizzato nella frazione citosolica e catalizza reazioni di esterificazione di un'ampia varietà di composti come gli steroidi, i carboidrati ed i composti alchilici ed acrilici, per formare coniugati con il solfato.

- ***UDP-Glucoronil-transferasi (UGT)***: La reazione di coniugazione dei substrati con l'acido glucuronico avviene attraverso due reazioni iniziali con gli enzimi citosolici. La prima consiste nella formazione di un intermedio reattivo, l'UDP-Glucosio (UDPG) a partire dal glucosio-1-fosfato, seguito dalla formazione dell'acido glucuronico. I cosubstrati, essenziali alla coniugazione catalizzata dalla UDP-Glucoronil-transferasi (UGT), sono, per la maggior parte rappresentati da composti idrossilati ed, in minor misura, da composti con gruppi amminici o solfidrilici che possono essere utilizzati come gruppi funzionali. Gli enzimi che

appartengono alla famiglia UGT sono molto simili fra loro ma hanno differenti funzionalità e probabilmente non riconoscono i diversi gruppi funzionali (-OH, -COOH, -NH₂, etc.) ma, bensì, le differenze di configurazione del substrato. Gli enzimi UGT sono localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico.

Se questa via metabolica avviene nella regione baia (*bay region*) o fiordo (*fjord region*) dell'IPA, la molecola risultante può giocare un ruolo importante come cancerogeno in quanto sono regioni elettrofile capaci di legare il DNA per formare addotti covalenti, un passaggio iniziale per la trasformazione maligna delle cellule. Molti IPA tra cui il Benzo[a]Pirene (Dipple et al., 1984; Gelboin, 1980) ed il Dibenzo[a,l]Pirene (Ralston et al., 1994; 1995) vengono metabolizzati attraverso questa via. In questo processo di attivazione metabolica si generano degli stereoisomeri ed, infatti, la formazione dei metaboliti degli IPA attraverso gli enzimi CYP e EH procede con un'elevata stereoselettività.

Benzo[a]Pirene

Gli effetti mutageni e cancerogeni del Benzo[a]Pirene sono dovuti proprio al legame covalente dei suoi derivati metabolicamente attivi con il DNA cellulare. Studi presenti in letteratura mostrano che il BPDE, un composto mutagenico nei sistemi batterici e nelle cellule di mammifero, nonché tumorigenico negli animali da laboratorio (Buening et al., 1978; Rubin, 2001), si presenta sotto forma di due enantiomeri che sono il (+)- e il (-)-anti-benzo[a]pirene diolo epossido [(+)-a-BPDE; (-)-a-BPDE] (Thakker et al., 1977; Yang e Gelboin, 1976). La stechiometria è di fondamentale importanza in quanto i due enantiomeri del BPDE, esibiscono attività biologiche differenti. Infatti, mentre il (+)-a-B[a]PDE è altamente carcinogeno, il (-)-a-B[a]PDE ha un effetto minore o nullo nei sistemi cellulari dei mammiferi (Buening et al., 1978). Entrambi, comunque, reagiscono principalmente con il gruppo N² della guanina, portando all'apertura *cis/trans* dell'anello dell'eossido, dando, così, origine agli addotti (+)-*trans-anti*-[BP]-N²-dG e (-)-*trans-anti*-[BP]-N²-dG (Geacintov et al., 1997; Meehan e Straub, 1979; Cheng et al., 1989) (Figura 11).

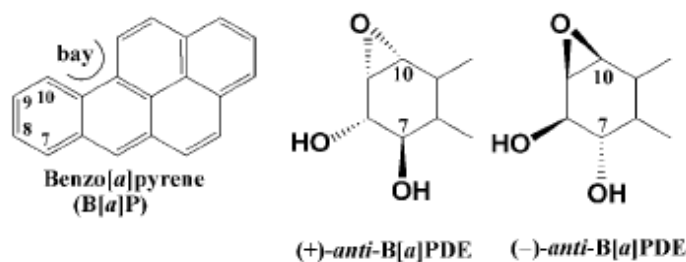


Fig. 11. Struttura del Benzo[a]Pirene e delle sue due forme metabolicamente attive: (+)-anti-B[a]PDE e (-)-anti-B[a]PDE [Da: Geacintov et al., 2002]

Saggi di trascrizione *in vitro* hanno messo in evidenza che entrambi gli addotti determinano completi blocchi dell'allungamento dell'RNA polimerasi II umana (Perlow et al., 2002), in maniera sequenza- e stechiometria- dipendente, quando presenti sul filamento trascritto dei geni attivi, mentre su quello non trascritto, le lesioni indotte dal BPDE, non pongono barriere alla progressione della trascrizione, ma non permettono la dissociazione del complesso rendendola, quindi, più lenta. Il BPDE legato alla guanina in posizione N² ne modifica le proprietà di appaiamento e porta alla formazione di accoppiamenti errati di tipo G:A che, alla replicazione successiva, si trasformeranno in mutazioni GC>TA. La presenza di questi addotti al DNA nell'epitelio del polmone di soggetti fumatori dimostra che questi cancerogeni raggiungono, nel tessuto bersaglio, dei livelli tali da modificarne il loro DNA.

I tessuti preneoplastici e i tumori al polmone mostrano, spesso, alterazioni dell'espressione di oncogeni e/o geni soppressori dei tumori. Tali alterazioni sono associate a cambiamenti cellulari che implicano uno sbilanciamento tra la proliferazione cellulare, la riparazione del DNA e la morte cellulare; alterazioni che potrebbero risultare anche dall'invecchiamento cellulare e/o da insulti chimici sia endogeni che esogeni (Fields et al., 2004). Numerosi studi hanno messo in evidenza che il BPDE influenza l'espressione di geni, quali il proto-oncogene H-ras ed il gene soppressore dei tumori p53, modificando le guanine in posizioni che sono presenti nei così detti punti caldi di mutazione nel cancro umano (Denissenko et al., 1996; Dittrich e Krug, 1991). Lo studio molecolare delle mutazioni del gene p53 nei tumori polmonari di fumatori ha identificato che queste sono preferenzialmente trasversioni GC>TA. Il BPDE fa diminuire anche

l'espressione del gene soppressore dei tumori BRCA-1, attraverso una via p53 dipendente (Jeffy et al., 2002) e influenza anche l'espressione dei protooncogeni Cdc25B e c-myc aumentandone e diminuendone, rispettivamente, i livelli di espressione. Nel caso di Cdc25B (il cui prodotto genico è una fosfatasi essenziale per la progressione nel ciclo cellulare), il BPDE aumenta i livelli di espressione di questo gene in cellule che vanno incontro a differenziazione squamosa terminale ed in cellule di cancro al polmone, ma non in cellule non differenziate e non tumorigeniche (Oguri et al., 2003). La sovraespressione di Cdc25B è correlata con la bassa sopravvivenza di soggetti affetti da cancro in cui si ha tale sovraespressione (Takemasa et al., 2000; Sasaki et al., 2001). Negli esempi discussi il rilevamento di addotti nel tessuto tumorale ed il rilevamento di mutazioni in un gene rilevante nel processo di cancerogenesi, formano un quadro complessivo di convincente associazione tra esposizione a cancerogeni ambientali, danno al DNA e formazione di tumori.

Dibenzo[a,l]Pirene

Il Dibenzo[a,l]Pirene (DB[a,l]P) detto anche dibenzo[def,p]crisene o nafto[1,2,3,4-pqr]tetrafene, secondo la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), è considerato l'idrocarburo aromatico policiclico più altamente carcinogeno presente nell'ambiente (Cavalieri et al., 1991; Higginbotham et al., 1993; Sauvain et al., 2001; Seidel et al., 2004). Sebbene il DB[a,l]P può, in teoria, essere metabolizzato a tre dioli epossidi, di cui uno con regione a baia (l'1,2-diolo-3,4-eossido) e due con regione a fiordo (il 3,4-diolo-1,2-eossido e l'11,12-diolo-13,14-eossido), studi sugli addotti covalenti al DNA formati dal DB[a,l]P in cellule umane e di roditore in coltura, hanno dimostrato che solamente uno di questi tre dioli epossidi si forma realmente e cioè l'*11,12-diolo-13,14-eossido* (Ralston et al., 1994). Come per il B[a]P, anche per il DB[a,l]P l'attivazione metabolica ha luogo con un'elevata stereoselettività. Infatti, sono solo due gli enantiomeri che si formano: il (-)-anti-dibenzo[a,l]pirene diolo eossido [(-)-anti-DB[a,l]PDE], considerato essere il suo metabolita ultimo maggiormente reattivo nei confronti del DNA (Mahadevan et al., 2003), ed il (+)-

syn-dibenzo[a,l]pirene diolo epossido [(+)-syn-DB[a,l]PDE] (Figura 12) (Ralston et al., 1995; Ralston et al., 1994b),

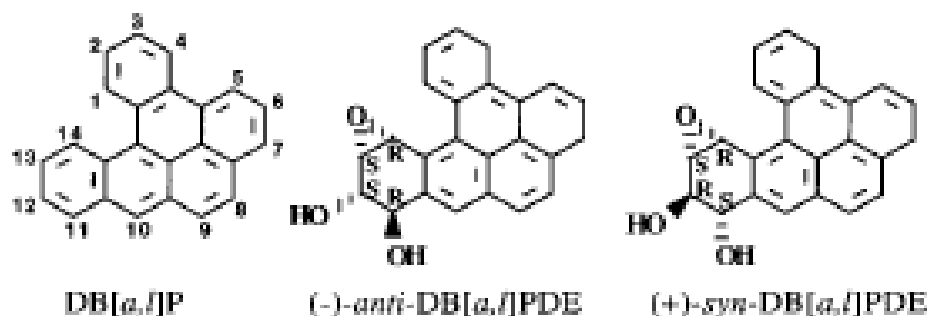


Fig. 12. Struttura del Dibenzo[a,l]Pirene e delle sue due forme metabolicamente attive: (-)-anti-DB[a,l]PDE e (+)-syn-DB[a,l]PDE [Da: Melendez-Colon et al., 1997]

i quali, reagendo primariamente con il gruppo N⁶ dell'adenina, danno origine ad addotti covalenti col DNA altamente carcinogeni. Infatti, gli addotti derivanti dalla regione a fiordo sono più flessibili e contorti rispetto a quelli derivanti dalla regione a baia dei dioli epossidi (Cosman et al., 1995; Suri et al., 1999; Geacintov et al., 1997; Geacintov et al., 2005). Ciò spiegherebbe anche le differenze nell'efficienza di riconoscimento dell'addotto e la sua riparazione da parte del NER, considerata la via principale di rimozione degli addotti derivanti dagli IPA (Wood, 1999; Sancar, 1996; Braithwaite et al., 1999; Mitchell et al., 2003). Studi di Dreij e collaboratori (2005) su cellule di carcinoma epiteliale di polmone umano, hanno dimostrato, infatti, un diverso tasso di rimozione degli addotti derivati dal (-)-anti-DB[a,l]PDE rispetto al (+)-anti-B[a]PDE. Questi studi hanno rilevato che il rapporto di addotti dA/dG del (+)-anti-B[a]PDE è indipendente dal tempo, mentre per il (-)-anti-DB[a,l]PDE incrementa in maniera significativa. Ciò significa che l'alta carcinogenicità degli IPA con regione a fiordo deriva dalla capacità di formare addotti preferibilmente a livello delle adenine e proprio questi addotti sono più pronti ad eludere il riconoscimento da parte del sistema di sopravvivenza cellulare e a sfuggire, quindi, alla successiva rimozione della lesione da parte del NER. Il (-)-anti-DB[a,l]PDE induce un'ampia varietà di mutazioni di cui quelle predominanti sono rappresentate da sostituzioni di basi a livello dell'appaiamento A:T. Tra queste sostituzioni quelle che avvengono più frequentemente durante l'esposizione al (-)-

anti-DB[a,l]PDE sono le transizioni A:T→G:C seguite dalle trasversioni A:T→C:G o G:C→T:A. A dosi molto elevate di (-)-anti-DB[a,l]PDE le sostituzioni più comuni sono, invece, rappresentate dalle trasversioni G:C→T:A (Mahadevan et al., 2003). Come il B[a]PDE anche il DB[a,l]PDE esercita la sua attività genotossica sia in cellule umane (Ralston et al., 1997; Melendez-Colon et al., 2000) che in quelle di topo (Melendez-Colon et al., 2000; Buters et al., 2002), influenzando l'espressione di geni quali gli oncogeni della famiglia *h-ras* (portando alla loro attivazione) (Nesnow et al., 1998; Ross e Nesnow, 1999) e dei geni soppressori dei tumori quali p53 (inducendo la perdita della loro funzionalità) (Denissenko et al., 1996; Pfeifer e Denissenko, 1998), due fenomeni legati a processi di carcinogenesi indotta dagli IPA che colpiscono, nel topo, cellule cancerose di organi bersaglio quali pelle e polmoni.

Addotti dei carcinogeni al DNA

L'azione delle sostanze chimiche sul DNA può essere indiretta o diretta. L'azione indiretta consiste nell'attacco al DNA di molecole di ossigeno attive formatesi in seguito alla reazione dell'agente primario con un bersaglio cellulare diverso dal DNA. L'azione diretta, che consiste nell'interazione di un centro elettrofilo della sostanza con i centri nucleofili del DNA, risulta, invece, dall'interazione fisica dell'agente primario, o di un suo metabolita derivato, col DNA dando origine, generalmente, ad un addotto covalente. Gli addotti al DNA possono presentare diverse proprietà conformazionali: (1) il gruppo aromatico può giacere nel solco minore; (2) il gruppo aromatico può intercalarsi nella doppia elica compromettendo l'appaiamento tra le basi; (3) il gruppo aromatico si intercala nella doppia elica andando ad impilarsi assieme alle basi che mano a mano vengono aggiunte al nuovo filamento allungando, in questo modo, la doppia elica di DNA senza, però, compromettere l'appaiamento tra le basi. Queste tre conformazioni sono governate dalla posizione in cui si forma l'addotto, dalla stechiometria dell'addotto, dalla natura delle basi e dalla topologia del gruppo aromatico. Gli addotti al DNA rappresentano un marcatore di esposizione agli IPA e ad altri composti aromatici, nonché riflettono l'attività degli enzimi di riparazione del DNA danneggiato. Addotti potenzialmente dannosi sono quelli derivanti dall'interazione dei dioli

epossidi (DE), metaboliti degli IPA, col DNA (Sims e Grover, 1974; Szeliga e Dipple, 1998). Gli addotti *trans*-anti-B[a]PDE-N²-dG hanno una conformazione tale da essere classificati come addotti il cui gruppo aromatico giace nel solco minore, mentre gli addotti *trans*-anti-DB[a,l]PDE-N⁶-dA appartengono alla categoria di addotti che si intercalano nella doppia elica senza compromettere l'appaiamento tra le basi. Gli addotti al DNA che derivano dagli epossidi che si ottengono nella regione a baia rappresentano la maggior parte di quelli che si formano *in vivo* anche se la modulazione di alcuni enzimi può portare alla loro formazione, in parte, anche *in vitro* (Oesch e Guenther, 1983).

Ruolo del TCR nella rimozione degli addotti

Numerosi studi hanno messo in evidenza che il Mismatch Repair è implicato nell'apoptosi indotta dagli addotti dei dioli epossidi col DNA (Wu et al., 2003), ma il meccanismo predominante di rimozione di questi addotti voluminosi è il Nucleotide Excision Repair (NER) (Wood, 1999; Sancar, 1996; Braithwaite et al., 1999; Mitchell et al., 2003). Infatti gli addotti al DNA presenti sul filamento stampo dei geni attivi possono impedire la progressione del *complesso della RNA polimerasi (RNAP)*, avendo effetti deleteri sulla trascrizione. Non potendo tollerare un blocco della trascrizione, le cellule hanno evoluto vari meccanismi che rilasciano il complesso trascrizionale nel momento in cui questo evento si verifica. La rimozione del danno che blocca il RNAP sul filamento trascritto dei geni attivi, potrebbe essere facilitato proprio dall'RNA polimerasi bloccata che viene riconosciuta dal meccanismo di riparazione per escissione di nucleotide accoppiata alla trascrizione o TCR. La caratteristica principale del TCR, infatti, è proprio quella di non riconoscere direttamente il danno al DNA ma, bensì, l'RNA polimerasi bloccata al sito danneggiato, che porta, poi, al reclutamento di tutte le proteine NER essenziali alla rimozione del danno stesso (Mellon et al., 1987; Svejstrup, 2002; Svejstrup, 2003) ed alcuni addotti vengono riconosciuti meglio rispetto ad altri proprio grazie alla loro capacità di arrestare la trascrizione piuttosto che comportarsi da substrato dell'omodimero XPC/hHR23B (responsabile del riconoscimento del danno nel NER). Per questo motivo molte lesioni voluminose che includono anche quelle di alcuni IPA eludono il macchinario di riparazione

NER e vengono riparate poco, contribuendo alla loro tumorigenicità, ma potrebbero anche essere riconosciute dal TCR nel momento in cui vanno ad arrestare l'elongazione della trascrizione.

La capacità degli IPA con regione a fiordo di legare in maniera più estensiva il DNA e di riuscire ad eludere il macchinario di riparazione NER, rispetto agli IPA con regione a baia, è dovuto alle loro caratteristiche strutturali ed alla loro capacità di formare addotti prevalentemente a livello dei residui di adenina ed in minor misura su quelli di guanina. Infatti quando il diolo epossido di un IPA con regione a baia ed uno con regione a fiordo legano un residuo di adenina, l'addotto risultante adotta, in entrambi i casi, una conformazione in cui il gruppo aromatico si intercala nella doppia elica del DNA, impacchettandosi tra le basi appaiate e portando all'allungamento della doppia elica senza, però, compromettere l'appaiamento tra la base che esso va a modificare e la sua controparte sul filamento opposto. Essendo, però, il gruppo aromatico degli addotti dei dioli epossidi con regione a fiordo non planare e curvato, esso li rende meno distorti e permette loro un impacchettamento migliore rispetto agli addotti dei dioli epossidi con regione a baia, il cui gruppo aromatico è, invece, planare e inflessibile. Studi condotti riguardo l'elongazione della trascrizione in presenza degli addotti derivanti dagli IPA con regione a fiordo e baia, hanno messo in evidenza che la sequenza locale di DNA, in cui è presente l'addotto, influenza la capacità della lesione di bloccare la trascrizione, sebbene ancora non si conosca il reale meccanismo con cui essa eserciti tale effetto (Perlow et al., 2002) ed anche la stechiometria influenza la propensione dell'addotto a bloccare tale meccanismo cellulare. Modelli molecolari delle lesioni indotte dagli addotti degli IPA con regione a fiordo, formati a livello delle adenine sul filamento trascritto dei geni attivi, suggeriscono che l'addotto può esistere in due orientazioni differenti all'interno del sito attivo dell'RNAP, una che permette l'incorporazione del nucleotide e seguente elongazione della trascrizione ed una che, invece, blocca l'entrata del nucleotide nel canale della RNA polimerasi prevenendo, così, l'incorporazione della base e portando al blocco della polimerasi stessa. Nel primo caso l'addotto si posiziona nel solco maggiore adiacente il residuo di adenina danneggiato ed il suo partner uridina sul filamento opposto con l'anello aromatico che punta verso il lato 3' o 5' del residuo di adenina modificato (in base alla conformazione dell'addotto) non disturbando, in questo modo, il legame idrogeno tra le due basi appaiate (Figura 13);

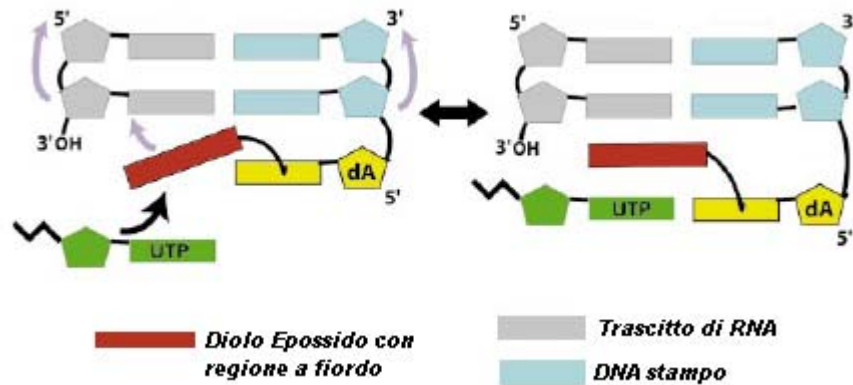


Fig. 13. Rappresentazione schematica di un addotto intercalato all'estremità 3' di un'adenina modificata. [Da: Schinecker et al., 2003]

nel secondo caso l'addotto si trova intercalato al lato 3' o 5' del residuo di adenina, occupando lo spazio che nel sito attivo dovrebbe essere riempito dalla base presente sul filamento opposto prevenendo, così, un ulteriore elongazione della RNA polimerasi (Figura 14).

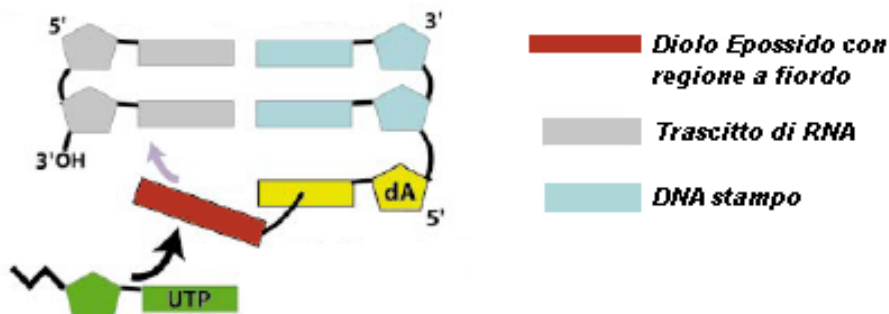


Fig. 14. Rappresentazione schematica di un addotto intercalato all'estremità 5' di un'adenina modificata che blocca il legame idrogeno dell'adenina danneggiata e l'ulteriore avanzamento dell'RNA polimerasi. [Da: Schinecker et al., 2003]

Aberrazioni cromosomiche

Le aberrazioni cromosomiche (AC), cioè cambiamenti nell'organizzazione strutturale di uno o più cromosomi, sono considerate un importante marcatore biologico dell'esposizione umana a radiazioni ionizzanti e agenti chimici

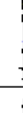
genotossici. A seconda del tipo di agente mutageno che le ha indotte e dello stadio del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule durante l'esposizione, le aberrazioni possono essere suddivise in *cromosomiche*, *cromatidiche* e *subcromatidiche*, sulla base dell'unità strutturale coinvolta nel cambiamento.

Le **aberrazioni cromosomiche**, indotte nella fase G₁ del ciclo cellulare, interessano entrambi i cromatidi.

Le **aberrazioni cromatidiche**, indotte durante la fase S o G₂ del ciclo cellulare, appaiono, in metafase, come rotture e/o scambi ed interessano un singolo cromatidio.

Le **aberrazioni subcromatidiche**, invece, indotte alla fine della fase G₂ o in profase, appaiono come scambi in cui le unità coinvolte sembrano essere più piccole di un singolo cromatidio.

Esempi di aberrazioni indotte nella fase G₁ del ciclo cellulare sono mostrati in Figura 15:

TIPO	G ₁	METAFASE
GAP ISOCROMATIDICA		
DELEZIONE TERMINALE		
DELEZIONE INTERSTIZIALE		
ANELLO ACENTRICO		
ANELLO CENTRICO		
INVERSIONE PERICENTRICA		

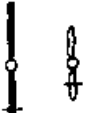
TIPO	G ₁	METAFASE
TRASLOCAZIONI RECIPROCHE		
DICENTRICI		

Fig. 15. Diagrammi dell'origine degli intrascambi e degli interscambi cromosomici

Esempi di aberrazioni indotte nella fase S-G₂ del ciclo cellulare sono mostrati in figura 16:

TIPO	S-G ₂	METAFASE
DELEZIONE TERMINALE		
DELEZIONE INTERSTIZIALE		
ANELLO ACENTRICO		
ANELLO CENTRICO		
ISOCROMATIDI		

TIPO	S-G ₂	METAFASE
SCAMBI SIMMETRICI		
SCAMBI ASIMMETRICI		
TRIRADIALI		

Fig. 16. Diagrammi dell'origine degli intrascambi e degli interscambi cromatidici.

