

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
XXII CICLO**

**RUOLO DELLA PROTEINA DDB-1 (DNA damage-binding
protein-1) NELLA PROTEOLISI DI p27^{kip1} INDOTTA DA
RADIAZIONI ULTRAVIOLETTE**

Dottoranda: Dott. Barbara Iovine

Relatore

Prof. Maria Assunta Bevilacqua

Coordinatore

Prof. Giuseppe D'Alessio

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

RIASSUNTO

DDB1 (DNA damage-binding protein) è stata originariamente identificata, in cellule di mammifero, come la subunità maggiore (p127) di un complesso eterodimerico che lega il DNA danneggiato da radiazioni ultraviolette (UV), noto in letteratura come UV-DDB (*Ultraviolet- DNA-Damage Binding protein*). La localizzazione subcellulare di DDB1 è principalmente citoplasmatica, ma in seguito ad irradiazione con UV trasloca nel nucleo, dove diviene partner molecolare di proteine coinvolte nel Riparo per Escissione Nucleotidica (NER), contribuendo sia al TCR (riparo accoppiato alla trascrizione) che al GGR (riparo genomico globale).

La funzione di DDB1 non è, tuttavia, limitata ad assemblare i sistemi di riparo, poiché è stato dimostrato che interagisce anche con diversi fattori trascrizionali e che può funzionare da regolatore trascrizionale. Nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato, infatti, abbiamo dimostrato che interagisce con il promotore della fibromodulina (Fmod), una proteina della matrice extracellulare coinvolta nell'assemblaggio delle fibrille di collagene, i cui livelli di espressione aumentano in seguito ad esposizione a UVC. Il coinvolgimento di DDB1 nella regolazione trascrizionale della Fmod è stato confermato da esperimenti che dimostrano che la trascrizione di questo gene diminuisce con l'utilizzo di un dsRNA interferente per DDB1 (siDDB1) e aumenta in seguito all'iperespressione del suo cDNA [Bevilacqua et al., 2005].

In un recente lavoro [Iovine et al., 2009] abbiamo, inoltre, dimostrato che anche l'esposizione a radiazioni UVA ed UVB attiva la trascrizione di Fmod, sebbene con modalità differenti. In particolare, l'incremento dei livelli di espressione della Fmod indotto dagli UVA è significativamente influenzato dalla produzione dei ROS, mentre l'incremento indotto dagli UVB è strettamente correlato alla traslocazione di DDB1 dal citoplasma al nucleo. Questi risultati fanno ipotizzare che DDB1 abbia un ruolo cruciale nella regolazione trascrizionale di geni UV-indotti e che esista una correlazione tra la regolazione di questi geni ed il meccanismo di riparo del DNA danneggiato dagli UV.

Negli ultimi anni diversi studi hanno portato all'identificazione di un ulteriore ruolo di DDB1 quale proteina adattatrice nei complessi cullina-RING ubiquitina ligasi (CRL) coinvolti nella degradazione di diversi substrati, incluso l'inibitore delle chinasi ciclina dipendente p27^{Kip1}, i cui livelli controllano la progressione del ciclo cellulare.

Gli esperimenti descritti in questa tesi hanno lo scopo di valutare il ruolo svolto da DDB1 nella regolazione di p27^{Kip1}, in seguito ad un danno al DNA indotto da UV.

L'analisi dell'espressione di p27^{Kip1} mediante Western Blot di estratti proteici di cellule raccolte a differenti tempi dall'esposizione agli UV, ha messo in evidenza che a basse dosi

(5J/m²) di UVC, ma non ad alte dosi, l'espressione nucleare di p27^{Kip1} si riduce rapidamente. Questa riduzione, che si osserva a circa 6 ore dall'irradiazione, avviene anche in altre linee cellulari (HUH-7, SHSY, Hela, Hek) ed è correlata alla maggiore espressione di DDB1 nel nucleo. Il trattamento con MG132 ne previene la riduzione UV indotta, dimostrando che questa riduzione è in realtà una degradazione proteasoma-dipendente. Esperimenti di immunoprecipitazione, inoltre, identificano la presenza di DDB1 nel complesso responsabile dell'ubiquitinazione di p27^{Kip1}.

Inoltre, esperimenti di RT PCR dimostrano che gli UV non hanno alcun effetto sulla trascrizione del gene p27^{Kip1}, confermando, quindi che la degradazione UV-indotta è il risultato di una regolazione di tipo post-traduzionale.

I risultati ottenuti forniscono nuove conoscenze sulla regolazione di p27^{Kip1} nella risposta cellulare ad un danno al DNA indotto dagli UV e supportano l'ipotesi che DDB1 abbia un ruolo chiave in questo meccanismo.

SUMMARY

DNA damage-binding protein (DDB) is a heterodimer made up of the DDB1 and DDB2 subunits. The DDB complex recognizes and binds some UV-damaged DNA lesions and is implicated in nucleotide excision repair (NER). Our results, moreover, show that DDB1 coordinately contributes to the assembly of DNA repair mechanisms and, at the same time, to the regulation of the transcription of UV-induced genes. Recent studies indicate that this protein associated with Skp2 and Cul4A is part of the E3 ubiquitin ligase complex and induces proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitory protein p27^{Kip1}.

We investigated the relationship between p27^{Kip1} turnover and DDB1 expression following UV irradiation and DNA-damage. We found that low, but not high doses of UVC irradiation lead to reduction of p27^{Kip1}. In fact, at 6 hours after irradiation we observed the decrease in p27^{Kip1} nuclear protein and the DDB1 translocation into the nucleus; conversely, high doses of UV induced p27^{Kip1} accumulation and unchanged level of DDB1. We carried out similar experiments in HUH-7, SHSY, HeLa and Hek 293 cells and we showed that this p27^{Kip1} reduction is a mechanism cell type-independent. Moreover, BJ5ta, incubated with the proteasoma inhibitor MG132 and exposed to 5J/m² of UVC for 6 hours, showed the increase of p27^{Kip1}, suggesting that the p27^{Kip1} degradation may be proteasoma-dependent. Immunoprecipitation analysis with antibody recognizing p27^{Kip1} and DDB1 after UV irradiation and Western Blot with antibody recognizing DDB1 and p27^{Kip1} showed an interaction between these proteins.

These results demonstrated that: a) low (5J/m²), but not high doses of UV irradiation induced p27^{Kip1} degradation; b) decrease in nuclear level of p27^{Kip1} are related with the DDB1 translocation into nucleus; c) p27^{Kip1} degradation is proteasoma-mediated and DDB1-dependent; d) p27^{Kip1} degradation is correlated to a mild DNA damage.

The role of DDB1 in ubiquitination and proteasomal degradation of p27^{Kip1} remains to be investigated, even if, our results provide a significant contribution to address this point.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Ruolo della proteina DNA Damage -binding protein 1 (DDB1) nel sistema di Riparo per Escissione Nucleotidica (NER).....	5
1.2 Ruolo di DDB1 nel complesso E3 ubiquitina ligasi.....	8
1.3 p27^{kip1} ed il ciclo cellulare.....	13
SCOPO DELLA TESI.....	16
2. MATERIALI E METODI.....	17
2.1 Colture cellulari.....	17
2.2 Trattamento con radiazioni ultraviolette.....	17
2.3 Preparazione degli estratti proteici totali per Western Blot.....	18
2.4 Preparazione degli estratti proteici nucleari e citosolici per Western blot.....	18
2.5 Analisi delle proteine mediante Western Blot.....	18
2.6 Analisi del danno al DNA attraverso Saggio Cometa.....	19
2.7 Real-time PCR	20
2.8 Trattamento con inibitore del proteasoma.....	21
2.9 Immunofluorescenza.....	21
2.10 Immunoprecipitazione.....	22
2.11 Trasfezione.....	22
3. RISULTATI.....	23
3.1 Basse dosi di UV inducono cambiamenti nei livelli di espressione della proteina p27^{kip1}	23
3.2 La traslocazione nucleare di DDB1 correla con la riduzione nucleare dei livelli proteici di p27^{kip1}	23
3.3 La riduzione di p27^{kip1} è il risultato di una degradazione proteasoma-dipendente e DDB1 fa parte del complesso E3-ubiquitina ligasi responsabile della sua ubiquitinazione	24
3.4 Cellule interferite con un siRNA per DDB1 aumentano i livelli di p27^{kip1} dopo esposizione a basse dosi di UV.....	25
FIGURE.....	26
4. DISCUSSIONE.....	31
5. BIBLIOGRAFIA.....	33

INTRODUZIONE

1.1 Ruolo della proteina DDB1 (DNA Damage-Binding protein 1) nel sistema di Riparo per Escissione Nucleotidica (NER)

La proteina DDB1 è stata inizialmente identificata, in cellule di mammifero, come uno dei principali fattori che legano il DNA danneggiato dalle radiazioni ultraviolette (UV). Oggi, infatti, è noto che l'eterodimero UV-DDB, costituito da due subunità DDB1 e DDB2, con peso molecolare rispettivamente di 127 e 48 KDa, ha la funzione di riconoscere le lesioni sul DNA danneggiato dalle radiazioni ultraviolette (UV) e di ripararle attraverso il meccanismo di riparo per escissione nucleotidica (NER) [Friedberg et al., 2006].

DDB1 è localizzata soprattutto nel citoplasma, mentre DDB2 è una proteina esclusivamente nucleare. Normalmente nelle cellule la concentrazione molare di DDB1 è superiore rispetto a quella di DDB2, ma, dopo esposizione a UV, i livelli di mRNA e di proteina di DDB2 aumentano di 3-4 volte, mentre i livelli di DDB1 restano costanti. L'aumento di DDB2 si accompagna alla traslocazione di DDB1 nel nucleo e risulta già ben evidente dopo 72 ore dall'irradiazione. Pertanto, è stato ipotizzato che DDB2 funzioni da trasportatore di DDB1 dal citoplasma al nucleo. Tuttavia, la localizzazione citoplasmatica di DDB1 fa supporre che questa proteina abbia anche delle funzioni citoplasmatiche non ancora identificate [Liu et al., 2000].

Nel corso dell'evoluzione, le cellule eucariotiche hanno sviluppato diversi sistemi di riparo del DNA, in grado di identificare la presenza di un'alterazione nella struttura della doppia elica e di correggerla. Tra i vari sistemi di riparo, il NER rappresenta il principale meccanismo coinvolto nella correzione dei danni indotti sul DNA dai raggi UV. Il sistema NER agisce preferenzialmente sui dimeri di pirimidina ciclobutano (CPDs), sui fotoprodotti pirimidina-pirimidone (6-4PP), siti apurinici e piccoli mismatches, che si generano in seguito all'esposizione del DNA ai raggi UV. È stato osservato che maggiore è il grado di distorsione della doppia elica maggiore è l'affinità di legame che DDB ha per il DNA, ciò fornisce una spiegazione al fatto che DDB leghi con una più grande affinità i dimeri pirimidina-ciclobutano (CPDs) rispetto ai fotoprodotti pirimidina-pirimidone (6-4PP), responsabili di più lievi alterazioni strutturali [Hanawalt, 2002].

Il NER coinvolge circa trenta prodotti genici ed avviene attraverso una serie di passaggi sequenziali che portano alla rimozione del DNA danneggiato e alla sostituzione del tratto rimosso con nuovo DNA.

Le fasi di questo processo possono essere così riassunte [Hanawalt, 2002]:

- riconoscimento del danno al DNA;
- svolgimento del filamento di DNA ad opera di un'elicasi;
- incisione su entrambi i lati della lesione effettuata da un'endonucleasi di escissione;
- rimozione del singolo filamento danneggiato ad opera di un'esonucleasi;
- sintesi del frammento rimosso attraverso una DNA polimerasi;
- formazione del legame tra il frammento neosintetizzato ed il DNA preesistente tramite la DNA ligasi.

