

INDICE

SOMMARIO	pag. 3
SUMMARY	pag. 4
INTRODUZIONE GENERALE	pag. 5
SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA	pag. 11
SEZIONE I	pag. 12
INTRODUZIONE	pag. 12
MATERIALI E METODI	pag. 20
1.Colture cellulari	pag. 20
2.Trattamento delle cellule con TPT ed NU1025	pag. 20
3.Preparazione dell'omogenato cellulare	pag. 20
4.Isolamento di nuclei e citoplasma da cellule di glioblastoma umano	pag. 21
5.Analisi dell'inibizione di crescita mediante saggio MTT ed elaborazione con software Calculusyn	pag. 21
6.Determinazione della concentrazione proteica	pag. 22
7.Determinazione dell'attività PARP in omogenati cellulari	pag. 22
8.Determinazione dell'attività PARP in cellule in coltura	pag. 23
9.Analisi del ciclo cellulare per citofluorimetria	pag. 23
10.Analisi elettroforetica di proteine mediante gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)	pag. 24
11.Western blotting	pag. 24
RISULTATI	pag. 26
Analisi dei livelli basali di proteine	pag. 26
Analisi dell'inibizione di crescita in seguito a trattamento con TPT ed NU1025	pag. 26
Saggi di attività PARP <i>in vitro</i>	pag. 27
Analisi del ciclo cellulare	pag. 27
Saggio di attività PARP in cellule	pag. 28
Analisi dei livelli di espressione di p53 e p21	pag. 28
Localizzazione endocellulare di p53 e p21	pag. 29
DISCUSSIONE	pag. 30
SEZIONE II	pag. 32
INTRODUZIONE	pag. 32
MATERIALI E METODI	pag. 37
12.Colture cellulari	pag. 37
13.Trattamento delle cellule con rIFN α ed NU1025	pag. 37
14.Preparazione dell'estratto proteico	pag. 37
15.Sintesi e purificazione del ^{32}P pADPR	pag. 37
16.Analisi dei livelli di espressione proteica	pag. 38

17.Fosforilazione <i>in vitro</i> di hrSTAT-1	pag. 38
18.Induzione della poli(ADP-ribosilazione) covalente di proteine	pag. 38
19.Analisi di poli(ADP-ribosilazione) non covalente di proteine mediante polymer-dot blot	pag. 39
20.Esperimenti di co-immunoprecipitazione	pag. 39
21. Marcatura della sonda	pag. 39
22.Saggi di variazione di mobilità elettroforetica (EMSA)	pag. 40
RISULTATI	pag. 41
Analisi dei livelli di STAT-1	pag. 41
Localizzazione endocellulare di STAT-1	pag. 41
Analisi del meccanismo di poli(ADP-ribosilazione) di hrSTAT-1	pag. 42
Co-immunoprecipitazione di hrSTAT-1 e hrPARP-1	pag. 43
Analisi mediante variazione della mobilità elettroforetica (EMSA) dell'interazione di hrSTAT-1 al suo sito <i>consensus</i>	pag. 44
DISCUSSIONE	pag.44
BIBLIOGRAFIA	pag.46

SOMMARIO

Alla luce di evidenze autorevoli che suggeriscono un ruolo della reazione di poli(ADP-ribosilazione) in molti processi cellulari come il riparo del DNA e la trascrizione, la crescita cellulare e la trasformazione, la mia ricerca si è focalizzata sull'analisi dell'azione di inibitori di PARP come adiuvanti di agenti chemioterapici (es. veleni di Topo I ed interferoni) in cellule di glioblastoma e di carcinoma.

In una prima sezione sono stati investigati gli effetti indotti dal trattamento con l'inibitore di Topo I, il topotecano (TPT) e l'inibitore di PARP, l'NU1025 in due linee cellulari di glioblastoma umano D54^{p53wt} e U251^{p53mut}. E' stato trovato un effetto sinergico sia in termini di inibizione di crescita che di arresto in G2/M, mentre NU1025 non ha mostrato alcun effetto citotossico. I risultati mostrano che TPT causa un aumento dell'attività enzimatica, dovuta soprattutto all'automodificazione di PARP-1, che è stato messo in relazione con la stabilizzazione di p53 che a sua volta ha determinato un'overespressione di p21 nelle D54. Inoltre NU1025 incrementa specificamente il livello nucleare di p21. Viceversa in U251 il trattamento con TPT non ha avuto conseguenze sulla forma mutata inattiva di p53. Tali evidenze sono in linea con una segnalazione ad opera di PARP-1, *via* p53 e p21 del danno al DNA risultante dall'inibizione di Topo I.

In una seconda sezione della ricerca è stata analizzata la relazione tra la poli(ADP-ribosilazione) e la via JAK/STAT di trasduzione del segnale dipendente dall'interferone- α in cellule umane di carcinoma epidermoide, KB. Risultati precedenti hanno mostrato che l'inibizione di crescita da IFN α in KB, era accompagnata da un aumento dell'attività PARP, mentre a tempi più lunghi l'innescò dell'apoptosi era associato alla proteolisi caspasi-dipendente di PARP-1. Inoltre il trattamento combinato con un inibitore di PARP (3-ABA), revertiva l'inibizione di crescita e l'apoptosi causate dall'IFN α .

Alla luce di questi risultati, che suggeriscono che PARP-1 possa essere direttamente coinvolta nell'espressione genica dipendente dall'IFN α (es. STAT-1), la presente ricerca è stata indirizzata alla definizione della poli(ADP-ribosilazione) di STAT-1. Inizialmente è stata valutata l'overespressione, la fosforilazione e la traslocazione nucleare di STAT-1 dipendente da IFN α . I risultati hanno mostrato che STAT-1 piuttosto che subire modificazioni covalenti e non covalenti da parte di PARP-1, è capace di interagire fisicamente con essa, come riportato per altri fattori trascrizionali

SUMMARY

On the light of compelling evidences suggesting a role of the poly(ADP-ribosylation) reaction in several cellular processes like DNA repair and transcription, cell growth and transformation, my research has been focused on the analysis of the action of PARP-1 inhibitors as adjuvant of chemotherapeutic agents (i.e Topo I poisons and interferons) in glioblastoma and carcinoma cells.

In a first section the effects induced by treatment with the Topo I inhibitor, topotecan (TPT) and the PARP-1 inhibitor NU1025 in the D54^{p53wt} and the U251^{p53mut} glioblastoma cell lines was investigated. A synergistic effect has been found both in terms of cell growth inhibition and G2/M arrest, whereas NU1025 didn't show any cytotoxic effect. The results showed that TPT caused an activation of enzymatic activity, mainly due to the auto-modification of PARP-1, that has been related to the stabilization of p53, that in turn determined p21 over-expression in D54 cells. Moreover, NU1025 incremented specifically the p21 nuclear level. On the other hand, in U251 TPT treatment had no consequences on the mutated inactive form of p53. Such evidences are in line with a PARP-1 signalling *via* p53 and p21 of the DNA damage resulting from TPT inhibition of Topo I.

In the second section of the research the relationship between the poly(ADP-ribosylation) and the interferon- α dependent JAK/STAT signal transduction pathway in human epidermoid carcinoma KB cells was analysed. Previous results showed that KB cells growth inhibition by IFN α was accompanied by a rise of PARP-1 activity, whereas at longer times the onset of apoptosis was associated to the caspase dependent proteolysis of PARP-1. Moreover, combined treatment with the PARP-1 inhibitor 3-aminobenzamide (3-ABA), reverted cell growth inhibition and apoptosis caused by IFN α .

On the light of these results suggesting that PARP-1 may be directly involved in the IFN α dependent gene expression (i.e. STAT-1) the present research has been addressed to the definition of STAT-1 poly(ADP-ribosylation). Preliminarily, the IFN α dependent STAT-1 over-expression, phosphorylation and nuclear translocation has been assessed. The results showed that STAT-1 rather than undergo covalent and/or non-covalent modification by PARP, is able to physically interact with the protein as reported for other transcription factors.

INTRODUZIONE GENERALE

La poli(ADP-ribosilazione) è una modifica post-traduzionale di proteine nucleari che gioca un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità genomica, mediante il controllo della riparazione, replicazione e trascrizione del DNA e della scelta del tipo di morte nelle cellule eucariotiche.

Consiste in una reazione reversibile catalizzata dalla poli(ADP-ribosio)polimerasi (PARP) che ha come substrato il β -NAD⁺ e si esplica in più stadi (**figura 1**):

-Idrolisi del legame N-glicosidico tra la nicotinammide ed il ribosio, con rilascio di molecole di adenosina-difosfato-ribosio (ADPR) che sono usate per la sintesi di polimero.

-Formazione di un legame estereo tra la prima unità di ADPR ed uno specifico residuo amminoacidico, 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 delle quali si definisce una reazione detta di eteromodificazione; la PARP stessa subisce inoltre un'estesa reazione di automodificazione.

-Allungamento della catena di ADPR tramite legame 1''-2' α -glicosidico di successivi monomeri.

-Ramificazione del polimero ogni 20-50 unità tramite legami 1'''-2'' α -glicosidici (*Amè J.C. et al., 2000*).

La **figura 1** riporta come la reazione di poli(ADP-ribosilazione) rappresenti la fase anabolica di un processo metabolico più ampio che, ai fini del suo completamento, richiede anche una fase catabolica. Alla rapida sintesi di polimeri di ADPR (pADPR), che si realizza in risposta alla formazione di interruzioni del DNA, fa seguito una loro rapida ed efficiente degradazione ad opera della poli(ADPR)glicoidrolasi (PARG), il principale enzima responsabile del catabolismo del 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 (*Miwa M. et al., 1974*;

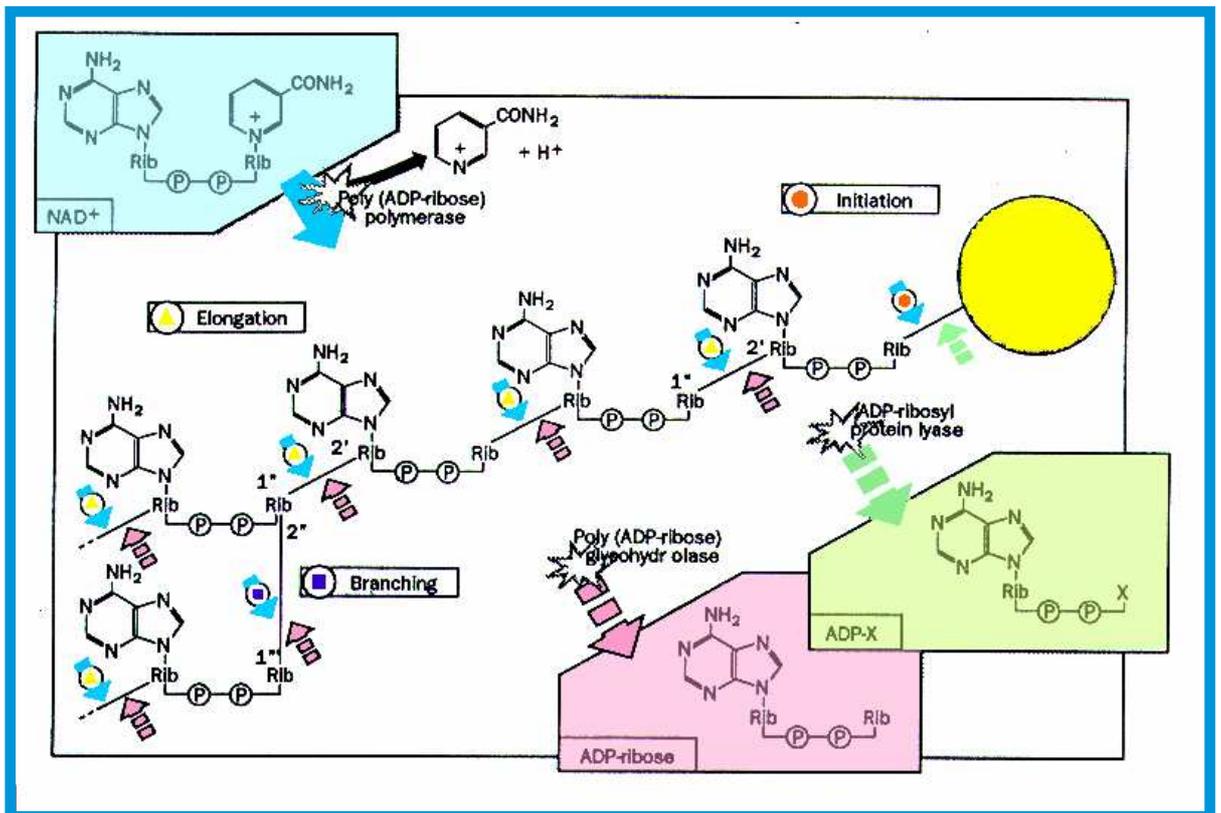


Figura 1.
Metabolismo del poli(ADP-ribosio)

Tanaka M. et al.,1976). In tal modo si riduce rapidamente la lunghezza di polimeri più estesi ed i frammenti più corti, così ottenuti, sono successivamente degradati in maniera lenta e distributiva (*Hatakeyama K. et al.,1986*). L'ultima molecola di ADPR legata alla proteina accettrice viene eliminata ad opera di una ADPribosil-proteina-liasi (*Oka J. et al.,1884*).

Il pADPR è un omopolimero di lunghezza variabile da 2 a più di 200 residui in catena e può presentare un più elevato grado di complessità per la presenza di ramificazioni singole e multiple ogni trenta residui (**figura 2**).

Il ruolo attribuito al polimero si basa sulla modulazione della funzione delle proteine alle quali può essere legato covalentemente e non covalentemente (*Meyer R.G. et al.,2004*). I polimeri di ADPR, infatti, possono associarsi alle proteine, oltre che tramite la formazione di legami covalenti, anche per l'instaurarsi di specifiche interazioni di tipo non covalente. In tale tipo di interazione è coinvolto un dominio, una sequenza legante il pADPR, formato da una successione di residui basici ed idrofobici (*Pleschke J.M. et al.,2000*) (**figura 3**). Inoltre, la PARP è in grado di interagire fisicamente con altre proteine nucleari andando a far parte di complessi multi-enzimatici che rappresentano il macchinario per numerose reazioni nucleari.

Quindi le proteine coinvolte nella reazione di poli(ADP-ribosilazione) possono essere suddivise in proteine accettrici del pADPR, proteine bersaglio del pADPR e proteine partners di PARP (**tabella I**).

Il ruolo della poli(ADP-ribosilazione) è stato studiato caratterizzando il principale enzima responsabile di tale reazione: la PARP-1, una proteina nucleare di 116 kDa, ubiquitaria, ritrovata in tutti gli eucarioti, con una organizzazione modulare in cui si possono evidenziare tre diversi domini funzionali (*Rolli V. et al.,2000*) (**figura 4**):

-un dominio ammino-terminale, contenente il sito di legame al DNA (DBD), caratterizzato da due domini a dita di zinco ed uno elica-giro-elica (*Mazen et al.,1989*), ed una sequenza di localizzazione nucleare (NLS);

-un dominio centrale di automodificazione che funziona come sito accettore primario di pADPR e presenta un modulo BRCT, responsabile delle interazioni proteina-proteina (*Bork P. et al.,1997; Nazak T. et al.,1994*);

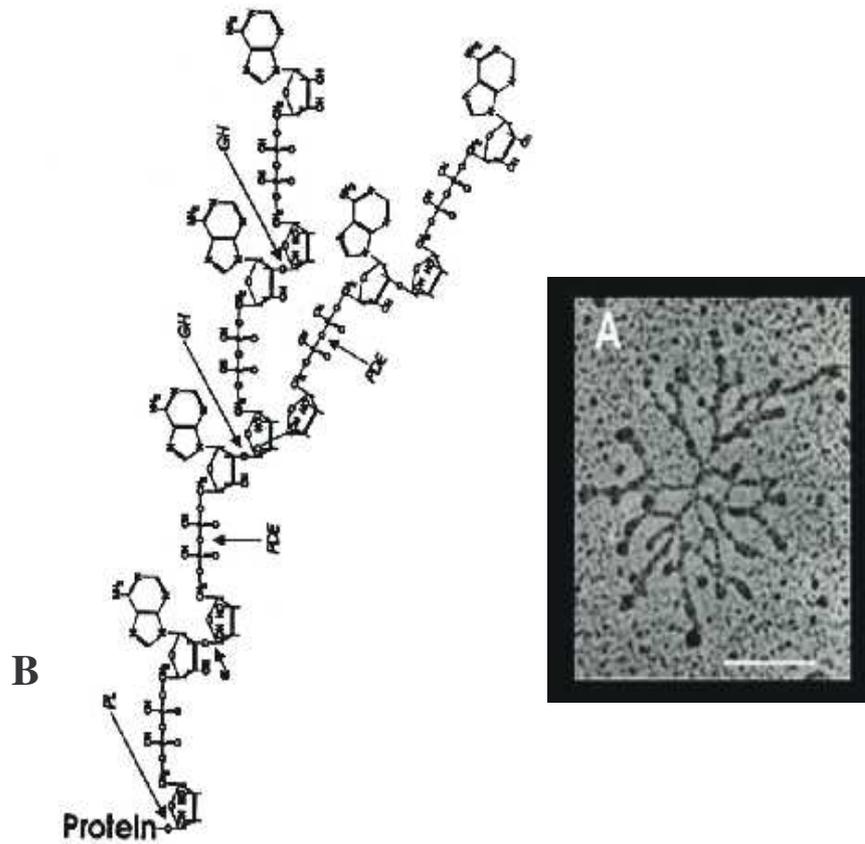


Figura 2.
Struttura chimica del poli(ADP-ribosio) (**B**)
e risoluzione mediante microscopia elettronica (20000X) (**A**)

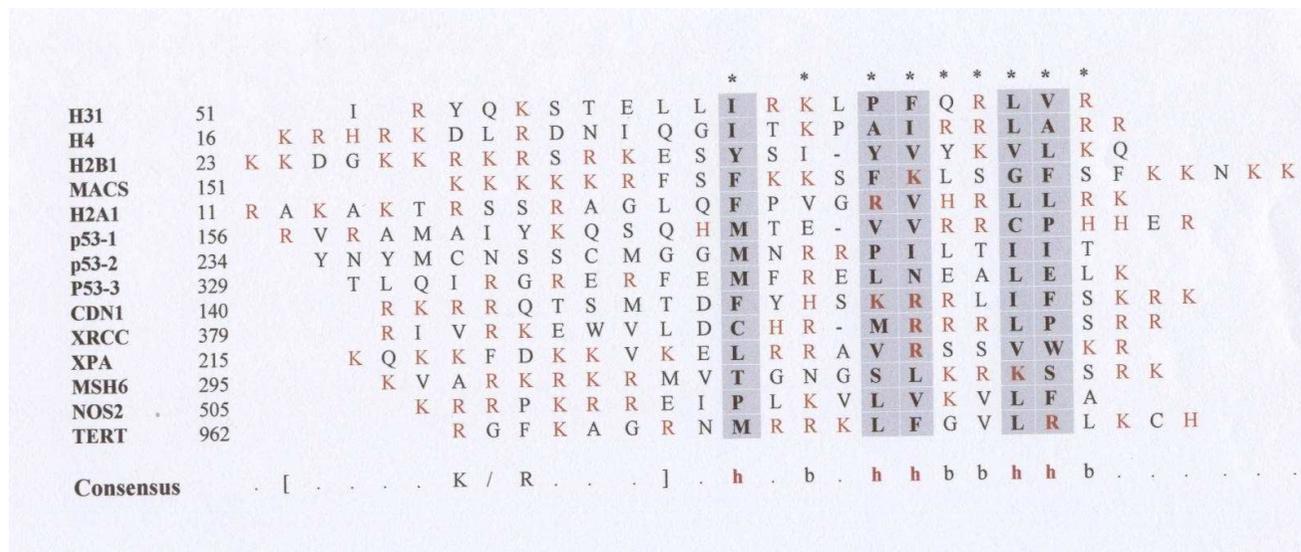


Figura 3.
 Allineamento delle sequenze di legame al pADPR
 h: amminoacidi idrofobici
 b: amminoacidi basici

PROTEINE ACCETTRICI DI pADPR

Poli-ADPRpolimerasi

Istone H1
Istone H2b
HMG
Lamine

DNA Polimerasi α
DNA Topoisomerasi I e II
DNA PK
Yin Yang

PROTEINE BERSAGLIO DI pADPR

Istone H1
Istone H2b
Lamine A-B-C

p53
p21
DNA Topoisomerasi I

PROTEINE PARTNERS DI PARP-1

DNA Topoisomerasi I
DNA Ligasi III
XRCC-1
NF-kB
Oct-1
DNA Polimerasi β

Tabella I.