Proprio in base alla fase del ciclo cellulare in cui inducono le AC, gli agenti mutageni possono essere suddivisi, a loro volta, in due gruppi: agenti S-dipendenti e S-indipendenti. Gli agenti **S-dipendenti** esprimono il danno al DNA quando la cellula si trova in fase di sintesi (S) e le aberrazioni indotte da questi agenti insorgono come errori di replicazione del DNA (in un processo definito "misreplication"). Quindi, se le cellule vengono esposte all'agente mutageno nella fase G₁ (fase di pre-sintesi del DNA) del ciclo cellulare, le aberrazioni indotte saranno solo di tipo cromatidico, mentre se l'esposizione avviene nella fase G₂ (fase di post-sintesi del DNA), non si avrà nessuna conseguenza da un punto di vista citogenetico. Sono esempi di agenti S-dipendenti la maggior parte degli *agenti chimici mutageni* e le *radiazioni UV a lunghezza d'onda corta*. Gli agenti **S-indipendenti**, invece, producono direttamente aberrazioni che saranno di tipo

cromosomico se l'esposizione avviene in fase G_1 e di tipo cromatidico se avviene durante la fase G_2 o S del ciclo cellulare. Le *radiazioni ionizzanti* ed *alcuni agenti chimici radiomimetici*, sono esempi di agenti S-indipendenti.

Durante gli anni '60 e gli inizi degli anni '70 sono stati effettuati diversi studi per determinare quale fosse l'origine delle aberrazioni cromosomiche, utilizzando diversi agenti. Bender e collaboratori (1974) hanno proposto un modello per la formazione delle aberrazioni cromosomiche e le assunzioni di base di questo modello sono quattro:

- 1) i cromosomi delle cellule eucariotiche in G_1 contengono una singola doppia elica di DNA;
- 2) il bersaglio per l'induzione di un'aberrazione è il DNA;
- 3) le aberrazioni consistono di rotture nella catena polinucleotidica ed in estremità rotte derivanti dalla ricombinazione, le quali preservano la polarità della catena;
- 4) le rotture a doppio filamento (DSBs) o vengono indotte endogenamente, come durante il normale processo di sintesi del DNA, oppure attraverso l'utilizzo di mutageni o per mezzo dei meccanismi di riparazione enzimatica.

Mentre la maggior parte delle rotture a singolo filamento vengono riparate, una piccola parte di esse viene convertita in rotture a doppio filamento.

Studi condotti successivamente (Natarajan e Obe, 1978, Natarajan et al., 1980) evidenziarono che:

- 1) le endonucleasi di restrizione (RE), che producono estremità tronche, sono più efficienti di quelle che formano estremità coesive nell'indurre DSBs;
- 2) in maniera simile alle radiazioni ionizzanti, gli RE inducono aberrazioni di tipo cromosomico in G_1 e di tipo cromatidico in G_2 ;
- 3) inibitori della riparazione, come *araC* (*Cytosine arabinoside*), potenziano gli effetti degli RE nell'indurre rotture nei cromosomi.

Queste similarità tra gli RE e le radiazioni ionizzanti fanno supporre che le DSBs siano le principali responsabili dell'insorgenza delle alterazioni.

Teorie sulla formazione delle Aberrazioni Cromosomiche indotte dalla radiazione ionizzante

Vi sono due principali teorie che riguardano i meccanismi di formazione delle aberrazioni cromosomiche indotte dalle radiazioni:

- 1) la **teoria classica della rottura e riunione**, formulata da Sax (1938; 1940; 1941) e da Lea (Catcheside e Lea, 1943; Lea, 1946);
- 2) la **teoria dello scambio**, formulata da Revell (1959).

- Teoria della rottura e riunione:

In accordo con questa teoria, la lesione primaria causata dalla radiazione, è una rottura cromatidica o cromosomica ed i tipi di aberrazioni che si osservano durante la mitosi dipendono dal destino di queste rotture; esse, infatti, potrebbero dare origine a strutture illegittime in processi di restituzione o di ricongiungimento con altre rotture presenti allo stesso tempo e nello stesso spazio. Nel processo di **restituzione** le rotture primarie si ricongiungono per riformare il cromosoma originario e quindi sfuggono all'analisi delle metafasi. A seconda che il processo di **ricongiungimento illegittimo** delle rotture avvenga all'interno di un cromosoma o tra cromosomi diversi si parlerà rispettivamente di **intrascambi** o **interscambi**. In entrambi i casi vengono indotti cambiamenti strutturali o aberrazioni che possono o non possono essere visibili alle successive mitosi.

Una terza possibilità è quella che le rotture possono restare aperte e, quindi, vengono viste come **delezioni terminali** nella successiva mitosi.

Dunque, un fattore importante, affinché i processi di restituzione e ricongiungimento avvengano, è la vicinanza delle due rotture sia nel tempo che nello spazio.

- Teoria dello scambio

In accordo con questa teoria, la lesione primaria non è una rottura cromatidica o cromosomica ma una lesione meno drastica che decresce nel tempo. Quindi, se due lesioni si vengono a trovare nello stesso spazio allo stesso tempo, entreranno in uno stadio più stabile detto "stadio di iniziazione dello scambio" e, sempre in

accordo con questa teoria, tutti i tipi di aberrazioni insorgono come risultato di un processo di scambio, essendo le rotture cromatidiche degli intrascambi incompleti (Revell, 1959).

Secondo Revell le rotture cromatidiche (che chiamò “discontinuità” per distinguerle dalle “gaps” o lesioni acromatiche) non rappresentano rotture primarie ma sono il risultato di un processo di “scambio fallito” e sosteneva che l’evento che porta alle aberrazioni cromosomiche non è una rottura (intesa come separazione della molecola di DNA per formare due estremità rotte) ma una “lesione instabile” che, se lasciata a se stessa, con il tempo diventa stabile e, se viene a contatto con una seconda lesione produce uno stadio di “inizio di scambio” che è reversibile ma che può dare origine ad un vero e proprio scambio strutturale. Il fallimento di uno scambio è visibile, in mitosi, come una delezione ma tale rottura non è di tipo primario bensì di tipo secondario. Utilizzando una particolare tecnica di colorazione, detta **Fluorocromo Più Giemsa (FPG)**, in cellule di ovario di hamster Cinese (CHO), Wolff e Bodycote (1975) diedero prove a favore di questa teoria, cercando di determinare l’origine della delezione cromatidica. Infatti questa tecnica permette di distinguere i cromatidi fratelli e gli eventuali scambi tra di essi (SCEs o Sister Chromatid Exchange). Quindi se le delezioni sono semplici rotture non restituite, allora il frammento deleto deve mostrare la stessa colorazione del cromatidio rotto, mentre se le delezioni sono il risultato di “scambi falliti”, allora il frammento deleto deve presentare la stessa colorazione del cromatidio intatto. I risultati hanno messo in luce che una parte delle delezioni, anche se minima, si origina dal fallimento di scambi, mentre la maggior parte si origina secondo il meccanismo di rottura e riunione. Oggi giorno la maggior parte degli studiosi sono d’accordo con la teoria di “rottura e riunione” ed attribuiscono solo una piccola percentuale di aberrazioni agli “scambi falliti”.

Scambi fra cromatidi fratelli

Gli scambi fra cromatidi fratelli (SCEs) rappresentano un fenomeno che si verifica ampiamente in natura (Chao et al., 1985; Escalza et al., 1989; Wei et al., 1993). Il significato biologico ed il meccanismo con cui si verifica ancora non è stato chiarito, ma numerosi studi hanno messo in evidenza che la formazione degli SCEs richiede il passaggio della cellula attraverso la fase di sintesi del DNA (Wolff et al., 1974). Infatti molti dati suggeriscono che il loro sito di formazione sia localizzato a livello della forca di replicazione (Kato, 1980; Cortés et al., 1993). Studi di Sonoda e collaboratori (1999) hanno messo in evidenza che vi è una relazione tra SCEs e ricombinazione omologa (HR). Infatti è proprio durante la formazione della forca di replicazione, quando i doppi filamenti omologhi si trovano vicini, che questo evento potrebbe prendere luogo con molta facilità (Morales-Ramirez et al., 1990). La ricombinazione omologa spontanea avviene, nelle cellule di mammifero, con un tasso di $10^{-6}/10^{-5}$ per ciclo cellulare, tra sequenze di DNA ripetute. Un comune substrato della HR è lungo circa 1-5 kb e corrisponde a circa 10 eventi di HR in ogni cellula per ciclo cellulare. Questo tasso di ricombinazione, molto probabilmente, dipende dalla posizione del genoma, dalla lunghezza delle sequenze ripetute e dalla distanza tra di esse (Helleday et al., 1998). Il numero di SCEs spontanei visualizzati con tecniche citogenetiche in cellule di mammifero è di circa 10 per cellula, quindi è ragionevole supporre che la maggior parte degli eventi di HR spontanea che prendono luogo in cellule di mammifero, siano SCEs poiché essi sono mediati attraverso la ricombinazione (Sonoda et al., 1999). Da un punto di vista citologico, quindi, gli SCEs risultano in una rottura a doppio filamento della molecola di DNA con conseguente ricongiungimento in siti omologhi di due cromatidi di uno stesso cromosoma. Da un punto di vista genetico, sono neutrali se vengono scambiate parti uguali dei cromatidi; se, invece, gli scambi avvengono in maniera disuguale, allora si possono verificare delezioni o inserzioni. Normalmente gli SCEs avvengono durante la mitosi o in cellule in divisione e quando il DNA cellulare è danneggiato da agenti genotossici il tasso di SCEs aumenta. Si pensa che gli SCEs siano un tentativo della cellula di fissare il danno causato dagli agenti genotossici e, quindi, più potente è l'agente e maggior sarà la frequenza della loro induzione. Tra gli agenti fisici e chimici che inducono SCEs

possiamo ricordare il trizio (Brewen e Peacock, 1969; Gibson e Prescott, 1972), la radiazione ultravioletta (Kato, 1973; Rommelaere et al., 1973; Wolff et al., 1974), gli agenti alchilanti (che a basse concentrazioni è stato visto indurre molti SCEs ma poche aberrazioni cromosomiche) (Kato, 1974; Latt, 1974; Perry e Evans, 1975; Solomon e Bobrow, 1975), ed altri agenti mutageni (Perry e Evans, 1975). Gli SCEs sono stati dimostrati per la prima volta da Taylor (1958) in studi autoradiografici di cromosomi marcati con trizio e consistevano di un cromatidio marcato ed uno non marcato. Negli anni successivi sono state sviluppate nuove tecniche di colorazione capaci di distinguere i cromatidi fratelli e, quindi, di osservare gli SCEs senza utilizzare l'autoradiografia. Queste tecniche dipendono dall'esposizione delle cellule agli analoghi della timidina, quali la 5-bromo-2-deossiuridina (BrdUrd), durante due cicli di replicazione del DNA. I cromosomi osservati dopo l'esposizione a questa sostanza, consisteranno di un cromatidio monosostituito ed un cromatidio bisostituito con BrdUrd. Alternativamente le cellule possono essere esposte agli analoghi solo per un ciclo di replicazione, seguito da un secondo ciclo in assenza di essi che porta sempre alla formazione di cromosomi con un cromatidio bisostituito ed uno monosostituito (Figura 17).

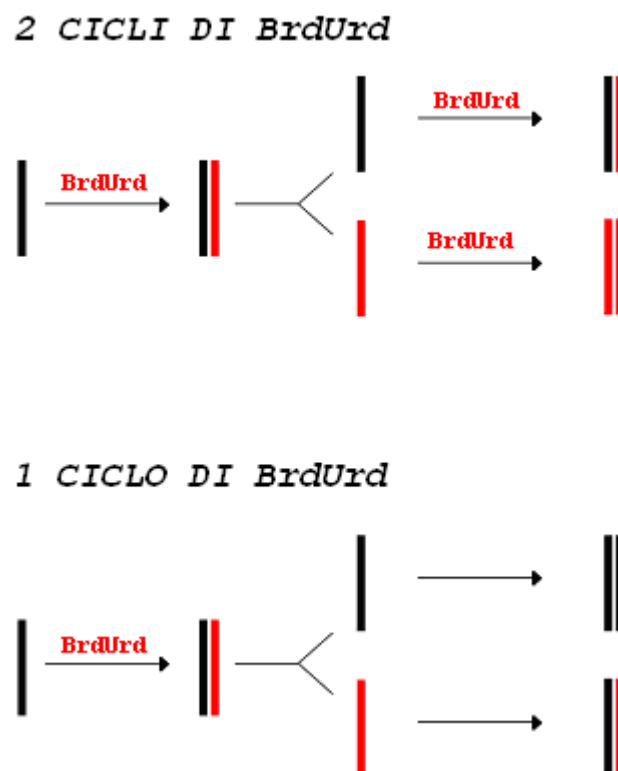


Fig. 17. Meccanismo di formazione degli SCEs

Tali cromatidi fratelli sostituiti vengono colorati in maniera differenziale con composti fluorescenti quali l'Hoechst 33258 (Latt, 1973) e arancio di acridina (Dutrillaux et al., 1974; Kato, 1974; Perry e Wolff, 1974) o con una combinazione di sostanze fluorescenti e Giemsa [tecnica **FPG (Fluorescent Plus Giemsa)**; Perry e Wolff, 1974; Wolff e Perry, 1974; Korenberg and Freedlender, 1974]. Grazie a questa tecnica, il potere di rilevamento citologico dello scambio è stato notevolmente migliorato rendendo la sua analisi molto più semplice. Tuttavia il trattamento delle colture cellulari con la BrdUrd, in questa tecnica, genera normalmente un leggero aumento del numero degli SCEs, sia spontanei che indotti, nella seconda divisione mitotica (Natarajan et al., 1983; Zwanenbug e Natarajan, 1984). Questo perché la BrdUrd ha la capacità di cambiare la struttura della cromatina in maniera tale da generare lesioni che inducono SCEs dopo la replicazione del DNA.

Il saggio degli SCEs permette di analizzare l'esposizione anche a basse dosi di sostanze chimiche rispetto alle aberrazioni cromosomiche ed ai micronuclei, due tests generalmente meno sensibili che richiedono l'esposizione ad elevate concentrazioni di mutageni/carcinogeni (Cattanach et al., 1968; Heddle, 1973; Lilly et al., 1975); inoltre negli SCEs si può ottenere un incremento della loro frequenza, statisticamente significativo, anche dopo l'analisi di sole 10 o 20 cellule, mentre i tests delle aberrazioni cromosomiche e dei micronuclei richiedono l'analisi di un gran numero di cellule; l'analisi degli SCEs è, oltretutto, molto semplice a differenza di quella delle aberrazioni cromosomiche che risulta più difficile e richiede un'elevata esperienza da parte dell'osservatore. L'induzione di SCEs si ottiene molto efficacemente in seguito al trattamento con agenti mutageni e cancerogeni, specialmente quelli che formano addotti covalenti col DNA o che sono in grado di interferire direttamente o indirettamente con la replicazione. Studi su cellule di mammifero hanno dimostrato che gli SCEs vengono indotti molto più efficacemente dagli agenti S-dipendenti (purché presenti prima o durante la fase S del ciclo cellulare), quali gli agenti alchilanti e la radiazione ultravioletta, rispetto agli agenti S-indipendenti, quali i raggi X, e la bleomicina (Kilman, 1975; Solomon e Bobrow, 1975). Per questi motivi gli SCEs sono considerati indicatori sensibili del danno cromosomico. Quindi grazie alla sua elevata sensibilità e alla facilità del procedimento, questo test è uno dei saggi

più comunemente utilizzati per valutare l'attività mutagenica di composti chimici ambientali mettendo in evidenza l'avvenuto danno al DNA.

Apoptosi

La morte cellulare si può verificare in due distinti meccanismi (Schwartzman e Cidlowski, 1993; Vermes e Haanan 1994) che sono la necrosi e l'apoptosi, i quali mostrano molteplici differenze sia da un punto di vista morfologico che biochimico (Figura 18):

La **necrosi** (intesa come morte "accidentale" della cellula) è un processo patologico che si verifica quando le cellule sono esposte ad un'ampia varietà di condizioni fisiologiche estreme (ad esempio ipossia o ipotermia) che possono portare a danni della membrana plasmatica ed ha inizio con una diminuzione della capacità delle cellule di mantenere l'omeostasi. Ciò implica un afflusso di acqua e ioni extracellulari negli organelli intracellulari (in particolare i mitocondri) e nella cellula intera che porta al loro rigonfiamento e rottura (lisi cellulare). Con la rottura della membrana plasmatica, il contenuto citoplasmatico, compresi gli enzimi lisosomiali, viene rilasciato nel lume extracellulare. La necrosi, in vivo, si manifesta come danno tissutale esteso e risulta in una intensa risposta infiammatoria.

- Caratteristiche morfologiche della necrosi:

- perdita dell'integrità di membrana;
- inizia con il rigonfiamento del citoplasma e dei mitocondri;
- finisce con la totale lisi della cellula;
- nessuna formazione di vescicole;
- disintegrazione degli organelli.

- Caratteristiche biochimiche della necrosi:

- perdita di regolazione dell'omeostasi;
- non richiede energia (processo passivo che avviene anche a 4°C);
- frammentazione del DNA post litica.

- Significato fisiologico della necrosi:

- influenza gruppi di cellule contigue;

- viene indotto da fattori non fisiologici (virus litici, ipotermia, ipossia, ischemia, veleni metabolici);
- fagocitosi mediata dai macrofagi;
- significativa risposta infiammatoria.

L'**apoptosi** (intesa come morte “programmata” o “naturale” della cellula) è un processo fisiologico attraverso cui le cellule indesiderate o inutili per l'organismo vengono eliminate durante lo sviluppo ed in altri processi biologici naturali. Al contrario della necrosi, questo evento, si verifica quando la cellula si trova in normali condizioni fisiologiche e partecipa attivamente alla propria morte (suicidio cellulare). Questo fenomeno si verifica spesso durante il normale turnover cellulare, durante i processi di omeostasi tissutale, durante l'embriogenesi, durante l'induzione ed il mantenimento della tolleranza immunitaria e durante lo sviluppo del sistema nervoso.

- Caratteristiche morfologiche dell'apoptosi:

- nessuna perdita di integrità della membrana plasmatica;
- aggregazione della cromatina alla membrana nucleare;
- inizia con la contrazione del citoplasma e la condensazione dei nuclei;
- finisce con la frammentazione delle cellule in piccoli corpi;
- formazione di vescicole circondate di membrana (corpi apoptotici);
- i mitocondri si gonfiano d'acqua per la formazione di pori ad opera di proteine che appartengono alla famiglia bcl-2.

- Caratteristiche biochimiche dell'apoptosi:

- è un processo finemente regolato dall'attivazione di più fasi enzimatiche;
- richiede energia sotto forma di ATP (è un processo attivo che non avviene a 4°C);
- frammentazione del DNA pre-litica;
- rilascio di vari fattori (ad esempio i citocromi C, il Fattore Inducente l'Apoptosi, AIF) dal mitocondrio al citoplasma;
- attivazione delle caspasi;
- alterazioni dell'asimmetria di membrana (ad esempio traslocazione delle fosfatidilserine dal citoplasma al lume extracellulare della membrana) .

- Significato fisiologico dell'apoptosi:

- influenza singole cellule;
- viene indotto da stimoli fisiologici (ad esempio dalla mancanza di fattori di crescita, da cambiamenti dell'ambiente ormonale);
- fagocitosi mediata dai macrofagi o da cellule adiacenti;
- nessuna risposta infiammatoria.

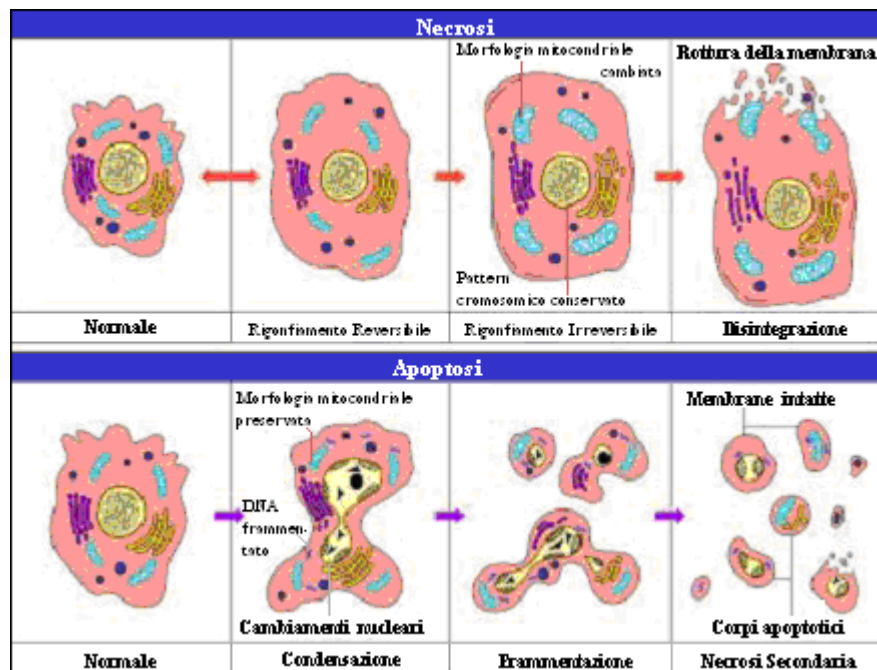


Fig. 18. Illustrazione delle caratteristiche morfologiche della necrosi e dell'apoptosi.

I geni implicati nel controllo della morte cellulare possono essere suddivisi in tre classi di proteine aventi funzionalità differenti:

1. Proteine “killer”, richieste per quelle cellule che vanno incontro ad apoptosi;
2. Proteine di “distruzione”, richieste per la digestione del DNA in cellule che stanno morendo;
3. Proteine di “inghiottimento”, richieste per la fagocitosi di cellule che stanno morendo mediata da cellule adiacenti ad esse.

Meccanismo Apoptotico

La maggior parte delle morti cellulari avviene attraverso il meccanismo apoptotico ed è per questo motivo che l'alterazione di tale processo risulta in un'ampia varietà di disordini maligni. L'apoptosi può essere indotta da due grandi vie di segnalazione separate che convergono in una cascata di esecuzione comune. Il segnalamento e l'esecuzione di tali vie avviene ad opera di specifiche proteasi denominate caspasi. La via intrinseca viene innescata da segnali interni quali un grosso danno al DNA, ad esempio, o dall'attivazione di oncogeni e genera una transitoria permeabilità della membrana mitocondriale che porta alla formazione di un complesso di proteine (detto apoptosoma) la cui funzione è quella di attivare le caspasi esecutrici. La fase decisiva della via intrinseca prende luogo a livello dei mitocondri ed i suoi più importanti regolatori appartengono alla famiglia BCL-2, di cui si conoscono 20 membri, alcuni dei quali pro-apoptotici, mentre altri sono anti-apoptotici. Affinché la via intrinseca prenda luogo si deve verificare l'inattivazione di BCL-2 o di altre proteine anti-apoptotiche quali BCL-X_L. Queste proteine, localizzate a livello della membrana mitocondriale, formano eterodimeri con altre proteine pro-apoptotiche, BAX o BAK, anch'essi facenti parte della famiglia BCL-2. L'attivazione di quest'ultime determina cambiamenti della struttura e funzione della membrana mitocondriale che prende il nome di "permeabilità transitoria della membrana mitocondriale" (MPT) e, durante questo processo, il mitocondrio rilascia alcune proteine quali i citocromi C e la proteina SMAC/Diablo. Viene rilasciata anche una flavoproteina della matrice mitocondriale, il fattore inducente l'apoptosi (AIF, "apoptosis inducing factor") che ha la funzione di attivare le caspasi. Nel citoplasma, 8 molecole di citocromo C si legano ad un uguale numero di proteine APAF1 ("apoptotic peptidase activating factor 1", fattore attivante le peptidasi apoptotiche) a formare "l'apoptosoma", la cui funzione è quella di legare un certo numero di pro-proteasi, la pro-caspasi 9 e di aiutare la loro attivazione autocatalitica in un processo ATP-dipendente. La via estrinseca viene innescata da segnali esterni ed è iniziata da recettori di membrana, denominati "recettori di morte" che appartengono alla super famiglia di geni definiti fattori di necrosi tumorale (TNF). Quelli maggiormente caratterizzati sono rappresentati da CD95 (o Fas), TNFR1 (TNF receptor-1) ed i recettori TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand),

DR4 e DR5. Questi recettori vengono attivati da specifici ligandi, citochine, e da proteine di superficie delle cellule immunitarie citotossiche. I “domini di morte” intracellulari dei recettori attivati si associano col ligando FADD (“Fas-associated death domain”, dominio della morte associato a Fas), una proteina “adattatrice” la quale si unisce al recettore per mezzo della presenza di domini effettori della morte (DED, death effector domain). Attraverso il legame al recettore della morte, questi domini vengono esposti e legano una pro-caspasi iniziatrice, detta pro-caspasi 8 (conosciuta anche come FLICE) o la pro-caspasi 10. Questo complesso, spesso, denominato DISC (“death inducing signaling complex”, complesso che segnala l’induzione della morte), ha la funzione di collocare distinte caspasi iniziatrici in azione. Questi eventi danno inizio ad una cascata di esecuzione con o senza il supporto della controparte intrinseca della via apoptotica. Altre proteine importanti sono rappresentate dalla proteina FLIP (“FLICE-inhibitory protein”, proteina inibitrice di FLICE) che blocca la via estrinseca inibendo la dimerizzazione delle caspasi iniziatrici e dalle proteine IAPs (“inhibitor of apoptosis protein”, proteina inibitrice dell’apoptosi) che agiscono a livello dell’apoptosoma inibendo le caspasi. Antagonista delle IAPs è il complesso SMAC/Diablo che si libera durante la transitoria permeabilità della membrana mitocondriale.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA

I bassi livelli di danno al DNA nell'uomo non possono essere equiparati al rischio di insorgenza di cancro e, quindi, spesso sono richieste conoscenze di base di quei meccanismi implicati nella loro generazione e riparazione, oltre che dell'utilizzo, nell'epidemiologia molecolare, di bioindicatori di genotossicità o biomarcatori di esposizione. Questo tipo di informazioni si possono ottenere attraverso studi condotti su linee cellulari umane in coltura o in animali da esperimento. Il lavoro da me svolto in questi tre anni di dottorato entra a far parte di un progetto europeo definito DIEPHY (Dietary Exposures to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and DNA Damage) i cui obiettivi sono stati quelli di:

- sviluppare tecniche sempre più sensibili per la determinazione di vari tipi di danno al DNA, inclusi anche gli effetti citogenetici;
- ottenere nuove informazioni circa il meccanismo di formazione e riparazione degli addotti generati dagli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e la loro relazione al danno ossidativo e all'apoptosi;
- condurre studi sui roditori selezionando specifici agenti protettivi e fornendo, così, le basi per futuri approfondimenti nell'uomo.

