

25 febbraio 2010

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MEDICHE E  
MEDICINA DI LABORATORIO

XXII CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO

**SILENZIAMENTO VS INIBIZIONE FARMACOLOGICA  
DELLA POLI ADP-RIBOSIO POLIMERASI-1 (PARP-1):  
DIFFERENTI EFFETTI SULLA CHEMIO-SENSIBILITA'  
TUMORALE, *IN VIVO* ED *IN VITRO***

CANDIDATA:

ANNALISA SUSANNA DORIO

Docente Guida/Tutor: Prof. GRAZIA GRAZIANI

Coordinatore: Prof. GIORGIO FEDERICI

A.A. 2009/2010

*“Desidero innanzitutto ringraziare la Professoressa Grazia Graziani per i preziosi insegnamenti durante questi anni e le per le numerose ore dedicate alla mia tesi. Ringrazio sentitamente il Professore Lucio Tentori che è stato disponibile a dirimere i miei dubbi durante la stesura di questo lavoro, per i numerosi consigli che mi hanno aiutato a crescere professionalmente. Inoltre vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alla Dott.ssa Alessia Muzi per la sua amicizia e la sua presenza costante non solo durante il lavoro, ma nella mia vita. Infine, ringrazio la mia famiglia e mio figlio Flavio, continua fonte di ispirazione e sostegno.”*

# Indice

Introduzione	1
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 MECCANISMI DI RIPARO DEL DNA	5
1.2 PARP	9
1.2.1 FUNZIONI E STRUTTURA DI PARP	9
1.2.2 PARP-1 NEL RIPARO DEL DNA	11
1.2.3 AGENTI METILANTI ED INIBITORI DI PARP	15
1.2.4 INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI I	19
1.2.5 ANGIOGENESI E PARP-1	20
1.2.6 PARP-2	22
1.3 CICLO CELLULARE	24
1.3.1 LA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE	25
1.3.2 SISTEMI DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE	25
<b>2 MATERIALI E METODI</b>	<b>33</b>
2.1 COLTURE CELLULARI	33
2.2 TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	34
2.3 ANALISI DELL'ATTIVITA' DI PARP	34
2.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PARP MEDIANTE <i>WESTERN</i> <i>BLOTTING</i>	34
2.5 ANALISI DELL'ATTIVITA' MPG	35
2.6 SAGGIO DI FORMAZIONE DI COLONIE	35
2.7 ANALISI MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO	36
2.8 STUDI PRECLINICI <i>IN VIVO</i>	36
2.9 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA	37
2.10 ANALISI STATISTICHE	38

<b>3</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>39</b>
3.1	RUOLO DI PARP-1 NELLA CRESCITA E CHEMIO-SENSIBILITA' DI DUE DIFFERENTI LINEE TUMORALI, <i>IN VITRO</i> . . . . .	39
3.1.1	SILENZIAMENTO STABILE DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 NELLE CELLULE DI MELANOMA CON RNA <i>interference</i> . . . . .	39
3.1.2	SILENZIAMENTO DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 NELLA LINEA DI CARCINOMA DELLA CERVICIA UTERINA	41
3.1.3	I CLONI DI MELANOMA SILENZIATI PER PARP-1 MOSTRANO UN AUMENTO DELLA CHEMIO-SENSIBILITA'	42
3.1.4	CHEMIO-SENSIBILITA' ALLA TMZ E AL Me-Lex, METILANTE SELETTIVO DELLA N3-ADENINA, COME AGENTI SINGOLI O IN ASSOCIAZIONE AD INIBITORI DI PARP DELLE LINEE TUMORALI B16 ED HeLa SILENZIATE PER L'ESPRESSIONE DI PARP-1 . . . . .	44
3.1.5	MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE E DELLA FOSFORILAZIONE DI Chk-1 O DI p53 INDOTTE DALLA TMZ COME SINGOLO AGENTE O IN COMBINAZIONE CON L'INIBITORE DI PARP NELLE LINEE CELLULARI TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1 . . . . .	47
3.1.6	MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE E FOSFORILAZIONE DI Chk-1 O p53 INDOTTE DAL Me-Lex, COME AGENTE SINGOLO O IN COMBINAZIONE CON L'INIBITORE DI PARP NELLE LINEE CELLULARI TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1 . . . . .	54
3.1.7	MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE INDOTTE DALLA TMZ IN COMBINAZIONE CON INIBITORI DI PARP NELLA LINEA DI MELANOMA SILENZIATA PER PARP-2	58
3.2	RUOLO DI PARP-1 NELLA CRESCITA TUMORALE E CHEMIO-SENSIBILITA' <i>IN VIVO</i> . . . . .	61
3.2.1	IL SILENZIAMENTO DI PARP-1 RIDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA CRESCITA DEL MELANOMA <i>IN VIVO</i> IN UN MODELLO ORTOTOPICO . . . . .	61

3.2.2	IL TRATTAMENTO CON TMZ É PIÚ EFFICACE NEI TOPI INOCULATI A LIVELLO INTRAMUSCOLARE CON MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 E LA COMBINAZIONE CON INIBITORI DI PARP NE AUMENTA ULTERIORMENTE L'EFFICACIA . . . . .	64
3.2.3	AUMENTO DELLA SOPRAVVIVENZA DEI TOPI INOCULATI A LIVELLO INTRACRANICO CON IL MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 ED IL TRATTAMENTO CON LA TMZ RISULTA PIU' EFFICACE RISPETTO AI TOPI INOCULATI CON IL MELANOMA DI CONTROLLO . . . . .	66
3.2.4	LA CRESCITA <i>IN VIVO</i> DELLE CELLULE DI MELANOMA SILENZIATE PER PARP-1 É ACCOMPAGNATA DA: UNA RIDOTTA FORMAZIONE DEI POLIMERI DI ADP-RIBOSIO, VASCOLARIZZAZIONE TUMORE-ASSOCIATA E REAZIONE INFIAMMATORIA . . . . .	70
<b>4</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>74</b>
4.1	L'ABOLIZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 AUMENTA LA CHEMIO-SENSIBILITÁ <i>IN VITRO</i> . . . . .	74
4.2	MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE NELLE LINEE TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1 O PARP-2 . . . . .	76
4.3	IL MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 HA UNA MINORE AGGRESSIVITÁ <i>IN VIVO</i> . . . . .	78
4.4	CONCLUSIONI . . . . .	81
<b>5</b>	<b>Publicazioni generate nel corso del dottorato</b>	<b>82</b>
5.1	Publicazioni inerenti al lavoro descritto nella tesi . . . . .	82
5.2	Altre publicazioni . . . . .	82
	<b>Bibliografia</b>	<b>85</b>

# Elenco delle figure

1.1	Meccanismi di riparo del DNA. . . . .	8
1.2	Meccanismo di Poli ADP-ribosilazione. . . . .	10
1.3	Struttura molecolare di PARP-1. . . . .	12
1.4	<i>Pathways</i> di riparo del <i>base excision repair</i> . . . . .	14
1.5	Ruolo del MMR nella tossicità degli agenti metilanti. . . . .	17
1.6	Meccanismi molecolari di citotossicità indotti da composti metilanti come agenti singoli o in combinazione con inibitori di PARP. . . . .	18
1.7	Ruolo biologico della Topoisomerasi I. . . . .	20
1.8	Strutture dei domini di PARP-1 e PARP-2. . . . .	23
1.9	Ciclo cellulare. . . . .	26
1.10	Meccanismo di regolazione di p53. . . . .	28
1.11	Modalità di controllo della progressione del ciclo cellulare della fase G2 / M. . . . .	30
1.12	Componenti dei punti di controllo del danno al DNA nelle cellule. . . . .	31
3.1	Caratterizzazione dei cloni di melanoma silenziati per PARP-1. . . . .	41
3.2	Analisi dell'espressione di PARP-1 nelle cellule di controllo e nelle cellule silenziate per PARP-1 B16 ed Hela. . . . .	42
3.3	Analisi del ciclo cellulare dei cloni di B16 di controllo o silenziati per PARP-1 trattati con TMZ o SN-38. . . . .	44
3.4	Chemiosensibilità <i>in vitro</i> delle cellule silenziate per PARP-1 e di controllo derivanti da linee B16 e Hela alla TMZ o al Me-Lex come agenti singoli o in combinazione con l'inibitore di PARP-1, GPI 15427 . . . . .	46
3.5	Analisi dell'influenza della TMZ come agente singolo, o in combinazione con GPI 15427, sulla distribuzione del ciclo cellulare delle cellule B16 di controllo e silenziate per PARP-1. . . . .	48
3.6	Analisi del ciclo cellulare delle cellule Hela silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	50

3.7	Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule B16 silenziate per PARP-1 e di controllo Babe e SiP-1 trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	51
3.8	Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule Hela silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	52
3.9	Ruolo della fosforilazione di Chk-1 nell'accumulo delle cellule in fase G <sub>2</sub> /M indotto da TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427 sia nelle cellule silenziate per PARP-1 che nelle cellule di controllo. . . . .	53
3.10	Analisi del ciclo cellulare delle B16 silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	55
3.11	Analisi del ciclo cellulare delle Hela silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	56
3.12	Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule B16 silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	57
3.13	Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule Hela silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	58
3.14	Influenza sulla distribuzione del ciclo cellulare delle cellule B16 silenziate per l'espressione di PARP-2 (SiP-2) della TMZ come agente singolo o in combinazione con gli inibitori di PARP, GPI 15427 e UPF 1035. . . . .	60
3.15	Crescita <i>in vivo</i> dei cloni di melanoma silenziate per PARP-1 e di controllo in un modello ortotopico. . . . .	62
3.16	Esame istologico della crescita del clone di melanoma di controllo o del clone di melanoma silenziato per PARP-1. . . . .	63
3.17	Analisi della chemio-sensibilità delle cellule B16 Babe e SiP-1 inoculate in topi trattati con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427. . . . .	65
3.18	Sopravvivenza dei topi inoculati a livello intracerebrale con melanoma di controllo o con melanoma silenziato per PARP-1. . . . .	67
3.19	Chemiosensibilità <i>in vivo</i> alla TMZ dei cloni di melanoma di controllo o silenziate per PARP-1 nel modello intracerebrale. . . . .	69

3.20	Analisi immunoistochimica delle sezioni tumorali per le proteine poli-ADP-ribosilate (PAR) . . . . .	71
3.21	Analisi immunoistochimica dell'espressione di PECAM/CD31 negli espianti di tumori di controllo o silenziati per PARP-1 . . . . .	72
3.22	Analisi immunoistochimica dell'espressione del TNF- $\alpha$ e del GITR negli espianti tumorali di controllo o silenziati per PARP-1. . . . .	73

# SOMMARIO

## Introduzione

Le poli (ADP-ribosio) polimerasi-1 e -2 (PARP-1 e PARP-2) sono enzimi nucleari che sintetizzano polimeri di ADP-ribosio usando il  $\text{NAD}^+$  come substrato. Questi enzimi sono coinvolti nel riparo dei danni al DNA, nei processi di trascrizione, nella regolazione del ciclo e della morte cellulare. Numerosi studi in modelli animali *knockout* per PARP-1 e PARP-2, hanno dimostrato che questi enzimi hanno funzioni ridondanti, ma anche complementari nella salvaguardia e nel mantenimento dell'integrità genomica. In particolare, PARP-1 e -2 sono componenti essenziali del *Base Excision Repair* (BER), responsabile del riparo dei danni al DNA indotti dalle radiazioni e da agenti alchilanti monofunzionali (metilanti).

La temozolomide (TMZ) è un agente metilante ad ampio spettro che è stato approvato per il trattamento dei gliomi ricorrenti ad alto grado di malignità ed è attualmente in corso di valutazione per il trattamento delle metastasi cerebrali dei tumori solidi (ad esempio il melanoma). A differenza del suo analogo dacarbazina, farmaco di riferimento per il trattamento del melanoma metastatico, la TMZ è una molecola lipofila e questa proprietà ne determina la biodisponibilità orale e la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica. Le proprietà farmacocinetiche, il profilo tossicologico favorevole e l'attività antitumorale contro un ampio spettro di tumori fanno della TMZ un chemioterapico di notevole interesse. Tuttavia, la rapida insorgenza di resistenza al trattamento con la TMZ ne diminuisce i benefici a lungo termine.

Il meccanismo d'azione della TMZ consiste nella generazione di un ampio spettro di addotti metilici: N7-metilguanina (N7-MeG), N3-metiladenina (N3-MeA) e O<sup>6</sup>metilguanina (O<sup>6</sup>MeG). L'O<sup>6</sup>MeG è considerata la principale lesione citotossica e mutagena, anche se è prodotta in piccole quantità. Infatti, esiste una correlazione inversa tra la sensibilità alla TMZ e i livelli di O<sup>6</sup>metilguanina DNA-metiltransferasi (MGMT), un enzima che rimuove selettivamente il metile dalla posizione O<sup>6</sup> della guanina. Se non riparata dal MGMT, la O<sup>6</sup>-MeG si appaia in modo errato con la timina o la citosina e questo appaiamento innesca l'intervento del *MisMatch Repair System* (MMR). Tuttavia il MMR non ripara il danno

e i ripetuti cicli di escissione e resintesi della base appaiata in modo erroneo con la O<sup>6</sup>MeG provocano rotture a doppio filamento del DNA, da apoptosi o arresto della crescita cellulare. Il grado di sensibilità delle cellule tumorali agli agenti metilanti è influenzato, quindi, dall'attività della MGMT e dal funzionamento del MMR.

Le N-metilpurine non contribuiscono, invece, alla citotossicità della TMZ; esse sono, infatti, escisse dalla N-metil purina DNA glicosilasi, (MPG). Successivamente il nucleotide danneggiato è sostituito grazie all'intervento coordinato di PARP-1 e -2 e degli altri componenti del BER.

Gli inibitori di PARP sono risultati in grado di potenziare la chemio-sensibilità di tumori resistenti a causa di elevati livelli di MGMT o di alterazioni funzionali di MMR. La maggiore efficacia degli agenti metilanti ottenuta in seguito all'inibizione di PARP è dovuta all'aumento del danno a livello del DNA, come risultato di un'alterazione del BER dopo la rimozione iniziale della base metilata ad opera della MPG. Attualmente gli inibitori di PARP sono in fase di sperimentazione clinica come adiuvanti della chemioterapia per il trattamento del melanoma metastatico.

Oltre che nel riparo del DNA, la PARP-1, svolge un ruolo chiave anche nell'infiammazione, durante la quale si ha la produzione di specie ossidanti che causano danni al DNA e iperattivazione di PARP-1. Questo determina un elevato consumo di NAD<sup>+</sup>, necessario alla sintesi dei polimeri di (ADP-ribosio), con conseguente consumo di ATP. Inoltre PARP-1 aumenta l'attività di fattori di trascrizione che regolano l'attività di mediatori infiammatori, di molecole di adesione e di citochine coinvolte nelle risposte del sistema immunitario. È noto che l'infiammazione contribuisce allo sviluppo e alla progressione di molti tipi di tumori; inoltre i linfociti, i macrofagi e le cellule tumorali producono una serie di citochine proinfiammatorie. Le citochine, a loro volta, possono favorire il processo tumorigenico aumentando la regolazione di mediatori dell'angiogenesi come il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Recentemente, abbiamo dimostrato che PARP-1 è direttamente coinvolto nel processo angiogenico come indicato dalla ridotta formazione di vasi sanguigni in risposta a stimoli angiogenici in topi *knockout* per PARP-1, o da parte di cellule endoteliali umane trattate con inibitori di PARP.

### **Obiettivi**

Lo scopo del presente lavoro è stato:

- confrontare l'influenza del silenziamento dell'espressione di PARP-1, attraverso la metodica di RNA *interference* (RNAi), con l'inibizione farmacolo-

gica dell'attività PARP, sulla chemio-sensibilità delle cellule tumorali alla TMZ e a MeOSO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-lexitropsin (Me-Lex), un composto sperimentale che genera selettivamente N<sup>3</sup>-MeA;

- studiare le modificazioni del ciclo cellulare indotte dai trattamenti con gli agenti metilanti in combinazione con gli inibitori di PARP e la modulazione delle proteine che regolano la progressione del ciclo;
- Stabilire il ruolo di PARP-1 nell'aggressività e chemio-resistenza del melanoma, *in vivo* utilizzando i cloni stabilmente silenziati per l'espressione di PARP-1.

## Risultati

Il silenziamento di PARP-1 nelle linee cellulari tumorali di melanoma o di carcinoma della cervice uterina silenziate, provoca un aumento di chemio-sensibilità a TMZ e Me-Lex, ed un incremento della percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare rispetto ai cloni di controlli. Il GPI 15427, un potente inibitore dell'attività PARP-1 e PARP-2, oltre ad aumentare la sensibilità alla TMZ e al Me-Lex nelle cellule di controllo, determina un aumento di chemio-sensibilità anche nelle cellule silenziate per PARP-1.

Il trattamento con TMZ o Me-Lex determina una più elevata fosforilazione di Chk-1, una chinasi coinvolta nell'arresto in G<sub>2</sub>/M, e dell'oncosoppressore p53 nelle cellule silenziate per PARP-1 rispetto alle cellule di controllo. La combinazione degli agenti metilanti con il GPI 15427 aumenta la fosforilazione di Chk-1 e p53 sia nelle cellule di controllo che in quelle silenziate per PARP-1.

Sebbene le caratteristiche di crescita *in vitro* delle cellule silenziate per PARP-1 siano simili a quelle delle cellule di controllo, la loro tumorigenicità, *in vivo*, è significativamente ridotta rispetto a quella delle cellule che esprimono PARP-1. Infatti, i topi inoculati intramuscolo con le cellule silenziate per PARP-1 mostrano un ritardo nella formazione di noduli tumorali, che sono anche significativamente ridotti di volume, rispetto a quelli dei topi inoculati con i cloni di controllo. Inoltre, si osserva un aumento della sopravvivenza gli animali inoculati a livello intracranico con le cellule silenziate per PARP-1, rispetto ai topi inoculati con i cloni di controllo, in un modello che mima la localizzazione nel SNC del melanoma. L'analisi immunoistochimica degli espianti di melanoma silenziate per PARP-1 indica una riduzione dell'espressione del marcatore per l'angiogenesi PECAM/CD31 e di proteine che intervengono modulando i processi infiammatori, che si accompagnano al tumore quali TNF- $\alpha$  e GITR.

Allo scopo di studiare il ruolo di PARP-1 nella chemio-resistenza del melanoma *in vivo*, topi singenici per il melanoma murino B16 sono stati inoculati a livello intramuscolare o intracranico con linee silenziate per PARP-1 e trattati con TMZ. Come nel modello *in vitro* anche nel modello *in vivo* la chemiosensibilità alla TMZ dei tumori silenziate per PARP-1 è superiore rispetto a quella dei tumori di controllo. Inoltre, anche nel modello *in vivo*, il GPI 15427 aumenta ulteriormente l'inibizione della crescita indotta dalla TMZ persino nei topi inoculati con le cellule silenziate per PARP-1.

### **Conclusioni**

Questi risultati forniscono nuove evidenze di un coinvolgimento diretto di PARP-1 nell'aggressività dei tumori a cui contribuisce, almeno in parte, la modulazione del processo angiogenico. I risultati confermano, inoltre, il ruolo di PARP-1 nel riparo dei danni al DNA indotti dai metilanti e nella chemio-resistenza. Infine, l'ulteriore potenziamento della chemio-sensibilità da parte degli inibitori di PARP osservato nelle cellule silenziate per PARP-1, dimostra il coinvolgimento di PARP-2, o di altri enzimi PARP, nel riparo degli addotti metilici.

Questi dati suggeriscono l'utilità di inibire sia PARP-1 che PARP-2 per aumentare l'efficacia della chemioterapia e per ridurre la progressione tumorale attraverso un meccanismo anti-angiogenico

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 MECCANISMI DI RIPARO DEL DNA

Il mantenimento dell'integrità genomica è di fondamentale importanza per la vita della cellula. Il DNA è il principale bersaglio di agenti chimici (mutageni ambientali, farmaci) e fisici (radiazioni UV e radiazioni ionizzanti). Ciò nonostante, si è calcolato che in una singola cellula vengono prodotti quotidianamente circa 1000 danni causati da eventi ossidativi, di deaminazione e di demetilazione, generati dal metabolismo ossidativo della cellula e dall'azione di agenti chimici e fisici esogeni. Malgrado l'elevato numero di danni, la stabilità genomica è molto alta poiché la cellula è provvista di sistemi enzimatici in grado di controllare, riconoscere e riparare i diversi tipi di alterazioni molecolari. La riparazione è un insieme di processi metabolici in grado di restituire la corretta struttura e funzione al DNA cellulare. La cellula deve coordinare la riparazione con gli altri processi quali la replicazione, la trascrizione ed il ciclo cellulare. Le cellule possono sia riparare il danno che tollerarlo e continuare a replicarsi, oppure possono andare incontro ad apoptosi in risposta a livelli critici di danno del DNA. I principali sistemi di riparo [1] [98] includono:

1. Riparo diretto del danno ad esempio da parte della O<sup>6</sup>-MetilGuanina MetilTransferasi (MGMT) che rimuove specificamente gruppi metilici dalla posizione O<sup>6</sup> della guanina. Per questo tipo di riparo non è richiesto nessun filamento di DNA come stampo.
2. Meccanismi di riparo per escissione, che rimuovono il nucleotide danneggiato sostituendolo con un nucleotide intatto complementare a quello presente nel DNA non danneggiato.

I meccanismi di riparo per escissione, che riguardano i danni al singolo filamento di DNA, comprendono:

- a. **Base Excision Repair** (BER) riparo per escissione di base: è un processo multifase che ripara il danno che coinvolge lesioni al DNA non ingombranti, causate da ossidazione, alchilazione, idrolisi, oppure deaminazione. BER

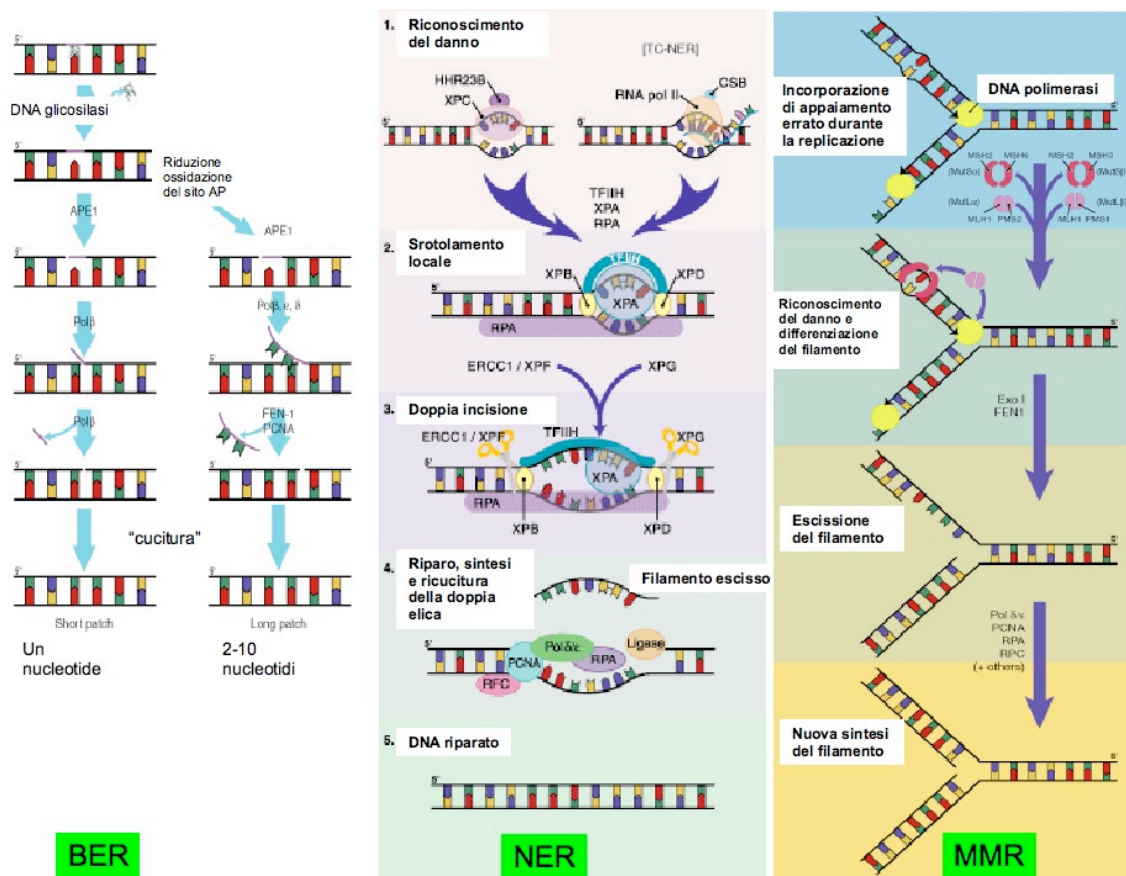
ha due vie di segnalazione; entrambe le vie iniziano con l'attivazione di una N-MetilPurina DNA-Glicosilasi (MPG) che riconosce la base alterata e rompe il legame N-glicosidico tra la base danneggiata e lo zucchero fosfato della struttura del DNA. Questo taglio genera un sito apurinico/apirimidinico (AP: sito apurinico) o un sito abasico nel DNA ed una AP-endonucleasi 1 (APE1) elimina la base azotata, lasciando il fosfato e il deossiribosio. Una liasi elimina il fosfato e lo zucchero in modo tale che una DNA-polimerasi  $\beta$  ( $Pol\beta$ ) leghi il nuovo nucleotide al 3' finale del taglio e la ligasi lo incorpori nel filamento. Il BER quindi può riparare la deaminazione della citosina in uracile o la trasformazione della guanina in 8-oxo-guanina, analogo dell'adenina [2] (Fig. 1.1 nella pagina 8 pannello a sinistra). La riparazione di una base danneggiata con un singolo nuovo nucleotide si riferisce all'attività del BER *short patch* che rappresenta approssimativamente l'80-90 % di tutta l'attività del sistema di riparo. Il percorso sostitutivo del BER, definito *long patch*, è utilizzato quando è presente nel DNA una base modificata che è resistente all'attività della liasi AP della DNA-polimerasi  $\beta$ . Questo secondo tipo di sistema ripara dai 2 ai 10 nucleotidi compresa la base danneggiata e richiede molti degli stessi fattori utilizzati nello *short patch*. Diversamente da quest'ultimo, però, il riparo del BER *long patch* è dipendente dall'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) [3] dove la DNA polimerasi ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$ ) aggiunge vari nucleotidi alle lacune da riparare sostituendo così i fosfati abasici come parte di un oligonucleotide. Il rimanente oligonucleotide che è eccedente è escisso dalla endonucleasi *Flap* FEN-1 prima che la DNA ligasi catalizzi la reazione di legame tra due frammenti di DNA.