Il sistema NER può essere a sua volta distinto in:

- a) un sistema di riparo rapido accoppiato alla trascrizione o TCR (Transcription Coupled Repair), che comporta un'efficiente eliminazione delle lesioni sul filamento di DNA attivamente trascritto, consentendo una rapida ripresa del processo di trascrizione;
- b) un sistema di riparo genomico globale o GGR (Global Genomic Repair), che controlla l'intero genoma ed in particolare quelle regioni di DNA non trascritte e filamenti complementari a quelli trascritti [Hanawalt, 2002].

Per quel che riguarda la funzione di DDB1 nel NER, sembra che questa proteina svolga un ruolo fondamentale nel GGR in seguito a danno generato da dimeri pirimidina-ciclobutano (CPDs) ed un ruolo solo accessorio nel GGR dei 6-4 fotoprodotto e che, inoltre, sia richiesta anche per il TCR [Sancar, 1996].

Il riconoscimento del DNA danneggiato ad opera del TCR avviene con meccanismi diversi da quelli utilizzati dal GGR. Infatti, mentre nel TCR è mediato dal blocco dell'oloenzima RNA polimerasi II a livello delle basi danneggiate, nel GGR il riconoscimento del sito di lesione avviene in maniera indipendente dalla RNA polimerasi II, ed è mediato dal complesso dello Xeroderma Pigmentoso C, formato dalle proteine XPC/HHR23B, e dall'eterodimero DDB1 e DDB2 (DDB). In particolare, è stato dimostrato che in vivo DDB è presente sul sito di lesione del DNA prima che avvenga il reclutamento di XPC/HHR23B, che segue l'irradiazione UV, e che favorisce il legame di XPC/HHR23B nella sede del danno [Groisman et al., 2003].

Inoltre, è stato dimostrato che DDB ha un ruolo cruciale nel processo di riparo poiché mutazioni di DDB2 sono responsabili di molti casi di sensibilità alla luce solare e di malattie che predispongono al cancro della cute [Wittschieben et al., 2003].

Nel GGR l'attacco del complesso proteico XPC/HHR23B al sito di lesione causa il reclutamento di altre proteine tra cui: XPA, il fattore generale di trascrizione TFIIH, che a sua volta è costituito da 10 proteine diverse, le elicasi XPB e XPD e la proteina della replicazione A (RPA), che stabilizza l'intero complesso. Il richiamo di queste proteine a livello delle basi

danneggiate porta allo svolgimento della doppia elica, in modo che il filamento danneggiato divenga accessibile all'azione di specifiche endonucleasi [Batty et al., 2000].

DDB1 nel GGR, in associazione con DDB2, sembrerebbe essere responsabile del riconoscimento del danno, legandosi al sito di lesione indotto dagli UV a livello di una cromatina condensata e quindi inattiva trascrizionalmente. In particolare, DDB2 prende contatto direttamente con il DNA, mentre DDB1 servirebbe ad aumentare l'affinità di legame dell'eterodimero DDB al DNA danneggiato [Kulaksiz et al., 2005].

Nell'ambito del GGR, DDB1 fa parte di un complesso multi-proteico in cui è presente anche la proteina DDB2, mentre per il TCR il complesso contenente DDB1 differisce per la presenza della proteina CSA al posto di DDB2 [Wittschieben et al., 2003].

In particolare, le proteine CSA e CSB (Cockayne Syndrome) fungono da coppia d'arresto per l'RNA polimerasi II, determinandone il suo distacco dal DNA [Friedberg et al., 2006]. L'attacco di CSA e CSB al DNA richiama le elicasi, XPB e XPD, che portano all'apertura della doppia elica, ed altre proteine, comprese XPA e RPA [Fousteri et al., 2006].

Le tappe, che seguono il riconoscimento del danno e lo svolgimento della doppia elica, sono pressoché identiche per entrambi i meccanismi, TCR e GGR. Vengono reclutate le endonucleasi XPG e ERCC1/XPF, che rimuovono il DNA danneggiato e viene effettuata la sintesi ex novo del filamento rimosso, che va a riempire il gap lasciato dall'escissione. A dirigere la fase di sintesi, in entrambi i casi, vi sono diversi fattori tra cui: l'Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare (PCNA), il fattore di replicazione C e le DNA polimerasi δ ed ϵ [Fitch et al., 2003].

DDB1 nel TCR, in associazione con la proteina CSB, non lega direttamente il DNA ma la RNA polimerasi II, favorendo l'arresto della trascrizione nei siti di danno al DNA e promuovendo gli eventi di riparo del DNA [Friedberg et al., 2006].

La proteina CSB trasloca nei siti di lesione grazie alla sua interazione con l'RNA pol II e favorisce l'accoppiamento dell'acetiltrasferasi p300 alla proteina CSA, proteine che costituiscono i fattori del core proteico del TC-NER [Fousteri et al., 2006].

1.2 Ruolo di DDB1 nel complesso E3 ubiquitina ligasi

DDB1 svolge anche il ruolo di proteina adattatrice nel complesso Cullina-RING-E3 ubiquitina ligasi (CRL) con la funzione di riconoscere e degradare numerosi substrati cellulari [Angers et al., 2006].

L'ubiquitinazione di proteine consiste nell'attacco di una o più molecole di ubiquitina attraverso reazioni enzimatiche a cascata che coinvolgono gli enzimi:

- E1: enzima che attiva l'ubiquitina
- E2: enzima che coniuga l'ubiquitina
- E3: ubiquitina-ligasi

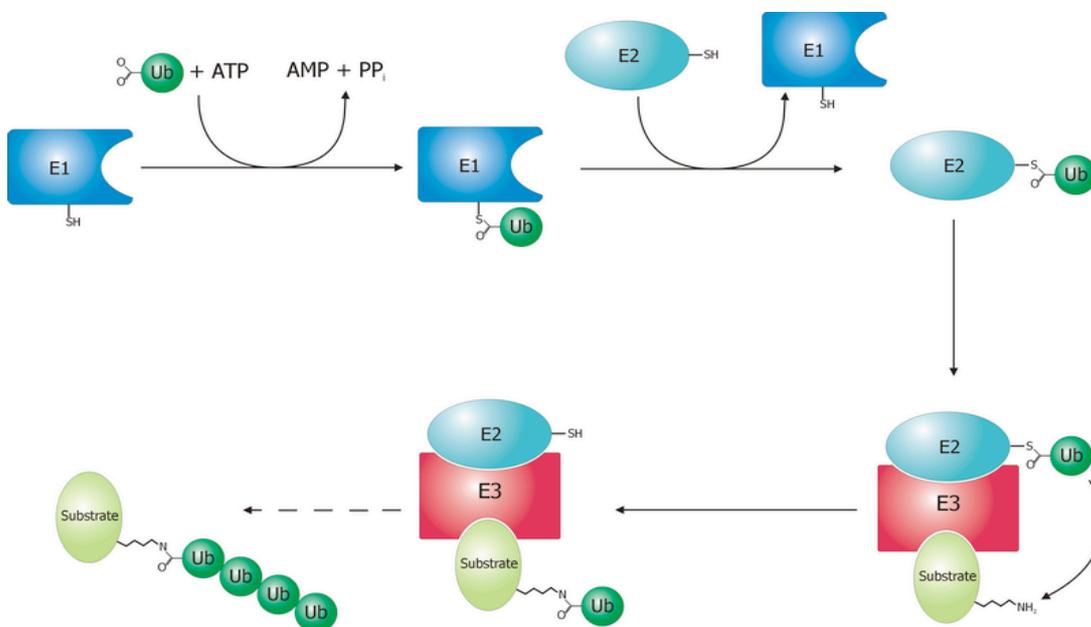


Fig.1.1 Rappresentazione schematica del meccanismo di ubiquitinazione

L'ubiquitina viene attivata, con il consumo di una molecola di ATP, attraverso la formazione di un legame tioestere ad alta energia tra il carbossile della glicina terminale dell'ubiquitina ed un residuo di cisteina presente sull'enzima E1. Successivamente, l'ubiquitina viene trasferita su un'altra cisteina presente nel sito attivo di un enzima E2 con una reazione di trans(tio)esterificazione. L'ultimo passaggio richiede l'intervento dell'enzima E3, in grado di interagire con E2 e, specificamente, con un residuo di lisina del substrato legato ad E3. Esistono centinaia di enzimi E3: la loro variabilità garantisce un'estrema specificità per substrato da ubiquitinare. Sebbene non siano completamente conosciuti i segnali che innescano tale processo, ne è stato proposto uno molto semplice, che riguarda il solo

amminoacido ammino-terminale della proteina bersaglio, che sarebbe dunque l'unico in grado di discriminare per il legame con i rispettivi enzimi E3. A seconda della natura dell'amminoacido ammino-terminale, la proteina potrà dunque avere emivita più o meno breve. Pertanto, mentre gli enzimi E1 ed E2 sono coinvolti nell'attivazione e trasferimento di molecole di ubiquitina, la specificità nel riconoscimento del substrato è conferita esclusivamente dall'enzima E3 ubiquitina-ligasi. La poli-ubiquitinazione di una proteina, generalmente, comporta la sua degradazione attraverso il proteasoma. Il substrato viene trasformato in piccoli peptidi, in maniera ATP-dipendente, mentre le molecole di ubiquitina vengono rilasciate grazie all'azione di *idrolasi* (Fig.1.1).

Sono stati descritti due tipi di enzimi E3: quelli che utilizzano il dominio *HECT*, in cui lo stesso polipeptide lega sia E2 che il substrato, e quelli che utilizzano un dominio *RING* per legare E2 e un polipeptide diverso per legare il substrato. Alcune famiglie di E3 con il *Ring-domain* hanno sviluppato una costruzione modulare molto articolata come il complesso SCF o APC (Fig. 1.2).

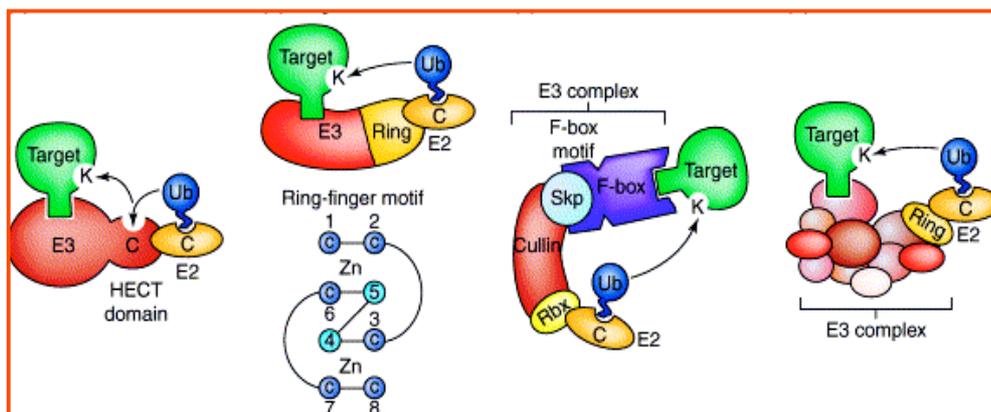


Fig. 1.2 Classificazione dell'enzima E3.

I complessi multimerici CRL (*cullin-RING ubiquitin ligase*) sono costituiti da una proteina appartenente alla famiglia delle culline, (se ne conoscono 7 nei mammiferi (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5, CUL7) che ha un ruolo di "scaffold" per l'assemblaggio delle diverse subunità e conferisce specificità funzionale all'enzima E3 ubiquitina-ligasi [Petroski et al., 2005].

L'estremità N-terminale della cullina lega una proteina adattatrice (es. DDB1, Skp1) che interagisce con una proteina F-BOX (es. DDB2, Skp2), dotata di molteplici domini di interazione proteina-proteina (es. ripetizioni di WD40, ripetizioni ricche di leucina), che ha funzione di modulo di riconoscimento per il substrato,.

L'estremità C-terminale, invece, dotata di attività catalitica, lega una proteina RING-finger (es. ROC1) che a sua volta è coinvolta nel legame con l'enzima E2 che porta con sé una molecola di ubiquitina attivata (Fig. 1.3).