Nello specifico, l'obiettivo principale dei miei studi in questi tre anni di dottorato, è stato quello di saggiare gli effetti citogenetici di due composti, appartenenti alla classe degli idrocarburi policiclici aromatici, che sono: il Benzo[a]Pirene ed il Dibenzo[a,l]Pirene, in linee cellulari di ovario di hamster Cinese difettive nella riparazione. A tal proposito sono state utilizzate tecniche citogenetiche quali l'analisi delle aberrazioni cromosomiche e gli scambi fra cromatidi fratelli (SCEs). Questi studi hanno fornito risultati essenziali all'approfondimento di quale meccanismo di riparazione sia implicato realmente nella riparazione delle lesioni indotte da questi due composti in esame e potrebbero essere cruciali nell'interpretazione di quelli che si otterranno sull'uomo.

INTRODUZIONE

Molti carcinogeni e/o mutageni chimici (come gli idrocarburi policiclici aromatici o IPA) non sono attivi di per sé, ma richiedono l'attivazione metabolica attraverso gli enzimi tissutali per formare intermedi altamente reattivi in grado di esibire i loro effetti biologici (Miller et al., 1977; Wright, 1980). A causa delle loro limitate capacità metaboliche, la maggior parte delle cellule utilizzate nei tests a breve termine *in vitro*, non sono, però, in grado di attivare direttamente i procarcinogeni e/o i promutageni. Questo perché la maggior parte degli enzimi responsabili di tale metabolismo si ritrovano prevalentemente nel fegato rispetto ad altri tessuti.

Le principali lesioni indotte dagli idrocarburi policiclici aromatici sono rappresentate dagli addotti alle basi del DNA, la cui presenza porta alla formazione di accoppiamenti errati che, alla replicazione successiva, si convertiranno in mutazioni del tipo trasversioni e/o transizioni. La presenza di questi addotti nei tessuti tumorali ed il rilevamento di mutazioni in geni che sono rilevanti nei processi di cancerogenesi, formano un quadro complessivo di convincente associazione tra esposizione a cancerogeni ambientali, danno al DNA e formazione di tumori. La cellula, per garantire l'integrità genomica, ha elaborato, nel corso dell'evoluzione, un complesso sistema enzimatico di riparazione in grado di riconoscere ed eliminare differenti tipi di lesioni. I principali meccanismi di riparazione sono rappresentati dal Base Excision Repair (BER) ed dal Nucleotide Excision Repair (NER), essenziali nella riparazione di basi inappropriate o danneggiate. In particolare il *BER* è importante nella riparazione dei danni indotti dalle radiazioni ionizzanti e dagli agenti alchilanti, mentre il *NER* riconosce addotti voluminosi nel DNA, come il ciclobutano del dimero di pirimidina (CPD) e il 6-4PP, indotti dalla radiazione UV e si suddivide in due sottovie, di cui una meno specifica e più lenta, che ripara il danno sull'intero genoma, detta *Global Genome Repair (GGR)*, e l'altra più specifica, in quanto ripara il danno sul filamento trascritto dei geni attivi, detta *Transcription Coupled Repair (TCR)*.

Il MisMatch Repair (MMR), essenziale nella correzione di basi non correttamente appaiate durante la replicazione, la ricombinazione genetica o come risultato di un danno al DNA.

La Riparazione per Ricombinazione, essenziale per riparare le rotture a doppio filamento (DSBs) che si possono formare endogenamente, durante la replicazione e la meiosi, oppure attraverso agenti esogeni, quali la radiazione ionizzante. Esse rappresentano la forma più distruttiva di danno al DNA e, se non riparate, possono portare a perdita di informazione genetica e morte cellulare (Olive, 1998), mentre se mal riparate possono portare a carcinogenesi in maniera diretta oppure attraverso traslocazioni, inversioni o delezioni (Morgan et al., 1998). Si conoscono due sistemi di riparazione delle DSBs:

- la Ricombinazione Omologa (HR) ed
- il Non Homologous End-Joining (NHEJ).

Purtroppo, però, ancora oggi poco si conosce circa i meccanismi di riparazione implicati nella rimozione degli addotti al DNA provocati dagli IPA e della loro correlazione con i fenomeni cancerogenici. Al fine, quindi, di dissezionare i differenti meccanismi di riparazione implicati nella rimozione delle lesioni indotte da questi composti, in particolare quelle derivanti dal metabolismo del Benzo[a]Pirene (B[a]P) come il 7,8-diidrossi-9,10-epossi-7,8,9,10-tetraidrobenzo[a]pirene (BPDE) e del Dibenzo[a,l]Pirene (DB[a,l]P) come l'11,12-diidrossi-13,14-epossi-11,12,13,14-tetraidrodibenzo[a,l]pirene (DBPDE), in questa tesi di dottorato sono stati effettuati studi di citogenetica classica che ci hanno consentito di studiare l'instabilità cromosomica attraverso l'analisi di aberrazioni cromosomiche e scambi tra cromatidi fratelli (SCEs) su diverse linee cellulari di ovario di hamster Cinese (CHO), tutte derivanti da un'unica linea parentale (AA8) e ciascuna difettosa per una delle diverse vie di riparazione sopra elencate.

L'elenco delle linee cellulari da noi utilizzate può essere così riassunto:

AA8: è la linea parentale da cui derivano tutte le altre linee.

UV4: che esibisce una mutazione frame-shift nel gene ERCC1, il cui prodotto, insieme con l'endonucleasi XPF, è implicato nell'incisione della lesione al DNA, durante il NER (Thompson, 1991).

UV5: che esibisce un difetto nel gene XPD, il cui prodotto è un'elicasi facente parte del complesso TFIIH, attivo, anch'esso, nel NER .

V3-3: che esibisce un difetto nel gene XRCC7; questa linea cellulare manca della subunità catalitica della DNA-PK funzionale ed è, di conseguenza, difettiva nel NHEJ.

Irs1SF: che esibisce un difetto nel gene XRCC3, il cui prodotto è una proteina correlata alla famiglia di Rad51, importante nella HR.

EM9: che esibisce un difetto nel gene XRCC1, il cui prodotto interagisce con la DNA ligasi III ed altri fattori implicati nel BER; è, quindi, difettiva in questa via di riparazione (Caldecott, 2003).

UV61: che esibisce un difetto nel gene CSA, il cui prodotto, assieme a quello di un altro gene, CSB, è fondamentale al corretto funzionamento del TCR. Si pensa che esse aiutano il reclutamento delle proteine TFIIH, RPA e XPA al sito danneggiato ed aiutano anche a spostare la RNA polimerasi in maniera sufficiente da permettere alle tre proteine di accedere al sito danneggiato.

Le linee cellulari UV4 e UV5 sono molto sensibili a sostanze che inducono la formazione di addotti al DNA quali, a esempio, il B[a]P (Gelboin, 1980; Yang et al., 1980) ed, inoltre, le UV4 sono sensibili anche ad agenti che inducono cross-links, quali la mitomicina C (MMC) e sostanze simili (Thompson, 1991; Hoy et al., 1985).

Per quanto riguarda la linea cellulare irs1SF, è stato dimostrato che è sensibile alla radiazione ionizzante, ed è caratterizzata da una instabilità cromosomica spontanea piuttosto elevata (Cheong et al., 1992; Fuller et al., 1988; Jones et al., 1990; Thacker e Ganesh, 1990), mentre le linee cellulari difettive nel NHEJ, quali V3-3, mostrano una ipersensibilità alla radiazione ionizzante e, a differenza delle linee cellulari difettive nella HR, anche ad agenti che formano legami crociati DNA-proteine, i così detti “cross-linking” (Caldecott e Jeggo, 1991).

La linea cellulare EM9 mostra un’elevata frequenza di SCEs ed un’ipersensibilità verso la 5-bromo-2-deossiridina (BrdUrd), un analogo di base della timina. Inoltre, risulta essere sensibile ad agenti alchilanti, (Thompson et al., 1982) ed a composti ossidanti quali il perossido di idrogeno, i raggi X, ecc...(Barrows et al., 1991; Thompson et al., 1983; Thompson, 1991; Yu et al., 1999). Alcuni studi indicano che nella formazione degli SCEs siano implicati molteplici geni, i quali si sono conservati durante l’evoluzione. Per mantenere bassa o normale la frequenza di SCEs, si deve avere un funzionamento coordinato di un certo numero di tali geni e, di conseguenza, se uno di essi è difettivo, porterà ad un aumento costitutivo di tale frequenza. E’ probabile che l’aumento di SCEs nella linea EM9, rifletta proprio una risposta aberrante di queste cellule alla proliferazione in un mezzo contenente la BrdUrd.

La linea cellulare UV61, a causa della mancanza della proteina CSB, risulta sensibile alla radiazione ultravioletta (UV) e agli agenti ossidativi, anche se alcuni studi hanno dimostrato che la sensibilità di questa linea cellulare ai raggi UV è minore rispetto ad altre linee che sono completamente difettive nel NER (Thompson et al., 1988).

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e condizioni di crescita:

Negli esperimenti di questa tesi di dottorato sono state utilizzate sette linee cellulari di ovario di hamster Cinese (CHO) delle quali sei difettive in una delle vie di riparazione del DNA (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3) ed una parentale (AA8) da cui tutte le altre derivano. Queste sono state coltivate in terreni MEM (AA8 e V3-3), Ham's F10 (UV61 EM9) e DMEM (UV4, UV5, irs1SF) supplementati con il 10% di siero fetale bovino ed antibiotici, ad una temperatura di 37°C, in un'atmosfera satura di umidità al 5% di CO₂. Le CHO presentano un cariotipo aneuploide stabile con un numero modale di 21 cromosomi ed un ciclo cellulare di circa 12 h.

Reagenti:

Le linee cellulari sono state trattate con i seguenti reagenti:

1. **colchicina** (soluzione stock 10 µg/ml), utilizzata alla dose finale di 0,2 µg/ml;
2. **5-bromo-2-deossiuridina** (soluzione stock 300 µg/ml), impiegata alla dose finale di 3µg/ml;
3. **7,8-diidrossi-9,10-epossi-7,8,9,10-tetraidrobenzo[a]pirene (BPDE)** (soluzione stock 50 µM, disciolta in DMSO), usato a differenti dosi finali a seconda delle esigenze sperimentali: 0,8 µM, 1,6 µM e 3,2 µM;
4. **11,12-diidrossi-13,14-epossi-11,12,13,14-tetraidrodibenzo[a,l]pirene (DBPDE)** (soluzione stock 1µM in DMSO) utilizzato, anch'esso, a differenti dosi a seconda delle condizioni sperimentali: 0,0025 µM, 0,005 µM e 0,0075 µM.

Trattamento delle colture cellulari:

Quando dopo una serie di cicli replicativi le cellule hanno raggiunto la confluenza, le colture cellulari vengono mantenute ed espanse attraverso l'utilizzo di un enzima proteolitico pancreatico (detto tripsina), la cui funzione è quella di distaccare il monostrato cellulare dal fondo della fiasca; a questo punto le cellule vengono diluite in terreno e contate utilizzando la camera di Burkner, allo scopo di prelevare dalla sospensione cellulare la giusta quantità di cellule per una nuova coltura. Negli esperimenti oggetto di questa tesi, per ogni punto sperimentale, sono state seminate 500000 cellule in 5 ml di terreno completo in fiasche da 25 cm², tra le 12 e le 24 h prima del trattamento con l'agente mutageno e secondo il protocollo sperimentale utilizzato.

Per l'analisi della frequenza degli scambi tra cromatidi fratelli (SCEs) in presenza di BrdUrd per due cicli cellulari, le colture sono state trattate contemporaneamente con BrdUrd, alla concentrazione di 3 µg/ml, e con differenti dosi di BPDE (0.8 µM, 1.6 µM e 3.2 µM) e di DBPDE (0,0025 µM, 0,005 µM e 0,0075 µM) e fissate a diversi tempi in base alla durata del loro ciclo cellulare (24h per le AA8, UV5 e le UV61; 30h per le EM-9, UV4 e le V3-3; 36h per le irs1SF), dopo di che la BrdUrd è stata rimossa semplicemente con un cambio di terreno. Tre ore prima del fissaggio le cellule sono state trattate con colchicina, una sostanza che blocca le cellule in metafase (Figura 19).

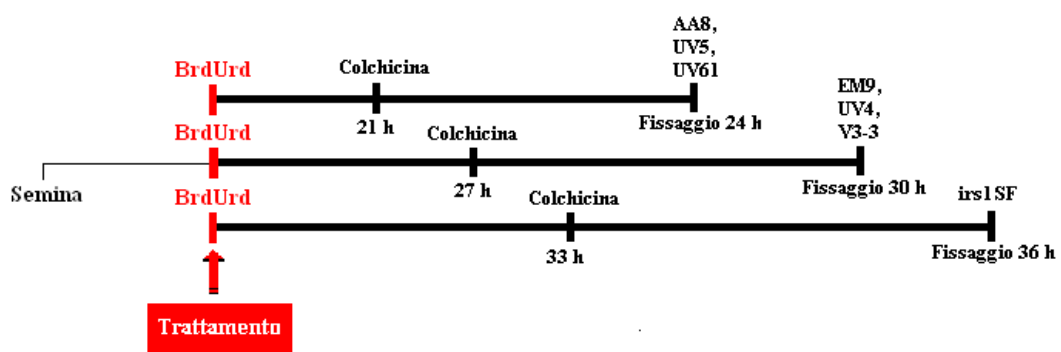


Fig. 19. Protocollo classico per l'analisi degli SCEs

Per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche e degli SCEs, è stato utilizzato, invece, un protocollo unico dove cellule asincrone sono state fatte crescere per circa un ciclo cellulare in presenza di BrdUrd prima del trattamento con il composto da noi utilizzato, poi sono state trattate con differenti dosi di BPDE (0.8 μ M, 1.6 μ M e 3.2 μ M) e di DBPDE (0,0025 μ M, 0,005 μ M e 0,0075 μ M) ed è stata aggiunta la colchicina tre ore prima il fissaggio che è stato effettuato a diversi tempi in base alla durata del loro ciclo cellulare (24h per le AA8, UV5 e le UV61; 30h per le EM-9, UV4 e le V3-3; 36h per le irs1SF) (Figura 20).

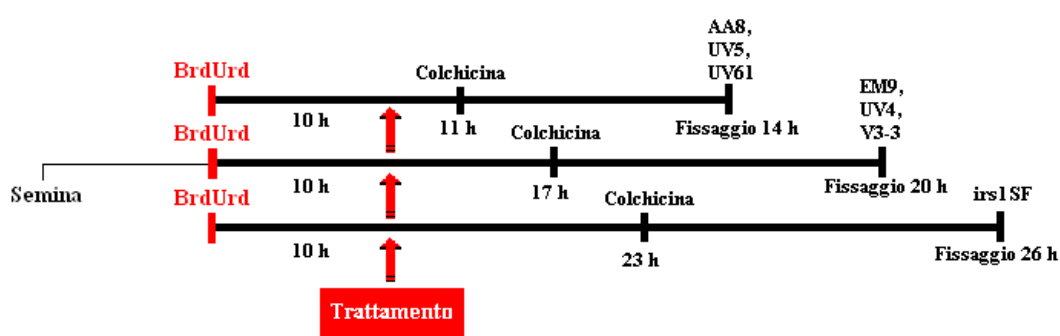


Fig. 20. Protocollo sperimentale per l'analisi contemporanea di aberrazioni cromosomiche ed SCEs

Fissaggio ed allestimento dei preparati:

Dopo aver aspirato il terreno all'interno delle bottiglie (il quale viene conservato all'interno di tubi conici da centrifuga) ed aver staccato il monostrato cellulare dalla fiasca di coltura per tripsinizzazione (aggiungendo 0,5 ml di tripsina nelle fiasche e ponendole per 5 minuti nell'incubatore), le cellule vengono risospese nel terreno conservato nelle provette coniche e centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti. A questo punto si aspira il sopranatante, si risospende il "pellet" cellulare e si aggiungono 5 ml di una soluzione ipotonica (tricitrato di sodio all'1%), goccia a goccia tenendo la provetta in agitazione e lasciando, poi, i tubi in bagnomaria a 37°C per 5 minuti. Poi si effettuano 3 lavaggi in fissativo fresco composto da metanolo ed acido acetico nel rapporto 3:1. Questo passaggio si esegue centrifugando la sospensione cellulare a 1200 rpm per 5 minuti, si aspira il sopranatante, si risospende il "pellet" e si aggiungono 5 ml di fissativo fresco.

Dopo il passaggio in fissativo, i tubi vengono conservati in frigorifero a 4° C per una notte. Il mattino seguente, di nuovo, i tubi vengono centrifugati, si aspira il sopranatante, si risospende e diluisce il “pellet” in fissativo fresco fino ad ottenere l'adeguata concentrazione cellulare. A questo punto la sospensione è pronta per essere seminata: alcune gocce del preparato vengono fatte cadere in maniera uniforme sui vetrini porta oggetto, precedentemente sgrassati e conservati in acqua a 4° C, per favorire l'apertura delle metafasi.

Colorazione dei vetrini:

E' stata utilizzata la colorazione differenziale dei cromatidi fratelli detta **Fluorocromo Più Giemsa (FPG)**, usata per la prima volta da Perry e Wolff (1974). Questa tecnica si basa sulla capacità della BrdUrd di ridurre la fluorescenza del fluorocromo Hoechst 33258 ottenendo, quindi, quella dei cromatidi privi di BrdUrd e l'opacità i quelli che l'hanno incorporata. E' consigliabile far invecchiare i vetrini per almeno 2 o 3 giorni prima della colorazione per poi procedere come segue:

- i vetrini vengono immersi orizzontalmente in apposite vaschette per 25 minuti in una soluzione acquosa al 2% di Hoechst 33258;
- poi vengono posti, sempre in posizione orizzontale, in 100 ml di acqua di fonte per 30 minuti ed ad una distanza di 15-20 cm da una lampada solare Osram (300W);
- a questo punto vengono colorati con una soluzione acquosa al 3% di Giemsa per 6/7 minuti, ponendoli in posizione verticale;
- poi vengono effettuati due lavaggi veloci in acqua di fonte ed i vetrini vengono lasciati asciugare all'aria per poi essere montati, dopo un passaggio in xilolo, con un vetrino coprioggetto in Eukitt.

Analisi della Morfologia Apoptotica:

Le diverse linee cellulari sono state trattate alla dose di 3,2 µM di BPDE e 0,0075 µM di DBPDE per determinare la risposta apoptotica spontanea ed indotta da

queste due sostanze. Al fine di identificare e discriminare le cellule apoptotiche e necrotiche dalle cellule vive, è stata utilizzata una combinazione di coloranti fluorescenti quali, la fluoresceina di acetato (FDA, che colora il citoplasma; 5 µg/ml), lo ioduro di propidio (PI; 0,5 µg/ml) e il colorante Hoechst (HO, che colora il nucleo di cellule vive; 1 µg/ml). Questa analisi è stata condotta al microscopio fluorescente su 500 cellule, scelte casualmente, 24h dopo il trattamento.

Analisi al microscopio:

I vetrini seminati e fissati sono stati analizzati al microscopio ottico con obiettivo 100x ad immersione. Per ogni punto sperimentale sono state analizzate 50 metafasi, al fine di calcolare la frequenza degli scambi tra cromatidi fratelli (SCEs) e 100 metafasi per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche.

Analisi statistica:

La significatività statistica tra le diverse frequenze di SCEs nei due trattamenti, in uno stesso esperimento, è stata calcolata con il **t-test di Student**.

RISULTATI

Trattamento con il BPDE:

Aberrazioni cromosomiche:

La frequenza spontanea delle aberrazioni cromosomiche varia tra le diverse linee cellulari. Infatti le linee difettive nella riparazione mostrano una frequenza più elevata se comparata con quella della linea parentale (AA8): mentre le AA8 hanno una media di aberrazioni pari a 1,5 su 100 cellule analizzate, le linee cellulari difettive nella riparazione V3-3, UV61, UV5, UV4, EM9 e irs1SF mostrano, rispettivamente, una media pari a 4.0, 4.0, 7.5, 8.0, 36 e 76 aberrazioni su 100 cellule osservate. Le linee difettive nel BER (EM9) e nella ricombinazione omologa (irs1SF) esibiscono una frequenza spontanea di aberrazioni molto più elevata rispetto le altre (Grafico 1).

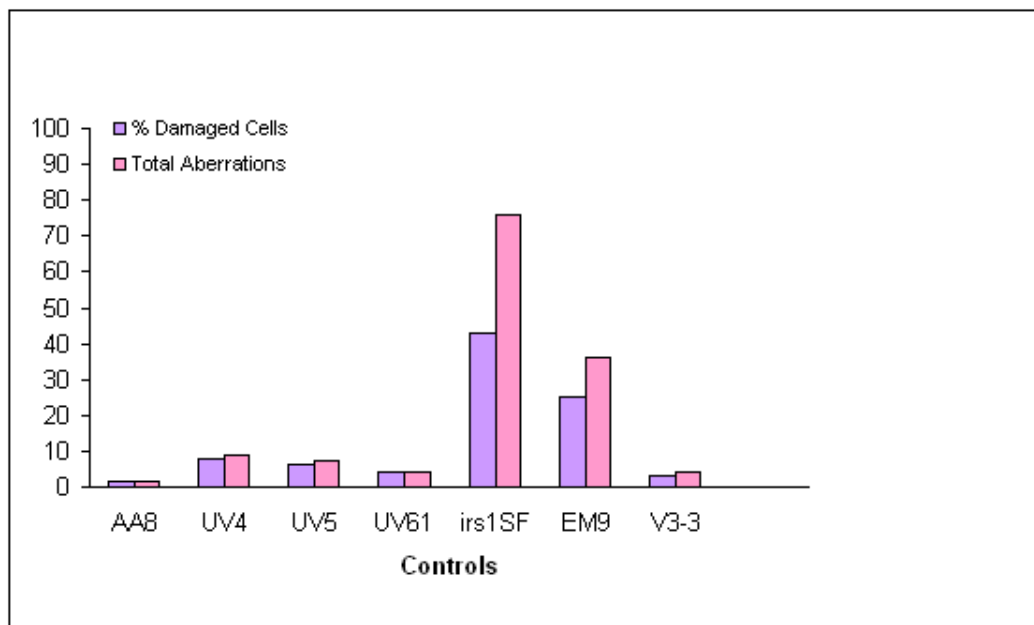


Grafico 1. Percentuale di cellule danneggiate e aberrazioni totali spontanee nella linea cellulare parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3).

In seguito al trattamento col BPDE (Tabella 1), in tutte le linee cellulari difettive nella riparazione, sono state riscontrate sia rotture che scambi cromatidici. Infatti, il BPDE, generalmente, dà origine ad aberrazioni quali: rotture (B'), rotture isocromatidiche (B'') e differenti tipi di scambi cromatidici. Al fine di poter comparare, in termini di induzione di aberrazioni cromosomiche, le diverse linee cellulari usate nel nostro studio, le frequenze di aberrazioni cromosomiche spontanee di ciascuna linea sono state sottratte alle rispettive frequenze di aberrazioni indotte a tutte le dosi utilizzate. Inoltre, per stabilire l'ordine di sensibilità delle varie linee cellulari all'induzione delle aberrazioni cromosomiche indotte dal BPDE, il valore medio di induzione delle stesse a tutte e tre le dosi utilizzate è stato introdotto nella formula, qui di seguito riportata, del fattore di sensibilità (F_{ab}) calcolato come il rapporto tra l'aumento delle aberrazioni indotte nella linea difettiva sull'aumento delle stesse nella linea parentale:

$$F_{ab} = \frac{\text{Frequenza Ab. X linea cellulare (BPDE)} - \text{Frequenza Ab. X linea cellulare (K)}}{\text{Frequenza Ab. AA8 (BPDE)} - \text{Frequenza Ab. AA8 (K)}}$$

L'ordine di sensibilità risultante nelle diverse linee cellulari per ciò che riguarda le aberrazioni cromosomiche indotte dal BPDE è: UV4, *irs1SF*, UV5, UV61, EM9, V3-3 e AA8 in ordine decrescente.