- b. **Nucleotide Excision Repair** (NER) Riparazione per escissione di nucleotidi, che ripara un danno che coinvolge filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi. Questi includono danni che provocano una notevole distorsione dell'elica, quali i dimeri di timina causati da luce UV, come pure le rotture di un singolo filamento [?]. Il processo di riparo NER richiede l'azione di più di 30 proteine che includono il riconoscimento del danno, l'apertura locale della doppia elica del DNA vicino alla lesione, una doppia incisione della doppia elica con il danno, la riparazione delle lacune e la "ricucitura" della doppia elica di DNA (Fig. 1.1 nella pagina 8, pannello centrale).
- c. **MisMatch Repair** (MMR), che corregge errori di replicazione e di ricombinazione genetica o *loops* di inserzioni/delezioni (IDL), che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del

DNA. Il meccanismo di riparo del MMR prevede il riconoscimento iniziale del danno tramite eterodimeri delle proteine MSH2-MSH6 (conosciuti come MutS  $\alpha$   $\beta$ ). I principali appaiamenti errati base-base e gli IDL sono riconosciuti dal MutS  $\alpha$ , mentre i più ampi IDL sono di solito riconosciuti dal MutS  $\beta$ . Successivamente al riconoscimento della lesione MutS  $\alpha$   $\beta$  legano l'ATP, vanno incontro ad una traslocazione nel DNA lontano dal sito della lesione finché non incontrano le altre proteine del MMR [93]. Si formano, quindi, enormi complessi proteici, includenti quelli che contengono le proteine eterodimeriche di MLH1-PMS2 (MutL  $\alpha$   $\beta$ ), MLH1-MLH3 ed i fattori di replicazione. L'interazione tra il sistema di replicazione, in particolare con il PCNA, e le proteine del MMR fornisce un legame fisico tra il riconoscimento dell'appaiamento errato e l'identificazione del nuovo filamento di DNA sintetizzato a livello della forca replicativa. L'escissione e la sintesi del filamento nascente (contenente l'appaiamento errato o gli IDL) è effettuato da numerosi fattori tra cui il PCNA, l'RPA, l'RFC, l'esonucleasi I la DNA polimerasi  $\delta$  e  $\epsilon$ , l'endonucleasi FEN1 ed altri [4] (Fig. 1.1 nella pagina seguente, pannello di destra).

Un tipo particolarmente pericoloso di danno al DNA per le cellule in divisione è la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno:

- **Non-Homologous End-Joining (NHEJ)** [5]: riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo. Tuttavia può esserci una perdita di sequenza durante questo processo e quindi tale riparo può essere mutagenico. Il NHEJ può verificarsi a tutti gli stadi del ciclo cellulare, ma nelle cellule di mammifero è il principale meccanismo fino a quando la replicazione del DNA non rende possibile la riparazione per ricombinazione con impiego del cromatide fratello come stampo.
- **Homologous Recombination (HR)** [1]: si attiva in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA è in replicazione, oppure ha appena portato a termine la propria duplicazione. La riparazione per ricombinazione richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo per la riparazione di una rottura. Il cromosoma danneggiato è riparato con l'impiego, come stampo, di un cromatide fratello neosintetizzato. Il macchinario enzimatico responsabile per questo processo è praticamente identico al macchinario responsabile del *crossingover* nelle cellule germinali durante la meiosi.



(a) Pannello a sinistra, *Base Excision Repair* (BER): nella figura è mostrato un modello generale per la via di segnale del BER quando è presente una lesione ad un solo nucleotide neql DNA (*short patch*), oppure lesioni da 2 a 10 nucleotidi (*long patch*). Pannello centrale, *Nucleotide Excision Repair* (NER): la figura mostra un modello semplificato delle fasi del sistema di riparo: 1) Riconoscimento del DNA danneggiato che è diverso a seconda che sia coinvolto il NER associato al genoma o il NER accoppiato alla trascrizione (GG- e TC-NER, rispettivamente). Nel GG-NER il riconoscimento del danno avviene attraverso il complesso XPC/HHR23B, invece il TC-NER riconosce il blocco del meccanismo di trascrizione al sito della lesione. Le proteine CSA e CSB posizionano il complesso della RNA polimerasi in modo tale che le proteine del NER possano accedere al sito danneggiato; 2) Svolgimento della doppia elica del DNA attraverso le proteine XPB e XPD; 3) Doppia incisione sul filamento del DNA da parte delle endonucleasi XPG e ERCC1/XPF; 4) riparo del DNA, sintesi e "ricucitura" del filamento. Pannello a destra, *MisMatch Repair* (MMR): nella figura è mostrato un modello di MMR di mammifero: il MMR è attivato attraverso il riconoscimento dell'appaiamento errato e l'identificazione del filamento in cui è presente l'errore; l'escissione successiva del nuovo filamento sintetizzato contenente la base male appaiata o il *loop* inserzione/delezione (IDL); la nuova sintesi del filamento che è effettuato per ristabilire l'integrità del DNA. Modificata da Aziz Sancar et al., Annu. Rev. Biochem., 2004; 73: 39–85 .

Figura 1.1: Meccanismi di riparo del DNA.

## 1.2 PARP

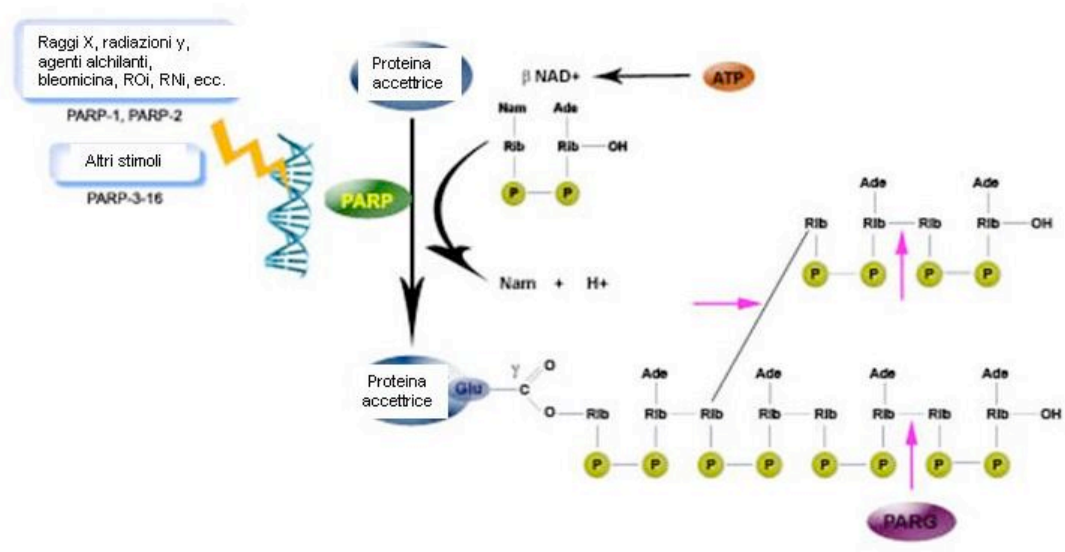
### 1.2.1 FUNZIONI E STRUTTURA DI PARP

La poli ADP-ribosilazione è una modificazione post-traduzionale di proteine nucleari che svolge un ruolo centrale nel mantenimento dell'integrità genomica, nella scelta del destino cellulare e della morte cellulare mediante il controllo del riparo, replicazione e trascrizione del DNA. Il principale enzima responsabile della sintesi di polimeri di (ADP-ribosio) e quello ad oggi meglio caratterizzato nell'ambito di una ampia famiglia, è la PARP-1, una proteina nucleare di circa 116 kDa, ubiquitaria, presente in tutti gli eucarioti. La reazione consiste nella sintesi di omopolimeri di ADP-ribosio variabili per lunghezza e complessità e si esplica in più stadi:

1. Idrolisi del legame N-glicosidico tra la Nicotinammide Adenina Dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), usata come substrato, ed il ribosio, con eliminazione di nicotinammide e protoni e rilascio di molecole di adenosina-difosfato-ribosio (ADP-ribosio) utilizzate per la sintesi dei polimeri;
2. Formazione di un legame estereo tra la prima unità di (ADP-ribosio) ed uno specifico residuo amminoacidico, acido aspartico o glutammico, di accettori proteici nucleari. Questi ultimi possono essere proteine coinvolte nel mantenimento della struttura cromatinica, o enzimi implicati nel metabolismo del DNA, a carico dei quali si attua una reazione detta di eteromodificazione che avviene principalmente mediante corti polimeri lineari (massimo 20-30 residui). Inoltre, anche la stessa PARP-1 è un accettore di polimeri di (ADP-ribosio); in questo caso si parla di una reazione di automodificazione che avviene mediante polimeri lunghi e ramificati.
3. Allungamento della catena di polimeri tramite legame glicosidico di successivi monomeri da 2 a più di 200 residui in catena.
4. Ramificazione del polimero di (ADP-ribosio) ogni 20-50 unità [6](Fig. 1.2 [nella pagina successiva](#))

Alla rapida sintesi di polimeri, fa seguito una sua rapida ed efficiente degradazione ad opera della poli ADP-glicoidrolasi (PARG). L'ultima molecola di ADP-ribosio, legata alla proteina accettrice viene eliminata ad opera di una ADP ribosil-proteina-liasi [7].

In condizioni basali i livelli cellulari di polimeri di ADP-ribosio, rappresentati da corti oligomeri, sono dell'ordine delle picomoli. Tuttavia, in risposta ad agenti



- (a) In risposta ad un danno al filamento di DNA, PARP idrolizza il  $\text{NAD}^+$ , rilasciando nicotinamide (Nam) e un protone ( $\text{H}^+$ ), e catalizza il successivo trasferimento dell'ADP-ribosio a proteine nucleari accettrici. La reazione inizia attraverso la formazione di un legame estere tra l'amminoacido accettore (Glu, Asp o  $\text{COOH-Lys}$ ) e il primo (ADP-ribosio); l'allungamento dei polimeri coinvolge la catalisi di un legame glicosidico. L'enzima nucleare di degradazione poli (ADP-ribosio) glicoidrolasi (PARG) taglia i legami glicosidici tra le unità di (ADP-ribosio). Modificata da Valérie Schreiber et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006; 7: 517-528 .

Figura 1.2: Meccanismo di Poli ADP-ribosilazione.

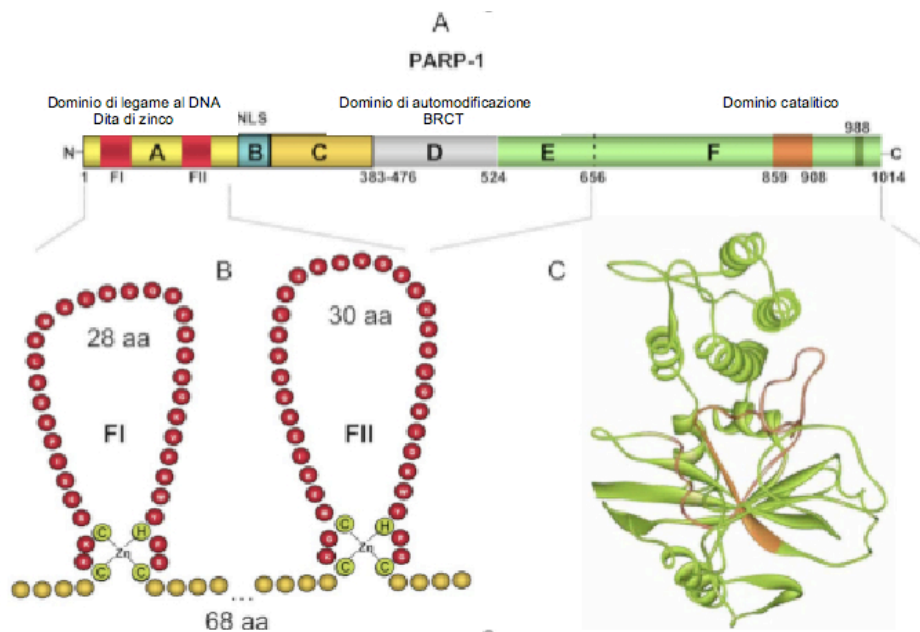
genotossici, vengono rapidamente sintetizzate e degradate quantità di PAR nel-l'ordine delle nanomoli, con una vita media inferiore ad 1 minuto. I polimeri hanno una elevata densità di cariche negative e perciò possono competere con il DNA per le interazioni elettrostatiche con le proteine basiche. I lunghi polime-ri legati covalentemente alle PARP sono capaci di interagire non covalentemente con proteine nucleari mediante un dominio, comune a numerose proteine, quali ad esempio p53, p21, DNA-PK [8].

PARP-1 ha una organizzazione modulare, in cui è possibile distinguere tre domini funzionali [99]:

- Il **dominio N-terminale** formato da due motivi *zinc finger* che fungono da sensori del danno al filamento di DNA e sono necessari per il legame con lo stesso acido nucleico.
- Il **dominio centrale di automodificazione** è molto ricco di residui di aci-do glutammico, che rappresentano i siti di legame per i polimeri di ADP-ribosio, e presenta un motivo *leucin zipper*, ed un motivo identificato con la porzione C terminale del gene del cancro alla mammella (BReast cancer C-Terminus) BRCT, responsabili delle interazioni proteina-proteina, come quelle che si instaurano tra le molecole di PARP e proteine accettrici con lo stesso motivo strutturale.
- Il **dominio catalitico**, che lega il  $\text{NAD}^+$  responsabile della sintesi di poli-meri, è evolutivamente conservato ed è presente in altre isoforme enzimati-che che vanno a definire una super-famiglia le cui componenti presentano localizzazione, struttura e funzioni diverse (Fig. 1.3 nella pagina seguente).

## 1.2.2 PARP-1 NEL RIPARO DEL DNA

Il modello prevede che PARP-1 riconosca il DNA danneggiato fungendo da "sen-sore del danno" [94]; il legame all'acido nucleico porta all'attivazione dell'enzima con la produzione di polimeri lunghi e ramificati, i quali agiscono da effettori re-clutando sul sito danneggiato i macchinari enzimatici nucleari. L'estensione del danno al DNA può determinare il tipo di risposta e l'esito della segnalazione. In-fine, la terminazione del segnale avviene attraverso la degradazione del polimeri ad opera della PARG, con il conseguente ripristino dello stato attivo di PARP-1. Anche PARP-2 prende parte a questo processo, sebbene in misura minore rispetto a PARP-1.



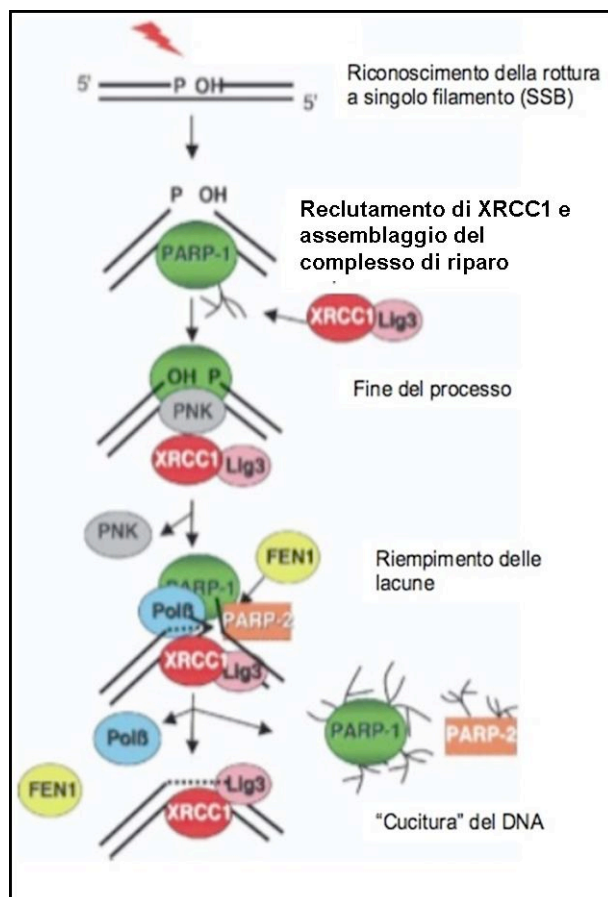
- (a) A: PARP-1 ha tre domini di struttura: il dominio N terminale in grado di legare il DNA (DBD), il dominio di automodificazione ed il dominio C terminale dove si trova il sito catalitico. B: il dominio di legame al DNA contiene due dita di Zinco che sono utilizzate per il legame al DNA. Il DBD contiene anche il segnale di localizzazione nucleare (NLS) nel quale si trova il sito per il clivaggio da parte delle caspasi. Il dominio di automodificazione presenta un motivo detto BRCT che rappresenta la porzione C terminale del gene del cancro alla mammella. C: Il diagramma rappresenta il dominio catalitico di PARP-1 (amminoacidi da 656 a 1014). Il dominio catalitico contiene un sito attivo di PARP-1 che è altamente conservato negli eucarioti e consiste di 50 amminoacidi (da 859 a 908). Modificata da Victoria Cepeda et al., *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2006; 1: 39-53.

Figura 1.3: Struttura molecolare di PARP-1.

Molti meccanismi sono quindi coinvolti nella regolazione attraverso PARP-1 nel sistema di riparo del DNA ad opera del BER. PARP-1 interagisce con molteplici componenti nucleari del riparo del danno a singolo filamento (SSRB) e del complesso di BER, compresa la DNA ligasi III che è un sensore dei tagli al DNA, il fattore XRCC1, gli effettori del riparo del DNA come la DNA polimerasi  $\beta$  e la DNA ligasi III. Il processo (Fig. 1.4 nella pagina successiva) prevede i seguenti punti:

1. riconoscimento del danno al DNA;
2. trasformazione ed amplificazione del segnale di danno, poli ADP-ribosilazione di PARP-1 (automodificazione) e degli istoni H1 e H2B (eteromodificazione), innesco del rilassamento della struttura cromatinica ed accesso degli enzimi di riparo al sito del danno;
3. reclutamento di XRCC1 al sito del danno (mediato dalla sua poli (ADP-ribosilazione), seguito dall'assemblaggio del complesso di riparo;
4. fine del processo: la chinasi polinucleotidica che è stimolata da XRCC1 converte le estremità libere del DNA inciso a 5'-fosfato e 3'-OH;
5. riempimento delle lacune mediante la DNA polimerasi, stimolata da PARP-1;
6. reazione di "cucitura" ad opera della DNA ligasi III.

La PARP-1 è coinvolta anche nella regolazione della trascrizione sia mediante interazione proteina-proteina che PAR-proteina [94]. PARP-1 può infatti rilassare la struttura cromatinica mediante rimozioni degli istoni dopo la poli ADP-ribosilazione rendendo il DNA accessibile al processo di trascrizione. Inoltre PARP-1 possiede la capacità di interagire a livello del promotore con sequenze *enhancers*, può fungere da co-regolatore trascrizionale interagendo con svariati fattori di trascrizione (ad esempio NF $\kappa$ B). Oltre ad essere coinvolto nel riparo del DNA, PARP-1 può anche agire come mediatore di morte cellulare. In presenza di un danno di scarsa entità al DNA, la PARP-1 può consentire il riparo ed agire come una molecola della sopravvivenza. Qualora il danno sia moderato, ma non riparabile, la cellula va incontro ad apoptosi e PARP-1 viene inattivato mediante digestione enzimatica delle caspasi. Il taglio di PARP-1 da parte delle caspasi rappresenta un evento precoce e probabilmente essenziale nell'avvio dei meccanismi di morte cellulare programmata. In presenza di danno elevato al DNA e, quindi, di iperattivazione di PARP-1, si verifica l'inibizione dell'assemblaggio



(a) Il sistema di riparo *short-patch*, che interviene dopo l'escissione di una base danneggiata (tagli indiretti), coinvolge il reclutamento della poli (ADP-ribosio) polimerasi 1 o 2, (PARP-1, o PARP-2), che innesca l'immediato reclutamento della proteina "scaffold" XRCC1, e l'assemblaggio del complesso di riparo del singolo filamento (SSBR). La chinasi polinucleotidica (PNK), stimolata da XRCC1, converte le parti finali danneggiate in 5'-fosfato e 3'-idrossile stimolando la DNA polimerasi  $\beta$  ( $pol\beta$ ) a sostituire il nucleotide danneggiato. L'entità (in termini di lunghezza dei nucleotidi) del riparo è controllata dall'endonucleasi 1 (FEN1) e da PARP-2. La fase finale del riparo è effettuata dalla DNA ligasi III (LigIII), controllata da XRCC1, che ricuce il taglio. Modificata da A. Huber et al. DNA Repair 3: 1103–1108, 2004.

Figura 1.4: *Pathways* di riparo del *base excision repair*.

di complessi trascrizionali, a causa delle repulsioni elettrostatiche tra i polimeri legati alla PARP-1 con conseguente blocco della trascrizione che consente di riparare il DNA danneggiato. L'iperattivazione della PARP induce la morte cellulare per necrosi, anche come conseguenza del depauperamento della scorta di NAD<sup>+</sup> e di ATP [10].

### 1.2.3 AGENTI METILANTI ED INIBITORI DI PARP

Gli agenti metilanti formano legami covalenti tra gruppi alchilici e nucleofili di molecole come il DNA. Essi cedono un solo gruppo alchilico e la loro interazione con il DNA genera addotti metilici a livello di posizioni delle basi azotate con conseguente azione citotossica e/o mutagena.

Nell'ambito degli agenti metilanti, rientrano farmaci di interesse clinico come la temozolomide (TMZ) [97] e la dacarbazina (DTIC). La TMZ è in grado di superare la barriera ematoencefalica [11]; è infatti una molecola lipofila e per tale motivo è anche bene assorbita dopo somministrazione orale ed ha un'elevata diffusione tissutale. L'intermedio attivo della TMZ è il composto 5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carbossamide (MTIC) che si forma spontaneamente dall'idrolisi della TMZ (nel caso della dacarbazina deriva dalla sua attivazione metabolica) ed interagisce con il DNA metilandolo.

L'interazione della TMZ con il DNA genera un ampio spettro di addotti metilici tre dei quali sono: la N7-Metilguanina (N7-MeG), la N3-Metiladenina (N3-MeA) e l'O<sup>6</sup>-Metilguanina (O<sup>6</sup>-MeG). Anche se la N7-MeG è quantitativamente la lesione prevalente (~65-80%), questo addotto sembra avere una scarsa tossicità, invece la N3-MeA non riparata è una lesione altamente tossica presumibilmente perchè questo addotto impedisce il contatto tra la DNA polimerasi e l'adenina nel filamento stampo del DNA [12]. Tuttavia la bassa percentuale di addotti N3-MeA (~8-12%) generati da TMZ è prontamente riparata, insieme alla N7-MeG dal BER (*short patch*) che sostituisce un singolo nucleotide modificato, come descritto in precedenza.

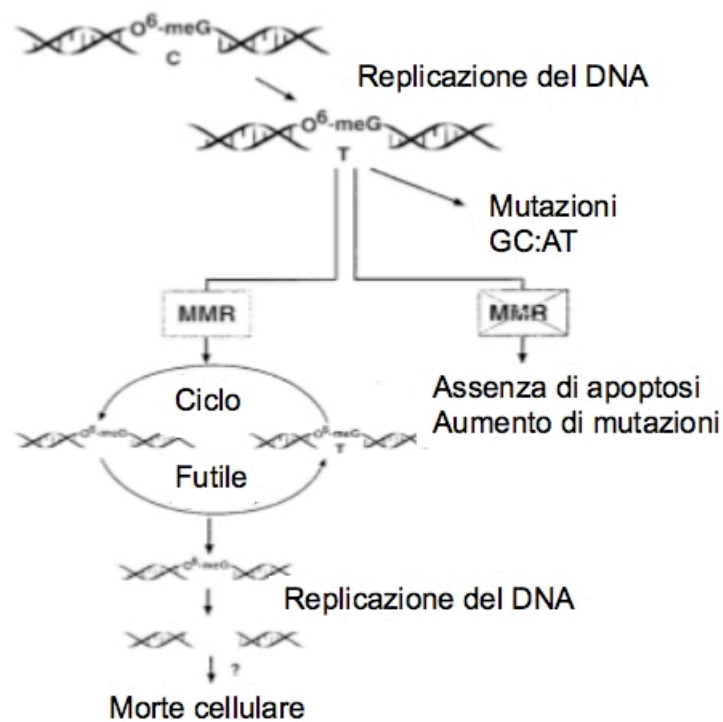
L'O<sup>6</sup>-MeG nonostante sia prodotta in bassa percentuale (~8%) è generalmente considerata la lesione più tossica e mutagena tra quelle prodotte dagli agenti metilanti. La citotossicità dell'O<sup>6</sup>-MeG è fortemente influenzata dai livelli enzimatici della MGMT, responsabile della rimozione del metile in posizione O<sup>6</sup> della guanina grazie alla sua capacità di riconoscere e trasferire l'addotto metilico ad un proprio residuo di cisteina [13]. Questo porta all'auto-inattivazione dell'enzima poichè il sito accettore del gruppo metilico non viene più rigenerato [14]. Il numero degli O<sup>6</sup>-metil addotti riparato dipende dal numero delle molecole di MGMT

presenti all'interno della cellula e dalla velocità di sintesi del nuovo enzima. Nelle cellule neoplastiche sono presenti livelli di MGMT estremamente variabili che rendono i tumori più o meno sensibili ai metilanti.