Il complesso Cul4-DDB1 ubiquitina ligasi regola la proliferazione cellulare, la sopravvivenza ed il riparo al DNA attraverso l'ubiquitinazione di molteplici substrati, fondamentali nella regolazione dei diversi processi cellulari. L'ubiquitinazione di proteine del sistema di riparo è una modifica post-traduzionale fondamentale nella risposta al danno del DNA, poiché è responsabile della regolazione dell'attività dei due principali complessi coinvolti del NER.

L'eterodimero DDB1-DDB2 si associa attraverso la subunità DDB1, che funge da proteina adattatrice, al complesso Cul4A-ROC1-E3 ubiquitina ligasi (CRL). CUL4 è la cullina "scaffold" del complesso. All'estremità N-terminale di Cul4A c'è il dominio che lega il substrato e cioè il dominio BPB (β -propeller B domain) della proteina adattatrice DDB1, composta dai domini BPA, BPB, BPC. All'estremità C-terminale di CUL4 c'è il dominio catalitico che si associa con Rbx1 (*Ring domain protein*) e recluta l'enzima E2 che porta con sé una molecola di ubiquitina. In seguito all'attivazione di CUL4, mediante neddilazione, una modificazione post-traduzionale simile all'ubiquitinazione, il substrato si avvicina all'enzima E2 per essere coniugato con una molecola di ubiquitina [Angers et al., 2006].

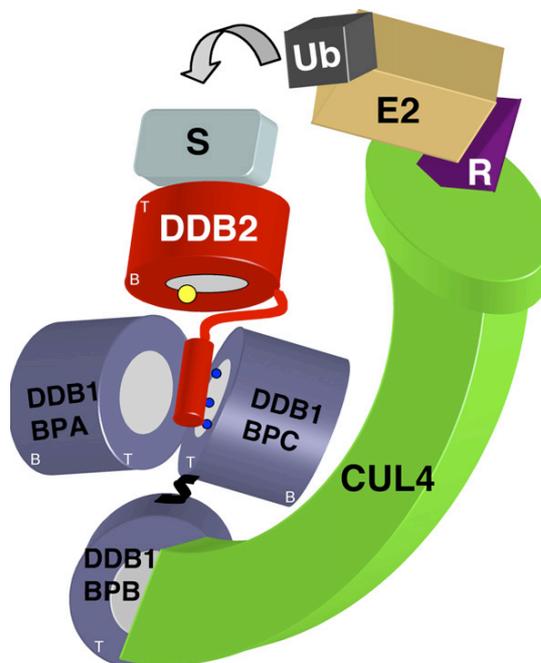


Fig. 1.3 La struttura del CRL^{DDB1} [Angers et al., 2006].

Il complesso CRL^{DDB1} una volta attivato (Fig. 1.4):

- rimodella la cromatina mediante l'ubiquitinazione di proteine bersaglio, comprendenti gli istoni H2A, H3 e H4, allo scopo di facilitare l'accessibilità delle proteine del complesso XPC/HHR23B del sistema GG-NER [Wang et al., 2006];
- ubiquitina la subunità XPC del complesso XPC/HHR23B, accelerandone il reclutamento ed aumentandone la stabilità di legame al DNA danneggiato [Kapetanaki et al., 2006];
- ubiquitina lo stesso DDB2, che viene in seguito degradato via proteasoma. L'ubiquitinazione di DDB2 rappresenta la modificazione-evento che innesca il processo di riparo [Chen et al., 2006].

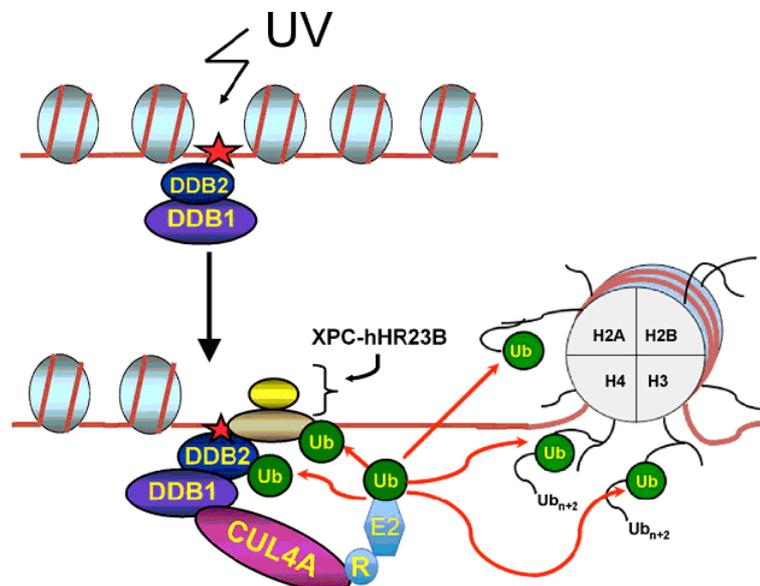


Fig. 1.4 Diagramma schematico degli eventi di ubiquitinazione mediati dal complesso CRL-DDB1 mediato dal sistema GG-NER [Wang et al., 2006].

La proteina CSA mostra un'elevata omologia di sequenza con la proteina DDB2, poichè contiene gli stessi domini di legame al complesso Cul4A-ROC1-E2 ubiquitina ligasi, con il quale si assembla costituendo un complesso simile al CRL [Lee et al., 2007].

Il complesso Cul4A-ROC1-E2 ubiquitina ligasi, in seguito all'irradiazione UV, è reclutato nei siti di danno del DNA grazie all'interazione con CSB.

A differenza del GG-NER, in cui la degradazione di DDB2 serve da innesco per il riparo, nel TC-NER la degradazione di CSB, mediata dall'E3 ubiquitina ligasi del complesso Cul4A-

DDB1-CSA, determina la ripresa dell'attività trascrizionale da parte della RNA pol II dopo la rimozione della lesione [Groisman et al., 2006].

Pertanto, i complessi CRL possono, attraverso una struttura con più subunità proteiche, reclutare centinaia di recettori per substrato; sono, infatti, capaci di interagire specificatamente con una quantità ancora maggiore di proteine bersaglio, alcune delle quali sono coinvolte, non soltanto nel sistema di riparo, ma anche nei *checkpoints* del ciclo cellulare [Bendjennat et al., 2003].

L'attività dei complessi CRL è finemente regolata principalmente attraverso modifiche post-traduzionali. E' stato osservato che l'iper-espressione o amplificazione di diverse culline è presente in numerosi casi di tumori umani della mammella [Chen et al., 1998].

Recenti studi strutturali e biochimici su questi complessi hanno individuato come modifica post-traduzionale la neddilazione a livello di un residuo conservato di lisina all'estremità C-terminale della cullina (NEDD8). Questa modifica determina l'attivazione dei complessi CRL attraverso i seguenti meccanismi:

- cambio conformazionale a livello dell'interfaccia ROC1-E2 che determina l'avvicinamento del complesso al substrato in modo da facilitarne il traferimento della molecola di ubiquitina [Duda et al., 2008];
- reclutamento iniziale di E2, complessato con una molecola di ubiquitina, al complesso cullina-ROC1 promuovendo la poli-ubiquitinazione del substrato [Saha et al., 2008];
- inibizione del riconoscimento da parte dell'inibitore delle culline, CAND1 (*cullin-associated neddylation-dissociated protein 1*), che, in assenza di NEDD8, previene l'interazione della cullina con ROC1 all'estremità C-terminale e l'interazione con le molecole adattatrici all'estremità N-terminale [Zheng et al., 2002].

La de-neddilazione della Cullina ne determina, invece, l'inattivazione [Cope et al., 2002].

1.3 p27^{Kip1} ed il ciclo cellulare

La progressione attraverso il ciclo cellulare coinvolge la sequenziale attivazione o inattivazione di chinasi ciclina-dipendenti (CDKs). Oltre alla regolazione tramite fosforilazione, l'attività delle Cdk può essere controllata mediante il legame con proteine inibitorie, chiamate inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKIs), ai complessi Cdk/ciclina. Le CKI si legano in maniera non covalente ai complessi ciclina-CDK inattivandoli e possono, inoltre, legare indipendentemente la Cdk e la ciclina isolata. Nelle cellule di mammifero, due famiglie di inibitori di Cdk sono responsabili della regolazione dei differenti complessi Cdk/ciclina. I membri della famiglia Ink4 a cui appartengono p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}, si legano in modo specifico a Cdk4 e alla sua isoforma CDK6 inibendoli. Al contrario, i membri della famiglia Cip/Kip e cioè p21^{Cip1/WAF1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, regolano tutti gli stadi di superamento della fase G1 e S, legandosi a complessi formati da Cdk (2-4-6) e cicline (A, D o E). Sebbene gli inibitori Cip/Kip si legano e inibiscono i complessi CDK-ciclina D, E ed A, si ritiene che il bersaglio principale di questi inibitori sia il complesso ciclina E-Cdk2.

p27^{Kip1}, è una proteina di circa 23kDa che è stata identificata come un inibitore del complesso ciclina E-CDK2, ed agisce principalmente in G0 e G1 precoce, dove è necessario per l'arresto in G1 come conseguenza della riduzione dei livelli di fattori di crescita, dell'inibizione da contatto e della perdita di aderenza alla matrice extracellulare [Guan X et al., 2006]. Normalmente, infatti, l'espressione di p27^{Kip1} è più elevata nelle cellule quiescenti e diminuisce dopo stimolazione con mitogeno.

In un normale ciclo cellulare, la proteina p27^{Kip1} viene degradata o in fase G1 precoce o in S-G2. È stato, inoltre, dimostrato che il controllo dell'attività *in vivo* di p27^{Kip1} è di tipo post-traduzionale e coinvolge la fosforilazione su diversi siti della proteina. Durante la fase G1 precoce, la degradazione di p27^{Kip1} avviene nel citoplasma in maniera proteasoma-indipendente ed è mediata dalla fosforilazione sulla Serina in posizione 10. Questa fosforilazione determina il trasporto della proteina dal nucleo al citoplasma mediato da un complesso proteico deputato al trasportare le proteine dal nucleo CRM1. Nel citoplasma p27^{Kip1} viene a questo punto ubiquitinata dal complesso KPC1-KPC2 (Kip1 ubiquitination-promoting complex) e degradata. Quindi, la degradazione di p27^{Kip1} durante la fase G1 avviene dopo il suo passaggio dal nucleo al citoplasma ad opera del complesso citoplasmatico E3 KPC ed è Skp2-indipendente. Durante la fase S-G2, invece, p27^{Kip1} è fosforilato sulla treonina in posizione 187 dal complesso Ciclina E-CDK2 e viene degradata nel nucleo attraverso il proteasoma. In questo meccanismo l'ubiquitinazione della proteina è

mediata dal complesso SCF^{skp2} costituito da Skp1 che funge da proteina adattatrice e da Skp2 che rappresenta il modulo di riconoscimento [Takumi et al., 2004] (Fig.1.5).