Proteine nucleari coinvolte nella reazione di poli(ADP-ribosilazione)

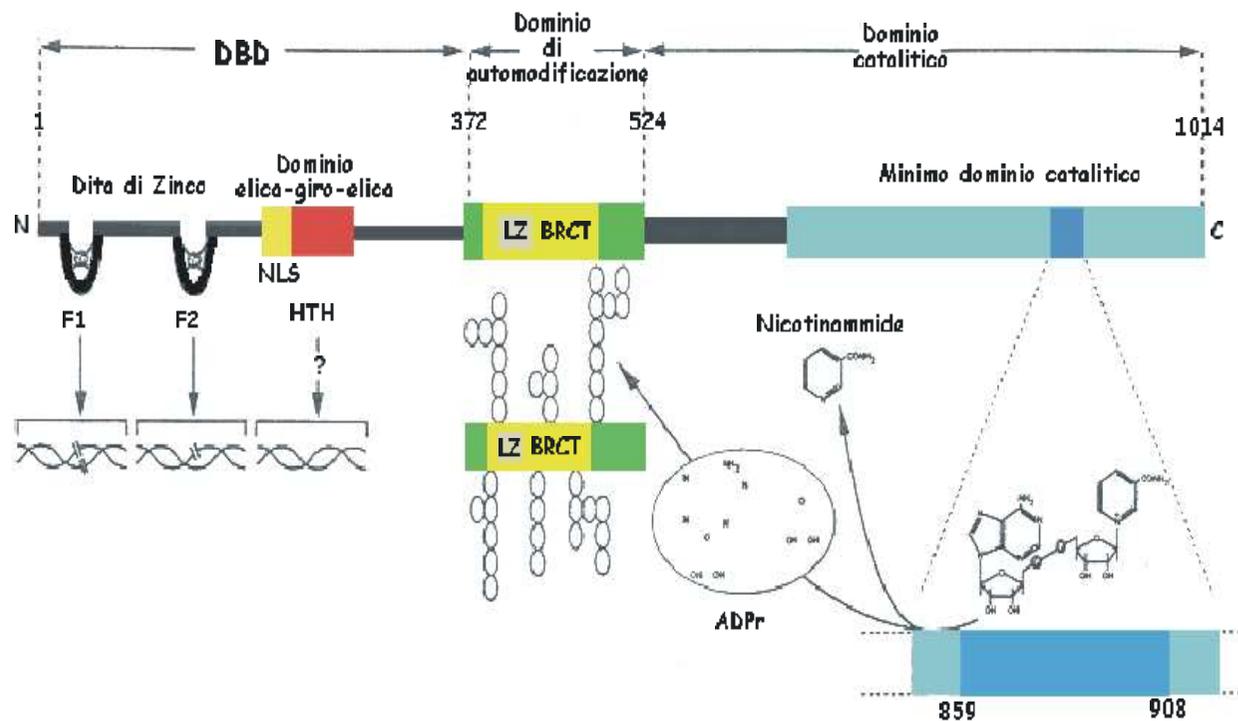


Figura 4.
 Struttura molecolare della PARP-1
 DBD (DNA Binding Domain)
 NLS (Nuclear Location Signal)
 HTH (Helix Turn Helix)
 LZ (Leucine Zipper)
 BRCT (Breast Cancer C-Terminus)

-un dominio carbossi-terminale, che lega il substrato ed è responsabile dell'attività catalitica dell'enzima.

Oggi sono conosciuti diversi geni che codificano per proteine con attività poli(ADPR)polimerasica. Si parla di una famiglia di PARPs le cui componenti presentano localizzazione, struttura e funzioni diverse (**figura 5**).

La PARP-2 è la meglio caratterizzata e presenta la più alta percentuale di identità con la PARP-1 (circa il 60%); è una proteina di 62 kDa a localizzazione nucleare, in grado di legare il DNA danneggiato che ne determina, tra l'altro, l'attivazione (*Amè J.C. et al.,1999*). Analisi effettuate sulla struttura primaria della proteina hanno evidenziato l'assenza del dominio di automodificazione, la presenza di un segnale di localizzazione nucleare ed un DBD con caratteristiche differenti ad indicazione di una diversa specificità di substrato.

La maggior parte degli studi convergono a definire un modello che prevede per PARP-1 e -2 un ruolo di segnalatore del DNA danneggiato ed il sistema PARP/PARG come meccanismo di trasduzione di tale segnale (*Malanga M. & Althaus F.,2004*) (**figura 6**). Il modello prevede che PARP abbia un'alta affinità di legame per il DNA danneggiato e agisca, quindi, come "sensore del danno", il legame all'acido nucleico porta all'attivazione dell'enzima con la produzione di polimeri di ADPR lunghi e ramificati. La fase effettrice della segnalazione consiste nel reclutamento selettivo di proteine ADPRibosilate nelle vicinanze dell'interruzione sul DNA. Queste proteine possono partecipare direttamente al riparo del DNA o coordinarlo mediante stimolazione della riparazione del DNA, alterazione del ciclo cellulare, ed innesco di sistemi di sopravvivenza o di morte cellulare. La relativa affinità e disponibilità delle proteine ADPRibosilate, associato all'estensione del danno al DNA, può determinare il tipo di risposta e l'esito della segnalazione.

Infine la terminazione del segnale avviene attraverso la degradazione del pADPR ad opera della PARG.

The PARP protein family

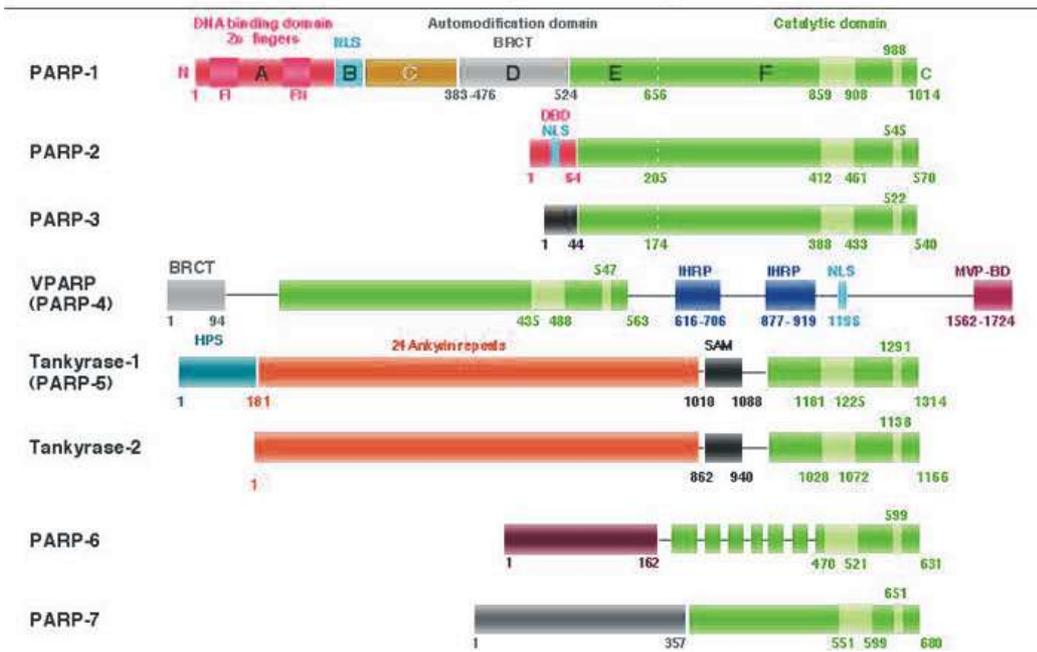


Figura 5.

Rappresentazione schematica della struttura molecolare dei domini degli enzimi appartenenti alla famiglia delle PARP.

DBD (DNA Binding Domain)

BRCT (Breast Cancer C-Terminus)

IHRP (Homologous to Inter-Alpha-Inibitor Family)

NLS (Nuclear Location Signal)

SAM (Sterile Alpha Module)

HPS (Region Containing Homopolymeric Runs of His, Ser, Pro)

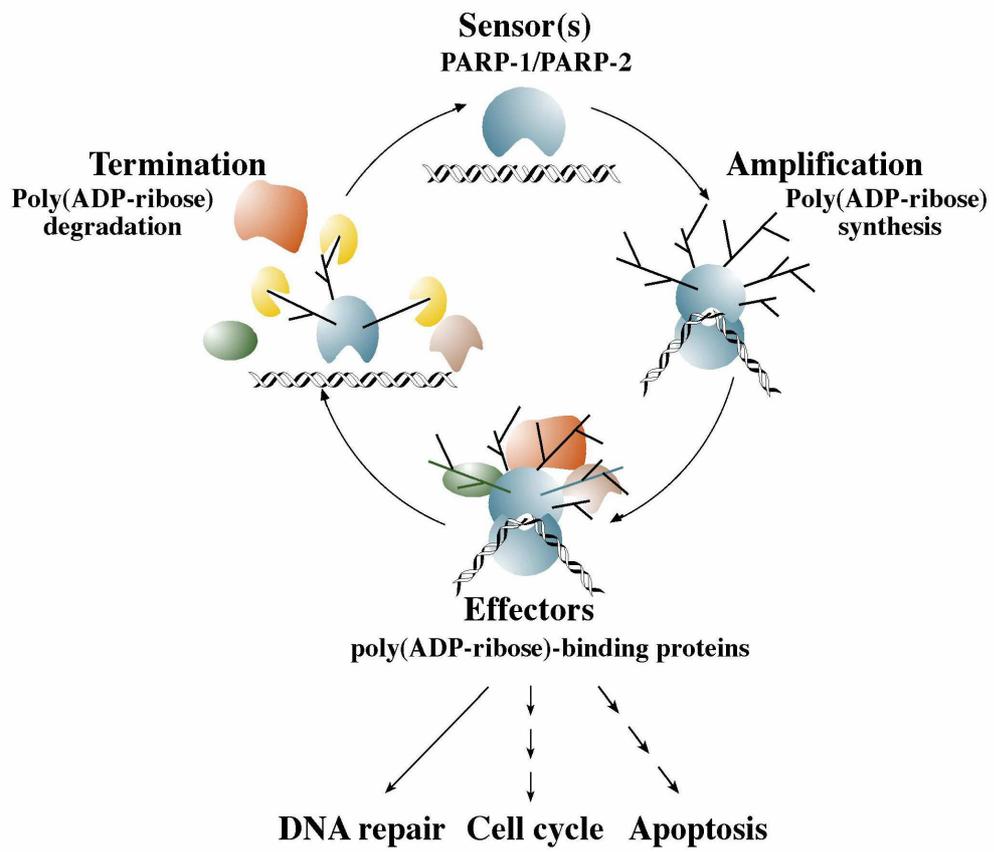


Figura 6.
 Meccanismo di segnalazione del danno al DNA ad opera di PARP-1 e -2

Oltre che nella sopravvivenza e riparazione del DNA, PARP-1 è risultata coinvolta anche nella regolazione della trascrizione (*Lee Kraus W. & Lis J.T.,2003*). Essa infatti è in grado di modulare sia mediante interazione proteina-proteina che pADPR-proteina diversi fattori di trascrizione. Nella **figura 7** è mostrato un modello che sintetizza i risultati raccolti in questo ambito. La PARP-1 è risultata in grado di interagire direttamente con sequenze promotrici (a), andare a far parte di complessi di inizio della trascrizione (b), riconoscere particolari conformazioni del DNA (Loops, DNA cruciforme) (c), oltre che modificare gli istoni e determinare il rilassamento del DNA, trasformando la cromatina in una struttura trascrizionalmente attiva (d). Anche i polimeri di ADPR sono capaci di interagire con componenti dell'apparato trascrizionale compresi fattori di trascrizione (SP1, p53 e CREB, Ying e Yang, Oct-1) (*Oei S.L. et al.,1998*) e proteine ad alta mobilità elettroforetica (HMG). In alcuni casi il pADPR regola l'attività trascrizionale anche agevolando il corretto assemblaggio del complesso di inizio. Viceversa una iperattivazione dell'enzima può provocare un disassemblaggio di tali complessi a causa delle repulsioni elettrostatiche tra DNA e pADPR e quindi reprimere la trascrizione.

PARP-1 svolge un importante ruolo anche nella morte cellulare mediando la scelta tra la necrosi e l'apoptosi.

In **figura 8** è riportato un modello che rende conto delle attuali conoscenze sul ruolo delle PARPs nella sopravvivenza e nella morte cellulare in seguito a danno al DNA. Il comportamento delle PARPs in questi processi sembra dipendere dal numero di interruzioni sul filamento di DNA. In presenza di basse quantità di danno al DNA, la PARP può agire come una molecola promotrice della sopravvivenza come precedentemente illustrato.

Viceversa in seguito ad un danno eccessivo al DNA, l'iperattivazione della PARP induce la morte cellulare per necrosi, che può essere mediata dalla deplezione della scorta di NAD^+ e di ATP (*Leist M. et al.,1997*). L'apoptosi, invece, è indotta da diversi segnali, compresa la stimolazione dei recettori della morte, il danno al DNA, la carenza di fattori di crescita, ed è

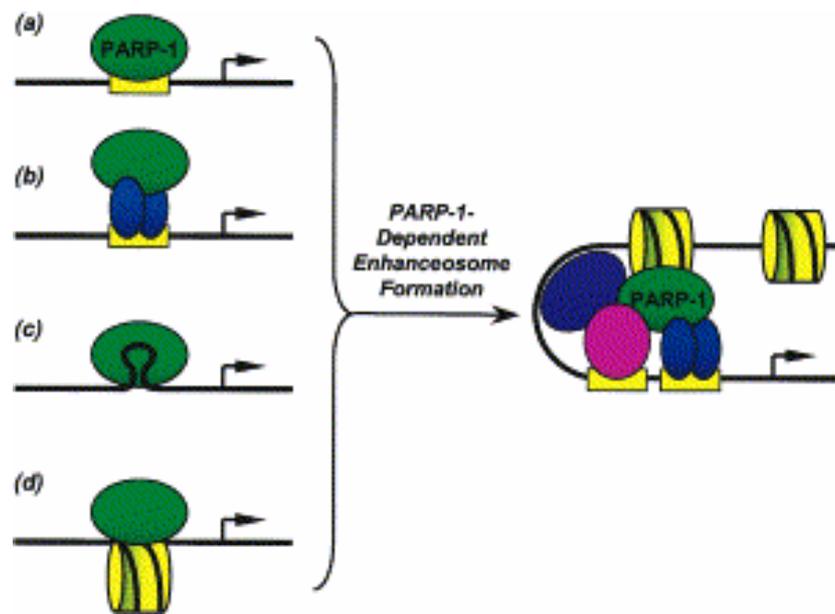


Figura 7.
Meccanismo di controllo della trascrizione ad opera di PARP

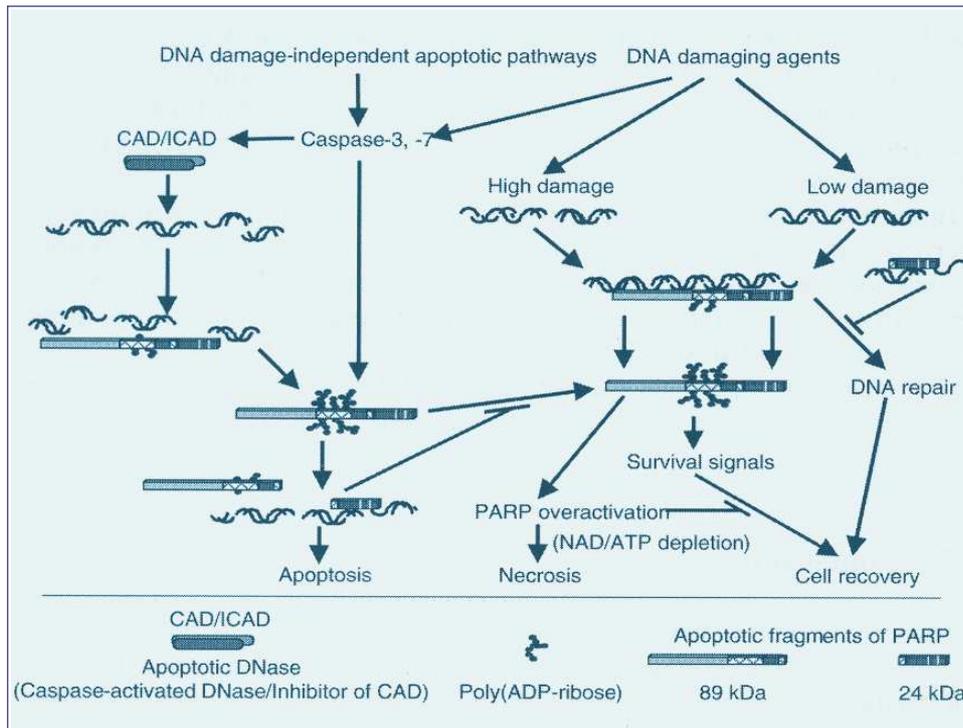


Figura 8.
Ruolo di PARP nella scelta del destino cellulare

garantita dall'azione di proteasi specifiche (caspasi) che operano la degradazione di molti substrati, tra cui la PARP, coinvolti nell'omeostasi cellulare.

Tuttavia questo tipo di morte cellulare e di protezione dall'infiammazione è considerato funzionale solo in presenza di moderati livelli di danno, perché le cinetiche di diminuzione del NAD e dell'ATP sono molto più veloci della cinetica di frammentazione della PARP in presenza di elevati livelli di danno al DNA.

La proteolisi apoptotica della PARP genera due frammenti, uno di 89 kDa e l'altro, di 24 kDa, corrispondente al DBD (*Germain M. et al.,1999*). Tale rottura inattiva la PARP, poiché è stato dimostrato che l'enzima per poter funzionare richiede il dominio legante il DNA.

La sua frammentazione serve a sopprimere una futile iperattivazione dell'enzima che, in seguito al depauperamento delle energie della cellula, forzerebbe verso la morte cellulare per necrosi (*Leist M. et al.,1997*).

E' stato anche osservato che il frammento apoptotico di 24 kDa può legarsi irreversibilmente ai tagli sul DNA ed inibire, competitivamente, il legame delle molecole non frammentate di PARP e quindi il suo intervento nel processo di riparazione al DNA (*Simbulan-Rosenthal C.M. et al.,1998*).

Infine, è stato recentemente riportato, che anche la PARG è bersaglio della caspasi-3, a riprova che un accurato controllo del sistema di poli(ADP-ribosilazione) è indispensabile per l'esecuzione della morte cellulare programmata e per l'eliminazione di cellule irrevocabilmente danneggiate (*Affar E.B. et al.,2000*).

L'intervento del sistema di poli(ADP-ribosilazione) in processi cellulari vitali, suggerisce la possibilità che un alterato funzionamento di tale sistema sia alla base di condizioni patologiche quali la trasformazione neoplastica.

Le prime indicazioni sulla possibile implicazione di questo sistema nella tumorigenesi furono fornite dall'uso di inibitori della PARP. Un'analisi sistematica di inibitori della PARP fu condotta da Sims e coll. (1982) i quali

trovarono che i più potenti inibitori competitivi della PARP erano 3-amminobenzammide (3-ABA) e 3-metossibenzammide (3-MB). Successivi esperimenti hanno dimostrato che anche i derivati del chinazolinone presentano un'attività inibitoria di PARP, e sono indicati come "i nuovi inibitori della PARP". Ne sono un esempio l'NU1025 (8-idrossi-2-metilchinazolinone-4-(3H)-I), e l'NU1057 (8-idrossi-2-(4'nitrofenil)chinazolinone-4-(3H)-I), che aumentano la tossicità di agenti DNA-metilanti, e radiazioni ionizzanti, inibendo la riparazione del DNA (Curtin N.J. et al.,2004).

Poichè è stato dimostrato che l'inibizione della PARP-1 impedisce la riparazione del DNA lesionato, sembra possibile indurre un incremento della morte preferenziale di cellule cancerogene, rispetto a quelle normali, in seguito all'azione combinata degli inibitori della poli(ADP-ribosilazione) e di agenti antineoplastici. Le cellule cancerogene, infatti, durante la loro rapida proliferazione risultano più sensibili all'azione di agenti genotossici in grado di interferire con la sintesi del DNA, rispetto alle quiescenti. Per tale ragione, gli inibitori della PARP-1 potrebbero svolgere una attività coadiuvante antitumorale in combinazione con altri agenti antineoplastici correntemente utilizzati

SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA

Il mio lavoro di ricerca è stato indirizzato alla verifica del ruolo di PARP nella segnalazione del DNA danneggiato e nella regolazione della trascrizione in cellule neoplastiche.

A tal fine sono state prese in esame due tipi di cellule neoplastiche umane, glioblastoma (U251 e D54) e carcinoma oro-faringeo (KB) ed inibitori di PARP di nuova e vecchia generazione sono stati utilizzati in combinazione con agenti chemioterapici quali IFN α e TPT.

In particolare la ricerca ha riguardato:

- Il ruolo di PARP come segnalatore del danno al DNA derivante dall'inibizione della Topoisomerasi I in cellule di glioblastoma umano D54^{p53wt} e U251^{p53mut}
- L'intervento di PARP nella trasduzione del segnale indotto da IFN α in cellule del carcinoma orofaringeo, KB

Le analisi eseguite hanno preso in esame:

- la vitalità cellulare in seguito a trattamenti singoli e combinati
- le variazioni del ciclo cellulare
- le principali caratteristiche della reazione di poli(ADP-ribosilazione), quali l'attività PARP, i livelli di pADPR e l'identificazione dei suoi accettori
- la modulazione di proteine a diverso ruolo implicate nella reazione di poli(ADP-ribosilazione)

In relazione al differente *status* di p53 delle cellule di glioblastoma è stato analizzato il coinvolgimento di tale sistema in risposta ai trattamenti, analizzando in particolar modo le variazioni di attività trascrizionale di p53, misurata come variazione dei livelli di espressione di p21 e localizzazione endocellulare.

In considerazione delle conoscenze sulla trasduzione del segnale IFN dipendente, in cellule KB, è stata analizzata l'espressione di STAT-1, la sua fosforilazione e traslocazione nel nucleo, nonché la sua relazione con PARP-1.

SEZIONE I

Ruolo di PARP come segnalatore del danno al DNA derivante
dall'inibizione della DNA Topoisomerasi I in cellule di glioblastoma umano
D54^{p53wt} e U251^{p53mut}

INTRODUZIONE

I gliomi sono un gruppo eterogeneo di tumori cerebrali primitivi che rappresentano il 60% delle neoplasie del sistema nervoso centrale. Le problematiche del trattamento di questo tumore sono legate alla necessità di una chirurgia sofisticata e di alta precisione e ad una bassa disponibilità di farmaci in grado di superare la barriera ematoencefalica.

Mutazioni del gene p53 sono una delle più comuni alterazioni dei gliomi e poichè la funzione di p53 è modulata da geni che in maniera specifica ne controllano l'effetto di soppressore tumorale (es. Topo I e PARP-1), la conoscenza della relazione tra p53 e i geni correlati sarà utile per il disegno di nuove strategie chemioterapiche.

La Topo I appartiene ad un'ampia famiglia di enzimi, le DNA topoisomerasi, che risolvono fenomeni di superavvolgimento, supertorsione e superelicità del DNA, derivanti da processi quali replicazione e trascrizione.