Quando la cellula tumorale esprime basse concentrazioni di MGMT, gli O<sup>6</sup>-metil addotti non vengono riparati e la cellula avvia il programma di morte cellulare (apoptosi) [15]. Infatti, se gli addotti metilici in posizione O<sup>6</sup> della guanina non sono rimossi dalla MGMT l'O<sup>6</sup>-MeG forma appaiamenti alterati con la citosina o la timina con conseguente attivazione del MMR che pur riconoscendo questo errato appaiamento non è in grado di portare a termine il riparo in quanto rimuove la citosina o la timina stessa ma non la guanina metilata. La DNA polimerasi non potendo reperire la base complementare all'O<sup>6</sup>-MeG, provoca la ripetuta attivazione del MMR. Questo continuo attivarsi inutilmente del MMR, che scinde la base appaiata male per reinserire la citosina o la timina nel filamento di DNA complementare a quello contenente la O<sup>6</sup>-MeG provocano rotture a singolo e a doppio filamento, arresto della crescita e/o induzione del processo apoptotico (Fig. 1.5 nella pagina seguente)[16, 17].

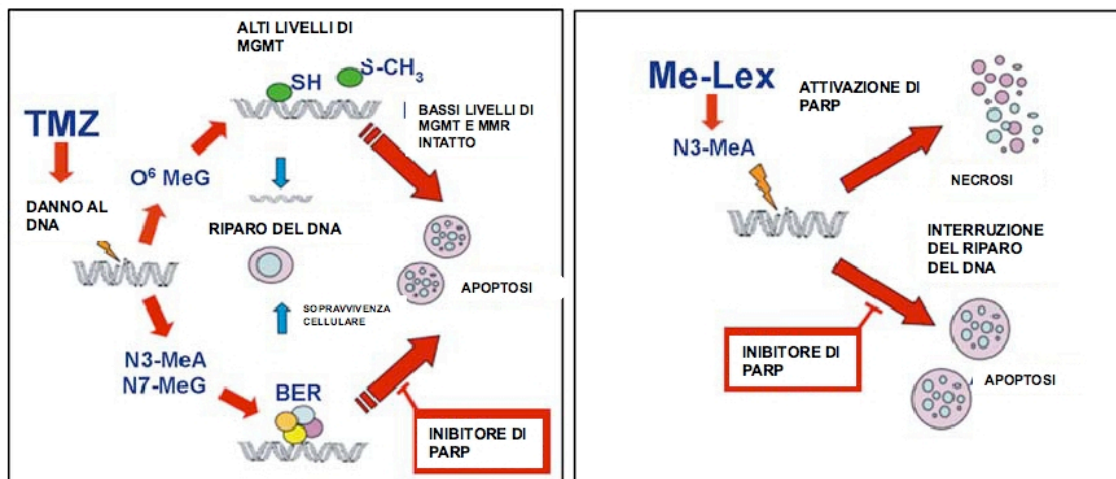
Se è presente un'alterazione funzionale del MMR le cellule tumorali diventano resistenti all'O<sup>6</sup>-MeG; anche inibendo totalmente l'attività dell'MGMT le cellule MMR-negative sono resistenti all'azione dei farmaci metilanti. Le cellule con un MMR difettivo, sono geneticamente instabili ed il chemioterapico stesso può contribuire ad aumentare la possibilità di danni genetici con il rischio di insorgenza di tumori secondari [18] (Fig. 1.6 nella pagina 18).

In cellule con livelli elevati di MGMT o con un'alterazione funzionale del MMR, la suscettibilità alla TMZ può essere ristabilita utilizzando inibitori di PARP. Per ciò che concerne il chemio-potenziamento, i dati ottenuti utilizzando inibitori di PARP o ricavati da studi su topi *knockout* per la proteina PARP-1 o PARP-2, indicano che la soppressione dell'attività di PARP aumenta la suscettibilità cellulare agli agenti genotossici ed inibisce i sistemi di riparo del DNA. La maggior parte degli inibitori di PARP sono formati da un gruppo carbossiammide con attaccato un anello aromatico che mima la porzione nicotinammidica del NAD<sup>+</sup>, [19] il substrato di PARP, oppure sono formati da un gruppo carbammile costruito su uno scheletro eterociclico poliaromatico [20]. Questi inibitori, agiscono come analoghi del NAD<sup>+</sup>, impedendo il legame della nicotinamide al dominio catalitico di PARP [21][22][23]. Farmaci con caratteristiche strutturali analoghe alla nicotinamide, come la benzammide ed i suoi derivati, sono stati i primi ad essere studiati come inibitori di PARP. Tuttavia, queste molecole si sono dimostrate dei deboli inibitori di attività e causano altri effetti non correlati con l'inibizione di PARP.



(a) Il riconoscimento delle basi appaiate male di  $O^6\text{-MeG:C}$  o  $O^6\text{-MeG:T}$  determina l'inizio del ciclo futile da parte del MMR. La replicazione della base non metilata rimossa dal MMR, induce rotture a doppio filamento del DNA e la morte cellulare. Modificata da Aquilina G. and Bignami M. Mismatch Repair in Correction of Replication Errors and Processing of DNA Damage, *Journal of Cellular Physiology*, 2001; 187: 145-154.

Figura 1.5: Ruolo del MMR nella tossicità degli agenti metilanti.



(a) Meccanismi molecolari di citotossicità indotti da composti metilanti come singoli agenti od in combinazione con inibitori di PARP. Pannello a sinistra: la TMZ genera una serie di addotti come l'O<sup>6</sup>-MeG, che è riparato da alti livelli di MGMT, e N<sup>3</sup>-MeA o N<sup>7</sup> MeG che sono entrambe rimosse dal BER. Nelle cellule con bassi livelli di MGMT e MMR intatto le O<sup>6</sup>-MeG, non riparate, innescano apoptosi. L'inibizione di PARP impedisce il reclutamento dei componenti del BER coinvolti nel processo di riparo delle N-metilpurine; questi risultati determinano rotture all'elica del DNA ed apoptosi. Pannello a destra: l'agente metilante Me-Lex provoca attivazione di PARP ed conseguente necrosi; l'aggiunta di inibitori di PARP cambia la modalità di morte cellulare da necrosi ad apoptosi.

Figura 1.6: Meccanismi molecolari di citotossicità indotti da composti metilanti come agenti singoli o in combinazione con inibitori di PARP.

Seguendo un approccio farmacologico più razionale, sono stati sintetizzati nuovi e più potenti inibitori di PARP, che però non sono selettivi tra PARP-1 e PARP-2. Gli studi preclinici *in vivo* ed *in vitro* stanno dando risultati molto promettenti sull'utilizzo di questi nuovi inibitori di PARP nella ricerca di differenti strategie farmacologiche per la terapia del cancro [23]. In particolare, l'inibizione dell'attività PARP è in fase di sperimentazione clinica per aumentare la sensibilità dei tumori resistenti alla TMZ.

Il meccanismo alla base dell'aumento di sensibilità alla TMZ è da ricondurre all'interruzione del processo di riparo delle N-metilpurine, mediato dal BER, dopo l'iniziale rimozione delle basi metilate ad opera della MPG. Infatti, la successiva incisione del filamento di DNA ad opera della APE non potrà essere riparata in quanto l'inibizione della funzione coordinatrice di PARP interromperà il processo di riparo mediato dal BER. Il trattamento delle cellule tumorali con differenti inibitori di PARP prima dell'esposizione alla TMZ, incrementa il numero di rotture dei filamenti di DNA con induzione di apoptosi e inibizione della crescita cellulare.

Un altro agente metilante altamente tossico, soprattutto nelle cellule leucemiche con bassi livelli o assenza di MPG, è il MeOSO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>lexitropsina (Me-Lex).

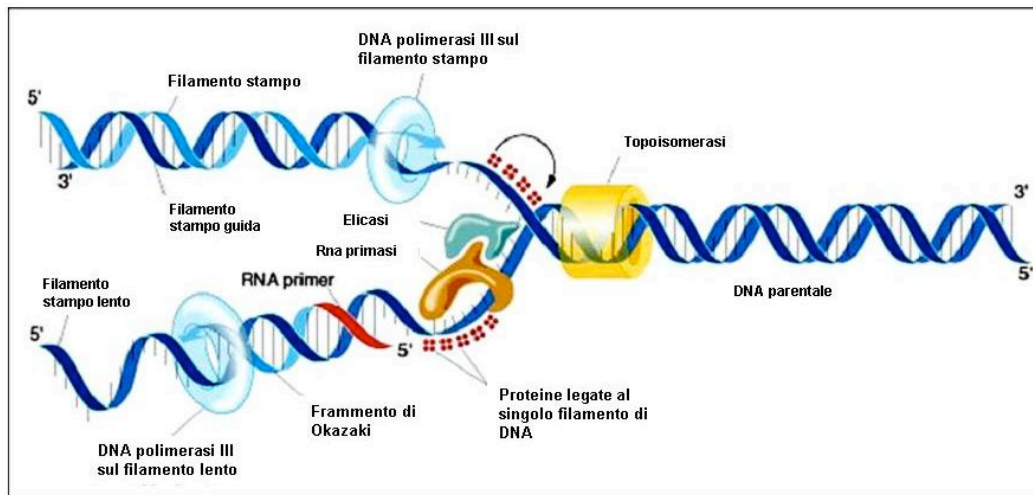
Tale agente metilante è l'unico in grado di generare selettivamente addotti N3-MeA (>99%); diversamente dalla TMZ la sensibilità al Me-Lex non è influenzata dallo stato funzionale del MMR [24, 25, 26, 27].

La necrosi è la modalità di morte cellulare prevalente indotta dal Me-Lex ed è probabilmente il risultato dell'elevata attivazione di PARP, che avviene pochi minuti dopo il trattamento con il farmaco prima della precoce perdita del potenziale mitocondriale. La combinazione di Me-Lex ed inibitori di PARP induce un marcato effetto inibitorio della crescita, associato ad un'inibizione di c-Myc, provocando rotture a singolo filamento e l'apoptosi [24]. Quindi l'aggiunta di inibitori di PARP sposta semplicemente la modalità di morte cellulare da necrotica ad apoptotica come conseguenza dell'interruzione del processo di riparo delle metilpurine mediato dal BER (Fig. 1.6 nella pagina precedente). L'effetto apoptotico derivante dal cotrattamento con inibitori di PARP e Me-Lex è evidente soprattutto in quei tumori con alti livelli di MPG che sono resistenti alla necrosi indotta da agenti metilanti [24].

#### 1.2.4 INIBITORI DELLA TOPOISOMERASI I

La topoisomerasi I è un enzima essenziale che rilassa la superelica di DNA, attraverso la generazione di tagli transitori nel singolo filamento dell'elica; ciò favorisce la replicazione del DNA e la trascrizione di RNA. Durante questo processo, la topoisomerasi I è legata in maniera covalente alla doppia elica del DNA e forma corti intermedi tagliati (complesso clivabile), causando la rotazione intorno al filamento non tagliato dell'elica del DNA ed il rilassamento dell'elica. Infine la ricongiunzione del filamento di DNA tagliato ristabilisce l'integrità del DNA ed è seguita dalla dissociazione dell'enzima dalla doppia elica (Fig. 1.7 nella pagina successiva).

La camptotecina ed i suoi derivati di interesse clinico irinotecano e topotecano sono potenti inibitori della topoisomerasi I [28]. Questi farmaci legano in modo non covalente il complesso topoisomerasi-DNA stabilizzando il complesso clivabile ed impedendo la fase di ricongiunzione. Dal momento che questa interazione è reversibile, la citotossicità avviene solo quando la forcella di replicazione incontra un complesso clivabile, il quale è perciò convertito in una rottura permanente a doppio filamento del DNA.



(a) Le Topoisomerasi sono enzimi ubiquitari, presenti in eucarioti, procarioti e virus, che hanno il compito di risolvere i superavvolgimenti del DNA per permettere lo svolgimento delle funzioni cellulari vitali, trascrizione e replicazione. Modificata da Stewart L. Science, 1998; 279: 1534-1541.

Figura 1.7: Ruolo biologico della Topoisomerasi I.

### 1.2.5 ANGIOGENESI E PARP-1

L'angiogenesi consiste nella formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da quelli pre-esistenti ed è un processo complesso che di solito avviene sotto lo stretto controllo di fattori che la stimolano o la inibiscono [29]. A seconda del tipo di vaso, attorno alla struttura basale possono organizzarsi cellule di sostegno, cellule muscolari lisce e una matrice extracellulare. In questo modo si realizza un sistema vascolare ordinato che in modo efficace rilascia ai tessuti sani le sostanze nutritive.

L'angiogenesi si divide in 4 fasi principali:

- 1) Vasodilatazione.
- 2) Destabilizzazione del vaso e degradazione della matrice.
- 3) Proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali
- 4) Formazione del lume e stabilizzazione del vaso [30].

Il fattore fondamentale che regola il processo fisiologico di angiogenesi è il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). L'angiogenesi mediata dal VEGF rappresenta uno dei meccanismi principali attraverso il quale, nelle normali condizioni fisiologiche, avviene il controllo del livello di vascolarizzazione dei tessuti.

Come per i tessuti sani, anche per i tumori solidi l'accrescimento e la sopravvivenza dipendono dalla presenza di una estesa rete di vasi sanguigni. Inoltre,

la capacità del tumore di formare metastasi dipende, in grande misura, dallo sviluppo di una propria vascolarizzazione. L'angiogenesi patologica [31] è quindi essenziale per la progressione maligna dei tumori solidi. I tumori di piccole dimensioni, con un diametro inferiore ai 2 millimetri, sono quiescenti e si nutrono per semplice diffusione. Tuttavia per il proprio sviluppo il tumore deve conquistare l'accesso alla vascolarizzazione dell'ospite e creare una propria vascolarizzazione. Per raggiungere questo obiettivo i tumori si sottopongono a un processo detto *switch* angiogenico [32] (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi). Questo *switch* deriva dallo squilibrio tra i fattori pro-angiogenici e quelli anti-angiogenici in seguito ad alterazioni della loro espressione.

Gli induttori di angiogenesi possono essere classificati in 3 classi:

- 1- VEGF e Angiopietina;
- 2- Chemochine e Citochine. Il prototipo è FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor*);
- 3-TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) e TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*).

Nello sviluppo del tumore si distinguono due fasi: una avascolare di quiescenza delle piccole lesioni (<2mm) e una seconda fase nella quale la crescita tumorale necessita della vascolarizzazione [33]. Il VEGF rilasciato dal tumore agisce a livello dei recettori presenti sulle cellule endoteliali, attivando l'angiogenesi. In tal modo il VEGF stimola la formazione di una vascolarizzazione nuova e immatura che rende possibile un'ulteriore crescita tumorale. A causa del rapido accrescimento tumorale l'apporto di ossigeno e delle sostanze nutritive diviene inadeguato, dando luogo ad aree di ipossia. L'ipossia stimola un'ulteriore produzione di VEGF, che a sua volta stimola la formazione di nuovi vasi. Una volta che il tumore è entrato nella fase vascolare, la formazione di nuovi vasi prosegue durante tutta la crescita tumorale. Il VEGF agisce anche come fattore di permeabilità vascolare [29], grazie alla sua capacità di indurre la fenestrazione dei vasi (formazione di falle nella parete vascolare) e di aumentare la permeabilità del microcircolo.

Il TNF- $\alpha$  stimola l'angiogenesi indirettamente poiché, liberato all'esterno dei vasi sanguigni, agisce su macrofagi, mastociti, cellule endoteliali e tumorali stimolandoli a produrre i fattori ad azione pro-angiogenica diretta. Aumenta, infatti, l'espressione di VEGF, VEGFR, IL-8 e FGF-2.

Il coinvolgimento di PARP-1 nelle malattie su base infiammatoria e gli effetti protettivi degli inibitori di PARP sono stati dimostrati in diversi modelli sperimentali. PARP-1 aumenta l'attività di svariati fattori di trascrizione regolando l'espressione di mediatori dell'infiammazione, molecole di adesione e citochine infiammatorie che favoriscono la risposta angiogenica [34][35]. Sebbene in let-

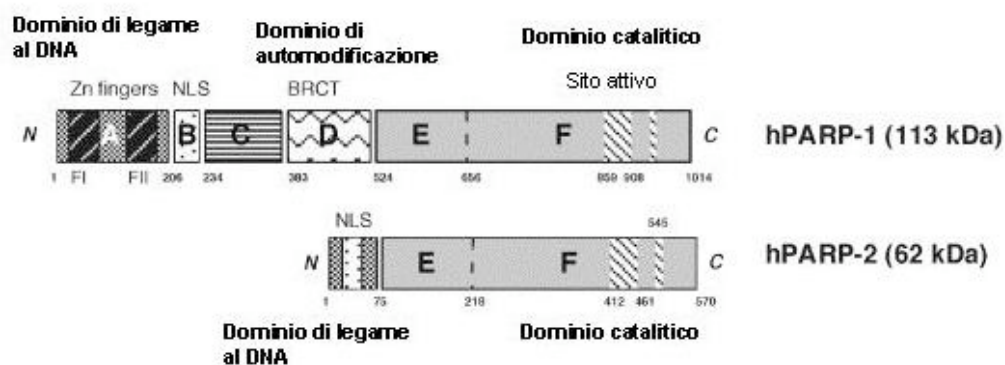
teratura è stato descritto il ruolo di PARP nell'infiammazione ci sono pochi dati disponibili sul suo ruolo nell'angiogenesi tumorale.

Abbiamo recentemente dimostrato [36] che l'inibizione farmacologica di PARP-1 o l'assenza della sua espressione (topi *knock-out* per PARP-1) riducono marcatamente l'angiogenesi. Le cellule endoteliali trattate con basse dosi di inibitori di PARP non sono più in grado di migrare in risposta al VEGF o al *Placental Growth Factor* (PlGF) un membro della famiglia del VEGF, coinvolto nella vascolarizzazione tumorale. L'inibizione di PARP in queste cellule è anche associata alla ridotta formazione di strutture vascolari in risposta al matrigel, una matrice artificiale che mima la membrana basale. La ridotta migrazione delle cellule endoteliali in presenza dell'inibitore di PARP si osserva quando le cellule sono stimulate dal VEGF o dal PlGF, ma non si verifica in risposta al *Epidermal Growth Factor* (EGF); questo suggerisce una potenziale influenza dell'inibitore di PARP selettivamente verso membri della famiglia del VEGF. Anche altri autori hanno messo in evidenza un ruolo di PARP-1 nell'angiogenesi [37]. Questo effetto è attribuito alla modulazione di fattori di trascrizione che sono ampiamente coinvolti nelle risposte cellulari, quali la proliferazione, l'infiammazione e l'angiogenesi. In particolare, una riduzione della vascolarizzazione tumorale ed una modulazione negativa di geni coinvolti nell'angiogenesi è stata dimostrata in modelli *in vivo* di carcinogenesi cutanea, in topi PARP-1 *knockout* o topi trattati con l'inibitore di PARP. Inoltre, fibroblasti esposti a 20  $\mu$ M di inibitore di PARP, o derivati dai topi PARP-1 *knockout* mostrano una mancata induzione di HIF-1 $\alpha$ , un fattore di trascrizione coinvolto nell'angiogenesi, attraverso la regolazione positiva dell'espressione di VEGF [38].

### 1.2.6 PARP-2

Dei 18 membri della famiglia PARP l'unico altro componente attivato dalle rotture del DNA è PARP-2 [9]. PARP-2 è un enzima di 62 kDa DNA-dipendente, nei fibroblasti embrionali derivanti da topi *knockout* per PARP-1 [39]. PARP-2 è responsabile solo per il 10-15% dell'attività totale di PARP nelle cellule ed ha un'organizzazione modulare in cui si possono evidenziare due domini strutturali:

1. Il **domino presente nella regione N-terminale**, di 75 aa, responsabile sia della localizzazione di PARP-2 nel nucleo che del riconoscimento delle interruzioni sul DNA. Esso contiene il dominio di legame al DNA (DBD), altamente basico, il segnale di localizzazione nucleare (NLS) ed segnale di lo-



(a) NLS= segnale di localizzazione nucleare; BRCT=dominio carbossi-terminale relativo al gene del cancro alla mammella; Zn finger=dominio a dita di zinco. Modificata da Yelamos J. et al. Trends Mol Med., 2008; 14: 169-178.

Figura 1.8: Strutture dei domini di PARP-1 e PARP-2.

calizzazione nucleolare (NoLS). Il DBD di PARP-2 è strutturalmente diverso da quello di PARP-1, riflettendo, probabilmente, le differenze nelle strutture del DNA che sono riconosciute da ogni singolo enzima [40]. Infatti, a differenza di PARP-1, PARP-2 si lega in modo meno efficiente alle rotture a singolo filamento del DNA, mentre ha una grande affinità per i *gaps* strutturali che corrispondono ad intermedi del riparo molto più avanzati nella fase del processo [41].

2. Il **dominio catalitico** che è molto simile a quello di PARP-1, con una similitudine pari al 70% eccetto in vicinanza del sito accettore, molto probabilmente specifico per i substrati proteici [42]. Il motivo E del dominio catalitico interagisce sia come interfaccia di vari *partners*, che come dominio di automodificazione [43](Fig. 1.8).

PARP-2 presenta analogie e differenze con PARP-1: è in grado, infatti, di modificare la cromatina, ma a differenza di PARP-1 che trasferisce polimeri di ADP-ribosio sull'istone H1, PARP-2 modifica l'istone H2B. PARP-2, inoltre, interagisce con PARP-1, ed entrambi condividono gli stessi bersagli coinvolti nel riparo di rotture a singolo filamento del sistema BER: XRCC1, la DNA polimerasi- $\beta$  e la DNA ligasi [43].

PARP-1 e PARP-2 mostrano differenti cinetiche di reclutamento a livello del sito del DNA danneggiato: mentre PARP-1 si accumula velocemente e in modo transitorio, PARP-2 mostra un ritardato e persistente accumulo [44]. L'accumu-

lo di PARP-2 dipende dall'attività di PARP-1. Il reclutamento di XRCC1 al sito danneggiato è dipendente dall'attività di PARP-1 ma non da PARP-2 [40].

Queste osservazioni, indicano un possibile coinvolgimento di PARP-2 nelle fasi tardive del processo di riparo. Quindi PARP-1 e PARP-2 svolgono due distinti ruoli nell'organizzazione spazio-temporale dei processi che coinvolgono il BER.

PARP-1 e PARP-2 interagiscono anche con proteine coinvolte nella struttura del cinetocore e nel punto di controllo del fuso mitotico. Alcuni bersagli specifici di PARP-2 sono stati scoperti solo di recente; ad esempio, uno di questi è la proteina telomerica TRF2 suggerendo un ruolo di PARP-2 nel controllo dell'integrità telomerica [45].

Un recente studio ha dimostrato che PARP-2, ma non PARP-1, è un importante mediatore della sopravvivenza delle cellule T durante la timopoiesi prevenendo l'attivazione di risposte apoptotiche dipendenti da danni al DNA [40]. Inoltre, in accordo con il ruolo degli enzimi PARP come modulatori epigenetici della funzione fisiologica, PARP-2 è implicato sia nei processi meiotici che in quelli post-meiotici, infatti topi PARP-2 KO esibiscono una grave compromissione della spermatogenesi [46]. L'inibizione selettiva di PARP-2 è ancora oggetto di studi e punta principalmente sulla bassa identità di sequenza, che PARP-2 ha per il dominio di legame al DNA, rispetto a PARP-1. Pellicciari R. [47] ha recentemente riportato la preparazione e la valutazione di una serie di derivati isoquinolinoni come potenziali inibitori selettivi per PARP-2. Tra questi è stato identificato il composto UPF1035 come potente inibitore per PARP-2 con una selettività 60 volte maggiore per PARP-2 rispetto a PARP-1.

### 1.3 CICLO CELLULARE

Il ciclo cellulare è un complesso processo coinvolto nella crescita e proliferazione cellulare, nello sviluppo degli organismi, nella regolazione del riparo del DNA danneggiato e nelle malattie quali il cancro. La maggior parte del ciclo cellulare è occupata dall'interfase o intercinesi, compresa tra la fine di una mitosi e l'inizio della successiva. L'interfase si suddivide in una fase G1, una fase S e una fase G2. La fase G1, segue immediatamente la mitosi. La durata di questa fase, che varia a seconda della natura della cellula, è breve: oscilla da 5 a 10 ore in cellule di mammiferi con elevato ritmo riproduttivo, è rallentata nelle cellule cancerose, talvolta è persino nulla. La cellula può abbandonare il pool proliferativo per differenziarsi, allora la fase G1 corrisponderà a una fase di crescita e di differenziazione. La

fase S è caratterizzata dalla duplicazione di tutto il DNA nucleare. La fase G2 è piuttosto breve, dura 4-5 ore, ed inizia quando la replicazione si è completata.

