



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"SCIENZE BIOMEDICHE ENDOCRINOLOGICHE  
E NEUROFISIOLOGICHE"

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Alessandro Martini

COINVOLGIMENTO DEL DOMINIO BRCT DI  
PARP1 NELLA VIA APOPTOTICA p53  
DIPENDENTE INDOTTA DA RAGGI UV

Settore Scientifico Disciplinare BIO/16

**Dottorando**

Dott. Catozzi Marco

**Tutore**

Dott. Previati Maurizio

Anni 2007/2009

## ABSTRACT

Il nostro lavoro è partito dai risultati ottenuti dal Dr. Stefano Volinia del dipartimento di Morfologia ed Embriologia sezione di Istologia dell'Università degli Studi di Ferrara e dal suo gruppo di lavoro; il quale mediante le tecniche del *T7 phage display* e del biopanning è riuscito ad isolare 4 peptidi in grado di legare fosfopeptidi derivanti dalla proteina p53 umana. L'analisi dei peptidi isolati ha permesso di ricondurli a porzioni ben precise di alcune proteine. Due sono stati riconosciuti come parte della proteina PARP1, uno dei due in particolare è stato identificato nel dominio BRCT di tale proteina. L'obiettivo del nostro lavoro è stato quindi, quello di valutare la possibile interazione fra BRCT e p53 e di cercare di valutare gli effetti di tale interazione sul pathway apoptotico p53 dipendente. PARP1 e p53 sono proteine coinvolte principalmente durante i processi di riparazione del DNA danneggiato da agenti genotossici. Nel caso in cui il sistema di riparazione fallisca, le due proteine contribuiscono attivamente all'induzione dell'apoptosi. Come prima cosa si è dovuto mettere a punto un modello di morte cellulare, nel quale, la morte doveva avvenire per apoptosi e le proteine PARP1 e p53 dovevano essere attivamente coinvolte in tale processo. La nostra scelta è ricaduta sulle cellule U2OS (Human Bone Osteosarcoma) e sulle radiazioni UV come agente per indurre il danno genotossico. Per verificare la funzionalità del modello, sono stati effettuati esperimenti in cui cellule esposte ai raggi UV sono state trattate con inibitori di p53, PARP1 e caspasi. In ogni caso si è osservata una riduzione della mortalità cellulare che ci ha confermato che la morte avviene per apoptosi caspasi dipendente e mediato dalle proteine PARP1 e p53. Il dato è stato confermato anche valutando l'aumento di espressione di p53 in seguito all'esposizione ai raggi UV. Il passo successivo è stato quello di verificare se avvenisse l'interazione fra BRCT e p53. L'ipotesi è stata confermata mediante affinity purification, in cui sfere funzionalizzate con gruppi BRCT-GST sono stati incubati con lisati di cellule trattate. I dati ottenuti oltre a confermare l'interazione hanno anche evidenziato che esiste una sostanziale differenza fra la cinetica dell'espressione di p53 che tende ad avere un massimo a 24 ore dal trattamento e quella della sua interazione con BRCT, che raggiunge un picco ad 8-10 ore dal trattamento per poi diminuire. Tutto ciò ci ha fatto supporre che qualche modificazione post-traduzionale avvenisse nella p53 in seguito al trattamento, l'ipotesi più accreditata è che si tratti di una fosforilazione. Come passo successivo si è voluto verificare se l'interazione sin qui studiata potesse avvenire anche

all'interno della cellula ed in caso affermativo valutare quale effetto essa potesse avere sulla cascata apoptotica. A tal fine, mediante trasfezione si sono ottenute due linee di cloni stabili, uno in grado di esprimere la proteina di fusione BRCT-GFP ed uno la sola GFP, utilizzato come controllo. In seguito ad esposizione alle radiazioni UV i cloni BRCT-GFP hanno mostrato una riduzione significativa della mortalità rispetto ai GFP. Il meccanismo da noi ipotizzato per giustificare tale effetto protettivo prevede la possibile competizione fra BRCT-GFP e PARP1 per il sito specifico di legame alla p53. Tale competizione ridurrebbe notevolmente la percentuale di PARP1 attivata, alterando la normale cascata apoptotica. Per supportare tale teoria una linea cellulare p53 negativa, le H1299 (cellule di carcinoma polmonare umano), è stata trasfettata con gli stessi vettori utilizzati per le U2OS. In seguito a trattamento non si è potuta apprezzare nessuna differenza fra i cloni esprimenti BRCT-GFP e quelli esprimenti la sola GFP. Per quanto riguarda le prospettive future, sarebbe interessante stabilire esattamente il meccanismo con cui BRCT svolge il proprio effetto protettivo, ed inoltre sarebbe di grande importanza scoprire quale evento regola l'interazione fra p53 e BRCT e quali aminoacidi siano coinvolti.

Parole chiave: BRCT, PARP-1, p53, apoptosi, radiazioni UV.

*Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is one of the most abundant proteins within mammalian cells. PARP-1 is an abundant nuclear enzyme involved in DNA repair and transcriptional regulation and is now recognized as a key regulator of cell survival and cell death as well as a master component of a number of transcription factors involved in tumor development and inflammation. PARP-1 is essential to the repair of DNA single-strand breaks via the base excision repair pathway. Despite many interesting studies that implicate PARP-1 in transcription, chromatin remodelling, apoptosis, DNA repair and several neurological disorders, its precise role is still unclear. The aim of my studies is represented by the involvement of the PARP-1 domain, BRCT in the induction of p53-dependent apoptotic pathway. The p53 protein is one of the most important tumor suppressor proteins. Normally, the p53 protein is in a latent state. However, in case of DNA damage, nucleotide depletion or hypoxia, when its activity is required, p53 becomes rapidly activated and initiates transcription of pro-apoptotic and cell cycle arrest-inducing target genes.*

*By means of the aid of T7 phage display have been the expression of a library of peptides able to bind Phosphopeptides; through biopanning and after several cycle of*

*selection 18 clones were isolated of which 9 phosphopeptides bound p53, but not able to bind non phosphorylated p53. The clones obtained were then amplified and further selected with an electrophoretic run; sequenced and the subsequent alignment of the sequences with those of protein database SwissProt: 2 clones (S4p5311 and S4p5316) results correspond to PARP-1 protein sequences, BRCT domain.*

*Therefore we developed a model of cell death, characterized by cells U2OS (Human Bone Osteosarcoma) treated with UV and after 24 hours of exposure we obtained a mortality of 50-60%. We then analyzed the morphological and immunochemistry markers that confirmed, our hypothesis, Death by UV irradiation happen by apoptosis; final confirmation is given to us by the study of cell vitality by colorimetric assay. Moreover we have studied how changes in the expression of p53 protein following treatment with UV, revealing an increase in time-dependent beginning 3 hours after treatment and with a maximum to 24 hours.*

*Furthermore by Affinity Purification, performed with functionalized beads with GST-BRCT group were incubated with cell lysates from cultures at different times of treatment. BRCT-p53 interaction occurs with a very different kinetics from the expression of p53. We supposed that the key event which regulates the interaction between p53 and BRCT is a phosphorylation and this interaction is able to reduce cell death after exposure to UV. To test whether the BRCT-p53 interaction could also occur within cells, we transfected some culture cell by using Lipofectamine, with two separate vectors. One, able to express a GFP and the other BRCT-GFP fusion protein. Then using immunoprecipitation technique we were able to verify the interaction occurred within the cell, between BRCT and p53, and we discovered a protective effect against apoptosis induced by UV radiation. We didn't see the same effect on the cells transfected only with the GFP vector, and again on a different line cells called H1299 which is p3 negative*

*In conclusion, we have validated the model of cell death developed by us for apoptosis experiment and we have characterized the interaction between BRCT and p53 in several biological condition. For the future we would like to discover if the phosphorylation represent the main even that regulates the interaction between p53 and BRCT, and how this mechanism performs its protective effect.*

*Keywords: BRCT, PARP1, p53, Apoptosis, UV Radiation*

# INDICE

<b>1.INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
<b>1.1 L' APOPTOSI</b>	<b>8</b>
1.1.1. FUNZIONI DEL PROCESSO APOPTOTICO	9
1.1.2.FATTORI CHE INDUCONO L' APOPTOSI	10
1.1.3 APOPTOSI vs NECROSI: ASPETTI MORFOLOGICI	12
1.1.4 FASI DELL' APOPTOSI	14
1.1.5 PATHWAY DELL' APOPTOSI	16
<i>1.1.5.1 Via estrinseca</i>	16
<i>1.1.5.2 Via intrinseca</i>	17
<b>1.2 MOLECOLE CON RUOLI DI RILIEVO NEL MECCANISMO APOPTOTICO</b>	<b>19</b>
1.2.1 LE CASPASI: GLI EFFETTORI DELLA MORTE CELLULARE PROGRAMMATA	19
1.2.2 PROTEINE DELLA FAMIGLIA Bcl-2: MODULATORI DELL' APOPTOSI	22
1.2.3 PROTEINA UMANA p53 (Hp53)	25
<i>1.2.3.1 Struttura</i>	25
<i>1.2.3.2 Modificazioni post-traduzionali di p53 e associazione con altre proteine</i>	28
<i>1.2.3.3 Attivita' trascrizionale di p53</i>	31
<i>1.2.3.4 Ruolo di p53 nelle patologie</i>	33
1.2.4 PARP	35
<i>1.2.4.1 PARP family: caratteristiche e funzioni</i>	36
<i>1.2.4.2 PARP-1</i>	39
1.2.5 INTERAZIONE TRA PARP-1 E p53	40
<i>1.2.5.1 Poli(adp-ribosil)azione</i>	41
1.2.6 BRCA1 e BRCT	43
<i>1.2.6.1 Mutazioni a carico di BRCA1</i>	46
<b>1.3 SCOPO DELLA TESI</b>	<b>47</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>48</b>
<b>2.1 MODELLO DI MORTE CELLULARE PER APOPTOSI P53 DIPENDENTE</b>	<b>48</b>
2.1.1 Le U2OS	48
2.1.2 TRATTAMENTO DELLE CELLULE U2OS CON UV	49
2.1.3 QUANTIFICAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE	50
<i>2.1.3.1 Saggio MTT</i>	50
<i>2.1.3.2 Saggio MTS</i>	51
2.1.4 STUDIO DEI MARKERS DELL' APOPTOSI	52
<i>2.1.4.1 Markers morfologici</i>	52
<i>2.1.4.2 Markers genici: tecnica Western Blot</i>	52
<b>2. 2 STUDIO DELL'INTERAZIONE p53 BRCT</b>	<b>55</b>
2.2.1 AFFINITY PURIFICATION	55
<i>2.2.1.1 Preparazione e immobilizzazione del ligando</i>	55

2.2.1.2 <i>Preparazione dei campioni e Affinity Purification</i>	58
<b>2.3 STUDIO DEL RUOLO DI BRCT</b>	<b>60</b>
2.3.2 TRASFEZIONE E SELEZIONE DEI CLONI	60
2.3.3 STUDIO DELLA VITALITA'	61
<b>2.4 PROTEZIONE BRCT SU CELLULE p53 NEGATIVE</b>	<b>62</b>
2.4.1 H1299	62
2.4.2 TRASFEZIONE E STUDIO DELLA VITALITA' CON CONTA CELLULARE	63
<b>2.5 INDAGINE STATISTICA</b>	<b>63</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>64</b>
<b>3.1 U2OS e UV: modello di morte cellulare</b>	<b>66</b>
3.1.1 ANALISI DI MARKER MORFOLOGICI MEDIANTE MICROSCOPIA	66
3.1.2 INIBITORI DELL'APOPTOSI E VITALITA'	67
3.1.3 QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI P53	70
<b>3.2 INTERAZIONE BRCT-p53</b>	<b>71</b>
<b>3.3 RUOLO DI BRCT NEL PROCESSO APOPTOTICO</b>	<b>72</b>
3.3.1 TRASFEZIONE DELLE CELLULE U2OS E LORO SUCCESSIVA SELEZIONE	72
3.3.2 EFFETTO DELL'INTERAZIONE P53-BRCT SULLA VITALITA'	75
3.3.2.1 <i>Conta cellulare</i>	75
3.3.2.2 <i>Saggio di vitalita' con mts</i>	76
<b>3.3 VALUTAZIONE DELLA MORTE CELLULARE IN CELLULE H1299</b>	<b>79</b>
<b>4. CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI</b>	<b>80</b>
<b>5. APPENDICI</b>	<b>82</b>
<b>5.1.APPENDICE 1: MTT</b>	<b>82</b>
<b>5.2 APPENDICE 2: MTS</b>	<b>84</b>
<b>5.3 APPENDICE 3: AFFINITY PURIFICATION</b>	<b>85</b>
<b>5.4 APPENDICE 4: TRASFEZIONE</b>	<b>88</b>
<b>6. RINGRAZIAMENTI</b>	<b>92</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>93</b>

# 1. INTRODUZIONE

Da alcuni decenni l'apoptosi o morte cellulare programmata è un meccanismo ampiamente studiato, in quanto negli esseri pluricellulari è coinvolto in numerosi processi fondamentali, come lo sviluppo embrionale, la rigenerazione dei tessuti e l'eliminazione di cellule con danni al genoma (Leist & Jaattela, 2001).

Le cellule, grazie ad una serie ordinata di eventi che costituiscono il ciclo cellulare, sono in grado di gestire il delicato equilibrio tra sopravvivenza e morte che le può indurre verso la proliferazione, la permanenza in uno stato di quiescenza oppure verso l'apoptosi.

Sono stati monitorati quattro punti fondamentali di controllo del ciclo cellulare (checkpoints) durante i quali, se vengono riscontrate anomalie nel genoma, il ciclo viene arrestato ed il danno viene riparato:

- arresto in fase G1, se il DNA risulta danneggiato;
- arresto in fase S se il DNA non si replica correttamente;
- arresto in fase G2, se il DNA risulta danneggiato;
- arresto in fase M, se si ha formazione impropria del fuso mitotico (Hartwell & Weinert, 1989).

Questi checkpoints, e di conseguenza il passaggio da una fase all'altra del ciclo cellulare, sono regolati da una serie di proteine (in particolare l'oncosoppressore p53) e dalle interazioni che avvengono tra queste. Un ruolo cruciale è attribuito alle modificazioni chimiche, la fosforilazione e la defosforilazione delle stesse proteine. Tuttavia, all'interno degli organismi si verificano situazioni nelle quali è impossibile, per la cellula, intervenire con i suoi meccanismi di riparazione che normalmente garantirebbero la stabilità genomica e quindi la sua sopravvivenza. Di fronte ad un danno cellulare irreparabile, la risposta dell'organismo è l'induzione della morte cellulare programmata o apoptosi (Pietenpol & Stewart, 2002; Lossi & Merighi, 2003).

E' noto che alterazioni del sofisticato meccanismo apoptotico o della sua regolazione, possono causare patologie degenerative nel caso vi sia una eccessiva mortalità cellulare, dovuta ad una iper-rattivazione del processo, oppure neoplasie in presenza di proliferazione incontrollata (Böhm & Schild, 2003).

Le conoscenze attuali sui meccanismi cellulari e molecolari dell'apoptosi già consentono di sviluppare strategie terapeutiche nei confronti di malattie come la quella di Alzheimer, di Parkinson, la sclerosi laterale amiotrofica e la retinite pigmentosa. Pertanto, risulta di particolare interesse continuare ad approfondire gli studi di questo meccanismo di morte.

## **1.1 L' APOPTOSI**

Come tutti gli organismi, anche la cellula va incontro a senescenza e a morte. Fino agli anni '70 si riteneva che la morte cellulare fosse la conseguenza solo di eventi traumatici o della morte dell'intero organismo. In seguito a studi sullo sviluppo e la metamorfosi degli invertebrati, risultò sempre più evidente l'esistenza di una morte cellulare di tipo fisiologico, che come tale poteva non causare infiammazione e dolore, avere delle finalità proprie, essere conseguenza della senescenza e contribuire all'omeostasi cellulare (Gluecksmann, 1951; Lockshin & Zakeri, 2001).

A quell'epoca, dal punto di vista morfologico si distingueva tra cariolisi e carioressi. La cariolisi corrispondeva a quanto si osserva in caso di necrosi, nella quale il nucleo, così come l'intera cellula, in seguito al rigonfiamento cellulare, sembrava dissolversi (processo chiamato lisi), rilasciando il suo contenuto nell'ambiente extracellulare. Il materiale cellulare così disperso causava reazione infiammatoria. (Majno & Joris, 1995). La carioressi, o frammentazione del nucleo, era invece caratterizzata dalla divisione in frammenti, sia del nucleo sia di tutta la cellula, i quali venivano prontamente fagocitati dalle cellule circostanti o da fagociti professionisti senza avere le conseguenze negative descritte per la necrosi. Questo ad oggi si riscontra invece nel processo apoptotico (Wyllie, 1992; Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003).

Nel 1965 fu utilizzato per la prima volta il termine "morte cellulare programmata" per descrivere un processo in cui la cellula si autodistrugge mediante una serie di eventi geneticamente programmati (Lockshin & Williams, 1965a, 1965b). Qualche anno dopo Kerr (1971) studiando l'atrofia del fegato di ratto, indotta mediante chiusura della branca maggiore dell'arteria porta, osservò che gli eventi che portavano alla morte degli epatociti mostravano una serie di configurazioni morfologiche ben precise. Egli notò un iniziale decremento del volume della cellula, seguito dal ripiegamento della membrana citoplasmatica, dalla condensazione della cromatina e dalla formazione di vescicole contenenti gli organelli. Questo meccanismo, identificato come una necrosi anomala,



l'anno successivo venne battezzato apoptosi (dal greco *απο* = cadere giù) (Kerr et al., 1972).

La successiva scoperta della frammentazione del DNA nelle cellule indotte alla morte per apoptosi fu descritto da Wyllie et al. (1980) essi notarono che facendo migrare questi frammenti su un gel, mostravano una tipica struttura a scala (conosciuta come ladder), suggerendo che i frammenti stessi fossero dei multipli dei nucleosomi.

Un'altra tappa importante nella ricerca sull'apoptosi fu la sua scoperta nel nematode *Caenorhabditis elegans*. Ellis & Horvitz (1986) dimostrarono come durante lo sviluppo embrionale di questo animale 131 cellule su 1090 venivano eliminate. In seguito è diventato evidente che l'apoptosi era controllata da speciali geni che furono chiamati *ced* (da *C. elegans death*). Alcuni di questi geni (*ced-3* e *ced-4*) inducevano apoptosi, mentre altri (*ced-9* ed *egl-1*) erano anti-apoptotici. Nei mammiferi *ced-3* e *ced-4* sono risultati omologhi delle caspasi e dell'Apaf-1 (Ellis et al., 1991).

### **1.1.1. FUNZIONI DEL PROCESSO APOPTOTICO**

Le cellule degli organismi pluricellulari non esprimono tutti i geni in loro possesso, ma attivano di volta in volta “pacchetti di geni specifici”, a cui corrispondono determinati “programmi cellulari”. La morte per apoptosi è per l'appunto uno di questi programmi, alla pari del differenziamento e della divisione cellulare, e comporta, come gli altri, una complessa rete di segnalazione inter-cellulare. La definizione di apoptosi come “morte cellulare programmata” o “suicidio cellulare” indica che tale processo è svolto attivamente dalla cellula, con dispendio di energia e per lo più con significato spesso altruistico, ossia viene attivato tutte le volte che il sacrificio di cellule singole risulta vantaggioso per l'organismo nel suo complesso (Lewis, 2000; Leist & Jaattela, 2001).

Una delle funzioni dell'apoptosi all'interno di un organismo pluricellulare è quello di contribuire, insieme alla mitosi, al mantenimento dell'omeostasi numerica. I due processi si devono equilibrare tra loro in ogni tessuto e in ogni momento della vita dell'organismo, nell'accrescimento come nella vita adulta, nel normale turn-over come in presenza di patologie. Inoltre, un loro squilibrio ha potenzialmente conseguenze molto gravi (aplasia o iperplasia) (Leist & Jaattela, 2001; Bohm & Schild, 2003).

Nello sviluppo embrionale e fetale come nella metamorfosi, l'apoptosi porta all'eliminazione di tutte le strutture vestigiali, o che svolgono un ruolo solo durante una

precisa fase dello sviluppo, come ad esempio le membrane interdigitali che restano dopo la formazione delle dita nei mammiferi, oppure, negli anuri, la coda del girino durante la metamorfosi in rana. L'apoptosi ha un vero e proprio ruolo morfogenetico nello sviluppo del sistema nervoso; infatti, il numero, inizialmente elevatissimo dei neuroni, si riduce progressivamente per morte di quelle cellule che non sono state in grado di stabilire le corrette relazioni tra di loro e con quelle bersaglio (Lewis, 2000).

Anche il normale turn-over tissutale si avvale della morte cellulare programmata per eliminare le cellule usurate, questo fenomeno si osserva negli strati superficiali degli epitelii di rivestimento pluristratificati o all'apice dei villi intestinali, dove la proliferazione delle cellule dello strato basale deve procedere con lo stesso ritmo della morte delle cellule senescenti (Zhang et al., 2002).

Nel sistema immunitario, l'eliminazione selettiva delle cellule timiche autoreattive e lo spegnimento dei cloni alla fine di una risposta immunitaria, si avvalgono dell'apoptosi. Le cellule citotossiche del sistema immunitario inducono quelle bersaglio al suicidio cellulare inserendovi un enzima analogo alle caspasi. L'apoptosi è quindi molto importante nel sistema immunitario, sia durante l'ontogenesi, sia nell'omeostasi, sia nel meccanismo dell'immunità cellulo-mediata (Krammer et al., 1994).

### **1.1.2. FATTORI CHE INDUCONO L'APOPTOSI**

I meccanismi che portano all'esecuzione attiva della morte cellulare programmata, sono stati quasi completamente delucidati, mentre resta molto da capire a livello di segnalazione, regolazione ed induzione di questo processo.

Per quanto riguarda la regolazione e l'induzione dell'apoptosi, un ruolo molto importante è giocato dai fattori di crescita (*Growth Factors*), che non hanno solo la funzione di indurre la proliferazione cellulare, ma svolgono il ruolo di veri e propri fattori di sopravvivenza. Normalmente essi sono presenti in quantità limitante, per alcuni tipi cellulari la capacità di legarne a sufficienza ne determina il destino nel corso della vita post-natale, questo meccanismo consente di adattare, in modo molto rapido, differenziamento e proliferazione di alcune cellule staminali al fabbisogno dell'organismo. Ad esempio, le cellule emopoietiche pluripotenti sono prodotte nel midollo osseo in numero superiore alle necessità basali, se non si verificano infezioni o emorragie, molte di esse sono destinate ad andare in apoptosi. Tuttavia, in caso di

necessità, basterà che l'organismo produca una quantità superiore al normale di un dato fattore o di una combinazione di fattori per indurre sopravvivenza, proliferazione e differenziamento specifico di un numero di cellule superiore al fabbisogno basale (Granérus & Engström, 2008).

Gli ormoni possono anch'essi costituire fattori di sopravvivenza per alcune cellule, due esempi significativi sono costituiti dalle cellule ghiandolari mammarie, le quali, alla fine della lattazione, quando viene a cessare lo stimolo della prolattina, vanno incontro ad apoptosi. Lo stesso vale anche per le metastasi di alcuni tumori prostatici, che dipendono dalla presenza di androgeni (Kiess & Gallaher, 1998).

Per alcuni tipi cellulari il contatto cellula-cellula e/o cellula-matrice extracellulare costituisce un fattore di sopravvivenza; il segnale, mediato da una chinasi della famiglia FAK (*Focal Adhesion Kinase*) si propaga da zone specializzate della superficie cellulare in cui alcune proteine di membrana mediano il rapporto con il citoscheletro. Qualora si verifichi la mancanza di contatto, queste cellule si auto-percepiscono come "inutili" o potenzialmente metastatiche e il suicidio cellulare risulta la risposta a tale percezione. Questo meccanismo consente di eliminare le cellule in eccesso che non abbiano stabilito le giuste connessioni, nel corso dello sviluppo embrionale (Hague et al., 1997).

Molte sostanze tossiche quali, farmaci (tra cui numerosi antitumorali), radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e radiazioni ionizzanti (UV), causano danni al DNA o gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri, tutte queste condizioni, qualora superino una certa soglia, possono indurre la morte per apoptosi. Nel caso del danno genotossico, questo "suicidio altruistico" è molto importante, in quanto, le cellule il cui DNA è stato gravemente danneggiato e non può essere riparato fedelmente, potrebbero subire una trasformazione in senso neoplastico (Böhm & Schild, 2003).

Le infezioni virali fanno anch'esse scattare nella cellula un meccanismo che tende a indurre apoptosi, per difendere l'organismo stesso dalla propagazione virale. Questo meccanismo può però determinare una grave carenza di alcuni tipi cellulari, come si verifica nel caso di infezione da HIV nella quale le cellule colpite sono proprio un tipo di linfociti, destinati alla difesa immunitaria. I virus, come spesso accade, possono però mettere in atto delle contromisure, inducendo la sintesi di inibitori dell'apoptosi (Hardwick, 1997; Lockshin & Zakeri, 2001).

### 1.1.3 APOPTOSI vs NECROSI: ASPETTI MORFOLOGICI

La necrosi o morte cellulare accidentale si distingue dalla sia dal punto di vista morfologico, sia biochimico dalla morte cellulare programmata (Vermees et al, 2000). La prima avviene in seguito a gravi ed irreversibili danni patologici come l'ipossia, l'ipertermia, l'infezione virale o l'esposizione a vari agenti tossici (Israels, 1999). Questi eventi causano un rigonfiamento delle cellule con formazione inizialmente di piccole vescicole, in seguito si osserva dilatazione dei mitocondri e formazione di grosse vescicole. A questo segue la lisi degli organelli cellulari e del nucleo, dovuta alla perdita dell'integrità delle membrane stesse. La conseguenza di questi eventi è il rilascio del contenuto degli organuli nel cistosol (ATP, proteasi e lisozimi) e la degradazione aspecifica del DNA. Infine, si ha lo scoppio della cellula con rilascio del materiale citoplasmatico nel mezzo extracellulare, questo fenomeno richiama una risposta infiammatoria (Majno & Joris, 1995) (Fig. 1).

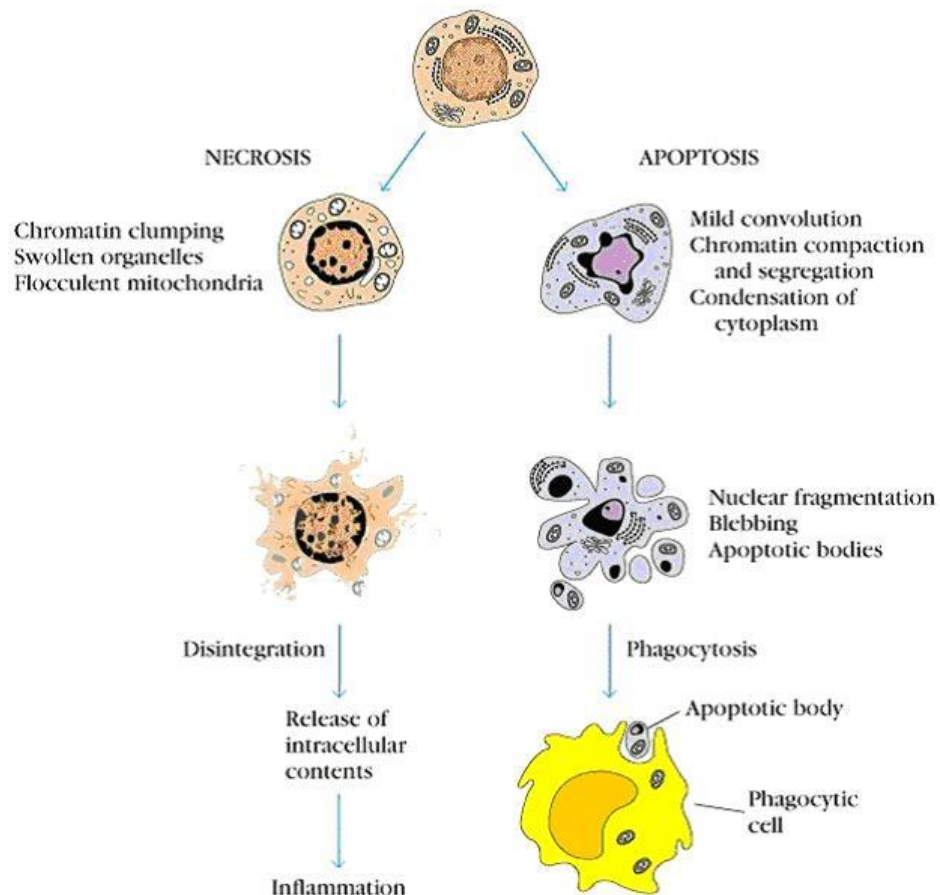


Figura 1: Apoptosi e necrosi a confronto.

Durante l'apoptosi, invece, si ha una serie di eventi ordinati e standardizzati. Dal punto di vista morfologico, nella fase iniziale del processo la cellula diventa sferica e si restringe (shrinkage) perdendo il contatto con le cellule adiacenti. Questo avviene perché le proteine del citoscheletro vengono digerite da specifiche proteasi (chiamate caspasi) che sono state attivate all'interno del citoplasma. In seguito, mentre gli organelli cellulari rimangono intatti la cromatina comincia a condensarsi (picnosi) in corpi addossati alla membrana nucleare. Più tardivamente si assiste alla disgregazione del nucleolo ed alla frammentazione della cromatina in porzioni di circa 200 paia di basi (Granville et al., 1998), questo taglio avviene ad opera di endonucleasi attive solo durante il processo apoptotico (Enari et al., 1998). I granuli di cromatina così degradata vengono successivamente circondati da evaginazioni della membrana stessa che conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (blebbing). Il nucleo quindi si rompe in corpi apoptotici detti anche "corpi cromatinici" o "unità nucleosomiali" che si staccano dal corpo cellulare e che successivamente vengono fagocitati dai macrofagi o da cellule vicine, senza che ci sia una reazione infiammatoria (Wyllie, 1992; Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003) (Fig. 1).