Si tratta di proteine monomeriche di 120 kDa di peso molecolare, molto diffuse sia nei procarioti che negli eucarioti.

Esse agiscono mediante un'interruzione transitoria del singolo filamento di DNA per permettere il passaggio del filamento integro attraverso l'interruzione, in modo che vengano ridotte le tensioni topologiche. In seguito alla reazione di taglio, da parte di Topo I sul DNA, si genera negli eucarioti il gruppo 3'-P libero, che successivamente si andrà a legare alla stessa Topo I, tramite un legame diestere con la pTyr, per poi procedere con l'attività di ricongiungimento.

L'intermedio covalente tra Topo I ed il 3'-P del singolo filamento tagliato, prende il nome di "cleavable complex" (*Freeney G.P. et al., 2003*). Questo intermedio permette la libera rotazione della molecola di DNA intorno al filamento intatto. Alla fine della rotazione, l'interruzione del filamento viene

saldata dalla stessa Topo I che, successivamente, si allontana lasciando una doppia elica rilassata.

La determinazione della struttura cristallografica indica che la Topo I umana è costituita da quattro maggiori regioni (**figura 9**):

-La regione N-terminale (a.a. 1-215) è costituita da alcuni amminoacidi idrofobici. Contiene quattro sequenze di localizzazione nucleare (NLS) ed un dominio di legame per i fattori di splicing (SF2/ASF), non è indispensabile per l'attività catalitica (*Gupta M. et al.,1995*).

-Il dominio centrale (a.a. 216-635) diviso in 3 subdomini I, II, III è altamente conservato e necessario per il legame al DNA (*Gupta et al.,1995*). I subdomini I e III si legano al DNA immediatamente prima del sito di taglio formando una morsa chiusa intorno alla doppia elica di DNA (modello "C-CLAMP") (*Pommier Y. et al.,1999*).

-Il dominio globulare "linker" (a.a. 636-697) è poco conservato e non è obbligatorio per l'attività catalitica. Nella struttura cristallografica questo segmento è presente in una forma non covalentemente legata con il DNA (*Stewart L. et al.,1998*), assume una configurazione "coiled-coil" e protrude dal resto dell'enzima. E' carico positivamente e prende contatto con il DNA immediatamente dopo il sito di taglio. Per tale regione è stato proposto un importante ruolo nel controllo della rotazione del filamento di DNA non tagliato durante il suo rilassamento (*Champoux J.J. et al.,1998; Stewart L. et al.,1998*).

-Il dominio globulare C-terminale (a.a. 698-765), è altamente conservato e contiene il sito attivo con la Tyr-723 nelle cui vicinanze si trovano residui coinvolti nella resistenza agli inibitori. Questi residui (in particolare Asn 722) sono probabilmente critici per il legame delle camptotecine (inibitori di tale classe di enzimi) al "cleavable complex" che porta alla formazione di quello che viene detto "abortive complex". Ciò sarebbe in accordo con il modello proposto in cui le camptotecine si pongono all'interfaccia TopoI/DNA legandosi con le coppie di basi fiancheggianti il sito di taglio (*Fan Y. et al.,1998*). Inoltre, in tale regione, è anche presente il sito di legame per l'ATP, necessario per l'attività chinasi della Topo I (*Larsen et al.,1999*).

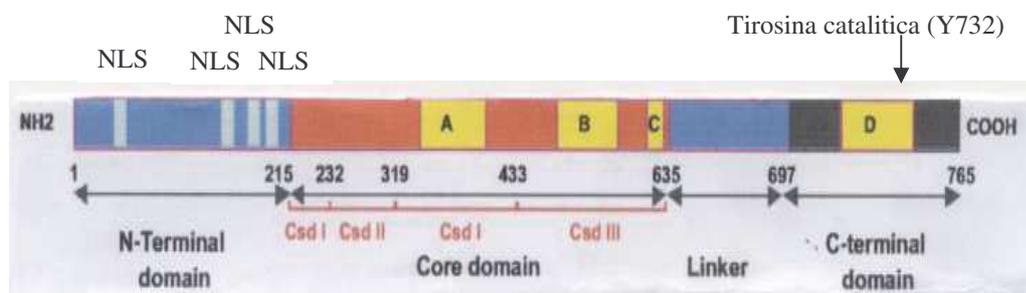


Figura 9.
Struttura primaria di Topo I

Due derivati delle camptotecine sono stati recentemente approvati come agenti chemioterapici dalla F.D.A. il Topotecano (TPT), e l'Irinotecano. Questi agenti antineoplastici (**figura 10**) agiscono prevenendo la fase di ricongiungimento legandosi in maniera non covalente al "cleavable complex" e convertendo la Topo I in un vero e proprio "veleno cellulare" la cui citotossicità deriva dall'accumulo di una serie di interruzioni a singolo filamento nel DNA che, ostacolando le fisiologiche attività di replicazione e trascrizione, possono portare la cellula a morte mediante formazione di interruzioni al doppio filamento di DNA, che si generano quando i complessi di trascrizione e duplicazione del DNA incontrano gli "abortive complex" (Nitis J.L. & Beck W.T., 1996).

Alte concentrazioni (μM) di TPT, in vivo, risultano citotossiche entro le 48 ore, inducendo frammentazione del DNA e formazione dell' "abortive complex" DNA/Topo I, ma senza provocare maggiori cambiamenti del ciclo cellulare.

Il TPT risulta essere un composto specifico per la fase S ed ha mostrato una notevole efficacia soprattutto nei confronti dei glioblastomi umani ma la percentuale di risposte cliniche è ancora molto bassa.

Molte linee cellulari umane sono resistenti alle camptotecine perchè esistono vie biochimiche che sono in grado di tollerare e/o riparare "l'abortive complex " indotto da tali farmaci.

E' quindi molto probabile che la selettività e l'efficienza delle camptotecine come agenti anticancro dipenda dalla deficienza, nelle cellule tumorali, dei meccanismi di riparo, della regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, mentre le cellule normali si adattano più efficacemente ai danni indotti da Topo I.

In tal senso è sempre più crescente l'interesse nello studio della modulazione della reazione di poli(ADP-ribosilazione) che, come detto è coinvolta in molti di questi meccanismi di riparo.

Recenti risultati pongono le basi molecolari dell'effetto adiuvante degli inibitori della PARP con quelli della Topo I.

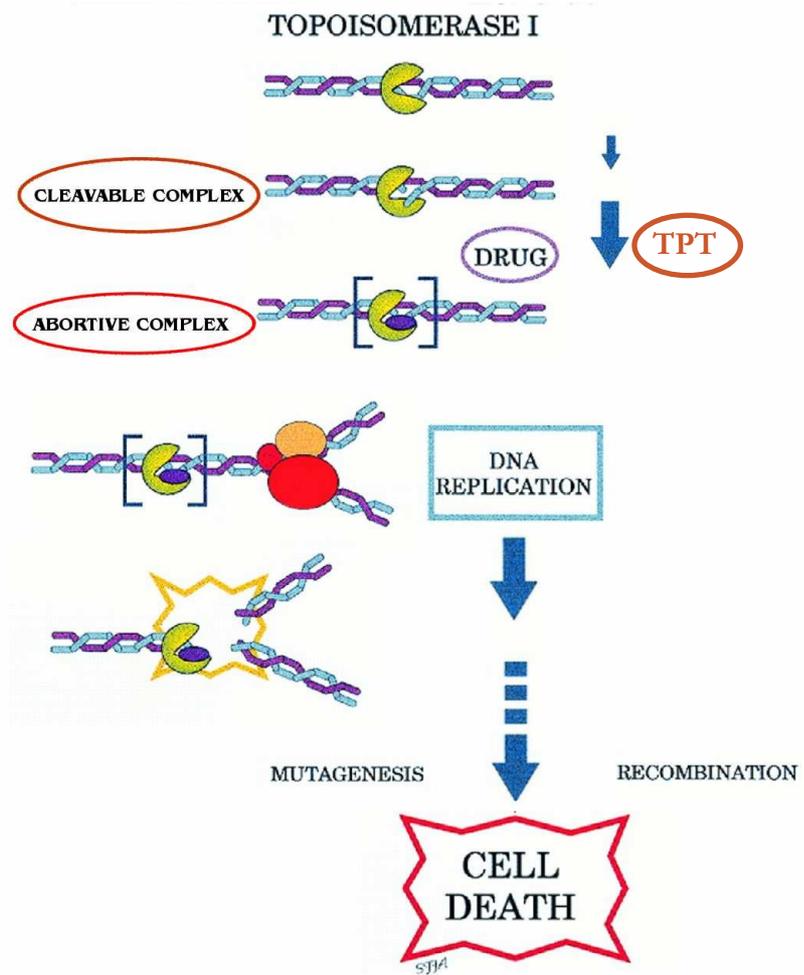


Figura 10.
Intervento del TPT nel meccanismo d'azione della Topo I

E' stato dimostrato che PARP-1 e -2 possono rimuovere la Topo I covalentemente legata al DNA. Tali enzimi riconoscono il taglio operato da Topo I come un danno al DNA. Essi in forma automodificata bloccano la formazione del "cleaveable complex" o attraverso l'inibizione del taglio o attraverso lo spostamento dell'equilibrio taglio/rilegatura a favore di quest'ultima (*Malanga M. & Althaus F.R.,2003*).

Studi cinetici sulla reazione ligasica in presenza di pADPR indicano che tale attività di Topo I è accelerata e la vita del complesso è più breve. Tale effetto è stato osservato anche in seguito a trattamento con camptotecine, indicando che la poli(ADP-ribosilazione) è capace di superare l'effetto tossico del farmaco.

In Topo I sono state definite 3 sequenze coinvolte nell'interazione con il pADPR: 2 nel core centrale (261-280, 532-550), che contribuisce alla formazione del sito catalitico, ed una nel dominio linker (569-688). Inoltre il sito di legame al pADPR in tale dominio, sembra essere il più facilmente raggiungibile quando Topo I è in complesso. Quindi si può ipotizzare che, il pADPR, può avere effetto principalmente su questo sito inducendo variazioni conformazionali che destabilizzano la tasca di legame del TPT e riposizionano il DNA lesionato in modo che possa avvenire la reazione di ricongiungimento.

La sensibilità dei tumori ai trattamenti chemioterapici spesso dipende anche dallo *status* di p53; è noto infatti che il 50% dei tumori umani presenta p53 mutata (*Hollstein M. et al.,1991; Hainaut P. et al.,2000*). p53 è uno dei più importanti soppressori di tumori, regola la crescita cellulare e protegge le cellule dalla trasformazione maligna.

Normalmente p53 è presente nelle cellule a bassi livelli, sia perchè ha una emivita breve sia perchè è presente in forma latente. In seguito però a diversi stimoli, quali il danno al DNA e l'attivazione di oncogeni, si osserva un accumulo di p53 nel nucleo dove è attiva come fattore di trascrizione. L'attivazione di p53 può essere modulata a 3 livelli:

-un aumento della concentrazione della proteina p53 attraverso un aumento della traduzione o dell'emivita;

-la trasformazione della proteina p53 da una forma latente a una conformazione attiva;

-la traslocazione della proteina p53 dal citoplasma al nucleo.

E' stato dimostrato che p53 è citoplasmatica nella maggior parte delle cellule normali (*Rotter V. et al.,1983; Dippold W.G. et al.,1981*). In cellule trasformate o in attiva proliferazione tuttavia p53 è principalmente localizzata nel nucleo.

p53 è un attivatore trascrizionale sequenza-specifico ed il suo sito consenso di legame al DNA è definito da due copie del motivo di 10 bp: 5'-pu pu C (A/T) (A/T) G PY PY PY -3' separate da circa 0-13 bp.

Si tratta di una proteina di 393 a.a., che contiene diverse regioni (**figura 11**):

-TA: regione di transattivazione (1-42 a.a.), lega componenti trascrizionali per favorire la trascrizione di geni a valle;

-DBD: dominio di legame al DNA, regione centrale, residui 102-292;

-NLS: segnale di localizzazione nucleare; segnale di importo di p53 dal citoplasma al nucleo;

-TET: regione di tetramerizzazione che, favorisce la forma funzionale di p53 costituita da due dimeri;

-REG: "DNA Mediated Negative Regulation of Specific DNA Binding";

p53 gioca un importante ruolo nella trasduzione di segnali indotti da molti tipi di stress cellulari, regolando l'espressione di prodotti genici che possono portare all'arresto del ciclo cellulare, impedendo la replicazione del DNA prima che il danno sia riparato, o causare la morte cellulare per apoptosi (*Lane D. et al.,1998*) (**figura 12**).

In seguito a danno al DNA p53 aumenta la sua espressione, tetramerizza quindi viene attivata e induce la trascrizione di geni quali p21 che inibendo il complesso CDK/ciclina porta ad un arresto del ciclo cellulare essenziale perchè il DNA possa essere riparato prima che la cellula duplichi. Se il danno viene riparato p53 induce la trascrizione di mdm2 che agisce su p53

5'-Pu Pu Pu C (A/T) (A/T) G Py Py Py -3'

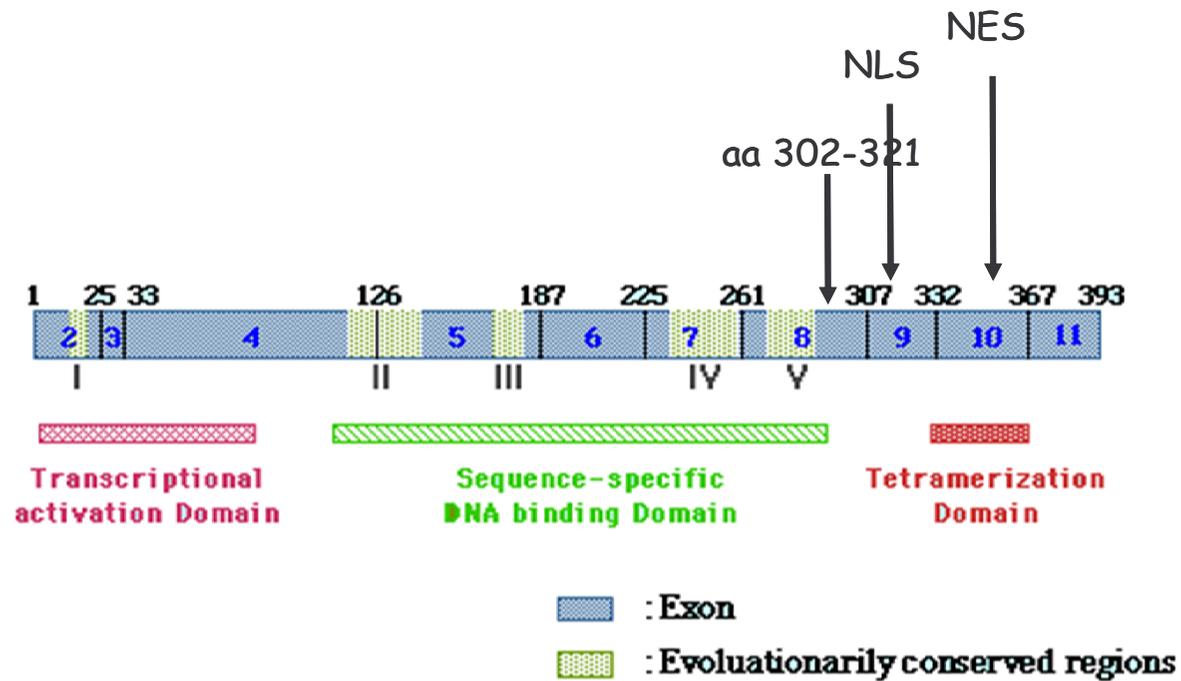


Figura 11.

Sito consenso di legame al DNA e struttura primaria di p53

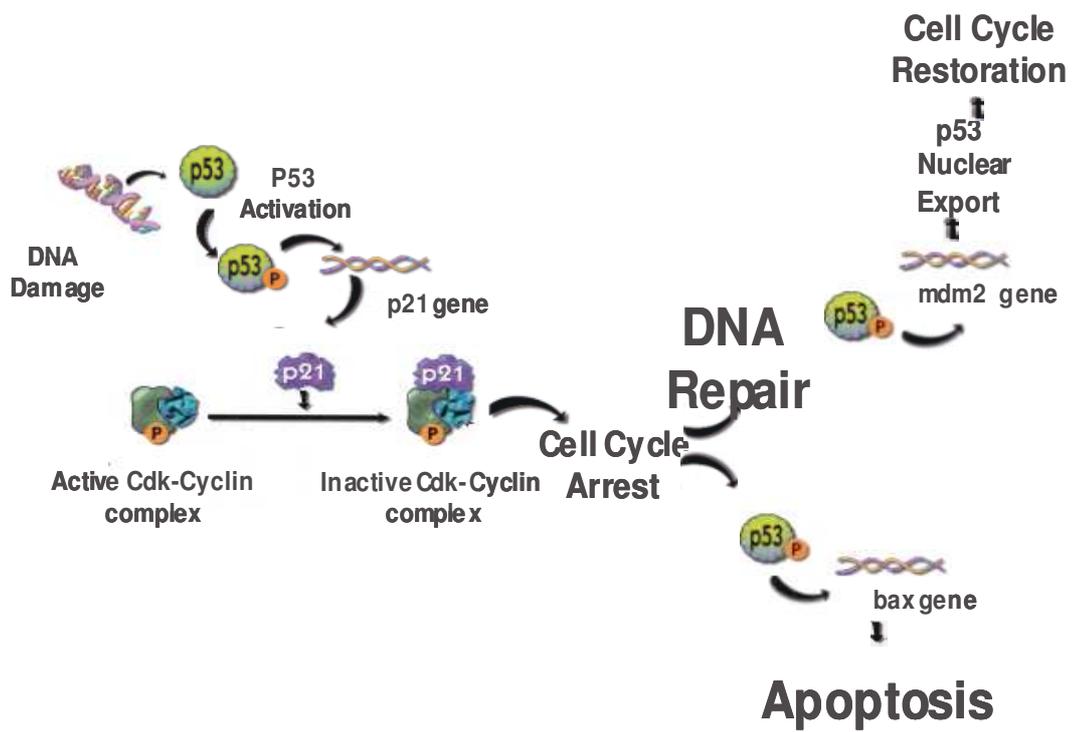


Figura 12.
Ruolo di p53

traslocandola nel citoplasma, dove viene degradata, ripristinando il ciclo cellulare. Se il danno non è riparabile p53 può attivare la trascrizione di geni di morte apoptotica come BAX e IGF-BP3.

In seguito a stress genotossico p53 può essere attivata mediante

- Fosforilazione
- Acetilazione
- poli(ADP-ribosilazione)

Almeno 18 siti della p53 umana sono modificati post-traduzionalmente. In particolare, l'N-terminale subisce soprattutto molte fosforilazioni, mentre il C-terminale presenta siti di fosforilazione, acetilazione e sumoilazione. p53 funziona solo fosforilata, esiste una forma fosforilata costitutiva ed una indotta da stress, perchè la fosforilazione aumenta in seguito a danno al DNA. Anche l'acetilazione di p53 è un meccanismo chiave nella sua funzionalità; avviene al C-terminale a carico di residui di Lys 373 e 382, ad opera del fattore p300/CBP, e di Lys 320 ad opera di altri fattori. Le acetilasi legano la proteina p53 e agiscono come coattivatori per la trascrizione (*Grossman S.R.,2001*).

Inoltre in p53 sono state trovate tre sequenze di legame per il pADPR, due nel dominio DBD alle estremità (153-178, 231-253), ed una nel dominio di oligomerizzazione (326-348) (*Malanga M. et al.,1998*). E' stato dimostrato che il pADPR può impedire la transattivazione di p53, e può anche bloccare la trascrizione p53 dipendente, revertendo il legame al sito consenso. Inoltre anche la presenza su p53 di un sito di legame del polimero vicino al sito di proteolisi, suggerisce che il pADPR possa proteggere p53 stabilizzandola nel nucleo (*Mandir A.S. et al.,2002*).

Quindi, p53 può differenzialmente rispondere alla poli(ADP-ribosilazione) indotta dal danno al DNA: in condizioni di poco danno al DNA, una piccola quantità di polimero legato a PARP-1 o PARP-2 può favorire l'attività trascrizionale di p53. Al contrario, una grande quantità di pADPR, associato ad un eccessivo danno al DNA e massimo consumo di NAD⁺, può inibire l'attività di p53 e contribuire a dirigere le cellule verso l'apoptosi (*Yu S.W. et al.,2002*) o la necrosi (*Berger N.A.,1985*).

In conclusione la poli(ADP-ribosilazione) può operare con un duplice meccanismo che attiva una via p53 dipendente e indipendente per garantire riparo o eliminazione di cellule con genoma compromesso.

E' stato osservato che p53 interagisce direttamente con Topo I in vitro ed in cellule di carcinoma trattate con agenti genotossici (Gobert C. et al.,1999). L'interazione molecolare porta all'attivazione di Topo I sia in termini di rilassamento del DNA superavvolto, sia in termini di fosforilazione (Gobert C. et al.,1996; Larsen A.K. & Skladanowski A.,1998). In vivo l'interazione p53^{wt}/Topo I è strettamente regolata, mentre p53^{mut} è associata costitutivamente a Topo I (Gobert C. et al.,1999) e questo è importante perchè alcuni tumori contengono elevati livelli di p53^{mut}. Quindi una non regolata continua attivazione di Topo I è probabilmente in grado di aumentare i livelli dell'instabilità genetica considerando la potente attività ricombinogena della stessa (Cheng C. et al.,1998; Zhu J. et al.,1996).

Infatti il complesso DNA-Topo I con il 3' di un filamento di DNA, in condizioni normali, si unisce con il 5' dello stesso filamento nella fase finale della reazione. Alternativamente, il ricongiungimento può avvenire con il 5'OH di una molecola eterogenea di DNA risultando in un DNA ricombinante (Anderson R.D. et al.,1994).