I grafici 2 e 3 mostrano che sia le linee cellulari difettive nella riparazione per escissione di nucleotidi (UV4 e UV5) sia quella difettiva nella riparazione accoppiata alla trascrizione (UV61) e sia quella difettiva nella riparazione per ricombinazione omologa (*irs1SF*) risultano essere più sensibili rispetto alle altre, indicando che il NER e l'HRR sono importanti vie di rimozione delle lesioni indotte dal BPDE portanti alla formazione di aberrazioni cromosomiche.

Cell Line	Normal Cells	Damaged Cells	se(yEr±) % Damaged Cells	B'	B''	Chromatid Exchanges	Frequency of Aberrations	se(yEr±) Total Aberrations	Induced Aberrations	F _{ab}
AA8 K	197	3	0,01114	0,5	1	0	1,5	0,00862		
AA8 0,8 uM	191	9	0,02022	2	1	1,5	4,5	0,0147	3	1
AA8 1,6 uM	185	15	0,02599	4	1	2,5	7,5	0,01867	6 *	
AA8 3,2 uM	177	23	0,03167	4	3,5	6	14	0,02926	12,5 *	
UV4 K	92	8	0,02727	4	3	2	8	0,02727		
UV4 0,8 uM	78	22	0,04163	18	3	8	29	0,05911	21 *	6,88
UV4 1,6 uM	68	32	0,04688	19	9	10	38	0,05993	30 *	
UV4 3,2 uM	46	54	0,05009	24	14	66	105	0,1321	97 *	
UV5 K	187	13	0,02426	5	1	1,5	7,5	0,02282		
UV5 0,8 uM	170	30	0,03589	8	3	6,5	17,5	0,03125	10 *	2,48
UV5 1,6 uM	175	25	0,03286	5,5	2,5	7,5	15,5	0,03178	8 *	
UV5 3,2 uM	72	28	0,03487	14	2	27	43	0,07818	35,5 *	
UV61 K	96	4	0,01969	4	0	0	4	0,01969		
UV61 0,8 uM	92	8	0,02727	1	0	8	9	0,03208	5	2,27
UV61 1,6 uM	83	17	0,03775	3	4	14	21	0,04984	17 *	
UV61 3,2 uM	76	24	0,04292	11	2	18	31	0,0662	27 *	
irs1SF K	57	43	0,01714	31	3	42	76	0,10929		
irs1SF 0,8 uM	34	66	0,01969	35	12	55	102	0,09742	26	4,97
irs1SF 1,6 uM	25	75	0,02904	38	10	78	126	0,09059	50 *	
irs1SF 3,2 uM	33	67	0,03487	25	8	74	107	0,10176	31	
EM9 K	75	25	0,04352	11	1	24	36	0,07038		
EM9 0,8 uM	67	33	0,04726	10	5	34	49	0,09692	13	1,58
EM9 1,6 uM	64	36	0,04824	9	10	38	57	0,09975	21	
EM9 3,2 uM	76	24	0,04292	6	4	26	36	0,07591	0	
V3-3 K	194	6	0,04976	1	0	3	4	0,01713		
V3-3 0,8 uM	182	8	0,04726	3,5	2,5	4,5	10,5	0,03844	6,5	1,47
V3-3 1,6 uM	181	19	0,04352	2	1	8	11	0,02535	7 *	
V3-3 3,2 uM	171	29	0,04726	5,5	0	15,5	22	0,04346	18 *	

Tabella 1. Frequenza delle aberrazioni cromosomiche (su 100 cellule) dopo trattamento con differenti dosi di BPDE in linee cellulari di tipo selvatico (AA8) e difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * p<0,01 Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea); Fab: Fattore di sensibilità.

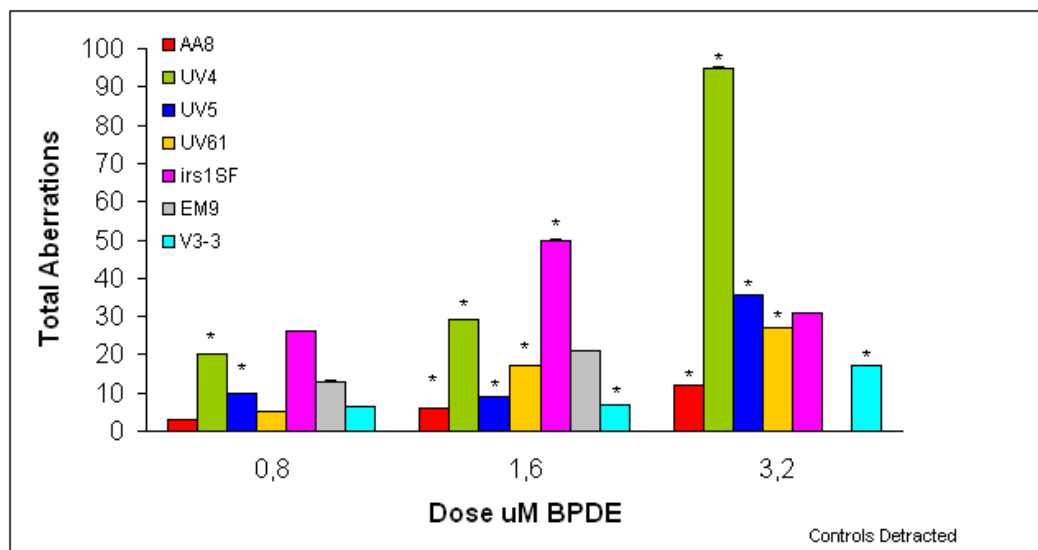


Grafico 2. Aberrazioni cromosomiche totali dopo trattamento con differenti dosi (0,8 μM , 1,6 μM e 3,2 μM) di BPDE. * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

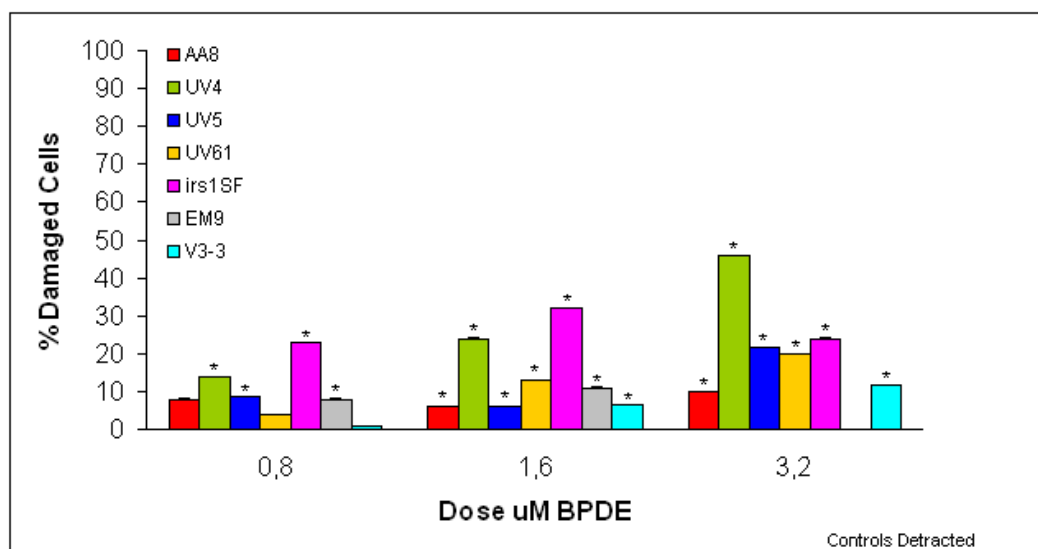


Grafico 3. Percentuale di cellule danneggiate dopo trattamento con differenti dosi (0,8 μM , 1,6 μM e 3,2 μM) di BPDE. * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

Scambi fra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchanges, SCEs):

Le frequenze degli SCEs osservate nelle diverse linee cellulari a seguito del trattamento con BPDE per un ciclo e per due cicli cellulari, in presenza di BrdUrd, sono rappresentate nelle Tabelle 2 e 3.

Tabella 2. Frequenza degli SCEs (per cellula) dopo trattamento con BPDE per un solo ciclo in presenza di BrdUrd in cellule di tipo selvatico (AA8) e difettose nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * $p < 0,01$ Student t-test; IP: Indice di Proliferazione; F_{SCE} : Fattore di sensibilità.

Cell Line	Mean SCEs	se(yEr±)	Induced SCEs	IP		FSCE
				M1	M2	
AA8 K	4,52	0,32721		4	96	1
AA8 0,8 uM	7,2	0,69282	2,68 *	11	89	
AA8 1,6 uM	8,72	0,62322	4,2 *	8	92	
AA8 3,2 uM	11,4	1,03923	6,88 *	8	92	
UV4 K	6,4	0,49666		3	99	2,2
UV4 0,8 uM	14,8	0,98995	8,4 *	3	97	
UV4 1,6 uM	17,88	1,28623	11,48 *	37	64	
UV4 3,2 uM	17,2	1,16333	10,8 *	47	53	
UV5 K	6,24	0,73774		7	93	3,47
UV5 0,8 uM	16,32	1,0766	10,08 *	26	74	
UV5 1,6 uM	17,4	0,96609	11,16 *	33	67	
UV5 3,2 uM	32,92	2,33732	26,68 *	27	73	
UV61 K	6,72	0,46289		8	92	0,9
UV61 0,8 uM	9,38	0,82478	2,66	13	87	
UV61 1,6 uM	10,98	0,83491	4,26 *	35	65	
UV61 3,2 uM	12,32	0,98352	5,6 *	40	60	
irs1SF K	5,56	0,45122		0	100	0,15
irs1SF 0,8uM	5,56	0,28331	0	3	97	
irs1SF 1,6 uM	7,6	0,53541	2,04 *	10	90	
irs1SF 3,2 uM	5,4	0,27689	0	4	96	
EM9 K	69,36	2,15516		12	88	0,82
EM9 0,8 uM	71,96	2,26382	2,6	29	71	
EM9 1,6 uM	73,08	2,04437	3,72	24	76	
EM9 3,2 uM	74,4	2,05019	5,04	33	67	
V3-3 K	5,6	0,45826		12	88	1,78
V3-3 0,8 uM	11,04	1,17258	5,44 *	31	69	
V3-3 1,6 uM	13,96	1,11277	8,36 *	53	47	
V3-3 3,2 uM	16,32	1,40205	10,72 *	49	51	

Tabella 3. Frequenza degli SCEs (per cellula) dopo trattamento con BPDE per due cicli in presenza di BrdUrd in cellule di tipo selvatico (AA8) e difettose nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * p<0,01 Student t-test; IP: Indice di Proliferazione; FSCE: Fattore di sensibilità.

Cell Line	Mean SCEs	se(yEr±)	Induced SCEs	IP		FsCE
				M1	M2	
AA8 K	5,48	0,42079		0	100	1
AA8 0,8 uM	16	1,07083	10,52 *	1	100	
AA8 1,6 uM	19,12	1,40157	13,64 *	2	98	
AA8 3,2 uM	19,6	1,47648	14,12 *	2	98	
UV4 K	6,04	0,48813		2	98	0,71
UV4 0,8 uM	11,28	0,84955	5,24 *	16	84	
UV4 1,6 uM	16,16	1,15856	10,12 *	27	73	
UV4 3,2 uM	17,8	1,41421	11,76 *	61	39	
UV5 K	6,4	0,58023		2	98	0,74
UV5 0,8 uM	10,2	0,70711	3,8 *	17	85	
UV5 1,6 uM	20,92	1,95356	14,52 *	57	43	
UV5 3,2 uM	16,4	1,05198	10 *	85	15	
UV61 K	5,76	0,46289		8	92	0,63
UV61 0,8 uM	12,56	0,91848	6,8 *	10	90	
UV61 1,6 uM	12,24	0,78588	6,48 *	26	74	
UV61 3,2 uM	16,8	1,13725	11,04 *	46	54	
irs1SF K	9,32	0,69455		72	28	0
irs1SF 0,8 uM	7,6	0,7461	0	66	34	
irs1SF 1,6 uM	8,04	0,9755	0	74	26	
irs1SF 3,2 uM	0	0	0	92	8	
EM9 K	73,84	2,70227		12	88	0,073
EM9 0,8 uM	67,84	3,24432	0	10	90	
EM9 1,6 uM	76,64	3,27815	2,8	8	92	
EM9 3,2 uM	70,08	2,95799	0	5	95	
V3-3 K	8,48	0,82688		10	90	0,47
V3-3 0,8 uM	11,52	0,84285	3,04	7	93	
V3-3 1,6 uM	11,8	1,10303	3,32	9	91	
V3-3 3,2 uM	20,28	2,63472	11,8 *	8	92	

Nel protocollo con un solo ciclo cellulare in presenza di BrdUrd, la frequenza spontanea di SCEs nella linea parentale (AA8) è di 4.52 per cellula e tutte le linee cellulari difettive nella riparazione, ad eccezione delle EM9, hanno mostrato solo un lieve incremento di SCEs spontanei (da 5,6 a 6,7 per cellula) se comparate ad essa. Nel protocollo sperimentale in cui le cellule sono state cresciute per due cicli cellulari in presenza di BrdUrd, la frequenza spontanea di SCEs è risultata più elevata nelle linee cellulari V3-3 e irs1SF (50-60%), mentre per le altre linee cellulari la frequenza è risultata piuttosto simile tra i due protocolli sperimentali (Grafico 4). La linea cellulare EM9 è nota esibire una frequenza molto elevata di SCEs spontanei.

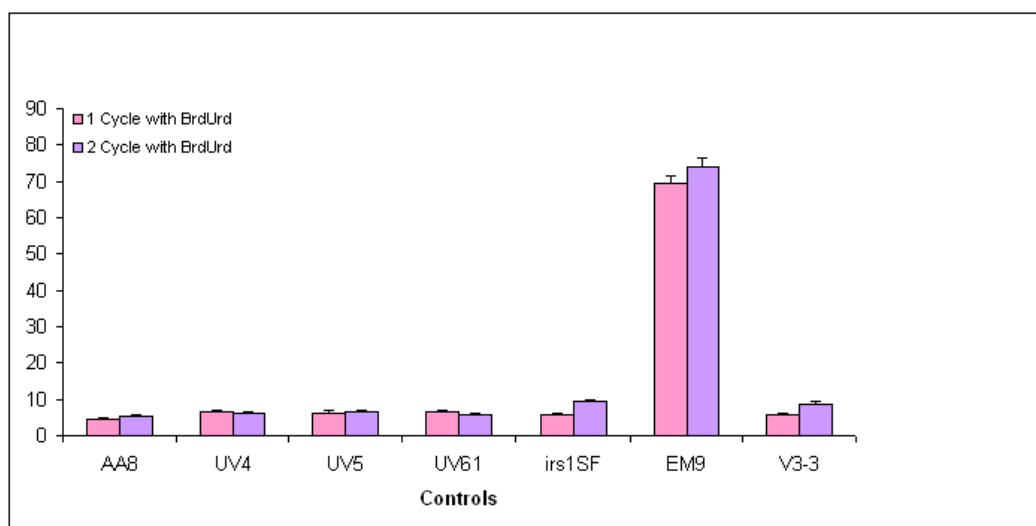


Grafico 4. Frequenza spontanea di SCEs dopo un solo ciclo cellulare e dopo due cicli cellulari in presenza di BrdUrd, nella linea cellulare parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3).

Per quanto riguarda il trattamento con il BPDE, tutte le linee cellulari, eccetto le EM9 e le irs1SF, hanno presentato un incremento dose dipendente nella frequenza di SCEs indotti dal BPDE. Inoltre, la frequenza di SCEs è risultata leggermente più elevata nel trattamento col BPDE per un solo ciclo cellulare in presenza di BrdUrd rispetto all'altro protocollo. Per comparare la sensibilità di induzione degli SCEs nelle diverse linee cellulari, il valore medio di SCEs indotti a tutte e tre le dosi di BPDE utilizzate è stato introdotto nella formula, di seguito riportata, del Fattore di Sensibilità (FSCE) calcolato come il rapporto tra l'incremento della

frequenza degli SCEs nella linea difettiva sull'aumento degli stessi nella linea parentale:

$$F_{SCE} = \frac{SCEs \text{ X linea cellulare (BPDE)} - SCEs \text{ X linea cellulare (K)}}{SCEs \text{ AA8 (BPDE)} - SCEs \text{ AA8 (K)}}$$

Prima di procedere al calcolo delle frequenze di SCEs indotti dal BPDE in ciascuna linea cellulare, sono stati sottratti i rispettivi controlli (grafici 5 e 6). L'ordine di sensibilità risultante nelle diverse linee cellulari per ciò che riguarda gli SCEs indotti dal BPDE, dopo un ciclo, è: UV5, UV4, V3-3, AA8, UV61, EM9 e irs1SF, mentre dopo due cicli è: AA8, UV5, UV4, UV61, V3-3, EM9 e irs1SF (in ordine decrescente). Come si può dedurre dai fattori di sensibilità presentati nelle tabelle 1, 2 e 3, l'aumento degli SCEs non è così ingente rispetto alle frequenze delle aberrazioni cromosomiche indotte dal BPDE.

I grafici 5 e 6 indicano che le linee cellulari difettive nel NER sono più sensibili delle altre e che quindi il NER è una via di riparazione importante nella rimozione di quelle lesioni indotte dal BPDE che portano alla formazione degli SCEs. La riparazione per ricombinazione omologa (HRR), invece, gioca un ruolo minore nella formazione degli SCEs indotti dal BPDE.

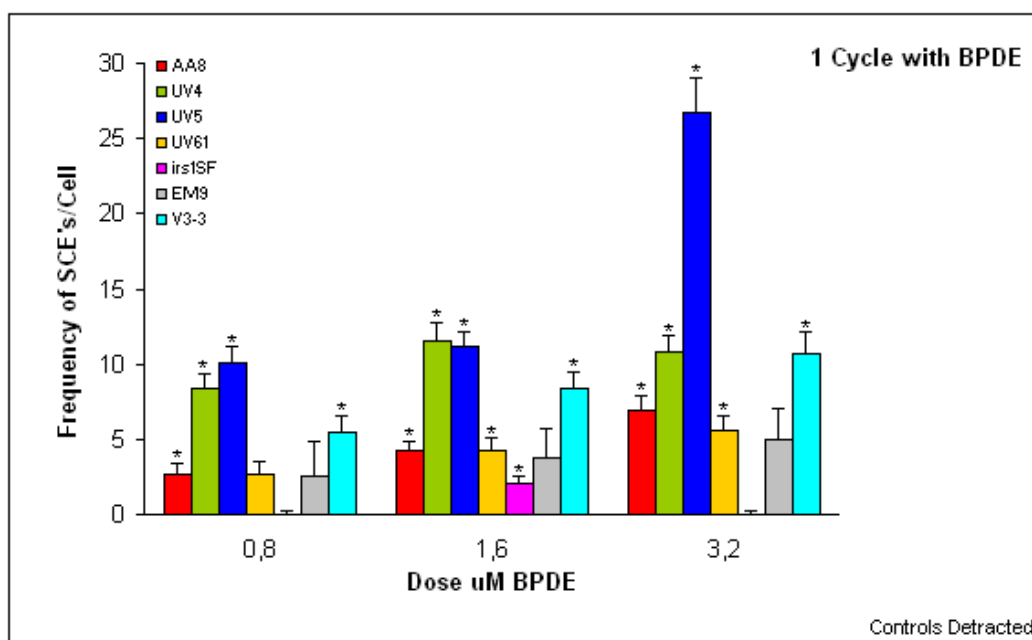


Grafico 5

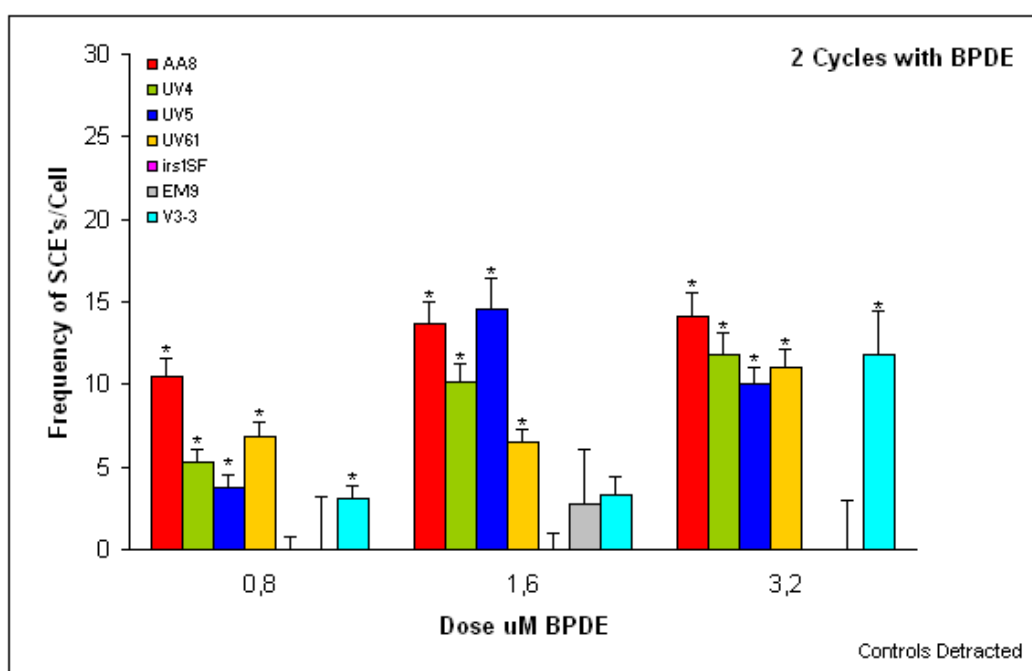


Grafico 6

Grafici 5 e 6. Frequenza di SCEs indotti, dopo trattamento, per uno (grafico 5) o due cicli (grafico 6) con differenti dosi di BPDE (0,8 μM , 1,6 μM e 3,2 μM), nella linea parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

Apoptosi:

Il grafico 7 mostra la frequenza di cellule apoptotiche indotte dalla dose più alta di BPDE utilizzata (3,2 μ M) per l'analisi sia delle aberrazioni cromosomiche che degli SCEs. Le frequenze spontanee variano tra lo 0,4 % delle UV5 al 3,3 % delle AA8, mentre le frequenze di cellule apoptotiche indotte a seguito del trattamento col BPDE, incrementa dallo 0,9 % delle UV4 al 15,7% delle UV5. L'ordine di sensibilità è il seguente: UV5, irs1SF, UV61, V3-3, AA8, EM9 e UV4. Non si osserva, quindi, nessuna correlazione tra la percentuale di cellule apoptotiche indotte e la frequenza di aberrazioni cromosomiche osservate o fra la percentuale di cellule apoptotiche indotte ed il tipo di difetto nella riparazione del danno indotto al DNA dal BPDE. Essendo le linee cellulari utilizzate p53 negative, l'induzione di apoptosi osservata, sebbene scarsa, nelle linee UV5 e irs1SF è probabilmente un processo p53 indipendente.

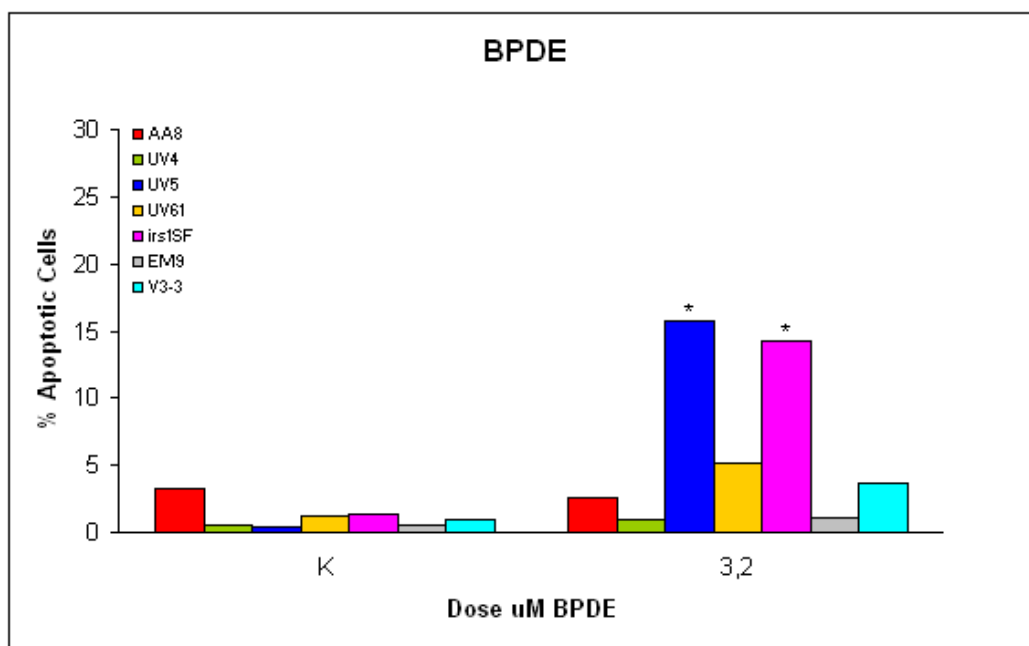


Grafico 7. Frequenza di apoptosi spontanea (K) ed indotta (dopo trattamento con 3,2 μ M di BPDE) nella linea parentale (AA8) ed in quelle difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). * $p < 0,01$ Student t-test.