Il processo apoptotico, a differenza di quello necrotico, essendo molto complesso, richiede alti livelli di ATP, a seconda di quanto ATP è presente all'interno della cellula è possibile sapere se essa morirà per apoptosi o per necrosi (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997).

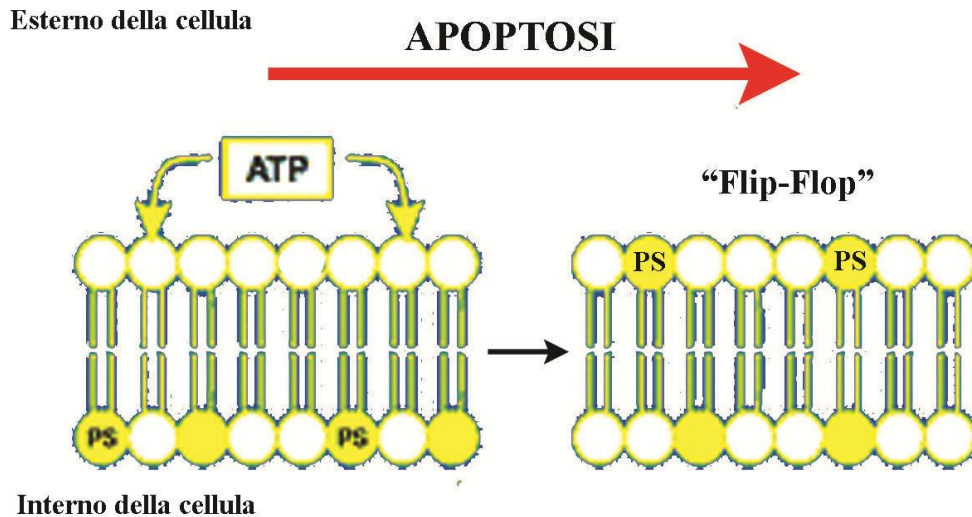
#### 1.1.4 FASI DELL'APOPTOSI

Gli studi condotti sul nematode *C. elegans* permisero di suddividere il processo apoptotico in tre fasi:

- 1) induzione;
- 2) esecuzione;
- 3) riconoscimento e fagocitosi.

Negli eucarioti superiori, la fase di induzione è regolabile e reversibile, in quanto vede un “colloquio incrociato” (*cross-talk*) tra stimoli contrastanti (segnali di sopravvivenza e segnali di morte). La prima fase comincia con l'arrivo di segnali, interni o esterni alla cellula mediati da recettori, oppure fisici o genotossici (l'espressione di oncogeni etc.). L'induzione è caratterizzata dall'individuazione di questi segnali da parte della cellula, che, come risposta attiva via multiple di trasduzione e amplificazione del segnale. Segue la fase esecutrice, durante la quale la macchina apoptotica agisce portando a morte la cellule attraverso vari pathways, che convergono nell'attivazione finale delle caspasi (*cysteinyl aspartate proteinases*). In questa seconda fase vengono attivate svariate proteine mentre altre sono inibite, nel complesso si verifica una cascata di eventi proteolitici e nucleolitici preordinati, che amplificano il segnale e portano alle tipiche modificazioni morfologiche dell'apoptosi. La finalità della morte cellulare programmata è quella di predisporre la cellula ad essere facilmente fagocitata impedendo la fuoriuscita di materiale potenzialmente pro-infiammatorio o immunostimolante. Nella fase successiva, quindi, intervengono dei sistemi di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

La superficie della cellula apoptotica (o dei corpi apoptotici in cui si è frammentata) espone segnali “eat-me” (letteralmente, *mangiami*), come la fosfatidilserina (PS). Infatti, nel corso del processo apoptotico, una delle prime modificazioni della cellula riguarda i fosfolipidi della membrana plasmatica. La PS, localizzata di norma nello strato citosolico, viene esposta su quello esterno con un meccanismo nominato a “flip-flop” (Fig. 2).



**Figura 2:** Meccanismo a “flip-flop” di esposizione della fosfatidil-serina (PS).

Questo fenomeno è sufficiente per segnalare la cellula ai macrofagi, che percepiscono l’esposizione della PS come un segnale di appetibilità. Inoltre, la cellula emette molecole chemiotattiche che richiamano i macrofagi professionisti, infatti alla fosfatidilserina si associano anche altre molecole normalmente citoplasmatiche, come anche ulteriori alterazioni delle molecole di superficie, con variazioni che coinvolgono anche gli oligosaccaridi del glicocalice. Tutte queste modificazioni sono percepite da monociti e macrofagi grazie ad una numerosa schiera di recettori di superficie, tra cui molecole di tipo lectinico (che legano glucidi) (Böhm & Schild, 2003).

Può accadere che la cellula apoptotica non venga fagocitata e una volta esaurita l’energia disponibile, essa non riuscendo più a mantenere le proprietà di impermeabilità della membrana vada incontro a necrosi secondaria (Van Cruchten & Van den Broeck, 2002).

### 1.1.5 PATHWAY DELL'APOPTOSI

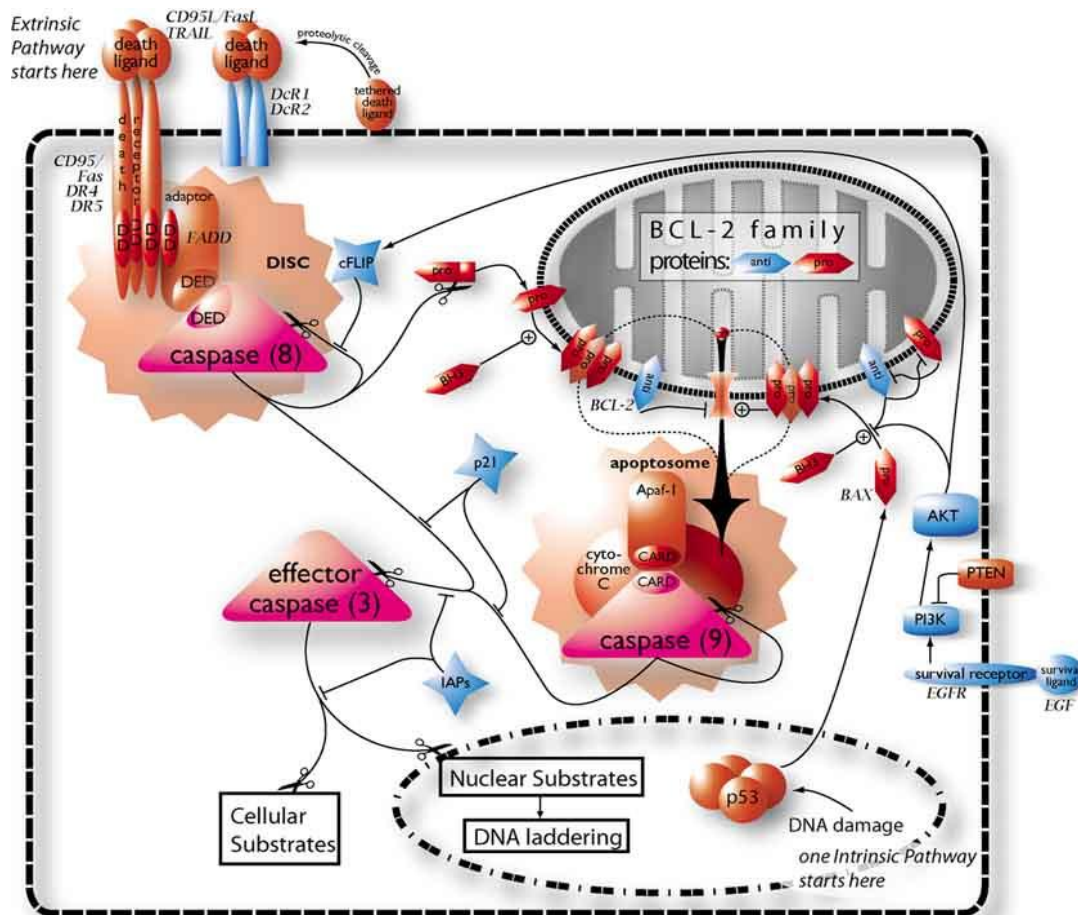
I diversi stimoli ed eventi apoptogenici seguono due (o forse più) distinti pathways, uno attivato da "segnali di morte" che giungono a specifici recettori di superficie (via recettoriale, o estrinseca), l'altro attivato da segnali endogeni e regolato dal mitocondrio (via mitocondriale, o intrinseca). Queste due vie sono reversibili e regolabili fino a quando non convergono alla attivazione delle caspasi, le principali esecutrici della morte cellulare (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006).

#### 1.1.5.1 Via estrinseca

L'innescò della via estrinseca è conseguenza dall'attivazione di specifici recettori di membrana chiamati recettori di morte. Questi appartengono alla famiglia del Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) tra i quali si conoscono il Fas (anche conosciuto come CD95 o Apo-1), il TNF-R1, TRAIL-R1 e il TRAIL-R2 e infine il DR3, il DR4, il DR5, e il DR6 (Sartorius et al., 2001; Ashkenazi, 2002). Questi recettori possiedono un dominio extracellulare ricco di cisteina, uno di transmembrana e infine, uno citoplasmatico, chiamato dominio di morte (*Death Domain*= DD).

I ligandi possono essere solubili (secreti) o essere presenti sulla superficie di altre cellule che entrano in diretto contatto con quella "condannata a morte". Una volta legata la molecola-segnaie, i recettori trimerizzano alterando la conformazione del DD, ciò favorisce il reclutamento di proteine adattatrici (*Fas-Associated Death Domain*= FADD, *TNFR-Associated Death Domain*=TRADD e *FLICE-Associated Huge protein*= FLASH) presenti nel citoplasma e che si vanno a legare, con interazioni omotipiche, ai DD formando un complesso chiamato DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003). Grazie alla presenza di un dominio DED (*Death Effector Domain*) presente sul DISC, questo complesso recettore-adattatori è in grado di legare una pro-caspasi iniziatrice, la pro-caspasi-8. Quest'ultima viene attivata proteoliticamente a caspasi-8 la quale è così in grado di attivare altre proteine tra le quali la caspasi-3, la quale è indispensabile per l'esecuzione della morte cellulare programmata (Krammer, 2000; Böhm & Schild, 2003; Gewies, 2003; Mandic, 2003) (Fig. 3).





**Figura 3:** schema dei pathways apoptotici, via estrinseca e via intrinseca (Bögler & Weller, 2002).

### 1.1.5.2 Via intrinseca

La via di segnalazione mitocondriale, si può considerare alternativa a quella recettoriale, essa integra e propaga segnali di morte, che si originano dentro alla cellula in seguito al danneggiamento del DNA, ad uno stress ossidativo, allo shock termico, all'eliminazione di fattori di crescita, alla somministrazione di un chemioterapico o di radiazioni UV. La via estrinseca può altresì convergere sul quella mitocondriale, indicando una interazione tra i due pathway (Kaufmann & Earnshaw, 2000; Wang, 2001; Mandic, 2003; Fumarola & Guidotti, 2004) (Fig. 3).

Anche nella via di segnalazione intrinseca si ha la formazione di un complesso che comprende sette molecole dell'adattatore APAF-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) (analogo a *ced-4*) che assieme ai dATPs reclutano altrettante molecole di una pro-caspasi iniziatrice, la pro-caspasi-9. Sia l'APAF-1 sia la pro-caspasi-9 possiedono un

dominio CARD (*caspiasi recruiting domain*), grazie al quale interagiscono. Il complesso di origine mitocondriale, chiamato apoptosoma, comprende anche diverse molecole di citocromo-C (Li et al. 1997; Zou et al., 1997). L'insieme di queste molecole causa l'attivazione della caspasi-9 la quale è a sua volta in grado di attivare la caspasi-3 e indurre di conseguenza la morte cellulare (Slee et al., 1999; Van de Craen et al., 1999; Böhm & Schild, 2003) (Fig. 3).

Il mitocondrio è un organulo la cui matrice mitocondriale è infatti circondata da due membrane, una interna (MI) e una esterna (ME) che delimitano uno spazio intermembrana contenente varie molecole di ATP sintetasi e le componenti della catena respiratoria. Normalmente queste molecole creano un potenziale di membrana (PT) o gradiente elettrochimico. Quando alla cellula giungono segnali di morte molti di questi agiscono sul mitocondrio alterando il PT e la permeabilità delle sue membrane. Questo evento è seguito dall'induzione di una cascata di processi che hanno come evento ultimo la formazione di pori sulla ME e conseguente rilascio nel citoplasma di proteine pro-apoptotiche presenti nello spazio tra le due membrane mitocondriali, come APAF-1 e il citocromo-C prima menzionati (Bernardi et al., 1999; Loeffler & Kroemer, 2000), inoltre, si ha il rilascio di ioni  $Ca^{2+}$  dalla matrice mitocondriale (Zoratti & Szabo, 1995) ma anche altre proteine che sono in grado di modulare l'apoptosi, alcune in maniera caspasi indipendente. Tra quest'ultime si conoscono il fattore AIF (*apoptosis-inducing factor*) il quale traslocando al nucleo, media la frammentazione del DNA (Susin et al., 1999) e la endonucleasi G (Li et al., 2001a). Altre proteine rilasciate al mitocondrio e invece caspasi-dipendenti sono la Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspasi/direct IAP-binding protein with low pI*) che previene l'inattivazione della caspasi-3, della -7 e della -9 operata dalle IAP (proteine inibenti l'apoptosi) inibendo le IAP stesse (Verhagen et al., 2000; Srinivasula et al., 2001; Breckenridge & Xue 2004) ed infine la serin proteasi HtrA2/Omi che ha un meccanismo simile alla Smac/DIABLO (Suzuky et al., 2001; Verhagen et al., 2002).

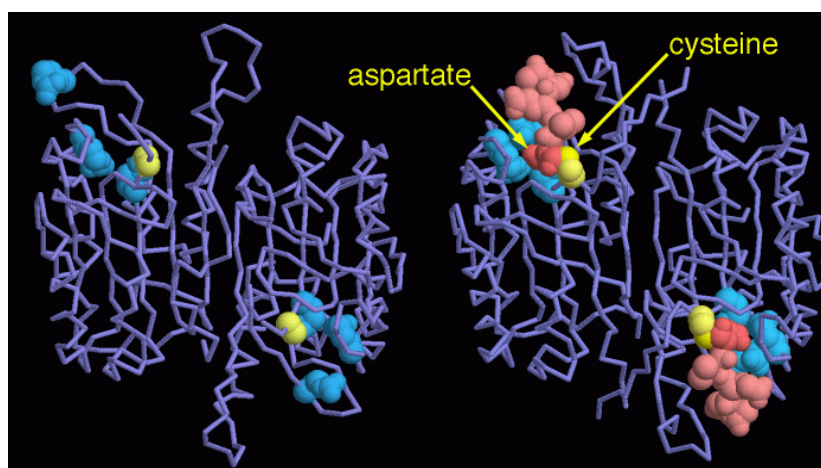
Il mitocondrio è interessato dai fenomeni di apoptosi anche se il segnale parte dai recettori di membrana e interessa quindi la via estrinseca. Infatti, è documentato che la caspasi-8 media il taglio di una proteina citosolica, il Bid la quale, trasloca sulla membrana mitocondriale favorendo il rilascio del citocromo-C e la successiva attivazione della caspasi e quindi la via intrinseca (Luo et al., 1998 Gross et al. 1999) (Fig. 3).

## 1.2 MOLECOLE CON RUOLI DI RILIEVO NEL MECCANISMO APOPTOTICO

Come è già stato citato, sono numerose le molecole coinvolte nella cascata apoptotica. Fra le varie famiglie di proteine, senza dubbio la più studiata è quella delle Caspasi, esse infatti esplicano la loro attività alla fine del processo apoptotico e vengono attivate indipendentemente dalla via (intrinseca od estrinseca) che ha indotto la morte cellulare. Anche le proteine della famiglia Bcl-2 (*B-cell lymphoma gene 2*) sono molto studiate come importanti modulatori dell'apoptosi. In questa tesi inoltre, verranno prese in considerazione altre proteine con ruolo regolatore come p53 e PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*) coinvolte soprattutto nella risposta al danno genotossico indotto da agenti tossici e raggi ultravioletti, particolare attenzione è stata posta sulla loro interazione.

### 1.2.1 LE CASPASI: GLI EFFETTORI DELLA MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

Le caspasi sono una famiglia di cisteina-endoproteasi coinvolte sia nell'attivazione di citochine pro-infiammatorie che nella morte cellulare programmata. Possiedono una cisteina nel loro sito catalitico e tagliano le molecole bersaglio a livello di un residuo di aspartato, da qui deriva il loro nome. (Gorman et al., 1998; Marks & Berg, 1999; Strasser et al., 2000) (Fig. 4).



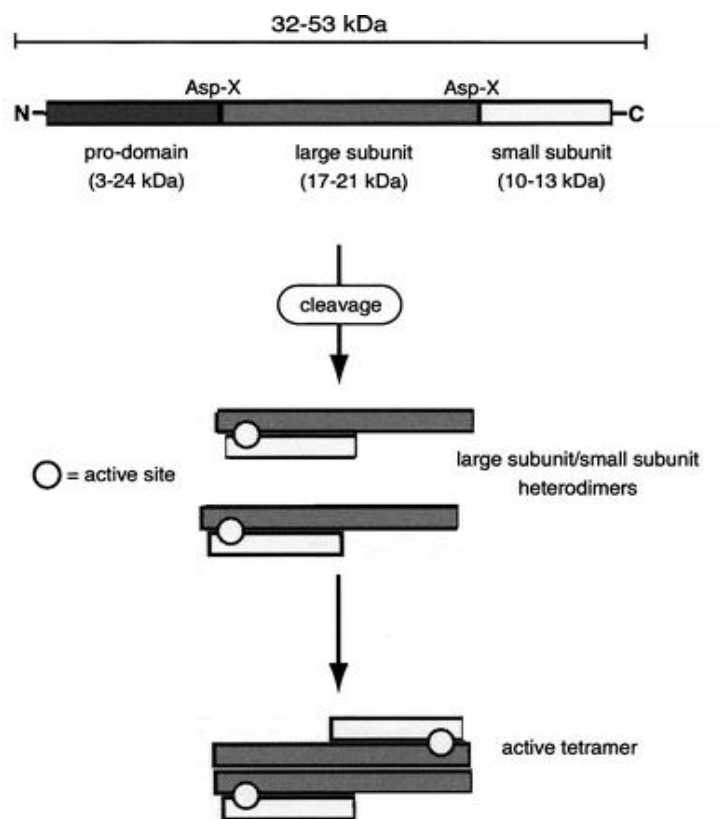
**Figura 4:** Sito catalitico delle caspasi (di David S. Goodsell).

Si conoscono due tipi di caspasi:

- **“iniziatrici”** (caspasi-2, -8, -9, -10, -12 e -14) che tagliano forme inattive di altre caspasi dette “effettrici”, attivandole. Queste caspasi posseggono un pro-dominio molto più lungo rispetto a quello delle effettrici;
- **“effettrici”** (caspasi-3, -6, -7, -11 e -13) che tagliano precisi substrati proteici dando corso al processo apoptotico (Böhm & Schild, 2003; Mandic, 2003).

Le caspasi vengono sintetizzate sottoforma di zimogeno o pro-caspasi e sono formate da una singola catena sulla quale si possono individuare un pro-dominio N-terminale che contiene domini come CARD (caspasi-2, -3, -9) o DED (caspasi-1, -4, -8, -10), un dominio maggiore (p20 PM=20kDa) ed un dominio minore (p10 PM=10kDa) (Hengartner, 2000). Le pro-caspasi devono quindi essere attivate per poter svolgere la loro attività proteolitica. Vi sono vari modi in cui queste proteine possono essere attivate:

- per contattato, come nel caso della pro-caspasi-8, dove vengono richiamate dalle proteine adattatrici che si trovano collegate ai recettori di membrana, la vicinanza fra di loro causa l’attivazione reciproca;
- per associazione con altre proteine, un esempio è la pro-caspasi-9, la quale viene attivata collegandosi ad altre proteine durante la formazione dell’apoptosoma;
- per taglio proteolitico, è il caso delle caspasi effettrici le quali vengono invece attivate mediante la rimozione del pro-dominio. Dapprima si ha l’eterodimerizzazione tra la subunità p20 e quella p10, successivamente, i due eterodimeri si associano in un tetramero cataliticamente attivo, ogni tetramero possiede due siti catalitici (Hengartner, 2000) (Fig. 5).



**Figura 5:** Attivazione proteolitica delle caspasi.

L'attivazione delle caspasi richiede la presenza di alcuni cofattori come:

- il granzima B, rilasciato dai linfociti T citotossici, implicato nell'attivazione delle caspasi -3 e -7;
- i recettori di morte (come FAS, TRAIL, TNF) che possono attivare le caspasi-8 e -10;
- il citocromo-C che partecipa alla formazione dell'apoptosoma;
- le proteine bcl-2, che attivano la caspasi-9.

Una volta che il sistema delle caspasi è attivato, un processo di feedback positivo assicura che l'apoptosi sia obbligatoriamente terminata. Per esempio, la caspasi-9 attivata dall'apoptosoma, attiva la caspasi-3, quest'ultima oltre a tagliare le sue proteine bersaglio, taglia altre caspasi-9 le quali saranno così in grado di formare altri apoptosomi amplificando il segnale (Hengartner, 2000).

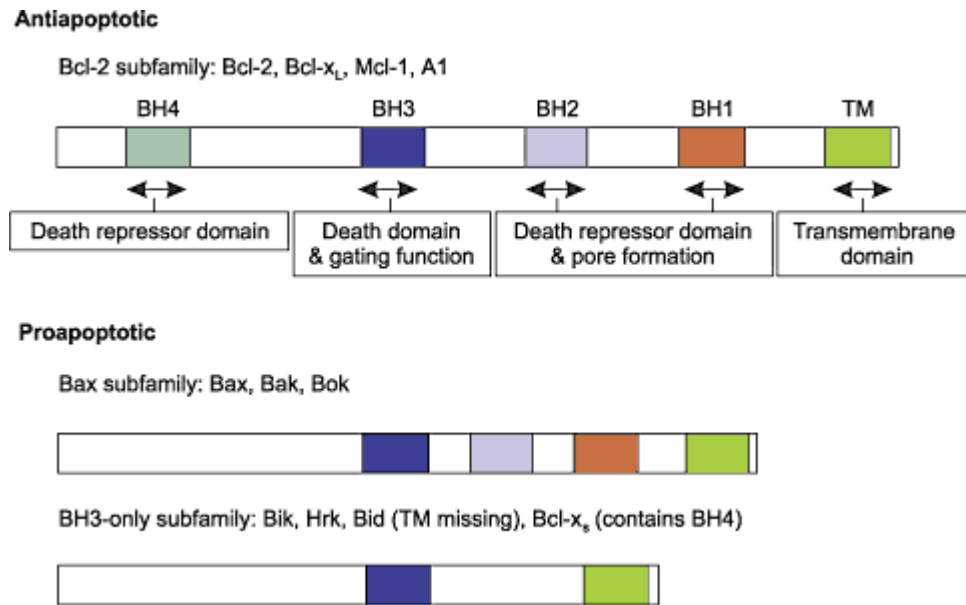
Il taglio proteolitico effettuato delle caspasi attiva alcune molecole e ne inattiva altre, il fine è quello di portare alla frammentazione della cellula mantenendone integra la membrana plasmatica. Fra i bersagli finali delle caspasi troviamo anche, ICAD/DFF45 la cui funzione è quella di reprimere l'enzima CAD (*Caspase-Activated DNase*). Il

taglio di ICAD/DFF45 da parte delle caspasi permette a CAD di entrare nel nucleo e frammentare il DNA (Enari et al., 1998). Verranno quindi inattivate le molecole coinvolte nella riparazione del DNA come la poli(ADP)ribosio polimerasi (PARP) e PAK2, oltre che le laminine dell'involucro nucleare ed elementi del citoscheletro, mentre verrà attivata la trans-glutaminasi, una molecola che rende più resistente la membrana cellulare (Marks & Berg, 1999; Böhm & Schild, 2003).

### **1.2.2 PROTEINE DELLA FAMIGLIA Bcl-2: MODULATORI DELL'APOPTOSI**

La morte cellulare programmata è regolata da diversi tipi di molecole con funzione pro o anti-apoptotica, in particolare le proteine della famiglia del Bcl-2 sono conosciute come modulatori del processo apoptotico.

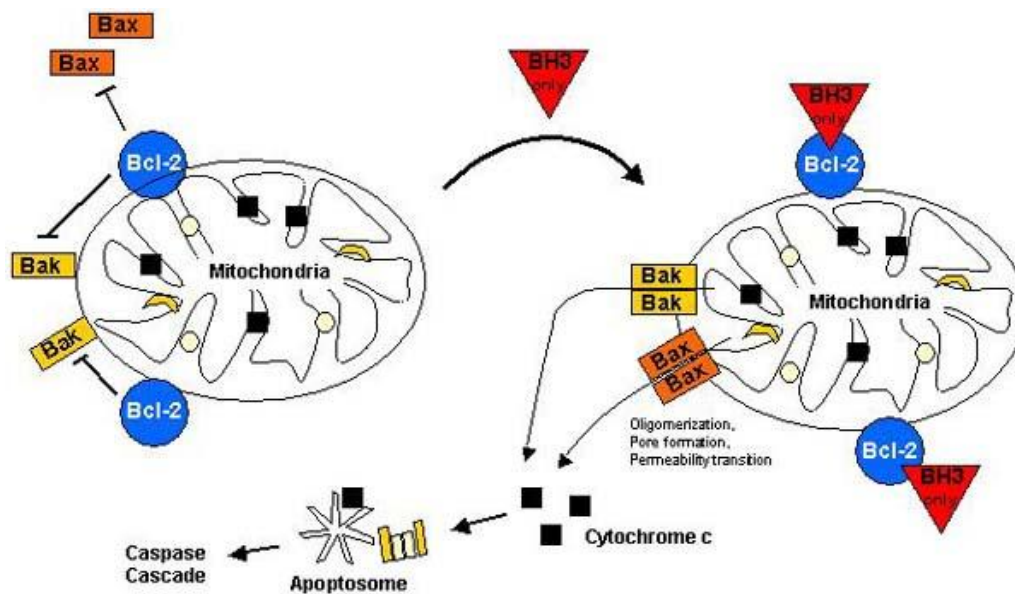
In questa famiglia sono stati identificati, al momento, più di 20 membri e classificati sulla base di sequenze-elica conservate, conosciute come domini di omologia Bcl-2 (da BH1 a BH4) (Scorrano & Korsmeyer, 2003). Tra i componenti della famiglia Bcl-2 esistono alcune forme con funzione anti-apoptotica, come, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl1 (o A1), BHRF e Mcl-1, che possiedono tutti e quattro i domini BH e un dominio C-terminale idrofobico con il quale si ancorano alle membrane, come quella mitocondriale, quella del reticolo endoplasmatico e quella nucleare. Alcune proteine sono, invece, pro-apoptotiche e vengono suddivise in due sottofamiglie. La prima è la Bax che possiede i domini BH1, BH2, e BH3 e comprende le proteine Bax, Bak, e Bok, la seconda sottofamiglia ha la caratteristica di possedere solo il dominio BH3, a questo gruppo appartengono le proteine Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3 e Spike (Cory & Adams, 2002; Mund et al., 2003). In cellule quiescenti, le forme pro-apoptotiche sono normalmente presenti libere nel citoplasma, però, se stimolate possono legarsi alle membrana mitocondriale o a proteine ivi presenti (Wolter et al., 1997) (Fig. 6).



**Figura 6:** struttura dei vari componenti della famiglia del Bcl-2. TM: dominio di transmembrana. BH: domini di omologia. (Ogata & Takahashi, 2003).

Molte delle proteine sopra elencate sono in grado di interagire fra di loro, attraverso il dominio BH3, creando degli omodimeri, eterodimeri ed oligomeri con ruolo sia di agonisti, sia di antagonisti per i loro partner (Gross et al., 1999). Il rapporto tra proteine pro- e anti-apoptotiche, nella formazione sia degli omodimeri sia degli eterodimeri, viene soppesato, infatti, a seconda di quanto l'equilibrio tra questi modulatori si sposti in un senso o nell'altro, la cellula "sceglie" se sopravvivere o morire (Oltvai & Korsmeyer, 1994; Yang & Korsmeyer, 1996; Nagata, 1997).

Le proteine della famiglia Bcl-2 modulano il processo apoptotico controllando direttamente l'attivazione delle caspasi (Strasser et al., 2000) oppure agendo sull'integrità del mitocondrio controllando il rilascio di proteine nel citoplasma (Wang, 2001), quest'ultima nei mammiferi sembra essere la funzione centrale (Cory & Adams, 2002). Nel caso particolare del mitocondrio di una cellula sana Bax è libero nel citoplasma mentre Bak è legato alla membrana mitocondriale. Sotto uno stimolo apoptotico Bax cambia conformazione e si inserisce sulla membrana mitocondriale dimerizzando con Bak e contribuendo alla formazione di pori in modo diretto o interagendo con altre componenti di membrana come i canali anionici voltaggio dipendenti (*Voltage-Dependent Anion Channel*= VDCA) (Antonsson et al., 2000; Tsujimoto & Shimizu, 2000) (Fig. 7).



**Figura 7:** regolazione dell'apoptosi da parte delle proteine della famiglia Bcl-2 (Gewies, 2003).

La proteina Bcl-2, al contrario, è in grado di sequestrare i membri pro-apoptotici della famiglia prevenendo l'attivazione di Bax o Bak ed inibendo quindi gli eventi apoptotici mitocondriali (Fig. 7). Bcl-2, è in grado altresì di controllare il flusso in entrata e in uscita degli ioni (come il  $\text{Ca}^{2+}$ ) e di piccole molecole e proteggere le cellule dall'apoptosi sequestrando la proteina Apaf-1, bloccando l'attivazione della caspasi-9 o inibendo il rilascio di citocromo-C dal mitocondrio (Yang & Korsmeyer, 1996; Minn et al., 1997; Rossè et al., 1998; Zhivotovsky, 1998; Kim, 2005). Anche la sovra espressione di Bcl2 e Bcl- $X_L$  può inibire la morte cellulare programmata (Reed, 1998).