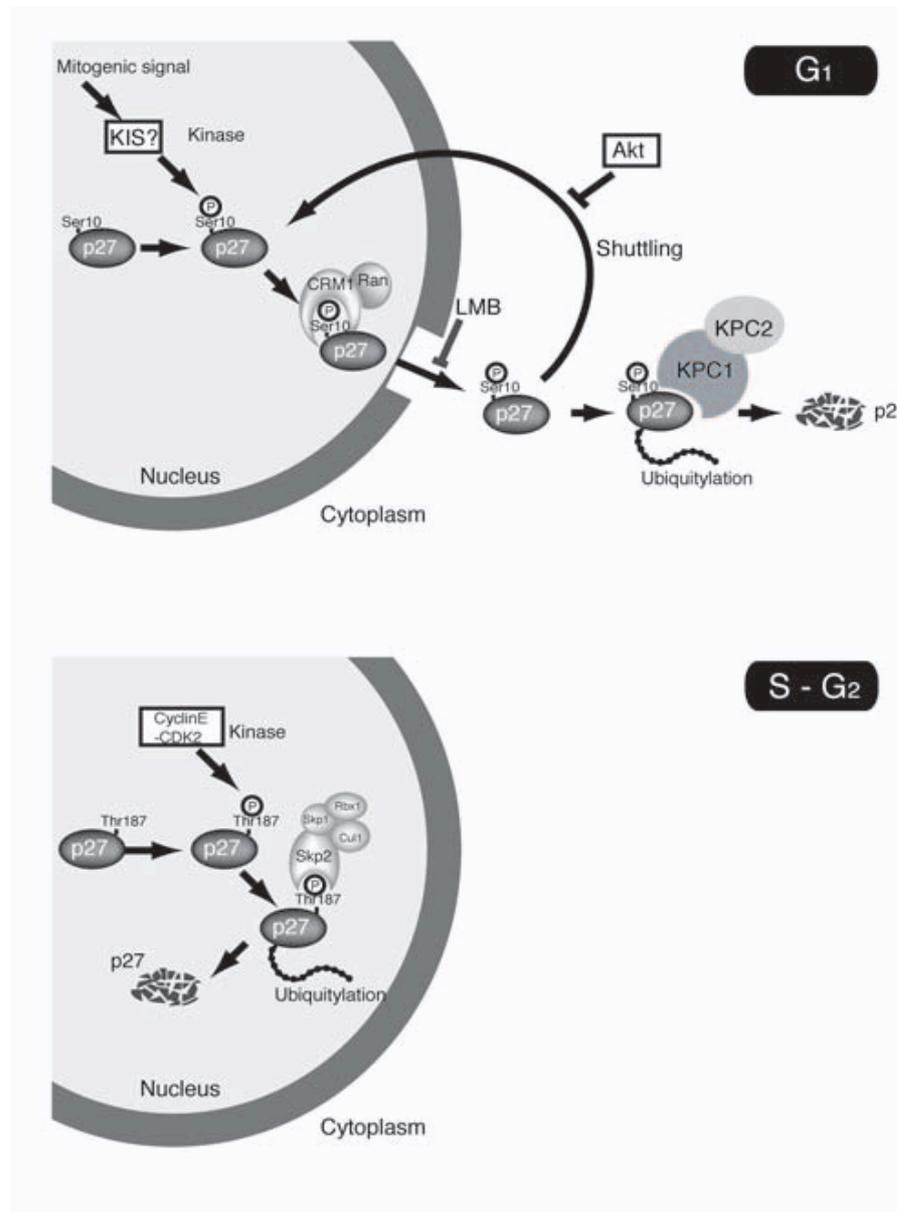


Fig 1.5 Schema della degradazione di p27^{Kip1} nelle diverse fasi del ciclo cellulare [Takumi et al., 2004]

Il *turnover* basale di p27^{Kip1} è mediato dall'ubiquitinazione della proteina da parte dell'ubiquitina E3 ligasi SCF^{Skp}, che ha come proteina adattatrice del complesso Skp1. Studi recenti, però, hanno dimostrato che la degradazione di p27^{Kip1} endogeno potrebbe essere mediata anche da un complesso E3, che ha come proteina adattatrice DDB1 al posto di Skp1 (Cul4A-DDB1-Skp2-E3 ubiquitina ligasi). In particolare, è stato dimostrato, che, Cul4A-DDB1, attraverso la proteina Skp2, legano p27^{Kip1} [Bondar T et al., 2006].

Il *turn-over* temporale e selettivo di p27^{Kip1} mediante ubiquitina/proteosoma non è, però,

l'unico meccanismo di controllo dei livelli intracellulari di questo inibitore. Esistono, infatti, almeno altri due diversi meccanismi nella regolazione della espressione di p27^{Kip1} e cioè una regolazione trascrizionale a livello del promotore [Dijkers et al., 2000] ed il controllo della traduzione del suo mRNA [Millard et al., 1997].

In tumori umani la degradazione della proteina p27^{Kip1} risulta aumentata in molti casi di tumori aggressivi [Slingerland et al., 2000] ed in metastasi di carcinoma del colon retto [Moreira et al., 2003].

Invece, la completa assenza o la riduzione dell'espressione della proteina p27^{Kip1} è un marcatore biochimico di prognosi negativa in carcinomi della mammella [Tanet al., 1997], del colon retto [Loda et al., 1997], della prostata [Yang et al., 1998], dell'esofago [Singh et al., 1998], dello stomaco [Kim et al., 2000], del polmone [Esposito et al., 1997], in carcinomi epatocellulari [Fiorentino et al., 2000] e nei melanomi [Florens et al., 1998].

SCOPO DELLA TESI

La proteina DDB1 (DNA damage-binding protein-1), a localizzazione prevalentemente citoplasmatica, in seguito ad un danno sul DNA indotto da radiazioni ultraviolette, trasloca nel nucleo attivando i meccanismi di riparo per escissione nucleotidica. DDB1, infatti, contribuisce al riparo accoppiato alla trascrizione, che ripara le lesioni sui filamenti di DNA attivamente trascritti e al riparo genomico globale, che agisce sull'intero genoma ed in particolare sulle regioni di DNA non trascritte e sui filamenti complementari a quelli trascritti. La cellula per consentire ai sistemi di riparo di agire, arresta il suo ciclo aumentando i livelli di espressione degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti quali p21^{waf1} e p27^{Kip1}; se, però, il danno al DNA è troppo esteso e non può essere efficacemente riparato, la cellula arresta il ciclo e va in apoptosi.

Negli ultimi anni diversi studi hanno portato all'identificazione di DDB1 quale proteina adattatrice nei complessi "*cullin-RING ubiquitin ligases*" (CRL), coinvolti nella degradazione di diversi substrati cellulari. In particolare, DDB1 è stata identificata nel complesso proteico E3-ubiquitina ligasi (CUL4-DDB1-ROC1 ubiquitina E3 ligasi), con funzione di favorire la proteolisi della proteina p27^{Kip1}. E' stato dimostrato, infatti, che esiste una associazione tra Cul4A, DDB1 e Skp2 e che Skp2, oltre ad utilizzare il complesso Cul1-Skp1, notoriamente responsabile della degradazione di p27^{Kip1} in condizioni basali, utilizza anche Cul4A-DDB1. Il coinvolgimento di DDB1 nella proteolisi di p27^{Kip1} fa supporre che questa proteina oltre ad avere un ruolo come "sensore di danno" può avere un ruolo critico nel controllo dei checkpoints del ciclo. Sulla base di queste osservazioni, gli esperimenti descritti in questa tesi hanno avuto l'obiettivo di studiare la correlazione tra DDB1 e p27^{Kip1}, in seguito ad un danno al DNA indotto da esposizione a radiazioni ultraviolette. A tale scopo, sono stati analizzati i livelli dell'espressione di p27^{Kip1} e di DDB1 in fibroblasti umani immortalizzati (BJ-5ta) ed in numerose altre linee cellulari, dopo esposizione a basse ed ad alte dosi di UV.

MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

Fibroblasti umani di cute (BJ-5ta), immortalizzate con la subunità catalitica della telomerasi (hTERT) e fornite dalla ATCC (American Type Culture Collection) sono state cresciute a 37°C in ambiente 5% CO₂, in mezzo Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM-GIBCO) ATCC addizionato con 20% Medium 199 (M199-SIGMA), 10% siero fetale bovino (GIBCO), 5% glutammina (LONZA), 1% penicillina-streptomina (LONZA), 0.1% igromicina (SIGMA).

Cellule Hela, derivanti da un carcinoma umano epiteliale della cervice uterina, cellule umane di neuroblastoma SHSY, cellule umane di epatoma HUH-7 e cellule umane embrionali di carcinoma di rene HEK293 sono state cresciute ad una temperatura di 37°C al 5% di CO₂ in mezzo Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM, BioWhittaker), addizionato con 10% (20% per le sole SHSY) siero fetale bovino (GIBCO), 1% penicillina-streptomina (LONZA).

2.2 Trattamento con radiazioni ultraviolette

1x10⁶ cellule BJ-5ta sono state piastrate in piastre da 100 mm in mezzo di coltura sopra descritto. Dopo l'incubazione per 1 giorno ad una temperatura di 37°C al 5% di CO₂, il mezzo e' stato rimosso, le cellule BJ-5ta sono state lavate con tampone salino PBS 1x freddo ed e' stato aggiunto 1 ml di PBS 1x freddo alle piastre. Le cellule, cresciute in monostrato a subconfluenza, sono state irradiate con UVC (200 e 290 nm).

Dopo il trattamento, il PBS è stato rimosso e sostituito con 10ml di mezzo di coltura.

Le cellule di controllo sono state trattate allo stesso modo, ma non sono state irradiate.

Le cellule sono state lasciate in coltura per 1-3-6 ore e poi sono state raccolte.

Come sorgente di UVC è stata utilizzata una lampada (DELCHIMICA SCIENTIFIC GLASSWARE VL-4.LC 230V 50/60 Hz) che emette raggi UV principalmente ad una lunghezza d'onda compresa tra 200 e 290 nm, con un picco a 254 nm.

L'intensità delle radiazioni, è stata misurata con un UVmetro (Spectrolyne mod.; Spectronics Corp., Westbury, N.Y., USA).

Le dosi utilizzate per il trattamento con i raggi UVC sono state:

2,5 J/m², 5 J/m², 10 J/m², 15 J/m², 20J/m², 40 J/m².

2.3 Preparazione degli estratti proteici totali per Western Blot

Per la preparazione di estratti proteici totali, le cellule sono state raccolte in tampone salino freddo (PBS 1x) e risospese in un tampone di lisi contenente 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerolo, 50 mM NaF, 1 mM Sodio Ortovanadato, 1% TRITON, e 10 µg/ml degli inibitori Aprotinina, Leupeptina e Pepstatina (SIGMA). Dopo 15 minuti in ghiaccio, l'estratto è stato chiarificato mediante centrifugazione a 16.000 rpm a 4°C per 10 minuti. La concentrazione proteica presente nel supernatante è stata determinata secondo il metodo Bradford mediante saggio colorimetrico Bio-Rad.

2.4 Preparazione degli estratti proteici nucleari e citosolici per Western blot

Per la preparazione di estratti nucleari e citoplasmatici le cellule sono state lavate con PBS 1x freddo per due volte e lisate nel tampone di lisi 1x contenente 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 0.2% NP40 e 10 µg/ml degli inibitori Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina. Il lisato è stato poi centrifugato per 5 minuti a 4°C a 14000 rpm.

Il sovrantante contenente gli estratti citoplasmatici è stato raccolto ed il precipitato contenente i nuclei risospeso in 50 µl di un tampone di lisi 1x contenente 20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF e 10 µg/ml degli inibitori Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina. Il lisato era poi centrifugato per 5 minuti a 4°C a 14000 rpm.

Il sovrantante contenente gli estratti nucleari è stato raccolto.

La concentrazione delle proteine è stata determinata secondo il metodo Bradford mediante saggio colorimetrico Bio-Rad.

2.5 Analisi delle proteine mediante Western Blot

Le proteine sono state separate su gel di poliacrilammide, in SDS, al 13%, e trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Immobilon-P, Millipore), seguendo le indicazioni del fornitore. I filtri sono stati pre-incubati in una soluzione al 5% latte (BIORAD) in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente, i filtri sono stati incubati per 1 ora con opportune diluizioni dell'anticorpo primario, a temperatura ambiente, in una soluzione al 5% latte in TBS contenente Tween-20 allo 0.1% (T-TBS). L'eccesso di anticorpo è stato allontanato mediante tre lavaggi successivi dei filtri in T-TBS per 10 minuti a temperatura ambiente. I filtri sono stati poi incubati con l'opportuno anticorpo secondario

coniugato con perossidasi di rafano, diluito in latte al 5% T-TBS, per 30 minuti a temperatura ambiente. L'avvenuta interazione è stata visualizzata utilizzando il sistema della chemiluminescenza ECL (Amersham-Pharmacia Biotech).

Gli anticorpi utilizzati negli esperimenti di Western Blot sono :

- anticorpo policlonale anti-DDB1 (Zymed) alla concentrazione finale di 1: 500;
- anticorpo monoclonale anti-p27^{Kip1} (Invitrogen) alla concentrazione finale di 1:300;
- anticorpo monoclonale anti α -tubulina (Santa Cruz Biotechnology) alla concentrazione finale di 1: 1000;
- anticorpo policlonale anti-YY1 (Santa Cruz Biotechnology) alla concentrazione finale di 1: 500;
- anticorpo monoclonale sheep anti-mouse (Amersham-Pharmacia Biotech) alla concentrazione finale di 1: 5000;
- anticorpo policlonale goat anti-rabbit alla concentrazione finale di 1: 5000.