La capacità di p53^{mut} di associarsi ad altre proteine nucleari, porta sia ad un'attivazione costante di alcune proteine, tra cui Topo I, sia all'inibizione costitutiva di altre. Questo potrebbe essere il fattore cruciale che porta a selezionare le cellule tumorali con p53 mutata (Gobert C. et al.,1999).

Alla luce di quanto riportato, questa filone del mio lavoro di ricerca ha valutato gli effetti di un inibitore di Topo I, il TPT, su due linee cellulari di glioblastoma umano, le D54^{p53wt} e le U251^{p53mut} (mutazione nel codone 273 CGA→CAT) in combinazione con un inibitore di PARP NU1025.

La mutazione di p53 presente nelle U251 porta al cambiamento di un solo amminoacido Arg→His nel dominio di legame al DNA e porta ad una proteina trascrizionalmente inattiva.

Tale lavoro è consistito nella:

- Analisi, in termini di inibizione di crescita, dell'effetto combinato dei trattamenti con TPT +/- NU1025;
- Analisi citofluorimetriche delle variazioni del ciclo cellulare in seguito ai trattamenti con i due inibitori;
- Analisi dell'attività poli(ADPR)polimerasica per definire il coinvolgimento della PARP nel danno indotto al DNA da tali composti;
- Analisi, per immunorivelazione, dei livelli e della localizzazione di p53 e p21 per determinare l'intervento di tali proteine nella risposta cellulare a tale danno.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari

Le due linee cellulari di glioblastoma umano, D54^{p53wt} e U251^{p53mut} sono state amplificate in terreno di coltura composto per il 50% di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e per il 50% di Ham's nutrient mixture F-12 (*Cambrex*), supportato con 10% di siero fetale bovino (*Bio Whittaker*) scomplementato per 1 ora a 56 °C, penicillina 100 U/ml, streptomicina 100 µg/ml e glutammina 5 mM (*Cambrex*). A tempi stabiliti le cellule sono state staccate con soluzione di Tripsina (Tripsina 0.05%, EDTA 0.02%, *Cambrex*), contate al microscopio invertito con camera Burkner, previa colorazione in Trypan blue (*Biorad*) (1% Trypan blue e 20% della soluzione contenente le cellule in PBS, *Cambrex*) e successivamente piastrate in dischi petri da 100 mm e multi well da 12 e 96 (*Corning Incorporated*) in numero variabile a seconda dei trattamenti.

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% CO₂.

2. Trattamento delle cellule con TPT ed NU1025

A 24 ore dal piastramento il terreno è stato allontanato e sono stati effettuati trattamenti con TPT 10-1000 nM (*Sherig Plough*) ed NU1025 10-50 µM (*Alexis*), in alcuni esperimenti sono state utilizzate due dosi di NU1025 10 µM a distanza di 24 ore. Dopo diversi tempi di trattamento, le cellule sono state staccate e contate come precedentemente descritto.

Le aliquote concentrate degli agenti sono state preparate sciogliendo il TPT in acqua distillata sterile, e l'NU1025 in DMSO; le aliquote sono state conservate a -20 °C. La concentrazione finale del DMSO, sempre inferiore allo 0.1% (v/v), non ha evidenziato azione citotossica (dati non mostrati).

3. Preparazione dell'omogenato cellulare

Le cellule di glioblastoma, controllo o trattate con gli inibitori di Topo I e PARP-1, sono state risospese alla concentrazione di 5x10⁶ cellule/ml in

tampone PB (Tris-HCl 40 mM pH 7.8, EDTA 0.6 mM, β -mercaptoetanolo 1 mM, MgCl₂ 30 mM, Triton X-100 0.05% e glicerolo 20%), contenente un “cocktail” di inibitori di proteasi (*Boehringer*), utilizzato come indicato dalla casa produttrice e PMSF 1 mM, e permeabilizzate in ghiaccio per 30 minuti.

4. Isolamento di nuclei e citoplasma da cellule di glioblastoma umano

Le cellule D54 sono state risospese in tampone contenente Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 2 mM, β -mercaptoetanolo 5 mM, Triton X-100 1%, saccarosio 320 mM, inibitori di proteasi e PMSF 2mM, alla concentrazione di 5×10^6 cellule/ml. L'omogenizzazione è stata effettuata utilizzando il Dounce, e la sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti a 4 °C.

Il sopranatante, contenente il citoplasma, è stato allontanato e conservato a freddo. Il precipitato, contenente nuclei, è stato risospeso in tampone PB alla concentrazione di 5×10^6 nuclei/ml.

5. Analisi dell'inibizione di crescita mediante saggio MTT ed elaborazione con software Calcsyn

L'MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2yl)-2,5-bromuro di difeniltetrazolo) (*Sigma*) è un colorante solubile in acqua che viene metabolizzato dalle cellule vitali in un prodotto viola, insolubile in acqua, il formazano.

Dopo i diversi trattamenti con TPT ed NU1025 alle cellule mantenute in coltura in multi well da 96, è stato aggiunto 10% di MTT e sono state incubate per 4 ore a 37°C, 5% CO₂.

Dopo tale periodo la soluzione terreno di coltura/MTT è stata allontanata ed i sali di formazano formati sono stati solubilizzati con isopropanolo acidificato (96% isopropanolo:4% HCl 1N), sono stati agitati per 20 minuti al buio, a temperatura ambiente e successivamente l'assorbanza è stata misurata a 570 nm con un lettore ELISA (*Biorad 550*).

La percentuale di inibizione è stata calcolata dopo aver sottratto alla media di assorbimento dei campioni trattati (tre per ogni punto), la media di assorbimento del bianco (mezzo senza cellule).

I dati ottenuti sono stati elaborati con il software Calcsyn che partendo da risultati sperimentali di inibizione proliferativi, ottenuti con diverse combinazioni di agenti, ha simulato l'effetto teorico di un ampio spettro di coppie di dosi, definendo così l'indice di combinazione (CI) che permette di stabilire se l'effetto è sinergico, additivo o antagonista.

CI<1 Sinergismo

CI>1 Antagonismo

CI=1 Additività

$CI = (D1 + D2) / (Dx1 + Dx2)$

D1+D2 rappresenta l'effetto della somma dei singoli trattamenti

Dx1+Dx2 rappresenta l'effetto del trattamento combinato

6. Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo di Lowry (*Lowry O.H. et al., 1951*), utilizzando albumina di siero bovino (BSA, *Pierce*) come standard.

7. Determinazione dell'attività PARP in omogenati cellulari

L'attività poli(ADPR)polimerasica è stata determinata in omogenati cellulari (circa 100 µg di proteine) incubati a 30 °C per 15 minuti, in presenza di NAD 0.4 mM, [³H]-NAD⁺ (*Amersham Bioscience*) (10000 cpm/nmole), in tampone PB contenente DNAsi I (*Sigma*) 0.05 mg/ml, in un volume finale di 50µl. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata interrotta per aggiunta di TCA freddo 40% (v/v). Il precipitato ottenuto è stato lavato mediante filtrazione su carta Millipore (HAWP 000 10; 0.45 µm), con 7-8 mL di TCA freddo 7% e la radioattività ad esso associata è stata determinata mediante scintillazione liquida (*Spettrometro Beckman LS 1701*).

Una unità enzimatica corrisponde, alla quantità di enzima in grado di determinare la produzione di una µmole di ADPR nell'unità di tempo (1 minuto) e nell'unità di volume (1 ml).

8. Determinazione dell'attività PARP in cellule in coltura

Dopo diversi tempi di trattamento il terreno di coltura è stato allontanato e sono stati aggiunti 0.5 ml, di una soluzione contenente Tris-HCl 56 mM pH 7.5, KCl 28 mM, NaCl 28 mM e MgCl₂ 2 mM a cui sono stati aggiunti digitonina 0.01% (*Sigma*), NAD⁺ 0.125 μM e [³H]-NAD⁺ 10x10⁶ cpm/nmol. Le cellule sono state incubate per 10 minuti a 37 °C, e le proteine precipitate per aggiunta di TCA alla concentrazione finale del 15 %.

Dopo tre ore di incubazione in ghiaccio le cellule sono state sottoposte a centrifugazione a 10000 rpm, a 4 °C, per 10 minuti e a cinque lavaggi del precipitato con 0.5 ml di TCA 5%.

Il precipitato, risospeso in 0.5 mL di SDS 0.2% ed NaOH 0.1 N è stato incubato per la notte a 37 °C ed analizzato per scintillazione liquida.

L'attività enzimatica è stata calcolata come pmoli di ADPR prodotte/10⁶ cellule.

9. Analisi del ciclo cellulare per citofluorimetria

Aliquote di circa 0.5x10⁶ cellule per punto, sono state centrifugate a 1200 rpm 4°C per 5 minuti, lavate in PBS che è poi stato allontanato per centrifugazione a 1200 rpm, 4°C per 5 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in 125 μl di PBS e fissato in 375 μl di etanolo 95%.

Le cellule sono state, quindi, incubate a temperatura ambiente per 30 minuti in PBS contenente Ioduro di Propidio (50 μg/ml) ed RNasi A (*Sigma*) 0.5 mg/ml e sottoposte all'analisi del contenuto di DNA utilizzando un citofluorimetro a flusso laminare (*FacSCAN, Necton Dickinson, San Josè, CA USA*), interfacciato con postazione PC dotata di software CyCLOPS ® Summil (*Cytomation, Fort Collins, CO, USA*) per l'analisi dei dati.

La fluorescenza generata dall'eccitazione del colorante con una sorgente laser 488 nm, è registrata tra 580 e 750 nm ed i dati raccolti sono stati utilizzati per analisi del ciclo cellulare attraverso il software Mod Fit LT 2.0 (*Verity Software House Inc., Ranger, ME, USA*).

10. Analisi elettroforetica di proteine mediante gel di poliacrilammide in SDS (SDS-PAGE)

Aliquote pari a 50-100 µg di proteine dell'omogenato cellulare sono state precipitate con TCA 40% (v/v) e dopo 20 minuti di permanenza in ghiaccio sono state sottoposte a centrifugazione a 4 °C per 15 minuti a 3500 rpm. Il TCA residuo è stato allontanato mediante lavaggi con etanolo 100% freddo, attraverso un ciclo di tre centrifugazioni a 10000 rpm, 4°C per 10 minuti ed i precipitati, dopo totale evaporazione dell'etanolo, sono stati risospesi direttamente in tampone Laemli (*Biorad*).

L'analisi elettroforetica è stata condotta utilizzando mini gel (10x8x0.1cm) a gradiente di concentrazione di poliacrilammide (5-15%). La corsa elettroforetica è stata effettuata ad amperaggio costante (12-15 mA) in tampone di corsa (Tris 25 mM/Glicina 192 mM pH 8.8, contenente SDS 0.1%). Come markers di peso molecolare sono stati utilizzati miscele di proteine standard da 7 a 250 kDa di peso molecolare (*Biorad*).

11. Western blotting

I campioni proteici dopo separazione elettroforetica sono stati trasferiti su membrana di PVDF (Immun-Blot polyvinylidene difluoride, *Millipore*) mediante elettroblotting (*Biorad Transblot System*) in tampone di Trasferimento (Tris 25 mM/Glicina 192 mM pH 8.8, contenente SDS 0.025%).

Il trasferimento è stato condotto a 4°C per 90 minuti ad amperaggio costante di 200 mA oppure per la notte a 100 mA.

Il filtro è stato poi equilibrato in tampone TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM e Tween-20 1%) e successivamente incubato over-night a 4°C o per 1 ora a 37°C in TBST contenente proteine del latte al 5% (*Biorad*), per saturare eventuali siti non specifici di legame.

La successiva incubazione con anticorpi primari, opportunamente diluiti in tampone TBST contenente latte al 3%, è stata effettuata per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente.

Sono stati utilizzati anticorpi primari policlonali anti-p21 (M19, *S.Cruz*) (1:500), ed anticorpi monoclonali anti-PARP-1 (F1-23, *Alexis*) (1:5000), anti-pADPR (H-10, *Alexis*) (1:500), anti-p53 (DO-1, *S.Cruz*) (1:2000), anti- α -actinina (H-2, *S.Cruz*) (1:200), anti-Topo I (scl-70, *Topogen*) (1:5000).

Dopo 3 lavaggi da 5 minuti in TBST, il filtro è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-mouse (*Biorad*) (1:2000), anti-rabbit (*Biorad*) (1:4000) e proteina A-perossidasi (*Topogen*) (1:20000), coniugati alla perossidasi. Il filtro è stato, infine, sottoposto ad ulteriore ciclo di lavaggi e l'attività perossidasi è stata rivelata per chemiluminescenza potenziata (Luminol Reagent, *S.Cruz*) e successiva esposizione per autoradiografia, o utilizzando il Chemi-doc (*Biorad*).

L'analisi densitometrica è stata effettuata utilizzando il densitometro GS-710 (*Biorad*) ed il programma Quantity one.

RISULTATI

-Analisi dei livelli basali di proteine

Indagini preliminari per western blotting hanno dimostrato la presenza in U251 di un contenuto maggiore di p53, come riportato per diverse linee cellulari mutate in tale gene.

Viceversa entrambe le cellule D54 ed U251 hanno mostrato livelli paragonabili di p21, PARP-1 e Topo I, per quantitativi uguali di estratto proteico caricato su gel, verificati con l'utilizzo dell'anticorpo contro l' α -actinina (**figura 13**).

-Analisi dell'inibizione di crescita in seguito a trattamento con TPT ed NU1025

Cellule D54^{p53wt} e U251^{p53mut}, trattate con concentrazioni crescenti di inibitori di PARP-1 e Topo I, sono state sottoposte ad analisi di vitalità cellulare utilizzando il saggio colorimetrico MTT. In **figura 14** e **15** sono mostrati i risultati di esperimenti effettuati utilizzando TPT a dosi da 10 a 1000 nM, e NU1025 a dosi 10 e 50 μ M.

Tali risultati mostrano che in seguito a trattamento con TPT 10 nM si verifica un'inibizione massima della crescita cellulare di circa il 70% alle 72 ore, nelle due linee cellulari (**figura 14**). Entrambe le linee cellulari, quindi, sono risultate sensibili al TPT il cui effetto antiproliferativo è apparso paragonabile. NU1025, invece non ha mostrato alcun effetto inibitorio della crescita cellulare sino alle concentrazioni di 50 μ M, sia in D54 che in U251 (**figura 15**). Analogamente la crescita cellulare non è risultata inibita da un doppio trattamento con NU1025 10 μ M a distanza di 24 ore (**figura 15**).

In seguito i due inibitori sono stati combinati tra loro seguendo il criterio di mantenere costante il rapporto tra i due composti utilizzati e variando le loro quantità nell'ambito di tale rapporto.

I dati sperimentali così ottenuti sono stati elaborati mediante il software Calcsyn che ha permesso di definire che tra i due inibitori c'è sinergismo ed

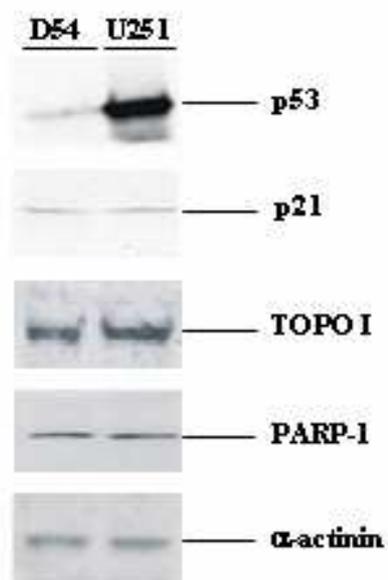


Figura 13.
Analisi dei livelli basali di proteine in D54 ed U251

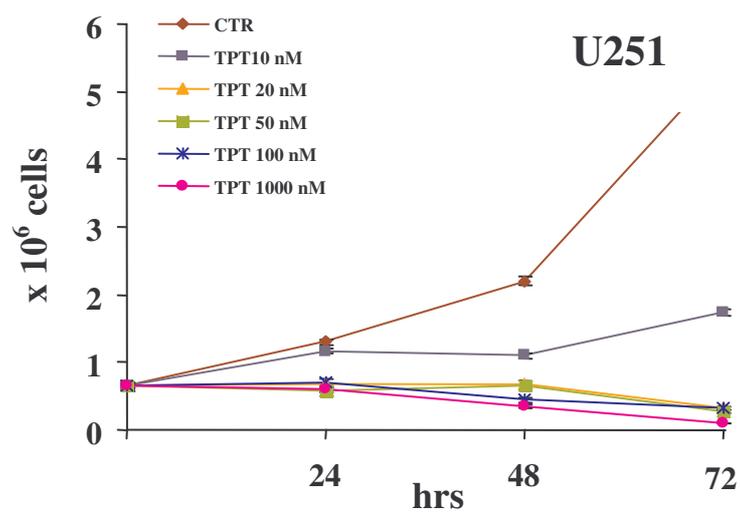
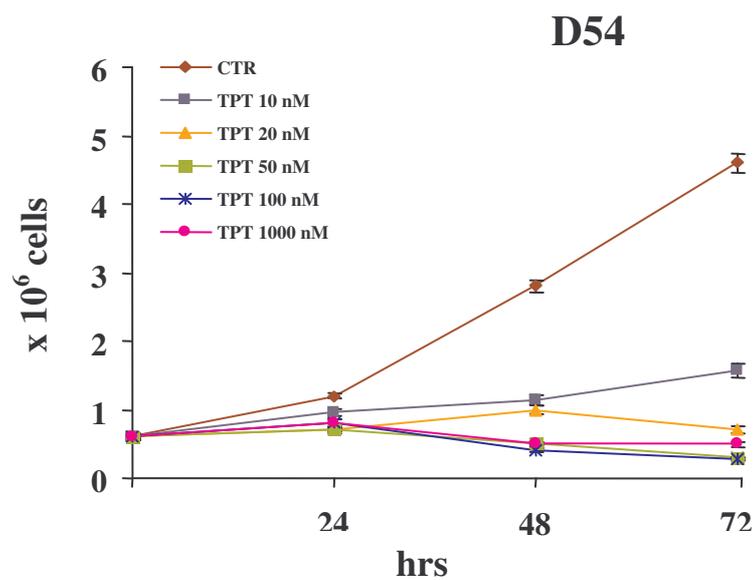


Figura 14.

Analisi dell'inibizione di crescita cellulare in seguito a trattamento con TPT 10-1000 nM mediante saggio MTT

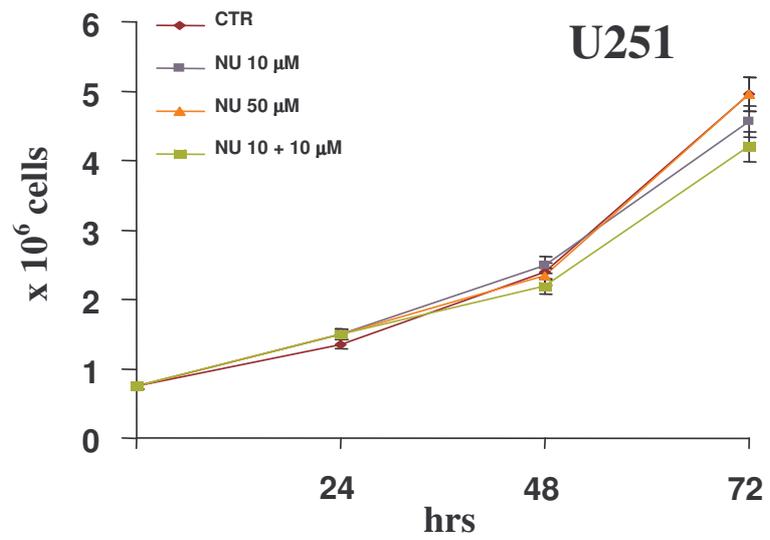
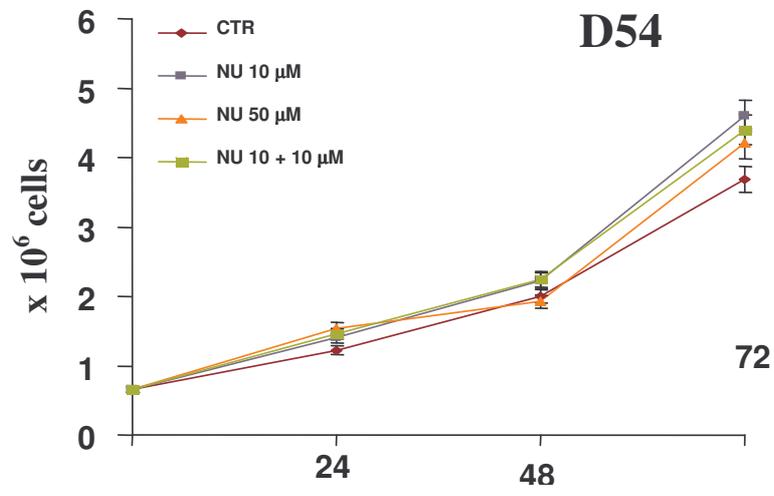


Figura 15.

Analisi dell'inibizione di crescita cellulare
 in seguito a trattamento con NU1025
 10-50 μ M mediante saggio MTT

il rapporto a cui si è evidenziato il massimo sinergismo è 1:1000, TPT:NU1025 (**figura 16**).

-Saggi di attività PARP *in vitro*

La **figura 17** mostra l'attività potenziale totale di PARPs in omogenati cellulari di D54 ed U251. Si osserva innanzitutto un valore leggermente superiore in U251 rispetto alle D54. Inoltre la figura mostra l'efficienza di due noti inibitori dell'enzima, 3ABA ed NU1025. Quest'ultimo è in grado di inibire pressoché totalmente l'attività PARP (91-94%), alla concentrazione di 10 µM mentre alla concentrazione 50 µM l'incremento di inibizione risulta trascurabile. Tali percentuali sono del tutto paragonabili a quelle osservate con la 3ABA ma a concentrazione cento volte superiori.

NU1025, quindi, che è definito un inibitore di nuova generazione rispetto alla 3-ABA, si conferma molto più efficiente anche nel nostro sistema sperimentale.