I membri della famiglia che possiedono solo il dominio BH3 sono necessari per l'attivazione di Bak/Bax (Bouillet & Strasser., 2002) (Fig. 7). Per esempio Bid, che normalmente è presente nel citosol, dopo l'attivazione della via estrinseca viene attivato dal taglio proteolitico operato dalla caspasi-8. Il Bid troncato (t-Bid) si può così inserire nella membrana mitocondriale favorendo il rilascio del citocromo-C (Goping et al. 1998; Cory & Adams, 2002; Scorrano et al., 2002). La proteina Bad invece, è regolata da processi di fosforilazione e defosforilazione (Zha et al., 1996); in assenza di segnali di sopravvivenza o in risposta ad un flusso in entrata di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  Bad viene defosforilata, così può legarsi ai membri anti-apoptotici della famiglia presenti sul mitocondrio (Bcl-/Bcl $X_L$ ), favorendo la morte cellulare. Invece, quando alla cellula arrivano dei fattori trofici, Bad viene fosforilato diventando capace di legare la proteina 14-3-3 restando inattivo, libero nel citosol (Datta et al., 1997; Harada et al., 1999; Wang



et al., 1999). Bim invece è normalmente presente sui microtubuli e durante l'apoptosi trasloca sulla membrana esterna del mitocondrio (Gupta, 2001).

### **1.2.3 PROTEINA UMANA p53 (Hp53)**

Una proteina sulla quale è stata posta particolare attenzione per la sua attività di regolazione del ciclo cellulare come oncosoppressore e quindi induttore dell'apoptosi è la p53. Questa proteina ha la capacità di preservare la stabilità cellulare prevenendo l'insorgere di mutazioni, il suo nome è semplicemente dovuto al suo peso molecolare di 53 kDa (Strachan & Read, 2004).

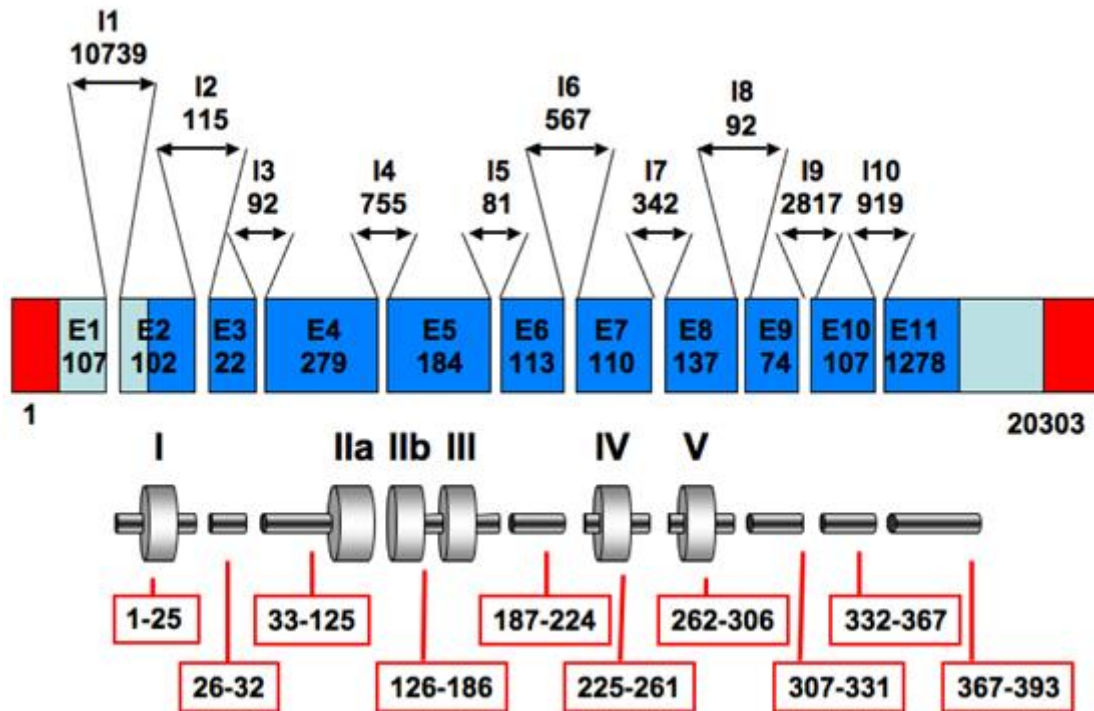
#### **1.2.3.1 Struttura**

Hp53 è una fosfoproteina nucleare composta da 393aa. Subisce diverse modificazioni post-traduzionali tra cui la fosforilazione, l'acetilazione, l'ubiquitinilazione, la sumoilazione e la neddilazione.

Nell'uomo il gene che codifica per p53 è TP53 ed è localizzato sul cromosoma 17 (17p13.1). Tale gene è stato mappato anche in altri animali e risulta così localizzato:

- topo (cromosoma 11);
- ratto (cromosoma 10);
- cane (cromosoma 5);
- maiale (cromosoma 12).

Per quanto riguarda la struttura del gene, nell'uomo, è caratterizzato da 11 esoni e di un grande introne fra gli esoni 1 e 2 (Fig. 8).



**Figura 8.** Sequenza genica di p53. In rosso sono rappresentate le UTR ed in blu gli esoni, mentre le sequenze introniche sono indicate come spazi fra gli esoni. Le lunghezze sono in paia di basi (bp) (immagine presa da [p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_gene.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html))

In Hp53, l'esone 1 è non codificante e si ritiene che questa regione formi una struttura a forcina (stem-loop) in grado di legare saldamente la p53 wild type ma non quella mutata.

Nel gene Hp53 ritroviamo la presenza di due promotori:

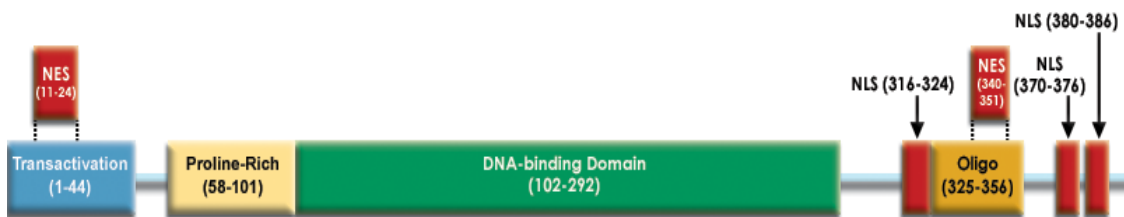
- P1, localizzato a monte del primo esone, responsabile della trascrizione del mRNA che codifica per la proteina intera e funzionante;
- P2, localizzato all'interno della regione del primo introne, coinvolto nella trascrizione di altre rare forme di mRNA.

Sono stati identificati più di 15 fattori di trascrizione, i cui siti di legame sono stati individuati all'interno del promotore P1 e della regione del primo esone.

Nella proteina p53 si possono individuare diversi domini funzionali:

- I. nella porzione amino-terminale (1-44), si trova il dominio di trans-attivazione, è responsabile dell'attivazione di geni target, e due siti di legame per MDM2;
- II. un dominio ricco in prolina (58-101), media la risposta di p53 al DNA danneggiato;

- III. la porzione centrale (102-292) contiene il DNA-binding domain (DBD), caratterizzato da differenti motivi strutturali;
- IV. il dominio di oligomerizzazione (325-356), rappresentato da un beta-foglietto seguito da due alfa-eliche. Il beta foglietto è coinvolto nella dimerizzazione della p53, le due alfa eliche, invece, mediano la tetramerizzazione di due dimeri di p53;
- V. tre segnali di localizzazione nucleare (NLS), sono stati identificati al C-terminale, mediante similarità di sequenza e tecniche di mutagenesi. Il più estremo, che presenta un cuore basico dato da 3 residui consecutivi di lisina, è il più attivo ed il più conservato;
- VI. sempre al C-terminale, all'interno del dominio di oligomerizzazione, troviamo un segnale di esportazione nucleare (NES), altamente conservato e ricco di leucine. Si ritiene che l'oligomerizzazione di p53 provochi il mascheramento di NES e di conseguenza l'accumulo della proteina a livello nucleare (Fig. 9).



**Figura 9:** Domini funzionali della proteina p53.

(preso da: <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/index.php>)

Le mutazioni più frequenti che disattivano la Hp53 nel cancro si localizzano nel dominio DBD. La maggior parte di queste mutazioni rendono la proteina incapace di legarsi alle specifiche sequenze di riconoscimento sul DNA, non attivando la trascrizione del gene. Tuttavia queste mutazioni del DBD sono recessive. Al contrario, possono esserci mutazioni, che interessano il dominio di oligomerizzazione, che hanno caratteristiche dominanti, nelle quali, la mutazione anche di un solo allele impedisce la tetramerizzazione anche delle proteine non mutate (Bai & Zhu, 2006).

### 1.2.3.2 Modificazioni post-traduzionali di p53 e associazione con altre proteine

In seguito a stress genotossici, vengono attivate una serie di chinasi che hanno come bersaglio la p53, esse agiscono fosforilando specifici residui di serina (Ser) e treonina (Thr), ottenendo come risultato finale, l'attivazione della proteina stessa (Fig. 10).

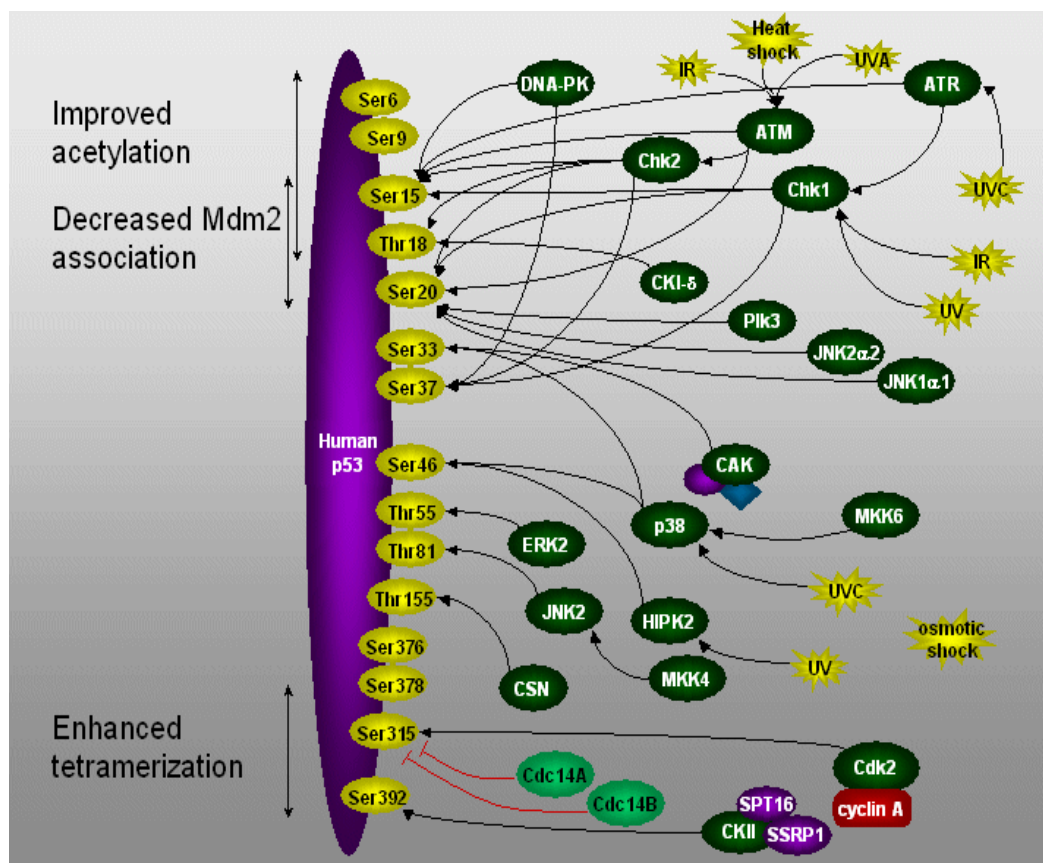


Figura 10: principali siti di fosforilazione di p53.

(Preso da: [http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transpath/6.0/doc/doc/maps/p53\\_sites.html](http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transpath/6.0/doc/doc/maps/p53_sites.html))

Particolarmente importante, risulta essere il dominio N-terminale di p53, a livello del quale sono stati identificati otto siti di fosforilazione, a livello di Ser 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 e di Thr 18 (Appella & Anderson, 2000). Sono presenti siti di fosforilazione anche a livello del dominio C-terminale, come Ser 315, 392 e Thr 81 (Zacchi et al., 2002). La fosforilazione della Ser 15, sembra giocare un ruolo importantissimo per quanto riguarda il processo di attivazione trascrizionale poiché tale evento blocca l'esportazione nucleare di p53, consentendone un accumulo efficiente e una massima attivazione (Lambert et al., 1998).

La fosforilazione della Ser 15, è mediata da ATM, proteina caratterizzata da una regione ricca in proline, un leucine-zipper ed un dominio PI3-K (*fosfoinositide 3-chinasi*) (Shieh

et al., 2000). ATM presenta una localizzazione nucleare e possiede un'attività chinasi che funge da sensore del danno al DNA. Una volta attivata, ATM media una rapida fosforilazione della Ser 15 di p53, in seguito la proteina ATR è responsabile del mantenimento di tale condizione di fosforilazione. Un terzo enzima poi, è implicato nella fosforilazione della Ser 15, ovvero la DNA-PK (*protein-chinasi DNA-dipendente*) il cui ruolo non è ancora stato chiarito.

Oltre alla Ser 15, anche le Ser 9, 20 e 46 vengono fosforilate in modo ATM-dipendente ma solo la Ser 15 viene fosforilata direttamente da ATM (Canman et al., 1998). La fosforilazione della Ser 20, avviene per opera di Chk2; ATM interviene reclutando questa proteina; mentre per le Ser 9 e 46, ATM interviene attivando protein-chinasi ancora sconosciute (Saito et al., 2002).

La fosforilazione della Ser 15 induce a sua volta la fosforilazione della Thr 18, per azione della casein chinasi-1, inibendo così l'interazione p53-MDM2 (*Mouse Double Minute 2*) (Dumaz et al., 1999).

MDM2 è una ubiquitina E3-ligasi che lega i residui 15-29 del dominio N-terminale di p53. Oltre ad inibirne l'attività trascrizionale, MDM2 può anche portare alla degradazione di p53, attraverso un'azione proteosomica ubiquitina-mediata, preceduta da una traslocazione nucleare-citoplasmatica di p53 (Kubbutat et al., 1997). Esiste un intervallo di tempo tra l'attivazione di p53 e la successiva induzione di MDM2, durante il quale p53 esercita i suoi effetti (Schon et al., 2002).

La fosforilazione dei residui Ser 15, Thr 18 e Ser 20 in modalità diverse e non ancora ben chiarite concorre nell'attività di p53 e nella sua interazione con MDM2:

- quella del residuo Ser 20 è fondamentale per la regolazione del tasso di turnover di p53, dopo danneggiamento del DNA;
- la Ser 15 fosforilata, lega CBP/p300 e successivamente viene coinvolta nell'attivazione trascrizionale di p53. Non esiste nessun effetto diretto della Ser 15 fosforilata sul legame p53-MDM2 anche se attivamente coinvolta nella fosforilazione delle Thr18;
- la Thr 18 fosforilata rappresenta l'unica modificazione che attenua significativamente l'interazione p53-MDM2. Tale fosforilazione infatti, indebolisce di 10 volte il legame p53-MDM2, indicando che la fosforilazione della sola Thr 18 è responsabile dell'abrogazione del legame (Dumaz & Meek, 1999).

Un ruolo notevole nell'attivazione ATM-dipendente di p53, viene svolto dalla defosforilazione della Ser 376. Attraverso tecniche di immunoblotting, è stato constatato che, in condizioni normali, i residui Ser 376 e Ser 378 sono fosforilati, mentre dopo trattamento con radiazioni ionizzanti, la Ser 378 resta fosforilata mentre la Ser 376 si defosforila. Inoltre, la sequenza aminoacidica che circonda la Ser 376 di p53 presenta una profonda somiglianza con le sequenze di riconoscimento per le proteine 14-3-3 (Chehab et al., 1999).

Le proteine 14-3-3 sono una famiglia di proteine omo- ed etero-dimeriche, altamente conservate, che mediano la trasduzione dei segnali legandosi a fosfoserine. Queste proteine, legandosi come dimeri, inducono un cambio conformazionale di p53 la quale aumenta così la sua affinità per specifiche sequenze di DNA. In questo modo p53 è in grado di assumere la sua forma tetramericamente attiva e può svolgere la funzione di fattore di trascrizione.

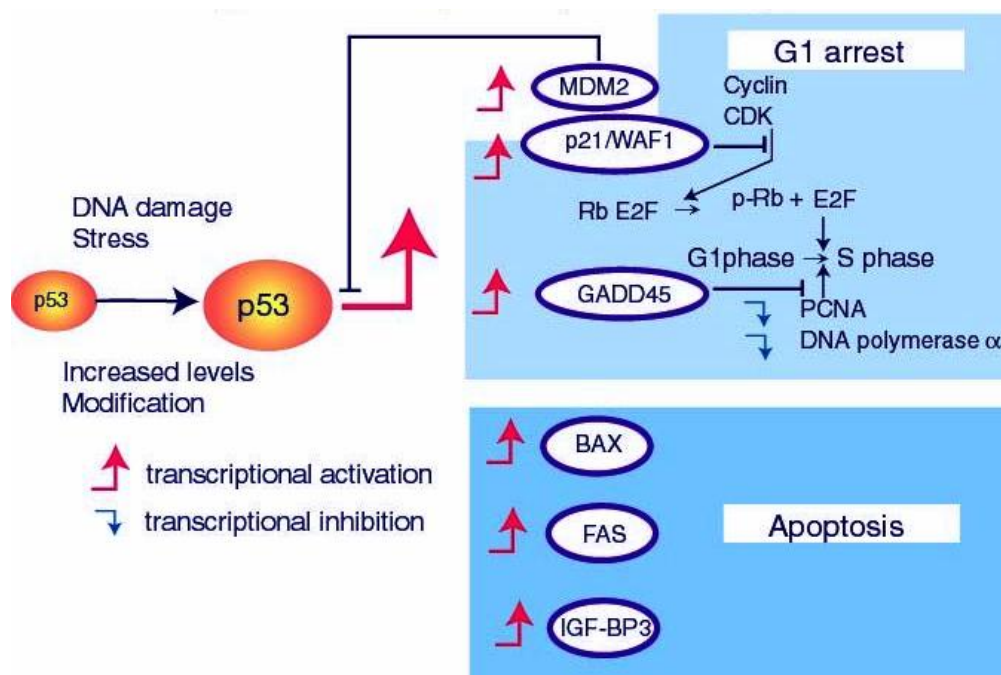
Come già accennato, la fosforilazione della Ser 15 porta ad un aumento significativo del legame tra p53 e CBR/p300. CBR (*CREB binding protein*) e p300 sono proteine regolatrici in grado di aumentare i livelli di trascrizione, mediante due meccanismi diversi, uno che implica il collegamento di fattori di trascrizione all'oloenzima pol II, e l'altro che prevede l'acetilazione di istoni, nelle vicinanze di promotori bersaglio, inducendo la cromatina ad assumere una configurazione più aperta ed accessibile. CBR (e l'associata P/CAF-acetilasi) e p300, possono inoltre acetilare fattori di trascrizione non istonici, regolandone l'attività (Sakaguchi et al., 2000).

Un'altra proteina che si associa a p53 regolandola, è Pin1, una propil-isomerasi. Quando si verifica un danneggiamento del DNA dovuto a stress genotossico, p53 interagisce con Pin1, mediante un'interazione che dipende fortemente dallo stato di fosforilazione di p53. Gli aminoacidi coinvolti principalmente in questo processo sono la Ser 33, Ser 315 e Thr 81 (Sudol & Hunter, 2000). Pin1 riconosce, attraverso il suo dominio WW, motivi pSer/Thr-Pro a livello di fosfoproteine. Questi motivi, esistono in conformazione *cis* e *trans* e la loro conversione è catalizzata dal dominio C-terminale propil-isomerasico (PPIase) di Pin1. Quindi, Pin1 isomerizza specificatamente il legame peptidico pSer/Thr-Pro. Il dominio WW forma nel suo sito di legame una "tasca" che contiene al suo interno le catene laterali dei residui Ser 16, Arg 17, Tyr 23 e Thr 34 ed è proprio la Ser 16, posizionata al centro della tasca, a legare i motivi pSer/Thr-Pro (Lu et al., 1999). Affinché avvenga tale legame, è però necessario che la Ser 16 venga fosforilata dalla

PKA. L'isomerizzazione Pin 1-dipendente del legame peptidico pSer/Thr-Pro è un essenziale meccanismo di stabilizzazione e attivazione trascrizionale di p53.

### 1.2.3.3 Attività trascrizionale di p53

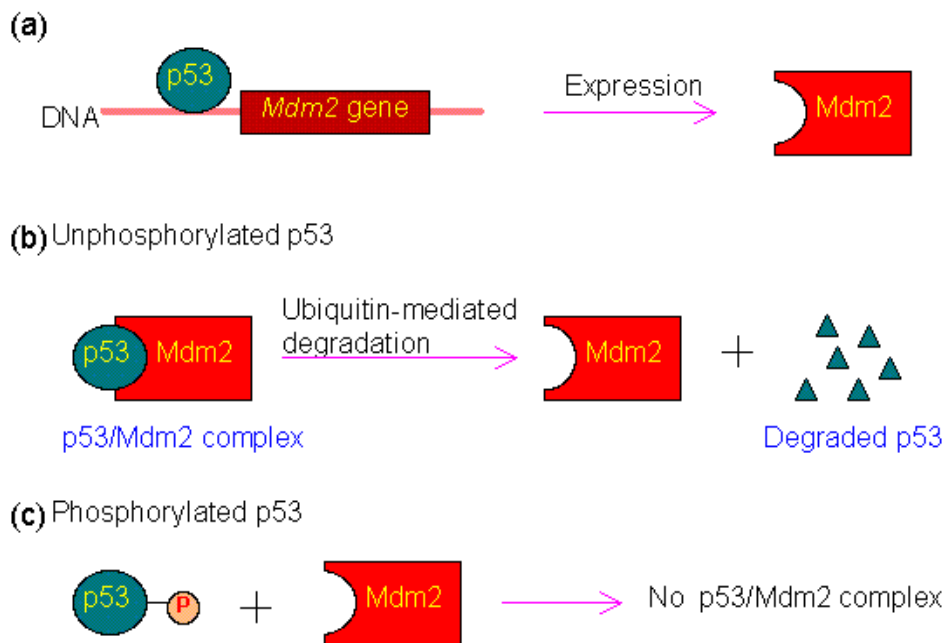
In quanto fattore di trascrizione, p53 è in grado di attivare o reprimere l'espressione di geni che regolano l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'apoptosi. I geni maggiormente coinvolti sono p21<sup>CIP/WAF</sup>, GADD45, p53R2, p53AIP1, Bax, IGF-BP3, p53DINP1, Fas, bcl-2, killer/DR5 e molti altri (Vogelstein et al., 2000) (Fig. 11).



**Figura 11:** Azioni della proteina p53 attivata.

Per quanto riguarda l'arresto del ciclo cellulare, p53 agisce nel punto di controllo (checkpoint) che arresta le cellule in fase G<sub>1</sub> tardiva. Tale arresto è causato dalla trascrizione p53-mediata del gene p21<sup>CIP/WAF</sup>. La proteina p21<sup>CIP/WAF</sup>, è un inibitore della ciclina-chinasi (CKI) che inibisce la fosforilazione della proteina Rb, da parte dei complessi Cdk4-Ciclina D, Cdk6-Ciclina D e Cdk2-Ciclina E. Tale evento è necessario per la transizione dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S. Inoltre, p21<sup>CIP/WAF</sup> inibisce i complessi Cdk1-Ciclina A e Cdk1-Ciclina B, necessari per la transizione dalla fase G<sub>2</sub> alla fase M, arrestando così il ciclo cellulare in G<sub>2</sub>.

L'arresto del ciclo cellulare è un evento determinante poiché permette alla cellula di riparare il danno causato dallo stimolo genotossico. In questo meccanismo di riparazione partecipa in modo diretto p53, inducendo la trascrizione del gene GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage). Se il danno viene riparato con successo, p53 induce la trascrizione di MDM2 che, legandosi a p53, la inattiva. In seguito, essendo MDM2 una ubiquitina E3-ligasi, attraverso il reclutamento e la stimolazione di una ubiquitina E2 enzima-coniugato, media la ubiquitinazione della p53 indirizzandola verso la degradazione proteasomica (Honda & Yasuda, 2000). In tal modo, i livelli di p53 tornano ad essere bassi e si assiste anche ad una diminuzione dei livelli di p21<sup>CIP/WAF</sup> (Fig. 12).



**Figura 12:** dinamica dell'interazione fra p53 e MDM2  
(Presa da: [www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4Hp53.htm](http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4Hp53.htm))

In molti casi, il danno al genoma è talmente esteso e grave che i meccanismi di riparazione non sono in grado di ripararlo in modo soddisfacente e la conseguenza di questa situazione è l'induzione dell'apoptosi p53-mediata.

All'interno della cellula esiste un equilibrio tra l'espressione di geni che inducono e inibiscono l'apoptosi. Questo equilibrio può essere modificato da p53, a favore dei geni che inducono l'apoptosi e affinché ciò si verifichi, p53 deve essere nella sua forma attiva, ossia stabile e a livelli elevati. Eventi importanti per l'induzione dell'apoptosi



p53-mediata sono le fosforilazioni ATM-dipendenti e l'attivazione del dominio WW di Pin1 (Shen et al., 2001).

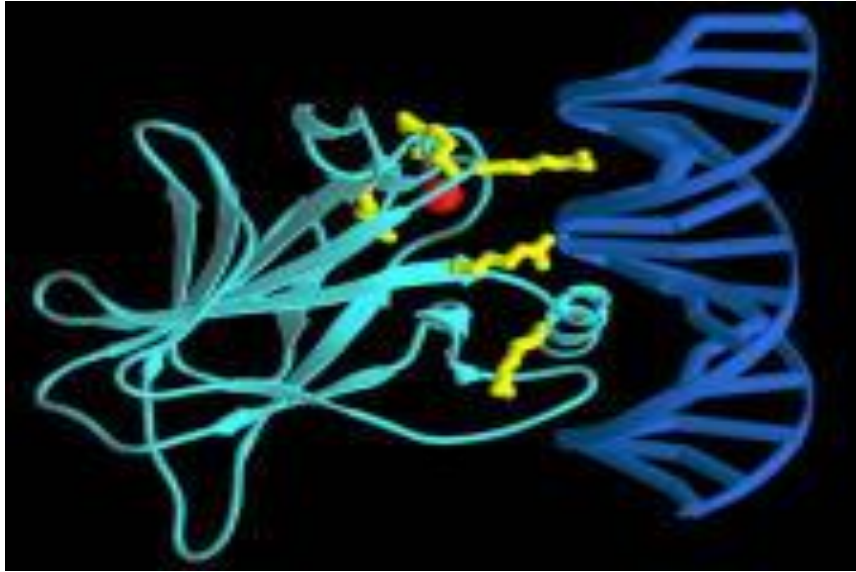
Altri geni la cui espressione è regolata da p53 sono Bcl-2 (anti-apoptotico) e Bax (pro-apoptotico). Sono stati identificati siti di legame per p53 nel promotore del gene Bax, il quale viene sovra-espresso in risposta a danni genomici e all'aumento di p53. Inoltre, p53 promuove la down-regolazione di Bcl-2. Questo sta ad indicare come, tra i geni Bcl-2 e Bax regolati da p53, l'equilibrio intercellulare possa essere alterato, a seguito di stimoli, a favore di Bax, per la distruzione cellulare mediante apoptosi.

Anche il gene pro-apoptotico Fas può essere sovra-espresso da p53. Una volta attivata da FasL, Fas (CD95) trimerizza e attiva le caspasi, causando apoptosi p53-dipendente.

#### **1.2.3.4 Ruolo di p53 nelle patologie**

La proteina p53 ha un ruolo centrale nella protezione del nostro corpo dal cancro. In generale, le cellule cancerose contengono due tipi di mutazioni, le prime che provocano la crescita e la moltiplicazione incontrollata delle cellule, le seconde che disattivano le normali difese che proteggono contro la crescita innaturale. Le mutazioni del gene TP53 sono state trovate in circa la metà dei casi di cancro nell'uomo. Si tratta per lo più di mutazioni disattivanti, che cambiano le informazioni del DNA in una particolare posizione. La cellula produce quindi una p53 con un errore, a causa dell'inserimento di un aminoacido errato in un punto della catena proteica. La normale funzione di p53 è bloccata in questi mutanti e la proteina è incapace di fermare la moltiplicazione della cellula danneggiata (Canman & Kastan , 1997).

Quasi tutte le forme principali di cancro (di pelle, polmone, fegato, seno, vescica e intestino), manifestano mutazioni a carico del dominio di legame al DNA di p53 (Fig. 13).



**Figura 13:** dominio centrale di p53 (DBD) legato al DNA.

In questa regione si conoscono ben 5 hotspots di mutazione. Si tratta di residui direttamente o indirettamente coinvolti nel legame specifico tra la p53 e la sequenza target di DNA. L'analisi del pattern di mutazione in dieci forme più comuni di neoplasie, ha mostrato che la mutazione G:C→T:A rappresenta la sostituzione più frequente (Cetin-Atalay & Ozturk, 2000).