### 1.3.1 LA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

La progressione del ciclo cellulare è regolata, principalmente, da complessi proteici enzimatici che contengono una subunità catalitica, la proteina chinasi ciclina-dipendente (Cdk) e una subunità regolatrice la ciclina [48]. Le Cdk sono proteine chinasi a serina/treonina che sono attivate in punti specifici del ciclo cellulare [49, 50, 51].

L'attività enzimatica dei complessi ciclina-Cdk consente di fosforilare gruppi di proteine necessarie per la transizione da una fase all'altra del ciclo.

Sino ad ora sono state identificate 9 Cdk, di queste solo 5 sono attive nel ciclo cellulare: durante la fase G1 operano Cdk-4, Cdk-6 e Cdk-2, in fase S Cdk-2 ed in fase G2/M Cdk-1. La progressione attraverso le varie fasi del ciclo avviene secondo un processo biochimico in cui specifiche cicline si legano ed attivano sequenzialmente distinte Cdk [52]. Infatti, a differenza delle Cdk, presenti a livelli costanti durante tutte le fasi del ciclo, le cicline vengono ciclicamente sintetizzate e degradate nel corso del ciclo di divisione cellulare [53]. La variazione delle loro concentrazioni avviene con modalità finemente regolate e specifiche per ogni tipo di ciclina. Infatti le cicline contengono delle sequenze PEST, proteine con motivi ricchi in prolina (P), glutammato (E), serina (S) e treonina (T), che sono bersaglio per la degradazione attraverso l'ubiquitinazione a tempi specifici.

### 1.3.2 SISTEMI DI CONTROLLO DEL CICLO CELLULARE

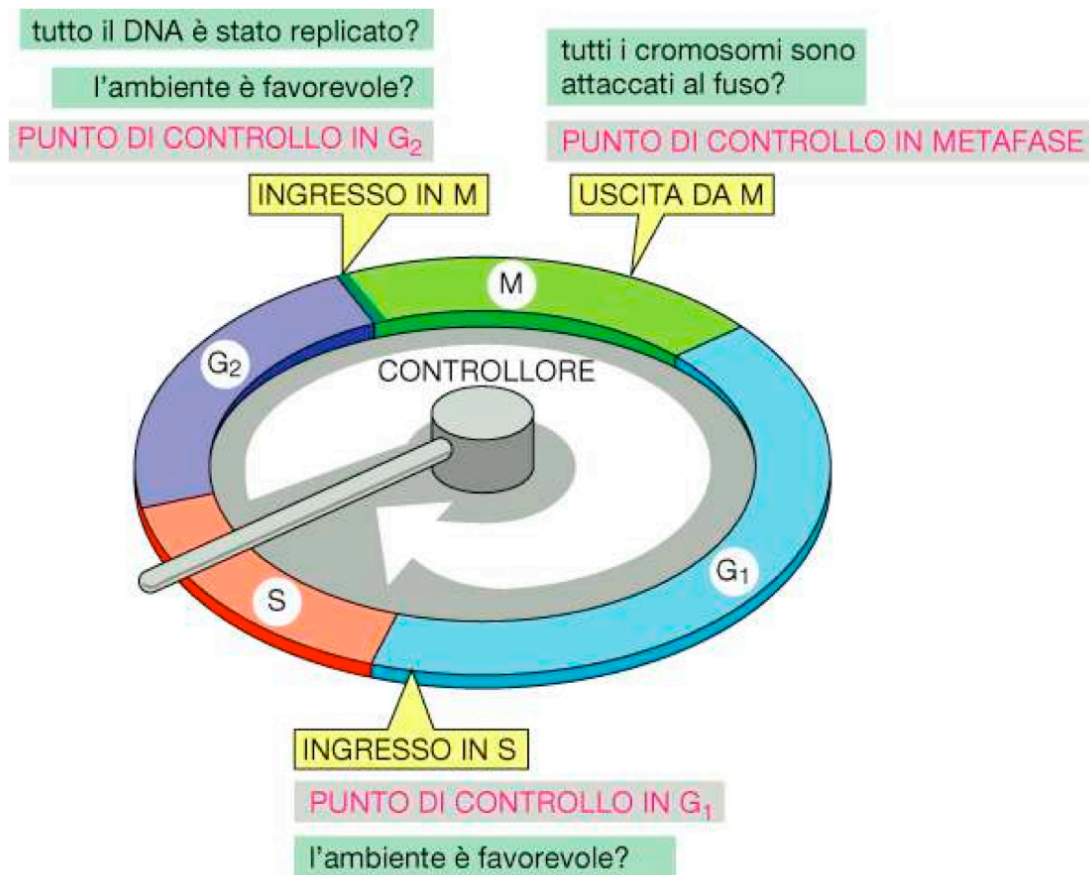
Le cellule posseggono molti sistemi di controllo del ciclo cellulare, chiamati "*checkpoints*", che sono attivati in momenti diversi del ciclo e in grado di bloccarne la progressione nel caso in cui si verificano degli errori in qualche fase di tale processo.

Esistono 4 *checkpoints* che agiscono a livello delle principali transizioni del ciclo cellulare :

La cellula in fase G1 accresce le sue dimensioni. Al termine di questa fase troviamo il

- **G1 *checkpoint***: controllo delle dimensioni cellulari, della presenza di un ambiente favorevole

Superato il primo checkpoint la cellula entra in fase S e duplica il proprio materiale genetico.



(a) Modificata da Vermeulen K. et al. Cell Prolif., 2003; 36:131-149.

Figura 1.9: Ciclo cellulare.

- **G1/S checkpoint:** controllo dell'assenza di danni genetici.

Successivamente entra in fase G2, durante la quale si accresce nuovamente. Al termine di questa fase troviamo il

- **G2 checkpoint:** controllo delle dimensioni, della completa duplicazione e dell'integrità di tutto il materiale genetico. È durante questo checkpoint che vengono riparati gli eventuali danni rilevati al DNA.

A questo punto la cellula entra in fase M, durante la quale incontriamo l'ultimo checkpoint

- **M checkpoint:** controllo dell'assemblamento corretto dei cromosomi al fuso mitotico (Fig. 1.9).

I *checkpoint*, possono dividersi in intrinseci, che agiscono in un ciclo cellulare imperturbato ed estrinseci, che agiscono solo in risposta ad agenti esterni.

I *checkpoint* intrinseci assicurano la corretta successione temporale ed il corretto svolgimento delle varie fasi che costituiscono il ciclo cellulare. I *checkpoint* *estrinseci* vengono attivati in presenza di situazioni esterne che mettono a rischio la corretta progressione del ciclo cellulare. Un esempio di *checkpoint* estrinseco è il *checkpoint* da danno al DNA.

Il *checkpoint* da danno al DNA (Fig. 1.12 nella pagina 31) è un tipo particolare di *checkpoint* estrinseco che, in presenza di danni al DNA, si attiva, inducendo un blocco del ciclo cellulare a livello delle transizioni G1/S, G2/M ed anche in fase S. Oltre a questa risposta principale, il *checkpoint* da danno al DNA induce la trascrizione di geni riparativi, modula l'attività dei sistemi di riparazione ed è in grado di indurre l'apoptosi.

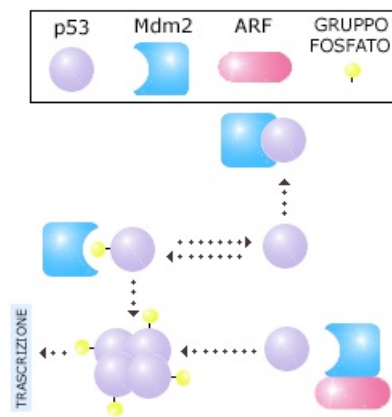
I *checkpoints* del danno al DNA si avvalgono dell'intervento di:

1. Proteine “**sensore**” del danno;
2. Proteine “**mediatrici**”: sono proteine in grado di facilitare l'attivazione di ATM (*A*taxia *T*elangiectasia *M*utated), ed ATR (*A*taxia *T*elangiectasia and *R*ad-3-related); le più conosciute sono: 53BP1 (*p*53 *B*inding *P*rotein 1), MDC1 (*M*ediator of *D*N*A* *d*amage *C*heckpoint 1), TopBP1 (*T*opoisomerase *B*inding *P*rotein 1) e BRCA1 (*B*reast *C*ancer susceptibility gene 1);
3. Proteine “**trasduttrici**”: ATM, ATR, Chk1 e Chk2;
4. Proteine “**effettrici**” come p53, Cdc25, p21 (wee1) che inattivano le Cdk inibendo la progressione del ciclo cellulare.

### **Checkpoint G1/S**

I danni alla doppia elica del DNA, riguardanti la transizione G1/S, innescano l'attivazione di ATM che fosforila molte proteine tra cui BRCA1 [54], NBS1 [55], Chk2 e p53 [56, 57] così come se stessa [58]. La chinasi Chk-2, a sua volta, fosforila la fosfatasi Cdc25A, favorendo l'ubiquitinazione e la degradazione della fosfatasi stessa e prevenendo l'attivazione della ciclina E/Cdk-2. L'arresto del ciclo in G1-S è anche dipendente dalla proteina oncosoppressore p53.

La p53 (55 kDa) è una proteina altamente instabile che in genere viene degradata per proteolisi subito dopo la sua stessa sintesi. Ha una emivita di circa 20 minuti. Allo stato stazionario la concentrazione di p53 in queste cellule è molto bassa ma i danni al DNA determinano la rapida induzione dell'attività della p53. La p53 è una fosfoproteina molto versatile perché innesca reazioni che determinano la comparsa di varie risposte cellulari.



(a) Quando p53 è complessata ad Mdm-2 non è attiva. L'interazione tra Mdm2 e p53 è regolata sia dalla fosforilazione di p53 (che inibisce l'interazione con Mdm2) oppure dal sequestro di Mdm2 da parte di ARF. Modificata da T Van Maerken et al. Cell Death and Differentiation, 2009; 16: 1563–1572.

Figura 1.10: Meccanismo di regolazione di p53.

In condizioni fisiologiche cioè in cellule non sottoposte a stress, la degradazione di p53 è sotto il controllo di una proteina nota come Mdm2, che agisce da regolatore negativo. Questa proteina si lega a p53 nel nucleo e ne blocca l'attività di fattore di trascrizione, favorendo la sua poliubiquitilazione, esportazione nel citoplasma e degradazione nel proteasoma. Tra i molto geni regolati da p53 c'è proprio Mdm2, che assicura che i livelli di p53 in una cellula non sottoposta a stress si mantengano bassi. A seguito invece di alcuni stress o di danni al genoma, p53 può essere fosforilata nel suo dominio N-terminale da alcune chinasi che rilevano il danno al DNA (tra cui Chk2, ATM, ATR). Le stesse chinasi fosforilano anche la proteina Mdm2 [59, 60], provocandone l'inattivazione funzionale (Fig. 1.10); in seguito a queste due fosforilazioni aumentano i livelli e la concentrazione di p53 che potrà regolare i suoi geni *target* ed evocare una serie di risposte:

- Può avere un effetto citostatico (arresto del ciclo cellulare) irreversibile (senescenza) o reversibile (ritorno alla proliferazione);
- Può mobilitare proteine di riparo del DNA;
- Può indurre apoptosi [61];
- Può mobilitare proteine che bloccano la formazione dei vasi.

### Checkpoint S

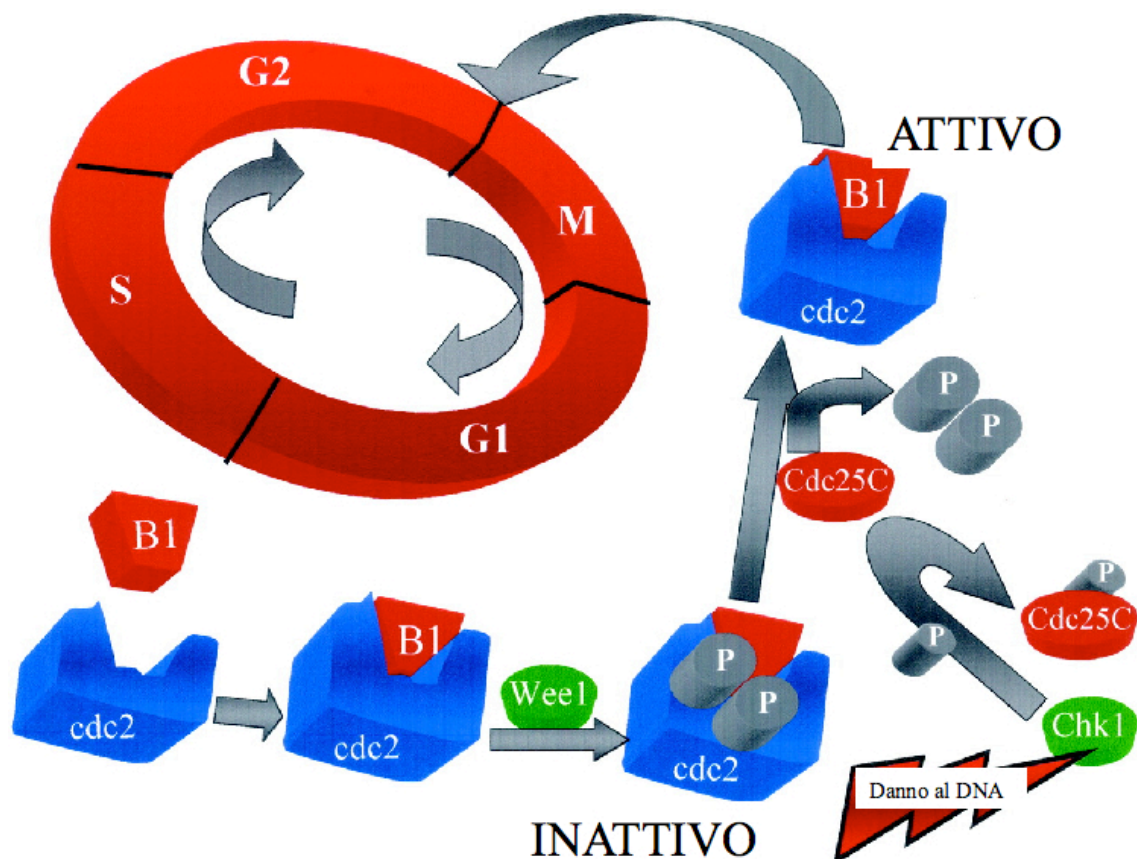
Il collasso o il blocco della forcella di replicazione attiva ATR. ATR è stato scoperto nel genoma umano come un omologo di ATM e di SpRad3 (da qui il nome di ATR). Come ATM, ATR è in grado di fosforilare residui di serina e treonina, ma diversamente da quest'ultimo, non si rilevano cambiamenti misurabili della sua attività chinastica in conseguenza di un danno al DNA, suggerendo che ATR possa normalmente svolgere un'attività chinastica e che il suo ruolo nello specifico sia correlato alla sua localizzazione nella cellula.

Una volta che ATR attivato è traslocato sui foci di replicazione del DNA, fosforila la chinasi Chk1; Chk-1 fosforila, a sua volta la fosfatasi Cdc25A, facilitando in questo modo il riconoscimento da parte del complesso ubiquitina-ligasi e la sua degradazione proteolitica. L'ubiquitinazione limita, così la sua capacità di far progredire il ciclo attraverso la fase S. ATR sembra comunque essere una chinasi multifunzionale che svolge molteplici ruoli nella regolazione di molti eventi tra la fase S e quella M.

#### ***Checkpoint G2/M***

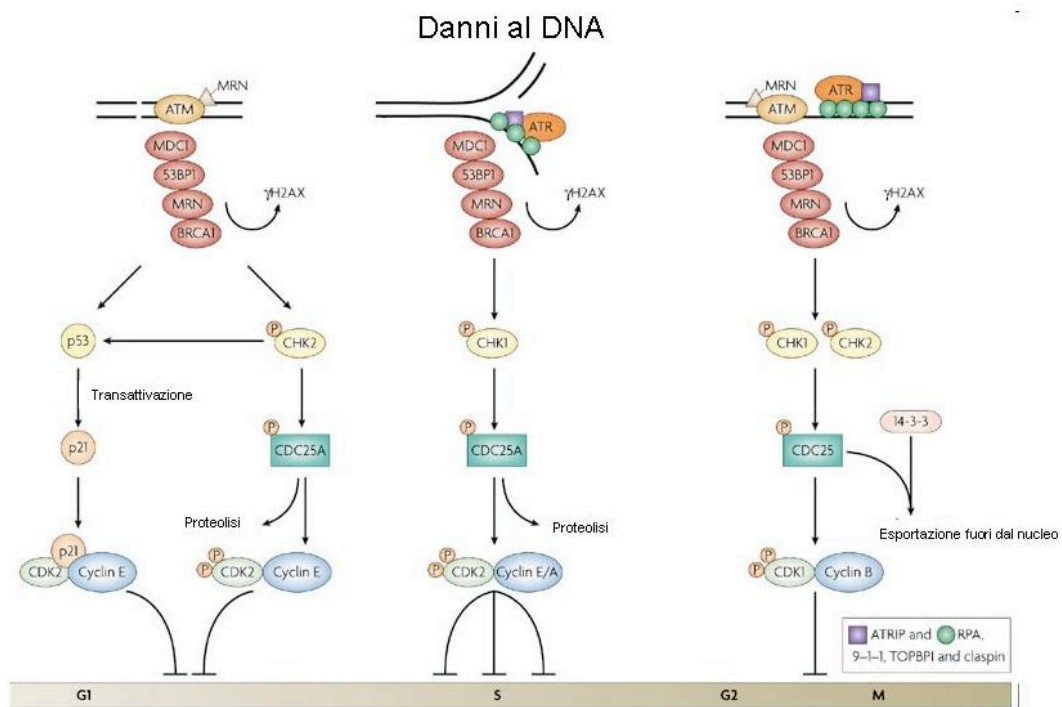
I danni al DNA che avvengono in fase G2 possono attivare direttamente ATM, e indirettamente, attraverso l'attività di ATM, anche ATR. L'entrata in mitosi è impedita, o mantenendo la Cdk-1 nella sua forma inattiva attraverso la sua fosforilazione, o con il sequestro del complesso Cdk-1/ciclina B fuori dal nucleo. In questo caso le proteine effettrici sono le chinasi Chk-1 e Chk-2 che fosforilano il Cdc25. La fosforilazione di quest'ultimo inibisce la sua attivazione e promuove il suo legame con la proteina 14-3-3 sequestrandolo al di fuori del nucleo ed impedendogli l'attivazione del complesso Cdk-1/ciclina B e l'entrata in mitosi [62, 63]. Anche la proteina p53 svolge un ruolo nel punto di controllo G2/M poiché, media la dissociazione tra Cdk-1 e ciclina B attraverso l'induzione di Gadd45 (gene inducibile dell'arresto della crescita e del danno al DNA) [64, 65] [66] (Fig. 1.11 [nella pagina seguente](#)).

Analisi biochimiche rivelano che Chk2 attivato fosforila Cdc25A, Cdc25C, BRCA1 e p53. Chk2 è coinvolto principalmente nell'apoptosi p53-dipendente, ma non nell'arresto in G2/M causato da danni al DNA [67].



(a) Per la progressione del ciclo cellulare dalla fase G2 alla fase M è richiesta l'attivazione del complesso cdc2 (Cdk-1) e ciclina B1. La regolazione del complesso cdc2-B1 coinvolge l'inibizione della fosforilazione, operata da Wee1. La defosforilazione di questi siti attraverso la fosfatasi Cdc25C aumenta l'attività della chinasi Cdk1. Il danno al DNA attiva Chk-1, il quale inattiva Cdc25C attraverso la fosforilazione del Cdc25C, determinando la fosforilazione e la conseguente inattivazione del complesso cdc2-B1 e l'arresto in G2/M. Modificata da Tyagi A. K. et al., Clin. Cancer Res., 2002; 8: 3512-3519.

Figura 1.11: Modalità di controllo della progressione del ciclo cellulare della fase G2 / M.



(a) Il danno al DNA è riconosciuto dai sensori che, con l'aiuto di mediatori mandano il segnale ai trasduttori. I trasduttori, a loro volta, attivano e disattivano altre proteine (gli effettori) che partecipano direttamente nell'inibizione della transizione in G1/S, della progressione in fase S, o della transizione in G2/M. Modificata da Löbrich M, Jeggo PA. *Nat Rev Cancer*, 2007; 11: 861-869.

Figura 1.12: Componenti dei punti di controllo del danno al DNA nelle cellule.

# OBIETTIVI

Obiettivi del presente studio sono:

1. Confrontare l'influenza della mancanza dell'espressione di PARP-1, attraverso il silenziamento stabile del gene, con quella dell'inibizione farmacologica dell'attività PARP usando inibitori di PARP-1 e PARP-2, sulla chemiosensibilità delle cellule tumorali ad agenti metilanti ad ampio spettro come la TMZ, e ad agenti metilanti selettivi per la N3-adenina come il Me-Lex.
2. Studiare i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta delle cellule tumorali silenziate per PARP-1 e -2 ai trattamenti con gli agenti metilanti singoli o in combinazione con gli inibitori di PARP.
3. Stabilire il ruolo di PARP-1 nell'aggressività e chemio-resistenza del melanoma utilizzando i cloni stabilmente silenziati per l'espressione di PARP-1.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 COLTURE CELLULARI

La linea cellulare di melanoma murino B16 di derivazione dai topi C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>/H-2<sup>b</sup>) (ATCC) è stata coltivata in terreno RPMI-1640 contenente il 10% di siero fetale bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM di L-glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 ug/ml di streptomicina (Sigma-Aldrich) a 37° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

La linea cellulare di carcinoma umano della cervice HeLa è stata coltivata in terreno DMEM (Sigma-Aldrich) contenente il 10% di siero fetale bovino, 2 mM di L-glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 ug/ml di streptomicina (Sigma-Aldrich) a 37° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Per il silenziamento stabile dell'espressione di PARP-1 nelle cellule B16 o HeLa, è stata usata la metodica di RNA *interference* basata sull'utilizzo di un vettore di DNA. In particolare, un clone della linea tumorale (B16 o HeLa) ottenuto attraverso diluizione limite delle cellule (chiamato Clone 1), è stato trasfettato con il vettore pBS-U6-SiP912 [68] usando il Kit di trasfezione *Calphos Mammalian transfection kit* (Clon-tech). Il vettore pBABE (gentilmente concesso dal Dr. Robert Weinberg, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA), che porta il gene per la resistenza alla puromicina, è stato co-trasfettato con il vettore pBS-U6-SiP912 usando il rapporto di 1:3 per permettere la selezione dei cloni trasfettati. I cloni con la resistenza agli antibiotici sono stati isolati con degli anelli per la selezione di cloni e mantenuti in presenza di 5 ug/ml di puromicina per le B16 o di 2 ug/ml di puromicina per le HeLa. Il clone cellulare di controllo è stato anche trasfettato con il vettore pSuper-siPARP-2 [69] per il silenziamento stabile di PARP-2. La crescita cellulare dei cloni trasfettati è stata valutata contando le cellule vitali in quadruplicato ogni 24 h, durante tre giorni di coltura. La vitalità cellulare è stata determinata attraverso il colorante *trypan blue*.

## 2.2 TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Le soluzioni stock della TMZ (fornita dalla *Schering-Plough Research Institute*) e della 7-idrossistaurosporina (UCN-01, Sigma-Aldrich) (100 mM e 10 nM, rispettivamente), sono state preparate sciogliendo i farmaci in dimetilsolfossido. Il Me-Lex è stato preparato come precedentemente descritto [70] e sciolto in etanolo al 95% (10 mM). Per l'inibizione di PARP-1 e PARP-2 sono stati utilizzati il GPI 15427 [10-(4-metil-piperazina-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diazo-benzo[de]antracen-3-one, Eisai, Baltimora] [71, 72] e, in alcuni esperimenti, l'UPF1035 derivato del 5-benzoiloxoisoquinolin-1(2H)-one [47]. Le soluzioni stock degli inibitori di PARP (1 mM) sono state preparate sciogliendo il GPI 15427 e l'UPF1035, rispettivamente in 70 mM di PBS senza potassio ed in dimetilsolfossido. La concentrazione finale del dimetilsolfossido o dell'etanolo è sempre stata minore dello 0.1 % (v/v) e non ha contribuito alla tossicità.

## 2.3 ANALISI DELL'ATTIVITA' DI PARP

L'attività di PARP è stata valutata usando cellule ( $5 \times 10^5$ ), non trattate o esposte a 20 mM di  $H_2O_2$  per 15 min., che sono state, poi, permeabilizzate con digitonina (0,1 mg/ml) in presenza di 0.25  $\mu$ Ci  $^3H$ -NAD<sup>+</sup> (Perkin-Elmer) [73].

Successivamente i polimeri di ADP-ribosio marcati con  $^3H$ -NAD<sup>+</sup> sono stati recuperati mediante precipitazione con acido tricloroacetico e la radioattività è stata valutata mediante un  $\beta$ - counter (Vallac, Gaithersburg, MD). I risultati sono stati espressi come dpm di precipitato contenente  $^3H$ -NAD<sup>+</sup> /  $5 \times 10^5$  cellule.