Alla luce di questi dati e di quelli precedentemente mostrati per gli esperimenti successivi si è scelta la dose TPT 10 nM ed NU1025 10 µM.

-Analisi del ciclo cellulare

Il sinergismo tra i due inibitori è stato evidenziato anche mediante l'analisi citofluorimetrica che ha dimostrato come l'NU1025 da solo non alteri in alcun modo la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo in entrambe le linee cellulari (**figure 18-19**).

Viceversa il TPT porta ad un lieve accumulo in G2/M nelle D54 uguale alle 48 ed alle 72 ore, ed un accumulo più sostenuto nelle U251, maggiore alle 48 ore rispetto alle 72.

L'utilizzo combinato dei due inibitori ha mostrato un aumento significativo del blocco in G2/M, nelle D54, ed uno sconvolgimento tale del ciclo cellulare nelle U251, che rende indistinguibili le fasi. Entrambi questi effetti perdurano fino alle 72 ore

Cell lines	Combination Ratio (TPT/NU)	Combination Index (CI50)	Interpretation
D54	1:1000	0.113	Very strong synergism
U251	1:1000	0.389	Strong synergism

$$CI = \frac{D_1 + D_2}{D_{X1} + D_X}$$

CI > 1
CI = 1
CI < 1

Figura 16.
Definizione del sinergismo TPT:NU1025 mediante il software Calcsyn

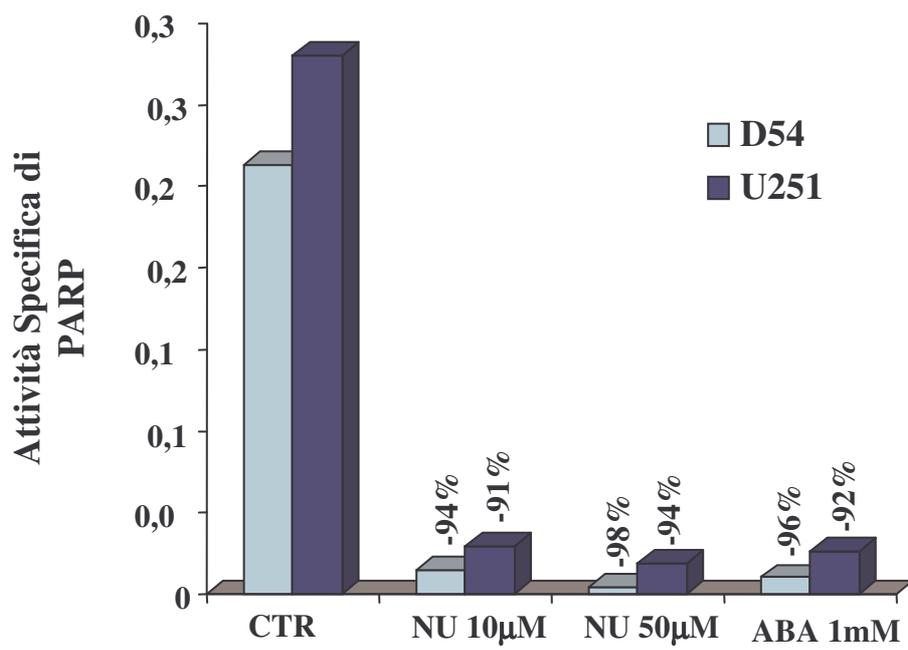


Figura 17.

Analisi dell'attività specifica di PARP in D54 e U251 in presenza degli inibitori NU1025 e 3-ABA

D54

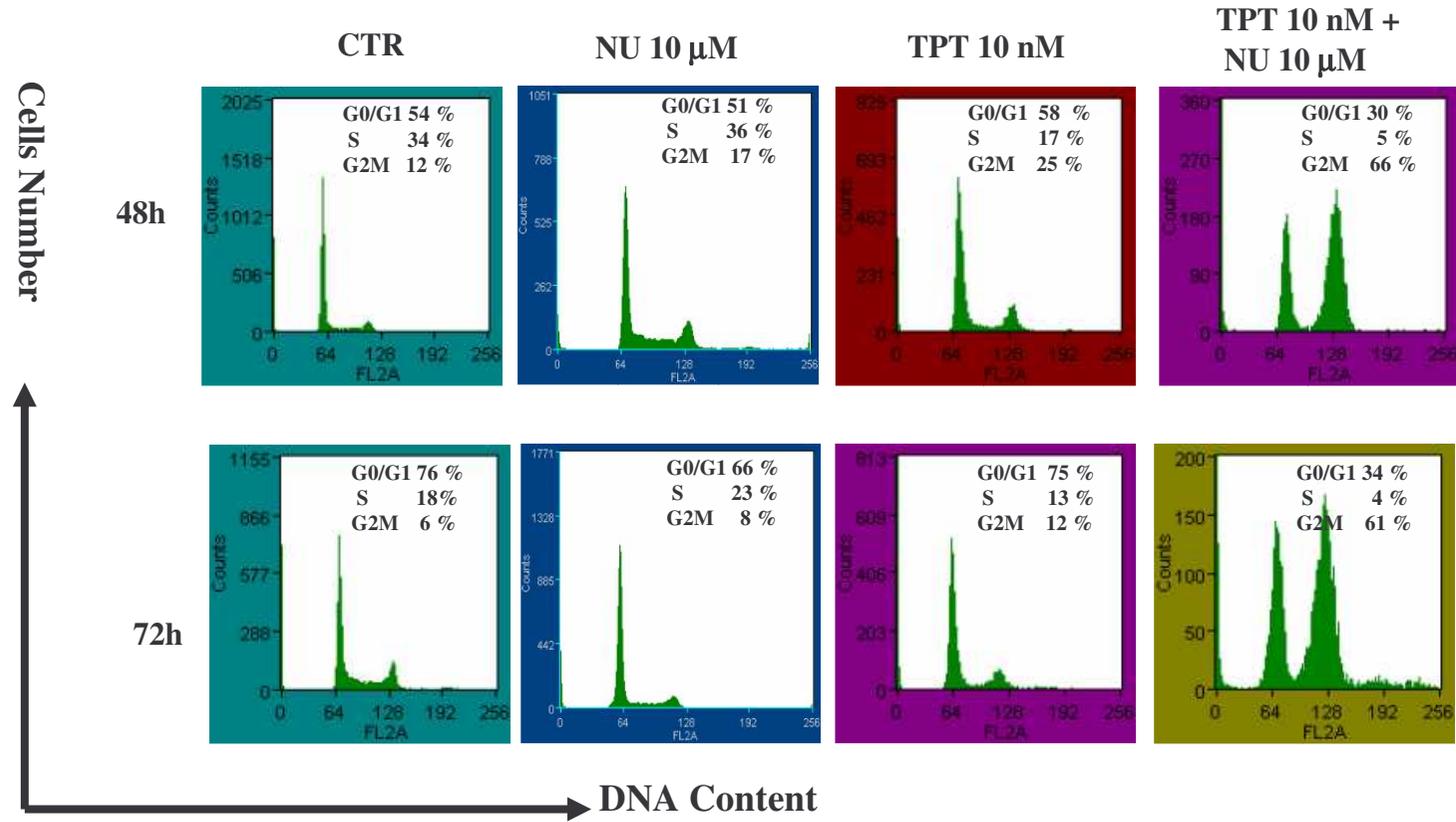


Figura 18.

Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria

U251

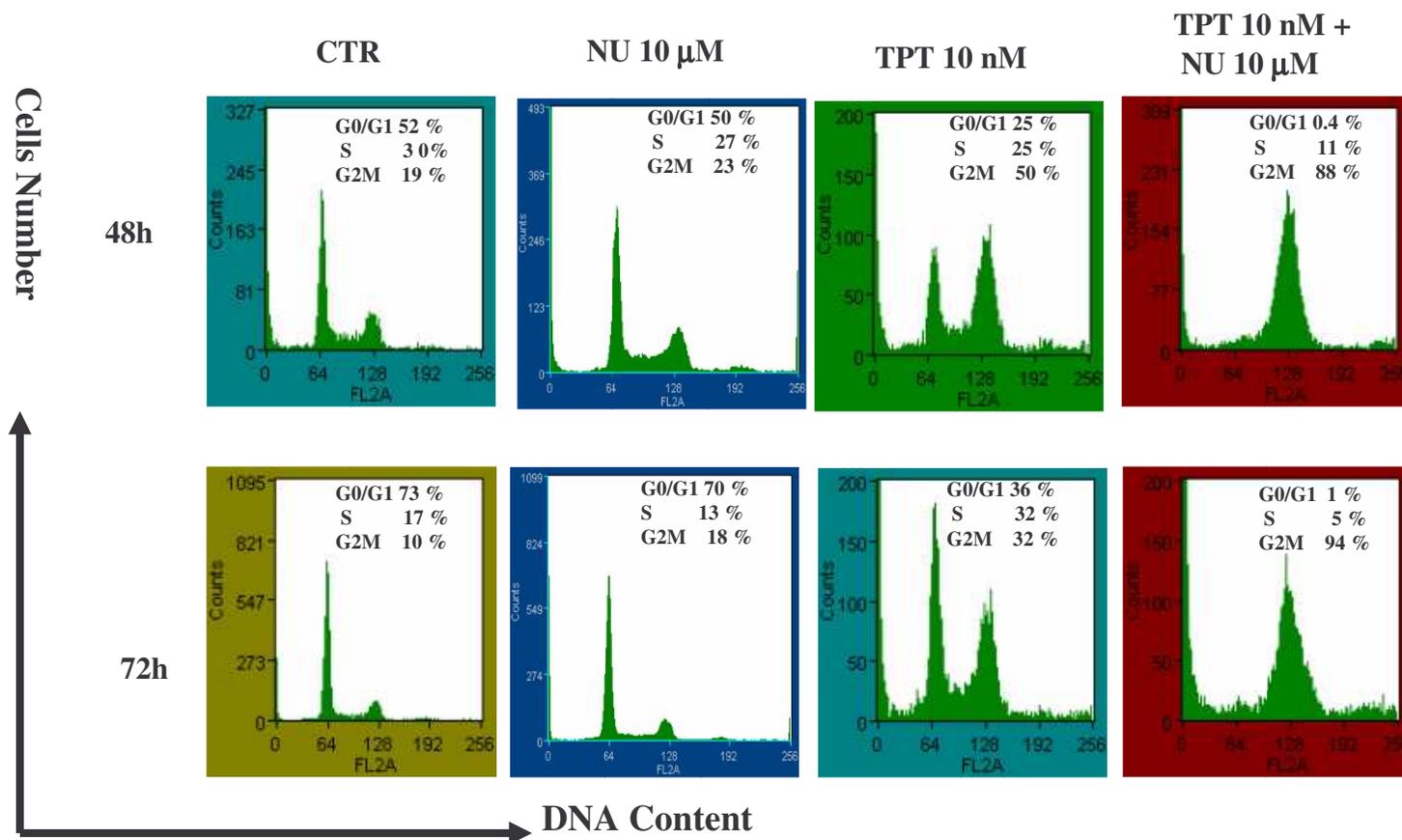


Figura 19.
Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria

-Saggi di attività PARP in cellule

La **figura 20 A** riporta i valori di incorporazione di ^3H pADPR nella frazione TCA precipitabile di campioni di cellule sottoposte a trattamento con NU1025 e TPT.

Sia nelle D54 che nelle U251 si osserva un'inibizione da NU1025 che pare del 50% sino a 24 ore di trattamento.

Viceversa il trattamento con TPT porta ad un cospicuo e sostenuto aumento dell'attività PARP in entrambe le linee cellulari.

L'analisi per western blotting (**pannello B**), utilizzando un anticorpo diretto contro il pADPR, mostra, per quantità paragonabili di estratti proteici, che l'attivazione e l'inibizione di PARP si traducono in variazione dei livelli di automodificazione di PARP-1, mentre risulta invariata l'entità dell'eteromodificazione. Risultati paragonabili sono stati ottenuti per le U251.

-Analisi dei livelli di espressione di p53 e p21

In **figura 21 A** sono mostrati i risultati di esperimenti di western blotting condotti su estratti proteici di cellule trattate con concentrazioni di TPT di 10 e 100 nM per tempi differenti.

L'immunorivelazione con un anticorpo anti-p53 ha evidenziato un'aumento dose e tempo dipendente di tale proteina, che, a sua volta, porta ad aumento di espressione di p21. E' interessante notare come l'aumento del contenuto di p53 preceda quello della sua proteina bersaglio, p21.

Lo stesso tipo di analisi condotto nelle U251 (**pannello B**) dimostra la presenza in tale linea cellulare di una p53 inattiva, il cui contenuto non varia in seguito ai trattamenti e che non è in grado di stimolare l'espressione di p21.

Per verificare che il trattamento combinato TPT+NU1025 avesse effetto sull'attività trascrizionale di p53, sono stati analizzati i livelli di espressione di p21 in D54 sottoposte all'azione di TPT 10 nM ed NU1025 10 μM , dato in singola e doppia dose a distanza di 24 ore (**figura 22**).

L'analisi densitometrica (**pannello B**) mostra innanzitutto che NU1025 da solo, sia in singola che doppia dose, non altera i livelli di espressione di p21. Viceversa, in combinazione con TPT, porta ad un aumento dell'espres

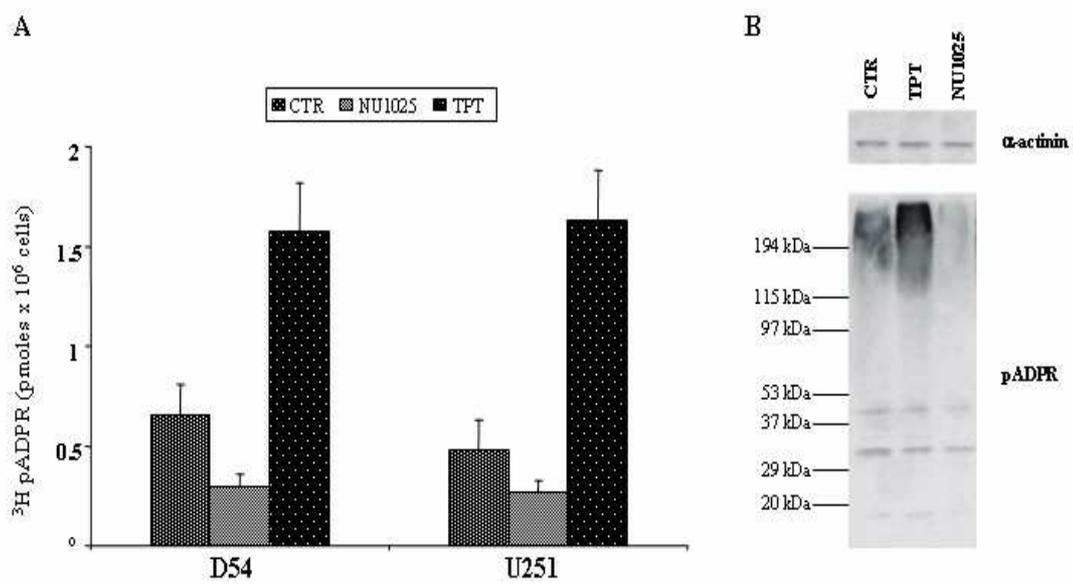


Figura 20.

A. Analisi dell'attività PARP in cellule controllo e trattate con TPT 10 nM ed NU1025 10 μM

B. Analisi del pADPR sintetizzato in D54 controllo e trattate con TPT 10 nM ed NU1025 10 μM

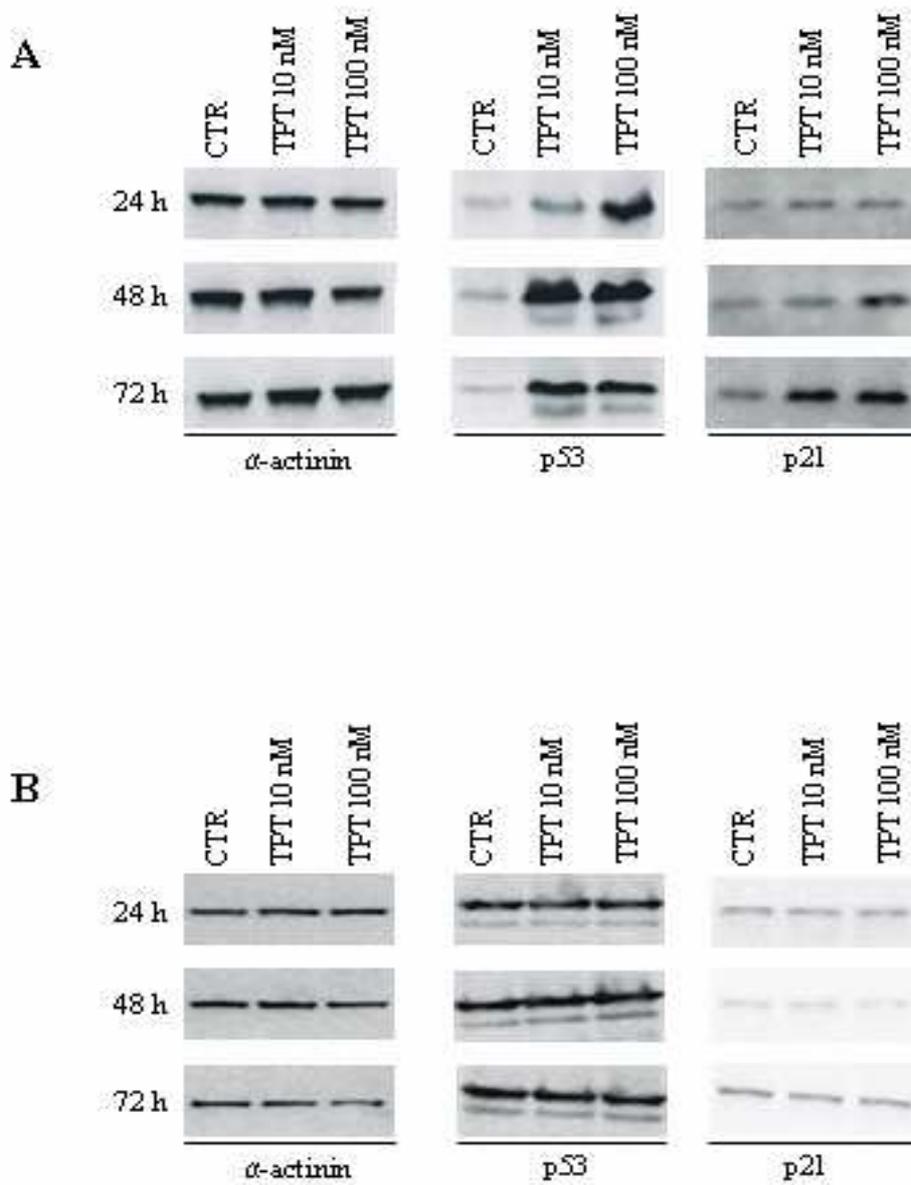


Figura 21.

Analisi dei livelli di p53 e p21 in seguito a trattamenti con TPT 10-100 nM in D54 (A) e U251 (B)

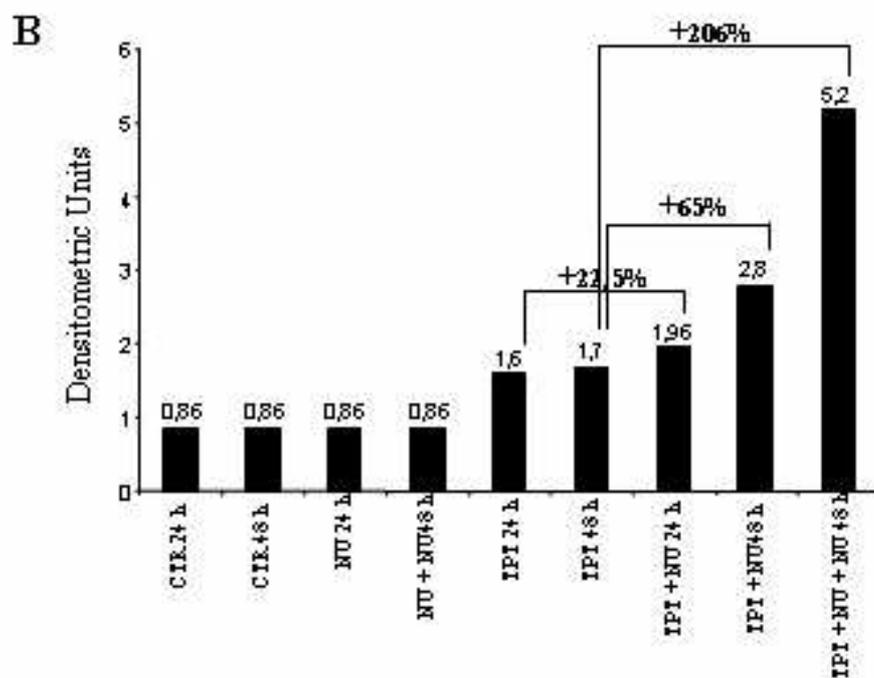
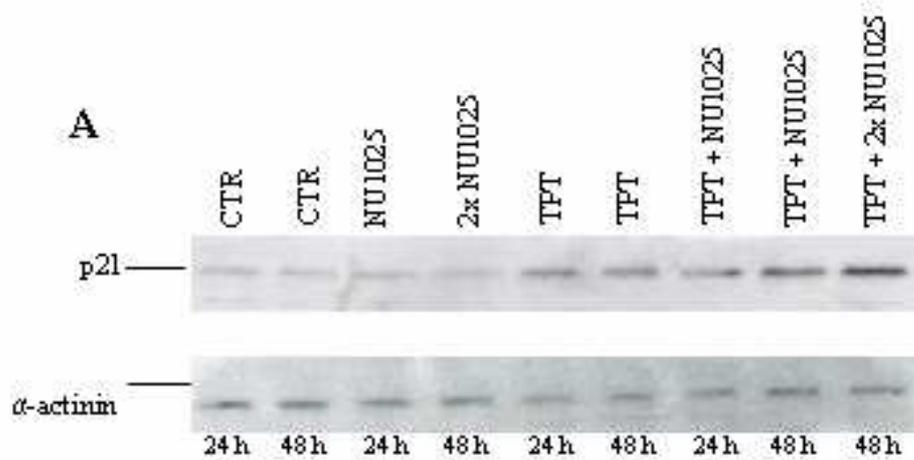


Figura 22.