Trattamento con il DBPDE:

Aberrazioni cromosomiche:

La frequenza spontanea delle aberrazioni cromosomiche, come già visto nei risultati dei precedenti esperimenti, varia tra le diverse linee cellulari. Infatti quelle difettive nella riparazione mostrano una frequenza più elevata se comparata con quella della linea parentale (AA8). Le AA8 hanno una media di aberrazioni pari a 2 su 100 cellule analizzate, mentre le linee cellulari difettive nella riparazione V3-3, UV61, UV4, UV5, EM9 e irs1SF mostrano, rispettivamente, una media pari a 4.0, 6.0, 9.0, 10, 41 e 82 aberrazioni su 100 cellule osservate (Grafico 8).

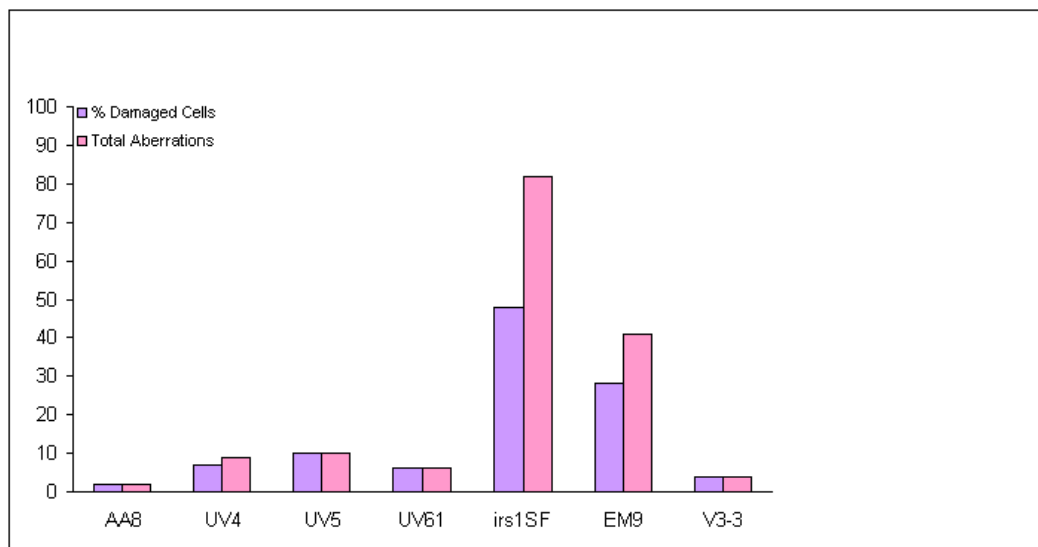


Grafico 8. Percentuale di cellule danneggiate e aberrazioni totali spontanee nella linea cellulare parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3).

Anche in seguito al trattamento col DBPDE, in tutte le linee cellulari difettive nella riparazione, sono state riscontrate sia rotture che scambi cromatidici (Tabella 4) e, per comparare le diverse linee cellulari tra loro, le rispettive frequenze di aberrazioni spontanee sono state sottratte dal totale in modo tale da considerare solamente quelle indotte. Per stabilire l'ordine di sensibilità all'induzione delle aberrazioni cromosomiche indotte dal DBPDE nelle diverse linee cellulari, il valore medio di induzione delle aberrazioni cromosomiche ottenute a tutte e tre le dosi utilizzate (0,0025 μ M, 0,005 μ M e 0,0075 μ M) è stato impiegato nella formula per il calcolo del Fattore di Sensibilità (Fab).

L'ordine di sensibilità risultante nelle diverse linee cellulari per ciò che riguarda le aberrazioni cromosomiche indotte dal DBPDE è stato: EM9, irs1SF, UV4, UV5, AA8, UV61 e V3-3, in ordine decrescente.

I grafici 9 e 10 mostrano che le linee cellulari difettive nella riparazione per escissione di basi (EM9) e nella riparazione per ricombinazione omologa (irs1SF) risultano essere più sensibili rispetto le altre, indicando che il BER e l'HRR sono importanti vie di rimozione delle lesioni indotte dal DBPDE portanti alla formazione di aberrazioni cromosomiche. Al contrario le linee difettive nel NER (UV4, UV5 e UV61) non mostrano un aumento di sensibilità, ma un andamento simile alla linea parentale.

Cell Line	Normal Cells	Damaged Cells	se(yEr±) % Damaged Cells	B'	B''	Chromatidic Exchanges	Frequency of Aberrations	se(yEr±) Total Aberrations	Induced Aberrations	Fab
AA8 K	98	2	0,01407	1	0	1	2	0,01407		1
AA8 0,0025 uM	89	11	0,03145	6	2	4	12	0,03562	10 *	
AA8 0,005 uM	87	13	0,0338	5	3	5	13	0,0338	11 *	
AA8 0,0075 uM	89	11	0,03145	6	1	4	11	0,03145	9 *	
UV4 K	93	7	0,02564	6	2	1	9	0,03786		1,3
UV4 0,0025 uM	83	17	0,03775	14	2	3	19	0,04426	10	
UV4 0,005 uM	77	23	0,0423	12	2	14	28	0,057	19 *	
UV4 0,0075 uM	83	17	0,03775	9	1	9	19	0,04426	10	
UV5 K	90	10	0,03015	5	0	5	10	0,03015		1,2
UV5 0,0025 uM	82	18	0,03861	13	3	5	21	0,04777	11 *	
UV5 0,005 uM	75	25	0,04352	8	4	16	28	0,05333	18 *	
UV5 0,0075 uM	84	16	0,03685	8	1	8	17	0,03775	7 *	
UV61 K	94	6	0,02387	2	1	3	6	0,02387		0,53
UV61 0,0025 uM	90	10	0,03015	2	1	10	13	0,04181	7	
UV61 0,005 uM	91	9	0,02876	3	2	4	9	0,02876	3	
UV61 0,0075 uM	89	11	0,03145	4	1	7	12	0,03562	6	
irs1SF K	52	48	0,05021	17	2	63	82	0,10736		3,33
irs1SF 0,0025 uM	47	53	0,05016	25	3	80	108	0,11949	26	
irs1SF 0,005 uM	28	72	0,04513	26	0	119	145	0,12503	63 *	
irs1SF 0,0075 uM	51	49	0,05024	26	2	65	93	0,11393	11	
EM9 K	72	28	0,04513	9	2	30	41	0,07534		4,53
EM9 0,0025 uM	56	44	0,04989	22	4	53	79	0,11308	38 *	
EM9 0,005 uM	53	47	0,05016	27	2	49	78	0,10109	37 *	
EM9 0,0075 uM	54	46	0,05009	21	6	75	102	0,14069	61 *	
V3-3 K	96	4	0,01969	4	0	0	4	0,01969		0,43
V3-3 0,0025 uM	95	5	0,0219	3	2	1	6	0,02778	2	
V3-3 0,005 uM	89	11	0,03145	3	4	5	12	0,03266	8 *	
V3-3 0,0075 uM	94	6	0,02387	0	2	5	7	0,02932	3	

Tabella 4. Frequenza delle aberrazioni cromosomiche (su 100 cellule) dopo trattamento con differenti dosi di DBPDE in linee cellulari di tipo selvatico (AA8) e difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * p<0,01 Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea); Fab: Fattore di sensibilità.

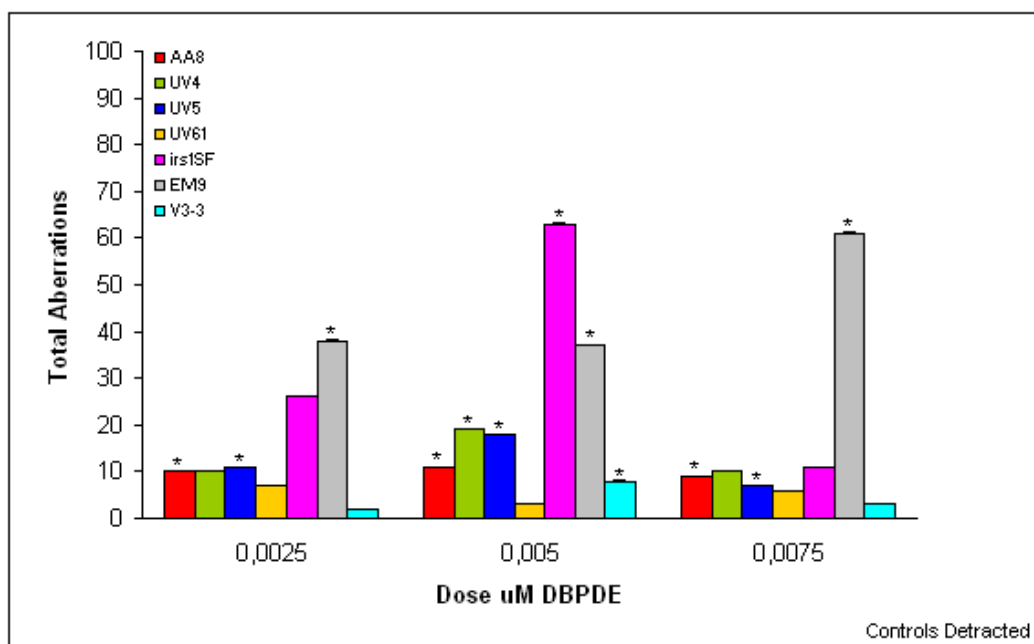


Grafico 9. Aberrazioni cromosomiche totali dopo trattamento con differenti dosi (0,0025 μM, 0,005 μM e 0,0075 μM) di DBPDE. * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

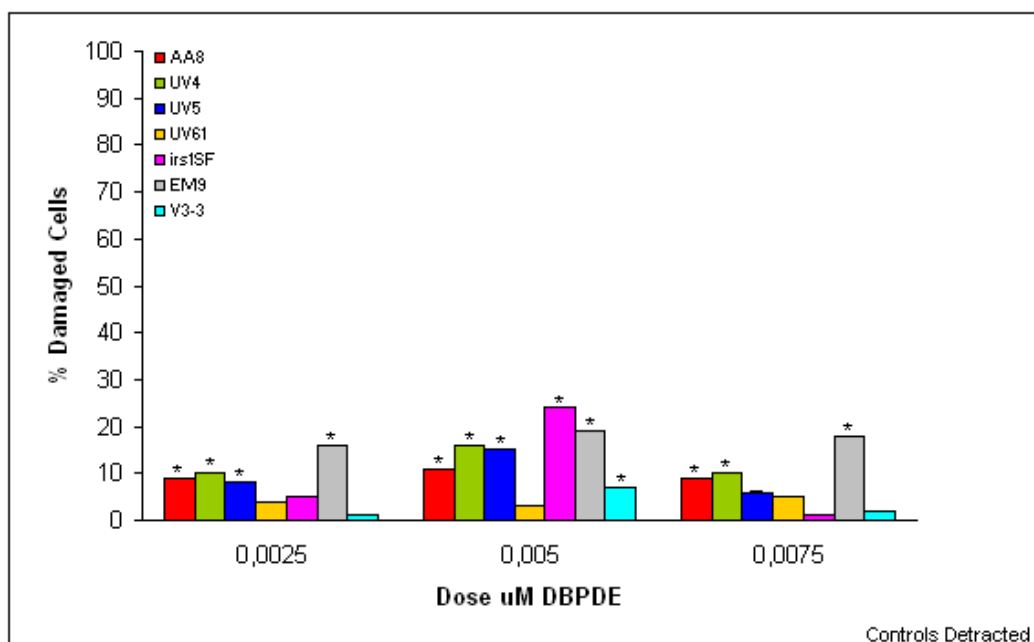


Grafico 10. Percentuale di cellule danneggiate dopo trattamento con differenti dosi (0,0025 μM, 0,005 μM e 0,0075 μM) di DBPDE. * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

Scambi fra cromatidi fratelli (Sister chromatid Exchanges, SCEs):

Le frequenze degli SCEs osservate nelle diverse linee cellulari a seguito del trattamento con DBPDE per un ciclo e per due cicli cellulari in presenza di BrdUrd, sono rappresentate nelle Tabelle 5 e 6.

Tabella 5. Frequenza degli SCEs (per cellula) dopo trattamento con DBPDE per un solo ciclo in presenza di BrdUrd in cellule di tipo selvatico (AA8) e difettose nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * $p < 0,01$ Student t-test; IP: Indice di Proliferazione; FSCE: Fattore di sensibilità.

Cell Line	Mean SCEs	se(yEr±)	Induced SCEs	IP		F SCE
				M1	M2	
AA8 K	7,22	0,39723		5	95	1
AA8 0,0025 uM	10,56	0,56508	3,34 *	9	91	
AA8 0,005 uM	15,16	0,70876	7,94 *	7	93	
AA8 0,0075 uM	16,6	0,80711	9,38 *	14	86	
UV4 K	8,14	0,47122		6	94	1,28
UV4 0,0025 uM	12,9	0,72633	4,76 *	10	90	
UV4 0,005 uM	17,66	1,11084	9,52 *	12	88	
UV4 0,0075 uM	20,34	1,1951	12,2 *	15	85	
UV5 K	10,42	0,55261		8	92	0,95
UV5 0,0025 uM	12,52	0,63965	2,1	7	93	
UV5 0,005 uM	18,46	1,35322	8,04 *	33	67	
UV5 0,0075 uM	20,06	1,16703	9,64 *	42	58	
UV61 K	8,54	0,49174		0	100	1,51
UV61 0,0025 uM	14,4	0,8266	5,86 *	3	97	
UV61 0,005 uM	19	1,26071	10,46 *	1	99	
UV61 0,0075 uM	23,5	1,4114	14,96 *	1	99	
irs1SF K	5,06	0,37948		11	89	0,34
irs1SF 0,0025 uM	7,02	0,43845	1,96 *	55	45	
irs1SF 0,005 uM	7,1	0,52158	2,04 *	67	33	
irs1SF 0,0075 uM	8,16	0,51139	3,1 *	80	20	
EM9 K	60,98	2,02766		3	97	2,24
EM9 0,0025 uM	73,42	2,53934	12,44 *	9	91	
EM9 0,005 uM	77,32	2,03007	16,34 *	7	93	
EM9 0,0075 uM	78,54	2,26332	17,56 *	9	91	
V3-3 K	10,84	0,51059		4	96	1,75
V3-3 0,0025 uM	17,58	1,09287	6,74 *	5	95	
V3-3 0,005 uM	24,44	1,33437	13,6 *	2	98	
V3-3 0,0075 uM	26,78	1,40996	15,94 *	8	92	

Tabella 6. Frequenza degli SCEs (per cellula) dopo trattamento con DBPDE per due cicli in presenza di BrdUrd in cellule di tipo selvatico (AA8) e difettose nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). Se: Errore Standard; * p<0,01 Student t-test; IP: Indice di Proliferazione; FSCE: Fattore di sensibilità.

Cell Line	Mean SCEs	se(yEr±)	Induced SCEs	IP		FSCE
				M1	M2	
AA8 K	6,72	0,418		7	93	1
AA8 0,0025 uM	15,3	1,09293	8,58 *	7	93	
AA8 0,005 uM	16,94	0,85877	10,22 *	7	93	
AA8 0,0075 uM	18,26	0,99214	11,54 *	14	86	
UV4 K	10,28	0,67856		5	95	0,9
UV4 0,0025 uM	14,66	0,75355	4,38 *	12	88	
UV4 0,005 uM	20	1,26685	9,72 *	18	82	
UV4 0,0075 uM	23,64	1,19378	13,36 *	16	84	
UV5 K	10,82	0,47783		4	96	1
UV5 0,0025 uM	17,72	0,75972	6,9 *	8	92	
UV5 0,005 uM	20,58	0,97189	9,76 *	13	87	
UV5 0,0075 uM	24,6	1,23354	13,78 *	41	59	
UV61 K	7,94	0,44759		2	98	1,2
UV61 0,0025 uM	18,22	0,94687	10,28 *	2	98	
UV61 0,005 uM	21,06	1,4553	13,12 *	4	96	
UV61 0,0075 uM	19,98	0,67279	12,04 *	5	95	
irs1SF K	7,38	0,42282		15	85	0,1
irs1SF 0,0025 uM	7,52	0,46707	0,14	19	81	
irs1SF 0,005 uM	8,38	0,47714	1	33	67	
irs1SF 0,0075 uM	9,76	0,60106	2,38 *	31	69	
EM9 K	77,54	2,23318		7	93	0,6
EM9 0,0025 uM	81,94	1,99641	4,4	10	90	
EM9 0,005 uM	87,42	2,26636	9,88 *	3	97	
EM9 0,0075 uM	80,9	2,14348	3,36	14	86	
V3-3 K	8,88	0,44962		2	98	2
V3-3 0,0025 uM	22	1,08834	13,12 *	2	98	
V3-3 0,005 uM	31,26	1,71114	22,38 *	2	98	
V3-3 0,0075 uM	34,52	1,81226	25,64 *	4	96	

Nel protocollo con un solo ciclo cellulare in presenza di BrdUrd, la frequenza spontanea di SCEs nella linea cellulare parentale (AA8) è di 7,22 per cellula e tutte le linee cellulari difettive nella riparazione, ad eccezione delle EM9 e delle irs1SF, hanno mostrato solo un lieve incremento di SCEs spontanei (da 8,14 a

10,84 per cellula) se comparate ad essa. Nel protocollo sperimentale in cui le cellule sono state in presenza di BrdUrd per due cicli cellulari, la frequenza spontanea di SCEs è risultata più elevata nelle linee cellulari UV4, irs1SF ed EM9, mentre per le altre linee cellulari la frequenza è risultata piuttosto simile tra i due protocolli sperimentali (Grafico 11).

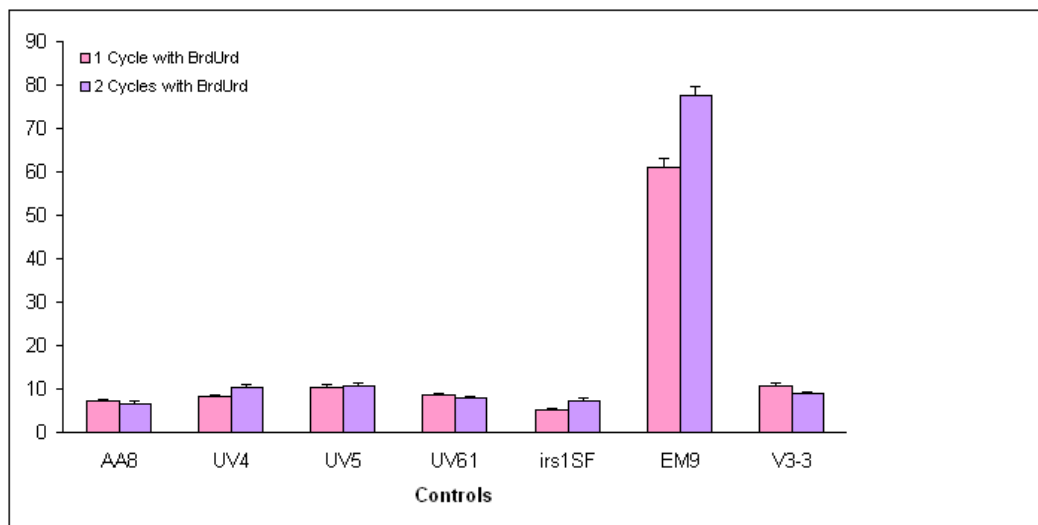


Grafico 11. Frequenza spontanea di SCEs dopo un solo ciclo cellulare e dopo due cicli cellulari in presenza di BrdUrd, nella linea cellulare parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3).

Nel trattamento col DBPDE tutte le linee cellulari, ad eccezione delle irs1SF, dove si riscontra un minimo incremento solo alla dose più alta, hanno presentato un incremento dose dipendente della frequenza di SCEs. Per comparare la sensibilità di induzione degli SCEs nelle diverse linee cellulari, il valore medio di SCEs indotti a tutte e tre le dosi di DBPDE utilizzate è stato introdotto nella formula del Fattore di Sensibilità (FSCE) calcolato come il rapporto tra l'incremento della frequenza degli SCEs nella linea difettiva sull'aumento degli stessi nella linea parentale. Prima di procedere al calcolo delle frequenze di SCEs indotti dal BPDE in ciascuna linea cellulare, sono stati sottratti i rispettivi controlli (grafici 12 e 13). L'ordine di sensibilità risultante nelle diverse linee cellulari per ciò che riguarda gli SCEs indotti dal DBPDE, dopo un ciclo

cellulare, è: EM9, V3-3, UV61, UV4, AA8, UV5 e irl1SF, mentre dopo due cicli è: V3-3, UV61, UV5, AA8, UV4, EM9 e irl1SF (in ordine decrescente). I grafici 12 e 13 indicano che le linee cellulari deficienti nel BER (EM9), nel NHEJ (V3-3) e nel TCR (UV61) sono più sensibili delle altre e che quindi sono importanti vie di riparazione per la rimozione di quelle lesioni indotte dal DBPDE portanti alla formazione degli SCEs. La riparazione per ricombinazione omologa (HRR), come per il BPDE, gioca un ruolo minore nella formazione degli SCEs indotti dal DBPDE.

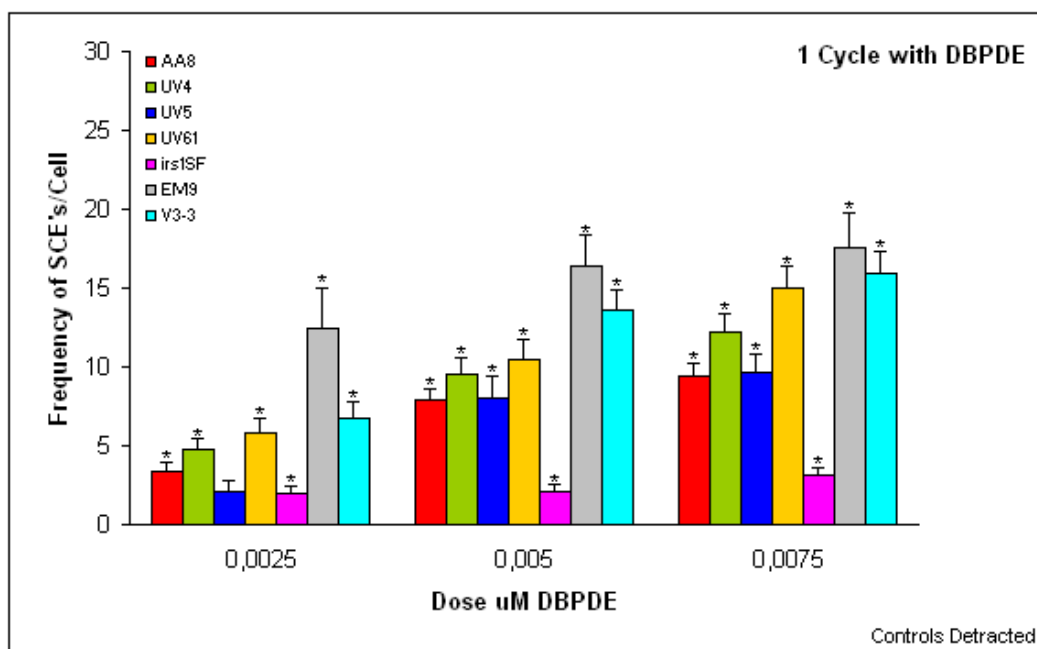


Grafico 12

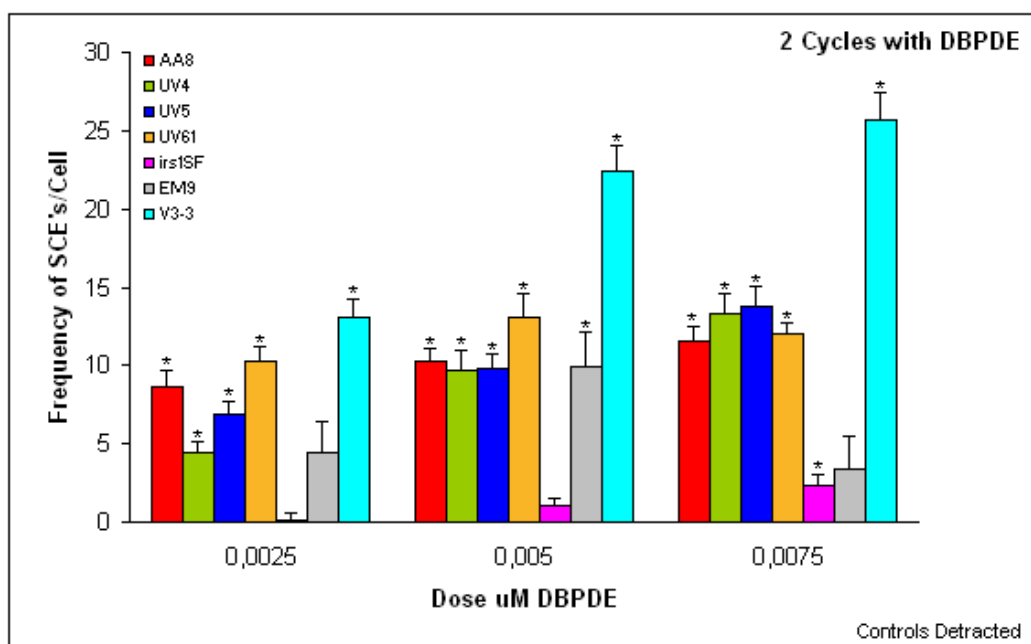


Grafico 13

Grafici 12 e 13. Frequenza di SCEs indotti, dopo trattamento per uno (grafico 12) o due cicli cellulari (grafico 13) con differenti dosi di DBPDE (0,0025 μM , 0,005 μM e 0,0075 μM) nella linea parentale (AA8) e nelle linee difettive nella riparazione (UV4, UV5, UV61, irs1SF, EM9 e V3-3). * $p < 0,01$ Student t-test (trattati verso il controllo all'interno della stessa linea).