## 2.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PARP MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Il *western blotting* è stato effettuato utilizzando gel di poliacrilammide al 10-12%. I lisati cellulari sono stati ottenuti incubando, per 30 minuti in ghiaccio,  $3 \times 10^6$  cellule in una soluzione contenente 50 mM di TRIS H-Cl, 150 mM di NaCl, 25 mM di NaF, 0.1% di sodio ortovanadato, 0.2 % di Triton X-100, 0.3 % di Nonidet P-40. Al tampone di estrazione sono stati aggiunti gli inibitori di proteasi e gli inibitori di fosfatasi. Le cellule sono state poi centrifugate a 13,000 rpm per 30 minuti a 4 °C. La concentrazione proteica negli estratti è stata determinata attraverso il saggio proteico della Bio-Rad, utilizzando l'albumina del siero di vitello come standard.

Dopo elettroforesi, le proteine sono state trasferite su membrana di PVDF (*polyvinylidene difluoride*-Amersham). Dopo il trasferimento, i siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione con una soluzione al 5% di latte scremato in polvere (Bio-Rad) in soluzione salina tamponata con trizma e *tween* 20 (TBS-T). La membrana è stata poi incubata con gli anticorpi policlonali.

L'espressione delle proteine è stata valutata usando i seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale anti-PARP-1 (clone C2-10; Trevigen; diluizione 1/2000), anticorpo policlonale anti-PARP-2 (clone Yuc; Alexis; diluizione 1/5000), anticorpo policlonale anti-fosfo-Chk1 (Ser345) (133D3, Cell Signaling Technology, Beverly; diluizione 1/1000), anticorpo policlonale anti-fosfo-p53 (Ser15) (Cell Signaling Technology, diluizione 1/1000), anticorpo policlonale anti- $\beta$ -tubulina (clone H-235; Santa Cruz Biotechnology; diluizione 1/400), anticorpo monoclonale anti- $\beta$ -actina (clone AC-15; Sigma-Aldrich, diluizione 1/2500). I segnali sono stati quantificati usando un densitometro Kodak (Rochester, NY, USA). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati usando un kit per la chemio-luminescenza (Amersham). I filtri sono stati esposti su di una lastra autoradiografica Hyperfilm (Amersham) per pochi secondi o alcuni minuti in base all'intensità del segnale.

## 2.5 ANALISI DELL'ATTIVITA' MPG

Le cellule ( $1 \times 10^7$ ) sono state sonicate a 4°C in 0,5 ml di una soluzione contenente 50 mM di Tris-HCl, 3 mM di ditiotreitolo e 2 mM di EDTA, pH 8.3, ed inibitori di proteasi. Varie quantità di estratti cellulari sono stati incubati con 15  $\mu$ g di DNA di timo bovino metilato usando N-[<sup>3</sup>H]metil-N-nitrosourea (GE Healthcare, 18 Ci/mmol), in un volume totale di 100  $\mu$ l di soluzione tampone II (20 mM Tris-HCl, 1 mM ditiotreitolo, 60 mM NaCl, e 1 mM EDTA, pH 8). L'attività MPG è stata espressa come fmol di metilpurina rilasciata per mg di proteina.

## 2.6 SAGGIO DI FORMAZIONE DI COLONIE

Le cellule sono state seminate in triplicato in piastre da 6 pozzetti ( $2 \times 10^2$  cellule/pozzetto) e sono state trattate con TMZ (15-250  $\mu$ M), o con SN-38 (Alexis, 0.1-5 nM). Le cellule sono state coltivate per valutare la capacità di formazione delle colonie; dopo 10-14 giorni le colonie sono state fissate, colorate con il 2% di blu di metilene in etanolo al 95% e contate. Sono state considerate valutabili solo le colonie costituite da un numero di cellule > di 50. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte in triplicato. La chemiosensibilità è stata valutata in ter-

mini di IC<sub>50</sub>, cioè, la concentrazione di farmaco capace di inibire la formazione del 50% di colonie.

## 2.7 ANALISI MEDIANTE CITOMETRIA A FLUSSO

La necrosi indotta dal trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata valutata mediante citometria a flusso. Le cellule sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, dopo 4 h, sono state lavate e risospese in tampone fosfato (PBS) contenente 2 µg/ml di ioduro di propidio (IP). Le cellule necrotiche, che hanno perso l'integrità della membrana plasmatica sono positive per la colorazione con IP.

Anche le modificazioni del ciclo cellulare indotte dal trattamento con i farmaci sono state valutate attraverso l'analisi del contenuto di DNA con citometria a flusso. Le cellule (1x10<sup>6</sup>) trattate o meno con i farmaci sono state lavate in PBS, fissate in etanolo al 70%, e poste a -20°C per almeno 18 h. Le cellule così fissate sono state poi centrifugate e risospese in 1 ml di soluzione ipotonica contenente lo 0.1% (w/v) di sodio citrato, lo 0.1 % di Triton-X (v/v), 50 µg/ml di ioduro propidio, 10 µg/ml di RNasi per poi essere incubate al buio, a 37°C per 15 min. I dati sono stati analizzati escludendo gli aggregati ed i frammenti cellulari tramite FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*). La fluorescenza alla luce rossa, dovuta alla presenza di IP, è stata misurata su scala lineare con il citofluorimetro FACScan ed il software *CellQuest*. Per l'analisi del ciclo cellulare è stato usato il software *Mod-Fit* versione 3.0 (*Becton and Dickinson*).

## 2.8 STUDI PRECLINICI *IN VIVO*

Le cellule di melanoma B16 (2.5x10<sup>5</sup>), del clone di controllo o del clone silenziato per PARP-1, sono state inoculate a livello intramuscolare (i.m.) nell'arto posteriore di topi maschi C57BL/6 o B6D2/F1 istocompatibili (Charles River). Prima di inoculare il tumore gli animali sono stati anestetizzati con 2,2,2 tribromoetanolo (0,25 mg/g, Sigma-Aldrich). Il peso corporeo è stato misurato tre volte a settimana. I tumori sono stati misurati con il calibro ed il volume è stato calcolato secondo la formula [(diametro maggiore)<sup>2</sup>xdiametro minore]/2. I trattamenti con i farmaci sono iniziati 6 giorni dopo l'inoculo del tumore, quando il volume dei noduli aveva raggiunto 200-250 mm<sup>3</sup>. La crescita del melanoma è stata monitorata misurando i noduli tumorali ogni 3 giorni a settimana. Per i trattamenti

in vivo, la TMZ è stata sciolta in dimetilsolfossido, diluita in soluzione salina e somministrato via intraperitoneale (i.p.), alla dose di 100 mg/Kg/al giorno per 5 giorni. Il GPI 15427 è stato somministrato per via orale una volta al giorno (40 mg/Kg) per 5 giorni come singolo agente o 1 h prima della TMZ. I topi di controllo sono stati inoculati con il veicolo del farmaco.

L'inoculo di cellule nella regione intracranica è stato effettuato come descritto in precedenza [71]. In breve, le cellule ( $10^4$  in 0.03 ml di PBS) sono state inoculate nella regione intracranica (i.c.) mediante una microiniezione nella zona centrale dell'osso frontale ad una profondità di 2 mm, utilizzando una microsiringa di vetro da 0.1 ml con un ago di 27-gauge. Le cellule di melanoma murino B16 sono state inoculate i.c. in topi maschi C57BL/6. Prima di inoculare il tumore gli animali sono stati anestetizzati con 2,2,2 tribromoetano (0,25 mg/g, Sigma-Aldrich). Negli esperimenti selezionati, topi maschi e femmine C57BL/6 di controllo e PARP-1 KO, forniti dal Dr. Z.-Q. Wang di sei-otto settimane (Fritz Lipmann Institute, Jena, Germania) [74], sono stati inoculati nella regione intracranica con le cellule di melanoma. Il peso corporeo è stato misurato tre volte a settimana; la sopravvivenza è stata registrata per 60 giorni ed è stato determinato il tempo medio di sopravvivenza (MST). L'esame istologico dei noduli tumorali o del tessuto cerebrale è stato eseguito usando animali addizionali che non sono stati considerati per il monitoraggio della crescita tumorale e della sopravvivenza. I tessuti sono stati fissati in formaldeide tamponata al 10% (w/v), tagliati lungo il piano assiale ed inclusi in paraffina. Le sezioni istologiche (di spessore pari a 5  $\mu$ m) sono state colorate con ematossilina-eosina ed analizzate al microscopio ottico. La percentuale di incremento della durata della vita è stata calcolata con la seguente formula:  $\{[\text{MST (giorni) dei topi trattati}/\text{MST (giorni) dei topi di controllo}] - 1\} \times 100$ . Tutte le procedure che hanno coinvolto i topi sono state effettuate in accordo con le leggi nazionali (D.L. No. 116, G.U., Suppl. 40, Feb. 18, 1992 and G.U. 163, July 1994) ed internazionali (EEC Council Directive 86/609, OJ L 358. 1, Dec 12, 1987; *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, United States National Research Council, 1996).

## 2.9 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Le sezioni dei tessuti sono stati deparaffinati e la perossidasi endogena è stata eliminata con lo 0.3% (v/v) di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanolo al 60% (v/v) per 30 minuti. Il legame non specifico è stato minimizzato incubando le sezioni per 20 minuti in PBS al 2% (v/v) di siero normale di capra. I siti di legame per l'avidina o

la biotina endogena sono stati bloccati da incubazioni sequenziali per 15 minuti con biotina ed avidina (DBA), rispettivamente. Le sezioni sono state incubate per una notte con i seguenti anticorpi: anti-PAR (Santa Cruz Biotechnology), anti-PECAM-1/CD31 (Santa Cruz), con anti-fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Santa Cruz), o con anti-recettore relativo al TNFR indotto dai glucocorticoidi (GITR, *R&D Systems*, Minneapolis). Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati alla diluizione di 1:100 (v/v) in PBS. Le sezioni sono lavate in PBS ed incubate con anticorpi secondari. Uno specifico segnale è stato rilevato con una IgG di capra coniugato con biotina anti-coniglio e con il complesso avidina-biotina perossidasi (DBA). Come cromogeno per la perossidasi è stata usata la 3,3-diaminobenzidina (DAB) che dà luogo alla formazione di un prodotto finale marrone insolubile in alcool. La contro-colorazione dei nuclei è stata effettuata con il rosso nucleare.

## 2.10 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state effettuate usando il programma *Primer of Biostatistics Statistical Software*, (McGraw-Hill, New York). Le curve di sopravvivenza sono state generate con la stima del prodotto limite di Kaplan-Meier e le differenze tra i vari gruppi sono state valutate mediante analisi *log-rank* con la correzione di *Yates*. Per le comparazioni multiple, i risultati sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni. Un valore di P inferiore allo 0.05 è stato considerato significativo. In alcuni casi è stato anche utilizzato il test del t-Student per le analisi statistiche dell'attività PARP. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per  $P < 0.05$ .

## 3 RISULTATI

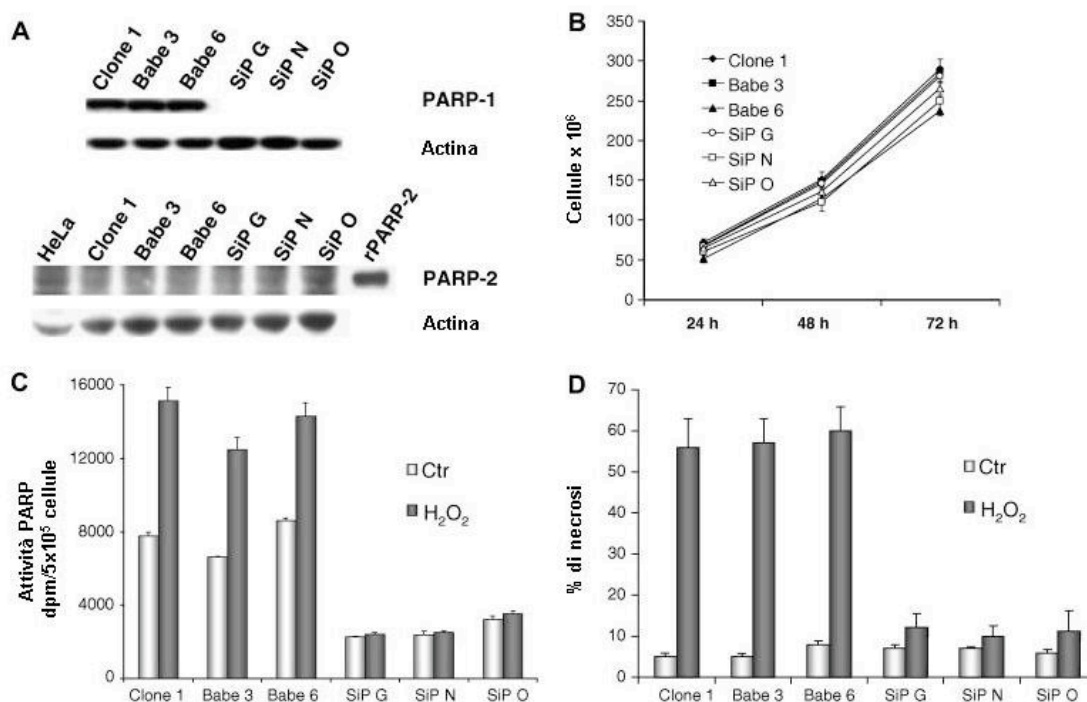
### 3.1 RUOLO DI PARP-1 NELLA CRESCITA E CHEMIO-SENSIBILITA' DI DUE DIFFERENTI LINEE TUMORALI, *IN VITRO*

#### 3.1.1 SILENZIAMENTO STABILE DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 NELLE CELLULE DI MELANOMA CON RNA *interference*

Per silenziare stabilmente l'espressione di PARP-1 nelle cellule di melanoma abbiamo usato un approccio di RNA *interference* basato sull'utilizzo di un vettore pBS-U6-SiP912 contenente una sequenza bersaglio selettiva per PARP-1 [68]. Un clone (Clone 1) del melanoma murino B16, con un tasso di crescita *in vitro* ed una tumorigenicità *in vivo* comparabile a quelle della linea cellulare parentale (dati non mostrati), è stato co-trasfettato con il vettore pBS-U6-SiP912 e con il vettore pBABE che esprime il solo gene per la resistenza alla puromicina. Come controllo è stato utilizzato il Clone 1 trasfettato solo con il vettore pBABE. Alcuni cloni che sono risultati resistenti alla puromicina sono stati, poi, analizzati per l'espressione e per l'attività di PARP-1. Questi cloni sono stati in seguito chiamati cloni SiP-1. Gli studi *in vivo* ed *in vitro* sono stati condotti utilizzando tre cloni silenziati per l'espressione di PARP-1 (SiP G, SiP N e SiP) con i loro rispettivi controlli (clone 1, Babe 3 e Babe 6) (Fig. 3.1 nella pagina 41-A). Questi cloni sono stati anche analizzati per l'espressione di PARP-2 ed i risultati indicano che PARP-2, sebbene debolmente rilevabile, è presente sia nei cloni di controllo che in quelli silenziati per PARP-1 (Fig. 3.1 nella pagina 41-A).

L'analisi dei tempi di duplicazione e quindi del potenziale proliferativo, valutata sulla base della cinetica di crescita (illustrata nella Fig. 3.1 nella pagina 41-B), indica che i cloni SiP-1 possiedono un tempo di duplicazione pari a 20-25 h, che è lo stesso di quello dei cloni di controllo.

I cloni SiP-1, inoltre, quando sono trattati con l'agente ossidante  $H_2O_2$ , che genera rotture a doppio filamento nel DNA ed induce l'attivazione di PARP-1, sono incapaci di innescare l'attivazione di PARP-1 (Fig. 3.1 nella pagina seguente-C) in accordo con i precedenti risultati ottenuti in differenti linee cellulari [68]. Poichè danni elevati al DNA, che inducono una eccessiva attivazione di PARP-1, determinano morte cellulare per necrosi causata dal consumo di  $NAD^+$  e conseguentemente di ATP [75], abbiamo valutato se il silenziamento di PARP-1 potesse prevenire la necrosi indotta dall' $H_2O_2$ . I risultati indicano che i cloni SiP-1 sono protetti dalla necrosi precoce, che, invece, si osserva chiaramente nei cloni di controllo. (Fig. 3.1 nella pagina successiva-D).



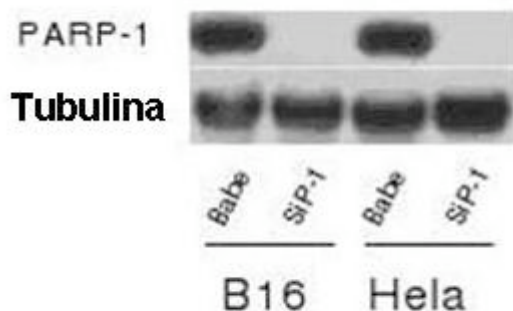
(a) (A) I lisati cellulari (50 ug) dei cloni di controllo (Clone 1, Babe 3 o Babe 6) o dei cloni trasfettati con il vettore pBS-U6-SiP912 (SiP) sono stati sottoposti ad elettroforesi ed analizzati per l'espressione di PARP-1, PARP-2 o actina. La proteina murina di PARP-2 ricombinante (rPARP-2, 500 ng, Alexis) ed il lisato cellulare (50 ng) della linea di carcinoma della cervice uterina Hela sono stati usati come controlli positivi di PARP-2. (B) La crescita cellulare è stata valutata mediante conta cellulare in quadruplicato di tre campioni indipendenti per ciascun clone. I valori rappresentano la media delle cellule vitali  $\pm$  DS. La media dei tempi di raddoppiamento  $\pm$  DS, calcolata a tempi differenti, è stata la seguente: Clone 1,  $20 \pm 2$ ; Babe 3,  $21 \pm 1$ ; Babe 6,  $25 \pm 6$ ; SiP G,  $21 \pm 1$ ; SiP N,  $24 \pm 1$ ; SiP O,  $22 \pm 1$ . I dati sono rappresentativi di uno di tre esperimenti con risultati simili. (C) L'analisi dell'attivazione di PARP-1 nel Clone 1, nei cloni Babe o nei cloni SiP-1 è stata valutata incubando le cellule, non trattate o trattate con  $20 \text{ mM}$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$  per 15 min, con  $^3\text{H-NAD}^+$  dopo la permeabilizzazione con digitonina. I risultati sono espressi come dpm di  $^3\text{H-NAD}^+$  precipitato con acido tricloroacetico per  $5 \times 10^5$  cellule ed i valori rappresentano la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti. I risultati dell'analisi statistica (test del *t* di Student) indicano che le differenze tra il Clone 1 od i campioni Babe (non trattati o trattati con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ed i cloni SiP (non trattati o trattati con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sono altamente significativi con  $P < 0.0001$ . (D) I dati sono espressi come percentuale di cellule necrotiche e rappresentano la media di tre esperimenti  $\pm$  DS. I risultati dell'analisi statistica (test ANOVA seguita dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple) indicano che le differenze tra Clone 1 o Babe (trattati con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) rispetto a campioni SiP (trattati con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sono altamente significative con  $P < 0.05$ .

Figura 3.1: Caratterizzazione dei cloni di melanoma silenziati per PARP-1.

### 3.1.2 SILENZIAMENTO DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 NELLA LINEA DI CARCINOMA DELLA CERVICE UTERINA

La linea cellulare Hela, carcinoma umano della cervice uterina è stata silenziata per PARP-1 (SiP-1) attraverso la trasfezione del vettore pBS-U6-SiP912, che ha

come bersaglio la sequenza selettiva per PARP-1, insieme al vettore pBabe che esprime solo il gene per la resistenza alla puromicina. Sono state, così, ottenute cellule stabilmente silenziate per PARP-1. Come controllo sono state usate cellule HeLa trasfettate solo con il vettore pBabe. I cloni cellulari privi di espressione di PARP-1 sono stati selezionati per nuovi studi (Fig. 3.2).



(a) I lisati cellulari delle HeLa, di controllo (Babe) o trasfettate con il vettore pBS-U6-SiP912 (SiP-1), sono stati analizzati attraverso *western blotting* per l'espressione di PARP-1 o della tubulina e comparati con quelli delle cellule B16 di controllo o silenziate.

Figura 3.2: Analisi dell'espressione di PARP-1 nelle cellule di controllo e nelle cellule silenziate per PARP-1 B16 ed HeLa.

### 3.1.3 I CLONI DI MELANOMA SILENZIATI PER PARP-1 MOSTRANO UN AUMENTO DELLA CHEMIO-SENSIBILITA'

Poichè l'inibizione farmacologica dell'attività PARP-1 aumenta la sensibilità tumorale agli agenti metilanti e agli inibitori della topoisomerasi I, i cloni di controllo e i cloni SiP-1 sono stati testati per la loro chemio-sensibilità verso gli effetti anti-proliferativi della temozolomide (TMZ) o dell'inibitore di topoisomerasi I irinotecano (SN-38), mediante il saggio di formazione di colonie.

I risultati indicano che i cloni silenziate SiP-1 sono circa due volte più sensibili ai farmaci antitumorali rispetto ai cloni di controllo (Tabella 3.1 nella pagina successiva).

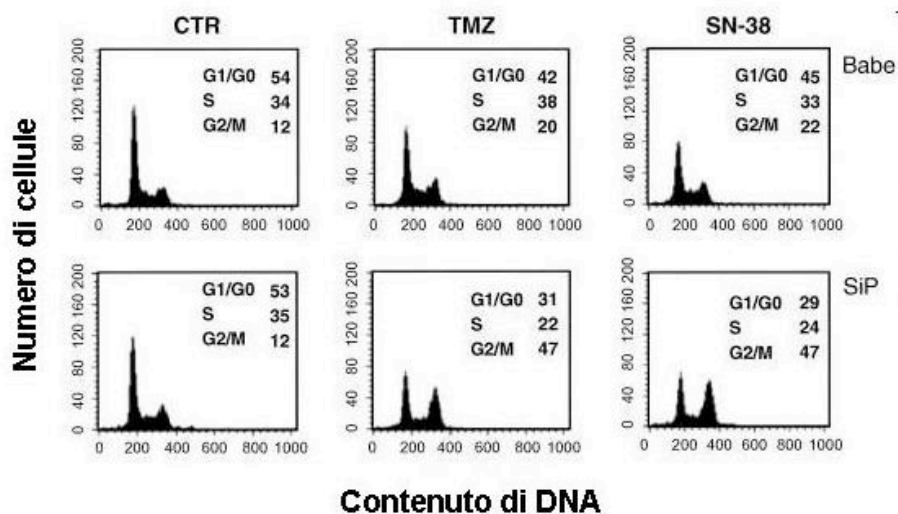
Clone	TMZ	SN-38
	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
Clone 1	117 ± 5	3.8 ± 0.5
Babe 3	134 ± 16	4.3 ± 0.3
Babe 6	120 ± 8	3.6 ± 0.6
SiP G	72 ± 5	1.8 ± 0.3
SiP N	70 ± 3	1.6 ± 0.2
SiP O	65 ± 6	2.0 ± 0.1

<sup>a</sup>I dati rappresentano i valori medi di tre esperimenti indipendenti ±DS. L'analisi statistica è stata effettuata usando l'ANOVA per le comparazioni multiple seguita dal test di Bonferroni ed indica che le differenze tra i cloni SiP e Babe sono tutte statisticamente significative (P<0.05).

Tabella 3.1: Chemiosensibilità *in vitro* dei cloni di B16 di controllo o silenziati per PARP-1

Precedentemente abbiamo osservato che la TMZ in combinazione con gli inibitori di PARP aumenta la percentuale di cellule in fase G2/M del ciclo cellulare a 24 h dopo il trattamento, rispetto alla TMZ usata come singolo agente [100].

Abbiamo, quindi, analizzato la distribuzione del ciclo cellulare delle cellule di melanoma di controllo o delle cellule silenziato per PARP-1, in seguito al trattamento con TMZ o con SN-38. I risultati indicano che i trattamenti con i farmaci delle cellule SiP-1 aumentano la percentuale di cellule in fase G2/M rispetto alle cellule di controllo (Fig. 3.3 nella pagina seguente).



(a) Le cellule tumorali Babe o SiP-1 sono state trattate con TMZ (250  $\mu$ M) o con SN-38 (5 nM) ed è stata valutata la percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare attraverso analisi citofluorimetrica 24 h dopo il trattamento con i farmaci. Il profilo della distribuzione cellulare ed i valori percentuali sono rappresentativi di uno di tre esperimenti con risultati simili.

Figura 3.3: Analisi del ciclo cellulare dei cloni di B16 di controllo o silenziati per PARP-1 trattati con TMZ o SN-38.