2.6 Analisi del danno al DNA attraverso Saggio Cometa

Il Saggio Cometa, noto anche come “single cell gel electrophoresis” (SCGE) e “micro gel electrophoresis” (MGE), è una tecnica microelettroforetica che consente la visualizzazione del danno al DNA in singole cellule.

Il test cometa è stato effettuato con un Kit fornito dalla ditta Trevigen.

In sintesi, dopo il trattamento con gli UVC (da 5 a 40 J/m²), le cellule sono state lavate con PBS, tripsinizzate, risospese in PBS, mescolate con un sottile gel di agarosio, a basso punto di fusione (Low Melting Agarose, LMA, fornito dal kit Trevigen) e disposte su di un vetrino da microscopio in un rapporto di 1:8 (cellule: agarosio). Successivamente, le cellule sono state lisate in una soluzione alcalina, la denaturazione del DNA nucleare, e sottoposte a corsa elettroforetica. Al termine della corsa elettroforetica, eseguita secondo le modalità riportate nel protocollo del kit, l'analisi quali-quantitativa dei risultati, è stata effettuata, dopo aver ricoperto con un film di Syber Green al microscopio a fluorescenza, utilizzando uno specifico software per analizzatore di immagini.

L'entità del danno al DNA, è stato stimato come di seguito riportato.

Per ciascun vetrino sono state scelte in modo casuale 100 cellule e sono state acquisite le relative immagini tramite telecamera collegata al microscopio. Le immagini acquisite sono state, poi, analizzate con uno specifico software (*Comet Score*) che permette di calcolare i principali parametri utilizzati per la valutazione del danno al DNA:

- % di DNA della coda;

- lunghezza della coda;
- tail moment (momento della coda-TM).

Il parametro Tail Moment TM esprime: il prodotto del % di DNA della coda (concentrazione DNA nella coda/concentrazione DNA nella cometa X 100) per la sua lunghezza. La dimensione del TM è una lunghezza. Il TM è stato utilizzato come indice di valutazione del danno.

La coda di una cometa appare tanto più lunga e più intensamente fluorescente quanto più il DNA è frammentato, quindi quanto più è elevato il danno. Per ogni punto della sperimentazione è stato calcolato il valore medio di tail moment tra 100 cellule esposte ad UVC. L'analisi statistica dei risultati (valore medio del TM) rappresenta la media ± DS di 3 esperimenti. La significatività statistica è stata calcolata con ANCOVA (one-way analysis of variance). Il livello di significatività statistica è stato definito con *P<0.05, **P<0.001.

2.7 Real-time PCR

L'RNA totale utilizzato per l'analisi di Real Time PCR è stato isolato dalle cellule BJ-5ta dopo trattamento con UVC mediante l'utilizzo del reagente TRIZOL secondo protocollo suggerito dalla ditta Invitrogen.

La reazione della trascrittasi inversa è stata effettuata nell'apparecchio Gene AMP PCR system 9700 su 1µg di RNA totale per ogni campione. La reazione è avvenuta secondo protocollo del Kit iScript cDNA Synthesis fornito dalla ditta BIO-RAD.

La reazione di Real-time PCR quantitativa è stata condotta nell'apparecchiatura iCYCLER SYSTEM fornito di OPTICAL SYSTEM (Biorad) secondo il seguente protocollo: 5 minuti a 95°C e successivi 40 cicli di 15 secondi a 95°C e 1minuti a 60°C (cicli di annealing e di amplificazione). La reazione di PCR è avvenuta in 20 µl finali:

- 10 µl di Sybr Green PCR Master Mix 2x (Invitrogen);
- 0.19 µl forward primer 40 µM;
- 0.19 µl reverse primer 40 µM;
- 7.62 µl H₂O;
- 2 µl cDNA.

La metodica scelta per la quantificazione del prodotto di PCR è stata quella del Sybr Green. La quantificazione relativa è stata effettuata comparando il Δct dei geni di interesse, ottenuto per differenza tra il suo ct e quello di ACTINA (gene housekeeping), nel campione controllo

$(\Delta ct_{\text{geneX};\text{cont.}} = ct_{\text{geneX};\text{cont.}} - ct_{\text{c-ACTINA};\text{cont.}})$ rispetto al Δct ottenuto nel campione in esame ($\Delta ct_{\text{geneX}} = ct_{\text{geneX}} - ct_{\text{c-ACTINA}}$).

Tale parametro è definito ΔCT e viene utilizzato per calcolare la quantità di mRNA con la seguente formula: $n = 2^{(\Delta \Delta ct_{\text{gene X}})}$, dove n indica il numero di volte che un gene x è cambiato rispetto al gene del campione di controllo.

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nelle Real Time PCR sono:

Gadd45 F: 5'-AGACCCCGGACCTGCACT-3'

Gadd45 R: 5'-CCGGCAAAAACAAATAAGTTGACT-3'

Actina F: 5'- CCTCACCCCTGAAGTACCCCA-3'

Actina F: 3'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT

2.8 Trattamento con inibitore del proteasoma

I fibroblasti sono stati piastrati in mezzo di coltura al quale sono stati aggiunti 2 ul/ml di una soluzione 20 mM, contenente l'inibitore del proteasoma MG132 (SIGMA), reso solubile in presenza di DMSO (1 mg/ml). Dopo 1 ora dal trattamento, il mezzo di coltura è stato allontanato e le cellule, ricoperte con un film sottile di PBS 1x freddo, sono state irradiate. Dopo 3-6 ore dall'irradiazione le cellule sono state raccolte.

2.9 Immunofluorescenza

I fibroblasti sono stati piastrati su vetrini e irradiati con UVC. Dopo 6 ore dall'irradiazione, le cellule sono state lavate con PBS 1x, fissate con formaldeide fredda 3.7% in PBS a 4°C per 30 minuti e lavate di nuovo con PBS. Poi sono state permeabilizzate con 0.2% TRITON in PBS. Dopo 15 minuti le cellule sono state lavate due volte con PBS ed incubate con 0.1% TRITON, 10% FBS in PBS per 1 ora a temperatura ambiente. Le cellule, lavate due volte con PBS, sono state prima trattate con l'anticorpo policlonale anti-p27 di coniglio (1:20, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) in PBS 10% FBS e 0,1% TRITON per 3 ore a temperatura ambiente. Successivamente, sono state lavate due volte con PBS ed incubate con l'anticorpo secondario IgG-FITC di capra anti-coniglio (1:100, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) in PBS 10% FBS e 0,1% TRITON per 1 ora a temperatura ambiente al buio. Dopo aver lavato due volte con PBS, le cellule sono state marcate con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, SIGMA) 0.1 µg/ml a temperatura ambiente per 30 minuti. DAPI è una molecola fluorescente che lega il DNA e, quindi, utile a localizzare i nuclei. I vetrini sono stati montati sul

portavetrini in 50% glicerolo in PBS e le cellule sono state poi esaminate al microscopio a fluorescenza con risoluzione 63x con appropriati filtri per DDB1 e DAPI.

2.10 Immunoprecipitazione

Ad 1 mg di estratto proteico totale, sono stati aggiunti 30 μ l di proteina *A/G PLUS agarose* per 1- 2 ore a 4°C per evitare la formazione di legami aspecifici tra le proteine del lisato e l'anticorpo (fase di "preclearing"). Dopo una centrifugata alla massima velocità per 30-60 secondi, il sovrnatante è stato raccolto ed incubato con 1 μ g di anticorpo primario *over night* a 4°C. Dopo 24 ore sono stati aggiunti 30 μ l di proteina *A/G PLUS agarose* a 4°C per 45 minuti. I campioni sono stati, poi, centrifugati per 30-60 secondi a 14000 rpm e i sovrinatanti, contenenti gli estratti proteici totali privati della proteina immunoprecipitata, sono stati prelevati e conservati a - 20°C. Il precipitato, costituito dal complesso proteina *A/G PLUS agarose*/ anticorpo primario/ proteina immunoprecipitata è stato risospeso in laemly buffer (4% SDS, 20% glicerolo, 0.125 M Tris/HCl, 0.004% Blu di bromofenolo, 10% β -mercaptoetanol) 1x e denaturato a 95-100°C per 5 minuti. A questo punto i campioni sono stati analizzati mediante Western Blot come sopra descritto.

2.11 Trasfezione

Le BJ5ta sono state trasfettate un siRNA per DDB1, per Skp2 ed un siRNA controllo utilizzando il kit siLentFect Lipid Reagent fornito dalla BIO-RAD. Le cellule sono state piastrate con il 60% di confluenza in piastre da 60 mm. Il giorno dopo è stato cambiato il mezzo di coltura e, secondo protocollo suggerito dalla ditta, sono stati utilizzati per ogni trasfezione 7ul di siLentFect e una concentrazione finale di ogni siRNA pari a 20mM. Le sequenze degli siRNA (IDT-integrated DNA Technologies) utilizzati è:

dsRNA: iDDB-1 5'-CGUUGACAGUAAUGAACAAGGCUCC-3'

dsRNA: iSkp2 5'-CGAACUCAGUUAUAGAAGUGUCCAC-3'

dsRNA: iCtrl (TYE563DS) 5'-CCUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUG-3'

RISULTATI

3.1 Basse dosi di UV inducono cambiamenti nei livelli di espressione della proteina p27^{kip1}

Allo scopo di analizzare i livelli di proteina p27^{kip1} dopo esposizione a radiazioni UV cellule BJ-5ta sono state irradiate a 254 nm con diverse dosi di UV, in un intervallo compreso tra 5 J/m² e 40 J/m².

In una prima tappa è stato valutato il danno al DNA con “Saggio Cometa” in condizioni alcaline. Come si osserva in Fig. 3.1, l’entità del danno misurato come rapporto coda/nucleo (*Tail Moment*) delle comete risulta lieve a basse dosi di UV ed elevato ad alte dosi di UV. I risultati ottenuti sono in accordo con i livelli, misurati mediante PCR real-time, dell’ mRNA del gene GADD45 (*grow arrest and DNA damage-inducible*), utilizzato come gene controllo, i cui livelli di espressione sono rapidamente indotti da danno al DNA (Fig. 3.2). In una seconda fase, invece, è stata analizzata l’espressione di p27^{kip1} mediante *Western Blot* (WB), utilizzando estratti proteici totali di cellule BJ-5ta esposte a bassa dose (5J/m²) ed alta dose (40J/m²) di UV e raccolte a diversi tempi dall’irradiazione. Come mostrato in Fig. 3.3 a basse dosi di UV (5 J/m²), ma non ad alte dosi (40J/m²), i livelli della proteina p27^{kip1} si accumulano dopo un ora dall’esposizione e si riducono dopo 3-6 ore. Lo stesso fenomeno si osserva anche in altre linee cellulari quali: cellule di epatoma (HUH-7), cellule di neuroblastoma (SHSY), cellule di carcinoma umano della cervice uterina (HeLa) e cellule di carcinoma umano di rene (Hek 293). Infatti, come si osserva in Fig.3.4 il *Western Blot* di estratti proteici totali provenienti dalle diverse linee cellulari mostra una riduzione dell’espressione di p27^{kip1} a basse dosi di UV e dopo 6h dall’irradiazione.

3.2 La traslocazione nucleare di DDB1 correla con la riduzione nucleare dei livelli proteici di p27^{kip1}

L’espressione della proteina p27^{kip1} è stata, successivamente, analizzata mediante *Western Blot* (WB), utilizzando estratti proteici citosolici e nucleari.

Le cellule BJ-5ta sono state esposte a dosi crescenti di UV nell’intervallo da 5 a 40J/m².