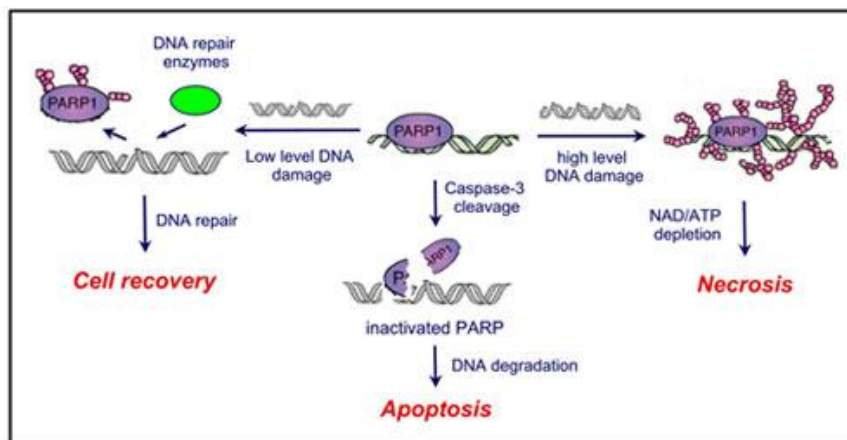
Generalmente, se i due alleli del gene TP53 sono entrambi mutati o deleti, l'attività di soppressione tumorale è drasticamente ridotta. Individui che ereditano solo un allele funzionante del TP53, sono suscettibili della mutazione all'allele normale in qualsiasi cellula dell'organismo e pertanto sono soggetti a manifestare tumori familiari differenti con esordio precoce una patologia conosciuta come sindrome di Li-Fraumeni. In questo caso tutte le cellule dell'organismo presentano la condizione di eterozigotità per l'allele TP53 mutato, ma il gene può anche essere danneggiato in singole cellule da mutageni (come sostanze chimiche, radiazioni ionizzanti o virus) incrementando la probabilità che la cellula inizi mitosi incontrollate. Alcuni patogeni possono invece direttamente interessare la proteina p53. Un esempio è il papillomavirus umano (HPV), che codifica la proteina E6 la quale lega p53 inattivandola. Questo, in sinergia con l'inattivazione di un altro regolatore del ciclo cellulare, il p105RB, permette ripetute divisioni cellulari che si manifestano nella forma clinica della verruca (Lee et al., 2009).

In un individuo sano, la proteina p53 è in continuo equilibrio tra produzione e degradazione. La degradazione della p53 è, come già menzionato, associata al legame

con MDM2. Attraverso un circuito di feedback negativo la stessa MDM2 viene indotta dalla p53. Tuttavia proteine p53 mutanti spesso non inducono MDM2 e dunque p53 si può accumulare in elevatissime concentrazioni. In condizioni più gravi, la p53 mutata può alterare i livelli della p53 sana.

### 1.2.4 PARP

La poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP) è un enzima che catalizza il trasferimento di catene di poli(ADP-ribosio) dal suo precursore NAD ai gruppi carbossilici delle proteine. Stimolo necessario e sufficiente per attivare la PARP è un danno al DNA. Quando il danno al genoma è lieve, l'enzima partecipa ai meccanismi di mantenimento dell'integrità della cromatina e della riparazione del DNA. L'iperattivazione di PARP in seguito ad un danno massivo del DNA ha invece un "ruolo suicida" in quanto, come è stato osservato in vari tipi di cellule e nei neuroni, l'estesa poli ADP-ribosilazione di proteine che ne consegue porta ad un grande consumo di NAD e ad un seguente rapido esaurimento cellulare di ATP. Un esempio di tale evento è quello che si verifica nel sistema nervoso centrale, in situazioni patologiche come l'eccitotossicità e l'ischemia cerebrale. In questi vi è un'elevata produzione di ossidanti e radicali come l'ossido nitrico (NO), che induce l'iperattivazione di PARP (Zhang et al., 1994). La PARP è dunque coinvolta nella regolazione di importanti processi nucleari come riparazione e ricombinazione del DNA, differenziazione cellulare ed apoptosi (Fig. 14).



**Figura 14:** processi nucleari in cui è coinvolta la proteina PARP .

(Preso da: [uts.cc.utexas.edu/~liulab/research.php?id=4](http://uts.cc.utexas.edu/~liulab/research.php?id=4))

### 1.2.4.1 PARP family: caratteristiche e funzioni

La famiglia delle proteine PARP è costituita da 17 membri (10 dei quali putativi) che hanno strutture e funzioni cellulari diverse tra loro: PARP1, PARP2, PARP3, VPARP (PARP4), PARP5a (TNKS) e PARP5b (TNKS2), PARP6, TIPARP (PARP7), PARP8, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14, PARP15 ed infine PARP16 (Fig. 15).

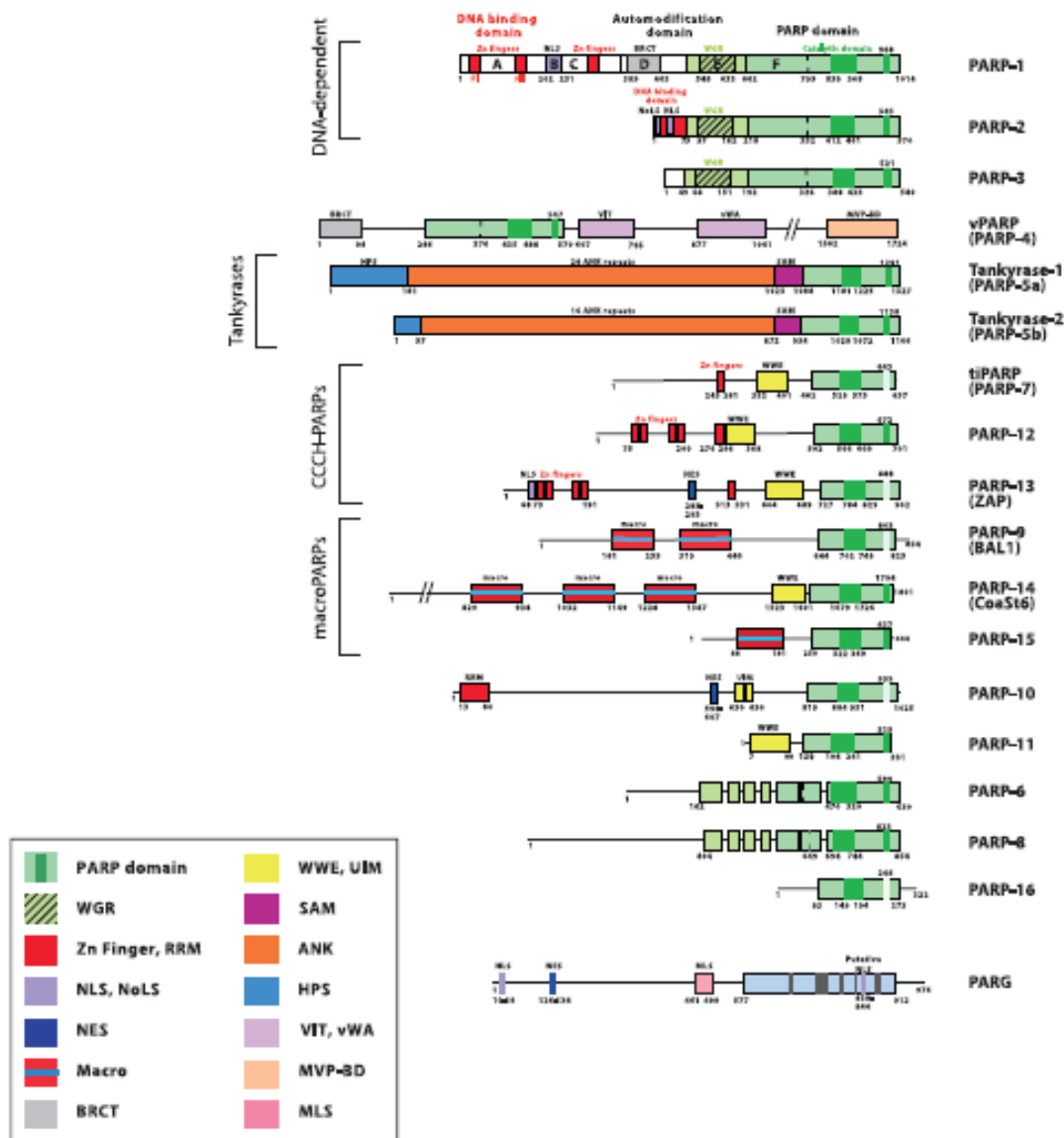
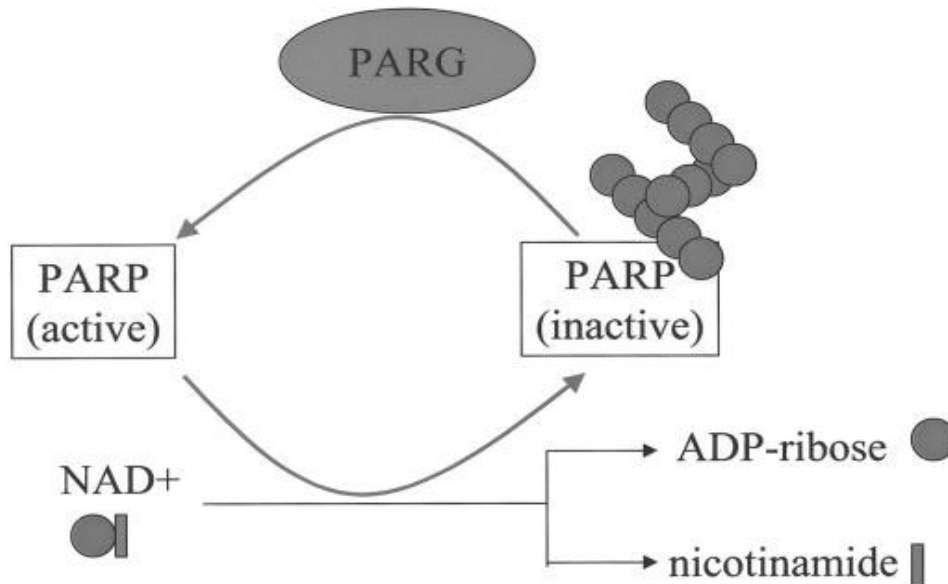


Fig. 15: Proteine dalla famiglia PARP.

(Presa da :[http://www.vincibiochem.it/PDFfiles/flyer\\_parp\\_family\\_np\\_final%5B1%5D.pdf](http://www.vincibiochem.it/PDFfiles/flyer_parp_family_np_final%5B1%5D.pdf))

Questi enzimi hanno la capacità di ottenere un polimero di ADP-ribosio (PAR), a partire da una molecola di nicotinamide adenin-dinucleotide (NAD) e di legarlo ad alcune proteine. Il PAR viene poi degradato da enzimi specializzati chiamati PARG

(poly-(ADP-ribose)glycohydrolase). E' stato inoltre trovato un nuovo enzima capace di degradare PAR e che non è correlato a PARG (Fig. 16). Tale enzima è stato denominato ADPRHL2 (Mueller-Dieckmann et al., 2006).



**Figura 16:** Schema dell'attività di PARP e PARG (Virag & Szab, 2002).

Il gene PARP è localizzato nel cromosoma 1 (q21-q22) mentre sequenze “*PARP-like*” sono localizzate nei cromosomi 14 (q13-q32) e 13 (q34).

Nella sua sequenza aminoacidica, PARP presenta cinque domini:

- due domini zinc-finger (aa 9-93 e 113-203) nella regione N-terminale;
- un dominio centrale BRCT (BCRA 1 C-terminale, aa 385-477);
- due domini C-terminali, con la regione PARP catalitica, quali il dominio regolatore PARPreg (aa 662-795) e il dominio PARP (aa 797-1010). Il dominio C-terminale è il più conservato.

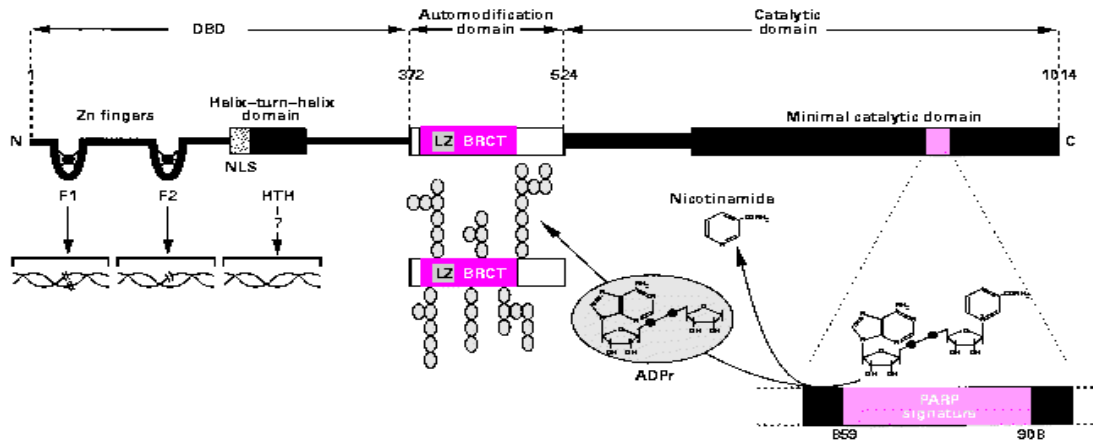
Una delle più importanti funzione di PARP, consiste nella riparazione di tagli (*nicks*) a singolo filamento del DNA. Essa infatti lega il filamento tagliato attraverso la sua porzione N-terminale contenente il motivo *zinc-finger* e procede al reclutamento di XRCC1, DNA-ligasi III, DNA-polimerasi-beta e chinasi. Questo processo prende il nome di *base excision repair* (BER) (Bouchard et al., 2003).

Sono state identificate quattro proteine PARP in grado di catalizzare la sintesi di PAR, a partire da NAD<sup>+</sup>:

- PARP-1, è una proteina plurimodulare di 113kDa altamente conservata ed abbondante (circa  $10^6$  molecole per cellula). Essa presenta caratteristiche in comune con proteine della rete di segnalazione dei danni genomici. Così come le proteine ATM, ATR, DNA-PK e p53, PARP-1 è attivata a seguito di rotture a singola elica del DNA ed interagisce con molte altre proteine che controllano i danni al genoma. Un prodotto alternativo del gene PARP-1 è la proteina sPARP-1 (PM=55,3 kDa), la quale presenta una localizzazione nucleare. La sua sequenza aminoacidica è simile a quella del dominio catalitico di PARP-1. Essa viene attivata da agenti genotossici, ma apparentemente non richiede rotture dell'elica del DNA per la sua attivazione;
- Tankyrase, è una proteina plurimodulare di 142kDa con dominio catalitico omologo a quello di PARP-1. *In vitro*, catalizza la sua auto-modificazione e la modificazione della proteina telomero-specifica TRF-1 in modo DNA-indipendente. Quindi è coinvolta nella regolazione dell'allungamento telomerasico (Ziegler & Oei, 2001);
- PARP-2, è una proteina di 62kDa attivata da rotture a singola elica del DNA, ma le cui funzioni restano ancora sconosciute;
- vault PARP, è una proteina di 193kDa recentemente identificata ed è una componente dei *vaults* che sono grandi complessi ribonucleoproteici con funzione ancora sconosciuta. Vault PARP catalizza la poli(ADP-ribosil)azione della proteina maggiore vault (Herceg & Wang, 2001).

### 1.2.4.2 PARP-1

Cataliticamente attiva come dimero, presenta una struttura a tre domini (dominio catalitico, dominio di auto-modificazione e DBD) (Fig. 17).



**Figura 17:** Struttura di PARP-1.

Il dominio N-terminale, di legame al DNA (DBD), si estende dalla metionina iniziale alla treonina 373 (Kurosaki et al., 1987). Ha un peso molecolare di circa 42kDa, contiene due *zinc-finger*, necessari per la stimolazione dell'attività catalitica dell'enzima in risposta a rotture del DNA a singola o doppia elica, e due motivi *helix-turn-helix*. In assenza di rotture del DNA, PARP-1 mostra un'attività enzimatica basale molto bassa. Contiene inoltre un'elevata percentuale di residui basici, probabilmente coinvolti nell'interazione dell'enzima con il DNA.

Nella regione centrale dell'enzima, tra i residui 374 e 525 si trova il dominio di auto-modificazione, ma non è stato ancora ben caratterizzato (Kurosaki et al., 1987). L'analisi della struttura primaria dell'enzima rivela che si tratta di un dominio ricco di residui di acido glutammico (Duriez et al., 1997). Anticorpi diretti contro questo dominio riducono la reazione di auto-modificazione del 50%, a conferma che almeno la metà dei residui accettori di catene di ADP, si trovano in questo dominio. Il sito di auto-modificazione contiene, inoltre, un dominio BRCT (BRCA C-terminale), di circa 95 amminoacidi che si ritrova in diverse proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA (Bork et al., 1997);

Il dominio catalitico si trova all'estremità C-terminale della proteina. Esso ha un peso molecolare di 55kDa e si estende tra i residui 526-1014 (Kurosaki et al., 1987).

L'attività catalitica di questo frammento, non può essere stimolata da rotture dei filamenti del DNA, e corrisponde all'attività basale dell'enzima nativo (Kameshita et al., 1986). L'attività dell'ADPr-transferasi è stata circoscritta ad una regione di 40kDa all'estremità C-terminale dell'enzima. Questa regione viene indicata come il dominio catalitico minimo, e può catalizzare l'inizio, l'elongazione e la ramificazione dei polimeri di ADPr, indipendentemente dalla presenza di DNA. La perdita degli ultimi quarantacinque aminoacidi nella parte C-terminale di questo dominio, annulla completamente l'attività dell'enzima (Althaus, 1992). La regione di 17kDa compresa tra il dominio catalitico minimo ed il dominio di auto-modificazione, può essere riconosciuta come *non-self* dal sistema immunitario e quindi legata da anticorpi inducendo alcuni disturbi reumatoidi (Yamanaka et al., 1987). Il dominio catalitico possiede rilevanti analogie strutturali con enzimi mono(ADP-ribosil)anti. Da analisi comparative tra il dominio catalitico di PARP e la mono(ADPr)-transferasi è stato ipotizzato che Glu-988 possa essere di rilevante importanza per l'attività dell'enzima. Mutazioni sito-specifiche di questo residuo di PARP riducono l'allungamento del polimero di duecento volte oltre che l'iniziazione di nuove catene di ADPr (Marsischky et al., 1995).

### **1.2.5 INTERAZIONE TRA PARP-1 E p53**

Dati in letteratura riportano come sia possibile evidenziare un'interazione tra PARP-1 e p53, nella risposta p53-mediata, conseguente a danni genotossici. In cellule con ridotta espressione di PARP-1, dopo esposizione a radiazioni, si è osservata una ridotta attività di p53 ed una diminuzione del suo accumulo nel nucleo, rispetto a cellule PARP-1-competenti. In cellule con ridotta espressione di PARP-1 sono state, inoltre, dimostrate alterazioni nell'espressione di prodotti genici a valle di p53, come p21 e MDM2, notando che, in tali condizioni, la cellula fatica a regolare le concentrazioni di MDM2 e la sua capacità di fosforilare la Ser 15 di p53 (Valenzuela et al., 2002). Il meccanismo ipotizzato prevede che ATM venga modificata da PARP-1, dopo esposizione a radiazioni ionizzanti (Canman et al., 1998). Se il danno al genoma non coinvolge l'attivazione di ATM, come nel caso in cui vengano impiegati agenti alchilanti per indurlo, l'assenza di PARP-1 porta ad un rallentamento delle capacità della cellula



stessa di riparare il DNA, con conseguente aumento della persistenza delle lesioni e passivo aumento di accumulo e attivazione di p53.

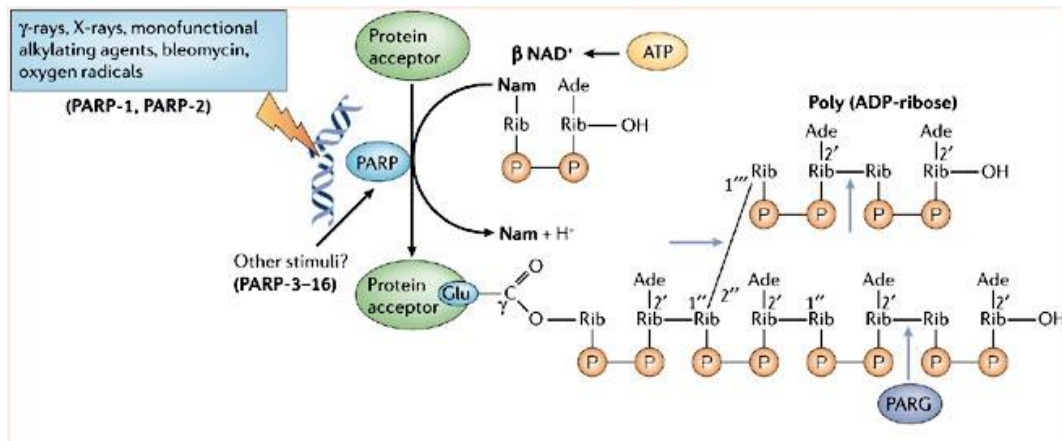
Il ruolo di PARP-1 nelle risposte p53-mediate è di difficile studio e non è stato ancora ben chiarito. L'ipotesi più accreditata, è che PARP-1 risieda a monte di p53, svolgendo un ruolo fondamentale nelle fasi iniziali della risposta cellulare alle radiazioni ionizzanti (Valenzuela *et al.*, 2002). Pare, inoltre, che PARP-1 sia in grado di attivare p53 mediante interazione diretta con essa oppure in seguito ad una sua poli(ADP-ribosil)azione.

### **1.2.5.1 Poli(ADP-ribosil)azione**

La poli(ADP-ribosilazione) è una modificazione post-traduzionale di proteine nucleari che gioca un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità genomica, mediante il controllo di riparazione, replicazione e trascrizione del DNA è in grado di indirizzare la cellula verso la morte per necrosi o apoptosi (Kim *et al.*, 2005). Si tratta di una reazione reversibile, catalizzata dalla (poli-ADP-ribosio)polimerasi (PARP) che ha come substrato il  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> e che si esplica in più stadi:

- idrolisi del legame N-glicosidico tra la nicotinammide ed il ribosio, con conseguente rilascio di molecole di adenosina-difosfato-ribosio (ADPR), utilizzate per la sintesi del polimero;
- formazione di un legame estere tra la prima unità di ADPR ed uno specifico residuo aminoacidico, acido aspartico o glutammico, di accettori proteici nucleari. Questi possono essere sia proteine strutturali (istoni), sia enzimi (DNA-topoisomerasi, DNA-ligasi, RNA-polimerasi ) a carico dei quali avviene una reazione di eteromodificazione;
- allungamento della catena di ADPR tramite legame 1'' → 2' alfa-glicosidico di successivi monomeri;
- ramificazione del polimero ogni 20-50 unità tramite legami 1''' → 2'' alfa-glicosidici.

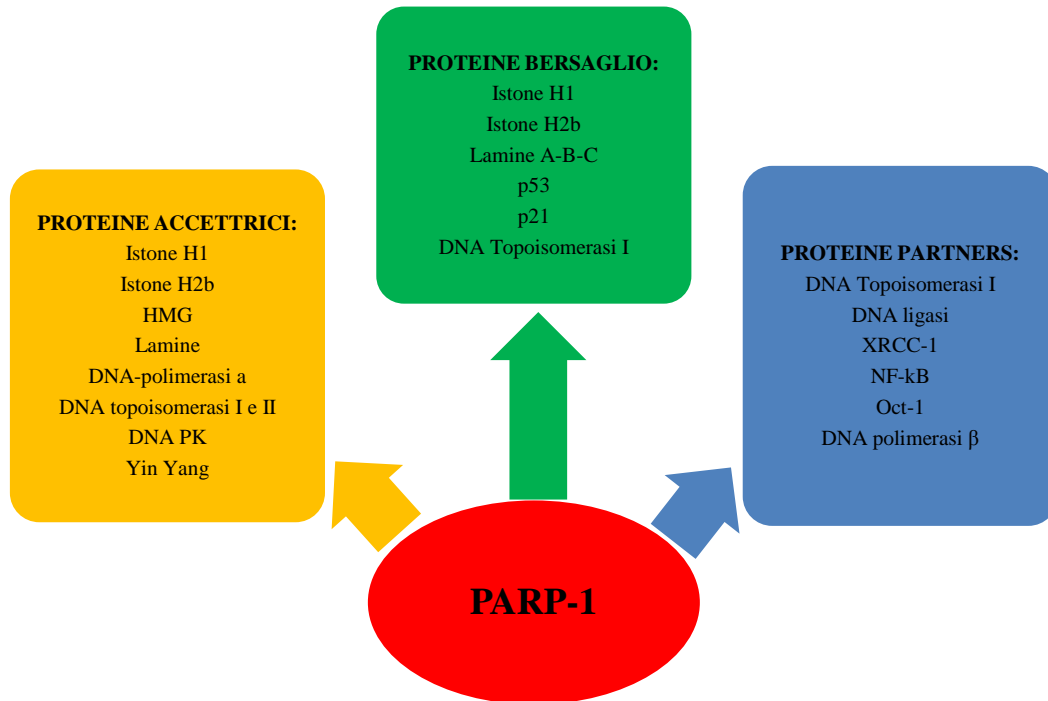
Come mostrato in figura 18 come la reazione di poli(ADP-ribosilazione) rappresenta la fase anabolica di un processo metabolico più ampio, per il completamento del quale è richiesta anche una fase catabolica (Kim, *et al* 2005).



**Figura 18:** reazione di poli(ADP-ribosil)azione di una proteina target da parte di PARP (Schreiber et al., 2006).

Alla rapida sintesi di polimeri ADPR (pADPR), che si realizza in risposta alla formazione di interruzioni del DNA, fa seguito una loro ampia ed efficiente degradazione ad opera della poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG), il principale enzima responsabile del catabolismo di pADPR *in vivo*. Attraverso la sua doppia attività endo- ed eso-glicosidica, la PARG catalizza l'idrolisi di legami glicosidici tra le unità di ADPR localizzate, rispettivamente, all'estremità e all'interno del polimero. In tal modo si riduce rapidamente la lunghezza di polimeri più estesi ed i frammenti più corti, così ottenuti, sono successivamente degradati in modo lento e ben distribuito. L'ultima molecola di ADPR legata alla proteina accettrice viene eliminata ad opera di una ADP-ribosil-proteina-liasi.

Il pADPR è un omopolimero di lunghezza variabile da due a più di duecento residui, che può presentare un più elevato grado di complessità per la presenza di ramificazioni semplici e multiple ogni trenta residui. Il ruolo attribuito al residuo, si basa sulla modulazione della funzione delle proteine alle quali si lega in modo covalente e non covalente. I polimeri di ADPR infatti, possono associarsi alle proteine tramite la formazione di legami covalenti, ma anche mediante l'instaurarsi di specifiche interazioni non covalenti. Inoltre, la PARP è in grado di interagire fisicamente con altre proteine nucleari, inserendosi in complessi multi-enzimatici. Quindi, le proteine coinvolte nella reazione di poli(ADP-ribosil)azione possono essere suddivise in proteine accettrici di pADPR, proteine bersaglio del pADPR e proteine partners di PARP (Fig. 19).



**Figura 19:** proteine che subiscono il processo di poli(ADP-ribosil)azione da parte di PARP-1.

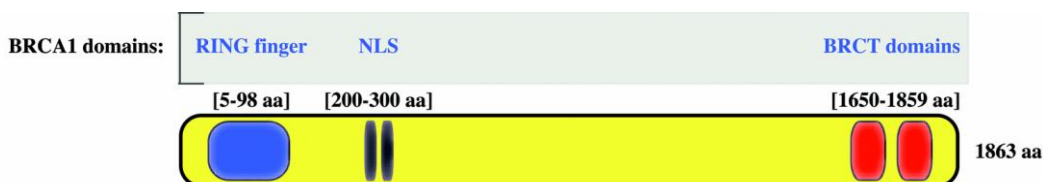
### 1.2.6 BRCA1 e BRCT

Gli oncosoppressori sono geni che svolgono diverse funzioni nella regolazione della crescita, del differenziamento e della morte programmata cellulare, esercitando un effetto inibitore su altri geni direttamente implicati nell'oncogenesi. Un'alterazione della loro funzionalità causa una perdita di tale controllo negativo e facilita lo svilupparsi del tumore. Gli oncosoppressori sono stati per lo più identificati mediante lo studio di mutazioni nelle linee germinali, che predispongono gli individui portatori, ad ereditare alcuni tipi di tumore; oppure mediante ricerca della perdita di cromosomi specifici nelle cellule neoplastiche (Clapperton et al., 2004).

Un vasto gruppo di onco-soppressori è costituito da geni implicati nei meccanismi di riparazione del DNA e nel mantenimento dell' integrità del genoma. La loro perdita di attività potrebbe consentire la mutazione di altri oncogeni od oncosoppressori che indurrebbero la cellula ad una proliferazione incontrollata (Clapperton et al., 2004).

In questa categoria troviamo anche BRCA1 che è localizzato in 17q21, è lungo più di 80Kb, contiene 22 esoni e codifica per un lungo trascritto di 7,8Kb.

La proteina codificata è composta da 1863 aminoacidi (220 kDa), è normalmente localizzata nel nucleo e contiene residui fosforilati. La proteina presenta dal lato N terminale un dominio RING finger ed all'estremo C terminale due domini BRCT (Fig. 20).