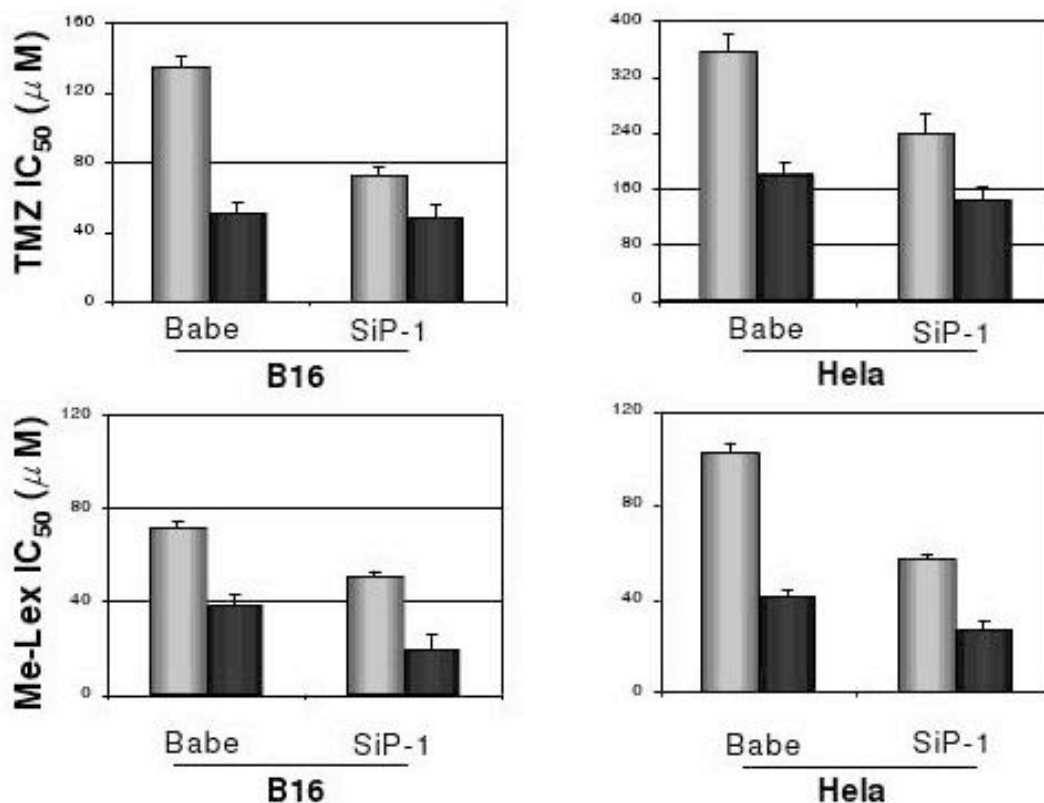
### 3.1.4 CHEMIO-SENSIBILITÀ ALLA TMZ E AL Me-Lex, METILANTE SELETTIVO DELLA N3-ADENINA, COME AGENTI SINGOLI O IN ASSOCIAZIONE AD INIBITORI DI PARP DELLE LINEE TUMORALI B16 ED HeLa SILENZIATE PER L'ESPRESSIONE DI PARP-1

Come già sopra descritto, le cellule di B16 silenziato per PARP-1 sono circa due volte più suscettibili rispetto ai cloni di controllo agli effetti antiproliferativi dell'agente metilante ad ampio spettro TMZ (Fig. 3.1 nella pagina precedente). Abbiamo, quindi analizzato, anche, la sensibilità delle cellule di controllo di B16 o HeLa e delle cellule silenziato di entrambe le linee tumorali (SiP-1) oltre che all'agente metilante TMZ anche all'agente metilante Me-Lex che a differenza della TMZ produce solo addotti metilici a livello della N3-adenina. I risultati illustrati nella figura 3.4 nella pagina 46 indicano che le cellule di HeLa sono 2.6 volte più resistenti alla TMZ rispetto alle cellule di B16. Questo è probabilmente dovuto

ai livelli più alti dell'attività dell'O6- metilguanina DNA metiltrasferasi (MGMT) presenti nelle cellule Hela [71][76]. Il silenziamento dell'espressione di PARP-1 nelle cellule Hela determina un significativo aumento della sensibilità agli effetti antiproliferativi della TMZ; comunque, il grado di chemio-sensibilizzazione ottenuto, è più basso rispetto a quello osservato nelle cellule SiP-1 del melanoma B16. Nel caso del Me-Lex, le cellule di Hela sono moderatamente più resistenti all'agente metilante rispetto alle cellule B16; questo è probabilmente dovuto agli alti livelli dell'attività della N-Metil Purina DNA Glicosilasi (MPG) riscontrati nelle cellule Hela (279 fmol/mg  $\pm$  69) rispetto alle cellule B16 (48 fmol/mg  $\pm$  3). La perdita dell'espressione di PARP-1 determina un più pronunciato aumento della chemio-sensibilità delle cellule Hela, SiP-1 rispetto al modello SiP-1 delle B16. Si può notare che per entrambi gli agenti metilanti il livello di chemio-sensibilizzazione provocato dal silenziamento di PARP-1 è più basso rispetto a quello ottenuto dall'inibizione farmacologica dell'attività di PARP nelle cellule Babe.

Allo scopo di valutare se l'inibizione dell'attività residuale di PARP nelle cellule SiP-1 potesse determinare un ulteriore aumento della suscettibilità tumorale all'effetto inibitorio della crescita degli agenti metilanti, abbiamo analizzato la chemio-sensibilità delle cellule di controllo e delle cellule SiP-1 alla TMZ o al Me-Lex in combinazione con l'inibitore di PARP, GPI 15427. Questo composto è molto potente sia nell'inibire l'attività di PARP-1 che di PARP-2 ( $IC_{50} = 8 \pm 2$  nM), inoltre è dotato di azione chemio-sensibilizzante in modelli preclini *in vitro* ed *in vivo* [71].

I risultati indicano che il GPI 15427 oltre a potenziare la chemio-sensibilità delle cellule Babe di B16 ed Hela, induce un ulteriore aumento dell'effetto antiproliferativo della TMZ o del Me-Lex nelle cellule SiP-1 di entrambe le linee cellulari, riducendo l' $IC_{50}$  del farmaco ad un valore comparabile (nel caso della TMZ) o anche più basso (nel caso del Me-Lex) di quello ottenuto nelle cellule Babe co-trattate con gli agenti metilanti insieme al GPI 15427 (Fig. 3.4 nella pagina successiva).



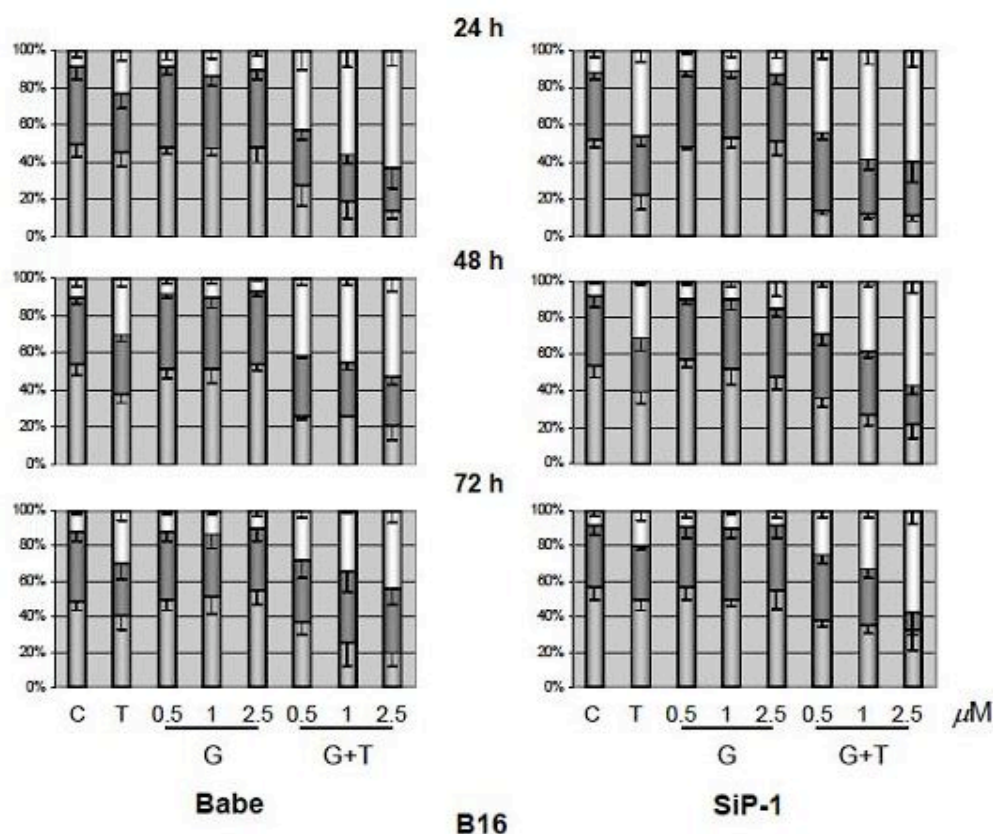
(a) L'analisi della chemio-sensibilità delle cellule di controllo o delle cellule SiP-1 in seguito ai trattamenti con TMZ o con Me-Lex come agenti singoli (colonne grigie), o in combinazione con 2.5 μM di GPI 15427 (colonne grigie) è stata testata con il saggio di formazione di colonie ed i risultati sono espressi come IC<sub>50</sub>. Solo le colonie con più di 50 cellule sono state considerate valutabili. I dati sono la media di tre esperimenti indipendenti ± DS. I risultati dell'analisi statistica effettuati con il test del *t-Student* riguardanti le differenze nella sensibilità alla TMZ o alla TMZ+GPI 15427 sono i seguenti: linee di B16, Babe TMZ vs SiP-1 TMZ,  $P < 0.0001$ ; Babe TMZ vs Babe TMZ+GPI 15427,  $P < 0.0001$ ; SiP-1 TMZ vs SiP-1 TMZ+GPI 15427,  $P = 0.008$ ; Babe TMZ+GPI 15427 vs SiP-1 TMZ,  $P = 0.007$ ; Babe TMZ+GPI 15427 vs SiP-1 TMZ+GPI 15427, non significativo (NS); linee di Hela, Babe TMZ vs SiP-1 TMZ,  $P = 0.005$ ; Babe TMZ vs Babe TMZ+GPI 15427,  $P < 0.0001$ ; SiP-1 TMZ vs SiP-1 TMZ+GPI 15427,  $P < 0.0001$ ; Babe TMZ+GPI 15427 vs SiP-1 TMZ,  $P = 0.031$ ; Babe TMZ+GPI 15427 vs SiP-1 TMZ+GPI 15427, non significativo (NS). I risultati dell'analisi statistica effettuati con il test del *t-Student* riguardanti la sensibilità all' Me-Lex o allal Me-Lex+GPI 15427 sono i seguenti: linee di B16, Babe Me-Lex vs SiP-1 Me-Lex,  $P = 0.001$ ; Babe Me-Lex+GPI 15427 vs SiP-1 Me-Lex,  $P = 0.023$ ; Babe Me-Lex+GPI 15427 vs SiP-1 Me-Lex+GPI 15427,  $P = 0.009$ ; linee di Hela, Babe Me-Lex vs SiP-1 Me-Lex,  $P < 0.0001$ ; Babe Me-Lex+GPI 15427 vs SiP-1 Me-Lex,  $P = 0.003$ ; Babe Me-Lex+GPI 15427 vs SiP-1 Me-Lex+GPI 15427,  $P = 0.007$ ; il GPI 15427 aumenta gli effetti anti-proliferativi dell' Me-Lex in tutte le linee cellulari ( $P < 0.0001$ )

Figura 3.4: Chemiosensibilità *in vitro* delle cellule silenziate per PARP-1 e di controllo derivanti da linee B16 e Hela alla TMZ o al Me-Lex come agenti singoli o in combinazione con l'inibitore di PARP-1, GPI 15427

### 3.1.5 MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE E DELLA FOSFORILAZIONE DI Chk-1 O DI p53 INDOTTE DALLA TMZ COME SINGOLO AGENTE O IN COMBINAZIONE CON L'INIBITORE DI PARP NELLE LINEE CELLULARI TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1

In studi precedenti abbiamo dimostrato che la TMZ in combinazione con l'inibitore di PARP aumenta la percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare a 24 h dal trattamento rispetto alla TMZ utilizzata come singolo agente [100]. Su questa base, abbiamo valutato se un tale effetto potesse verificarsi anche nelle cellule tumorali silenziate per PARP-1. Abbiamo, quindi, analizzato la distribuzione del ciclo cellulare delle cellule di melanoma, Babe e SiP-1, a diversi tempi in seguito all'esposizione alla TMZ (Fig. 3.5 nella pagina seguente).

I risultati indicano che a 24 h la TMZ induce un aumento significativamente più elevato della percentuale di cellule in G<sub>2</sub>/M nelle cellule silenziate SiP-1 rispetto alle cellule di controllo Babe. Inoltre, sia nelle linee Babe che nelle SiP-1, le cellule che si sono accumulate in fase G<sub>2</sub>/M riprendono a proliferare. Questo fenomeno è maggiormente rilevabile nel caso delle cellule SiP-1 a 72 h (Fig. 3.5 nella pagina successiva) e nel caso delle cellule Babe a 96 h (dati non mostrati).



(a) Le cellule B16, Babe o SiP-1 sono state trattate con TMZ (T; 300  $\mu$ M) o TMZ in combinazione con concentrazioni scalari di GPI 15427 (G; 0.5, 1 e 2.5  $\mu$ M) e ne è stato analizzato il ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica. I risultati sono presentati come percentuale di cellule nelle differenti fasi del ciclo cellulare a 24, 48, e 72 h dopo il trattamento. Fase G<sub>1</sub>, colonne grigie; fase S, colonne nere, fase M, colonne bianche. L'analisi statistica è stata effettuata con il metodo ANOVA seguito dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple; un valore di P minore di 0.05 è considerato significativo. Nelle cellule Babe le differenze di percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra la TMZ e la TMZ+GPI 15427 sono statisticamente significative con tutte le dosi di GPI 15427 a 24 e 48 h. Nelle cellule SiP-1 le differenze di percentuale delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra la TMZ e la TMZ +GPI 15427 sono statisticamente significative con 1  $\mu$ M di GPI 15427 a 24 e 72 h, e con 2.5  $\mu$ M di GPI 15427 a tutti i tempi. Nelle cellule SiP-1, l'aumento dell'accumulo di cellule in G<sub>2</sub>/M provocato da 2.5  $\mu$ M di GPI 15427+TMZ è significativamente più elevato di quello indotto da 1  $\mu$ M di GPI 15427 in combinazione con la TMZ a 48 e 72 h. Le differenze nella percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra le cellule Babe e SiP-1 trattate con la TMZ sono statisticamente significative solo a 24 h.

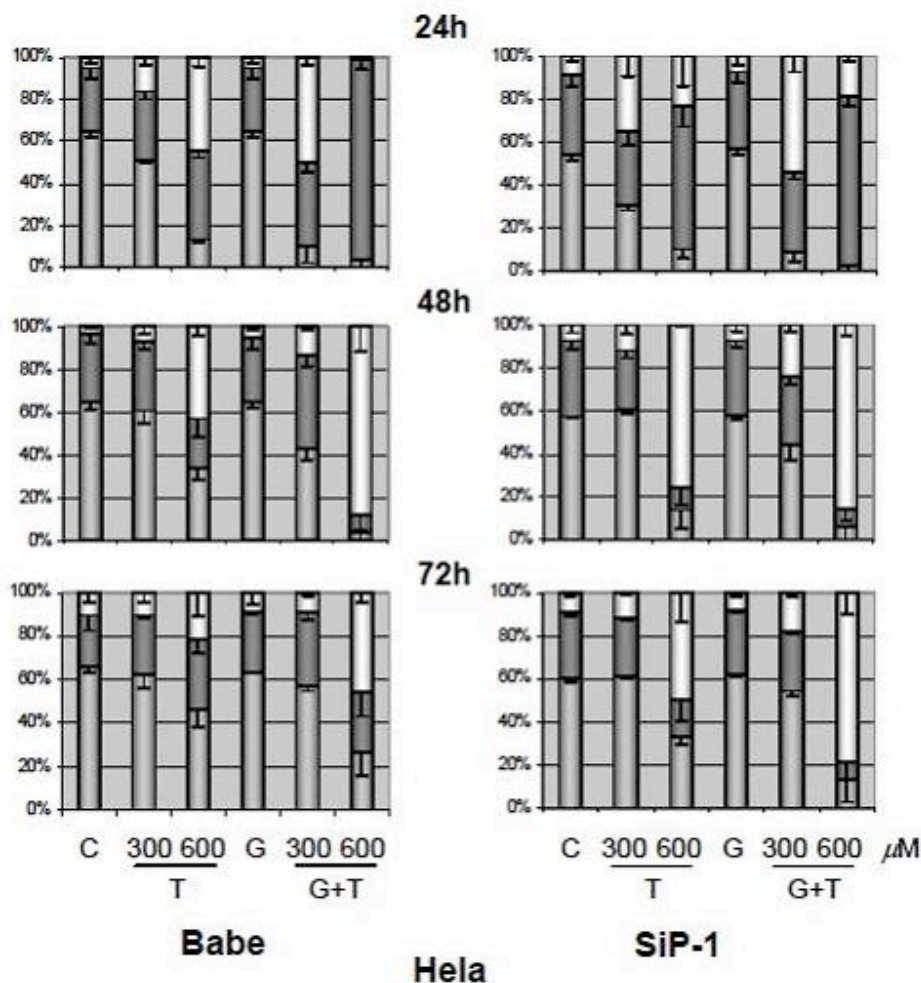
Figura 3.5: Analisi dell'influenza della TMZ come agente singolo, o in combinazione con GPI 15427, sulla distribuzione del ciclo cellulare delle cellule B16 di controllo e silenziate per PARP-1.

Abbiamo poi considerato se l'inibizione dell'attività basale residua di PARP nelle cellule SiP-1 potessero determinare un ulteriore aumento delle cellule che si accumulano in fase G<sub>2</sub>/M in seguito al trattamento con TMZ. A tale scopo, abbiamo analizzato le modificazioni del ciclo cellulare indotte dalla TMZ in com-

binazione con dosi scalari di GPI 15427.

I risultati mostrano che il GPI 15427 in combinazione con la TMZ incrementa la percentuale di cellule che si accumulano in fase G<sub>2</sub>/M in entrambe le linee cellulari. L'aumento mediato dal GPI 15427 nelle cellule Babe è dose-dipendente, è statisticamente significativo (anche a concentrazioni più basse di inibitore) ed evidente a 24 e 48 h dopo il trattamento con il farmaco. Nelle cellule SiP-1, l'aumento nella percentuale di cellule in G<sub>2</sub>/M mediato dal GPI 15427 è maggiormente evidente con le dosi più alte di inibitore (cioè 2.5 µM); si può notare che l'arresto è persistente oltre le 96 h (dati non mostrati) ed accompagnato da una progressiva diminuzione della percentuale di cellule in fase S (Fig. 3.5 nella pagina precedente). Sulla base di questi risultati, abbiamo scelto la concentrazione di 2.5 µM di GPI 15427 per i successivi esperimenti.

Le modificazioni del ciclo cellulare in seguito al trattamento con TMZ e GPI 15427 sono state valutate anche nelle cellule Hela di controllo e nelle cellule HeLa silenziate per PARP-1. In questo caso, i risultati descritti nella figura 3.6 nella pagina successiva indicano che il trattamento con 300 µM di TMZ induce un transitorio accumulo nella fase G<sub>2</sub>/M solo delle cellule silenziate SiP-1. Inoltre, la concentrazione più alta di TMZ (600 µM) induce un accumulo delle cellule SiP-1 nella fase S e delle cellule Babe nella fase G<sub>2</sub>/M, 24 h dopo il trattamento. A 48 h, le cellule SiP-1 esposte a 600 µM di TMZ superano la fase S e si accumulano nella fase G<sub>2</sub>/M. Il trattamento con 300 µM di TMZ in combinazione con 2.5 µM di GPI 15427 aumenta la percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M sia nelle cellule Babe che nelle cellule SiP-1 solo a 24 h. Il trattamento combinato delle cellule Babe con 600 µM di TMZ e GPI 15427 aumenta l'accumulo di cellule in fase S a 24 h e successivamente le cellule progrediscono nella fase G<sub>2</sub>/M. Invece, nelle cellule SiP-1 l'inibitore di PARP induce significative modificazioni nella distribuzione del ciclo cellulare rispetto al trattamento con TMZ come singolo agente solo a 72 h, quando si osserva un permanente arresto in G<sub>2</sub>/M (Fig. 3.6 nella pagina seguente).

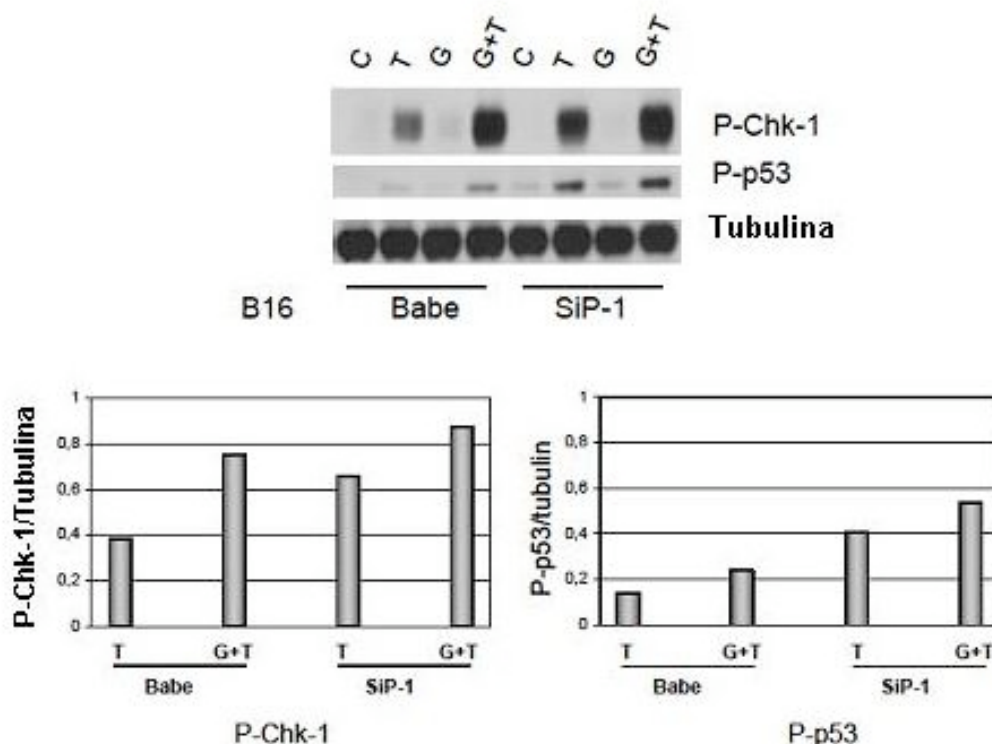


(a) Le cellule HeLa, Babe o SiP-1 sono state trattate con TMZ (T; 300 o 600  $\mu\text{M}$ ) o TMZ in combinazione con concentrazioni scalari di GPI 15427 (G; 2.5  $\mu\text{M}$ ) e ne è stato analizzato il ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica. I risultati sono indicati come percentuale di cellule nelle differenti fasi del ciclo cellulare a 24, 48 e 72 h dopo il trattamento. L'analisi statistica è stata effettuata usando il metodo ANOVA seguito dal test di Bonferroni per le comparazioni multiple; un P minore di 0.05 è considerato significativo. L'analisi statistica per la comparazione multipla indica che: la percentuale di cellule in fase  $G_2/M$  del gruppo trattato con 300  $\mu\text{M}$  di TMZ + GPI 15427 è significativamente più elevata rispetto al gruppo trattato con la sola TMZ a 300  $\mu\text{M}$  sia nella linea Babe che nella linea SiP-1 a 24 h; la percentuale di cellule in fase  $G_2/M$  con 600  $\mu\text{M}$  di TMZ + GPI 15427 è significativamente più alta rispetto alla sola TMZ a 600  $\mu\text{M}$  nelle cellule Babe a 48 e 72 h, invece nelle cellule SiP-1 l'aumento è significativo solo a 72 h. La percentuale di cellule in fase S, nella linea Babe trattata con 600  $\mu\text{M}$  di TMZ + GPI 15427 è significativamente più elevata rispetto a quella osservata nel gruppo trattato con 600  $\mu\text{M}$  di TMZ da sola a 24 h. La percentuale di cellule in  $G_2/M$  nelle cellule SiP-1 trattate con 600  $\mu\text{M}$  di TMZ è significativamente più alta rispetto alle cellule Babe a 48 e 72 h, invece la percentuale con 300  $\mu\text{M}$  di TMZ è differente solo alle 24 h.

Figura 3.6: Analisi del ciclo cellulare delle cellule HeLa silenziato per PARP-1 e di controllo trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

L'analisi con *western blotting* della fosforilazione del Chk-1, una chinasi coinvolta nel controllo del *checkpoint* G<sub>2</sub>, e della p53 nelle cellule B16, indica che il trattamento con TMZ provoca una maggiore induzione della fosforilazione del Chk-1 e della p53 nelle cellule silenziante per PARP-1 (Fig. 3.7).

L'aggiunta dell'inibitore di PARP all'agente metilante aumenta ulteriormente il livello di fosforilazione di Chk-1 e di p53 sia nelle linee B16 di controllo che in quelle silenziante per PARP-1 (Fig. 3.7).