Nella frazione nucleare i livelli di proteina p27^{kip1}, valutati dopo 1h dall’esposizione aumentano in maniera significativa, come si osserva in (Fig. 3.5.). L’accumulo di p27^{kip1} è dose-dipendente e correla con la traslocazione nel nucleo della proteina DDB1. Nella frazione

citoplasmica, invece, i livelli della proteina DDB1 non mostrano variazioni significative e la proteina p27^{kip1} risulta assente (Fig. 3.6).

Sono stati, quindi, valutati i livelli di espressione della proteina p27^{kip1} e della proteina DDB1 a diversi tempi di raccolta (1- 3-6 ore) dopo esposizione ad una bassa, media ed alta dose in un intervallo da 5 a 40J/m². Come si osserva in Fig. 3.6, a basse dosi di UV, dopo 3 e 6 ore dall'esposizione i livelli di proteina p27^{kip1} nella frazione nucleare si riducono. La riduzione di p27^{kip1} correla con la traslocazione di DDB1 dal citoplasma al nucleo.

La riduzione nucleare di p27^{kip1} trova conferma in un esperimento di immunofluorescenza in cui è stata analizzata la localizzazione cellulare di questa proteina utilizzando un anticorpo primario anti-p27^{kip1} ed un secondario coniugato ad un fluorocromo. L'analisi dei risultati, attraverso microscopia a fluorescenza (Fig. 3.7), mostra, in verde, il segnale relativo a p27^{kip1}, la colorazione blu del nucleo (segnale del DAPI) e la colorazione dovuta alla sovrapposizione dei due segnali (MERGE). A basse dosi di UV e dopo 1 ora dall'esposizione, il segnale di fluorescenza per p27^{kip1} è visibile principalmente nel nucleo, dopo 3-6h dall'irradiazione, invece, il segnale nucleare si riduce notevolmente.

3.3 La riduzione di p27^{kip1} è il risultato di una degradazione proteasoma-dipendente e DDB1 fa parte del complesso E3-ubiquitina ligasi responsabile della sua ubiquitinazione

Per valutare se la riduzione nucleare di p27^{kip1} a basse dosi di UV, fosse il risultato di una proteolisi proteasoma-dipendente le cellule BJ5ta sono state trattate con l'inibitore del proteasoma MG132 prima dell'esposizione agli UV.

Il trattamento con l'inibitore del proteasoma previene la riduzione di p27^{kip1} osservata a 3-6 ore dall'irradiazione, rispetto a cellule controllo trattate con DMSO; nel Western Blot in presenza di anticorpi anti-p27^{kip1} già dopo 3h, si osserva un aumento dell'espressione di p27^{kip1} (Fig. 3.8).

La presenza di DDB1, a basse dosi di UV, nel complesso dell'E3-ubiquitina ligasi è stata dimostrata attraverso esperimenti di co-immunoprecipitazione. In un primo esperimento, estratti proteici provenienti da cellule irradiate con 5 e 40 J/m² e raccolti dopo 1 ora dall'esposizione, sono stati immunoprecipitati con un anticorpo anti-p27^{kip1} e testati in presenza di un anticorpo anti-DDB1. Il risultato ottenuto (Fig. 3.9A) dimostra che l'interazione tra le due proteine avviene a basse dosi di UV. Successivamente, estratti proteici raccolti dopo 1-3-6 ore dall'irradiazione a basse dosi di UV, sono stati immunoprecipitati, in presenza di DDB1 o p27^{kip1} e testati mediante Western Blot, con anticorpi anti-p27^{kip1} e anti-

DDB1. I risultati mostrati in Fig. 3.9 B dimostrano che DDB1 e p27^{kip1} sono presenti nello stesso complesso dopo 1 ora dal trattamento UV, confermando l'ipotesi che DDB1 sia un componente del complesso DDB1-Cul4A-E3 ligasi, responsabile della degradazione di p27^{kip1} osservata a basse dosi di UV.

3.4 Cellule interferite con un siRNA per DDB1 aumentano i livelli di p27^{kip1} dopo esposizione a basse dosi di UV

Per escludere la possibilità che la degradazione di p27^{kip1} UV-dipendente fosse il risultato di una regolazione di tipo trascrizionale sono stati eseguiti esperimenti di RT PCR validati successivamente per Real Time PCR. Come mostrato in Fig. 3.10 i campioni di RNA raccolti a 1-3-6 ore dall'esposizione agli UV non mostrano alcuna differenza nei livelli di espressione dell'mRNA di p27^{kip1}. Lo stesso esperimento di RT PCR effettuato per valutare l'espressione dei mRNA di Skp2 e DDB1, dimostra, inoltre, che l'UV non ha alcun effetto neanche sulla regolazione trascrizionale dei componenti del complesso dell'ubiquitina E3-ligasi e che, l'aumento dell'espressione di DDB1 nel nucleo è relativo esclusivamente alla sua traslocazione dal citoplasma al nucleo.

Il silenziamento dei livelli endogeni di DDB1 e Skp2 attraverso l'utilizzazione di specifici siRNA conferma che la degradazione di p27^{kip1} è il risultato della sola regolazione post-traduzionale (Fig. 3.11). Un siRNA per DDB1 o per Skp2 inibisce la riduzione di p27^{kip1}, ed il Western Blot, infatti, mostra che i livelli di espressione di p27^{kip1} a 6 ore dall'irradiazione aumentano notevolmente nei campioni cellulari interferiti, che presentano livelli di espressione simili a quelli osservati dopo 1 ora dall'esposizione. Un controllo dell'esperimento è dato da una RT PCR in cui è evidente come l'mRNA di p27^{kip1} non varia in cellule interferite con DDB1 o con Skp2 (Fig. 3.11B).

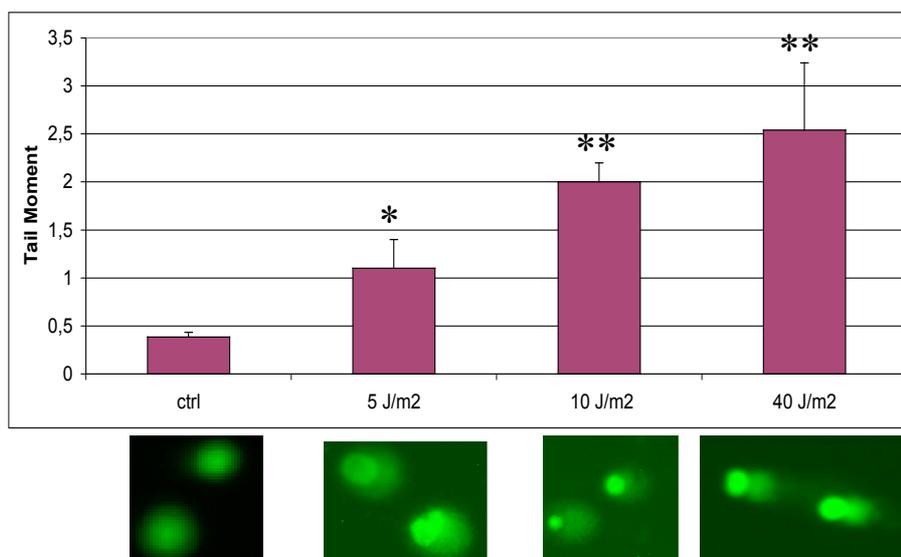


Fig 3.1 Saggio Cometa a diverse dosi di UV.

L'entità del danno al DNA è riportata con il parametro del Tail Moment, indicativo del rapporto dell'area coda/nucleo della cometa. L'analisi statistica dei risultati (valore medio del TM) rappresenta la media \pm DS di 3 esperimenti. La significatività statistica è stata calcolata con ANCOVA (one-way analysis of variance). Il livello di significatività statistica è stato definito con * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

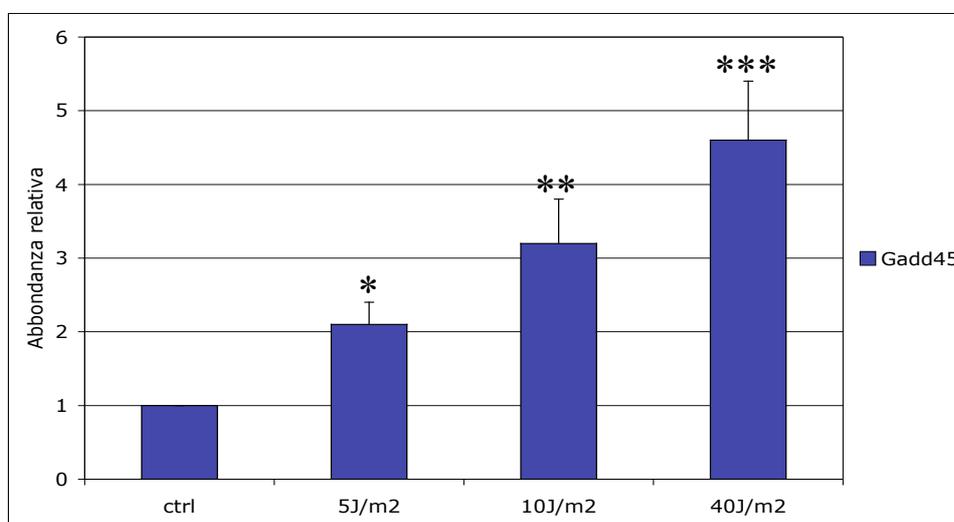


Fig 3.2 Espressione del gene Gadd45 valutata attraverso Real Time PCR dopo esposizioni ad UV

I valori di espressione sono riportati come abbondanza relativa e rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm DS di 3 esperimenti. La significatività statistica è stata calcolata con ANCOVA (one-way analysis of variance). Il livello di significatività statistica è stato definito con * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

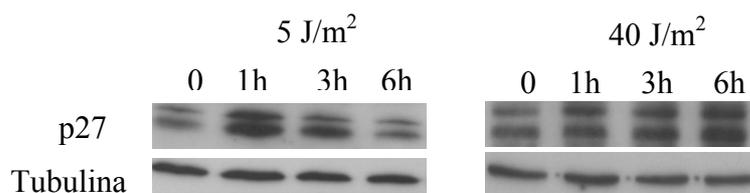


Fig 3.3 Western Blot di cellule irradiate a 5 e 40J/m² e raccolte a diversi tempi dopo l'irradiazione.
Estratti proteici totali di cellule Bj-5ta testati con Ab anti-p27 e anti-tubulina come controllo di normalizzazione.

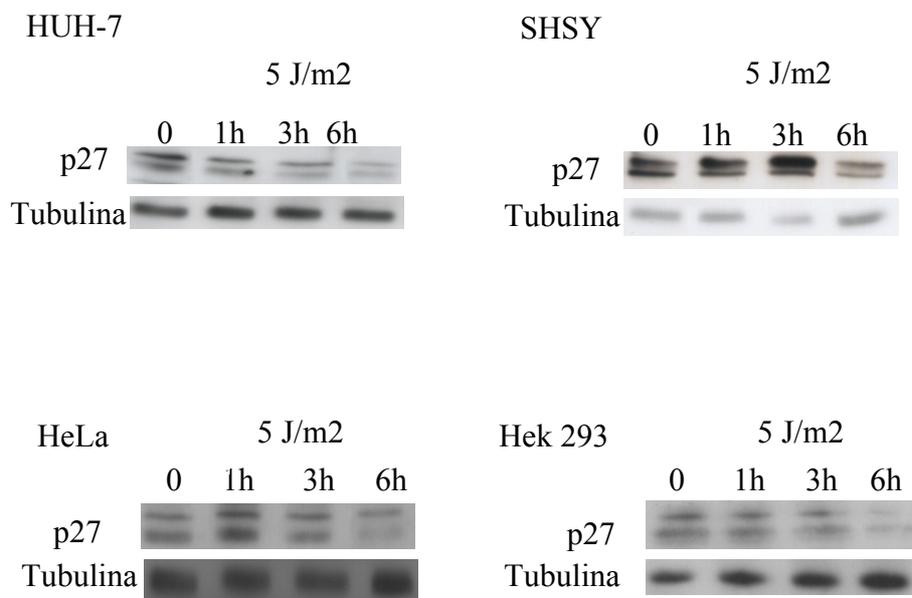


Fig 3.4 Western Blot di cellule HUH-7, SHSY, HeLa e Hek293 irradiate a 5J/m² e raccolte a diversi tempi dopo l'irradiazione.
Estratti proteici totali testati con Ab anti-p27 e anti-tubulina come controllo di normalizzazione.