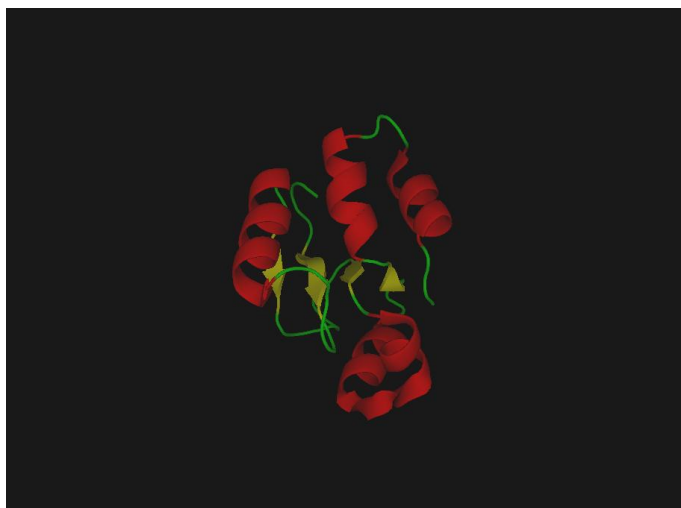


**Figura 20:** Struttura di BRCA1 (Zhang & Powell, 2005).

I domini Ring finger sono sequenze ricche di residui di cisteina che coordinano il legame di due ioni Zinco, facilitando il contatto proteina-proteina e proteina-DNA; in particolare è stata evidenziata l'interazione con il motivo RING finger di BARD1 (*BRCA1-associated RING domain protein*). Il dominio in oggetto è assolutamente necessario per l'espletamento della funzione di BRCA1, tanto che mutazioni coinvolgenti i residui di cisteina contenuti in questo dominio sono in grado di causare patologie (Zhang & Powell, 2005). E' stato riscontrato, che nonostante la proteina codificata da BRCA1 nell'uomo e nel topo, presentino una bassa omologia (solo il 58%), evento raro per un gene oncosoppressore, il dominio RING finger, presenta invece una elevata omologia (Wu et al., 1996).

Per quanto riguarda la porzione C terminale, BRCA1 presenta una sequenza, altamente conservata, il dominio BRCT (BRCA1 C terminale) che si ritrova frequentemente in proteine implicate nel riparo del DNA e nella regolazione del ciclo cellulare.

Il dominio BRCT consiste in ripetizioni (solitamente in tandem) di circa 90-100 aminoacidi ed ogni ripetizione BRCT assume uno specifico ripiegamento. L'organizzazione delle eliche  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -3 e del  $\beta$ -foglietto centrale è conservata in tutte le ripetizioni. Anche i residui idrofobici essenziali per il mantenimento del *folding* (ripiegamento) sono altamente conservati. Il dominio N-terminale di BRCT è composto da 112 residui aminoacidici, mentre il dominio C-terminale è composto da 102 residui. Le eliche  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -3 del dominio C-terminale sono fortemente compattate con l'elica  $\alpha$ -2 del dominio N-terminale, mediante interazioni idrofobiche (Clapperton et al., 2004) (Fig. 21).



**Figura 21:** struttura a  $\beta$ -foglietti ed  $\alpha$ -eliche di BRCT (Nagashima et al., 2005).

I due domini BRCT ripetuti in tandem (BRCT N-terminale e BRCT C-terminale) di BRCA1, hanno una struttura estremamente simile tra loro e si dispongono secondo un modello testa-coda. Entrambi i due ripetuti sono costituiti da quattro  $\beta$ -foglietti e tre  $\alpha$ -eliche e sono connessi tra loro mediante una struttura  $\beta$ -hair-pin.. La fenditura che si crea tra le tre  $\alpha$ -eliche dei ripetuti C- ed N-terminale, è altamente conservata ed è implicata nel legame con fosfopeptidi (Glover *et al.*, 2004).

BRCA1 è espresso in molti tessuti e tipi cellulari suggerendo che non si tratta di una espressione tessuto specifica che porta allo sviluppo del cancro della mammella e dell'ovaio. La trascrizione di BRCA1 iniziata in tardo G1 e rimane alta nel corso della fase S, indicando un suo ruolo nella entrata in fase S della cellula. La sua funzione primaria si esplica nei processi di riparazione del DNA, infatti, il dominio BRCT lega BACH1, appartenente alla *DEAH helicase family*, partecipando così al processo di riparazione dei DSB (Clapperton et al., 2004). Al momento si conosce molto poco riguardo a tale interazione ma si è potuto comunque constatare che il legame BRCA1-BACH1 è un evento importante per il controllo del danneggiamento del DNA, durante la fase G<sub>2</sub> (Clapperton et al., 2004).

Il prodotto genico di BRCA1 interagisce anche con la proteina Rad51 un componente chiave nella ricombinazione omologa e nel riparo dei punti di rottura a doppia elica.

### **1.2.6.1 Mutazioni a carico di BRCA1**

Topi omozigoti knockout hanno dimostrato che la totale perdita di funzione di BRCA1 risulta in letalità embrionale in seguito alla perdita della proliferazione cellulare. Le cellule derivanti da tali embrioni hanno evidenziato difetti nei meccanismi di riparazione del DNA confermando che BRCA1 aiuta quindi a mantenere l'integrità genomica. Quando questa funzione viene persa, molto probabilmente si ha un accumulo di altri difetti genici che sono direttamente responsabili dello sviluppo del tumore.

Un altro ruolo attribuito a BRCA1 è quello di fattore di trascrizione, sembra infatti che in associazione a BARD1 sia in grado di trascrivere alcuni geni (Starita & Parvin, 2003).

Attraverso i suoi domini BRCT, BRCA1 è in grado di legare la proteina p53 fosforilata, attivando così la trascrizione del gene p21<sup>CIP/WAF</sup>, un potente inibitore della crescita nella fase G1/S (Lu & Arric, 2000)

In particolare, il prodotto genico di BRCA1 una volta sintetizzato nel citoplasma cellulare, si lega ad altre due proteine le importine alfa e beta e si localizza nel nucleo mediante l'attraversamento di un poro nucleare. In questa fase la proteina Ran GTP-dipendente fornirebbe l'energia necessaria per questo movimento. All'interno del nucleo il prodotto di BRCA1 svolgerebbe due funzioni, la prima consiste nel formare un eterodimero che grazie al dominio RING finger andrebbe ad agire sul DNA come fattore di trascrizione, mentre la seconda comporterebbe, mediante il legame con la proteina rad51 uno suo coinvolgimento nell'appaiamento dei cromosomi omologhi in corso di meiosi o durante il meccanismo di riparazione del DNA a doppia elica.

La maggior parte delle mutazioni identificate a carico di BRCA1 sono del tipo frameshift che causano la formazione di una proteina tronca ed inattiva. In tutti i tipi di cancro studiati, che presentavano una mutazione in BRCA1 in grado di causare una patologia, l'allele di tipo selvatico è andato perso ( perdita della eterozigosità).

Complessivamente, più di 600 differenti mutazioni sono state identificate in BRCA1, la maggior parte delle quali di tipo privato, presenti cioè in una sola famiglia di affetti. Circa un terzo delle mutazioni identificate sono di significato dubbio (Ransburgh et al., 2010).

### **1.3 SCOPO DELLA TESI**

Gli studi descritti in questo lavoro sperimentale, si sono basati su risultati (non ancora pubblicati), del Dipartimento di Morfologia ed Embriologia dell'Università di Ferrara, ottenuti con la tecnica di phage display in fago T7.

La ricerca ha portato all'isolamento di due peptidi in grado di legare residui di fosfoserina e fosfotreonina, derivanti dalla proteina p53 umana e riconducibili al dominio BRCT di PARP1. Si è quindi cercato di dimostrare la possibilità d'interazione tra le due proteine, interazione che avviene mediante coinvolgimento del dominio BRCT di PARP1.

Nel nostro lavoro abbiamo voluto verificare se tale interazione, potesse avvenire anche all'interno dell'ambiente cellulare. Le cellule U2OS, utilizzate come modello di morte cellulare indotta da UV, sono state indotte ad iperesprimere la sequenza BRCT mediante trasfezione. Particolare attenzione è stata rivolta alla messa a punto di un modello idoneo allo studio dell'interazione p53-BRCT e dell'effetto che tale interazione esercita a livello della cascata apoptotica indotta da raggi UV.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 MODELLO DI MORTE CELLULARE PER APOPTOSI P53 DIPENDENTE**

Come primo step di lavoro si è voluto ottimizzare un modello di morte cellulare da poter utilizzare per svolgere indagini più approfondite in merito al coinvolgimento di p53 e PARP1 nell'apoptosi indotta da UV. Come linea cellulare è stata scelta quella delle U2OS (*Human Bone OsteoSarcoma*).

#### **2.1.1 Le U2OS**

Le U2OS sono una linea cellulare derivante dall'osteosarcoma umano, sono cellule che vivono in adesione e che mostrano una morfologia di tipo epiteliale. Esse esprimono la p53 wild type, e sono state utilizzate in questo studio in quanto dalla letteratura si conosce che se sottoposte a diversi tipi di radiazioni, vanno in apoptosi o bloccano il loro ciclo cellulare in maniera p53 dipendente (Allan & Fried, 1999).

Le U2OS sono state coltivate in adesione in condizioni permissive di 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>, in terreno completo costituito da:

- DMEM (*Dulbecco Modified Eagles's Medium*; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.);
- 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*; Gibco BRL);
- L-Glutamina 2mM (Gibco BRL);

Per il mantenimento della coltura cellulare il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni, e le cellule a confluenza sono state staccate con Tripsina EDTA 0,25% (Gibco BRL) a 37°C per 1min.



## 2.1.2 TRATTAMENTO DELLE CELLULE U2OS CON UV

Le cellule sono state seminate su diversi supporti e in concentrazioni opportune, in funzione delle tecniche che sono state utilizzate e che verranno descritte in seguito. Dopo un periodo di 24h, per farle aderire, le U2OS sono state trattate per 1 minuto con raggi ultravioletti esponendo le stesse ad una sorgente UVC (OSRAM HNS 15W G13 15 Watt) posta alla distanza di 20cm. Oltre ai campioni trattati con UV sono stati preparati anche altri ai quali non è stato fatto nessun tipo di trattamento (NT= non trattato).

Oltre al trattamento con UV, in alcuni casi sono stati utilizzati anche degli inibitori, (Tab. 1).

INIBITORE	ACRONIMO	PROTEINA INIBITA	CONCENTRAZIONE D'USO	DITTA
Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone	Z-VAD-FMK	Caspasi 1 Caspasi 3	20µM	SIGMA
Pifithrin	PIF	p53	20µM	SIGMA
5-iodo-6-aminobenzopyrone	INH2BP	PARP	50µM	SIGMA
Isoquinoline	ISQ	PARP	250µM	SIGMA
3-aminobenzidine	3-AB	PARP	10mM	SIGMA

**Tabella 1:** specifiche degli inibitori utilizzati su cellule U2OS.

Gli inibitori sono stati addizionati al terreno, uno per ogni campione e dopo il trattamento con gli UV, per una durata di 24h.

Su questi campioni sono stati eseguiti test di vitalità e studio di markers apoptotici morfologici e genici (per i dettagli delle tecniche vedi di seguito).

### **2.1.3 QUANTIFICAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE**

Per valutare la vitalità cellulare sono stati utilizzate due metodiche colorimetriche che integrano la quantità numerica con l'attività mitocondriale cellulare (Plumb et al., 1989).

#### **2.1.3.1 Saggio MTT**

Il test MTT è utilizzato per determinare la citotossicità di potenziali farmaci o di altre sostanze tossiche. Questo saggio sfrutta la capacità delle cellule vitali di ridurre l'MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) normalmente di colore giallo in formazano viola (per maggiori dettagli sulla tecnica vedi Appendice 1).

Le U2OS sono state seminate in piastre da 96-wells, alla concentrazione di 5000 cellule/100µl/pozzetto. Dopo 24h dalla semina i campioni sono stati trattati con UV per 1min è stato addizionato un inibitore per ogni campione; gli inibitori utilizzati in questo test sono Z-VAD e PIF. Un campione senza inibitori ma trattato con UV è stato considerato il nostro controllo (NT UV). Per ogni campione sono stati preparati 8 replicati e l'intero esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

Dopo 24h dall'aggiunta degli inibitori, ad ogni campione sono stati addizionati 10µl di MTT 5mg/ml (SIGMA) in seguito sono stati incubati a 37°C per circa 3 ore.

Dopo aver eliminato il terreno ai campioni sono stati aggiunti 100µl di una soluzione di Isopropanolo + 10% di HCl 1M e lasciati in incubazione per almeno 30 minuti. La lettura della piastra è stata eseguita ad una lunghezza d'onda di 540nm, utilizzando un lettore ELISA (SIRIO, SEAC S. R. L., Firenze).

Il valore di assorbanza ottenuto per ogni campione, espresso come densità ottica (OD= optical density), è stato normalizzato rispetto al trattamento con il solo UV (considerato 0%) e sottoposto a indagine statistica.

### **2.1.3.2 Saggio MTS**

Questo tipo di esame permette di valutare la vitalità cellulare aggiungendo direttamente al terreno di coltura un sale ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt= MTS) che viene convertito dalle cellule vitali in un composto colorato e solubile nel terreno di coltura, il formazano. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive (per maggiori dettagli sulla tecnica vedi Appendice 2)

Le cellule dopo essere state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 1000-5000 cellule/100µl/pozzetto, sono state lasciate aderire per 24h dopo di che si è proceduto al trattamento.

In questo caso i campioni sono stati divisi in due gruppi:

- NON UV, dove troviamo cellule non trattate (NT) e altre alle quali è stato addizionato al terreno uno dei seguenti inibitori (ISQ, 3-AB o INH2BP) per 24h;
- UV, nel quale troviamo tutti campioni esposti ai raggi ultravioletti per 1min, di questi alcuni verranno considerati come non trattati (NT) mentre ad altre è stato aggiunto al terreno l'ISQ, la 3-AB o l'INH2BP per 24h.

Per ogni campione sono stati preparati 8 replicati e l'intero esperimento è stato ripetuto almeno 3 volte.

Scaduto il tempo di trattamento ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 20µl di una miscela composta da MTS (CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder, Promega) e PMS (SIGMA) in rapporto 20:1. Dopo 4h di incubazione a 37°C, è stata effettuata una lettura a 490nm con il lettore di piastre (SIRIO, SEAC S. R. L., Firenze).

Il valore di assorbanza ottenuto per ogni campione, espresso come densità ottica (OD= optical density), è stato analizzato e sottoposto a indagine statistica.

## **2.1.4 STUDIO DEI MARKERS DELL' APOPTOSI**

### **2.1.4.1 Markers morfologici**

Per questo tipo di indagine le cellule sono state seminate in piastre petri da 10cm di diametro, sono state e lasciate fino a raggiungere la confluenza. In seguito, almeno 3 piastre sono state trattate solo con gli UV come descritto in precedenza, mentre altre 3 sono state tenute come controllo (NT). La prova è stata ripetuta per almeno 5 volte.

Come marcatore apoptotico è stato utilizzato lo Ioduro di Propidio (PI) (SIGMA), un intercalante del DNA che colora in rosso i nuclei delle cellule morte o di quelle che hanno o la membrana cellulare alterata e quindi non erano più in grado di espellerlo. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2µg/ml di PI per 10 minuti, e in seguito la morfologia dei nuclei è stata osservata con il microscopio ottico a fluorescenza (Nikon Eclipse TE2000-U).

### **2.1.4.2 Markers genici: tecnica Western Blot**

Questo tipo di tecnica ci permette di isolare e quantificare proteine di nostro interesse da tessuti e cellule.

Per questo saggio le U2OS sono state seminate e trattate con UV come visto per il saggio dei markers morfologici. Anche in questo caso un campione di controllo è stato mantenuto non trattato. I campioni trattati sono stati raccolti a tempi diversi dopo l'esposizione agli UV (3-6-9-16-24h) per valutare l'espressione delle proteine nel tempo.

Le cellule così preparate sono state staccate con lo scraper e la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1.000rpm per 10 minuti, ed è stato mantenuto solo il pellet il quale è stato risospeso e lavato con PBS 1X e nuovamente centrifugato. Il surnatante è stato eliminato e al pellet è stato aggiunto il buffer per lisare le cellule (Lysis Buffer) completo degli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi per 10 minuti in ghiaccio.

LYSIS BUFFER:

- Trizma base 20 mM ph 7.5 (SIGMA);
- NaCl 150Mm (Fluka);
- Triton X-100 1% (SIGMA);

- Aprotinina 5µg/ml (Fluka);
- EDTA 1mM (SIGMA);
- Trypsin Inhibitor 50µg/ml (Fluka);
- Benzamidine 5mM (SIGMA);
- NaF 25mM (SIGMA);
- Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2,5mM (SIGMA);
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1mM (SIGMA);
- PMSF 2mM (Fluka);
- Leupeptina 0,1mg/ml (Fluka);
- DTT 0,1mg/ml (SIGMA).

I campioni sono stati in seguito centrifugati a 10.000rpm per 10 minuti a 4°C ed è stato recuperato il surnatante.

Le proteine presenti nel lisato cellulare sono state quantificate con il BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Il test è stato eseguito su piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, e la lettura effettuata a 562nm.

La curva di taratura è stata determinata con BSA (*Albumin from bovine serum*) fornita nel kit ed utilizzata a quantità note (1µg, 2µg, 5µg, 10µg, 25µg e 50µg).

Per ogni campione sono state preparate delle aliquote alla concentrazione di 15µg di proteine alle quali è stato aggiunto il Lane Marker TB4x. I campioni sono stati bolliti per 3-5 minuti, lasciati raffreddare a temperatura ambiente, infine sono stati caricati e risolti in minigel di acrilamide (Stacking 4%; Running 10%).

Come riferimento è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (BIO-RAD)

La corsa elettroforetica è stata svolta con un sistema di elettroforesi verticale minigel Mini-PROTEAN 3(BIO-RAD) a tensione costante di 100V.

Le proteine separate su gel sono state trasferite su di una membrana di PVDF (Hydrophobic polyvinylidene difluoride, Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P, Biosciences, GE) con l'apparecchiatura Mini Trans-Blot cell (BIO-RAD) a corrente costante per 1h.

Per l'immunorivelazione la membrana, previa attivazione in metanolo, è stata incubata con soluzione di saturazione al 5% di latte in TBST 1x (TBS + 0.05% di Tween 20, SIGMA), per 30 minuti a temperatura ambiente (T.A.) in agitazione.

Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi con TBST 1X per almeno 5 minuti l'uno a T.A. in agitazione.

L'anticorpo primario (AbI) (Santa Cruz) è stato diluito nella soluzione di saturazione al 3% di latte in TBST 1X, le concentrazioni e i tempi di incubazione sono riportati in Tabella 1.

Dopo tre lavaggi da 5 minuti in TBST 1X la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi (AbII-HRP) (Santa Cruz) diluito in soluzione di saturazione al 5% di latte in TBST 1X. Per concentrazioni e tempi di incubazione si veda la Tabella 1.

Il complesso AbI-AbII-HRP è stato rivelato con il Luminolo (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz) mediante esposizione su lastra fotografica (Kodak BioMax Light Film, SIGMA).

ANTICORPO PRIMARIO			ANTICORPO SECONDARIO		
Tipo	Concentrazione	Incubazione	Tipo	Concentrazione	Incubazione
<b>p53 (DO-1)</b> <b>(In Mouse)</b>	1: 500	Overnght 4°C in agitazione	Anti-Mouse- HRP	1:2000	1h
<b>B-Tubulin</b> <b>(H235)</b> <b>(In Rabbit)</b>			Anti-Rabbit- HRP		T.A. in agitazione

**Tabella 2:** Concentrazione e tempo di incubazione degli anticorpi primari e secondari utilizzati nell'immunorivelzione .

Per accertarsi del corretto caricamento dei campioni e per una eventuale normalizzazione degli stessi è stata utilizzata la banda a 55kDa della  $\beta$ -tubulina.

## **2. 2 STUDIO DELL'INTERAZIONE p53 BRCT**

L'analisi della interazione di queste due proteine parte da uno studio precedentemente svolto dal gruppo di ricerca del Dr. Stefano Volinia (*Dipartimento di Morfologia ed Embriologia dell'Università di Ferrara*), il quale con la tecnica del *T7 Select Phage Display* e del *Biopanning* ha isolato delle sequenze peptidiche in grado di legare sequenze fosfopeptidiche di p53. I cloni ottenuti, sono stati sequenziati e due in particolare sono risultati corrispondere a due porzioni della PARP1. Con la tecnica dell'affinity purification sono poi stati isolati i frammenti di PARP1 in grado di legare p53, questi, a loro volta, sono stati sequenziati, documentando che il dominio BRCT era quello che legava la p53 (questa parte precedente al nostro lavoro verrà descritta più accuratamente nei risultati).

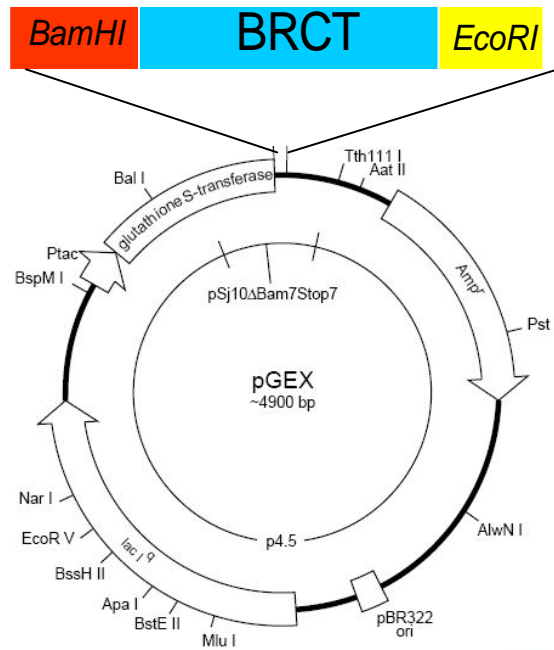
Partendo da questo presupposto si è voluto studiare questa interazione sul nostro modello cellulare esposto a trattamento UV, utilizzando le tecniche di affinity purification e il western blot.

### **2.2.1 AFFINITY PURIFICATION**

Questa è una tecnica cromatografica che permette di purificare una proteina di interesse partendo da un omogenato, questo risulta possibile grazie all'utilizzo di specifici ligandi della proteina di interesse che vengono immobilizzati su di un supporto. Dopo la formazione del legame specifico ligando-proteina si eluisce la proteina di interesse che può quindi essere analizzata (per maggiori dettagli sulla metodica vedi Appendice 3).

#### **2.2.1.1 Preparazione e immobilizzazione del ligando**

La proteina di fusione BRCT-GST è stata ottenuta mediante la realizzazione di un vettore, in cui la sequenza codificante per il BRCT è stato inserita in un vettore pGEX-2 (Pharmacia). (Fig. 22). Per tale fine sia il vettore che la sequenza sono stati tagliati con gli enzimi di restrizione BamHI e EcoRI.



**Figura 22:** schema del vettore pGEX e della sequenza BRCT inserita.

Il vettore è stato quindi inserito in batteri competenti, questi sono stati poi mantenuti in glicerolo a  $-80^{\circ}\text{C}$  come soluzione madre. All'occorrenza  $10\mu\text{l}$  di questa soluzione sono stati diluiti in  $500\mu\text{l}$  terreno LB (Luria-Bertani) (Tab. 3) di questi,  $10\mu\text{l}$  sono stati seminati su piastre petri da  $10\text{cm}$  di diametri, con terreno solido di coltura (LB-agar) (Tab. 3) addizionato con ampicillina ( $100\mu\text{g/ml}$  SIGMA), ed in seguito incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  over-night.

Il giorno seguente è stata prelevata una singola colonia ed inocolata in  $50\text{ ml}$  di terreno LB, incubata a  $37^{\circ}\text{C}$  over-night. Di questa coltura batterica  $2,5\text{ ml}$  sono stati diluiti in  $250\text{ ml}$  di terreno LB in una beuta da  $1\text{ litro}$  e mantenuta a  $37$  in agitazione. A questo punto è stata monitorata la crescita batterica mediante spettrofotometro S-22 UV/VIS (BOECO, Germany) al fine di ottenere un'assorbanza di  $0.6\text{OD}$ , ad una lunghezza d'onda di  $595\text{nm}$ .



<b>TERRENO LB (Luria-Bertani)</b>	<b>TERRENO LB-AGAR</b>
Tryptone 10gr/litro (Fluka) Yeast Extract 5gr/litro (Fluka) NaCl 10gr/litro (Fluka)	Terreno LB Agar 15gr/litro (SIGMA)

**Tabella 3:** composizione dei terreni di coltura batterica

Ottenuto il quantitativo di batteri necessari è stata indotta l'attività dell'enzima beta-galattosidasi mediante aggiunta di IPTG 1mM (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, (SIGMA) per indurre l'espressione del vettore. La soluzione è stata incubata in agitazione per 2-6 ore, poi dopo centrifuga a 5000rpm per 5 minuti è stato mantenuto il pellet e conservato a -80°C.

All'occorrenza il pellet è stato risospeso in un quinto del volume iniziale della coltura, aggiungendo il buffer di lisi per 15 minuti a T. A.

#### BUFFER DI LISI

- Trizma base 50mM ph 8. (SIGMA)
- EDTA 5mM (SIGMA);
- NaCl 5mM (Fluka)
- NP40 5ml/litro (Fluka)
- Glicerolo 100ml/litro (SIGMA)
- DTT 1 mM (SIGMA)
- PMSF 0,1mM (Fluka)

I batteri sono stati sonicati per 20 secondi, per tre volte con intervalli di 1 minuto e incubati per 15 minuti in ghiaccio poi centrifugati a 10000rpm per 10 minuti a 4°C. Il surnatante contenente la nostra proteina di fusione GST-BRCT è stato conservato mentre il pellet veniva eliminato.

## FUNZIONALIZZAZIONE DELLE BIGLIE E CREAZIONE DEL COMPLESSO

Il passo successivo è stata l'immobilizzazione del ligando su biglie di Glutathione Sepharose 4b (Amersham, Biosciences). Un'aliquota di 100µl di queste biglie è stata messa in una eppendorf e centrifugata per 30 secondi a 1000rpm per eliminare l'etanolo in cui sono diluite. A queste sono stati in seguito aggiunti 100 µl di il buffer di lisi.

Le biglie così preparate sono state addizionate al lisato batterico e incubato per circa 1 ora in agitazione a T. A. Dopo aver centrifugato 3000rpm per 2 minuti per permettere alle biglie di adagiarsi sul fondo, è stato eliminato il surnatante.

Al pellet è stato aggiunto 1 ml di buffer di lisi e incubato per 5 minuti a T. A., centrifugato a 1000 rpm per 1 min ed eliminato il surnatante. Le biglie sono state poi risospese in 500µl di buffer di lisi e conservate a 4°C. Così facendo si sono ottenute biglie funzionalizzate con la proteina di fusione legata (Fig. 23).



**Figura 23:** schema delle biglie funzionalizzate, legate con la proteina di fusione GST-BRCT.

### 2.2.1.2 Preparazione dei campioni e Affinity Purification

Le U2OS sono state seminate in piastre petri da 10cm di diametro e lasciate crescere fino a confluenza, un campione è stato tenuto come controllo (NT), mentre altri sono stati trattati con radiazioni ultraviolette per 1min I campioni trattati sono stati raccolti dopo 1-3-5-7-8-9-10-11-12h dal trattamento. Per ogni campione sono state eseguite almeno 3 repliche e la prova è stata svolta per almeno 5 volte.

Nei campioni ottenuti, il terreno è stato eliminato e le cellule lavate con PBS 1x (*Phosphate Buffer Solution*; Gibco, BRL) e mantenute in ghiaccio. Ad ogni piastra sono stati aggiunti 1,2ml di Lysis Buffer, addizionato di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, e così composto:

- Trizma base 20mM ph 7.5 (SIGMA);
- NaCl 150Mm (Fluka);
- Triton X-100 1% (SIGMA);
- Aprotinina 5µg/ml (Fluka);

- EDTA 1mM (SIGMA);
- Trypsin Inhibitor 50µg/ml (Fluka);
- Benzamidine 5mM (SIGMA);
- NaF 25mM (SIGMA);
- Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2,5mM (SIGMA);
- Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1mM (SIGMA);
- PMSF 2mM (Fluka);
- Leupeptina 0,1mg/ml (Fluka);
- DTT 0,1mg/ml (SIGMA);

Dopo 10 minuti di incubazione la soluzione è stata centrifugata a 9000rpm per 5 minuti ed il surnatante è stato mantenuto, ne è stato quantificato il contenuto di proteine mediante BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific) ed infine è stata eseguita l'affinity purification.

#### AFFINITY PURIFICATION

Di ogni campione lisato ne è stata presa una quantità pari a 100µg di proteine ed addizionato con 30µl di biglie funzionalizzate ed incubato over-night in agitazione a 4°C. Il giorno dopo i campioni sono stati centrifugati a 1000rpm per 10 secondi, il surnatante eliminato, e sul pellet sono stati eseguiti tre lavaggi, uno con 500µl di soluzione di lisi per staccare il complesso ligando-proteina dalla biglia, un secondo con 500µl di PBST 0,05% (PBS + 0.05% di Tween 20, SIGMA) ed infine con 500µl di PBS 1x.

Ad ogni campione sono poi stati aggiunti 25µl di Laemli Buffer 2 (SIGMA) ed in seguito sono stati denaturati a 95°C per 3 min. Infine, i campioni sono stati caricati su un gel di poliacrilamide al 10% e trasferiti con le modalità già viste per la tecnica del western blot.

Sulla membrana PVDF ottenuta è stata eseguita una immunorivelazione con l'anticorpo anti-p53 (Tab. 2) con la metodica descritta in precedenza.

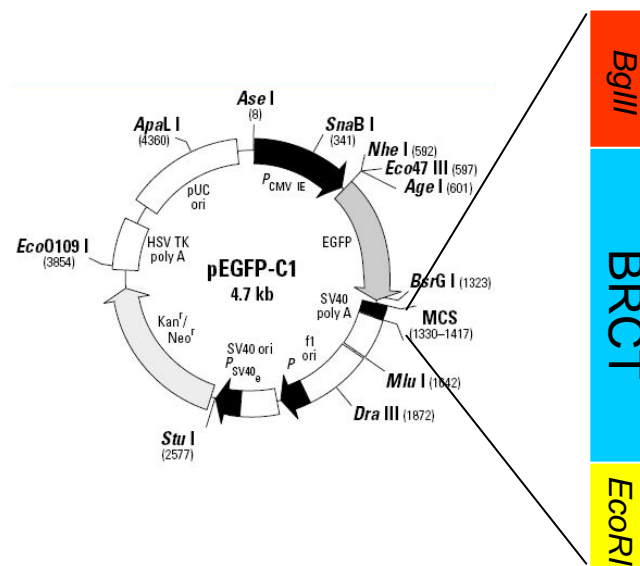
## 2.3 STUDIO DEL RUOLO DI BRCT

Una serie ulteriori di esperimenti è stata eseguita al fine di verificare il ruolo di BRCT nel pathway apoptotico p53 dipendente. Con questo fine è stata indotta una iperespressione della proteina BRCT tramite trasfezione e con conte cellulari e test di vitalità è stata indagata una sua eventuale capacità protettiva rispetto al danno indotto da radiazioni ultraviolette (Per maggiori dettagli sulla trasfezione vedi Appendice 4).