Apoptosi:

Il grafico 14 mostra la frequenza di cellule apoptotiche indotte alla dose più alta di DBPDE utilizzata (0,0075 μ M) per l'analisi sia delle aberrazioni cromosomiche che degli SCEs. Le frequenze spontanee variano tra lo 0 delle UV5 e delle EM9 al 2,75% delle irs1SF, mentre le frequenze di cellule apoptotiche indotte a seguito del trattamento col DBPDE, incrementa dall'1% delle EM9 al 8,3% delle irs1SF essendo l'intervallo di sensibilità il seguente: irs1SF, AA8, V3-3, UV4, UV5 e EM9. Anche nel caso del DBPDE non si osserva nessuna correlazione tra la percentuale di cellule apoptotiche indotte e la frequenza di aberrazioni cromosomiche osservate o fra la percentuale di cellule apoptotiche indotte ed il tipo di difetto nella riparazione del danno indotto dal DBPDE nel DNA.

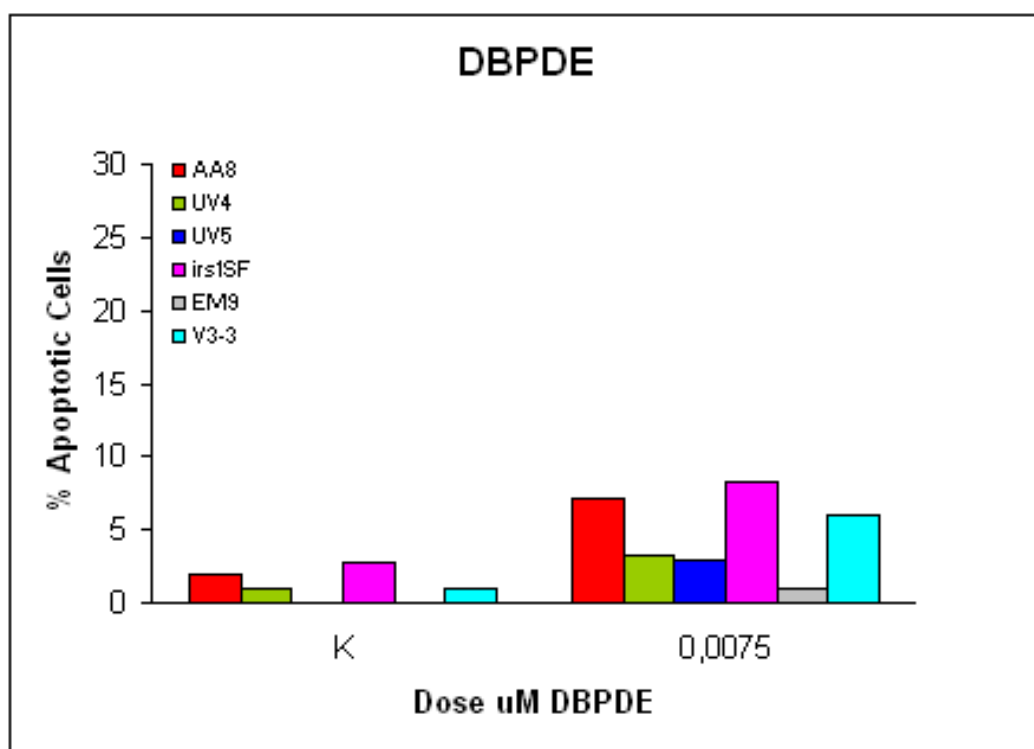


Grafico 14. Frequenza di apoptosi spontanea (K) ed indotta (dopo trattamento con 0,0075 μ M di DBPDE) nella linea parentale (AA8) ed in quelle difettive nella riparazione (UV4, UV5, irs1SF, EM9 e V3-3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di verificare quale meccanismo di riparazione sia implicato nella rimozione degli addotti al DNA indotti dagli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), in particolare quelli derivanti dai metaboliti ultimi del Benzo[a]Pirene e del Dibenzo[a,l]Pirene, cioè il 7,8-diidrossi-9,10-epossi-7,8,9,10-tetraidrobenzo[a]pirene (BPDE) e l'11,12-diidrossi-13,14-epossi-11,12,13,14-tetraidrodibenzo[a,l]pirene (DBPDE), rispettivamente. A questo scopo sono state utilizzate sette linee cellulari di cui una parentale, da cui tutte le altre derivano, e sei ciascuna difettiva in uno dei meccanismi di riparazione che i sistemi cellulari hanno evoluto al fine di mantenere l'integrità genomica e prevenire, quindi, il rischio di cancro. L'esposizione ai carcinogeni chimici (sostanze, cioè, in grado di iniziare il processo di cancerogenesi) presenti nei posti di lavoro e nell'ambiente in generale e molti fattori legati allo stile di vita (fumo, dieta, consumo di alcool, ecc.), sono implicati nell'induzione dei tumori nell'uomo ed i rischi di questa esposizione ambientale sono modulati da fattori di suscettibilità sia genetica che acquisita.

Lo sviluppo del cancro consiste di tre fasi denominate: iniziazione, promozione e progressione. L'iniziazione, che è un processo irreversibile, inizia nel momento in cui cellule normali vengono esposte a sostanze carcinogeniche ed il loro DNA danneggiato non viene riparato o viene riparato erroneamente. Nella carcinogenesi chimica, l'iniziazione implica l'assorbimento di un dato carcinogeno che poi viene seguentemente distribuito ai vari organi per essere metabolizzato. L'attivazione metabolica porta alla formazione di specie reattive (elettrofile) che vanno a legare il DNA causando errori di codificazione durante la replicazione e portando all'induzione di mutazioni. Le mutazioni somatiche in cellule danneggiate si possono riprodurre durante la mitosi e dare origine a cloni di cellule mutate. Lo stadio successivo di cancerogenesi, la promozione, rappresenta l'espansione delle cellule danneggiate a formare una popolazione di cellule tumorali premaligne attivamente proliferanti. L'ultimo stadio, la progressione, è anch'esso un processo irreversibile che produce nuovi cloni di cellule tumorali aventi un aumento della capacità proliferativa, della capacità invasiva e di formazione di metastasi.

Il fumo di sigaretta è la sorgente principale di esposizione a numerose sostanze cancerogene tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) ed è considerata la causa principale di cancro al polmone nell'uomo e viene, spesso, utilizzato come modello di studio di interazione tra la predisposizione genetica e l'esposizione ambientale. Nei soggetti non fumatori o che non siano esposti a queste sostanze sul posto di lavoro, la sorgente principale è rappresentata dalla dieta. Nei cibi i carcinogeni presenti sono rappresentati o da sostanze che si formano naturalmente, ad esempio per contaminazione, oppure che si originano durante la cottura o il processamento (affumicazione e cottura alla brace). E' stato stimato che la dieta umana apporta 3 µg di IPA/giorno, i quali possono essere comparati ad un'esposizione di 2-5 µg di IPA/giorno per pacchetto di sigarette in un fumatore regolare (Goldman e Shields, 2003). Essendo composti altamente solubili, gli IPA vengono facilmente assorbiti dalle cellule di polmone, intestino e pelle nei mammiferi. Numerosi studi sugli animali indicano che gli IPA possono indurre immunotossicità, genotossicità, carcinogenicità, tossicità riproduttiva (sia nel maschio che nella femmina) e influenzare lo sviluppo di arteriosclerosi.

E' stato osservato che le cellule del tumore al polmone di soggetti fumatori mostrano un significativo incremento del numero di alterazioni cromosomiche se comparate con quelle di soggetti non fumatori (Sanchez-Cespedes et al., 2001) supportando, ulteriormente, il concetto che i cancerogeni presenti nel tabacco sono fra le cause di anomalie cromosomali che insorgono nei tumori al polmone. Siccome molti carcinogeni chimici presenti nel fumo di sigaretta sono inattivi di per se, essi richiedono l'attivazione metabolica mediata dagli enzimi di fase I (ad esempio CYP), che li convertono in intermedi elettrofili che andranno, poi, a legare i centri nucleofili del DNA in maniera covalente, portando alla formazione di addotti carcinogeni voluminosi (Guengerich, 2000). Si suppone che la formazione degli addotti al DNA sia un evento chiave nell'iniziazione dei tumori durante la cancerogenesi chimica (Bartsch, 1996) e che il potenziale biologico di un dato addotto dipenda dal suo potenziale mutagenico, dalla sua capacità di essere riparato, dalla sua localizzazione all'interno di un gene bersaglio e dalla natura di quest'ultimo (Bohr, 1994). Il livello totale di addotti nel DNA e, in alcuni casi, di addotti specifici, sono stati correlati con mutazioni in vitro (McCormick, 1985; Beland et al., 1983), con aberrazioni cromosomiche (Bartsch, 1996; Morris et al., 1984; Talaska et al., 1987) e, generalmente, con la

carcinogenicità (Poirier e Beland, 1992; Otteneider e Lutz, 1999). Gli addotti, quindi, sono stati ampiamente utilizzati come biomarcatori di esposizione ai cancerogeni presenti nel fumo di sigaretta in numerosi studi di biomonitoraggio sull'uomo. Attraverso questi studi è stato determinato che i loro livelli nei fumatori sono modulati da diversi fattori tra cui l'estensione e la durata di esposizione, il tipo di fumatore (attivo o passivo), lo stato del fumatore (non ha mai fumato, fuma poco o costantemente), etnicità, sesso, polimorfismi allelici degli enzimi che sono coinvolti nell'attivazione e detossificazione metabolica, la riparazione del DNA e la sensibilità mutagenica. Studi condotti da Rundle e collaboratori (2000), su tessuto tumorale del seno, fanno supporre che i cambiamenti progressivi nelle cellule tumorali portano ad una maggiore formazione ed accumulo di addotti nei tessuti tumorali. Ciò starebbe a significare che questo fenomeno ha una forte rilevanza per ciò che riguarda la progressione dei tumori ma non ne rappresenta la causa. E' possibile che i cambiamenti nel metabolismo o riparazione del DNA e/o l'incremento di accessibilità del DNA a singolo filamento durante la replicazione e la proliferazione cellulare, potrebbero portare ad un incremento del livello degli addotti. Ciò rappresenterebbe un forte significato biologico, in quanto l'accumulo di addotti IPA-DNA gioca un ruolo importante nell'ulteriore progressione delle cellule maligne. L'incremento dei livelli degli addotti potrebbe portare, nel tempo, ad incrementare anche il numero di mutazioni e dell'instabilità genomica, contribuendo ulteriormente al fenotipo canceroso delle cellule. L'aumento del rischio di cancro e di trasformazione maligna nei sistemi cellulari sono associati non solo al bilancio tra l'attivazione metabolica e la detossificazione dei composti xenobiotici, ma anche dalla diminuzione della capacità riparativa di tali sistemi. Questa diminuzione può risultare in un incremento di addotti nei tessuti bersaglio e portare, quindi, a mutazioni in specifici geni e anche a carcinogenesi (Wei e Spitz, 1997). Studi epidemiologici hanno indicato che l'incremento del livello di addotti e la riduzione della capacità riparativa del DNA sono associati ad un incremento del rischio di cancro al polmone (Qingyi et al., 2000).

Il "nucleotide excision repair" (NER) è la via riparativa maggiormente implicata nella rimozione di un'ampia varietà di addotti voluminosi strutturalmente non relazionati che includono anche quelli indotti dagli idrocarburi policiclici aromatici e dai carcinogeni presenti nel tabacco (ad esempio il Benzo[a]Pirene)

(Cleaver, 1968; Hoffman e Hecht, 1990). Nelle cellule di mammifero gli addotti del Benzo[a]Pirene vengono riparate dal NER sia in vivo che in vitro (Gunz et al., 1996; Koostra, 1982; McLeod et al., 1991; Venkatachalam et al., 1995). Per studiare le lesioni indotte dagli IPA e per esaminare il meccanismo di riparazione implicato, Braithwaite e collaboratori (1998) hanno utilizzato sistemi “cell free” (cioè sistemi privi di cellule in cui vengono impiegati solo gli enzimi specifici del meccanismo che si sta studiando e che riflettono le proprietà che quest’ultimo ha in vivo) di cellule umane denominate HeLa, sviluppati, precedentemente, da Wood e collaboratori (1988). A questo scopo hanno impiegato differenti IPA, tra cui il Benzo[a]Pirene, il cui metabolita ultimo è rappresentato dal BPDE; quest’ultimo forma addotti covalenti col DNA prevalentemente in posizione N² delle guanine (80-90% degli addotti totali prodotti) (Cheng et al., 1989) e, in minor misura, in posizione N⁷ delle guanine, N⁶ delle adenine ed N³ delle citosine (Osborne et al., 1981). E’ stato dimostrato che all’aumentare della dose di BPDE utilizzata aumentava anche la riparazione delle lesioni indotte da esso. Per determinare, *in vitro*, il meccanismo responsabile di tale riparazione, hanno eseguito esperimenti identici su sistemi “cell free” di cellule deficienti nel NER, mancanti delle proteine XPA e XPD (Friedberg et al., 1995). Al contrario degli estratti cellulari HeLa, la riparazione delle lesioni indotte dal BPDE negli estratti cellulari XPA e XPD risultava difettiva a tutte le dosi di composto impiegate, mentre in estratti cellulari in cui erano presenti gli enzimi sia di XPA che di XPD hanno riscontrato una complementazione *in vitro* ed una capacità riparativa proficiente, che rifletteva che vi erano realmente difetti nel NER e non piuttosto un fallimento nell’allestimento dei preparati. Questi risultati, quindi, hanno dimostrato che gli addotti del BPDE vengono riparati attraverso il meccanismo NER in estratti cellulari umani. Perciò la riduzione dei livelli di espressione dei geni implicati nel NER può essere associata con il rischio di cancro al polmone. Ulteriormente studi di Cheng e collaboratori (2000) in individui con cancro al polmone ed in individui sani e di differenti età, etnicità, sesso ed uso o meno di tabacco, hanno dimostrato che i pazienti affetti presentano, se comparati ai controlli, una ridotta espressione dei livelli delle proteine XPG/ERCC5 e di CSB/ERCC6.

Anche gli addotti del DBPDE vengono rimossi prevalentemente dal NER. A causa della sua maggiore lipofilia ed alla sua più bassa reattività solvolitica, la

vita media degli addotti del DBPDE intracellulare risulta più lunga se comparata a quella del BPDE (Sundberg et al., 2002) e ciò rende questo composto l'idrocarburo policiclico aromatico più carcinogeno identificato nell'ambiente (Sauvain et al., 2001; Seidel et al., 2004). E' stato valutato che il DBPDE nelle colture cellulari si lega 10 volte più efficacemente al DNA del BPDE (Sundberg et al., 2002). Studi di Dreij e collaboratori (2004), condotti su cellule epiteliali di carcinoma polmonare umano, hanno dimostrato che il livello degli addotti derivanti dal DBPDE è seguito da una lenta, ma non statisticamente significativa, rimozione degli stessi ed, infatti, dopo 6 ore di incubazione il livello massimo degli addotti era dell'80%, cioè 3 volte più alto di quello del BPDE. Ciò sta a significare che la rimozione, ad opera del NER, degli addotti derivanti da IPA con regione a fiordo (quale il DBPDE) è significativamente meno efficiente di quella degli addotti derivanti dagli IPA con regione a baia (quale il BPDE).

Un altro meccanismo di riparazione che rimuove gli addotti voluminosi al DNA, come quelli prodotti dagli IPA, è il "Base Excision Repair" (BER). Fra le lesioni riconosciute dal BER vi sono i siti apurinici/apirimidinici (AP). Le modificazioni covalenti delle basi del DNA spesso rendono la base stessa instabile promuovendo la sua perdita e portando alla formazione di un sito AP (Friedberg et al., 1995). Gli studi di Braithwaite e collaboratori (1998) hanno anche dimostrato che gli addotti di alcuni IPA possono risultare instabili ed andare incontro a depurinazione producendo un sito AP nel DNA, facendo supporre che la riparazione del danno indotto dagli IPA nel DNA, negli estratti cellulari XP, (riparazione NER-indipendente) potrebbe riflettere la riparazione per escissione di basi del sito AP a seguito della depurinazione della base modificata dall'addotto. Il BER, però, ha la capacità di riconoscere il danno indotto solamente da alcuni IPA e ciò dipende fortemente dalla stabilità dell'addotto stesso. Infatti, se gli addotti indotti da un dato IPA sono stabili, questi vengono riparati principalmente dal NER e l'IPA, in questo caso, viene definito forte carcinogeno (ad es. il BPDE) (Buening et al., 1978). Al contrario se gli addotti al DNA sono instabili, essi vengono rimossi con maggiore efficienza per mezzo della depurinazione ed il risultante sito AP che ne deriva viene riparato dal macchinario BER. Questi IPA vengono, invece, definiti deboli carcinogeni. Inoltre gli addotti più stabili possono indurre la formazione di rotture a singolo filamento o generare rotture a doppio filamento in cellule in fase di replicazione, contribuendo, così, a diverse forme di

danno cromosomico (Wei et al., 1996). E' stato dimostrato che i polimorfismi genetici o le transizioni G:C→A:T nell'enzima ERCC1, implicato nel BER, che portano alla sostituzione di un aminoacido con un altro, possono influenzare sia i livelli di addotti voluminosi nel DNA che gli scambi tra cromatidi fratelli in cellule mononucleari umane (Duell et al., 2000). Un certo numero di studi ha dimostrato che gli addotti voluminosi al DNA possono portare a completi blocchi della replicazione sia nel caso in cui la DNA polimerasi non è in grado di oltrepassare l'addotto sia quando si verificano casi di appaiamento errato dovuti all'incorporazione errata di una base differente da quella complementare alla base modificata e che si verifica quando l'addotto viene oltrepassato. Quest'ultimo caso è noto come "translesion synthesis" (TLS) ed è operata dalle DNA polimerasi che appartengono alla super famiglia Y, una famiglia di polimerasi "error prone" che mostrano bassa fedeltà di sintesi e portano alla formazione di mutazioni (Goodman, 2000). La bassa fedeltà di questa super famiglia è stata dimostrata in vari sistemi con addotti derivanti dal BPDE (Zhang et al., 2002; Shen et al., 2002; Avkin et al., 2004).

A differenza degli studi condotti da questi ricercatori, in questa tesi di dottorato sono stati utilizzati tests citogenetici, quali le aberrazioni cromosomiche (AC) e gli scambi fra cromatidi fratelli (SCEs), considerati avere un ruolo importante nell'analisi degli effetti biologici sia alle basse (AC ed SCEs) che alle alte (SCEs) dosi di cancerogeni. Le AC sono il risultato di rotture dirette del DNA, di inibizione della sintesi del DNA e di altri meccanismi (Albertini et al., 2000). Queste vengono analizzate da molti anni nei linfociti di individui professionalmente esposti e costituiscono un biomarcatore degli effetti precoci prodotti da cancerogeni genotossici. Infatti, recentemente, sono stati effettuati diversi studi epidemiologici che hanno dimostrato che le frequenze delle AC sono predittive del rischio di sviluppare cancro (Bonassi et al., 2000; Hagmar et al., 2004). Gli SCEs, invece, provengono dallo scambio reciproco di DNA tra due cromatidi fratelli di un cromosoma duplicato e sebbene il loro meccanismo di formazione non è ancora ben delineato, si suppone che alla loro formazione contribuiscano il danno presente nel DNA e difetti nella riparazione (Perry et al., 1975; Nakanishi et al., 1979). Gli SCEs possono insorgere anche dal danno al DNA che si forma prima della replicazione (Renault et al., 1982) e sono considerati biomarcatori più sensibili degli effetti genotossici rispetto alle AC. Al

contrario di quest'ultime, comunque, gli SCEs non sono indicatori di mutagenicità, anche se potrebbero essere predittivi del danno cromosomico, almeno per ciò che riguarda gli agenti S-dipendenti (Latt, 1974). I dioli epossidi, metaboliti ultimi degli IPA, formano legami covalenti con i gruppi amino ciclici delle deossiguanosine o deossiadenosine per formare addotti voluminosi idrofobici (Weinstein et al., 1976; Palitti e Becchetti, 1977). Il BPDE agisce in maniera simile agli agenti S-dipendenti e, di conseguenza, per poter osservare aberrazioni dopo trattamento con tale sostanza, è richiesto il passaggio attraverso la fase S (fase di sintesi o replicazione) del ciclo cellulare. Il BPDE induce esclusivamente aberrazioni di tipo cromatidico principalmente rotture e scambi cromatidici. In particolare è stato osservato che il BPDE induce più scambi cromatidici che rotture cromatidiche in tutte le linee studiate indipendentemente dalla loro capacità riparativa. Come già detto, queste lesioni vengono riparate principalmente attraverso il NER anche se si è osservato che anche il BER è un meccanismo importante per la loro rimozione (Braithwaite et al., 1998). Per studiare l'influenza dei diversi meccanismi di riparazione implicati nella rimozione delle lesioni indotte al DNA dai dioli epossidi degli IPA, che giocano un ruolo importante nella formazione delle aberrazioni cromosomiche e degli SCEs, in questo studio sono state utilizzate differenti linee cellulari di ovario di hamster Cinese (CHO) tutte derivanti da una linea parentale comune (AA8) e ciascuna difettiva in uno dei meccanismi di riparazione detti NER (UV4,UV5), TCR (UV61), BER (EM9), NHEJ (V3-3) e HRR (irs1SF).

Le basi molecolari del meccanismo di formazione delle aberrazioni cromosomiche a seguito del trattamento con agenti S-dipendenti, quali il BPDE, fondamentalmente sono due e cioè o che le lesioni persistenti sino alla fase S del ciclo cellulare ostacolano la replicazione, bloccandola, oppure che le lesioni vengano superate senza essere riparate. Il primo caso potrebbe portare alla formazione di rotture nel DNA che, a loro volta, o non vengono riparate (rotture) oppure possono ricombinare con altre rotture presenti nel cromatidio fratello (intrascambi cromatidici) o, ancora, potrebbero ricongiungersi con una rottura presente in un cromosoma differente (interscambio cromatidico).