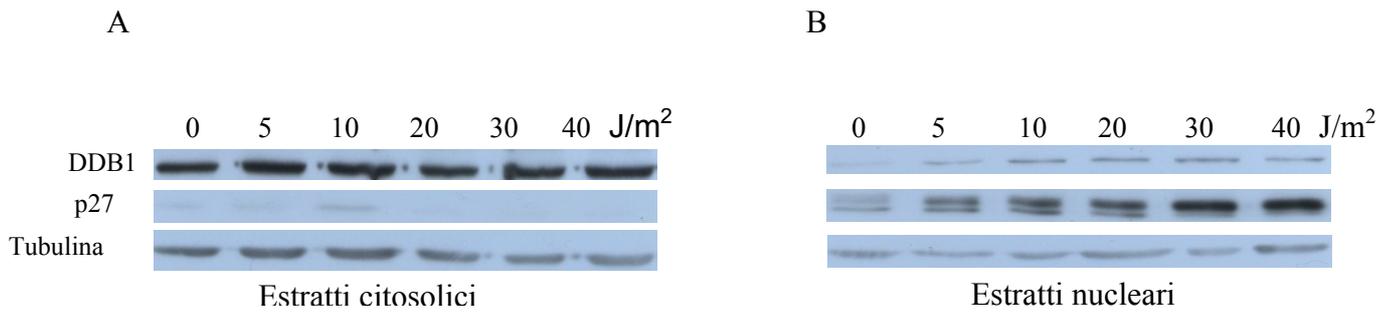


Fig 3.5 BJ 5ta: diverse dosi di UVC e raccolta dopo 1 h dall'irradiazione.

(A) W.B. di estratti proteici nucleari di cellule Bj-5ta trattati con Ab anti p27 e anti DDB1 e anti YY1 come controllo di normalizzazione.

(B) W.B. di estratti proteici citosolici di cellule Bj-5ta trattati con Ab anti p27 e anti DDB1 e anti-tubulina come controllo di normalizzazione.

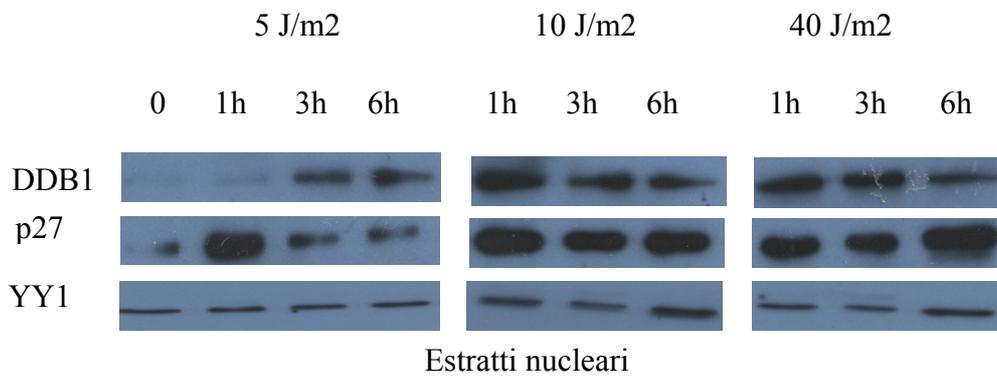


Fig 3.6 BJ 5ta: diverse dosi di UVC e raccolta a diversi tempi dopo l'irradiazione.

W.B. di estratti proteici nucleari trattati con Ab anti p27 e anti YY1 come controllo di normalizzazione.

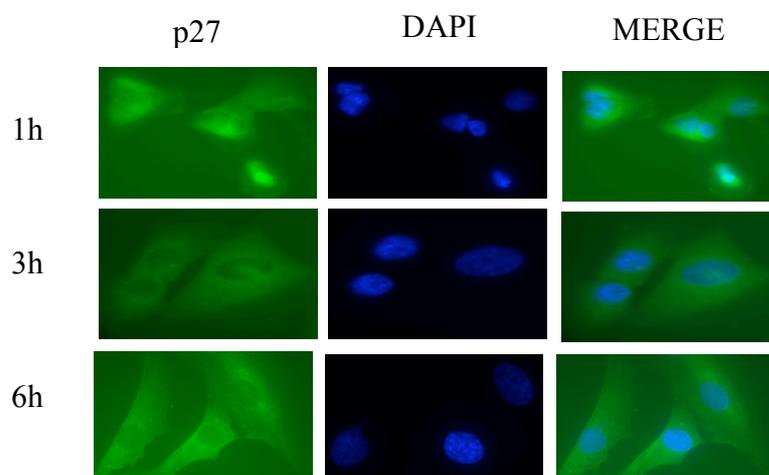


Fig 3.7 Analisi mediante immunofluorescenza della localizzazione della proteina p27^{Kip1} dopo un'irradiazione di 5J/m².

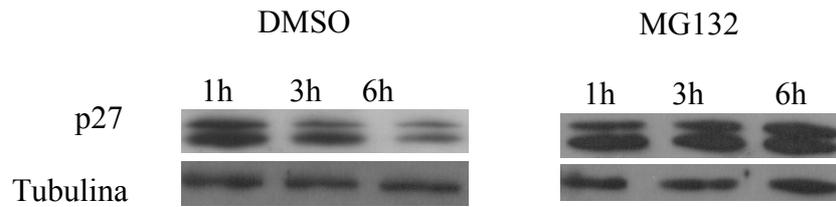


Fig 3.8 BJ 5ta in presenza dell'inibitore del proteasoma MG132, irradiate con 5J/m² e raccolte a diversi tempi.

W.B. di estratti proteici totali trattati con Ab anti p27 e anti-tubulina come controllo di normalizzazione. I livelli di proteina p27^{kip1} sono stati misurati a diversi tempi di raccolta (da 3 h a 6 h), in presenza di DMSO (controllo dell'esperimento) e in presenza di MG132.

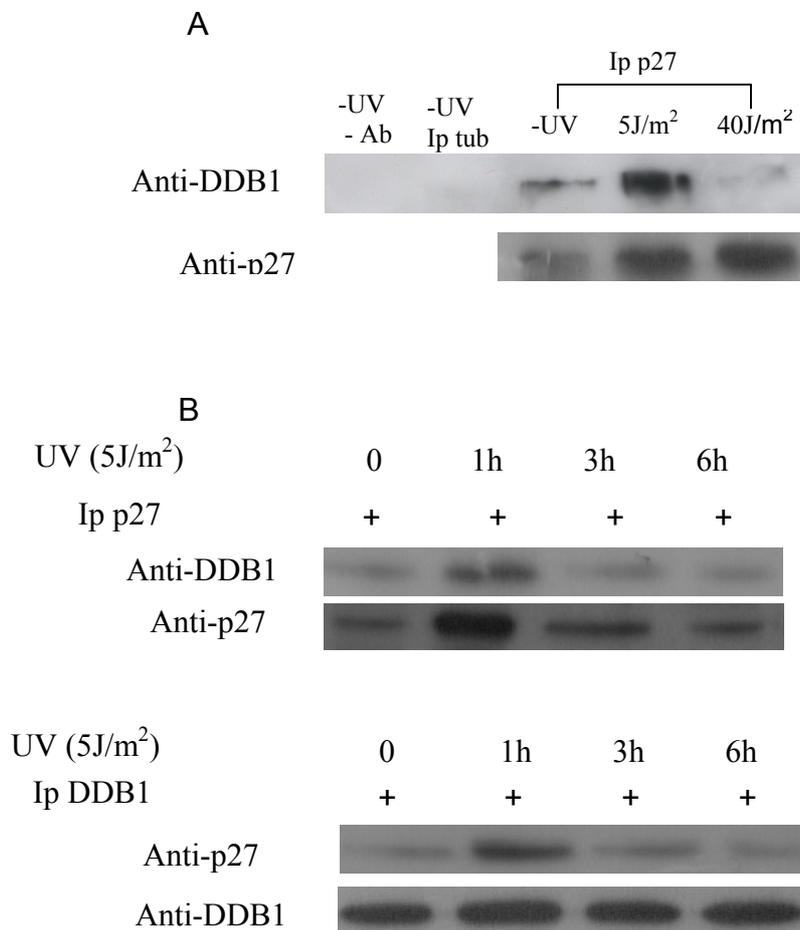


Fig 3.9 Co-immunoprecipitazioni

A) Western Bolt con anti -DDB1 di immunoprecipitati con Ab anti- p27 su estratti proteici totali di cellule BJ 5ta irradiate con diverse dosi di UVC 5J/m² e 40/m² e raccolte ad 1 ora dall'esposizione ad UVC

B) Western Blot con anti-DDB1 e anti-p27^{Kip1} su estratti proteici totali di cellule BJ 5ta irradiate con 5J/m² e raccolte a diversi tempi dopo l'esposizione ad UVC ed immunoprecipitati con Ab anti-p27 e con Ab anti-DDB1

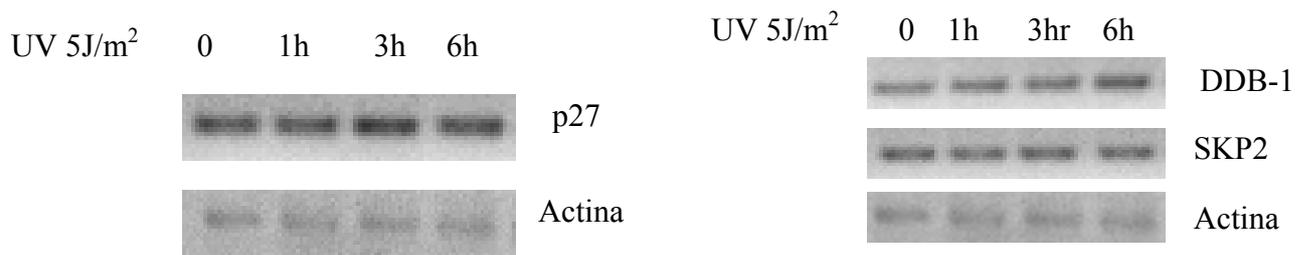
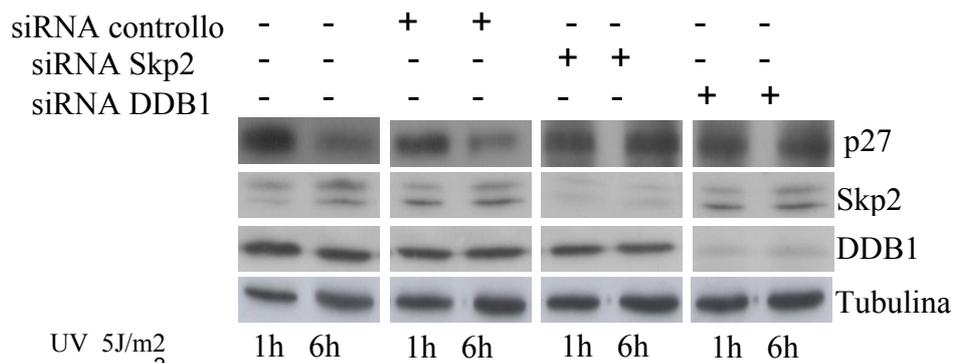


Fig 3.10 RT PCR di cellule BJ 5ta irradiate con 5J/m² e raccolte a diversi tempi dopo l'esposizione ad UVC.

Esperimento di RT PCR, in cui sono stati valutati i livelli di espressione di p27, DDB1 e Skp2. L'actina è stata utilizzata come mRNA controllo di normalizzazione.