### 2.3.2 TRASFEZIONE E SELEZIONE DEI CLONI

Le cellule U2OS sono state seminate in piastre petri da 10cm di diametro con terreno completo e fatte crescere fino a coprire circa l'80% della piastra. Le cellule sono state divise in 2 gruppi:

- 1) Trasfettate con un costrutto, in grado di far esprimere la proteina di fusione GFP-BRCT, formato da un vettore base ePEGFP-C1 (Clonetech) in cui è stata inserita la sequenza BRCT. Sia la sequenza che il vettore erano stati preventivamente tagliati con gli enzimi di restrizione BgIII ed EcoRI (Fig. 24.)
- 2) Trasfettate con il solo vettore di controllo pEGFP-C1 (Fig. 24.)



**Figura 24:** Rappresentazione del vettore pEGFP-C1 (Clonetech) impiegato per la realizzazione del costrutto e di fianco la sequenza GFP-BRCT inserita.

## TRASFEZIONE

Per ogni piastra è stata preparata una soluzione (sol. 1) composta da 7,2µl di Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen) e di 172,8 µl di terreno di coltura senza siero ed è stata lasciata incubare sotto cappa per 5 minuti. Nel frattempo, è stata preparata un'altra soluzione (sol. 2) con il costrutto di interesse alla concentrazione di 0,5 µg/µl e con terreno di coltura senza siero. Le due soluzioni, in seguito, sono state unite e lasciate incubare per 20 minuti. Per ogni piastra campione è stata poi aggiunta la miscela (sol. 1 +sol. 2) direttamente al terreno e il tutto è stato incubato per 5-6 ore a 37°C.

Il giorno dopo le cellule trasfettate sono state selezionate aggiungendo il G418 (*Geneticin*) (SIGMA) alla concentrazione di 400µg/ml. In seguito, le cellule più marcate, segno dell'avvenuta trasfezione sono state espanse in terreno completo continuando ad aggiungere G418 in dosi ridotte progressivamente da 400µg/ml a 1µg/ml. Per verificare l'efficienza della trasfezione sono state eseguite indagini morfologiche, osservando direttamente le cellule al microscopio a fluorescenza. Inoltre, l'avvenuta trasfezione è stata valutata quantitativamente con il western blot (vedi paragrafo) tramite immunorivelazione con AbI 1:250 (Anti-GFP(FL)- in rabbit, Santa Cruz) e come AbII un Anti-rabbit-HRP (come da Tabella 2).

## TRATTAMENTO DELLE CELLULE TRASFETTATE

Le U2OS trasfettate sia con GFP sia con GFP-BRCT sono state poi esposte a UV per 1min. Di entrambi i gruppi sono state tenuti dei campioni non esposti agli UV, considerati i controlli. Per ogni gruppo di trasfezione sono stati trattati almeno 5 campioni e la prova è stata eseguita per 3 volte.

Sulle cellule così preparate sono state eseguite delle conte cellulari e saggi con MTS.

### **2.3.3 STUDIO DELLA VITALITA'**

#### CONTE CELLULARI

Nel caso delle conte cellulari su campioni contenenti cloni diversi, addizionati con PI 2µg/ml, è stato eseguito il conteggio su almeno 5 campi per ogni campione, questi campi son stati acquisiti al microscopio ottico a fluorescenza all'ingrandimento 20x, su questi sono state contate le cellule marcate, il dato è stato rapportato al numero totale di cellule presenti per ogni campo.

## SAGGIO CON MTS

In questo tipo di analisi i singoli cloni trasfettati (chiamati G per la GFP e B per il GFP-BRCT) sono stati seminati nelle piastre da 96 pozzetti ed in seguito esposti ad UV. Sui campioni il test è stato eseguito con le medesime modalità viste in precedenza (paragrafo 2.1.3.2). Il dato di assorbanza (OD=optical density) ricavato da ogni gruppo di trasfezione e da ogni clone è stato normalizzato rispetto al valore dei rispettivi non trattati con UV.

## **2.4 PROTEZIONE BRCT SU CELLULE p53 NEGATIVE**

Per completare il dato relativo al ruolo di BRCT nell'apoptosi p53 dipendente, indotta dagli UV sono stati ripetuti i saggi svolti sulle U2OS anche su un'altra linea cellulare, le H1299.

### **2.4.1 H1299**

Le H1299 conosciute anche come NCI-H1299 sono una linea cellulare di carcinoma polmonare umano derivante da linfonodi. Queste cellule sono caratterizzate dalla parziale perdita dell'omozigosi per il gene TP53 e quindi non è in grado di esprimere la proteina p53 con funzione di oncosoppressore (Lin & Chang, 1996).

Le H1299 sono state coltivate in adesione in condizioni permissive di 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>, in terreno completo costituito da:

- DMEM (Dulbecco Modified Eagles's Medium; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.);
- 10% FBS (Fetal Bovine Serum; Gibco BRL);
- L-Glutamina 2mM (Gibco BRL);

Per il mantenimento della coltura cellulare il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni, e le cellule a confluenza sono state staccate con Tripsina EDTA 0,25% (Gibco BRL) a 37°C per 1min.

## **2.4.2 TRASFEZIONE E STUDIO DELLA VITALITA' CON CONTA CELLULARE**

Come per le U2OS anche le H1299 sono state trasfettate o con il costrutto GFP o con quello GFP-BRCT con le stesse modalità viste in precedenza. In seguito a trattamento con UV sulle cellule è stata eseguita una conta cellulare. Per le specifiche dei trattamenti e delle analisi eseguiti si vedano i paragrafi precedenti relativi alle U2OS (2.3.2 e 2.3.3).

## **2.5 INDAGINE STATISTICA**

Al fine di valutare la significatività dei dati raccolti, ogni esperimento è stato ripetuto per almeno tre volte. I dati ricavati dai vari esperimenti sulla vitalità sono stati analizzati con InStat 3.5 (Graph Pad Software). Si è scelto d'analizzare i dati con un intervallo di confidenza del 95% e si è operata un'analisi della varianza univariata (ANOVA). Una probabilità d'errore d'analisi ( $p$  value= P), inferiore allo 0,05% è stata ritenuta significativa.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le radiazioni ultraviolette (UV) possono indurre stress ossidativo, denaturazione delle proteine e danni al DNA sotto forma di dimeri di pirimidina e fotoprodotto (Gruijl et al., 2001; Ravanat et al., 2001).

L'intensità dello stimolo che danneggia il DNA è responsabile del destino della cellula: sopravvivenza o morte cellulare. Se il danno è lieve, vengono attivati i sistemi di riparazione del DNA, quali poli(ADP) ribosilazione ad opera di PARP (Tong et al; 2001), che nella maggior parte dei casi assicurano un recupero del danno e sopravvivenza cellulare. Però, di fronte ad un insulto genotossico più grave, i meccanismi di riparazione possono risultare insufficienti al punto da rendersi necessario l'avvio del pathway apoptotico che vede coinvolta anche la proteina p53. E' bene ricordare che in casi estremi, a seguito di un danno molto esteso del DNA, un'iper attivazione di PARP può causare morte della cellula per necrosi, in quanto il consumo eccessivo di NAD<sup>+</sup> porta ad una rapida deplezione di ATP (Ha & Snyder, 1999).

Fra i meccanismi coinvolti nel mantenimento dell'integrità genomica, sono di particolare importanza quelli che regolano le interazioni fra le proteine coinvolte nel pathway apoptotico, uno di questi è la fosforilazione.

Il punto di partenza del nostro lavoro sono i risultati, ottenuti dal dr. Stefano Volinia e dal suo *team* (Dipartimento di Morfologia ed Embriologia dell'Università di Ferrara).

Basandosi sulle informazioni riguardanti la sequenza aminoacidica di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, hanno utilizzato peptidi contenenti residui di fosfoserina e fosfotreonina derivanti dalla proteina p53 umana, come molecole bersaglio per lo screening della libreria di espressione *T7 Select Phage Display* di cervello umano. La lunghezza media dei cDNA che compongono la libreria, varia da 0,5 a 1Kb. Per la selezione dei cloni in grado di legare fosfopeptidi, si è utilizzato il metodo del biopanning, con due differenti approcci di analisi:

1. Utilizzo di 6 fosfopeptidi derivanti dalla proteina p53 umana, fosforilati in residui di Serina e Treonina ed immobilizzati su *Affigel-15* (Bio-rad). Dopo 4 cicli di selezione sono stati isolati 9 cloni in grado di legare i fosfopeptidi p53 derivati. Come controllo si sono utilizzati gli stessi peptidi derivati dalla p53 ma non fosforilati. In tal caso non è stato possibile isolare alcun clone perché nessuno si legava alle molecole bersaglio immobilizzate.



2. Utilizzo di una miscela di librerie di fosfoserina (pSer, pSerPro e pSerGln), e di peptidi fosforilati derivanti da proteine umane tra cui cdc25, NM23 e Pintide.

Anche in questo caso, i cicli di selezione, hanno portato all'isolamento di 9 cloni.

I cloni isolati sono stati amplificati e successivamente separati per elettroforesi. Dei 18 cloni analizzati, 4 si sono significativamente distinti per dimensioni, con una lunghezza compresa tra 1,5 e 1,8 Kb. Questi cloni (S5pSER09, S4p5311, S4p4316 e S4p5318) sono stati selezionati positivamente perché oltre ad avere un'affinità di legame per peptidi contenenti residui di fosfoserina, sono cloni molto più lunghi di quelli selezionati e di quelli componenti la libreria.

Il passo successivo è stato il sequenziamento dei 4 cloni e lo scanning della sequenza nucleotidica utilizzando il programma BLAST.

L'allineamento della sequenza del clone S5pSER09 con tutte le proteine della banca dati SwissProt, ha permesso di stabilire che a tale clone corrisponde la proteina umana MAP2. Per quanto riguarda i cloni S4p5311 e S4p5316, sono risultati corrispondere a due distinte porzioni della proteina PARP-1 umana. Infine, il clone S4p5318 è risultato corrispondere ad una proteina non ancora identificata, ma che si sa essere codificata da un gene localizzato a livello del cromosoma 10.

Una volta dimostrata l'affinità tra le due proteine, rimaneva da chiarire quali domini di PARP fossero coinvolti nel legame con p53.

Si è quindi effettuato uno studio mediante affinity purification, con il quale frammenti diversi della sequenza di PARP-1 sono stati immobilizzati su micro-biglie attraverso un legame GST-GSH-mediato ed esposti a p53. I frammenti risultati essere in grado di legare p53 sono stati purificati, amplificati e sequenziati. Le sequenze ottenute, capaci di legare p53, corrispondevano al dominio BRCT di PARP-1.

Nel nostro lavoro abbiamo cercato di valutare se l'interazione osservata avviene anche nell'ambiente intracellulare e quale effetto ha sul comportamento della cellula stessa.

Per prima cosa si è quindi reso necessario, mettere a punto un modello di morte cellulare per apoptosi indotta da un danno genotossico.

### **3.1 U2OS e UV: modello di morte cellulare**

Come linea cellulare abbiamo scelto le U2OS (*Human Bone OsteoSarcoma*), una linea trasformata proveniente da tessuto osseo affetto da sarcoma, in grado di esprimere la proteina p53 wild type.

La scelta dell'agente inducente danni al DNA è ricaduta sui raggi UV, in quanto l'abbondante letteratura in materia correla ampiamente la morte per apoptosi con l'esposizione a questa fonte di radiazioni (Allan & Fried, 1999).

Dopo diverse prove di esposizione ai raggi UV, siamo giunti alla conclusione che l'irradiazione per un minuto ad una distanza di 20 cm dalla sorgente, sono condizioni adeguate per ottenere una percentuale di morte pari al 50-60%, a 24ore dal trattamento. Stabiliti i tempi di irradiazione, siamo andati a verificare l'effettiva capacità del trattamento di avviare la cascata apoptotica, piuttosto che la necrosi.

Per valutare il processo apoptotico ci siamo avvalsi di differenti tecniche, come la microscopia a fluorescenza che ci ha consentito di visualizzare le variazioni morfologiche, il Western blotting per analizzare la diversa espressione di proteine coinvolte nell'apoptosi ed infine l'uso di saggi colorimetrici per valutare l'effetto di specifici inibitori sulla vitalità delle cellule trattate

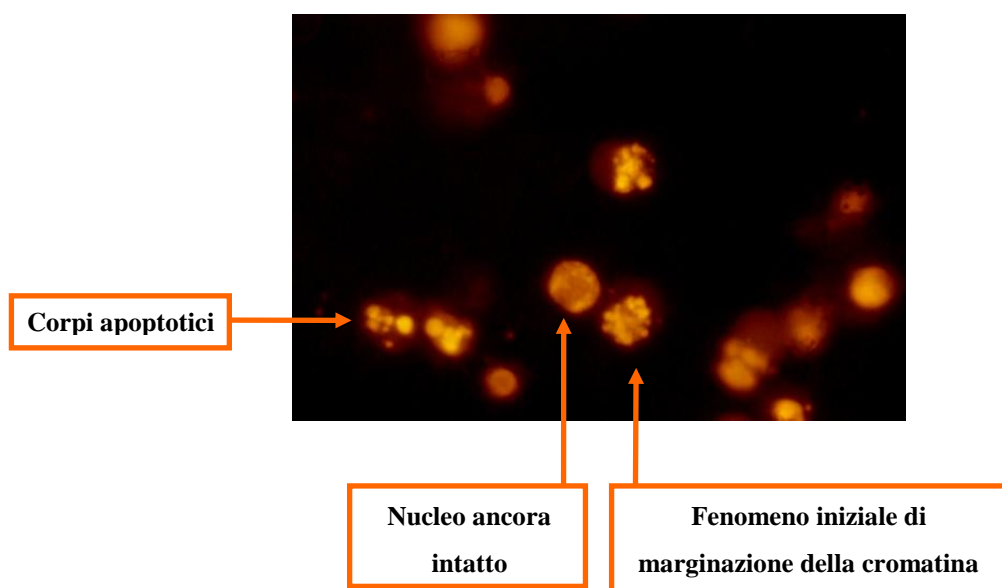
#### **3.1.1 ANALISI DI MARKER MORFOLOGICI MEDIANTE MICROSCOPIA**

La cellula apoptotica subisce una serie di alterazioni morfologiche che possono essere visualizzate microscopicamente con l'utilizzo dello Ioduro di Propidio (PI), un colorante di natura fenantridinica, che si intercala in modo stechiometrico tra le coppie di basi del DNA in doppia elica. Una volta intercalato, il PI emette una fluorescenza rossa che può essere sfruttata per un'analisi qualitativa al microscopio a fluorescenza, dato che il PI rende visibile la conformazione nucleare ed agisce marcando di rosso le cellule con membrana cellulare danneggiata.

Dopo 24 ore dall'esposizione di un minuto agli UV, le cellule sono state trattate con Ioduro di Propidio e analizzate al microscopio a fluorescenza.

Come si può osservare dalla figura 25, sono state ritrovate cellule che mostrano differenti morfologie, alcune presentano il nucleo ancora integro, altre presentano una

parziale marginazione della cromatina ed altre ancora hanno un nucleo picnotico. Tutte queste alterazioni sono tipiche dell'evento apoptotico.



**Figura 25:** immagine al microscopio a fluorescenza di cellule trattate con 1 minuto di UV osservate a 24 ore dall'esposizione. Ingrandimento 20x.

### 3.1.2 INIBITORI DELL'APOPTOSI E VITALITA'

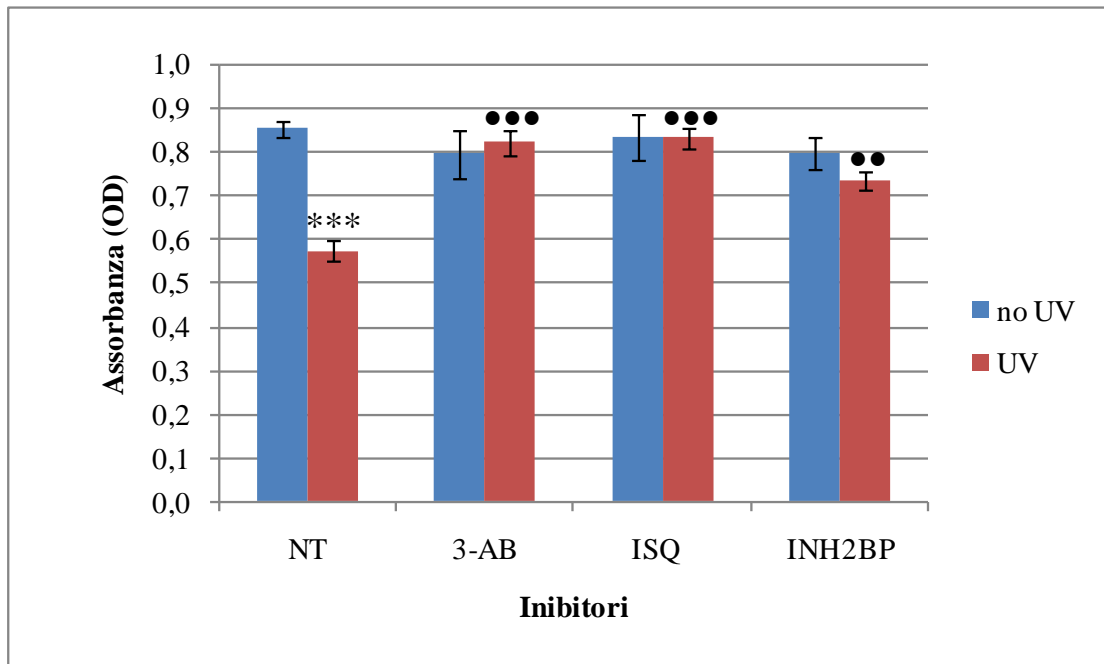
Per verificare il coinvolgimento di caspasi, p53 e PARP nel processo apoptotico, si sono effettuati saggi di vitalità, impiegando inibitori specifici delle proteine di nostro interesse. Con l'utilizzo del saggio MTT abbiamo testato l'effetto della pifitrina in grado di inibire l'attività di p53 (Murphy et al., 2004) e Z-Vad inibitore delle caspasi sui campioni trattati con gli UV.

Quello che si è osservato, normalizzando i dati rispetto al campione trattato con i soli UV considerato pari allo 0%, è che a 24 ore dal trattamento, i campioni in cui è stato aggiunto un inibitore mostrano percentuali di recupero diverse. L'utilizzo della pifitrina ha evidenziato un recupero del 50% di cellule viventi, mentre Z-VAD ha mostrato un recupero del 45% (Tab. 4).

<b>CAMPIONI</b>	<b>% CELLULE % CELLULE VIVE DOPO UV VIVE DOPO UV</b>
<b>SOLO UV</b>	<b>0%</b>
<b>UV + Z-VAD</b>	<b>45%</b>
<b>UV + PIF</b>	<b>50%</b>

**Tabella 4:** Saggio MTT condotto su cellule U2OS trattate con inibitori, dopo trattamento UV. Dati normalizzati rispetto al trattamento con i soli UV.

Lo studio del coinvolgimento di PARP-1 è stato effettuato con un esperimento simile al precedente, nel quale è stato utilizzato come saggio di vitalità l'MTS. In questo caso, tre inibitori specifici di PARP-1 sono stati aggiunti al terreno di coltura dopo il trattamento con UV. Dopo 24 ore è stato effettuato il saggio colorimetrico. Dai dati ottenuti confrontando le assorbanze dei singoli trattamenti con quella del campione non trattato, risulta che la presenza degli inibitori di PARP-1 (3-AB, ISQ, INH2BP) non ha dato effetti tossici, mentre la mortalità indotta dai raggi UV è risultata significativamente elevata rispetto al campione non irraggiato ( $P < 0,001$ ) (Fig. 26). Infine, abbiamo osservato che la presenza dell'inibitore riduce significativamente la mortalità rispetto al campione senza inibitori ma esposto ai raggi UV (INH2BP *vs* NT UV  $P < 0,01$ ; 3-AB e ISQ *vs* NT UV  $P < 0,001$ ) (Fig. 26).



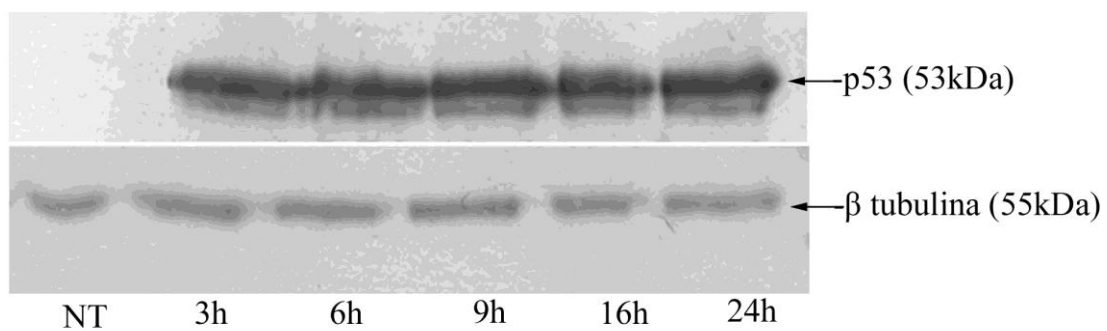
**Figura 26:** Effetto degli inibitori di PARP-1 (3-AB, ISQ, INH2BP) su U2OS trattate con i raggi UV. NT= cellule senza inibitori. \*= significatività calcolata rispetto al campione NT senza UV (\*\*\*:  $p < 0,001$ ); ●: significatività calcolata rispetto al campione senza inibitori ma trattato con UV (●●:  $p < 0,01$ ; ●●●:  $p < 0,001$ ).

Questi dati ci lasciano supporre che le proteine sopracitate siano attivamente coinvolte nel nostro modello di morte cellulare per apoptosi.

### 3.1.3 QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI P53

Dal momento che lo studio con gli inibitori suggerisce un coinvolgimento di p53 nel nostro modello cellulare, abbiamo voluto analizzare l'espressione della proteina in campioni trattati con UV per 1 minuto.

Come è possibile osservare dalla figura 27, nel campione non trattato la proteina p53 è assente, mentre dopo 3 ore dal trattamento si assiste ad un incremento della concentrazione della proteina. Tale incremento resta elevato anche dopo 24 ore.



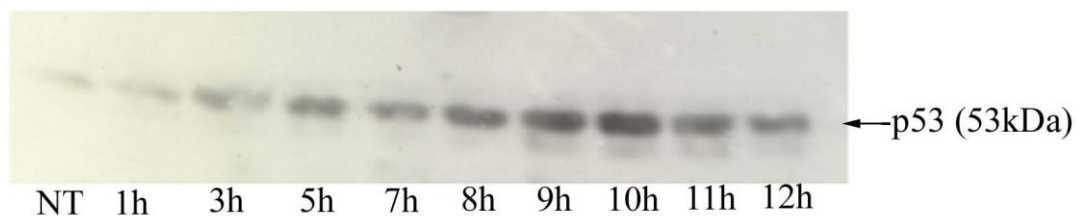
**Figura 27:** espressione di p53 in cellule U2OS dopo 3-6-9-16 e 24h dal trattamento con UV. NT= campione non trattato.

Questi risultati ci permettono di affermare che un'elevata percentuale della morte indotta dal trattamento UV avviene mediante apoptosi e che tale processo è caspasi dipendente, p53 e PARP-mediata.

### 3.2 INTERAZIONE BRCT-p53

A questo punto si è voluto verificare se l'interazione con la sequenza BRCT ottenuta, avvenisse anche con la proteina p53 sintetizzata dalle cellule. Per fare ciò si è effettuata un'analisi d'interazione mediante affinity purification. A tale fine la sequenza è stata inserita in un vettore di espressione batterico pGEX2 (Fig. 22), in grado di produrre la proteina di fusione BRCT-GST la quale è stata immobilizzata su biglie di *Glutathione Sepharose 4B*. In seguito la fase solida così ottenuta, è stata incubata con 250µg di lisato totale di cellule U2OS a tempi diversi dal trattamento con 1 minuti di UV (1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 e 12 ore).

Si è potuto così osservare che, inizialmente, la capacità di BRCT esogeno di legare la p53 delle cellule è immediata ed aumenta in maniera tempo-dipendente, verosimilmente in parallelo con l'aumento di espressione di p53, con un massimo tra le 8 e le 10 ore dall'esposizione. Successivamente però, si osserva una diminuzione del legame (Fig. 28), nonostante la quantità di p53 si mantenga elevata, come precedentemente dimostrato (Fig. 27).



**Figura 28:** Recupero di p53 mediante Affinity Purification.

Vi è quindi una notevole differenza fra la cinetica dell'espressione di p53 e quella della sua interazione con BRCT. Tale riduzione di affinità tra BRCT e p53 potrebbe essere la conseguenza di modificazioni post-traduzionali (fosforilazione o defosforilazione) a carico di quest'ultima.

### **3.3 RUOLO DI BRCT NEL PROCESSO APOPTOTICO**

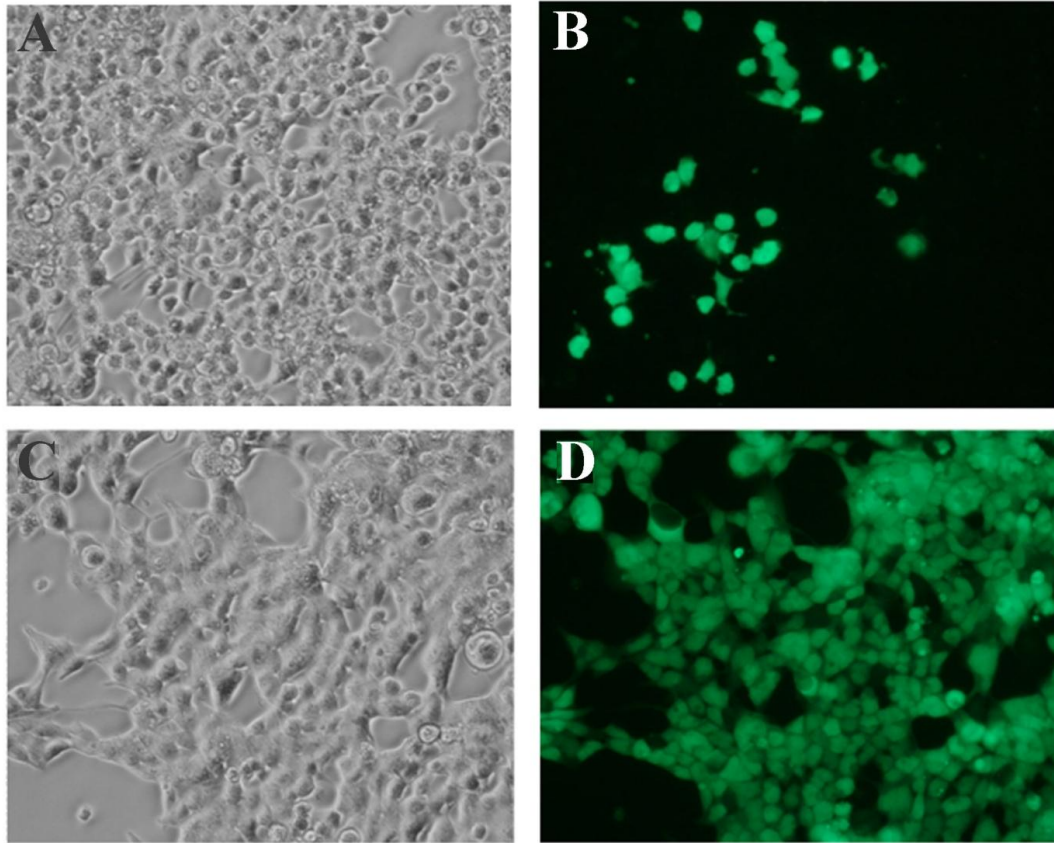
Una volta verificata l'esistenza dell'interazione tra BRCT esogeno e p53 e valutate la sua cinetica, si è voluto valutare se tale interazione potesse avvenire anche nell'ambiente intracellulare e quale fosse il suo effetto sul percorso apoptotico

#### **3.3.1 TRASFEZIONE DELLE CELLULE U2OS E LORO SUCCESSIVA SELEZIONE**

Le cellule U2OS sono state quindi indotte ad iper-esprimere la sequenza BRCT mediante trasfezione con un vettore pEGFP-C1 contenente la sequenza per l'espressione della proteina di fusione BRCT-GFP. Come controllo si è utilizzato un vettore contenente solo la proteina GFP. Entrambi i vettori utilizzati (BRCT-GFP e GFP) contengono il gene per la resistenza all'antibiotico G418 (Geneticina) (Fig. 24). Mediante trasfezione con lipofectamina si sono ottenute due linee di cloni quelli esprimenti BRCT-GFP e quelli esprimenti la sola GFP.

Come mostrano le immagini (Fig. 29), inizialmente la trasfezione ha mostrato un'efficienza molto bassa, infatti solo una piccola percentuale di cellule apparivano verdi al microscopio a fluorescenza (Fig. 29 A, B).