Analisi di variazioni di espressione di p21 in D54 sottoposte a trattamento con TPT 10 nM ed NU1025 10 μ M in singola e doppia dose

A. Western blotting

B. Analisi densitometrica

p21, rispetto al TPT da solo, del 22,5% alle 24 ore, del 65% alle 48 ore e di oltre il 200% con la doppia dose di NU1025 nelle 48 ore.

-Localizzazione endocellulare di p53 e p21

Per verificare se le variazioni osservate nel contenuto di p53 e p21 in cellule D54 fossero correlate ad una stabilizzazione della loro forma nucleare, si è proceduto all'isolamento di nuclei e citoplasma.

La presenza di una banda immunoreattiva per PARP nei soli nuclei e di α -actinina principalmente nella frazione citoplasmatica, oltre a confermare l'efficiente separazione, ha permesso di verificare l'uso di un quantitativo paragonabile di campione proteico (**figura 23**).

p53 è risultata presente solo nei nuclei ed in un quantitativo incrementato in seguito a trattamento con solo TPT ed in combinazione con NU1025.

Al contrario p21 nel campione controllo mostra una localizzazione prevalentemente citoplasmatica. Inoltre nei campioni trattati con TPT la componente nucleare appare incrementata, e diventa prevalente nei campioni sottoposti a trattamento combinato.

In conclusione, quindi, tali risultati indicano come l'effetto del TPT in combinazione con NU1025 sia quello di stabilizzare la forma nucleare di p53, che a sua volta è in grado di stimolare l'espressione di p21, la cui localizzazione nucleare sembra, inoltre, essere specificamente incrementata da NU1025.

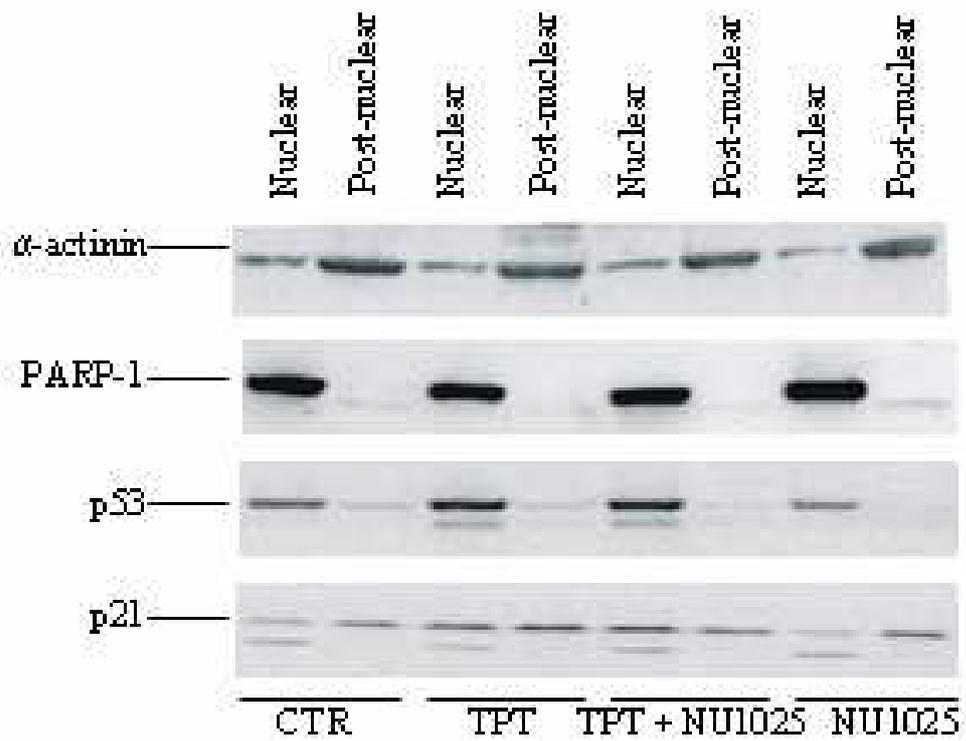


Figura 23.

Analisi della distribuzione nuclei-citoplasma di proteine in D54 sottoposte all'azione di TPT 10 nM +- NU1025 10 μ M in 24 ore

DISCUSSIONE

Una sfida critica nella ricerca contro il cancro è l'identificazione di lesioni geniche che possano sensibilizzare i pazienti alla chemioterapia. p53, che è mutata in un terzo dei glioblastomi, potrebbe rappresentare una di quelle lesioni e la modulazione della sua attività trascrizionale è considerata un promettente bersaglio terapeutico. Sia p53 che PARP-1 sono considerate 'guardiani' dell'integrità genomica, alla luce dei dati che mostrano una loro azione come proteine di controllo dei danni al DNA, implicate nella scelta tra sopravvivenza e morte cellulare. Inoltre ci sono autorevoli evidenze che la modificazione di p53 tramite pADPR, possa differenzialmente modulare tale proteina. Come già riportato, studi *in vitro* hanno dimostrato che differenti quantitativi di pADPR legati ai tre domini di legame presenti su p53, possono sia favorire che inibire la sua attività trascrizionale in presenza di bassi o alti livelli di danno al DNA (Malanga M., et al.,1998) e la sua poli(ADP-ribosilazione) covalente può regolare differenzialmente il suo legame alla sequenza consensus (Mendoza-Alvarez H. & Alvarez-Gonzalez R.,2001). *In vivo*, l'inibizione dominante negativa dell'attività PARP in timociti da topi transgenici, o l'inibizione di PARP-1 mediante un costrutto antisense in cellule di linfoma sottoposte a raggi- γ , risulta in una elevata e prolungata attivazione di p53 (Beneke R., et al.,2000; Simbulan-Rosenthal C.M. et al.,1998). I nostri risultati collimano con tali evidenze, dal momento che si è osservata una stabilizzazione dell'attività trascrizionale di p53 (mediante aumento di espressione di p21), come conseguenza dell'inibizione di PARP, richiesta per il riparo del DNA danneggiato in seguito all'inibizione di Topo I. In particolare si è dimostrata, per la prima volta, l'attivazione di PARP in risposta al danno determinato da 24 ore di trattamento con TPT, in accordo con l'azione specifica in fase S di tale inibitore.

Come ampiamente discusso, un dialogo tra PARP-1 e Topo I è stato già riportato da altri. Malanga ed Althaus (2003) hanno mostrato che PARP-1 e PARP-2 automodificate possono rimuovere la Topo I installata sul DNA, consentendo così il riparo di questo tipo di danno. Più recentemente Yung e

collaboratori (2004) hanno riportato un'interazione tra PARP-1 e Topo I che può essere regolata dalla poli(ADP-ribosilazione) di Topo I.

In accordo con questi risultati, possiamo ipotizzare che l'attività di PARP-1 contribuisca al recupero delle cellule dal danno al DNA indotto dall'inibizione di Topo I. Le nostre evidenze chiariscono inoltre che il segnale derivante dal danno al DNA indotto dall'inibizione di Topo I è raccolto dalle PARPs e trasferito a p53. Maggiori evidenze saranno necessarie per determinare se e quali altre proteine bersaglio di PARP, rappresentino gli intermedi di questa via di segnalazione.

Poiché sia PARP che p53 possono coordinare il riparo al DNA, così come la sopravvivenza e la morte cellulare, si può speculare che la loro interazione possa determinare il destino cellulare conseguente all'inibizione di Topo I.

Inibitori di nuova generazione di PARP di sufficiente potenza e con proprietà farmacocinetiche adatte ad essere seguite in modelli animali, hanno mostrato di aumentare l'attività di agenti antitumorali, come inibitori di Topo I ed altri agenti chemioterapici (*Curtin N.J.,2005*). Sarà interessante con esperimenti futuri definire le condizioni in cui trattamenti combinati con TPT ed NU1025, possano indurre l'apoptosi in cellule di glioblastoma, in accordo con quella che è stata definita una promettente strategia chemioterapia in cellule di cancro alla mammella (*Munoz-Gamez J.A. et al.,2005*).

SEZIONE II

Intervento di PARP nella trasduzione del segnale indotto da IFN α in cellule del carcinoma orofaringeo (KB)

INTRODUZIONE

Gli Interferoni (IFNs) costituiscono una complessa famiglia di citochine, proteine con attività anti-virali che sono secrete dalle cellule in risposta ad una varietà di stimoli (*Pestka S, 1987*). Esistono cinque classi di IFN: α , β , γ , τ e ω , divisi in due gruppi, I e II; l'IFN γ è l'unico di tipo II.

In generale l'esposizione delle cellule a virus ad RNA, induce la produzione degli IFN α e β . La classica funzione di tali molecole è la protezione contro l'infezione virale, inoltre l'abilità di queste molecole di inibire la proliferazione delle cellule tumorali, ha fatto sì che tali molecole entrassero nella pratica clinica, conferendo loro un ruolo nella terapia di un gruppo definito di neoplasie. Tuttavia il meccanismo alla base degli effetti antineoplastici degli IFNs non è ancora stato chiarito, sebbene recentemente sia stato riportato il loro coinvolgimento nell'induzione dell'apoptosi (*Caraglia M. et al., 2005*).

Gli IFNs sono secreti in prevalenza da leucociti, fibroblasti e linfociti attivati (*Isaacs A. et al., 1957*) ed agiscono sulle cellule bersaglio dopo legame con recettori cellulari specifici. Gli IFN α e β interagiscono con lo stesso recettore di tipo I, mentre l'IFN γ interagisce con un recettore di tipo II (*Pfezzer L.M. et al., 1998*).

Il legame degli IFNs di tipo I induce l'assemblaggio dei loro recettori, che portano alla fosforilazione di residui di tirosina localizzati nel dominio intracellulare di ogni catena del recettore. Dal momento che i recettori di tipo I non posseggono attività chinasi intrinseca, queste fosforilazioni in tirosina sono mediate dalle Tirosin Chinasi 2 (TK2) e dalle Janus chinasi (JAK), che sono esse stesse attivate da fosforilazione in tirosina, e che sono associate alla porzione citoplasmatica dei recettori, (*Fu X.Y., 1992; Schindler C.W. et al., 1992; Ziemiecki A., 1994*). I substrati delle JAK e TYK2 sono i Trasduttori

del Segnale e Transattivatori, STAT, che vengono reclutati alle fosfotirosine localizzate nella coda citoplasmatica dei recettori. (**figura 24**).

Le proteine STAT sono una famiglia di fattori di trascrizione presenti nel citoplasma in forma latente, coinvolte nella trasduzione del segnale oltre che di citochine, di ormoni e fattori di crescita (*Schindler C. et al.,1995; Takeda K. & Akira S.,2000*).

Nelle cellule di mammifero sono state identificate sette membri della famiglia STAT: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b e STAT-6 (*Copeland N.G. et al.,1995*).

Possono essere divisi in più domini strutturalmente e funzionalmente conservati (**figura 25**) (*Becker S.et al.,1998*):

- Un dominio ammino-terminale, ben conservato e responsabile delle interazioni dimero-dimero;

- Un dominio spiralizzato, costituito da quattro eliche avvolte che protrudono dal core della struttura, implicato nell'interazione proteina-proteina;

- Un dominio legante il DNA che sembra regolare l'esporto nucleare;

- Un dominio adiacente importante nell'assicurare una corretta struttura del dominio che lega il DNA;

- Un dominio SH2, che è quello maggiormente conservato, che regola il legame ai recettori e la dimerizzazione di STAT (*Kisseleva T. et al.,2002*).

Una volta fosforilate le tirosine dei recettori diventano elementi di aggancio per domini SH2 e per altri domini di legame presenti in proteine di membrana o citoplasmatiche. Le STAT reclutate al recettore vengono fosforilate in un'unica tirosina nella porzione carbossi-terminale e vengono poi rilasciate come omodimeri o eterodimeri mediante interazioni reciproche tra la fosfotirosina di una STAT ed il dominio SH2 di un'altra (**figura 24**). In seguito alla dimerizzazione le STATs traslocano rapidamente nel nucleo dove interagiscono con specifici elementi regolatori per indurre la trascrizione di geni target (*Caraglia M. et al.,2005*).

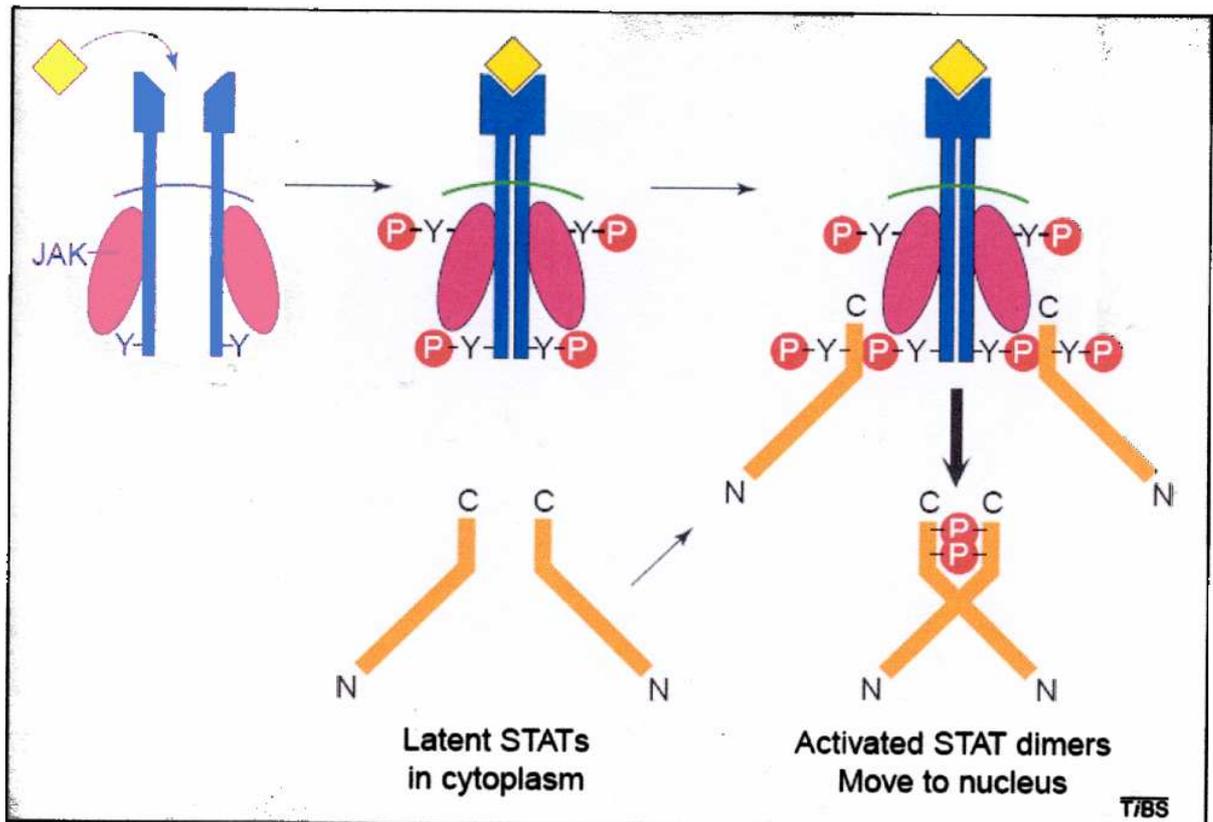


Figura 24.
 Meccanismo di attivazione delle STATs

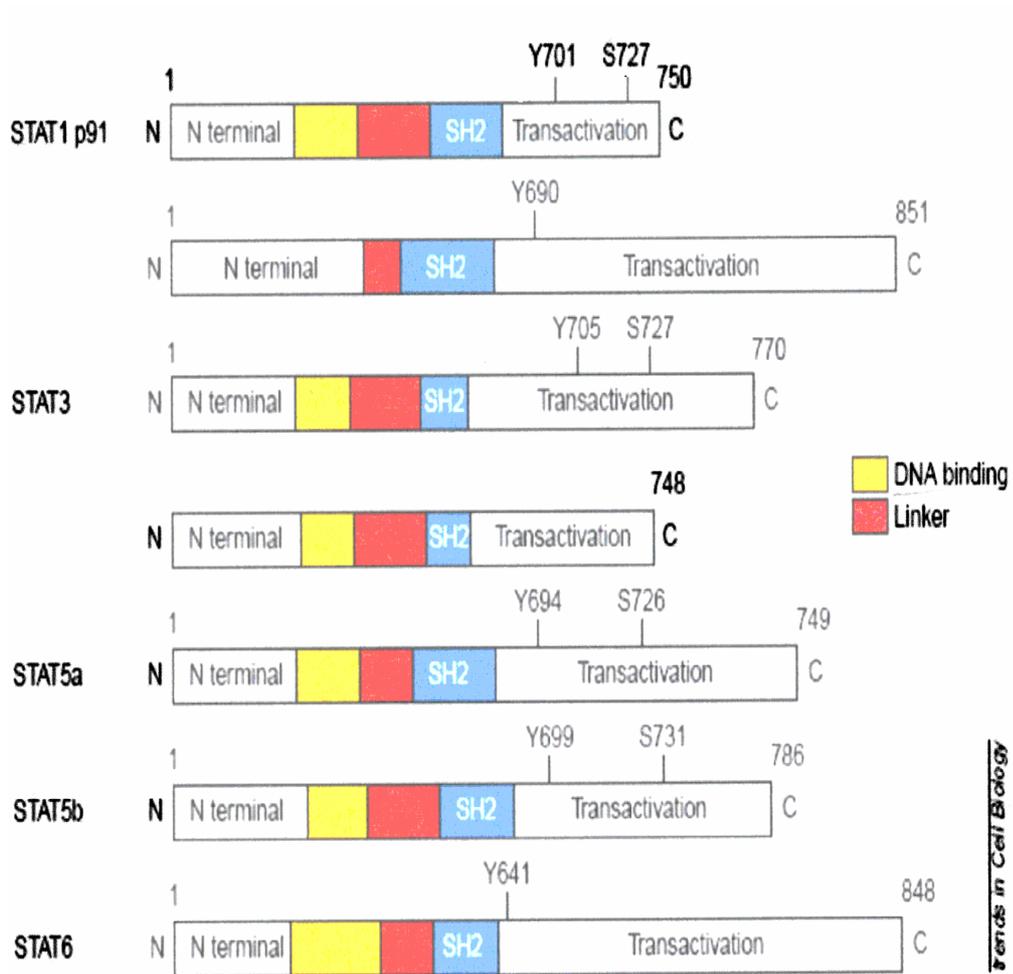


Figura 25.

Rappresentazione molecolare dei domini delle STATs
 SH2 Domain Receptor Binding and Dimerization
 Y Phosphorylated Tyrosine
 S Phosphorylated Serine

In particolare dopo la stimolazione da IFN α , STAT-1 e -2 sono attivate entro pochi minuti, mediante fosforilazione rispettivamente della Tyr 701 e 690 (Levy D.E. et al.,1989).

Tale risposta è spesso transiente. In seguito a trattamenti prolungati delle cellule con IFN, i livelli delle proteine STATs fosforilate diminuiscono fino quasi ai livelli precedenti ai trattamenti, portando ad un declino dell'espressione genica IFN dipendente (*Decker T. et al.,1989*).

Inoltre, il calo dell'induzione dell'espressione genica è spesso accompagnato da uno stato refrattario durante il quale le cellule rimangono non responsive all'aggiunta di induttore fresco (*Larner A.C. et al.,1986*).

Questo fenomeno di de-sensibilizzazione dimostra una regolazione fine della risposta ad IFN ed è importante per garantire l'appropriata e controllata azione di queste potenti citochine.

I meccanismi responsabili del controllo della risposta indotta da INF probabilmente operano a diversi livelli, che includono l'inibizione e la degradazione dei recettori (*Constantinescu S.N. et al.,1994*), la regolazione dell'attività delle protein-tirosin chinasi (TYKs) e delle protein-tirosin fosfatasi (PTPs) (che controllano la defosforilazione delle STATs), la degradazione di JAK e STAT (ad esempio tramite il proteasoma (*Kim T.K. & Maniatis T.,1996*)) e potenzialmente la regolazione dell'esporto nucleare delle STATs attivate (*Haspel R.L. et al.,1996*).

In particolare per azione di IFN α omo-o-etero-dimeri fosforilati di STAT-1 e STAT-2 si associano ad un membro della famiglia dei fattori di interazione di interferone (IRF), la proteina p48, a formare il complesso maturo ISGF3 che trasloca nel nucleo dove attiva la trascrizione genica legandosi agli elementi responsivi all'IFN (ISRE) (*Darnell J.E.Jr.,1997*). I geni stimolati da IFN (ISGs) sono normalmente quiescenti o espressi a bassi livelli nella cellula, la loro espressione è regolata trascrizionalmente mediante gli ISRE che contengono una sequenza consensus GAAAN(N)GAAA, chiamata GA box. Tale sequenza è stata ritrovata sulle regioni promotrici dei

geni per la 2'-5' oligoadenilato sintetasi e dello stesso IFN α (Harada H. et al.,1998).

Durante l'assemblaggio dei recettori di tipo I si formano anche gli omodimeri, STAT-3-3, STAT-5:-5, e gli eterodimeri STAT-1:-3 e CrkL:STAT-5, poiché anche queste molecole sono attivate dall'IFN α . Questi complessi migrano nel nucleo dove si legano ad elementi di regolazione GAS nei promotori dei geni IFN dipendenti (Meinke A. et al.,1996; Darnell J.E.Jr.,1997).

Quindi la segnalazione specifica IFN α dipendente tramite la via Jak/STAT, è stabilita dalla formazione di differenti complessi multipli che attivano differenti elementi di regolazione nei promotori di geni responsivi all'IFN (**figura 26**).