I processi fondamentali per l'inizio del NER sono l'incisione e l'escissione. Le UV5 (ERCC2) sono difettive nella fase di incisione (Weber et al., 1988), mentre le UV4 (ERCC1), sono difettive nella fase di escissione (Westerveld et al., 1984)

e le UV61 (ERCC6) sono difettive nel TCR (Troelstra et al., 1990). Tutte queste linee cellulari, insieme alla linea difettiva nella riparazione per ricombinazione omologa (irs1SF) sono risultate sensibili al **BPDE** per ciò che riguarda l'induzione di aberrazioni cromosomiche, indicando che il NER e l'HRR sono vie di riparazione fondamentali nella rimozione delle lesioni indotte dal BPDE. Anche se il più alto numero di aberrazioni nella linea cellulare UV4 potrebbe indicare che la fase di escissione sia più importante di quella di incisione (UV5), vi sono indicazioni secondo le quali le UV4 siano difettive anche nella riparazione per ricombinazione, come evidenziato da una forte sensibilità ad agenti "cross-linking" (Andersson et al., 2004) che potrebbero essere i responsabili dell'incremento di sensibilità di queste cellule. I nostri risultati sull'induzione degli SCEs, che si suppone essere una conseguenza dell'HRR, non supportano questa considerazione. Sebbene vi siano indicazioni che anche il BER sia implicato nella riparazione degli addotti indotti dal BPDE (Braithwaite et al., 1998), nelle cellule difettive nel BER (EM9), da noi analizzate, non abbiamo riscontrato nessun incremento di sensibilità in termini di aberrazioni cromosomiche. Per ciò che riguarda la frequenza di SCEs spontanei, nel protocollo sperimentale in presenza di BrdUrd per un solo ciclo cellulare, la frequenza risulta molto simile fra le diverse linee cellulari ad eccezione della linea EM9 che è nota avere una frequenza di SCEs molto elevata. Le linee più sensibili all'induzione di SCEs sono quelle difettive nel NER (UV4 e UV5) e quella difettiva nel NHEJ (V3-3). Le altre linee cellulari difettive nella riparazione, inclusa anche quella difettiva nella ricombinazione omologa (irs1SF) mostrano elevati livelli di SCEs spontanei se comparati alla linea parentale nel protocollo con due cicli in presenza di BrdUrd. Inoltre le linee cellulari irs1SF e EM9 non mostrano un aumento della frequenza di SCEs a seguito del trattamento con BPDE, mentre tutte le altre linee mostrano un andamento dose dipendente. Le linee cellulari difettive nell'HRR da noi analizzate mostrano un lieve incremento della frequenza spontanea di SCEs, mentre vi è una insignificante induzione di SCEs dopo trattamento col BPDE. Simili osservazioni sono state riportate anche per linee cellulari di hamster Cinese difettive nel gene BRCA2 (V-C8), nelle quali le frequenze spontanee di SCEs erano simili a quelle della linea selvatica e non è stato riscontrato nessun incremento a seguito del trattamento con mitomicina C (MMC) (Kraakman-van der Zwet et al., 2002). Generalmente si

assume che gli SCEs siano la conseguenza di fenomeni di ricombinazione omologa. Basandosi su questo concetto, ci si aspetta che le cellule difettive nell'HRR dovrebbero mostrare nessun o un lieve incremento dei livelli di SCEs, sia spontanei che indotti. I nostri risultati mostrano che mentre le frequenze spontanee di SCEs nella linea cellulare difettiva nell'HRR sono simili o più alte della linea parentale, quelle degli SCEs indotti sono molto più basse. Ciò sta ad indicare che i meccanismi di formazione degli SCEs spontanei possono essere differenti da quelli degli SCEs indotti. Inoltre abbiamo riscontrato un incremento di circa il 60% della frequenza di SCEs spontanei nel protocollo con due cicli cellulari rispetto a quello con un solo ciclo in presenza di BrdUrd nella linea difettiva nell'HRR indicando che le lesioni (molte, probabilmente, indotte dalla BrdUrd) portanti agli SCEs "spontanei" non vengono processati attraverso il meccanismo di riparazione per ricombinazione omologa. E' stato dimostrato che gli SCEs che si formano spontaneamente sono soprattutto l'effetto dell'incorporazione della BrdUrd nel filamento di DNA che viene utilizzato come stampo per la replicazione (Natarajan et al., 1981). Tutto ciò fa supporre che gli SCEs non possono insorgere esclusivamente come risultato della ricombinazione omologa ma probabilmente vi sono altri meccanismi attraverso cui si formano.

Dopo trattamento con **DBPDE**, invece, la linea cellulare più sensibile all'induzione di aberrazioni cromosomiche indotte è stata quella difettiva nella riparazione per escissione di basi (EM9) come anche la linea difettiva nella riparazione per ricombinazione omologa (irs1SF) ad indicare, quindi, che il BER e l'HRR sono i meccanismi di riparazione fondamentali nella rimozione delle lesioni indotte dal DBPDE che portano alla formazione delle aberrazioni cromosomiche. Al contrario le linee difettive nel NER (UV4, UV5 e UV61) non mostrano un aumento di sensibilità, ma un andamento simile alla linea parentale a tutte e tre le dosi utilizzate. Per ciò che riguarda la frequenza di SCEs spontanei, nel protocollo sperimentale in presenza di BrdUrd per un solo ciclo cellulare, la frequenza risulta molto simile fra le diverse linee cellulari ad eccezione della linea EM9. Le linee più sensibili all'induzione di SCEs sono quelle difettive nel BER (EM9) e nel NHEJ (V3-3). Le cellule trattate con differenti dosi di DBPDE e in presenza di BrdUrd per due cicli cellulari mostrano un aumento di SCEs solo nelle linee UV4, irs1SF e EM9, mentre le altre linee esibiscono un andamento simile tra i due protocolli sperimentali. Inoltre tutte le linee cellulari, eccetto le

irs1SF, mostrano un aumento della frequenza di SCEs dose dipendente a seguito del trattamento con DBPDE.

Il confronto della diversa sensibilità delle varie linee cellulari al BPDE ed al DBPDE ci ha consentito di fare delle ipotesi sul ruolo prevalente di alcuni meccanismi di riparazione nel rimuovere le lesioni indotte al DNA da tali agenti. Tali dati suggeriscono, infatti, l'importanza del NER per la resistenza cellulare al BPDE nell'induzione sia di aberrazioni cromosomiche che degli SCEs. Inoltre, evidenziano un possibile ruolo della ricombinazione omologa nella resistenza cellulare al BPDE solamente per ciò che riguarda le aberrazioni cromosomiche e del NHEJ solamente per ciò che riguarda gli SCEs. Nel trattamento col DBPDE sembra che il BER sia essenziale per la resistenza cellulare a questo composto nell'induzione sia di aberrazioni cromosomiche che degli SCEs, mentre il NHEJ svolge un ruolo importante per ciò che riguarda la resistenza soltanto agli SCEs e l'HRR solamente alle aberrazioni cromosomiche. Questi dati supportano quelli ottenuti da Braithwaite e collaboratori (1998), secondo i quali i meccanismi principalmente coinvolti nella rimozione degli addotti degli idrocarburi policiclici aromatici sono rappresentati dal "nucleotide excision repair"(NER) e dal "base excision repair" (BER).

BIBLIOGRAFIA

Aboussekhra, A., Biggerstaf, M., Shiviji, M.K.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Proti, M., Hybscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell.*, 80:859-868.

Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., et al. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res Rev.*, 463:111–72.

Andersson, B.S., Sadeghl, T., Siciliano, M.J., Lagerski, R and Murray, D. (2004). Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. *Cancer, Chemotherapy and Pharmacology*, 38:406-416.

Arand, M. and Oesch, F. (2002). In *Enzyme Systems That Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*, ed. Ioannides, C. (Wiley, New York), pp. 459–483.

Araujo, S.J. and Wood, R.D. (1999). Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutat. Res*, 435:23-33.

Avkin, S., Goldsmith, M., Velasco-Miguel, S., Geacintov, N., Friedberg, E.C. and Livneh, Z. (2004). Quantitative analysis of translesion DNA synthesis across a benzo[a]pyrene-guanine adduct in mammalian cells: the role of DNA polymerase κ . *JBC Papers in Press.*, pp. 1-32.

Barrows, L.R., Paxton, M.B., Kennedy, K.A. and Thompson, L.H. (1991). Characterization of revertants of the CHO EM9 mutant arising during DNA transfection. *Carcinogenesis*, 12:805-811.

Bartsch, H. (1996). DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship, *Mutat. Res.*, 340:67–79.

Beland, F.A. et al., (1983). Arylamine-DNA adducts in vitro and in vivo: their role in bacterial mutagenesis and urinary bladder carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, 49:125–134.

Bender, M.A., Griggs, H.G. and Bedford, J.S. (1974). Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemicals and ionising radiations, *Mutation Res.*, 23:197-212.

Benson, F.E., Baumann, P. and West, S.C. (1998). Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature*, 391:401–404.

Binkova, B., Giguere, Y., Rossner, P., Jr., Dostal, M. and Sram, R.J. (2000). The effect of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res.*, 471:57-70.

Block, W.D., Yu, Y. et al., (2004). Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucl. Acids Res.*, 32 (14):4351–4357.

Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W.S., Wang, W., Kashanchi, F. and Shiekhhattar, R. (2000). BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, 102:257–265.

Boffeta, P., Jourenkova, N. and Gustavsson, P. (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 8:444-472.

Bohr, V.A.(1994). Gene-specific damage and repair of DNA adducts and cross-links, *IARC Sci. Publ.K*, 125:361–369.

Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, IL., Knudsen. L.E. and

Norppa, H. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60:1619-1625.

Braithwaite, E., Wu, X. and Wang, Z. (1998). Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis*, 19(7):1239-46.

Braithwaite, E., Wu, X. and Wang, Z. (1999). Repair of DNA lesions: Mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat. Res.*, 424:207-219.

Brewen, J.G. and Peacock, W.J. (1969). The effect of tritiated thymidine on sister chromatid exchange in a ring chromosome. *Mutation Res.*, 7:433-440.

Bronner, C., Baker, S., Morrison, P., Warren, G., Smith, L., Lescoe, M., Kane, M., Earabine, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergard, P., Bollag, J., Godwin, A., Ward, D., Nordenskjold, M., Fishel, R., Kolodner, R. and Liskay, R. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*; 368:258-261.

Budman, J. and Chu, G. (2005). Processing of DNA for non homologous end-joining by cell-free extract. *The EMBO Journal*, 24:849-860.

Buening, M.K., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D.R., Akagi, H., Koreeda, M., Jerina, D.M. and Conney, A.H. (1978). Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7B,8A-dihydroxy-9A,10A-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc. Nat. Acad.Sci. USA*, 75:5358-5361.

Buters, J.T.M., Mahadevan, B., Quintanilla-Martinez, L., Gonzalez, F.J., Greim, H., Baird, W.M. and Luch, A. (2002). Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[a,l]pyrene-induced tumor formation. *Chem Res Toxicol*, 15:1127-1135.

Catcheside, D.G. and Lea, D.E. (1943). The effect of ionization distribution on chromosome breakage by X-rays. *J. Genet. Psychol.*, 45:186-196.

Cadelcott, K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2:955-969.

Cadelcott, K. and Jeggo, P. (1991). Cross sensitivity of gamma-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. *Mutat. Res.*, 255: 111-121.

Cattanach, B.M., Pollard, C.E. and Isaacson, J.H. (1968). Ethyl methanesulfonate-induced chromosome breakage in the mouse. *Mutation Res.*, 6:297-307.

Cavalieri, E.L., Higginbotham, S., RamaKrishna, N.V.S., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Rogan, E.G. and Salmasi, S. (1991). *Carcinogenesis*, 12,:1939–1944.

Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P. and Rao, V.N. (1999). The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*, 18:263–268.

Chan, D.W. and Lees-Miller S.P., (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, 271(5):8936–8941.

Chan, D.W., Chen, B.P. et al., (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.*, 16 (18):2333–2338.

Chang, W.H. and Kornberg, R.D. (2000). *Cell.*,102:609-613.

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

Chen, J., Silver, D.P., Walpiti, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M. and Scully, R. (1998). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell.*, 2:317-328.

Chen, L., Trujillo, K. et al., (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 275 (34):26196–26205.

Chen, P.L., Chen, C.F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z.D. and Lee W.H. (1998). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5287–5292.

Cheng, S., Hilton, B., Roman, J. and Dipple, A. (1989). DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 2: 334-340.

Cheng, L. et al., (2000). Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis, *Carcinogenesis*, 21:1527–1530.

Cheong, N., Wang, Y., Jackson, M. and Iliakis, G. (1992). Radiation-sensitive irls mutants rejoin DNA double-strand breaks with efficiency similar to that of parental V79 cells but show altered response to radiation-induced G2 delay. *Mutat. Res.*, 274:111-122.

Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. and Nicolas, J.F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosome by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Boil.*, 15:1968-1973.

Cleaver, J.E. (1968). Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum, *Nature*, 218:652–656.

Coin, F., Marinoni, J.C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M. and Egly, J.M. (1998). Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*, 20:184-188.

Cortés, F., Pinero, J. and Ortiz, T. (1993). Importance of replication fork progression for the induction of chromosome damage and SCE by inhibitors of DNA topoisomerases. *Mutat. Res.*, 303:71–76.

Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damaged response to double-strand breaks. *Science*, 286:1162-1166.

Cosman, M., Laryea, A., Fiala, R., Hingerty, B.E., Amin, S., Geacintov, N.E., Broyde, S. and Patel, D.J. (1995). Solution conformation of the (-)-*trans-anti*-benzo[c]phenanthrene-dA ([BPh]dA) adduct opposite dT in a DNA duplex: Intercalation of the covalently attached benzo[c]phenanthrenyl ring to the 3'-side of the adduct site and comparison with the (+)-*trans-anti*-[BPh]-dA opposite dT stereoisomer. *Biochemistry*, 34:1295-1307.

Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R. and West, S.C. (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell.*, 7:273–282.

de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R. and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell.*, 8:1129-1135.

de Jager, M., Wyman, C., van Gent, D.C. and Kanaar, R. (2002). DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP. *Nucleic Acids Res.*, 30:4425-4431.

de Laat, W.L., Appeldoorn, E., Sugawara, K., Weterings, E., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H. (1998b). DNA-binding polarity of human replication protein A position nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev*, 12:2598-2609.

Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S. and Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in *p53*. *Science*, 274:430–432.

Dignam, J.D. and Strobel, H.W. (1975). Preparation of homogeneous NADPH-cytochrome P450 reductase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63:845-852.

Ding, Q., Reddy, Y.V. et al., (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, 23(16):5836–5848.

Dipple, A., Moschel, R.C. and Bigger, C.A.H., (1984). Polynuclear aromatic carcinogens. In: Searle, C.E. (Ed.), *Chemical Carcinogens*, ACS Monograph, vol. 182. American Chemical Society Press, Washington DC, pp. 41– 163.

Dittrich, K. and Krugh, T.R. (1991). Mapping of (+/-)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to human c-Ha-ras protooncogene. *Chem. Res. Toxicol.*, 4: 277-281.

Douglas, P., Moorhead, G.B. et al., (2001). Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 276 (22):18992–18998.

Dreij, K., Seidel, A. and Jernstrom, B. (2005). Differential Removal of DNA Adducts Derived from *anti*-Diol Epoxides of Dibenzo[a,l]pyrene and Benzo[a]pyrene in Human Cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 18:655-664.

Duell, E.J., Wiencke, J.K., Cheng, T.J., Varkonyi, A., Zuo, Z.F., Ashok, T.D., Mark, E.J., Wain, J.C., Christiani, D.C. and Kelsey, K.T., (2000). Polymorphisms in the DNA

repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, 21 (5):965-971.

Dutrillaux, B., Fosse, A.M., Prieur, M. and Lejeune, J. (1974). Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatique humaines. *Chromosoma*, 48:327-340.

Dvir, A., Peterson, S.R. et al., (1992). Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (24):11920–11924.

Escalza, P., Pinero, J. and Cortés, F. (1989). A standardized method for the three way differential staining of plants chromosomes and the scoring of SCE per cell cycle. *Mutat. Res.*, 216:203–209.

Fields, W.R., Desiderio, J.G., Leonard, R.M., Burger, E.E., Brown, B.G. and Doolittle, D.J. (2004). Differential c-myc expression profiles in normal human bronchial epithelial cells following treatment with benzo[a]pyrene-4,5 epoxide, and benzo[a]pyrene-7,8-9,10 diol epoxide. *Molecular Carcinogenesis*, 40:79-89.

Fishel, R., Lescoe, M., Copeland, N., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with ereditary nonpolyposis cancer. *Cell*, 75:1027-1038.

Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. & Dogliotti, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, 37:3575–3580.

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

Frit, P. et al., (1999). *Biochimie*, 81, 27-38.

Fujiwara, Y., Masutani, C., Mizukoshi, T., Kondo, J., Hanaoka, F. and Iwai, S. (1999). Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein. *J. Biol Chem*, 274:20027-20033.

Fuks, F., Milner, J. and Kouzarides, T. (1998). BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene*, 17:2531–2534.

Fuller, L. and Painter, R.B. (1988). A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat. Res.*, 193: 109-121.

Gaillard, P.H. and Wood, R.D. (2001). Activity of individual ERCC1 and XPF subunits in DNA nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*, 29:872-879.

Gatei, M., Zhou, B.B., Hobson, K., Scott, S., Young, D. and Khanna, K.K. (2001). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies. *J. boil. Chem.*, 276:17276-17280.

Geacintov, N., Cosman, M., Hingerty, B., Amin, S., Broyde, S. and Patel, D.J. (1997). NMR solution structures of stereoisomeric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adducts: Principles, patterns, and diversity. *Chem. Res. Toxicol.*, 10: 111-146.

Geacintov, N. E., Broyde, S., Buterin, T., Naegeli, H., Wu, M., Yan, S. and Patel, D.J. (2002). Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the nucleotide excision repair machinery. *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)*, 65:202-210.

Geacintov, N.E., Naegeli, H., Dinshaw, J.P. and Broyde, S. (2005). Structural aspects of polycyclic aromatic carcinogen-damaged DNA and its recognition by NER proteins. In *DNA Damaged Recognition* (Siede, W., Kow, Y.W. and Doetsch, P.W., Eds.), Marcell Dekker Inc.

Gelboin, H.V. (1980). Benzo[a]pyrene metabolic activation and carcinogenicity: role and regulation of mixed function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.*, 60:1107– 1166.

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

Giles, A.S., Seidel, A. and Phillips, D.H. (1995). In vitro reaction with DNA of the fjord-region diol epoxides of benzo[g]chrysene and benzo[c]phenanthrene as studied by ³²P- postlabeling. *Chem. Res Toxicol.*, 8:591-599.

Goedecke, W., Eijpe, M., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M. and Heyting, C. (1999). Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat. Genet.*, 23(2):130-131.

Goldman R., Shields P.G. (2003). *Food Mutagens. J. Nutr.*, 133: 965S-973S

Goodman, M.F. (2000). *Trends Biochem. Sci.* 25, 189-195

Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.*, 72 (1):131– 142.

Gowen, L.C., Avrutskaya, A.V., Latour, A.M., Koller, B.H. and Leadon, S.A. (1998). BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damaged. *Science*, 281:1009-1012.

Guengerich, F.P., Daman, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V. and Kaminsky, L.S. (1982). Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P450: Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry*, 21:6019-6030.

Guengerich, F.P. (2000). Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 21:345–35.

Gum, J.R. and Strobel, H.W. (1981). Isolation of the membrane – binding peptide of NADPH – cytochrome P450 reductase. Characterization of the peptide and its role in the interaction of reductase with cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, 256:7478-7486.

Gunz, D., Hess, M.T. and Naegeli, H. (1996). Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair: evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J. Biol. Chem.*, 271:25089–25098.

Guo, J., Geacintov, N.E. and Broyde, S. (2003). Structural and thermodynamic studies of Dibenzo[a,l]pyrene diol epoxide DNA adducts. American Association for Cancer Research proceeding, pp 450.

Hagmar, L., Stromberg, U., Bonassi, S., Hansteen, IL., Knudsen, L.E., Lindholm, C. and Norppa, H. (2004). Impact of types of lymphocytes chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Research*, 64:2258-2263.

Hall, M., Grover, P.L. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbon: metabolism, activation and tumor initiation. In: Cooper, C.S., Grover, P.L. (Eds.) *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp. 327– 372.

Hanakahi, L.A. and West, S.C. (2002). Specific interaction of IP6 with human Ku70/80, the DNA-binding subunit of DNA-PK. *Embo J.*, 21 (8):2038–2044.

Hanakahi, L.A., Bartlett-Jones, M. et al., (2000). Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. *Cell*, 102 (6):721–729.

Harvey, R.G. (1991). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Chemistry and Carcinogenicity*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 11 –87.

Heddle, J.A. (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Res.*, 18:187-190.

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

Higginbotham, S., RamaKrishna, N.V.S., Johansson, S.L., Rogan, E.G. and Cavalier, E.L. (1993). *Carcinogenesis*, 14:875–878.

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

Hoffmann, D. and Hecht, S.S. (1990). Advances in tobacco carcinogenesis. In Cooper, C.S. and Grover, P.L. (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology—Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Springer-Verlag, Berlin, 94:63–102.

Houvras, Y., Benezra, M., Zhang, H., Manfredi, J.J., Weber, B.L. and Licht, J.D. (2000). BRCA1 physically and functionally interacts with ATF1. *J. Biol. Chem.*, 275:36230–36237.

Hoy, C.A., Thompson, L.H., Mooney, C.L. and Salazar, E.P. (1985). Defective DNA cross-link removal Chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents. *Cancer Res.*, 45: 1737-1743.

Hwang, B.J, Ford, J.M., Hanawalt, P.C. and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:424-428.

IARC, (1973). Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Man, vol. 3. Lyon, France.

IARC, (1983). Polynuclear aromatic compounds. Part I: chemical, environmental and experimental data. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Man, vol. 32. Lyon, France.

Jakoby, W.B. and Habig, W.H. (1980). Glutathione transferases. In *Enzymatic Basis of detoxification*: (Jakoby, W.B., eds.). Academic Press, New York; pp. 63-94.

Jeffy, B.D., Chirnomas, R.B., Chen, E.J., Gudas, J.M. and Romagnolo, D. (2002). Activation of the aromatic hydrocarbons receptor pathways is not sufficient for transcriptional repression of BRCA-1: requirement for metabolism of benzo[a]pyrene to 7r,8t-dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Cancer Res.*, 62: 113-121.

Johnson, R.E., Kovvali, G.K., Guzder, S.N., Amin, N.S., Holm, C., et al., (1996). Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J. Biol. Chem.*, 271:27987-27989.

Jones, N.J., Stewart, S.A. and Thompson, H. (1990). Biochemical and genetic analysis of the Chinese hamster mutants *irs1* and *irs2* and their comparison to cultured ataxia telangiectasia cells. *Mutagenesis*, 5: 15-23.

Jones, C.J. and Wood, R.D. (1993). Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry*, 32:12096-12104.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S. and Shibata, T. (2001). Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.*, 276:35201–35208.

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

- Kato, H. (1974). Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair. *Exptl. Cell Res.*, 85:239-247.
- Kato, H. (1974). Spontaneous sister chromatide exchanges detected by a BUdR-labelling method. *Nature (Lond.)*, 251:70-72.
- Kato, H. (1980). Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2:69–77.
- Katz, A.K., Carrel, H.L. and Glusker, J.P. (1998). Dibenzo[a,l]pyrene (Dibenzo[def,p] chrysene): fjord-region distortions. *Carcinogenesis*, 19:1641-1648.
- Khan, S.G., Muniz-Medina, V., Shahlavi, T. et al. (2002). The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res*, 30:3624-3631.
- Kilman, B.A. (1975). Sister chromatid exchanges in *Vicia Faba*. II. Effects of thiotepa, caffeine and 8-ethoxy-caffeine on the frequency of SCEs. *Chromosoma*, 51:11-18.
- Klungland, A. & Lindahl, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.*, 16:3341–3348.
- Koostra, A. (1982). Formation and removal of B[a]P diol epoxide–DNA adducts in human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 3:953–955.
- Koreeda, M., Moore, P.D., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H. and Jerina, D.M. (1978). Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science*, 199:778-781.
- Korenberg, J.R. and Freedlender, E.F. (1974). Giemsa techniques for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma*, 48:355-360.

Kraakman-van der Zwet, M., Overkamp, W.J.J., van Lange, R.E.E., Essers, J., Duijn-Goedhart, A., Wiggers, I., Swaminathan, S., van Buul, p.P.W., Errami, A., Tan, R.T.L., Jaspers, N.J.G., Sharan, S.K., Kanaar, R. and Zdzienicka, ;M.Z. (2002). Braca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a high frequency of spontaneous deletions. *Mol. Cell. Boil.*, 22:669-679.

Kramer, K.M., Brock, J.A. et al., (1994). Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, non-homologous recombination events. *Mol. Cell. Biol.*, 14 (2):1293–1301.

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

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

Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. and Sarasin, A. (2000). BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res.*, 60:5548-5552.

Lea, D.E. (1946). “Actions of radiations on living cells”. Cambridge University Press.

Lee, J. S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H. and Chung, J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damaged response. *Nature*, 404:201-204.

Lee, J.W., Blanco, L. et al., (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap-filling for non-homologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, 279 (1):805–811.

Legerski, R. and Peterson, C. (1992). Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C. *Nature*, 359:70-73.

Li, S., Chen, P.L., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Tomlinson, G., Osborne, C.K., Sharp, Z.D. and Lee, W.H. (1999). Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage *J. Biol. Chem.*, 274:11334–11338.

Li, S., Ting, N.S., Zheng, L., Chen, P.L., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lee, E.Y. and Lee, W.H. (2000). Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature*, 406:210–215.

Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J. and Jasin, M. (1998). Homology-directed repair is a major double-strand breaks repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5172-5177.