A



B

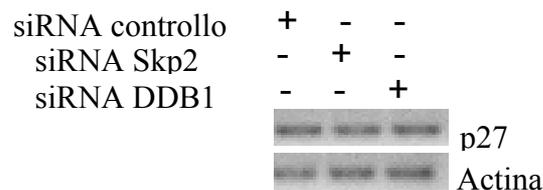


Fig 3.11 Cellule BJ5ta trasfettate con un siRNA per DDB1 e un siRNA per Skp2

- A) Western Blot di cellule trasfettate con siRNA per DDB1 e per Skp2 irradiate con 5J/m² e raccolte a 1 e 6 ore dall'irradiazione
- B) RT PCR per p27^{Kip1} dopo trsfazione con siRNA controllo, un siRNA per DDB1 e un siRNA per Skp2. L'actina è stata utilizzata come mRNA controllo di normalizzazione.

DISCUSSIONE

Le radiazioni ultraviolette (UV) causano danno al DNA, generando dimeri di ciclobutano-pirimidina (CPDs) e 6-4 fotoprodotto, che vengono efficacemente riparati dal meccanismo di riparo per escissione nucleotidica (NER). Le cellule rispondono a dosi basse o comunque non letali di UV attivando sia i meccanismi di riparo che i “*checkpoints*” cellulari. Questi meccanismi possono funzionare indipendentemente l’uno dall’altro, ma si pensa siano strettamente coordinati tra loro. In questo contesto DDB1 rappresenta un fattore chiave, in quanto da un lato partecipa attivamente al NER e dall’altro fa parte del complesso dell’ubiquitina E3-ligasi responsabile dell’ubiquitinazione dell’inibitore delle chinasi ciclina-dipendente p27^{Kip1}.

Gli esperimenti descritti in questa tesi dimostrano che DDB1 è coinvolta nel turnover di p27^{Kip1} in seguito all’esposizione di fibroblasti umani di cute (BJ-5ta) a radiazioni ultraviolette.

I dati riportati dimostrano che la proteina p27^{Kip1} si accumula nel nucleo dopo un’ora dall’esposizione agli UV in maniera dose-dipendente. Se tuttavia, si analizzano i livelli di p27^{Kip1} nel tempo, si osserva che a basse dosi di UV (5J/m²) e dopo 3-6 ore dall’esposizione, si ha una notevole riduzione dei livelli nucleari della proteina, che correla con la traslocazione di DDB1 nel nucleo; mentre ad alte dosi (40J/m²) l’aumento dei livelli di entrambe le proteine, osservati ad 1 ora dall’esposizione, rimangono costanti nel tempo.

Questa riduzione UV-dipendente è un fenomeno che si osserva anche in altre linee cellulari (HUH-7, SHSY, Hela, Hek 293), per cui la sua riproducibilità porta ad ipotizzare che questo meccanismo sia indipendente dal tipo di cellula.

Il pre-trattamento con l’inibitore del proteasoma MG132 dimostra che la riduzione di p27^{Kip1} è proteasoma dipendente ed esperimenti di co-immunoprecipitazione identificano DDB1 e Skp2 nel complesso responsabile dell’ubiquitinazione della proteina. Quindi, mentre il *turnover* basale di p27^{Kip1} è mediato dal complesso SCF (*Skp-Cullina-F-box protein*), che ha come proteina adattatrice del complesso Skp1, la degradazione di p27^{Kip1} endogeno dopo irradiazione sembrerebbe, invece, essere mediata dal complesso Cul4A-DDB1-Skp2-E3 ubiquitina ligasi, che ha come proteina adattatrice DDB1. Infatti, gli esperimenti di co-immunoprecipitazione mostrano l’interazione di p27^{Kip1} con DDB1 dopo un’ora dall’esposizione agli UV e cioè precedentemente alla sua degradazione. Inoltre, l’analisi dell’espressione di p27^{Kip1} mediante Western Blot di estratti di cellule BJ-5ta trasfettate con un RNA interferente per DDB1 e Skp2, conferma l’ipotesi che la sua degradazione UV-

dipendente sia mediata dal complesso Cul4A-DDB1-Skp2-E3 ubiquitina ligasi, mostrando, a 6 ore dagli UV, livelli di p27^{Kip1} paragonabili a quelli osservati dopo 1 ora.

Infine, l'analisi del danno al DNA effettuata mediante Saggio Cometa e PCR Real-time, del gene GADD45 ha evidenziato che l'entità del danno al DNA aumenta all'aumentare della dose di esposizione agli UV.

Queste osservazioni conducono alla formulazione di due ipotetici modelli di risposta cellulare al danno indotto da UV (Fig. 3.1):

- a) a basse dosi di UV l'entità del danno al DNA non è tale da interferire in maniera significativa con il ciclo cellulare quindi dopo un arresto iniziale, segnato dall'accumulo dei livelli nucleari della proteina p27^{Kip1} dopo 1 ora dall'esposizione agli UV, il ciclo cellulare riprende regolarmente, riducendo i livelli di p27^{Kip1};
- b) ad alte dosi di UV, invece, l'entità del danno al DNA è tale da indurre l'arresto del ciclo cellulare, caratterizzato da un aumento dei livelli nucleari di p27^{Kip1} che restano invariati nel tempo.

Presumibilmente, ad alte dosi di UV, il danno al DNA è cruciale per il destino della cellula; la scelta, se sopravvivere continuando a replicare, o se andare incontro ad una morte cellulare programmata (apoptosi), è subordinata all'efficacia del meccanismo di riparo del danno al DNA indotto dagli UV.

BIBLIOGRAFIA

1. Angers S., Li T., Yi X., MacCoss M.J., Moon R.T., Zheng N., *Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery, Nature* 443 (2006) 590–593
2. Batty, DRapic'-Otrin, V., Levine A.S., Wood R.D., *Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites, J. Mol. Biol.* 300 (2000) 275–290.
3. Bendjennat M., Boulaire J., Jascur T., Brickner H., Barbier V., Sarasin A., Fotedar A., Fotedar R., *UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21 (WAF1) to promote DNA repair, Cell* 114 (2003) 599-610.
4. Bevilacqua M.A, Iovine B., Zambrano N., D'Ambrosio C., Scaloni A., Russo T., Cimino F. *Fibromodulin gene transcription is induced by ultraviolet irradiation, and its regulation is impaired in senescent human fibroblasts, J. Biol. Chem,* vol., (2005) 280(36) 31809-31817.
5. Bondar T., Kalinina A., Khair L., Kopanja D., Nag A., Bagchi S., and Raychaudhuri P.. *Cul4A and DDB1 Associate with Skp2 To Target p27 for proteolysis Involving the COP9 Signalosome. Mol. And Cell. Biol.* 2006 p.2531-2539.
6. Chen L.C, Manjeshwar S., Lu Y., Moore D, Ljung B.M., Kuo, W.L., Dairkee S.H, Wernick M., Collins C., Smith H.S, *The human homologue for the Caenorhabditis elegans cul-4 gene is amplified and overexpressed in primary breast cancers, Cancer Res.* 58 (1998) 3677–3683.
7. Chen X, Zhang J., Lee J., Lin P.S., Ford J.M., Zheng N., Zhou P., *A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins, Mol. Cell* 22 (2006) 489–499.
8. Cope G.A., Suh G.S., Aravind L., Schwarz S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., Deshaies R.J, *Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1, Science* 298 (2002) 608–611.
9. Dijkers PF, Medema RH, Pals C, Banerji L, Thomas NS, Lam EW, Burgering BM, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. *Forkhead transcription*

- factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27Kip1. Mol. Cell Biol. (2000) 20. 9138-9148*
10. Duda D.M., Borg L.A., Scott D.C., Hunt H.W., Hammel M, Schulman B.A., *Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation, Cell 134 (2008) 995–1006.*
 11. Esposito V, Baldi A, De Luca A, et al. *Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. Cancer Res 1997; 57: 3381.*
 12. Fiorentino M, Altimari A, D'Errico A, Cukor B, Barozzi C, Loda M, Grigioni WF *Acquired expression of p27 is a favorable prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2000; 6: 3966.*
 13. Fitch M.E, S. Nakajima, A. Yasui, J.M. Ford, *In vivo recruitment of XPC to UVinduced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product, J. Biol. Chem. 278 (2003) 46906–46910.*
 14. Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Slingerland JM, Nesland JM, Holm R. *Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. Am J Pathol 1998; 153: 305.*
 15. Fousteri M, Vermeulen W., van Zeeland A.A, Mullenders L.H., Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo, *Mol. Cell 23 (2006) 471–482.*
 16. Friedberg, E.C., Walker G.C., Siede W.W., Wood R.D. Schultz, R.A, Ellenberger T., *DNA Repair and Mutagenesis, ASM press, Washington, D.C., 2006.*
 17. Groisman R., I. Kuraoka, O. Chevallier, N. Gaye, T. Magnaldo, K. Tanaka, A.F. Kisselev, A. Harel-Bellan, Y. Nakatani, *CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome, Genes Dev. 20 (2006) 1429–1434.*
 18. Groisman, R, J. Polanowska, I. Kuraoka, J. Sawada, M. Saijo, R. Drapkin, A.F. Kisselev, K. Tanaka, Y. Nakatani, *The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, Cell 113 (2003) 357–367.*
 19. Guan X., Chen L., Wang J., Geng H., Chu X., Zhang Q., Du L, De W.. *Mutations of Phosphorylation sites Ser¹⁰ and Thr¹⁸⁷ of p27^{Kip1} abolish cytoplasmatic*

- redistribution but do not abrogate G_{0/1} phase arrest in HepG₂ cell line. BBRC 347 (2006) 601-607*
20. Hanawalt P.C, *Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation, Oncogene 21 (2002) 8949–8956.*
 21. Iovine B., Nino M., Irace C., Bevilacqua MA, Monfrecola G., *Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expresssion in human fibroblasts in vitro, Biochimie (2009), .91(3). 364-372*
 22. Kamura T., Hara T., Matsumoto M., Ishida N., Okumura F., Hatakeyama S., Yoshida M., Nakayama K. and Nakayama K. *Cytoplasmatic ubiquitin ligase KCP regulates proteolysis of p27Kip1 at G1 phase. Nature Cell Biology 6 (2004) 1229-1235.*
 23. Kapetanaki M.G, Guerrero-Santoro J., Bisi D.C, Hsieh C.L., Ropic-Otrin V., Levine A.S., *The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (2006) 2588–2593;*
 24. Kim DH, Lee HI, Nam ES, et al. *Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. Histopathology 2000; 36: 245.*
 25. Kulaksiz G., Reardon J.T, Sancar A., *Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 9784–9792.*
 26. Lee J, Zhou P., *DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase, Mol. Cell 26 (2007) 775–780.*
 27. Liu W, Nichols A.F, Graham J.A, Dualan R, Abbas A, Linn S. *Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. J Biol Chem. (2000) 14; 28: 21429-21434.*
 28. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M.. *Increased proteasom-edependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nat Med 1997; 3: 231.*

29. Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem.* 1997 7093-7098
30. Moreira G Jr, Colleoni GW, Cangi MG. Reciprocal Cdc25A and p27 expression in B-cell non-Hodgkin lymphomas *Diagn Mol Pathol* 2003; 12: 128.
31. Petroski M.D, Deshaies R.J., Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 9–20.
32. Saha, A., Deshaies R.J, Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation, *Mol. Cell* 32 (2008) 21–31.
33. Sancar A, DNA excision repair, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 43–81.
34. Singh SP, Lipman J, Goldman H, et al. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 1730
35. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 10.
36. Tan P, Cady B, Wanner M, Worland P., Cukor B., Magi-Galluzzi G., Lavin P., Draetta G., Pagano M., Loda M. The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57: 1259.
37. Wang H, L. Zhai, J. Xu, H.Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Xiong, Y. Zhang, Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROCI ubiquitin ligase facilitates cellular response toDNA damage, *Mol. Cell* 22 (2006) 383–394.
38. Wittschieben B.B., Wood R.D, DDB complexities, *DNA Repair* 2 (2003) 1065–1069.
39. Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wang HJ., Phillipson J., deKernion JB., Loda M., Reiter RE. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol* 1998; 159: 941.
40. Zheng J, X. Yang, J.M. Harrell, S. Ryzhikov, E.H. Shim, K. Lykke-Andersen, N. Wei, H. Sun, R. Kobayashi, H. Zhang, CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex, *Mol. Cell* 10 (2002) 1519–1526.