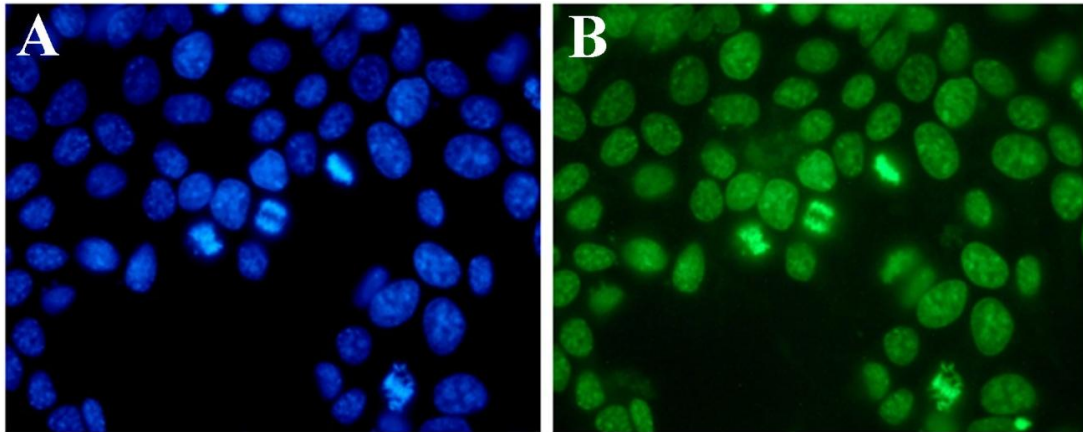


**Figura 29:** U2OS trasfettate con GFP e selezionate. Le immagini A e B mostrano il primo step della trasfezione, mentre le immagini C e D mostrano la selezione con G418 delle cellule. (A e C: immagini a contrasto di fase; B e D: immagini a fluorescenza con filtro in eccitazione a 480nm e in emissione a 510nm).

Si è quindi reso necessario isolare cloni stabili. Per effettuare ciò, dopo un trattamento di 48 ore con G418 sono state selezionate alcune cellule che mostravano la maggiore intensità di colorazione. Le cellule così ottenute hanno trascorso un periodo di selezione di un mese, durante il quale la concentrazione di G418 è stata progressivamente ridotta da 400  $\mu\text{g/ml}$  a 1  $\mu\text{g/ml}$ . Dall'analisi al microscopio a fluorescenza si è potuto verificare che più del 90% delle cellule risultava essere trasfettato con successo (Fig. 29 C, D).

Un altro dato interessante che si è evinto dall'osservazione al microscopio a fluorescenza dei cloni, è la differenza nella localizzazione del complesso BRCT-GFP rispetto a quella della sola GFP.

Dalla figura 30 si può infatti notare come il complesso BRCT-GFP sia localizzato esclusivamente nel nucleo, mentre la sola GFP è presente anche nel citoplasma (Fig. 28).

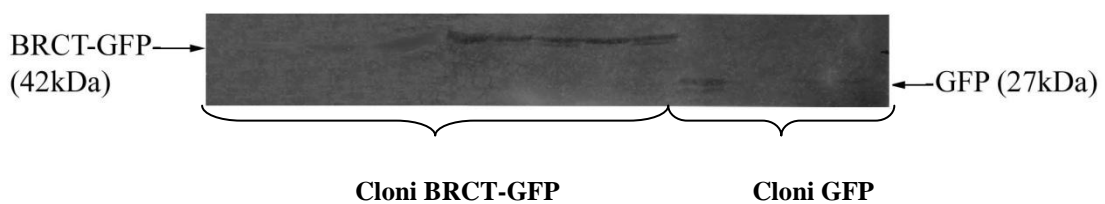


**Figura 30:** Localizzazione nucleare della fluorescenza in cloni BRCT-GFP stabili (A: colorazione nucleare blu con Hoechst, evidenziati i nuclei delle cellule U2OS; B: in verde localizzazione nucleare di BRCT-GFP) (ingrandimento 40x).

Questo comportamento era atteso in quanto molte proteine che possiedono il dominio BRCT hanno una localizzazione nucleare (Clapperton et al., 2004).

Per verificare l'effettiva riuscita della trasfezione, è stato effettuato un controllo mediante western blot, andando ad immunorivelare la proteina GFP.

Come è possibile notare dalla lastra (Fig. 31), nei cloni BRCT-GFP è presente una banda da 42kDa, che corrisponde alla proteina di fusione BRCT-GFP, il cui peso molecolare è dato dalla somma dei pesi molecolari della GFP (27kDa) e della sequenza BRCT (~15kDa). Nei cloni GFP è presente una banda da 27kDa, relativa al peso molecolare della sola proteina GFP.



**Figura 31:** Immunorivelazione della GFP in cloni di U2OS trasfettati con BRCT-GFP o con GFP.

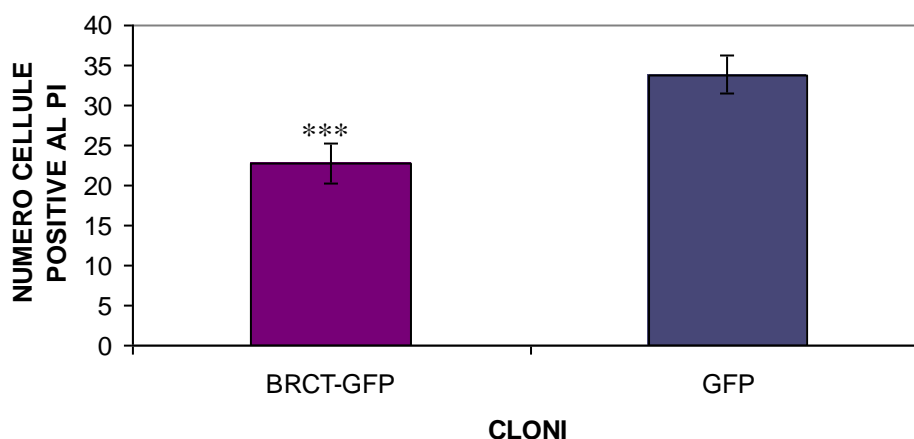
### 3.3.2 EFFETTO DELL'INTEREAZIONE P53-BRCT SULLA VITALITA'

Per valutare l'effetto dell'interazione p53-BRCT sulla morte cellulare, si sono utilizzati due tipi di metodologie, uno basato sulla conta delle cellule ed uno basato sul saggio di vitalità MTS.

#### 3.3.2.1 Conta cellulare

Dopo 24 ore dal trattamento UV, sia ai cloni GFP-BRCT che ai soli GFP sono stati aggiunti nel terreno di coltura PI 2 $\mu$ g/ml. Con il microscopio a fluorescenza si sono effettuate fotografie di 5 campi per piastra, con un ingrandimento 20x. Il numero di cellule rosse è stato poi determinato mediante conta manuale.

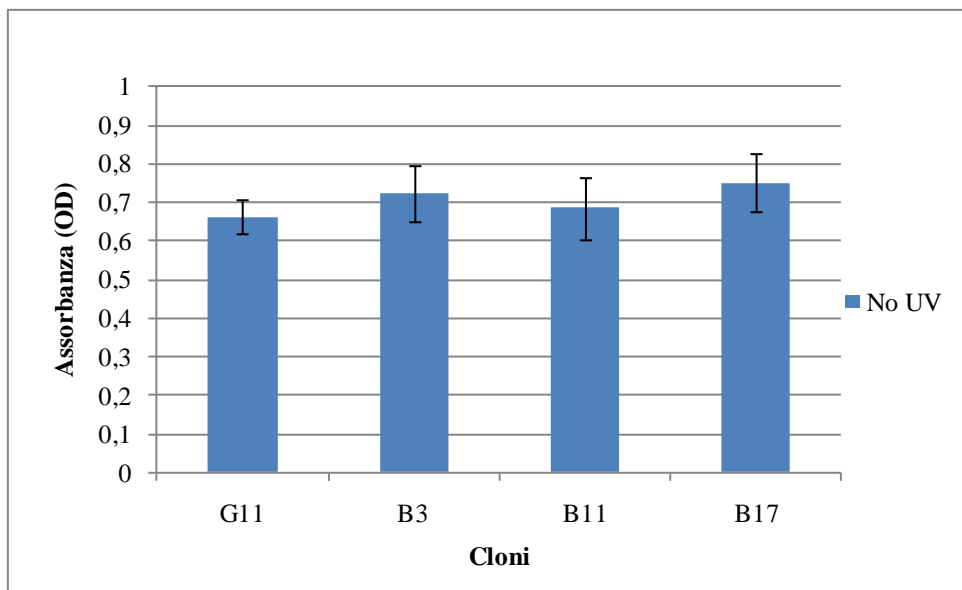
Confrontando la quantità media di cellule morte (rosse) dei cloni BRCT-GFP e GFP, si è potuto osservare che, a parità di trattamento, i cloni BRCT-GFP presentano una mortalità inferiore del 34%, facendoci ipotizzare un'azione protettiva di BRCT. L'analisi statistica ha indicato come altamente significativa la differenza ( $P < 0,001\%$ ) (Fig. 32).



**Figura 32:** mortalità indotta dal trattamento UV su cellule U2OS trasfettate con il vettore BRCT-GFP o con il vettore GFP. \*: significatività calcolata rispetto al campione trasfettato con GFP (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

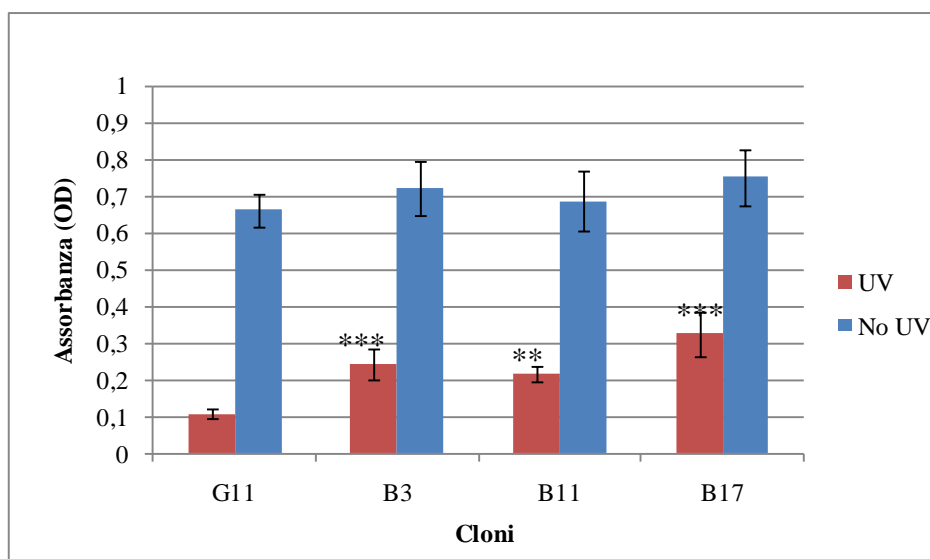
### **3.3.2.2 Saggio di vitalità con mts**

Per confermare ulteriormente il dato ottenuto dalle conte cellulari, si è deciso di eseguire il saggio MTS sui cloni BRCT-GFP (chiamati B) e GFP (chiamati G) trattati con UV. Come è possibile notare dal grafico sotto riportato i dati mostrano che senza trattamento con UV, non vi è nessuna differenza significativa fra i cloni BRCT-GFP e quello GFP utilizzato come controllo, dimostrando che la presenza del BRCT-GFP non altera la vitalità in condizioni cellulari normali (Fig. 33).



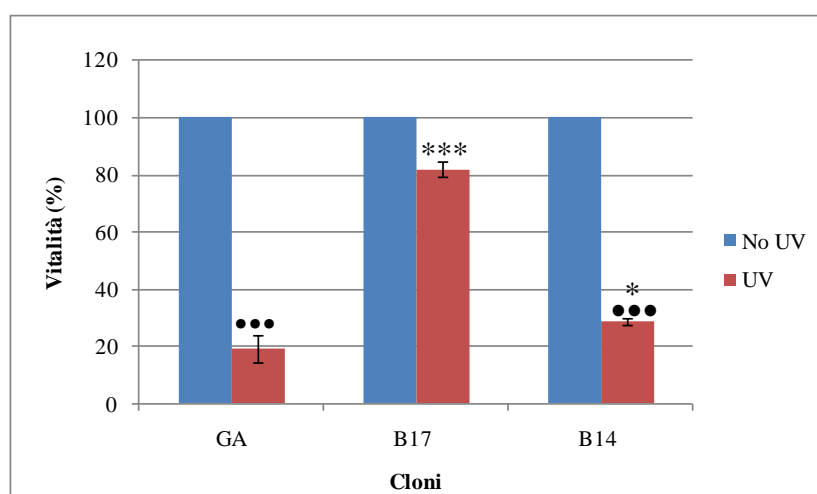
**Figura 33:** Vitalità di cloni BRCT-GFP e GFP non trattati con UV.

In seguito a trattamento con UV invece, si può notare una significativa differenza nella vitalità dei cloni BRCT-GF che risulta molto più alta, rispetto quella dei cloni GFP (B3 vs G11  $p < 0,001$ , B11 vs G11  $p < 0,01$  e B17 vs G11  $p < 0,001$ ) (Fig. 34).



**Figura 34:** vitalità dei cloni di U2OS trasfettate con BRCT-GFP (B3-B11-B17) o GFP (G11).  
Significatività calcolata rispetto al campione G11 (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

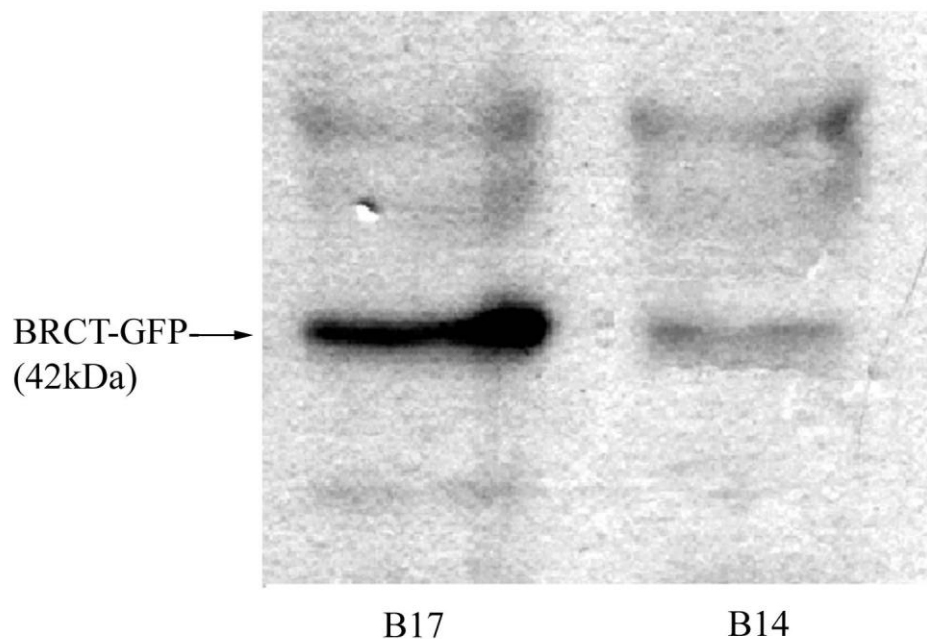
In un altro esperimento effettuato con la stessa tecnica abbiamo nuovamente confrontato cloni BRCT-GFP (B17 e B14) e un clone GFP (GA). In questo caso i dati sono stati analizzati valutando il decremento percentuale della vitalità di ogni clone BRCT-GFP rispetto al proprio non trattato che è stato normalizzato al 100%, i decrementi sono stati poi confrontati con quello del clone GA. I dati mostrano innanzitutto una significativa riduzione della vitalità causata dai raggi UV nel clone GFP (GA vs GA UV  $P < 0,001$ ) (Fig. 35).



**Figura 35:** vitalità di cloni di U2OS trasfettate con BRCT-GFP (B14, B17) o con GFP (GA). Per ogni clone il dato è stato normalizzato portando a 100% il dato no UV. \*: significatività calcolata rispetto al valore di GA (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ) ●: significatività calcolata rispetto al no UV (●●●:  $p < 0,001$ ).

Per quanto riguarda i cloni BRCT-GFP si può notare che mentre in B17 la riduzione della vitalità non è stata significativa rispetto al suo non trattato, per il clone B14 tale riduzione risulta più marcata (B14 vs B14 UV  $P < 0,001$ ), rimanendo però sempre significativamente minore rispetto a quella del clone GFP (B14 UV vs GA UV  $P < 0,05$ ). Per il clone B17 trattato con UV si è inoltre, notato un aumento significativo della vitalità cellulare rispetto al valore del clone GA (B17 UV vs GA UV  $P < 0,001$ ), indicando nuovamente un effetto protettivo del BRCT (Fig.35).

Per cercare di spiegare la netta differenza osservata tra i cloni B14 UV e B17 UV si è analizzata l'espressione della proteina BRCT-GFP mediante western blot, e immunorivelazione della GFP, osservando che nel clone B14 questa espressione era ridotta rispetto al clone B17 e quindi possiamo dire che quest'ultimo era maggiormente protetto (Fig. 36).



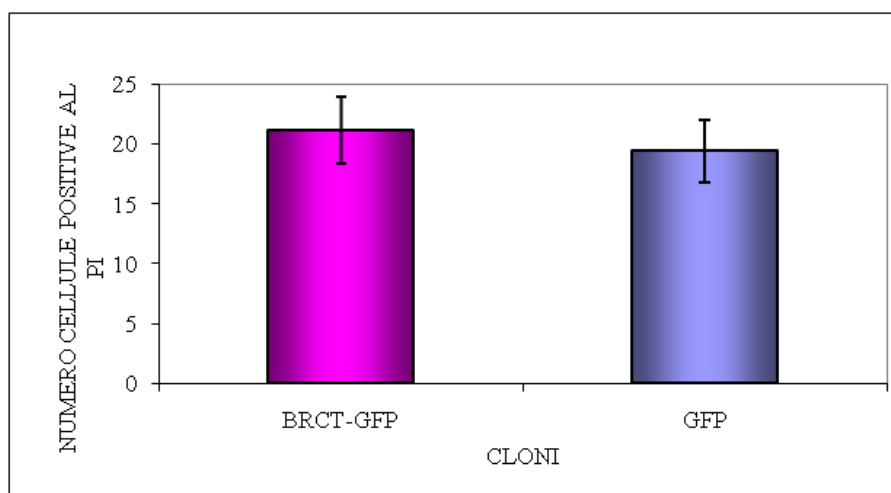
**Figura 36:** espressione della proteina di fusione BRCT-GFP nei cloni di U2OS trasfettate con il vettore BRCT-GFP e trattate con UV.

### 3.3 VALUTAZIONE DELLA MORTE CELLULARE IN CELLULE H1299

Dal momento che i risultati ottenuti sui cloni U2OS, BRCT-GFP e GFP, mediante conta cellulare e saggio colorimetrico, suggeriscono un'azione protettiva di BRCT dovuta alla sua interazione con p53, si è voluto verificare se tale effetto protettivo fosse effettivamente dovuto all'interazione in oggetto e non ad un altro evento cellulare.

Si sono quindi utilizzate cellule H1299 (*Human Lung Carcinoma Epithelial Cells*), che hanno la caratteristica di essere p53-negative. Mediante trasfezione con lipofectamina si sono ottenuti cloni stabili esprimenti BRCT-GFP e GFP. Questi, sono stati trattati con radiazioni UV e dopo 24 ore, sono state colorati con ioduro di propidio, fotografati al microscopio a fluorescenza ed analizzati mediante conta cellulare come già fatto in precedenza per le U2OS.

Dall'analisi dei dati ottenuti, non si è rilevata una differenza significativa di vitalità tra cloni BRCT-GFP e cloni GFP, ad ulteriore sostegno quindi dell'ipotesi protettiva di BRCT mediante la sua interazione con p53 (Fig. 37).



**Figura 37:** mortalità cellulare di cloni di H1299 trasfettate con BRCT-GFP o con GFP e poi esposte a raggi UV.

## 4. CONCLUSIONI E OBIETTIVI FUTURI

I dati ottenuti dai saggi colorimetrici, dalle conte cellulari, dalle osservazioni morfologiche e dai wetsrn blot ci hanno consentito di stabilire che il modello cellulare costituito dalle U2OS trattate con raggi ultravioletti è un buon modello di morte per apoptosi p53 e caspasi dipendente e che vede il coinvolgimento di PARP-1. E' stato infatti possibile valutare una riduzione significativa della mortalità, quando in seguito al trattamento venivano aggiunti gli inibitori delle proteine sopra citate.

Ci è stato, inoltre, possibile valutare l'incremento dell'espressione di p53 in seguito all'esposizione ai raggi UV. Siamo quindi riusciti a dimostrare che è possibile l'interazione fra p53 e la proteina di fusione BRCT-GST da noi prodotta e che tale interazione ha una cinetica notevolmente diversa da quella di espressione di p53. L'interazione ha un massimo di espressione a 8-10 ore dal trattamento, diversamente dalla sola p53 per la quale tale picco si osserva dopo 24 ore. La differenza nelle due cinetiche si suppone essere imputabile a qualche modificazione post-traduzionale di p53, probabilmente una fosforilazione.

In seguito siamo riusciti a far esprimere la sequenza BRCT all'interno delle cellule, mediante trasfezione con un vettore in grado di far sintetizzare la proteina di fusione BRCT-GFP. Tale proteina si è vista poi essere localizzata nel nucleo, comportamento simile a molte proteine che possiedono il dominio BRCT.

Come passo successivo siamo riusciti a verificare, mediante affinity purification, che avvenisse anche l'interazione fra p53 e la proteina di fusione BRCT-GFP sintetizzata dalla cellula. Tale interazione si è dimostrata avere un effetto protettivo nei confronti della morte per apoptosi indotta dai raggi UV.

Si presume che BRCT-GFP competa con PARP1 per il sito specifico di legame su p53; tale evento ridurrebbe notevolmente la percentuale di PARP1 attivata, con una conseguente alterazione della normale via apoptotica. Questa ipotesi è stata positivamente supportata sia dal fatto che l'effetto protettivo di BRCT-GFP è direttamente proporzionale alla sua quantità espressa dalla cellula e dal fatto che cellule p53 negative, come le H1299, una volta trasfettate con lo stesso vettore non hanno mostrato nessuna riduzione della mortalità in seguito all'esposizione ai raggi UV.

Sarà necessario per il futuro chiarire ulteriormente come si esplica l'effetto protettivo di BRCT, ma soprattutto sarà utile chiarire in che modo è regolata la sua interazione con la

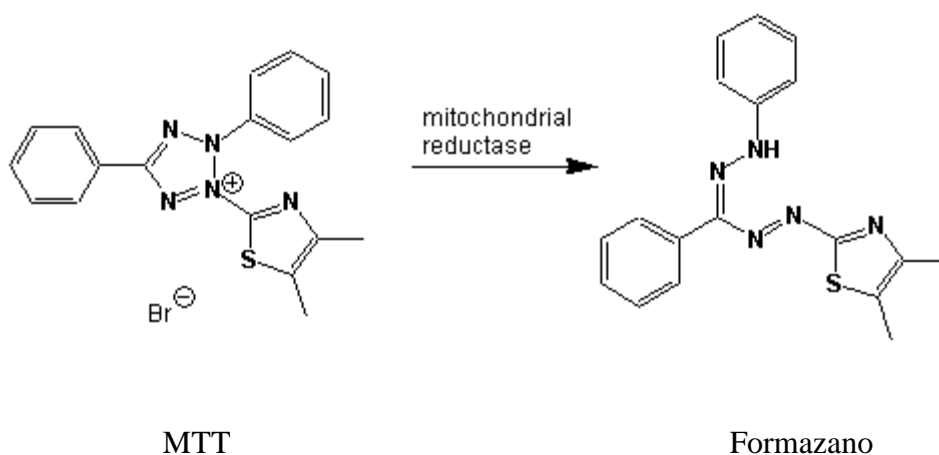


proteina p53, se effettivamente dipende dalla fosforilazione di alcuni aminoacidi, ed in caso affermativo scoprire quali di essi siano coinvolti in tale interazione.

## 5. APPENDICI

### 5.1.APPENDICE 1: MTT

L'MTT giallo (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) viene ridotto con formazione di formazano viola, a livello dei mitocondri delle cellule vitali (Fig. 38).



**Figura 38:** struttura della molecola di MTT e della sua forma ridotta, il formazano.

La riduzione dell'MTT, avviene solo quando gli enzimi reductasi dei mitocondri sono attivi e tale reazione è direttamente correlata al numero di cellule vitali. Il formazano prodotto viene solubilizzato (solitamente DMSO). L'assorbanza della soluzione colorata così ottenuta, viene infine misurata allo spettrofotometro con una lunghezza d'onda compresa tra 500 e 600 nm.

Ci sono alcune variabili che vanno attentamente considerate e controllate, al fine di ottenere dati riproducibili:

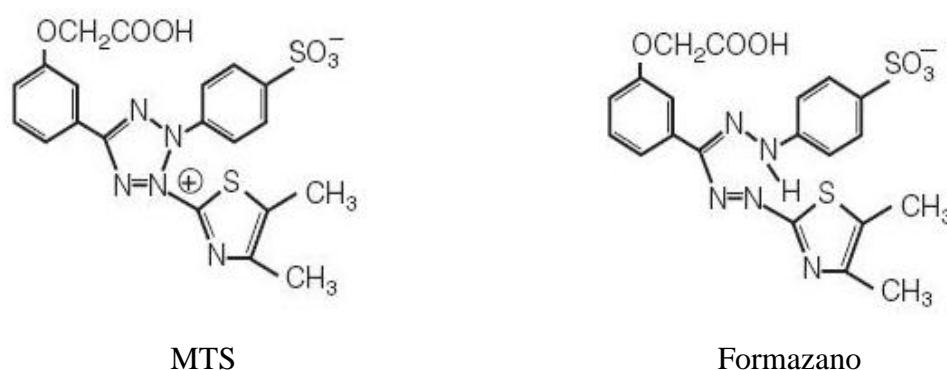
1. la concentrazione di MTT e il tempo di incubazione, influiscono sulla quantità di formazano prodotto. Poiché questi due fattori sono specifici per ogni tipologia cellulare, occorre stabilire, in base alla linea cellulare con la quale si sta lavorando, le condizioni ottimali (Denizot & Lang, 1986);
2. l'assorbanza, può essere misurata con svariati test e a lunghezze d'onda diverse. Occorre dunque scegliere il test più idoneo e stabilire la lunghezza d'onda di riferimento;

3. lo spettro di assorbanza dell'MTT-formazano, cambia e si abbassa al ridursi del valore di pH (Alley et al., 1988). Questo rappresenta il maggior e più largamente tollerato errore sistematico. Per contrastare l'effetto del ph, si possono utilizzare buffers con un alto valore di pH (Plumb et al., 1989);
4. sono svariati i solventi che si possono utilizzare per disciogliere i cristalli di MTT-formazano, il DMSO (dimethyl sulfoxide) è risultato essere il migliore (Carmichael et al., 1987);
5. la riproducibilità dell'MTT-assay è fortemente influenzata dalla semina delle cellule (Wan et al., 1994).

L'MTT-assay è dunque uno strumento che consente una misura quantitativa di una combinazione di due fattori: la proliferazione cellulare e l'attività di enzimi correlati al metabolismo cellulare (Berridge et al., 2005). Inoltre, rapidità, precisione e mancanza di radioisotopi sono importanti vantaggi offerti da questa tecnica (Mosmann, 1983). Se combinato con test per la determinazione del contenuto totale di proteine, come ad esempio il Bradford assay, l'MTT-assay consente la discriminazione tra attenuazione della proliferazione e attenuazione del metabolismo.

## 5.2 APPENDICE 2: MTS

Un saggio colorimetrico, per la determinazione del numero di cellule vitali proliferanti, è il quello MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium), utilizzato in associazione ad un reagente di accoppiamento quale PMS (phenazine methosulfate ). L'MTS viene bioridotto dalle cellule originando, a livello del mezzo di coltura, formazano solubile come prodotto finale (Barltrop et al., 1991) (Fig. 39).



**Figura 39:** struttura della molecola di MTS e della sua forma ridotta, il formazano.

La conversione dell'MTS in formazano, viene operata dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Poiché il formazano prodotto dalla bioriduzione dell'MTS è solubile nel medium di coltura, è necessario un numero inferiore di passaggi di reazione rispetto a test condotti utilizzando l'MTT (Bernabei et al., 1989).

Dopo l'incubazione delle cellule con la soluzione MTS/PMS si viene ad avere una lieve quantità di assorbanza a 490nm che essere misurata direttamente dalla piastra 96-wells, senza dover effettuare ulteriori procedure (Cory et al., 1991)..Il tipo di medium di coltura, il siero, il ph e il tempo di esposizione alla luce, sono variabili che contribuiscono al background di assorbanza a 490nm. Solitamente tale background risulta essere di circa 0.2-0.3 unità di assorbanza, dopo 4 ore di coltura.

Il saggio con MTS presenta quindi i seguenti vantaggi:

- lo step di solubilizzazione viene eliminato poiché l'MTS-formazano prodotto è solubile nel medium di coltura;
- sono richiesti solventi organici non volatili;

- le piastre, una volta lette, possono essere riposte in incubatore per la formazione di ulteriore colore;
- non vengono utilizzate sostanze radioattive.

### 5.3 APPENDICE 3: AFFINITY PURIFICATION

Proteine ed altre molecole di interesse, possono essere purificate a partire da estratti crudi o da altri tipi di campione, grazie ad una grande varietà di metodiche. La maggior parte delle tecniche di purificazione si basa sulla cromatografia, per mezzo della quale molecole in soluzione (chiamata fase mobile) vengono separate in base alle loro interazioni chimiche o fisiche con una matrice stazionaria (chiamata fase solida).

La cromatografia di affinità (anche detta affinity purification) si basa su specifiche interazioni di legame tra molecole. Un particolare ligando viene chimicamente immobilizzato su un supporto solido in modo tale che, quando il campione passa attraverso la colonna cromatografica, solo le molecole che hanno una specifica affinità di legame con esso possano essere trattenute.

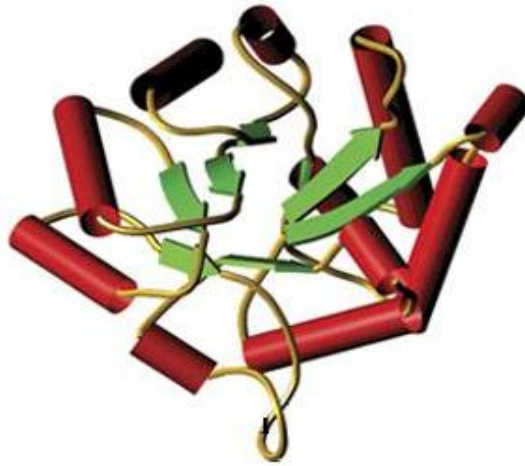
L'affinity purification è generalmente caratterizzata dai seguenti steps:

- incubazione del campione con il ligando immobilizzato sul supporto;
- lavaggio per l'eliminazione delle molecole che non si sono legate;
- eluizione (distacco) delle molecole target che hanno legato il ligando, questo evento viene causato attraverso una alterazione delle condizioni del buffer o eluente.