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

Little, S.B., Rabinowitz, J.R., Wei, P. and Yang, W. (1999). A comparison of calculated and experimental geometries for crowded polycyclic aromatic hydrocarbons and their metabolites. *Polycycl Arom Compd*, 14&15:53-61.

Liu, N., Schild, D., Thelen, M.P. and Thompson, L.H. (2002). Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucl. Acids Res.*, 30:1009–1015.

Lloyd, D.R. and Hanawalt, P.C. (2002). p53 controls global nucleotide excision repair of low levels of structurally diverse benzo[g]chrysene-DNA adducts in human fibroblast. *Cancer Res*, 62:5288-5294.

Loeb, L.A. (1994). Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 54:5059-5063.

Lu, A.Y.H. and West, S.B. (1978). Reconstituted mammalian mixed function oxidases: requirements, specificities and other properties. *Pharmacol. Ther. A.*, 2:337-358.

Lustig, A.J. (1999). The Kudos of non homologous end-joining. *Nature Genetics*, 23:130-131.

Ma, Y. and Lieber, M.R. (2002). Binding of inositol hexakisphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs. *J. Biol. Chem.*, 277 (13):10756–10759.

Ma, Y., Lu, H. et al., (2004). A biochemically defined system for mammalian non-homologous DNA end joining. *Mol. Cell.*, 16 (5):701–713.

Ma, Y., Pannicke, U. et al., (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in non-homologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108 (6):781–794.

MacLachlan, T.K., Takimoto, R. and El-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets. *Mol. Cell. Biol.*, 22:4280–4292.

Mahadevan, B., Dashwood, W.M., Luch, A., Pecaj, A., Doehmer, J., Seidel, A., Pereira, C. and Baird, W.M. (2003). Mutations Induced by (–)-*anti*-11*R*,12*S*-Dihydrodiol 13*S*,14*R*-Epoxide of Dibenzo[*a,l*]pyrene in the Coding Region of the Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase (*Hprt*) Gene in Chinese Hamster V79 Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41:131–139.

Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A. et al., (2002). Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end joining double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, 22 (14):5194–5202.

Marmorstein, L.Y., Ouchi, T. and Aaronson, S.A. (1998). The *BRCA2* gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13869–13874.

Masson, J.Y., Tarsounas, M.C., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Shah, R., Mcllwraith, M.J., Benson, F.E. and West, S.C. (2001). Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev.*, 15:3296–3307.

McCormick, J.J. and Maher, V.M. (1985). Cytotoxic and mutagenic effects of specific carcinogen-DNA adducts in diploid human fibroblasts, *Environ. Health Perspect.*, 62:145–155.

McGill, C.B., Shafer, B.K., Derr, L.K. and Strathern, J.N. (1993). Recombination initiated by double-strand breaks. *Curr. Genet.*, 23:305-314.

McLeod, M.C., Daylong, A., Adair, G. and Humphrey, R.M. (1991). Differences in the rate of DNA adduct removal and the efficiency of mutagenesis for two benzo[a]pyrene diol epoxides in CHO cells. *Mutat. Res.*, 261:267–279.

Meehan, T. and Straub, K. (1979). Double stranded DNA stereo-selectively binds benzo[a]pyrene diol epoxides. *Nature*, 277: 410-412.

Melendez-Colon, V.J., Smith, C.A., Seidel, A., Luch, A., Platt, K.L. and Baird, W.M. (1997). Formation of stable adducts and absence of depurinating DNA adducts in cells and DNA treated with the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene or its diol epoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13542-13547.

Melendez-Colon, V.J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W.M. (2000). Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem Res Toxicol*, 13:10 –17.

Mellon, I., Spivak, G. and Hanawalt, P.C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, 51:241–249.

Mellwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. and West, S.C. (2000). Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J. Mol. Biol.*, 304:151–164.

Melton, D.W., Ketchen, A.M., Nunez, F. et al. (1998). Cells from ERCC1-deficient mice show increased genome instability and a reduced frequency of S-phase-dependent illegitimate chromosome exchange but a normal frequency of homologous recombination. *J Cell Sci.*, 111:395-404.

Merkle, D., Douglas, P. et al., (2002). The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry*, 41 (42):12706–12714.

Miller, E.C. (1978). Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res.*, 38:1479–1496.

Miller, E.C. and Miller, J.A. (1966). Mechanism of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacol. Rev.*, 18:805–838.

Miller, J.A. and Miller, E.C. (1977). Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles, In: Hiatt, H. H., Watson, J.D. and Winsten, J. A. (eds.), *Origin of human cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 605-628.

Miller, K.A., Yoshikawa, D.M., McConnell, I.R., Clark, R., Schild, D. and Albala, J.S. (2002). RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *J. Biol. Chem.*, 277:8406–8411.

Milner, J., Ponder, B., Hughes-Davies, L., Seltsmann, M. and Kouzarides, T. (1997). Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*, 386:772–773.

Mitchell, J.R., Hoeijmakers, J.H. and Niedernhofer, L.J. (2003). Divide and conquer: Nucleotide excision repair battles cancer and aging. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15:232-240.

Modrich, P. (1994). Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, 266:1959-1960.

Moore, J.K. and Haber, J.E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of non-homologous end joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 16 (5):2164–2173.

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

Morgan, W.F., Corcoran, J., Hartmann, A., Kaplan, M.I., Limoli, C.L. and Ponnaiya, B. (1998). DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements and genomic instability. *Mutat. Res.*, 404: 125-128.

Morris, S.M. et al., (1984). Relationships between specific DNA adducts, mutation, cell survival and SCE formation, *Basic Life Sci.*, 29:353–360.

Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. and Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93:10729-10734.

Mu, D. and Sancar, A. (1997). Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J. Biol Chem*, 272:7570-7573.

Mu, D., Hsu, D.S. and Sancar, A. (1996). Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J. Boil Chem*, 271:8285-8294.

Nakanishi, Y. and Schneider, E.L. (1979). In vivo sister chromatid exchange: a sensitive measure of DANN damage. *Mutat. Res.*, 60:329-337.

Natarajan, A.T. and Obe, G. (1978). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations I. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mut. Res.*, 52:137-149.

Natarajan, A.T., Obe, G., van Zeeland, A.A., Palitti, F., Meijers, M. and Verdegaal-Immerzeel, E.A.M. (1980). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mut. Res.*, 69:293-305.

Natarajan, A.T., Csukas, I. and van Zeeland, A.A (1981). Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister chromatid exchanges induced by inhibitors of poly (ADP) ribose polymerase. *Mutation Research*, 84:125-132.

Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Zwanenburg, T.S.B. (1983). Influence of inhibitors of poly(ADP-ribose)-polymerase on DNA repair, chromosomal alterations and mutations. In: Miwa, M., Hayaishi, O., Shall, S., Smulson, M. and Sugimura, T. (eds.). ADP-ribosylation, DNA repair and cancer. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 227-242.

Nesnow, S., Ross, J.A., Mass, M.J. and Stoner, G.D. (1998). Mechanistic relationship between DNA adducts, oncogene mutations, and lung tumorigenesis in strain A mice. *Exp Lung Res*, 24:395– 405.

O'Donovan, A., Davies, A.A., Moggs, J.G., West, S.C. and Wood R.D. (1994). XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, 371:432-435.

Oesch, F. (1973). *Xenobiotica*, 3:305–340.

Oesch, F. and Guenthner, T.M. (1983). Effects of the modulation of epoxide hydrolase activity on the binding of benzo(a)pyrene metabolites to the DNA in the intact nuclei. *Carcinogenesis*, 4:57-65.

Oguri, T., Singh, S.V., Nemoto, K. And Lazo, J.S. (2003). The carcinogen (7R,8S)-dihydroxy-(9S,10R)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene induces Cdc25B expression in human bronchial and lung Cancer cells. *Cancer Res.*, 63: 771-775.

Olive, P.L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.*, 150: S42-S51.

Orel, N., Kyryk, A. and Puchta, H. (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *The Plant Journal*, 35:604-612.

Osborne, M.R., Jacobs, S., Harvey, R.G. and Brookes, P. (1981). Minor products from the reaction of (1) and (–) benzo[a]pyrene-anti-diolepoxide with DNA. *Carcinogenesis*, 12:553–558.

Otteneder, M. and Lutz, W.K. (1999). Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat. Res.*, 424:237–247.

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

Papadopoulos, N., Nicolaides, N., Wei, Y., Ruben, S., Carter, K., Rosen, C., Haseltine, W., Fleischmann, R., Fraser, C., Adams, M., Venter, J., Hamilton, S., Petersen, G., Watson, P., Lynch, H., Peltomaki, P., Mecklin, J., De la Chapelle, Kinzler, K. And Vogelstein, B. (1994). Mutation a MutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263:1625-1629.

Park, C.H. and Sancar, A. (1994). Formation of ternary complex by human XPA, ERCC1 and ERCC4 (XPF) excision repair proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:5017-5021.

Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z.O., Dogliotti, E. and Hubscher, U. (1999). Long-patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases δ and ϵ . *J. Biol. Chem.*, 274:33696–33702.

Paull, T.T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S.J. and Gellert, M. (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:6086-6091.

Perlow, R.A., Kolbanovskii, A., Hingerty, B.E., Geacintov, N.E., Broyde, S. and Scicchitano, D.A. (2002). DNA adducts from a tumorigenic metabolite of benzo[a]pyrene block human RNA polymerase II elongation in a sequence- and stereochemistry-dependent manner. *J. Mol. Biol.*, 321:29-47.

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

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

Pfeifer, G.P. and Denissenko, M.F. (1998). Formation and repair of DNA lesions in the *p53* gene: relation to cancer mutations. *Environ Mol Mutagen*, 31:197–205.

Pfeiffer, P. and Vielmetter, W. (1988). Joining of non-homologous DNA double-strand breaks in vitro. *Nucl. Acids Res.*, 16 (3):907–924.

Phillips, D.H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res.*, 443:139-147.

Poirier, M.C. and Beland, F.A. (1992). DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in animal models: implications for DNA adduct-based human cancer risk assessment, *Chem. Res. Toxicol.*, 5:749–755.

Puchta, H., Dujon, B. and Hohn, B. (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double-strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 21:5034-5040.

Qingyi, W. et al., (2000). Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study, *J. Natl Cancer Inst.*, 92:1764–1772.

Ralston, S.L., Lau, H.H., Seidel, A., Luch, A., Platt, K.L. and Baird, W.M. (1994). The potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene is metabolically activated to fjord-region 11,12-diol 13,14-epoxides in human mammary carcinoma MCF-7 cell cultures. *Cancer Res.*, 54(4):887–890.

Ralston, S.L., Lau, H.H.S., Seidel, A., Luch, A., Platt, K.L. and Baird, W.M. (1994b). Polycycl. Arom. Compds., 6:199–206.

Ralston, S.L., Lau, H.H., Seidel, A., Luch, A. and Baird, W.M., (1995). Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene to (-)-anti (11R,12S,13S,14R)- and (+)-syn(11S,12R,13S,14R)-11,12diol-13,14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis*, 16(12):2899-2907.

Ralston, S.L., Coffing, S.L., Seidel, A., Luch, A., Platt, K.L. and Baird W.M. (1997). Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene and its trans-11,12-dihydrodiol to fjord region 11,12-diol 13,14-epoxides in a human mammary carcinoma MCF-7 cell-mediated V79 cell mutation assay. *Chem Res Toxicol*, 10(6):687-93.

Reardon, J.T., Ge, H., Gibbs, E., Sancar, a., Hurwitz, J. and Pan, Z.Q. (1996). Isolation and characterization of two human transcription factor IIIH (TFIIH)-

related complexes: ERCC2/CAK and TFIIH. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:6482-6487.

Reddy, Y.V., Ding, Q. et al., (2004). Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J. Biol. Chem.*, 279 (38):39408–39413.

Renault, G., Gentile, A. and Chouroulinkov, I. (1982). Kinetics of induction of sister chromatid exchanges by X-rays through two cell cycles. *Mutat. Res.*, 94:359-368.

Revell, S.H. (1959). The accurate estimation of chromatid breakage and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 150:563-589.

Rommelaere, J., Susskind, M. and Errera, M. (1973). Chromosome and chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Chromosoma*, 41:243-257.

Ross, J.A. and Nesnow, S. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and *ras* oncogene mutations. *Mutat Res*, 424:155–166.

Roth, D.B. and Wilson, J.H. (1986). Non-homologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol. Cell. Biol.*, 6 (12):4295–4304.

Route, P., Smih, F. and Jasin, M. (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 91:6064-6068.

Rubin, H. (2001). Synergistic mechanism in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis (Lond.)*, 22: 1903-1930.

Rudin, N. and Haber, J.E. (1988). Efficient repair of HO-induced chromosomal breaks in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination between flanking homologous sequences. *Mol. Cell. Boil.*, 8:3918-3928.

Rundle, A., Tang, D., Hibshoosh, H., Estabrook, A., Schnabel, F., Cao, W., Grumet, S. and Perera, F. P. (2000). The relationship between genetic damaged from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*, 21(7):1281-1289.

Sancar, A. (1996). DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 65:43-81.

Sanchez-Cespedes, M., Ahrendt, S.A., Piantadosi, S., Rosell, R., Monzo, M., Wu, L., Westra, W.H., Yang, S.C., Jen, J. and Sidransky, D. (2001). Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res.*, 61: 1309–1313.

Sargent, R.G., Brenneman, M.A. and Wilson, J.H. (1997). Repair of site-specific double-strand breaks in mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Mol. Cell. Boil.*, 17:267-277.

Sasaki, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Tanahashi, M., Moriyama, S., Nakashima, Y., Fukai, L., Kiriya, M., Yamakawa, Y. and Fujii Y. (2001). Expression of Cdc25B gene as a prognosis maker in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.*, 173: 187-192.

Sauvain, J.J., Vu Duc, T. and Huynh, C.K. (2001). Development of an analytical method for the simultaneous determination of 15 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic nitrogen heterocyclic compounds. application to diesel particulates. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 371:966-974.

Sax, K. (1938). Induction by X-rays of chromosome aberrations in *Tradescantia* microspores. *Genetics*, 23:494-516.

Sax, K. (1940). An analysis of X-rays induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 25:41-68.

Sax, K. (1941). Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-rays. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 9:93-103.

Schinecker, T.M., Perlow, R.A., Broyde, S., Geacintov, N.E. and Scicchitano, D.A. (2003). Human RNA polymerase II is partially blocked by DNA adducts derived from tumorigenic benzo[c]phenanthrene diol epoxides: relating biological consequences to conformational preferences. Nucleic Acid Research, 31(20):6004-6015.

Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D. and Egly, J.M. (2000). Cell, 102:599-607.

Schwartzman, R.A. and Cidlowski, J.A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Rev., 14:133.

Seidel, A., Frank, H., Behnke, A., Schneider, D. and Jacob, J. (2004). Determination of dibenzo[a,l]pyrene and other fjord-region PAH isomers with MW 302 in environmental samples. Polycycl. Arom. Compd., 24:759-771.

Shaffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J. and Egly, J.M. (1994). The EMBO Journal, 13:2388-2392.

Shaffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncolin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., Chambon, P. and Egly, J.M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. Science, 260:58-63.

Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P. and Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. Nature, 386:804-810.

Shen, X., Sayer, J. M., Kroth, H., Ponten, I., O'Donnell, M., Woodgate, R., Jerina, D. M. and Goodman, M. F. (2002). *J. Biol. Chem.*, 277(7):5265-5274.

Shimada, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochrome P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.*, 95:1-6.

Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S, Guengerich, F.P., and Sutter, T.R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res*, 56:2979-2984.

Shivji, M.K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69:367-374.

Sijbers, A.M., van der Spek, P.J., Odijk, H. et al. (1996b). mutational analysis of the human nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res*, 24:3370-3380.

Sims, P. and Grover, P.L. (1974). Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, 20:165-274.

Singleton, M.R., Wentzell, L.M., Liu, Y., West, S.C. and Wigley, D.B. (2002). Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99:13492-13497.

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

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

Srivastava, D.K., Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E. and Wilson, S.H. (1998). Mammalian abasic site base excision repair.

Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem.*, 273:21203–21209.

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

Sum, E.Y., Peng, B., Yu, X., Chen, J., Byrne, J., Lindeman, G.J. and Visvader, J.E. (2002). The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. *J. Biol. Chem.*, 277:7849–7856.

Sundberg, K., Dreji, K., Seidel, A. and Jernstrom, B. (2002). Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 170-179.

Suri, A.K., Mao, B., Amin, S., Geacintov, N.E. and Patel, D.J. (1999). Solution conformation of the (+)-*trans-anti*-benzo[*g*]chrysene-dA adduct opposite dT in a DNA duplex. *J. Mol. Biol.*, 292:289-307.

Svejstrup, J.Q. (2002). Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3:21–29.

Svejstrup, J.Q. (2003). Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J. Cell Sci.*, 116:447–451.

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbial. Mol. Boil. Rev.*, 66:630-670.

Szeliga, J. and Dipple, A. (1998). DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem. Res. Toxicol.*, 11:1-11.

Takemasa, L., Yamamoyo, H., Sekimoto, M., Ohue, M., Noura, S., Miyake, Y., Matsumoto, T., Aihara, T., Tomita, N., Tamaki, Y., Sakita, L., Kikkawa, N., Matsuura, N., Shiozaki, H. and Monden, M. (2000). Over expression of Cdc25B phosphatase as a novel maker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, 60: 3043-3050.

Talaska, G. et al. (1987). The correlation between DNA adducts and chromosomal aberrations in the target organ of benzidine exposed, partially-hepatectomized mice, *Carcinogenesis*, 8:1899–1905.

Taylor, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labelled chromosomes. *Genetics*, 43:515-529.

Thacker, J. and Ganesh, N. (1990). DNA-break repair, radioresistance of DNA synthesis, and camptothecin sensitivity in the radiation-sensitive *irs* mutants: comparison to ataxia telangiectasia cells. *Mutat. Res.*, 235: 49-58.

Thakker, D.R., Yagi, H., Akagi, H., Koreeda, M., Lu, A.H., Levin, W. et al. (1977). Metabolism of benzo[a]pyrene. VI. Stereoselective metabolism of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol to diol epoxide. *Chem. Biol. Interact.*, 16: 281-300.

Thode, S., Schafer, A. et al., (1990). A novel pathway of DNA end-to-end-joining. *Cell.*, 60 (6):921–928.

Thompson, L.H. (1991). Properties and applications of human DNA repair genes. *Mut. Res.*, 247:213-219.

Thompson, L.H. And Schild, D. (2001). Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mut. Res.*, 477:131-153.

Thompson, L.H., Brookman, L.E., Dillehay, A.V., Carrano, J.A., Mazrimas, C.L., Mooney and J.L. Minkler (1982). A CHO cell strain having hypersensitivity to

mutagens, a defect in DNA strand-break repair and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 95: 427-440.

Thompson, L.H., Salazar, E.P., Brookman, K.W. and Hoy, C.A.(1983). Hypersensitivity to cell killing and mutation induction by chemical carcinogens in an excision repair-deficient mutant of CHO cells. *Mut. Res.*, 112:329-344.

Thompson, L., Mitchell, D., Regan, J., Bouffler, S., Stewart, S., Carrier, W., Nairn, R. and Johnson, R. (1988). *Mutagenesis*, 4:140–146.

Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J. and Abraham, R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.*, 14:2989-3002.

Troelstra, C., Odijk, H., de Wit, J., Westerveld, A., Thompson, L.H., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H.J. (1990). Molecular cloning of the human DNA repair gene ERCC6. *Mol. Cell Biol.*, 10:5806-5813.

van Dyck, E., Hajibagheri, N.M., Stasiak, A. and West, S.C. (1998). Visualisation of human Rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.*, 284:1027-1038.

van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A.A and Mullenders, L.H. (1995). Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts. *EMBO J.*, 14:360-367.

Venkatachalam, S., Denissenko, M. and Wani, A.A. (1995). DNA repair in human cells: quantitative assessment of bulky anti-BPDE–DNA adducts by non-competitive immunoassays. *Carcinogenesis*, 16:2029–2036.

Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A.T., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (1990). The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum

complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res*, 18:443-448.

Vermes, I. and Haanan, C. (1994). Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv. Clin. Chem.*, 31:177.

Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V. and Coon, M.J. (1981). Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.*, 256:266-277.

Walker, J.R., Corpina, R.A. et al., (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412 (6847):607–614.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, 14:927–939.

Weber, C.A., Salarzar, E.P., Stewart, S.A. and Thompson, L.H. (1988). Molecular cloning and biological characterization of a human gene, ERCC2, that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO1 UV5 cells. *Mol. Cell. Boil.*, 8:1137-1146.

Wei, Q. and Spitz, M.R. (1997). The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: a review. *Cancer Metastasis Rev.*, 16:295–307.

Wei, L.Y., Hou, R.F., Jan, K.Y. and Wang, T.C. (1993). Factors affecting zero background frequency of sister-chromatid exchange in mosquito cells. *Mutagenesis*, 8:179–182.

Wei, Q., Gu, J., Cheng, L., Bondy, M. L., Jiang, H., Hong, W. K., and Spitz, M. R. (1996). Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res.*, 56:3975–3979.

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

Whitlock, J.P. Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39:103-125.

Whitehouse, C.J. et al. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, 104:107–117.

Wienstein, I.B., Jeffrey, A.M., Jenet, K.W., Blobstein, S.H., Harvey, R.G., Harris, C., Autrup, H., Kasai, H. and Nakanishi (1976). Benzo[a]pyrene diol epoxide as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science*, 193:592-595.

Wiese, C., Collins, D.W., Albala, J.S., Thompson, L.H., Kronenberg, A. and Schild, D. (2002). Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucl. Acids Res.*, 30:1001–1008.

Wion, D. and Casadeus, J. (2006). N⁶-methylation-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 4:183-192.

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

Wolff, S. and Bodycote, J. (1975). The induction of chromatid deletions in accord with the breakage-and-reunion hypothesis. *Mut. Res.*, 29:85-91.

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

- Wong, A.K.C., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V. and Bartel, P.L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene Brca2. *J. Biol. Chem.*, 272:31941–31944.
- Wood, R. D., Robins, P. and Lindahl, T. (1988). Complementation of the *Xeroderma pigmentosum* DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell*, 53:97–106.
- Wood, R.D. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie*, 81:39-44.
- Wright, A.S. (1980). The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 75:215-241.
- Wu, J., Zhu, B.B., Yu, J., Zhu, H., Qiu, L., Kindy, M.S., Gu, L., Seidel, A. and Li, G.M. (2003). In vitro and in vivo modulations of benzo[c]phenanthrene-DNA adducts by DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Res.*, 31:6428-6434.
- Xu, B., Kim, S.T. and Kastan, M.B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G2-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol. Cell. Boil.*, 21:3445-3450.
- Xu, X., Weaver, Z., Linke, S.P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.W., Harris, C.C., Ried, T. and Deng, C.X. (1999). Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell.*, 3:389-395.
- Yang, S.K. and Gelboin, H.V. (1976). Microsomal mixed-function oxidases and epoxide hydratase convert benzo[a]pyrene stereospecifically to optically active dihydroxydihydrobenzo[a]pyrenes. *Biochem. Pharmacol.*, 25: 2221-2225.
- Yang, L.L., Maher, V.M. and McCormick, J.J. (1980). Error-free excision of the cytotoxic, mutagenic N2-deoxyguanosine DNA adduct formed in human fibroblasts by (+/-)-7 beta, 8 alfa-dihydroxy-9 alfa, 10 alfa-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proc. Natl. acad. Sci.*, 77:5933-5937.

Yarden, R.I., Pardo-Rcoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H. and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat. Genet.*, 30:285-289.

Yu, X. and Baer, R. (2000). Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J. Biol. Chem.*, 275:18541–18549.

Yu, X., Wu, L.C., Bowcock, A.M., Aronheim, A. and Baer R. (1998). The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, 273:25388–25392.

Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and BGlickman, B.W. (1999). Human DNA repair systems: on overwies. *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 3-20.

Zhang, Y., Wu, X., Guo, D., Rechkoblit, O., and Wang, Z. (2002). DNA Repair, 1(7):559-569

Zheng, L., Pan, H., Li, S., Flesken-Nikitin, A., Chen, P.L., Boyer, T.G. and Lee, W.H. (2000). Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Mol. Cell.*, 6:757–768.

Zwanembug, T.S.A.B. and Natarajan, A.T. (1984). 3-aminobenzamide-induced sister chromatid exchanges are dependent on incorporated bromodeoxyuridine in DNA. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 38:278-281.

RINGRAZIAMENTI

Questa tesi di Dottorato è stata svolta sotto la guida del Professor Fabrizio Palitti che ringrazio per la supervisione scientifica. Un ringraziamento particolare va alla Professoressa Roberta Meschini per i suggerimenti e l'apporto scientifico datomi. Ringrazio anche tutti i miei colleghi che mi sono stati di utile supporto nello svolgimento della sperimentazione scientifica.