Le proteine STAT mediano poi diversi processi biologici quali la crescita cellulare, la differenziazione, l'apoptosi, la trasformazione neoplastica, l'infiammazione e la risposta immunitaria.

Come già accennato l'IFN α ricombinante (rIFN α 2b) rappresenta un farmaco ampiamente utilizzato in oncologia clinica (Gutterman J.U. et al.,1994), il cui meccanismo d'azione non è tuttavia chiarito.

Tra i geni specifici inducibili dall' IFN α , si annoverano CBP/p300, Sp1, AP1 ed NF-kB (Ramana C.V. et al.,2000). Oei e coll. (1999) hanno riportato che la trascrizione di questi geni può essere regolata anche da PARP-1.

Come effetto ultimo l'IFN α , in cellule trasformate è in grado di alterare la progressione del ciclo cellulare causando un arresto in fase G0/G1, una transizione prolungata della fase S, o un arresto in G2/M (Yano H. et al.,1999). Il gruppo di ricerca con cui lavoro ha inoltre confermato che il trattamento con IFN α è in grado di indurre un recupero del programma apoptotico in cellule KB, che è preceduto da un aumento dell'attività PARP a cui segue la sua proteolisi specifica caspasi dipendente.(Quesada P et al.,2003).

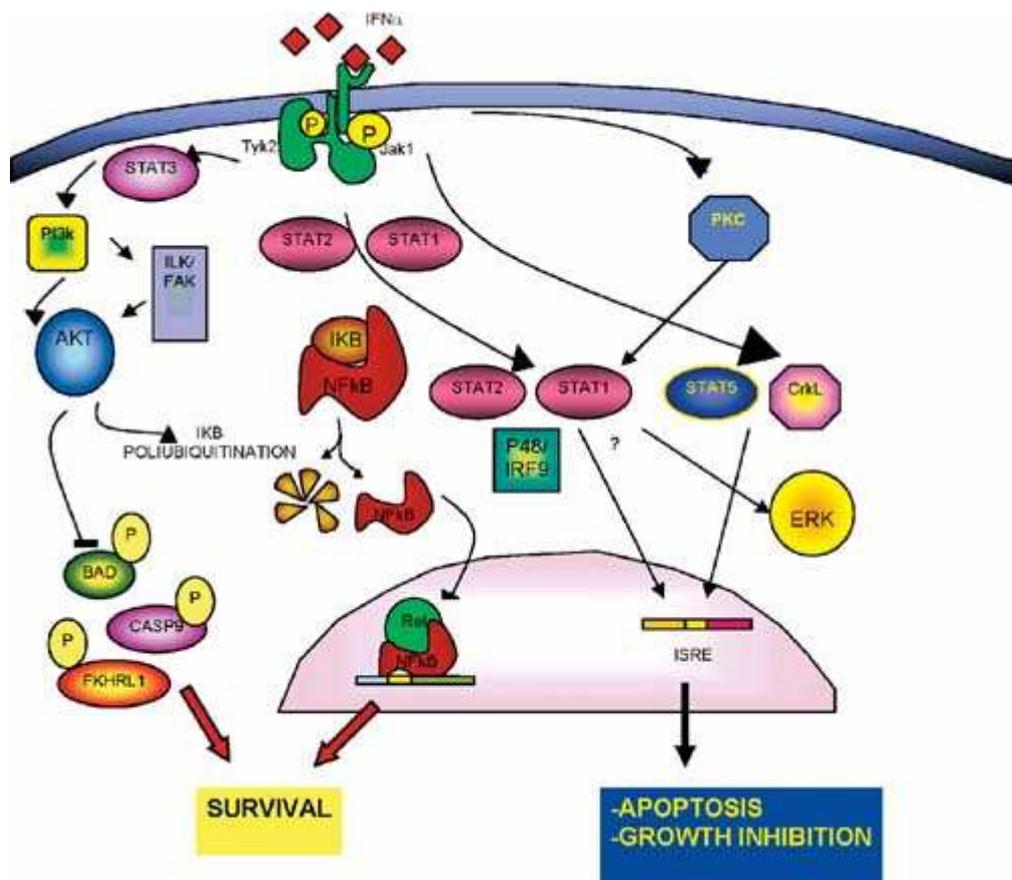


Figura 26.

Via di trasduzione del segnale attivato da IFN α

Sulla base di queste premesse, questo filone del mio lavoro di ricerca ha preso in esame il meccanismo di intervento di PARP nella trasduzione del segnale IFN dipendente in cellule del carcinoma squamoso oro-faringeo, KB.

Il lavoro è consistito nella:

- Verifica della stimolazione della trascrizione e della fosforilazione di STAT-1 per immunorivelazione
- Analisi della poli(ADP-ribosilazione) covalente e non covalente di STAT-1
- Analisi per co-immunoprecipitazione dell'interazione proteina-proteina STAT-1-PARP-1
- Analisi per EMSA dell'effetto di PARP-1 sul legame di STAT-1 al suo sito *consensus*

MATERIALI E METODI

12. Colture cellulari

Le cellule KB sono state propagate in terreno di coltura composto da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, *Cambrex*), supportato come riportato in Materiali e Metodi, SEZIONE I.

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata di 95% aria e 5% CO₂.

13. Trattamento delle cellule con rIFN α ed NU1025

A 24 ore dal piastramento il terreno è stato allontanato e sono stati effettuati trattamenti con rIFN α 2b 1000-10000 UI/ml (*Biomedical Laboratories, PBL*) ed NU1025 10 μ M (*Alexis*).

14. Preparazione dell'estratto proteico

Le cellule KB, controllo e trattate sono state risospese alla concentrazione di 5x10⁶ cellule/ml in RIPA Buffer (PBS 1X, NP-40 1%, SDS 0,1%) contenente inibitori di proteasi come precedentemente descritto e PMSF 1 mM.

Dopo 30 minuti in ghiaccio, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 5000 rpm, per 15 minuti, a 4°C ed il sovrinatante ha rappresentato l'estratto proteico.

15. Sintesi e purificazione del ³²P pADPR

Il [³²P] pADPR sintetizzato mediante incubazione di nuclei di testicolo di ratto, che esprimono un elevato quantitativo di PARP molto attiva (*Di Meglio S. et al., 2004*) con ³²P NAD⁺ 0.4 mM (80-100 cpm/pmol) è stato isolato dalla frazione TCA precipitabile mediante trattamento in tampone Tris-NaOH 10mM pH 12, contenente EDTA 1mM ed incubato per 2 ore a 60°C. Tale trattamento ha determinato il distacco del pADPR dalle proteine a cui era legato covalentemente.

La componente proteica è stata successivamente allontanata mediante estrazione con una miscela contenente cloroformio/alcool isoammilico (24:1 v/v) ed il pADPR è stato recuperato nella fase acquosa

16. Analisi dei livelli di espressione proteica

La determinazione della concentrazione proteica, la separazione elettroforetica, il western blotting e l'isolamento di nuclei e citoplasma sono stati condotti come precedentemente descritto (Materiali e Metodi, SEZIONE I). Per l'immunorivelazione sono stati utilizzati anticorpi primari monoclonali anti-PARP-1 (F1-23, *Alexis*) (1:5000), anti-pADPR (H-10, *Alexis*) (1:500), anti-STAT-1 α (C-111, *S.Cruz*) (1:2000), anti- α -actinina (H-2, *S.Cruz*) (1:200), anti-pSTAT-1 (4a, *BD Biosciences*) (1:1000)

17. Fosforilazione *in vitro* di hrSTAT-1

Il saggio è stato condotto a 30°C per 15 minuti incubando 0,5 μ gr di Chinasi di Adesione Focale Attiva umana ricombinante (hrFAK, *Biosource*) con 5 μ gr di hrSTAT-1 (STAT-1 umana ricombinante, *Biosource*) in tampone T/K (Hepes 20 mM pH 7,4, MnCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 50 mM, contenente una soluzione Mg/ATP 8 mM ed inibitori di proteasi come indicato dalla ditta produttrice, in un volume finale di 50 μ l.

L'avvenuta fosforilazione è stata verificata mediante western blotting utilizzando 250 ngr di proteina e rivelando con anticorpo anti-pSTAT-1.

18. Induzione della poli(ADP-ribosilazione) covalente di proteine

La reazione di poli(ADP-ribosilazione) è stata indotta *in vitro* incubando aliquote di hrPARP-1 (PARP-1 umana ricombinante, *Alexis*) e hrSTAT-1, in rapporto 1:2 per 15 minuti a 30°C, in presenza di 0.2-200 μ M NAD, in tampone PB contenente, 5 μ gr di DNAsi I e 4 μ gr di DNA di sperma di salmone. L'avvenuta modificazione delle proteine è stata verificata per western blotting utilizzando l'anticorpo anti-pADPR.

19. Analisi della poli(ADP-ribosilazione) non covalente di proteine mediante polymer-dot blotting

L'identificazione di proteine leganti il pADPR è stata effettuata mediante analisi per polymer-dot blotting.

Aliquote di hrSTAT-1 e hrPARP-1 (0.05-2 µgr) sono stati immobilizzati su membrana di PVDF mediante aspirazione con pompa da vuoto e successivo lavaggio in TCA 10% per 1 minuto. Dopo 4 lavaggi di 10 minuti in tampone TBST il filtro è stato incubato con pADPR (1 nmole) per un'ora a temperatura ambiente. Il filtro è stato poi sottoposto a 4 lavaggi di 10 minuti in TBST e successivamente incubato con anticorpo anti-pADPR e processato come descritto nei Materiali e Metodi, SEZIONE I.

20. Esperimenti di co-immunoprecipitazione

Aliquote di hrPARP-1 e hrSTAT-1, in rapporto 1:2 sono state incubate per 2 ore in agitazione a 4°C in tampone IP (TrisHCl 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) contenente inibitori di proteasi e PMSF 2 mM.

L'immunoprecipitazione è stata effettuata utilizzando anticorpi anti-STAT-1 ed anti-PARP-1 per immunoprecipitare ed IgG come controllo, a 4°C per la notte in agitazione.

Successivamente le proteine sono state adsorbite alla proteina A/G plus agarosio (*S.Cruz*) per 2 ore a 4°C in agitazione.

Il sovrantante è stato allontanato mediante una centrifugata di 20 minuti a 13000 rpm e 4°C, ed il precipitato è stato sottoposto a 3 lavaggi con tampone IP centrifugando a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C.

Dopo risospensione in tampone Laemli, i campioni sono stati sottoposti ad SDS PAGE e western blotting utilizzando anticorpi anti-PARP-1 e anti-STAT-1.

21. Marcatura della sonda

L'oligonucleotide a doppio filamento derivante dal mutante M67 del gene c-fos, contenente il sito di legame a STAT-1 (*Wagner B.J. et al., 1990*), dopo denaturazione è stato marcato mediante la reazione catalizzata dalla T4

polinucleotide chinasi (*Amersham Bioscience*) ed utilizzando $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$. In seguito alla rinaturazione si è proceduto alla separazione degli oligonucleotidi marcati dai nucleotidi liberi, tramite una gel filtrazione su resina Sephadex G50 (*Amersham Bioscience*).

22. Saggi di variazione di mobilità elettroforetica (EMSA)

Aliquote di 150-600 ngr di proteine hrSTAT-1 e hrPARP-1 sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con $2\text{-}5\times 10^4$ cpm di ^{32}P dell'oligonucleotide marcato contenente un sito *consensus* per STAT-1 in 15 μl di tampone di legame (Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 50 mM, glicerolo 10%, DTT 0.5 mM, EDTA 0.1 mM, 2 μgr di poly(dI-dC), 1 μgr di DNA di sperma di salmone).

I prodotti sono stati separati mediante gel di poliacrilammide al 5% in TBE (Tris-Borato-EDTA 0,5X).

L'intensità delle bande radioattive è stata misurata con un phosphoimager (*Biorad*).

RISULTATI

-Analisi dei livelli di STAT-1

Per verificare la stimolazione dell'espressione di STAT-1, sono stati analizzati per western blotting 100 µgr di estratti proteici da cellule KB sottoposte a diversi tempi di trattamento con IFN α .

La **figura 27** mostra, rispetto ad un contenuto basale molto basso presente nei campioni controllo, un sostanziale aumento della banda immunoreattiva per STAT-1 a partire da 12 ore di trattamento e che si intensifica ulteriormente dopo 24 ore.

In seguito al trattamento combinato IFN α ed NU1025 si evidenzia una banda della stessa intensità.

Lo stesso tipo di analisi eseguito utilizzando un anticorpo anti-pSTAT-1, in grado di riconoscere la fosforilazione in Tyr 701, ha permesso di definire i livelli di fosforilazione di tale proteina. In **figura 28** è riportato come nei campioni controllo non si evidenzia fosforilazione di STAT-1 che invece compare dopo 30 minuti di trattamento con IFN α e decade dopo 3 ore.

La stessa figura mostra come il trattamento con una dose di IFN α 10 volte maggiore non influisca sullo stato di fosforilazione della proteina che risulta inoltre molto inferiore a quello della proteina STAT-1 umana ricombinante fosforilata *in vitro*.

-Localizzazione endocellulare di STAT-1

La localizzazione nucleare di STAT-1 in seguito a trattamento con IFN è stata verificata in frazioni di nuclei e citoplasma isolate.

La purezza delle due frazioni sub-cellulari è stata confermata dall'analisi per western blotting del loro contenuto di PARP-1.

In **figura 29** è riportato come, l'elevato quantitativo di STAT-1 presente in un campione di cellule *in toto*, trattate con IFN α si ritrovi nei nuclei di tali cellule. PARP-1 e STAT-1 sono risultate accomunate da una stessa localizzazione nucleare.

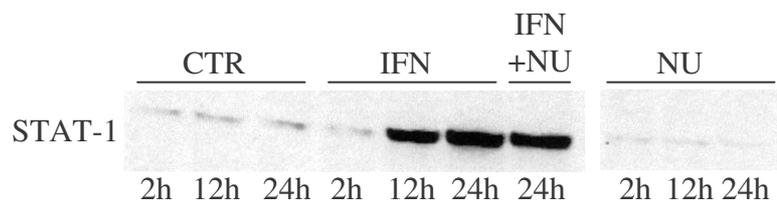


Figura 27.

Analisi dei livelli di STAT-1 in cellule KB sottoposte a trattamento con IFN α 1000 UI/ml ed NU1025 10 μ M

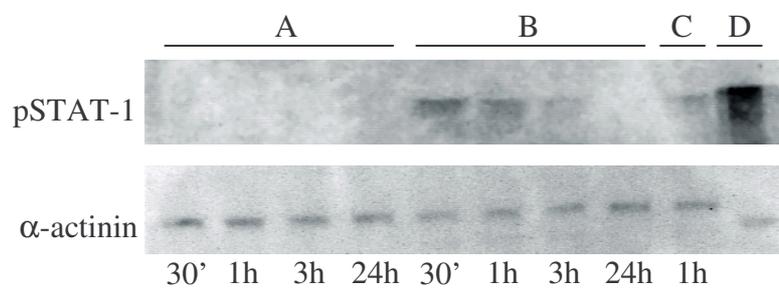


Figura 28.

Analisi dei livelli di fosforilazione di STAT-1 in cellule KB controllo (A) e dopo trattamento con IFN α 1000 UI/ml a tempi diversi (B)

C. IFN α 10000 UI/ml

D. hrSTAT-1 (0.25 μ gr)

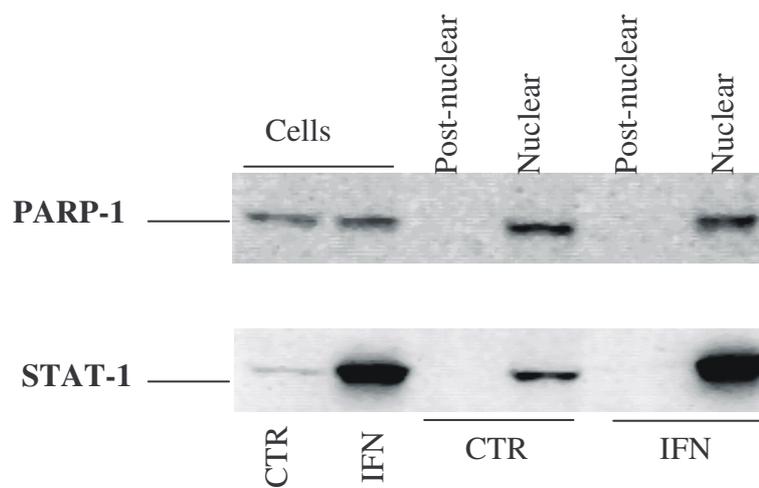


Figura 29.

Analisi della localizzazione nuclei-citoplasma di PARP-1 e STAT-1 in cellule KB controllo e trattate con IFN α 1000 UI/ml in 24 ore

-Analisi del meccanismo di poli(ADP-ribosilazione) di hrSTAT-1

Per definire se e quale potesse essere il meccanismo di poli(ADP-ribosilazione) a carico di STAT-1, sono stati effettuati esperimenti volti alla definizione di una sua modificazione per poli(ADP-ribosilazione) covalente e non covalente.

Aliquote di proteine hrSTAT-1 e hrPARP-1 sono state incubate con NAD a diversa concentrazione (0,2 e 200 μ M), in modo da poter stimolare sia la reazione di automodificazione che quella di eteromodificazione secondo quanto riportato in letteratura (*Rolli V. et al.,2000*). Il campione è stato quindi analizzato per western blotting utilizzando l'anticorpo anti-pADPR. La **figura 30** mostra una banda immunoreattiva in corrispondenza dell'apice del gel di poli(acrilammide ad indicazione di una estesa automodificazione con lunghi polimeri, quale quella che è definita a carico della PARP-1. La stessa banda, ma di minore intensità, è evidente nei campioni trattati con basse concentrazioni di NAD. In entrambi i casi è quindi stato possibile evidenziare solo l'automodificazione covalente di PARP-1, mentre non si è ottenuta evidenza della eteromodificazione di STAT-1.

Avendo riscontrato nella sequenza di tale proteina la presenza di potenziali domini di interazione con il pADPR (**figura 31 A**), si è proceduto all'analisi, mediante dot-blotting, della capacità di STAT-1 di interagire non covalentemente con tale polimero. In tali esperimenti è stata inoltre utilizzata una nota proteina bersaglio del pADPR, l'istone H1, come controllo positivo, e la DNAsi I come controllo negativo. La **figura 31 B** mostra il risultato dell'immunorivelazione per pADPR, del filtro di PVDF su cui sono stati immobilizzati quantitativi crescenti delle proteine sopra menzionate. Mentre l'istone H1 è risultato in grado di interagire con il pADPR, come dimostrano le bande immunoreattive di intensità proporzionale al quantitativo di proteina utilizzato, ne DNAsi I, ne hrSTAT-1 sono risultate capaci di legare il pADPR e quindi di reagire con l'anticorpo.

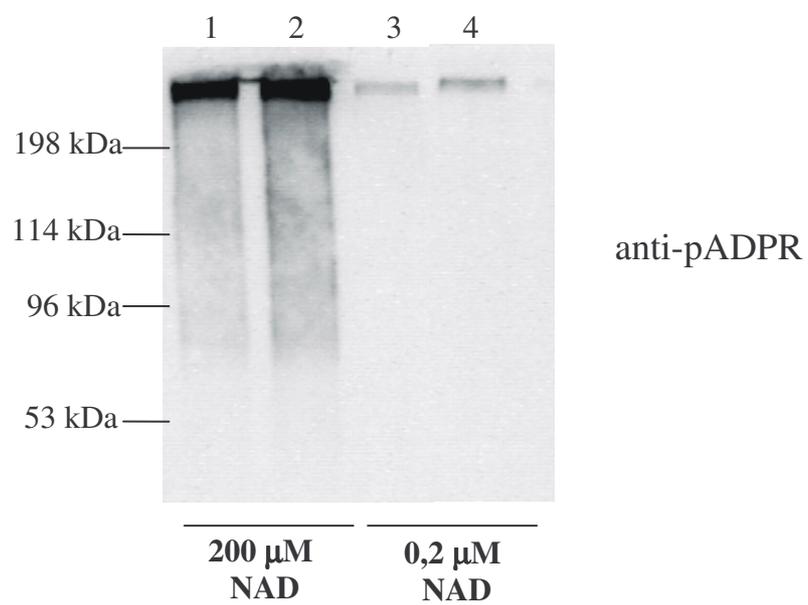


Figura 30.

Analisi di auto- ed etero-modificazione covalente.

1,3 250 ngr hrPARP-1 + 500 ngr hrSTAT-1

2,4 250 ngr hrPARP-1

A

STAT-1 (I)	F	C	F	E	I	I	S	F	V	-	F	N	V	I	I	F	V	M	C	I	E	F	E	I
STAT-1 (II)							I	N	F	F	F	E	V	V	F	F	I	I	E	I	I	N	V	
STAT-2 167		I	E	S	F	I	I	I	I	-	F	A	I	M	F	F	I	V	F	S	I	S	C	I
Consensus	F	/	F						F		F		F	F	F	F	F	F						

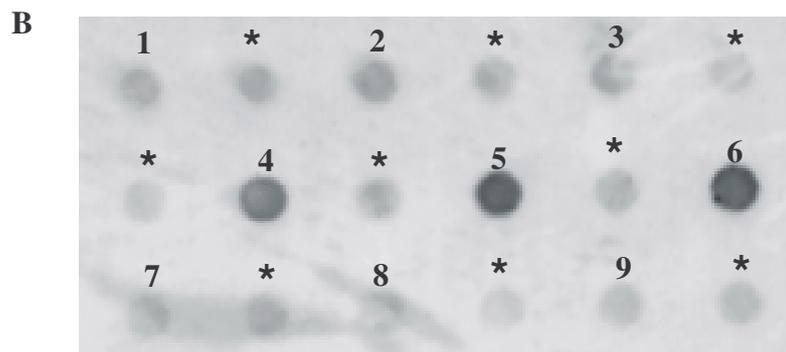


Figura 31.