I ligandi, si trovano commercialmente in forma pre-immobilizzata, pronti per l'uso. In alternativa, possono essere immobilizzati dall'operatore, su supporti attivati, disponibili in commercio (Hage, 1999). Generalmente, i ligandi vengono fissati direttamente sul supporto solido, attraverso la formazione di legami chimici covalenti tra un particolare gruppo funzionale del ligando (es. ammine primarie, acidi carbossilici, aldeidi) e gruppi reattivi del supporto. Sono comunque possibili anche altri tipi di legame (Wilchek & Chaiken, 2000). Ad esempio, proteine fuse a GST (*Glutathione S-Transferase*) sono dapprima legate ad un supporto di glutatione attraverso l'interazione con GST, e poi, vengono chimicamente cross-linkate al supporto.

Quando le proteine da purificare sono molto grandi e complesse vengono addizionate con elementi detti fusion-tags. Essi sono aggiunti al DNA che codifica per la proteina

nativa d'interesse. I modelli di fusion-tag più utilizzati sono una corta catena di residui di istidina in grado di legarsi a ioni metallici come nickel o cobalto, oppure il GST (Fig. 40 ).



**Figura 40:** struttura della proteina GST.

L'utilizzo di fusion-tag, consente di manipolare in modo facile le proteine "taggate" (protein-tagged).

Anticorpi specifici per le fusion-tags, possono essere utilizzati per identificare tali proteine. La GFP per esempio (*Green Fluorescent Protein*) è una fusion-tag che consente una diretta rilevazione della proteina ricombinante, mediante l'emissione di fluorescenza e anticorpi anti-GFP sono spesso utilizzati per purificare le proteine GFP-tagged.

FUSION TAG	IMMOBILIZED LIGAND	BINDING CONDITIONS	ELUTION CONDITIONS	AVAILABLE FORMATS
Glutathione S-transferase(GST)	Reduced glutathione	Neutral (physiologic) pH, and non-denaturing; glutathione must be reduced and GST must be active	Free reduced glutathione at neutral pH (competitor)	Prepacked column kits, spin cup column kits, SwellGel Discs, coated microplates
Histidine-tagged	Chelated Nickel or Cobalt	Neutral (physiologic) pH without reducing or oxidizing agents; small tag must be accessible in fusion protein structure; high ionic strength and denaturants (chaotropes such as 8 M urea) compatible.	>200 mM Imidazole, low pH, or strong chelators	Prepacked column kits, spin cup column kits, SwellGel Discs, Swell- Gel Discs in 96-well filter plates, coated microplates
Maltose Binding Protein (MBP)	Dextrin	Neutral (physiologic) pH and non-denaturing; NaCl added to reduce nonspecific binding	Maltose at neutral pH (competitor)	Gel slurry, coated microplates
Green Fluorescent Protein (GFP)	Anti-GFP antibody	Neutral (physiologic) pH and non-denaturing	Usual antibody/antigen elution buffers (e.g., low pH or chaotropic salts)	Coated microplates

**Tabella 5:** modelli più comuni di fusion-tags e relative condizioni di purificazione:

## 5.4 APPENDICE 4: TRASFEZIONE

Con il termine trasfezione, si intende un insieme di metodiche sia fisiche sia chimiche per introdurre acidi nucleici all'interno di cellule di mammifero, allo scopo di studiare la regolazione e l'espressione di geni eucarioti oltre che comprendere la funzione di numerosi geni. Questo strumento è efficace sia per l'identificazione delle sequenze regolative che controllano l'espressione genica, sia per la produzione di quantità notevoli di proteine. La possibilità inoltre, di introdurre nuovi geni o modificarne già esistenti, consente la costruzione di modelli animali utili per la comprensione delle basi molecolari di malattie umane di difficile studio (Hanania et al., 1995).

L'introduzione di geni in cellule di mammifero è un processo che necessita di una fonte abbondante di cellule di partenza per avere una buona efficienza di cellule trasfettate. La disponibilità di linee cellulari di mammifero capaci di crescere indefinitamente in coltura hanno fatto sì che gli esperimenti di trasferimento genico siano diventati una pratica comune in laboratorio.

Molto del lavoro di base nello studio dei geni di mammifero è derivato dall'analisi dei virus tumorali. Essi, dopo il processo di infezione, inseriscono il loro materiale genico nell'ospite e ne depremono l'apparato biosintetico cellulare al fine di produrre altri virus. La presenza di geni tumorali virali altera permanentemente le caratteristiche di crescita della cellula infettata trasformandola in una cellula tumorale. I primi esperimenti sono stati realizzati con i virus tumorali a DNA, in cui i geni venivano codificati nel DNA come nei geni cellulari. Il DNA veniva isolato dai virus e introdotto in colture di cellule non infette; che, al termine del processo, erano in grado di produrre virus infettanti completi. Questa tecnica venne denominata trasfezione per distinguerla dalla infezione, il percorso naturale di entrata (Cosset & Russell, 1996).

La trasfezione può essere eseguita, *in vitro* su cellule in colture cellulari a lungo termine, *ex-vivo* su cellule isolate da un organismo e trasferite su terreno di coltura oppure *in vivo* direttamente su cellule di un organismo (Lyerly & DiMaio, 1993).

La trasfezione ideale di geni o macromolecole all'interno di cellule eucariotiche dovrebbe mostrare per essere efficace, dovrebbe avere un'alta efficienza di trasferimento, una bassa tossicità e essere riproducibile in esperimenti *in vitro* e *in vivo*.

A seconda del destino del vettore inserito, si può distinguere tra trasfezione transiente e una silente. La prima è caratterizzata dal fatto che il vettore resta nella cellula sotto forma di frammento extracromosomico, senza integrarsi nel genoma cellulare. In



questo caso, le proprietà indotte dalla trasfezione permangono per breve tempo, solitamente meno di 72 ore dopo di che il frammento viene degradato. Quando invece il DNA esogeno si integra stabilmente nel genoma, si parla di trasfezione stabile, in questo caso l'effetto permane per l'intera vita della cellula e verrà trasmesso anche alle cellule che ne deriveranno. La trasfezione transiente è sicuramente più rapida, facile ed economica ma ovviamente permette solo studi limitati nel tempo. Quella stabile invece è necessaria ogni volta si desidera avere un effetto genico a medio-lungo termine (esempio: studio di geni connessi al processo di differenziamento cellulare) (Lyerly & DiMaio, 1993).

#### SELEZIONE DELLE CELLULE TRASFETTATE:

Indipendentemente dal tipo di trasfezione e dal metodo utilizzato, è necessario sviluppare delle tecniche che permettano l'isolamento solo delle cellule in cui il processo di trasfezione è effettivamente avvenuto. Questa funzione viene svolta dall'azione di alcune sequenze contenute nel vettore assieme al gene d'interesse.

Si conoscono diversi tipi di vettori:

- Vettori con markers di selezione, nei quali è inserito un gene per la resistenza a un particolare antibiotico, preceduto da un promotore forte che ne stimola la trascrizione. Quando nel terreno di coltura viene inserito lo stesso antibiotico, se il vettore è effettivamente entrato nella cellula gli conferirà la resistenza. Tutte le cellule non trasfettate saranno invece uccise.  
Gli antibiotici più comunemente utilizzati sono, il G418 (Geneticina), l'Igromicina B, la Blastomicina, la Puromicina, la Carbenicillina e la Kanamicina (per le cellule procariote);
- Vettori con GFP, sono senza markers ma hanno una sequenza che codifica per GFP (*Green Fluorescent Protein*). Solo le cellule che saranno visibili sulla lunghezza d'onda del verde avranno subito la trasfezione.

#### METODI DI TRASFEZIONE

Quando si vuole inserire il DNA in una cellula, ci si trova di fronte ad un problema, sia l'acido nucleico che la membrana cellulare sono carichi negativamente. Il DNA quindi, per forze di repulsione elettrostatiche, non è in grado di interagire spontaneamente con la membrana, pertanto molti metodi di trasfezione smascherano i gruppi anionici del

DNA. Queste metodiche possono essere divise in tre categorie, metodiche fisiche, biologiche, chimiche e tramite virus.

#### Metodi chimici

Questo metodo è considerato uno dei più semplici e meno costosi, esso è stato sviluppato per la prima volta nel 1977 ed utilizza il calcio fosfato. La procedura prevede il mescolamento di una soluzione tampone HEPES contenente ioni fosfato insieme ad una soluzione di cloruro di calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e DNA da trasfettare. A seguito del mescolamento delle due soluzioni, si ottiene un precipitato di calcio fosfato, che andrà a legare la molecola di DNA. Il precipitato viene risospeso e aggiunto al terreno di coltura (di solito una coltura monostrato). Con un processo ancora non ben noto, le cellule legano il precipitato e permettono l'ingresso del DNA (Graham & Van der Eb, 1973; Bacchetti & Graham, 1977).

#### Metodi biologici

Molto efficace risulta l'utilizzo di liposomi, piccole vescicole lipidiche che inglobano il DNA e che sono indotte ad entrare con esso nella cellula, simulando i processi di endocitosi cellulare (Liu et al., 1995). Un altro metodo prevede l'uso di dendrimeri, molecole altamente ramificate che si legano al DNA e lo trasportano nella cellula (Fischer et al., 2002; Manuel et al., 2008)

#### Metodi fisici:

Uno dei metodi più utilizzati è l'elettroporazione, che consiste nell'applicare una differenza di potenziale ai lati di una cuvetta contenente la soluzione con le cellule e il DNA da inserire. Lo shock elettrico provoca la formazione di pori temporanei nella membrana che permettono l'ingresso del materiale genetico. Tale procedura però comporta una elevata percentuale di morte cellulare (Neumann et al., 1982, Chang & Reese, 1990). Anche la microiniezione, viene utilizzata, questa metodica consiste nell'inserimento del materiale direttamente nella cellula, tramite un sottile ago. Per ovvi motivi pratici è più frequentemente usato in clinica, in tecniche come la fecondazione artificiale, piuttosto che in laboratorio dove si lavora con un alto numero di cellule. Un approccio diretto alla trasfezione è il metodo cosiddetto del cannone genico dove il DNA è accoppiato a un solido inerte (di solito d'oro) che viene "sparato" direttamente nella cellula (Daniell, 1993).

Metodi tramite virus:

Il DNA può essere inserito tramite traduzione virale. I virus più utilizzati sono gli adenovirus, i retrovirus e i lentivirus (Cosset & Russell, 1996).

## **6. RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia il Dott. Stefano Volinia, del Dipartimento di Morfologia ed Istologia, sezione di Istologia, Università degli Studi di Ferrara, ed il suo gruppo di lavoro, per la loro disponibilità sia nell'averci fornito i vettori utilizzati in questa tesi, sia per l'utilizzo di strumentazioni e materiali.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Allan L.A., Fried M. (1999). p53-dependent apoptosis or growth arrest induced by different forms of radiation in U2OS cells: p21WAF1/CIP1 repression in UV induced apoptosis. *Oncogene*, 18: 5403-5412.

Alley M.C., Scudiero D. A., Monks A. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, 48(3): 589-601.

Althaus F.R. (1992). Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J. Cell Sci.*, 102: 663-670.

Antonsson B., Montessunit S., Lauper S., Eskes R., Martinou J. C. (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem. J.*, 345 (Pt2): 271-278.

Appella E., Anderson C.W. (2000). Signaling to p53: breaking the post-translation modification code. *Pathol. Biol.*, 48: 227-245.

Askenazi A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (6): 420-430.

Bacchetti S., Graham F. (1977). Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74(4): 1590-1594.

Bai L., Zhul W.J. (2006). p53: Structure, function and therapeutic applications. *J. Cancer Mol.*, 2(4): 141-153.

Bartrop J.A., Owen T.C., Cory A.H., Cory J.G. (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 611-614.

Bernabei P.A., Santini V., Silvestro L., Dal Pozzo O., Bezzini R., Viano I., Gattei V., Saccardi R., Rossi Ferrini P.(1989). In vitro chemosensitivity testing of leukemic

cells: Development of a semiautomated colorimetric assay. *Hematol. Oncol.*, 7: 243-253.

Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronili V., Di Lisa F. (1999). Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 264 (3): 687-701.

Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11: 127-152.

Böhm, I., Schild H. (2003). Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol. Imag. Biol.*, 5 (1): 2-14.

Bork P., Hofmann K., Bucher P., Neuwald A.F., Altschul S.F., Koonin E.V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.*, 11(1): 68-76.

Bouchard J.V., Rouleau M., Poirier G.G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimen. Hematol.*, 3: 446-454.

Bouillet P., Strasser A. (2002). BH3-only proteins- evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J. Cell Sci.*, 115 (Pt 8): 1567-1574.

Breckenridge D. G, Xue D. (2004). Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16 (6): 647-52.

Canman C.E., Kastan M.B. (1997). Role of p53 in Apoptosis. In: Apoptosis. Pharmacological implication and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology*. Kaufmann S.H. (Ed). Academic Press, California US, 295- 428.

Canman C.E., Lim D.S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B., Siliciano J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281: 1677-1697.

Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47(4): 936-942.

Cetin-Atalay R., Ozturk M. (2000). p53 mutations as fingerprints of environmental carcinogens. *Pure Appl. Chem.*, 72(6): 995-999.

Chang D.C., Reese T. S. (1990). Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid freezing electron microscopy. *Biophys. J.*, 58: 1-12

Chehab N. H., Malikzay A., Stavridi E. S., Halazonetis T.D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(24): 13777-13782.

Clapperton J.A., Manke I.A., Lowery D.M., Ho T., Haire L.R., Yaffe M.B., Smerdon S.J. (2004). Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer. *Nature Struc.Mol. Biol.*, 11: 512-518.

Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.*, 3: 207-212.

Cory S., Adams J. M. (2002). The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2 (9): 647-656.

Cosset F.L., Russel S.J. (1996). Targeting retrovirus entry. *Gene Ther.*, 3: 946-956.

Cutler P. (2004). Affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.*, 244: 139-149.

Daniell H. (1993). Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol.*, 217: 536-556.

Datta S. R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91: 231-241.

De Gruijl F.R., Van Kranen H.J., Mullenders L.H. (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J. Photochem. Photobiol.*, 63:19-27.

Denizot F., Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.*, 89(2): 271-277.

Dumaz N., Meek D.W. (1999). Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.*, 18: 7002-7010.

Dumaz N., Milne D.M., Jardine L.J., Meek D.W. (2001). Critical roles for the serine 20, but not the serine 15, phosphorylation site and for the polyproline domain in regulating p53 turnover. *Biochem. J.*, 359: 459-464.

Duriez, Desnoyers, Hoflack, Shah, Morelle, Bourassa, Poirier, Talbot (1997). Characterization of anti-peptide antibodies directed towards the automodification domain and apoptotic fragment of poly (ADP-ribose) polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1334: 65-72.

Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.*, 57: 1835-1840.

Ellis H. M., Horvitz H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817-829.

Ellis R. E., Yuan J. Y., Horvitz H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698.

Enari M., Sakahira H, Yokoyama H. Okawa K. Iwamatsu A., Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662): 43-50.

Fischer D., Von Harpe A., Kunath K., Petersen H., Li Y.X., Kissel T. (2002). Copolymers of ethylene imine and N-(2-hydroxyethyl)-ethylene imine as tools to study



effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes. *Bioconjugate Chem.*, 13 (5): 1124–1133.

Fumarola C., Guidotti G. G. (2004). Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*, 9 (1): 77-82.

Gewies A. (2003). Introduction to apoptosis. *ApoReview*, pp. 26.

Glover M., Williams R.S., Lee M.S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *TRENDS Biochem. Sci.*, 29: 579-585.

Gluecksmann A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 26: 59-86.

Goping I. S., Gross A., Lavoie, J. N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S. J., Shore G.C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J. Cell Biol.*, 143: 207-215.

Gorman A. M., Orrenius S., Ceccatelli S. (1998). Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport*, 9 (10): R49-55.

Graham F.L., Van der Eb A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52 (2): 456–67.

Granérus M., Engström W. (2008). Growth factors and apoptosis. *Cell Proliferation*, 29(6): 309–314.

Granville D. J., Carthy C. M., Hunt D. W., McManus B. M (1998). Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.*, 78: 893-913

Gross A., Yin X. M., Wang K., Wei M. C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.*, 274: 1156-1163.

Guenzi S. (2006). Kit e prodotti per lo studi dell'apoptosi. *Biotechnologie 2000*: 8-15.

Gupta S. (2001). Molecular Steps of death receptor and mitochondrial pathway of apoptosis. *Life Sci.*, 69: 2957-2964.

Ha, H.C., Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 96, 13978-13982.

Hage DS. (1999). Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clin. Chem.*, 45(5): 593-615.

Hague A., Hicks D.J., Bracey T.S., Paraskeva C. (1997). Cell-cell contact and specific cytokines inhibit apoptosis of colonic epithelial cells: growth factors protect against c-mycindependent apoptosis. *British J. Cancer*, 75(7): 960-968.

Hanania E. G., Kavanagh J., Hortolbagyi G. , Giles R. (1995). Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am. J. Med.*, 99: pp. 537–552.

Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L. J., Taylor S. S., Scott J. D., Korsmeyer S. J. (1999). Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored proteinkinase. *Mol. Cell*, 3: 413-422.

Hardwick J.M. (1997). Virus induced Apoptosis. In: Apoptosis. Pharmacological implication and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology*. Kaufmann S. H. (Ed). Academic Press, California US, 295- 428.

Hartwell, L. H., Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 246: 629-634.

Hengartner M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805): 770-6.

Herceg Z., Wang Z.Q. (2001). Functions of poly(ADP-ribose)polymetafase (PARP) in DANN repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res.*, 477: 97-110.

Honda R., Yasuda H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of ligase. *Oncogene*; 19: 1473-1476.

Israels L. G. (1999). Apoptosis. *Stem Cells*, 17: 306-313.

Kameshita I., Matsuda M., Nishikimi M., Ushiro H., Shizuta Y. (1986). Reconstitution and poly(ADP-ribosylation) of proteolytically fragmented poly(ADP-ribose) synthetase. *J. Biol. Chem.*, 261(8): 3863–3868.

Kaufmann S. H, Earnshaw W. C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 42-49.

Kerr J. F. R. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cell death. *J. Pathol.*, 105: 13-20.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.

Kiess W., Gallaher B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Europ. J.f Endocrinol.*, 138(5): 482-491.

Kim R. (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333 (2): 336-43.

Kim M.K., Zhang T., Kraus W.L. (2005). Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes Dev.*, 19: 1951-1967.

Krammer P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407: 789-795.

Krammer P. H., Behrmann I., Daniel P., Dhein J., Debatin K. M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 6(2): 279-89.

Kubbutat M.H.G., Jones S.N., Voudsen K.H. (1997). Regulation of p53 stability by MDM2. *Nature*, 387: 299-303.

Kurosaki T., Ushiro H., Mitsuuchi Y., Suzuki S., Matsuda M., Matsuda Y., Katunuma N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T. (1987). Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.*; 262: 15990-15997.

Lambert P.F., Kashanchi F., Radonovich M.F., Shiekhattar R., Brady J.N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J. Biol. Chem.*, 273: 33048-33053.

Lee D., Kwon J.H., Kim E.H., Kim E.S., Choi K.Y. (2009). Effect of human papillomavirus on cell cycle-related proteins p16, Ki-67, Cyclin D1, p53, and ProEx C in precursor lesions of cervical carcinoma: a tissue microarray study. *Am J Clin Pathol.*, 132(3): 378-390.

Leist M., Jaattela M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspasis to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (8): 589-598.

Leist M., Single B., Castoldi A. F., Kuhnle S., Nicotera P. (1997). Intracellular ATP concentration: a switch deciding between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 185: 1481-1486.

Lewis K. (2000). Programmed death in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 503–514.

Li L. Y., Luo X., Wang X. (2001b). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412 (6842): 95-99.

Li P., Nijhawa D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S., Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479-489.

Lin D.L., Chang C. (1996). p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily. *J. Biol. Chem.*, 271(25): 14649–52.

Liu Y., Liggitt D., Zhong W. (1995). Cationic liposome-mediated intravenous gene delivery. *J. Biol. Chem.*, 270: 24864-24870.

Lockshin R. A., Williams C. M. (1965a). Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J. Insect. Physiol.*, 11: 803-809.

Lockshin R. A., Williams C. M. (1965b). Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmths. *J. Insect. Physiol.*, 11: 831-844.

Lockshin R. A., Zakeri Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2: 545-550.

Loeffler M, Kroemer G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp. Cell. Res.*, 256 (1): 19-26.

Lossi L., Merighi A. (2003). In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiol.*, 69: 287–312.

Lu M., Arric B.A. (2000). Transactivation of the p21 promoter by BRCA1 splice variants in mammary epithelial cells: evidence for both common and distinct activities of wildtype and mutant forms. *Oncogene*, 19: 6351-6360.

Lu P.J., Zhou X.Z., Shen M., Lu K.P. (1999). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science*; 283: 1325-1328.

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94: 481-490.

Lyerly H.K., Di Maio J.M. (1993). Gene delivery systems in surgery. *Arch. Surg.*, 128: 1197-1206.

Majno G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Amer. J. Pathol.*, 146: 3–15, 1995.

Mandic A. (2003). *Elucidation of pro-apoptotic signalling induced by cisplatin*. (Tesi). pp.46. Department of Oncology-Patology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.

Marks N., Berg M. J. (1999). Recent advances on neuronal caspases in development and neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, 35 (3): 195-220.

Marsischky G.T., Wilson B.A., Collier R.J. (1995). Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins. *J. Biol. Chem.*, 270(7): 3247–3254.

Menuel S., Fontanay S., Clarot I., Duval R.E., Diez L., Marsura A. (2008). Synthesis and Complexation Ability of a Novel Bis- (guanidinium)-tetrakis-( $\beta$ -cyclodextrin) Dendrimeric Tetrapod as a Potential Gene Delivery (DNA and siRNA) System. Study of Cellular siRNA Transfection. *Bioconjugate Chem.*, 19(12): 2357–2362.

Minn A. J., Velez P., Schendel S. L., Liang H., Muchmore S. W., Fesik S. W., Fill M., Thompson C. B. (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385: 353357.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol. Methods*, 65: 55-63.

Mueller-Dieckmann C., Kernstock S., Lisurek M., Von Kries J.P., Haag F., Weiss M.S., Koch-Nolte F. (2006). The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(41): 15026-1531.

Mund T., Gewies A., Schoenfeld N., Bauer M. K., Grimm S. (2003). Spike a novel BH3-only protein, regulate apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.*; 17 (6): 696-698.

Murphy P.M.J., Galigniana M.D., Morishima Y., Harrell J.M. (2004). Pifithrin-inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.*, 279(29): 30195–30201.

Nagashima T., Hayashi F., Yokoyama S. (2005). Solution structure of BRCT domain of poly(ADP-ribose) polymerase.

Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo. J.*, 1 (7): 841–845

Ogata Y., Takahashi M. (2003). Inhibition of cardiomyocyte apoptosis seems to reduce cardiomyocyte damage and improve cardiac dysfunction. Bcl-xL as an Antiapoptotic Molecule for Cardiomyocytes. *Drug News Perspect*, 16(7): 446.

Oliver B., Michael W. (2002). Apoptosis in gliomas, and its role in their current and future treatment. *Frontiers Biosci.*, 7: 339-353.

Oltvai Z. N., Korsmeyer S. J. (1994). Checkpoints of duelling dimers foil death wishes. *Cell*, 79: 189-192.

Paull K.D. *et al.* (1988). The synthesis of XTT : A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J. Heterocyclic Chem.*, 25: 911.

Pietenpol J. A, Stewart Z.A (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis *Toxicology*, 181-182 (27): 475-481.

Plumb J.A., Milroy R., Kaye S.B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.*, 49(16): 4435-4440.

Ransburgh D.J., Chiba N., Ishioka C., Toland A.E., Parvin J.D. (2010). Identification of Breast Tumor Mutations in BRCA1 That Abolish Its Function in Homologous DNA Recombination. *Cancer Res.*, 70(3): 988-95.

Ravanat J.L, Douki T., Cadet J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol.*, 63: 88-102

Reed J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17: 3225-3236.

Roehm N.W. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Immunol. Methods*. 142: 257-265.

Rosse´ T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B., Borner C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391: 496-499.

Saito S., Goodarzi A.A., Higashimoto Y., Noda Y., Lees-Miller S.P., Appella E., Anderson C.W. (2002). ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser46, in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 277: 12491-12494.

Sakaguchi K., Saito S., Higashimoto Y., Roy S., Anderson C.W., Appella E. (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein-1-like kinase. Effects on MDM2 binding. *J. Biol. Chem.*, 275: 9278-9283.

Sartorius U., Schmitz I., Krammer, P. H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.*, 2: 20–29.

Schon O., Friedler A., Bycroft M., Freund S., Fersht A.R. (2002). Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J. Mol. Biol.*, 323: 491-501.

Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.*, 7: 517-528.

Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S. A., Mennella C. A., Korsmeyer S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell*, 2 (1): 55-67.

Scorrano L., Korsmeyer S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304 (3): 437-44.

Shen M., Stukenberg P.T., Kirschner M.W., Lu K.P. (1998). The essential mitotic peptidyl-propyl isomerase Pin 1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.*, 12: 706-720.

Shieh S.Y., Ahn J., Tamai Y., Prives C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes. Dev.*, 14: 289-300.



Slee E. A., Harte M. T., Kluck R. M., Wolf B. B., Casiano C. A., Newmeyer D. D., Wang H. G., Reed J. C., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Green D. R., Martin, S. J. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.*, 144 (2): 281-92.

Srinivasula S. M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R. A., Robbins P. D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., Alnemri E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410: 112-6.

Starita L.M., Parvi J.D. (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15: 345–350.

Strachan T., Read A.P. (2004). Human Molecular Genetics 3. Ch. 17, Cancer Genetics

Strasser A., O'Connor L., Dixit V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 217-45.

Sudol M., Hunter T. (2000). New Wrinkles for an old domain. *Cell*, 103: 1001-1004.

Susin S. A., Lorenzo H. K., Zampami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penniger J. M., Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718): 441-446.

Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, 8: 613-21.

Tong W-M, Cortes U & Wang Z-Q (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1552: 27–37

Tsujimoto Y., Shimizu S. (2000). VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Diff.*, 7 (2): 1174-1181.

Valenzuela M.T., Guerriero R., Nunez M.I., De Almodovar J.M.R., Sarker M., De Murcia G., Oliver F.J. (2002). PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene*, 21: 1108-1116.

Van Cruchten S., Van den Broeck W. (2002). Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis. *Anat. Histol. Embryol.*, 31: 214–223.

Van de Craen M., Declercq W., Van den brande I., Fiers W., Vandenamee P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.*, 6: 1117-24.

Verhagen A. M., Ekert P. G., Pakusch M., Silke J., Connolly L. M., Reid G. E., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promote apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102 (1): 43-53.

Verhagen A. M., Silke J., Ekert P. G., Pakusch M., Kaufman H., Connolly L. M., Day C. L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R. L., Simpson R. J., Vaux D. L. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.*, 277 (1): 445-454.

Vermes I., Haanen C. & Reutelingsperger C. (2000). Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods*, 243: 167-190.

Virag L., Szabo C. (2002). The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Pharmacol Rev.*, 54:375–429.

Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-310.

Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D.F. (1994). A study of the reproducibility of the MTT test. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 5: 154-159.

Wang H. G., Pathan N., Ethell I. M., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke T. F., Reed J. C. (1999).  $Ca^{2+}$ -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284: 339-343.

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Anticancer Res.*, 19 (6a): 4759-4771.

Wilchek M., Chaiken I. (2000). An overview of affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.*; 147: 1-6.

Williams S.R., Green R., Glover M. (2001). Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. *Nature Struct. Biol.*; 8: 838-842.

Wolter K. G., Hsu Y. T., Smith C. L., Nechustan A., Xi X.G., Youle R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139: 1281-1292.

Wu L.C., Wang Z.W., Tsan J.T., Spillman M.A., Phung A., Xu X.L., Yang M.C., Hwang L.Y., Bowcock A.M., Baer R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature genetics*, 14 (4): 430-440

Wyllie A.H.D.D.E. (1992). Danno e morte cellulare. In: *Patologia 1: i principi*, Zanichelli Editore (1995), 1(3): 177-226.

Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251-306.

Yamanaka H., Willis E.H., Penning C.A., Peebles CL., Tan E.M., Carson D.A. (1987). Human autoantibodies to poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase. *J. Clin. Invest.*, 80(3): 900-904.

Yang E., Korsmeyer S. J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood*, 88: 386-401.

Zacchi P., Gotissa M., Uchida T., Salvano C., Avorio F., Volinia S., Ronai Z., Blandino G., Schneider C., Del Sal G. (2002). The propyl isomerase Pin 1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature*; 419: 853-857.

Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J., Korsmeyer S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-xl. *Cell*, 87: 619-628.

Zhang C., Shengb Z-Y, Hub S., Gaob J-C, Yua S., Liua Y. (2002). The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats. *Burns*, 28 (8): 731-737.

Zhang J., Dawson V.L., Dawson .T.M., Snyder S.H. (1994). Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*, 263: 687-689.

Zhang J., Powell S.M. (2005). The role of the brca1 tumor suppressor in dna double-strand break repair. *Mol. Cancer Res.*, 3(10): 531–539.

Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O. T., Doskeland S. O. (1998). Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, 391: 449-450.

Ziegler M., Oei S.L. (2000). A cellular survival switch: poly(ADP-ribosyl)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays*, 23: 543-548.

Zoratti M., Szabo I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241: 139-76.

Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90: 405-413.