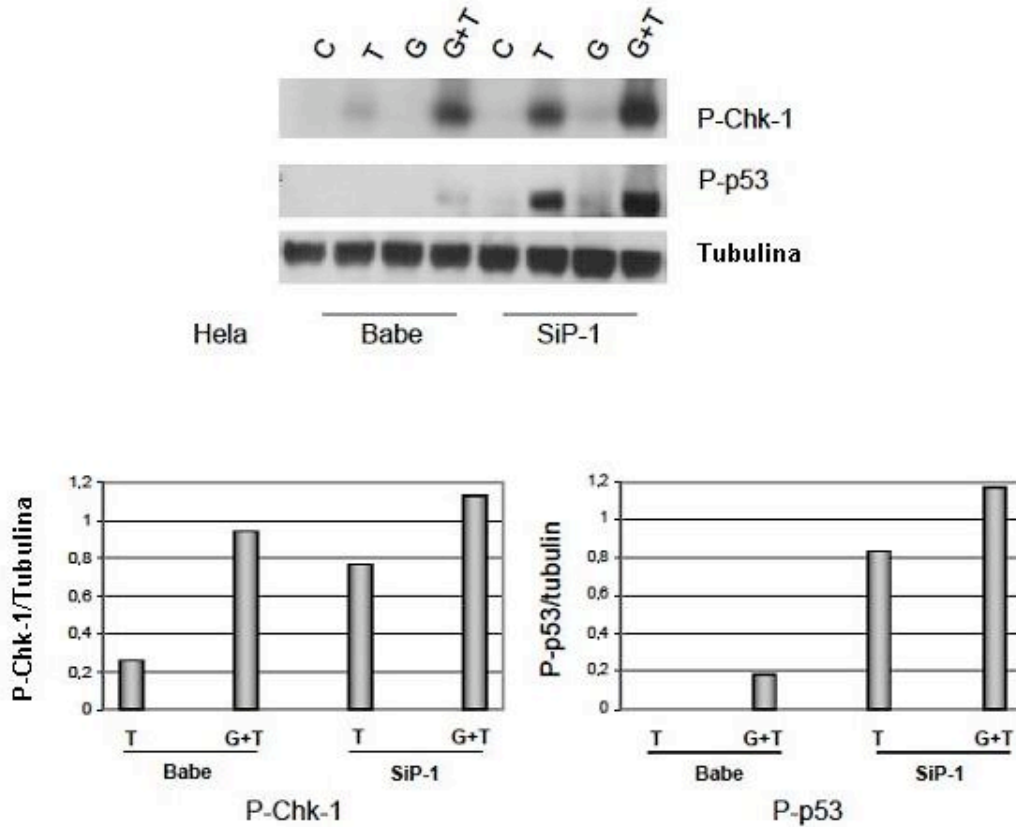


(a) Le cellule B16 Babe o SiP-1 sono state trattate con TMZ (T; 300  $\mu$ M) senza o con GPI 15427 (G; 2.5  $\mu$ M) per 3 h; i lisati cellulari (50  $\mu$ g) sono stati sottoposti ad elettroforesi ed analizzati per l'espressione del Chk-1 fosforilato (P-Chk-1), della p53 fosforilata (P-p53) o della tubulina. Gli istogrammi rappresentano i rapporti tra la densità ottica (O.D.) delle proteine fosforilate nei gruppi trattati con TMZ (T) o con GPI 15427 + TMZ (G+T) (dopo aver sottratto i valori di O.D. dei controlli) e la tubulina. I risultati sono rappresentativi di uno di due esperimenti con risultati simili.

Figura 3.7: Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule B16 silenziante per PARP-1 e di controllo Babe e SiP-1 trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

In modo simile, nelle cellule HeLa è stato osservato un aumentato livello di fosforilazione del Chk-1 e della p53 nelle cellule silenziante per PARP-1 rispetto alle cellule di controllo, ed il GPI 15427 aumenta ulteriormente questo effetto (Fig. 3.8 nella pagina successiva). Nelle cellule HeLa di controllo non si osserva attivazione

di p53 in seguito al trattamento con la TMZ, mentre la combinazione dei farmaci induce una debole fosforilazione di p53.

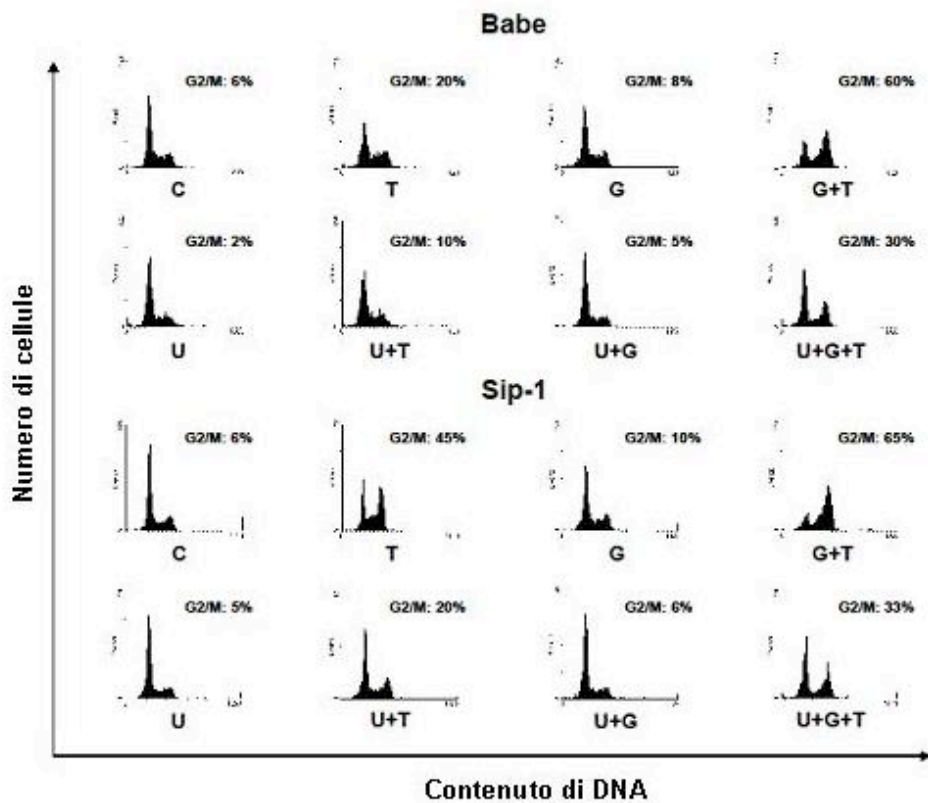


(a) Le cellule HeLa Babe o SiP-1 sono state trattate con 600  $\mu\text{M}$  di TMZ (T)  $\pm$  2.5  $\mu\text{M}$  GPI 15427 (G) per 3 h; i lisati cellulari (50  $\mu\text{g}$ ) sono stati sottoposti ad elettroforesi ed analizzati per l'espressione del Chk-1 fosforilato (P-Chk-1), della p53 fosforilata (P-p53) o della tubulina. Gli istogrammi rappresentano i rapporti tra la densità ottica (O.D.) delle proteine fosforilate nei gruppi trattati con TMZ (T) o con GPI 15427 + TMZ (G+T) (dopo aver sottratto i valori di O.D. dei controlli) e la tubulina. I risultati sono rappresentativi di uno di due esperimenti con risultati simili.

Figura 3.8: Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule HeLa silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

Il trattamento delle cellule B16 Babe o SiP-1 a concentrazioni non tossiche con l'inibitore specifico del Chk-1, UCN-01 riduce marcatamente l'accumulo delle cellule in G<sub>2</sub>/M indotto dal trattamento con TMZ da sola o in combinazione con GPI 15427 confermando il ruolo della via di segnale del Chk-1 nella risposta del controllo del ciclo cellulare, in particolare l'arresto in G<sub>2</sub>/M.

(Fig. 3.9 nella pagina seguente).

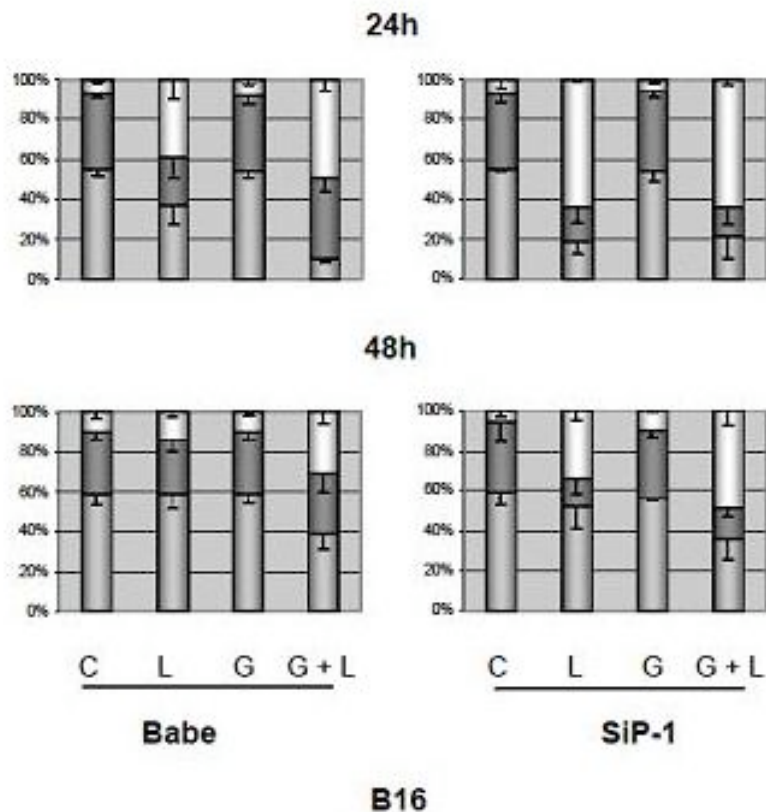


(a) Le cellule B16 Babe o SiP-1 sono state trattate con UCN-01 (U; 50 nM) seguito da TMZ (T; 300  $\mu$ M) come singolo agente o in combinazione con GPI 1547 (G; 2.5  $\mu$ M) e poi sono state analizzate con citofluorimetria a 24 h. Le distribuzioni del ciclo cellulare mostrate sono rappresentative di uno di tre esperimenti con risultati simili. I profili sono stati ottenuti usando il *software* CellQuest (Becton *and* Dickinson). In figura sono indicate le percentuali di cellule in fase G<sub>2</sub>/M.

Figura 3.9: Ruolo della fosforilazione di Chk-1 nell'accumulo delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M indotto da TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427 sia nelle cellule silenziate per PARP-1 che nelle cellule di controllo.

### **3.1.6 MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE E FOSFORILAZIONE DI Chk-1 O p53 INDOTTE DAL Me-Lex, COME AGENTE SINGOLO O IN COMBINAZIONE CON L'INIBITORE DI PARP NELLE LINEE CELLULARI TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1**

I cloni Babe e SiP-1 della linea cellulare B16 e Hela sono state trattate con concentrazioni crescenti di Me-Lex e poi analizzate mediante citofluorimetria. L'analisi delle modificazioni del ciclo cellulare dopo trattamento delle cellule di melanoma B16 indicano che nelle cellule di controllo il Me-Lex (100  $\mu$ M) induce un transitorio accumulo delle cellule in G<sub>2</sub>/M e che il GPI 15427 aumenta debolmente, ma in modo significativo, questo effetto a 48 h. Nella linea di melanoma SiP-1, il Me-Lex induce un più pronunciato arresto in G<sub>2</sub>/M ed una marcata riduzione della fase S nelle cellule SIP-1 rispetto alle cellule Babe (Fig. [3.10 nella pagina successiva](#)).

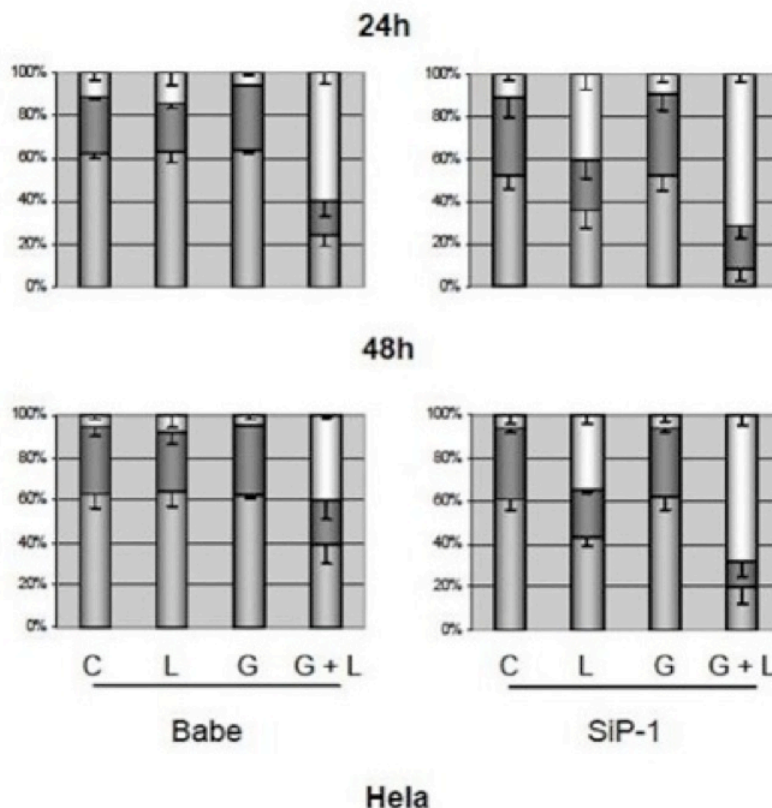


(a) Le cellule B16 Babe o SiP-1 sono state trattate con Me-Lex (L; 100  $\mu$ M) o con Me-Lex in combinazione con GPI 15427 (G; 2.5  $\mu$ M) ed il ciclo cellulare è stato analizzato attraverso citofluorimetria a flusso. I risultati sono presentati come percentuale di cellule trattate nelle differenti fasi del ciclo cellulare a 24 e 48 h. L'analisi statistica è stata effettuata usando l'ANOVA seguita dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple. Nelle cellule Babe e SiP-1 le differenze di percentuale delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra i gruppi trattati con il Me-Lex e il Me-Lex + GPI 15427 sono risultate statisticamente significative solo a 48 h. Le differenze nella percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra le cellule Babe e SiP-1 trattate con Me-Lex sono statisticamente significative a tutti i tempi (P<0.05).

Figura 3.10: Analisi del ciclo cellulare delle B16 silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

Le cellule Hela sono più resistenti al Me-Lex rispetto alle cellule B16. Infatti, il Me-Lex nelle cellule Hela di controllo non modifica sostanzialmente la distribuzione del ciclo cellulare, invece l'aggiunta al composto metilante di GPI 15427 aumenta significativamente l'accumulo delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M, anche se transitoriamente (Fig. 3.11 nella pagina seguente). Le cellule Hela silenziate per PARP-1 sono più sensibili alle modificazioni del ciclo cellulare indotto dal Me-Lex rispetto alla loro controparte di controllo. L'aggiunta di GPI 15427 blocca

permanentemente le cellule SiP-1 nella fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare (Fig. 3.11).

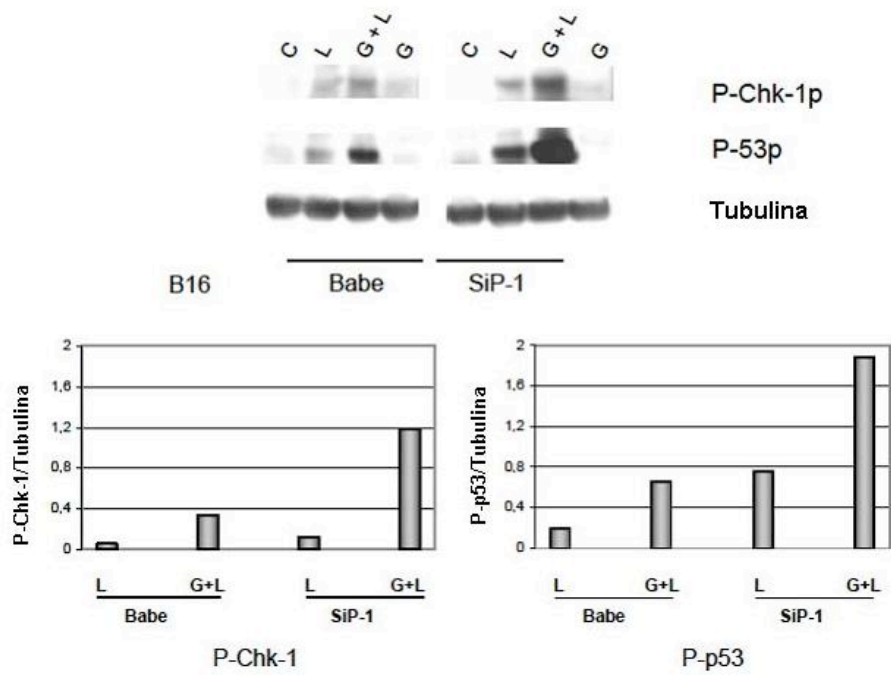


(a) Le cellule HeLa Babe o SiP-1 sono state trattate con Me-Lex (L; 100  $\mu$ M) o con Me-Lex in combinazione con GPI 15427 (G; 2.5  $\mu$ M) ed il ciclo cellulare è stato analizzato attraverso citofluorimetria a flusso. I risultati sono presentati come percentuale di cellule trattate nelle differenti fasi del ciclo cellulare a 24 e 48 h. L'analisi della varianza ANOVA seguita dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple, indica che il GPI 15427 aumenta significativamente l'accumulo delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M indotto dal Me-Lex sia nelle cellule Babe che nelle cellule SiP-1. Le differenze nella percentuale di cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra le cellule Babe e SiP-1 trattate con Me-Lex sono statisticamente significative a tutti i tempi ( $P < 0.05$ ).

Figura 3.11: Analisi del ciclo cellulare delle HeLa silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

L'analisi delle cellule B16 Babe e SiP-1 con *western blotting* indica che il trattamento con Me-Lex determina una elevata induzione della fosforilazione di p53 nelle cellule silenziate per PARP-1 (Fig. 3.12).

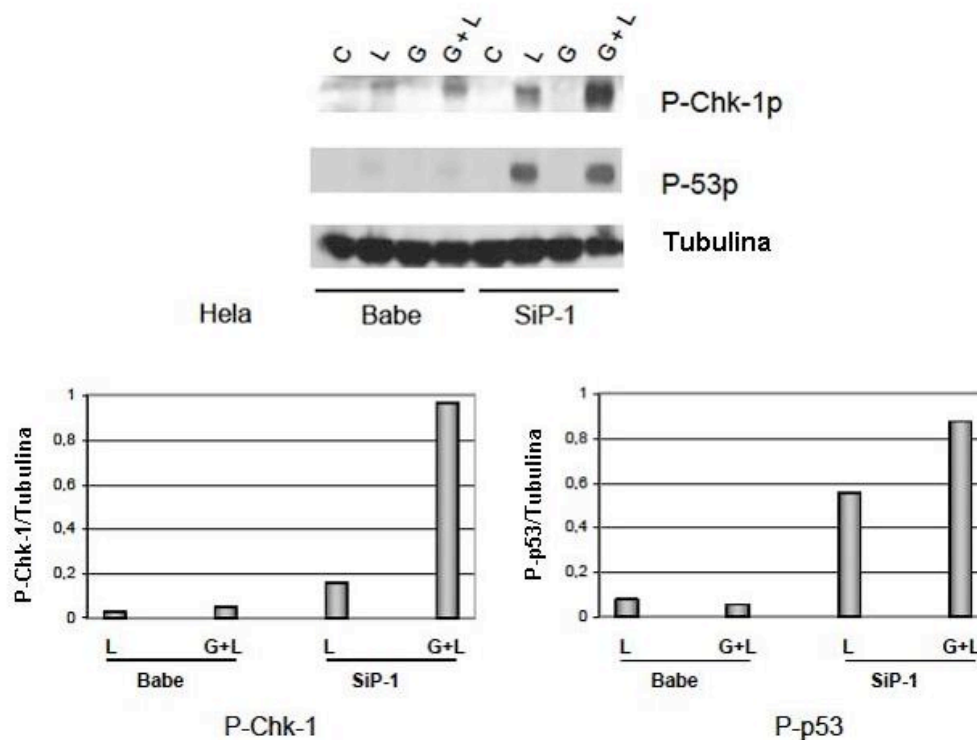
L'aggiunta dell'inibitore di PARP all'agente metilante determina un aumento ulteriore dei livelli di fosforilazione di p53 e di Chk-1 fosforilati sia nelle cellule B16 di controllo che in quelle silenziate per PARP-1 (Fig. 3.12).



(a) Le cellule B16 Babe o SiP-1 sono state trattate con 100  $\mu$ M di Me-Lex  $\pm$  GPI 15427 per 3 h; i lisati cellulari (50  $\mu$ g) sono stati sottoposti ad elettroforesi ed analizzati per l'espressione del Chk-1 fosforilato (P-Chk-1) o della p53 fosforilata (P-p53) o della tubulina. Gli istogrammi rappresentano il rapporto tra la densità ottica (O.D.) delle proteine fosforilate nei gruppi trattati con Me-Lex (L) o GPI 15427  $\pm$  Me-Lex (L+G) (dopo aver sottratto i valori O.D. dei controlli) o della tubulina. I risultati sono rappresentativi di uno di due esperimenti con risultati comparabili.

Figura 3.12: Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule B16 silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

Anche nelle cellule Hela il GPI 15427 aumenta la fosforilazione del Chk-1 e della p53 nelle cellule silenziate per PARP-1 rispetto alle cellule di controllo (Fig. 3.13 nella pagina seguente). Al contrario, non si osserva attivazione di p53 nelle cellule Hela di controllo trattate con gli stessi farmaci.



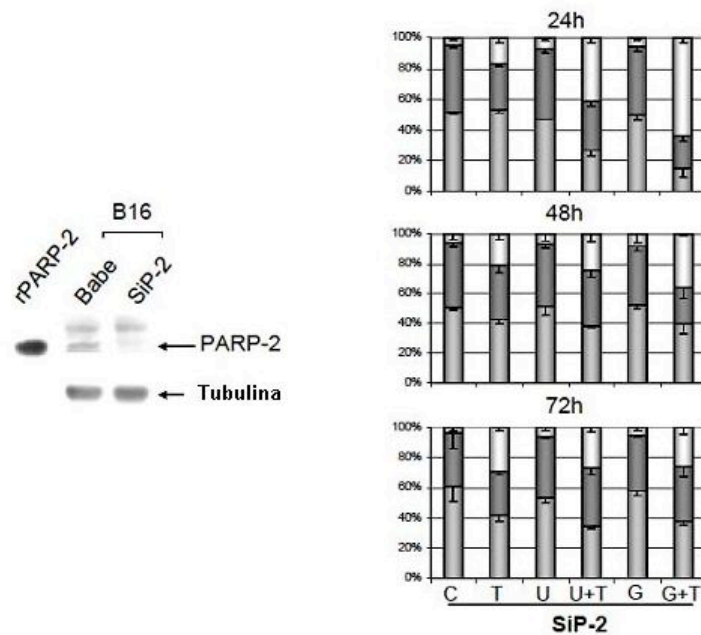
(a) Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule HeLa Babe e SiP-1 trattate con Me-Lex come singolo agente o in combinazione con il GPI 15427. Le cellule B16 Babe o SiP-1 sono state trattate con 100  $\mu$ M di Me-Lex  $\pm$  GPI 15427 per 3 h; i lisati cellulari (50  $\mu$ g) sono stati sottoposti ad elettroforesi ed analizzati per l'espressione del Chk-1 fosforilato (P-Chk-1) o della p53 fosforilata (P-p53) o della tubulina. Gli istogrammi rappresentano il rapporto tra la densità ottica (O.D.) delle proteine fosforilate nei gruppi trattati con Me-Lex (L) o GPI 15427  $\pm$  Me-Lex (L+G) (dopo aver sottratto i valori O.D. dei controlli) o della tubulina. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti con risultati simili.

Figura 3.13: Analisi della fosforilazione di Chk-1 e p53 nelle cellule HeLa silenziate per PARP-1 e di controllo trattate con Me-Lex come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

### 3.1.7 MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE INDOTTE DALLA TMZ IN COMBINAZIONE CON INIBITORI DI PARP NELLA LINEA DI MELANOMA SILENZIATA PER PARP-2

Allo scopo di determinare il ruolo di PARP-2 nell'effetto antiproliferativo della TMZ, abbiamo trasfettato il vettore pSuper-siPARP-2 in un clone di melano-  
ma B16. Un clone (SiP-2) silenziato per PARP-2 (SiP-2, Fig. 3.14 nella pagina 60 pannello a sinistra) è stato selezionato per gli studi successivi.

I risultati del saggio di formazione di colonie indicano che il clone SiP-2 è ugualmente sensibile alla TMZ ( $IC_{50}$ ;  $140 \pm 12 \mu M$ ) come il suo controllo ( $IC_{50}$ ;  $134 \pm 6 \mu M$ ), e l'aggiunta di GPI 15427 potenzia in modo simile l'effetto della TMZ ( $IC_{50}$ ;  $45 \pm 3 \mu M$ ). Abbiamo, quindi, valutato le modificazioni del ciclo cellulare prodotte dal trattamento con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427 o UPF 1035; quest'ultimo composto inibisce preferenzialmente PARP-2 ([47]). Per questi esperimenti è stata usata una concentrazione di UPF 1035 ( $15 \mu M$ ) capace di inibire l'attività cellulare di PARP nelle cellule B16 in misura simile alla dose del GPI 15427 pari a  $2.5 \mu M$  (dati non mostrati). I risultati illustrati nella figura 3.14 nella pagina seguente (pannello di destra) mostrano che il silenziamento di PARP-2 di per sé non determina un accumulo di cellule in fase  $G_2/M$ , dopo il trattamento con la TMZ, come agente singolo rispetto alle cellule di controllo Babe trattate con la stessa concentrazione di TMZ (Fig. 3.5 nella pagina 48). Entrambe gli inibitori di PARP determinano un accumulo transitorio delle cellule SiP-2 nella fase  $G_2/M$  del ciclo cellulare. Gli effetti del GPI 15427 sono più evidenti rispetto a quelli prodotti dall'UPF 1035 poiché GPI 15427 inibisce PARP-1 più efficacemente rispetto a PARP-2. Invece, l'UPF 1035 agisce principalmente su PARP-2 ([47]). Questi dati indicano che l'inibizione farmacologica di PARP-1 nelle cellule silenziate per PARP-2 determina solo un temporaneo accumulo delle cellule in fase  $G_2/M$ . È da notare che, solo quando PARP-1 è silenziato la concomitante inibizione farmacologica di PARP-2 induce le cellule ad arrestarsi stabilmente nella fase  $G_2/M$  (Fig. 3.5 nella pagina 48, pannello di destra). L'inibizione farmacologica di PARP-1 e PARP-2 nelle cellule di controllo non è sufficiente ad indurre un arresto permanente (3.5 nella pagina 48, pannello di sinistra).