A. Siti putativi di legame al pADPR su STAT-1 (h. aa idrofobici, b. aa. basici)

B. Analisi per dot blotting della poli(ADP-ribosilazione) non covalente di hrSTAT-1

1-2-3 DNasi I 0.5 µgr, 1 µgr, 2 µgr

4-5-6 H1 0.05 µgr, 0.1 µgr, 0.2 µgr

7-8-9 STAT-1 0.5 µgr, 1 µgr, 2 µgr

***** bianco

-Co-immunoprecipitazione di hrSTAT-1 e hrPARP-1

La **figura 32** riporta i risultati di un esperimento di co-immunoprecipitazione condotto utilizzando aliquote di hrPARP-1 e hrSTAT-1, in rapporto 1:2.

Nella figura sono mostrati i risultati di analisi per western blotting di immunoprecipitazioni effettuate utilizzando un anticorpo monoclonale anti-STAT-1 e/o un anticorpo monoclonale anti-PARP-1.

Il pannello A mostra, in seguito ad immunorivelazione con il suo anticorpo, l'efficienza e la specificità di immunoprecipitazione di hrSTAT-1 (linee 1-5). Inoltre nello stesso pannello (linea 3) e nel **pannello B** (linea 6) è evidente una banda immunoreattiva per hrPARP-1, che co-immunoprecipita usando un anticorpo anti-STAT-1. La capacità di co-immunoprecipitazione di queste due proteine è stata verificata utilizzando l'anticorpo anti-PARP-1 (**pannello B**, linea 7).

-Analisi mediante variazione della mobilità elettroforetica (EMSA) dell'interazione di hrSTAT-1 al suo sito *consensus*

Nell'ipotesi che PARP-1, interagendo con STAT-1, possa modificare la sua capacità di riconoscimento del tratto di DNA contenente il sito *consensus*, sono stati effettuati saggi EMSA in presenza o meno di hrPARP-1 nativa o automodificata. **La figura 33 A** dimostra che solo hrSTAT-1 fosforilata è in grado di legare il DNA, come si evidenzia dal ritardo della mobilità elettroforetica dell'oligonucleotide. Inoltre l'aggiunta alla miscela di legame di hrPARP-1 automodificata e non, non altera tale ritardo (**figura 33 A e B**)

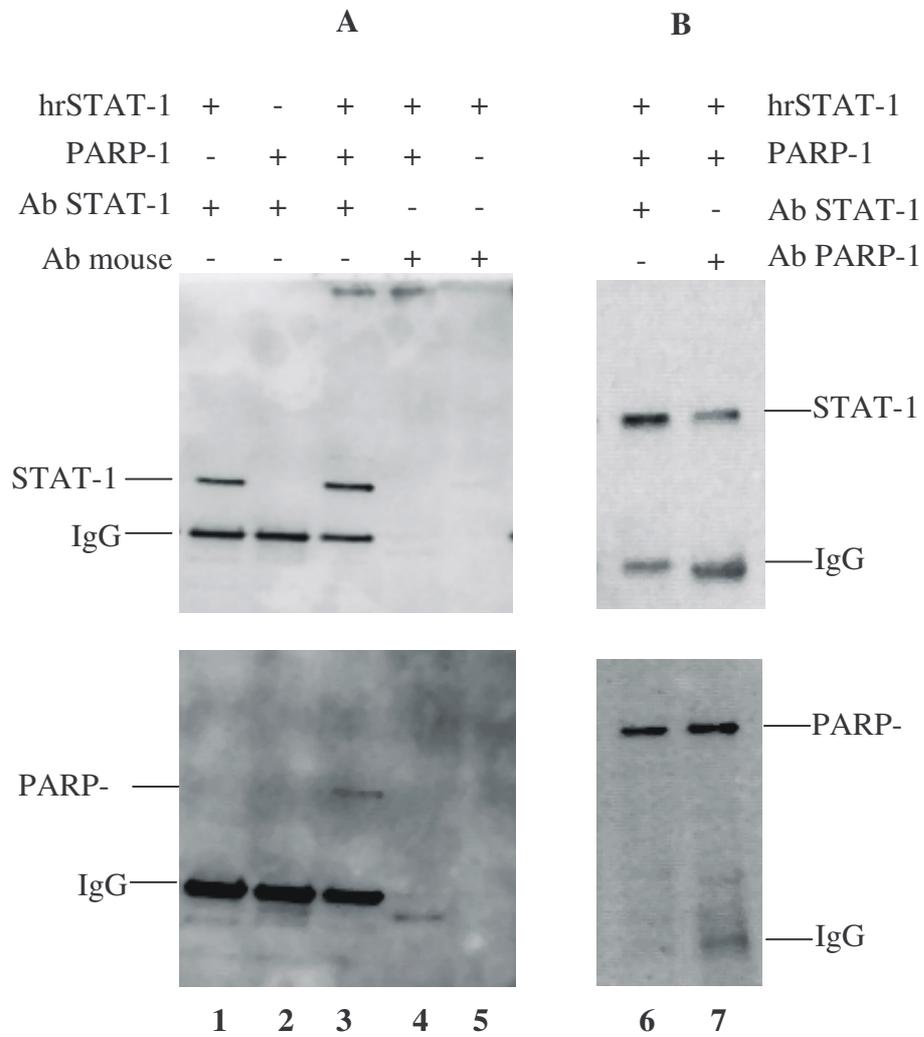


Figura 32.
 Analisi della co-immunoprecipitazione di
 hrPARP-1 (300 ngr) e hrSTAT-1 (600 ngr)

B

pSTAT-1	+	-	+	+	+
STAT-1	-	+	-	-	-
PARP-1	-	-	+	-	-
*PARP-1	-	-	-	-	+

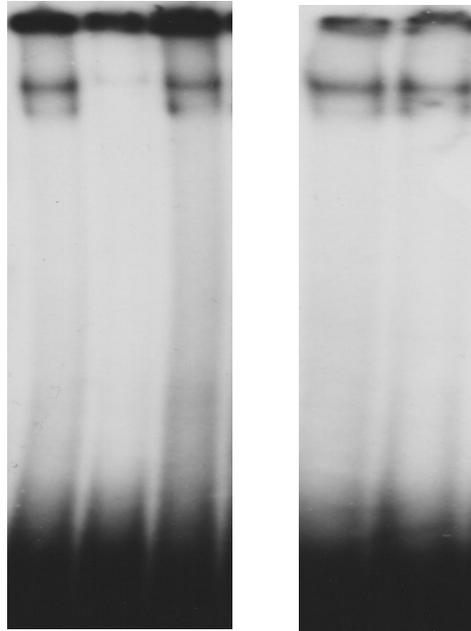


Figura 33.

Saggi EMSA di hrSTAT-1 e hrpSTAT-1 in presenza e assenza di hrPARP-1 nativa ed automodificata (*)

DISCUSSIONE

I risultati riportati in questa sezione confermano, in cellule KB, la stimolazione IFN α -dipendente dell'espressione di STAT-1 che, come riportato in letteratura, in forma fosforilata trasloca nel nucleo.

Inoltre, in relazione alla sua interazione con PARP-1 mediante il trattamento combinato delle cellule con IFN α e inibitore NU1025, si è osservato che l'attività dell'enzima non è richiesta per la stimolazione dell'espressione di STAT-1. Tale proteina, infatti, incontra PARP-1 dopo la sua traslocazione nel nucleo in forma fosforilata.

Per verificare l'eventuale interazione funzionale delle due proteine, utilizzando proteine umane ricombinanti, si è saggiata la modificazione covalente di STAT-1 ad opera di PARP-1. Questi esperimenti mentre hanno ribadito l'estesa automodificazione cui tale enzima può andare incontro, non hanno fornito evidenza di eteromodificazione di STAT-1. Tali risultati portano quindi ad escludere che STAT-1 possa essere accettore di pADPR. Quindi le evidenze precedenti che hanno dimostrato come in cellule KB il trattamento con IFN α determini una attivazione di PARP, devono essere spiegate con un meccanismo di regolazione indiretta mediato dalla automodificazione di PARP-1.

Molte sono ad oggi le evidenze che supportano un ruolo di PARP nella trascrizione, sia in senso positivo che negativo. I nostri risultati sono discordi con quanto riportato in letteratura circa un ruolo di PARP di co-silenziatore, nella trascrizione RNA polimerasi II dipendente (*Oei S.L., et al.,1998 a; Oei S.L., et al.,1998 b*). In tali lavori si è dimostrato che la modificazione covalente per poli(ADP-ribosilazione) della TATA-binding protein (TBP) e del fattore trascrizionale YY1, porta ad una regolazione negativa, in quanto ne impedisce il legame al DNA.

E' noto inoltre che molte componenti dell'apparato basale di trascrizione sono regolate da interazione non covalente con lunghi polimeri di ADPR legati a PARP-1.

Avendo ritrovato in STAT-1 la sequenza di legame per il pADPR, abbiamo voluto verificare la sua potenziale interazione con una preparazione di pADPR libero. Gli esperimenti di dot blotting hanno dimostrato che STAT-1 immobilizzata su filtro di PVDF non è in grado di riconoscere il polimero, diversamente da quanto è in grado di fare l'istone H1. Abbiamo quindi preso in esame il terzo possibile meccanismo di modulazione di STAT-1 ad opera di PARP-1, la formazione di complessi multiproteici. Abbiamo osservato la capacità di STAT-1 di interagire fisicamente con PARP-1, analogamente a quanto riportato in letteratura per un altro importante fattore di trascrizione, NFkB (Hassa P.O. & Hottinger M.O.,1999).

STAT-1 può quindi essere inserita nella lista di fattori di trascrizione e co-attivatori modulati da PARP-1 (de Murcia G. & Shall S.,2000). Nella maggior parte dei casi la presenza di PARP-1 come componente di complessi di trascrizione, stimola l'attività dei suoi "partners" incrementandone il legame a sequenze "target" o a regioni "enhancer". In molti casi questa interazione coinvolge il modulo BRCT.

Le caratteristiche di tali interazioni suggeriscono che il contatto tra PARP-1 ed i suoi "partners" può essere inversamente regolato dalla sua automodificazione ed il conseguente silenziamento genico può essere considerato un altro meccanismo di risposta cellulare al danno al DNA.

Nostri risultati preliminari di esperimenti di EMSA, dimostrano che PARP-1, sia nativa che automodificata, non influisce sul legame di STAT-1 al suo sito *consensus*. Rimane tuttavia da chiarire se tale interazione possa alterare la trascrizione genica STAT-1 dipendente.

In conclusione i risultati precedenti, circa la reversione dell'effetto citostatico dell'IFN α , in seguito ad inibizione di PARP, sono a favore di una implicazione dell'enzima nella regolazione della trascrizione di geni IFN-dipendenti. Tuttavia ulteriori ricerche sono necessarie per chiarire a quale livello PARP-1 espliciti il ruolo di modulatore. Al momento i risultati forniscono solo un parziale riscontro delle evidenze ottenute in vivo, circa il meccanismo con cui PARP-1 può intervenire, cioè entrando a far parte di complessi multiproteici.

BIBLIOGRAFIA

- Affar E.B., Germain M., Winstall E., Vodenicharov M., Shahr G., Salvezen G.S., Poirier G.G. (2000) *J. B. C.* 275, pp. 1346-1350
- Althaus F.R. and Ritcher C. (1987) "ADP-ribosylation of Proteins. Enzimology and Biological Significance", Springer-Verlag, Berlin, Heridelberg Springer-Verlag pp.3-125
- Amè J.C., Jacobson E.L., Jacobson M.K., cap.1 in de Murcia G., Shall S., eds. "From DNA damage and stress signalling to cell death: polyADP-ribosilation reactions" (2000) New York; Oxford Univ. Press.1-34
- Amè J.C., Rolli V., Schreiber V., Nierdergang C., Apiou F., Deker P., Muller S., Hoger T., Menissier de Murcia J., de Murcia G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:17860-17868
- Anderson R.D., Berger N.A. (1994) *Mutat. Res.* 309, pp.109-142
- Becker S., Groner B., Muller C.W. (1998) *Nature* 394, pp.145-151
- Beneke R., Geisen C., Zevnik B., Bauch T., Muller W.U., Kupper J.H., Moroy T. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20(18), pp.6695-703
- Berger N.A. (1985) *Radiat. Res.* 101, pp.4-15
- Bork P., Hoffman K., Bucher P., Neuwald A.F., Altschul S.F., Koonin E.V. (1997) *FASEB J.* 11, pp.68-76
- Caraglia M., Marra M., Pelaia G., Maselli R., Caputi M., Marasco S.A., Abruzzese A. (2005) *Journal of Cellular Physiology* 202, pp. 323-335
- Champoux J.J. (1998) *Prog. Nucleic. Acids. Res. Mol. Biol.* 60, pp.111-132
- Cheng C., Kussie P., Pavletich N., Shuman S. (1998) *Cell.* 92, pp. 841-850
- Constantinescu S.N., Croze E., Wang C., Murti A., Basu L., Mullersman J.E., Pfeffer L.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, pp.9602-9606
- Copeland N.G., Gilbert D.J., Schindler C., Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E. Jr., Mui A.L., Miyajima A., Quelle F.W., Ihle J. (1995) *genomics* 29, pp. 225-228
- Curtin N.J. cap.18 in "poly(ADP-ribosylation)"(2004) Burker A., eds. *Landes Biosciences.*

- Curtin N.J. (2005) *Expert Rev Mol Med.* Mar 15;7(4), pp.1-20
- Darnell J.E. Jr. (1997) *Science* 277, pp.1630-1635
- Darnell J.E., Kerr I.M., Stark G.R. (1994) *Science* 264, pp.1415-1421
- de Murcia G. and Shall S.(2000) “From DNA damage and stress signalling to cell death: polyADP-ribosilation reactions” (2000) New York; Oxford Univ. Press.1-34
- Decker T., Lew D.J., Cheng Y.S., Levy D.E., Darnell J.E. (1989) *EMBO J.* 8, pp.2009-2014
- Di Meglio S., Tramontano F., Cimmino G., Jones R, Quesada P. B.B.A. *Mol. Cell. Res.* (2004) 28;pp.35-44.
- Dippold W.G., Jay G., DeLeo A.B., Khoury G., Old L.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, pp.1695-1699.
- Fan Y., Kohn K.W., Shi L.M., Weinstein J.N., Pommier Y. (1998) *J. Med. Chem.* 41, pp.2216-2226
- Freeney G.P., Errington R.J., Wiltshire M., Marquez N., Chappel S.C., Smith P.J. (2003) *B.J. of Cancer* 88, pp. 1310-1317
- Fu X.Y. (1992) *Cell* 70, pp. 323-335
- Germain M., Affar E.B., D'Amours D., Dixit V.M. Salvesen G.S., Poirier G.G. (1999) *Exp. Cell. Res.*
- Gobert C., Bracco L., Rossi F., Olivier M., Tazi J., Lavelle F., Larsen A.K., Riou J.F. (1996) *Biochemistry* 35, pp.5778-5786
- Gobert C., Skladanowsky A., Larsen A.K. (1999) *Medical Sciences* 96, pp.10355-10360
- Grossman S.R., (2001) *J. Biochem.* 268, pp.2773-2778
- Gupta M., Fujimori A., Pommier Y. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1262, pp.1-14
- Gutterman J.U. (1994) *Procl. Nat. Acad. Sci.USA* 91, pp. 1198-1205
- Hainaut P. and Hollstein M. (2000) *Cancer Res.* 77, pp.81-137
- Harada H., Tangicuchi T., Tanaka N. (1998) *Biochimie* 80, pp.641-650
- Hassa P.O. and Hottinger M.O. (1999) *Biol. Chem.* 380, pp.953-958
- Haspel R.L., Salditt-Georgieff M., Darnell J.E. (1996) *EMBO J.* 15, pp. 6262-6268

- Hatakeyama K., Nemoto Y., Ueda K., Hayaishi O. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:14902-14911
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. (1991) *Science* 253, pp.49-53
- Isaacs A. and Lindemann J. (1957) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 147, pp.417-425
- Kim T.K. and Maniatis T. (1996) *Science* 273, pp.1717-1719
- Kisseleva T., Bhattacharya S., Schroeder-Braunstein J., Schindler C.W. (2002) *Gene* 285, pp.1-24
- Lane D. (1998) *Nature* 394, pp.616-617
- Larner A.C., Chaudhuri A., Darnell J.E. Jr. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, pp 453-459
- Larsen A.K., Gobert C., Markovits J., Bojanowski K., Skadanowski A. (1999) *Acta Biochim. Pol.* 45, pp.535-544
- Larsen A.K. and Skladanowski A. (1998) *Biochem Biophys Acta* 1400, pp.257-274
- Lee Kraus W. and Lis J.T. (2003) *Cell.* 113, pp.677-683
- Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S., Nicotera P. (1997) *J. Exp. Med.* 185, pp. 1481-1486
- Levy D.E., Kessler D.S., Pine R., and Darnell J.E. (1989) *Genes Dev.* 3, pp.1362-1371
- Lowry O.H., Rosenborugh N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) *J.Biol. Chem.* 193, pp. 256-275
- Malanga M. and Althaus F.R. (2003) *J. Biol. Chem.* 279, pp.5244-5248
- Malanga M. and Althaus F. R. cap.4 in "poly(ADP-ribosylation)" (2004) *Burker A., eds. Landes Sciences*
- Malanga M., Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Althaus F.R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, pp.11839-11843
- Mandir A.S., Simbulan-Rosenthal C.M., Lumpkin J.R., Dawson V.L., Smulson M.E., Dawson T.M. (2002) *J. Neurochemistry* 83, pp.186-192
- Mazen A., Menissier de Murcia J., Molinete M., Simonin F., Gradwohl G., Poirier G.G., de Murcia G. (1989) *Nucl. Acids. Res.* 17:4689-4698

- *Meinke A., Barahmand-Pour F., Wohrl S., Stoiber D., Decker T. (1996) Mol. Cell. Biol. 16, pp.6937-6945*
- *Mendoza-Alvarez H. and Alvarez-Gonzalez R. (2001) J. Biol. Chem. 276(39), pp.36425-30*
- *Meyer R.G., Meyer-Ficca L.M., Jacobson E.L., Jacobson M.K., (2004) cap.1 in "Poly(ADPribose)ylation" Bunker A., eds. Landes Sciences*
- *Miwa M., Tanaka M., Matsushima T., Sugimura T. (1974) J. Biol. Chem. 249:3475-3482*
- *Munoz-Gamez J.A., Martin-Oliva D., Aguilar-Quesada R., Canuelo A., Nunez M.I., Valenzuela M.T., Ruiz de Almodovar J.M., De Murcia G., Oliver F.J. (200). Biochem. J. 386(Pt1), pp.119-125*
- *Nazak T., Masutani T., Akangawa T., Sugimura T., Esuni H. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, pp.54-51*
- *Nitis J. L. and Beck W.T. (1996) European Journal of Cancer vol 32, pp.958-966*
- *Oei S.L., Griesenbeck J., Ziegler M., Schweiger M. (1998) Biochemistry 37, pp.1465-1469.a*
- *Oei S.L., Griesenbeck J., Schweiger M., Ziegler M.(1998) J.B.C. 273, pp.31644-31648.b*
- *Oka J., Veda K., Hayaishi O. (1884) J.B.C. 259, pp.896-995*
- *Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel C.E. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56, pp.727-777*
- *Pfezzer L.M., Dinarello C.A., Herberman R.B., Williams B.R., Borden E.C., Bordens R., Walter M.R., Nagabusan T.L., Trotta P.P., Pestka S. (1998) Cancer Res. 58, pp.2489-2499*
- *Pleschke M.J., Kleczkowska E.H., Strohm M., Althaus F.R. (2000) J. Biol. Chem. 275, pp.40974-40980*
- *Pommier Y., pourquier P., Urasaki Y., Wu J., Laco G.S. (1999) Drug Resistance Up. 2, pp.307-318*
- *Quesada P., Malanga M., Di Meglio S., De Lorenzo S., Fabbrocini A., Garbi C., Bianco A.R., Pepe S.(2003) Eur. J. Cancer 39, pp. 2103-2109*

- Ramana C.V. , Chatterie-Kishone M., Nguyen H., Stark G.R. (2000) *Oncogene* 19, pp. 2619-2627
- Rolli V., Ruf A., Augustin A., Schultz G.E., cap.2 in de Murcia G., Shall S., eds. "from DNA damage and stress signalling to cell death: polyADP-ribosylation reaction"(2000) New York; Oxford Univ. Press. 35-79
- Rotter V., Abutbul H., Ben-Ze' ev A. (1983) *EMBO J.* 2, pp.1041-1047
- Schindler C. and Darnell J.E. Jr (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 645, pp.621-651.
- Schindler C.W., Shuai K., Prezioso V.R., Daenell J.E. Jr. (1992) *Science* 257, pp.809-813
- Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Ding R., Bhatia K., Smulson M.E. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253(3), pp.864-8.a
- Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Hiltz-R Hickey H., Malkas L., Applegren N., Wu Y., Bers G. e Smulson M.E. (1998) *Biochemistry* 37, pp. 9363-9370.b
- Sims J.L., Silkorski G.W., Catino D.M., Berger N.A. (1982) *Biochemistry* 21, pp. 1813
- Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G.J.Champoux J.J. (1998) 279, pp.1534-1541
- Takeda K and Akira S. (2000) *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, pp.199-207
- Tanaka M., Miwa M., Matsushima T., Sugimura T., Shall S. (1976) *Arc. Biochem. Biophys.* 172:224-229
- Wagner B.J., Hayes T.E., Hobam C.J., Cochran B.H. (1990) *EMBO J* 9, pp.4477-4484
- Yano H. Iemura A., Haramaki M., Ogasawara S., Takayama A., Akiba J., Kojiro M. (1999) *Hepatology* 29 pp. 1708-1717
- Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., et al. (2002) 297, pp.259-263
- Yung T.M.C., Sato S., Satoh M.S. (2004) *J. Biol. Chem.* 38(17), pp.39686-39696
- Zhu J., Schiestl R.H. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, pp. 1805-1812
- Ziemieicki A. (1994) *Trends Cell. Biol.* 4, pp.207-212