(a) Pannello di sinistra: i lisati cellulari (50  $\mu$ g) del clone B16 di controllo (Babe) o del clone trasfettato con il vettore pSuper-siPARP-2 per il silenziamento di PARP-2 (SiP-2) sono stati analizzati attraverso *immunoblotting* per l'espressione di PARP-2 o della tubulina. Il PARP-2 ricombinante murino (rPARP-2, 500 ng, Alexis) è stato usato come controllo positivo. Pannello di destra: le cellule SiP-2 sono state trattate con TMZ (T; 300  $\mu$ M), o con l'inibitore di PARP-2 UPF 1035 (U; 15  $\mu$ M) o GPI 15427 (G; 2.5  $\mu$ M) come agenti singoli o in combinazione con la TMZ; il ciclo cellulare è stato analizzato attraverso citofluorimetria a flusso a 24, 48 e 72 h. L'analisi statistica per la comparazione multipla indica che le differenze di percentuale delle cellule in fase G<sub>2</sub>/M tra TMZ e TMZ + UPF 1035 sono statisticamente significative solo a 24 h, mentre le differenze tra TMZ e TMZ + GPI 15427 sono statisticamente significativi sia a 24 che a 48 h.

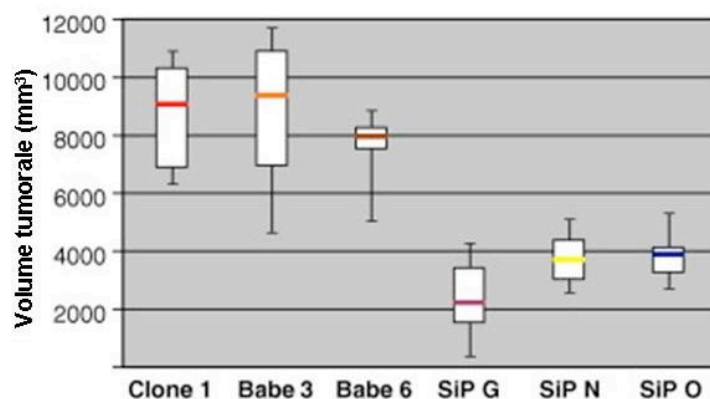
Figura 3.14: Influenza sulla distribuzione del ciclo cellulare delle cellule B16 silenziata per l'espressione di PARP-2 (SiP-2) della TMZ come agente singolo o in combinazione con gli inibitori di PARP, GPI 15427 e UPF 1035.

## 3.2 RUOLO DI PARP-1 NELLA CRESCITA TUMORALE E CHEMIO-SENSIBILITA' *IN VIVO*

### 3.2.1 IL SILENZIAMENTO DI PARP-1 RIDUCE SIGNIFICATIVAMENTE LA CRESCITA DEL MELANOMA *IN VIVO* IN UN MODELLO ORTOTOPICO

Per stabilire se la deplezione dell'espressione di PARP-1, nei nostri cloni, potesse influenzare la loro tumorigenicità *in vivo* abbiamo usato un modello ortotopico di melanoma con sviluppo di noduli a livello muscolare.

Topi C57BL/6 istocompatibili sono stati inoculati a livello i.m. con i cloni SiP-1 o i cloni di controllo e ne è stato monitorato il volume tumorale mediante l'utilizzo di un calibro. Nei topi inoculati con i cloni SiP-1, abbiamo osservato un ritardo nello sviluppo della massa tumorale; infatti, fino a 10 giorni dall'inoculo, i noduli non sono ancora misurabili nel 30 % degli animali. Nello stesso periodo di tempo i noduli sono calibrabili in tutti i topi inoculati con i cloni di melanoma di controllo. Al ventiduesimo giorno dall'inoculo è stata osservata una significativa riduzione ( $P < 0.05$ ) del volume tumorale nei topi inoculati con i cloni di melanoma SiP-1 rispetto agli animali inoculati con il Clone 1 o con i cloni Babe di controllo. (Fig. [3.15 nella pagina seguente](#)).



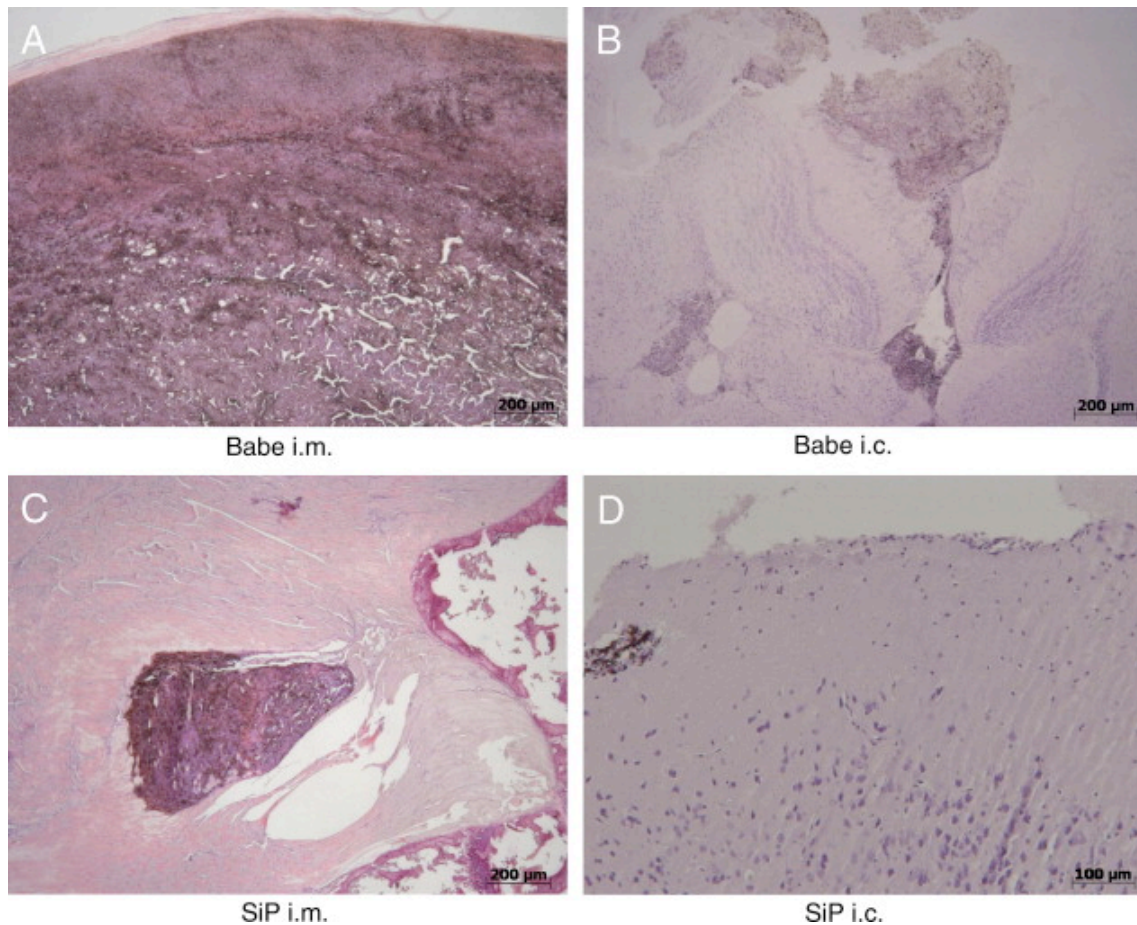
(a) I topi sono stati inoculati a livello intramuscolare con il Clone 1, i cloni Babe 3 o Babe 6 e con i cloni silenziati per PARP-1 SiP G, SiP N o SiP O. I diagrammi *Box and Whisker* si riferiscono al volume tumorale misurato al giorno 22 dopo l'inoculo del tumore. I dati sono stati analizzati con il metodo ANOVA seguito dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple ed i risultati indicano che la crescita dei cloni SiP è sempre stata significativamente inferiore ( $P < 0.05$ ) rispetto ai cloni di controllo (Clone 1, Babe 3, Babe 6). Non sono state osservate differenze significative tra i cloni di controllo. Gli intervalli di confidenza (95%) sono stati i seguenti: Clone 1 7341-10, 184; Babe 3, 5777-11, 736; Babe 6, 6171-8972; SiP G 3158-4499; SiP N 1141-3569; SiP O, 2924-4556.

Figura 3.15: Crescita *in vivo* dei cloni di melanoma silenziati per PARP-1 e di controllo in un modello ortotopico.

Gli animali sono stati, poi, sacrificati al fine di evitare sofferenze inaccettabili, in accordo con le linee-guida, nazionali ed internazionali per la regolamentazione sulla sperimentazione animale.

Gli studi successivi sono stati condotti utilizzando il clone Babe 3, come clone di controllo e che indicheremo da qui in poi come Babe, ed il clone SiP G come clone silenziato per PARP-1, che indicheremo con SiP-1.

L'esame istologico dei noduli di melanoma effettuato 15 giorni dopo l'inoculo del tumore ha rivelato una enorme infiltrazione tumorale dei tessuti muscolari nelle sezioni colorate con ematossilina/eosina degli animali inoculati con il clone Babe, viceversa, agli stessi tempi, la crescita del clone SiP-1 è ancora limitata e confinata all'interno del tessuto muscolare (Fig. 3.16 nella pagina successiva, pannello A e C).



(a) L'analisi istologica del tessuto muscolare prelevato dall'arto posteriore e del tessuto cerebrale di topi (6 topi per gruppo) inoculati con il clone Babe (A, B) o con il clone SiP-1 (C, D) è stata eseguita mediante colorazione con ematossilina-eosina sui campioni prelevati il giorno 15 o il giorno 11 rispettivamente per il modello intramuscolare o intracranico. In figura sono mostrate le sezioni istologiche rappresentative della crescita del melanoma nel muscolo dell'arto posteriore (i.m.) (A, C) o del cervello (B, D). L'esame microscopico del muscolo mostra una enorme infiltrazione tumorale nella sezione di tessuto degli animali inoculati con il clone Babe (A). Similmente, l'analisi dei tessuti cerebrali mostra un coinvolgimento cerebrale multifocale negli animali inoculati con il clone di melanoma Babe. Inoltre, ampie masse tumorali sono state rilevate sia nel sito di iniezione che nel parenchima (B). Al contrario, l'analisi del tessuto muscolare (C) e del tessuto cerebrale (D) prelevati dai topi inoculati con il clone SiP mostra una minima infiltrazione tumorale.

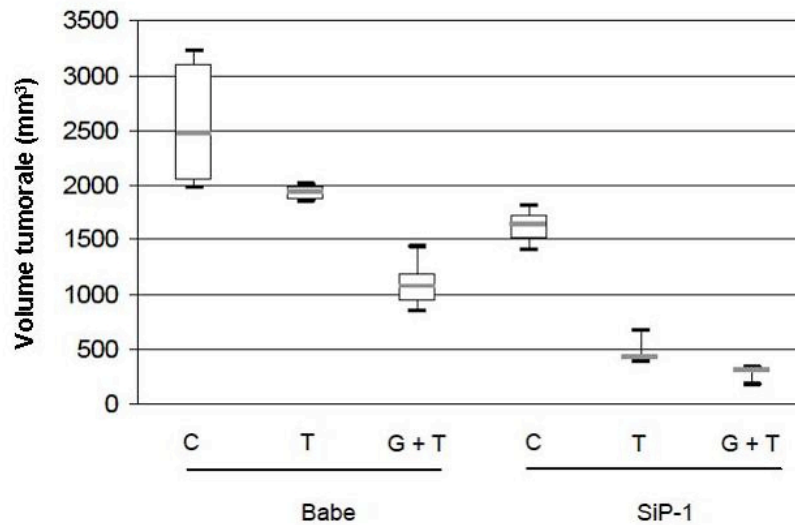
Figura 3.16: Esame istologico della crescita del clone di melanoma di controllo o del clone di melanoma silenziato per PARP-1.

### 3.2.2 IL TRATTAMENTO CON TMZ É PIÚ EFFICACE NEI TOPI INOCULATI A LIVELLO INTRAMUSCOLARE CON MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 E LA COMBINAZIONE CON INIBITORI DI PARP NE AUMENTA ULTERIORMENTE L'EFFICACIA

Come precedentemente osservato l'inibitore di PARP è in grado di aumentare la chemiosensibilità *in vitro* ai metilanti anche nei cloni silenziati stabilmente per PARP-1 (Tab. 3.4 nella pagina 46). Abbiamo, quindi, valutato l'influenza dell'inibitore di PARP sulla chemiosensibilità alla TMZ, *in vivo*, delle cellule di melanoma silenziate per PARP-1. Per questo scopo i cloni Babe di controllo e i cloni SiP-1 sono stati inoculati a livello intramuscolare in topi C57BL/6; successivamente, gli animali sono stati trattati giornalmente con 5 dosi di TMZ (100 mg/Kg/al giorno) da sola o in combinazione con il GPI 15427 (40 mg/Kg/al giorno). La figura 3.17 nella pagina successiva mostra la crescita del tumore in topi di controllo e in quelli trattati dopo 15 giorni dall'inoculo quando è stata raggiunta la grandezza massima eticamente accettabile nel gruppo di controllo.

I risultati indicano che le cellule silenziate per PARP-1 mostrano un ridotto tasso di crescita ( $P=0.001$ ) rispetto ai controlli. Come nel modello *in vitro* anche nel modello *in vivo* la chemio-sensibilità alla TMZ è più elevata nei tumori SiP-1 rispetto a quelli di controllo (72 % nei tumori SiP-1 vs 25% di inibizione della crescita nei tumori Babe). Il GPI 15427 come agente singolo non ha alcun effetto sulla crescita tumorale (dati non mostrati), ma aumenta significativamente l'inibizione della crescita indotta dalla TMZ nei topi inoculati con le cellule Babe. E' da notare inoltre che l'inibitore di PARP aumenta anche l'attività antitumorale della TMZ nei topi inoculati con le cellule SiP-1, determinando una regressione tumorale in tutti gli animali (Tabella 3.2 nella pagina 66).

In contrasto, nel gruppo degli animali trattati con TMZ come agente singolo si osserva solo una regressione su sei (Tabella 3.2 nella pagina 66). Nel complesso i dati mostrano che il GPI 15427 aumenta significativamente l'effetto antitumorale della TMZ, sia nei topi inoculati con Babe sia nei topi inoculati con il clone SiP-1.



(a) I topi sono stati inoculati i.m. con i cloni Babe (n=6) o con i cloni SiP-1 (n=8) e trattati con TMZ (T) o con TMZ + GPI 15427 (G + T) il giorno successivo all'inoculo del tumore, alla dose di 100 mg/Kg/ al giorno per 5 giorni. I diagrammi *Box and Whisker* si riferiscono al volume tumorale misurato al giorno 15 dall'inoculo del tumore. L'analisi statistica mediante test del *t Student* indica che la crescita del clone SiP-1 è significativamente più bassa di quella del tumore di controllo ( $P=0.001$ ). Per valutare le differenze tra il gruppo di controllo ed i gruppi trattati i dati sono stati analizzati con l'ANOVA seguita dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple ed i risultati indicano che il GPI 15427 aumenta significativamente l'efficacia della TMZ sia nei tumori Babe che in quelli SiP-1 ( $P<0.05$ ). I trattamenti con il GPI 15427 come agente singolo non hanno effetto sulla crescita dei tumori Babe o SiP-1 (dati non mostrati). Gli intervalli di confidenza (95%) sono i seguenti: controllo Babe non trattato, 2087-3024; Babe trattato con TMZ, 1872-1978; Babe trattato con TMZ + GPI 15427, 919-1268; controllo SiP-1 non trattato, 1497-1744; SiP-1 trattato con TMZ, 380-529; SiP-1 trattato con TMZ + GPI 15427, 263-340.

Figura 3.17: Analisi della chemio-sensibilità delle cellule B16 Babe e SiP-1 inoculate in topi trattati con TMZ come agente singolo o in combinazione con GPI 15427.

Linea cellulare	Trattamento	Inibizione della crescita tumorale vs CTR (%) <sup>§</sup>	Inibizione della crescita tumorale vs TMZ (%) <sup>§</sup>	Regressione s <sup>#</sup>
B16 Babe	TMZ	25		0/6
B16 Babe	TMZ + GPI 15427	58	44	0/6
B16 SiP-1	TMZ	72		1/6
B16 SiP-1	TMZ + GPI 15427	82	34	6/6

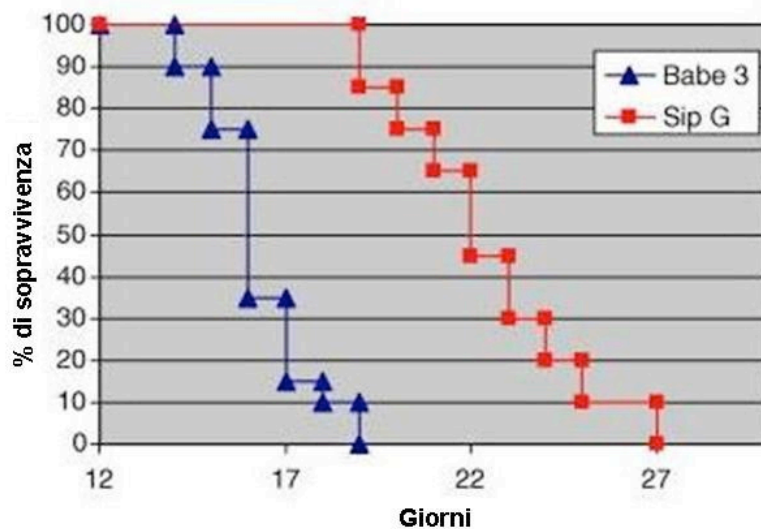
(a) <sup>§</sup>calcolato al giorno 15, che corrisponde anche al nadir dell'effetto inibitorio sulla crescita indotto dal trattamento con i farmaci nelle cellule Babe. <sup>#</sup> La regressione tumorale è stata definita come una riduzione del volume tumorale alla fine di due misurazioni consecutive.

Tabella 3.2: Efficacia terapeutica *in vivo* della TMZ e del GPI 15427 in combinazione nelle linee tumorali B16 di controllo o SiP-1.

In contrasto, nel gruppo degli animali trattati con TMZ come agente singolo si osserva solo una regressione su sei (Tabella 3.2). Nel complesso i dati mostrano che il GPI 15427 aumenta significativamente l'effetto antitumorale della TMZ, sia nei topi inoculati con Babe sia nei topi inoculati con il clone SiP-1.

### 3.2.3 AUMENTO DELLA SOPRAVVIVENZA DEI TOPI INOCULATI A LIVELLO INTRACRANICO CON IL MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 ED IL TRATTAMENTO CON LA TMZ RISULTA PIU' EFFICACE RISPETTO AI TOPI INOCULATI CON IL MELANOMA DI CONTROLLO

Poiché il cervello è uno dei siti preferenziali di metastasi del melanoma, abbiamo valutato se l'espressione di PARP-1 nel clone di melanoma potesse influenzare la loro capacità di crescita a livello del SNC. A questo scopo, il clone silenziato SiP-1 o il clone di controllo Babe, che mostrano identica cinetica di crescita *in vitro*, sono stati inoculati nel cervello di topi C57BL/6 e sono state confrontate le curve di sopravvivenza degli animali. La perdita dell'espressione di PARP-1 si associa ad un ritardo nella crescita del melanoma nel cervello, come evidenziato dalla sopravvivenza significativamente più lunga degli animali inoculati con il clone SiP-1 rispetto a quella degli animali inoculati con il clone di melanoma di controllo (Fig. 3.18 nella pagina successiva e Tabella 3.3 nella pagina seguente).



(a) In figura sono rappresentate le curve di sopravvivenza dei topi inoculati i.c. con i cloni di melanoma Babe o SiP-1 (n=20/gruppo). Le curve di sopravvivenza sono generate secondo il metodo del prodotto limite *Kaplan-Meier* e le differenze statistiche tra i due gruppi sono valutate con l'analisi *log-rank* con la correzione di *Yates*. Un aumento significativo ( $P < 0.0001$ ) della sopravvivenza si osserva confrontando le curve dei topi inoculati con il clone SiP-1 rispetto alle curve dei topi inoculati con il clone Babe.

Figura 3.18: Sopravvivenza dei topi inoculati a livello intracerebrale con melanoma di controllo o con melanoma silenziato per PARP-1.

Topi	Cloni	MST (range)	$P^a$ (SiP versus Babe)	$P^b$ (KO versus WT)
WT	Babe 3	16 (14–19)	–	–
WT	Sip G	22 (19–27)	<0.05	–
KO	Babe 3	16 (14–18)	–	NS
KO	Sip G	22 (20–27)	<0.05	NS

<sup>a</sup> La differenza statistica tra i due gruppi è valutata attraverso l'analisi *log-rank* con la correzione di *Yates*.  $P$  è stato calcolato confrontando le curve di sopravvivenza dei gruppi SiP-1 *versus* il gruppo Babe.

<sup>b</sup>  $P$  è stato calcolato confrontando le curve di sopravvivenza degli animali *wild-type* (WT, cioè topi con PARP-1) inoculati con le cellule Babe o SiP-1 con le curve di sopravvivenza dei topi *knockout* inoculati con le cellule Babe o SiP-1, rispettivamente. NS: non significativo.

Tabella 3.3: Sopravvivenza dei topi *wild-type* o *knockout* per PARP-1 inoculati a livello intracerebrale con i cloni di melanoma Babe o SiP.

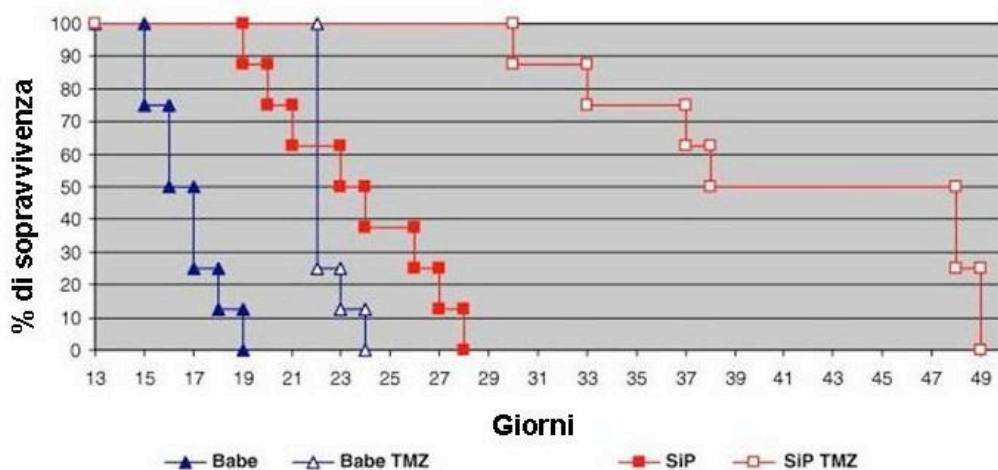
L'esame microscopico dei tessuti cerebrali, effettuato l'undicesimo giorno do-

po l'inoculo intracerebrale del tumore, rivela un coinvolgimento multifocale cerebrale negli animali inoculati con il clone di melanoma Babe. Infatti grandi masse tumorali sono presenti sia nel sito di iniezione che nel parenchima (Fig. 3.16 nella pagina 63 pannello B). Al contrario, l'analisi del tessuto cerebrale proveniente dai topi inoculati i.c. con il clone SiP mostra una minima infiltrazione tumorale (Fig. 3.16 nella pagina 63 pannello D).

Allo scopo di studiare se la mancata espressione di PARP-1 nelle cellule del microambiente tumorale (ad esempio l'endotelio, le cellule infiammatorie) potesse anche influenzare la crescita tumorale, le cellule di melanoma con PARP-1 intatto o silenziato, sono state inoculate, a livello intracranico in topi singenici PARP-1 *knockout* (KO), ma non sono state osservate differenze in termini di sopravvivenza media (*median survival time*, MST) tra topi *knockout* e *wild-type* (Tabella 3.3 nella pagina precedente). I dati suggeriscono che l'espressione di PARP-1 nelle cellule tumorali svolge un ruolo rilevante nello sviluppo del tumore mentre l'espressione o meno di PARP-1 nei tessuti circostanti non sembrano influenzare la crescita del melanoma a livello del SNC.

Abbiamo successivamente analizzato se la somministrazione *in vivo* della TMZ in topi inoculati nel SNC con melanoma B16 silenziato per PARP-1 fosse più efficace rispetto allo stesso trattamento nei topi inoculati con melanoma di controllo. Per questo scopo, topi C57BL/6 sono stati inoculati a livello i.c. con il clone SiP o con il clone di controllo Babe; successivamente gli animali sono stati trattati con 5 dosi di TMZ (68 mg/Kg/i.p./al giorno). Il confronto delle curve di sopravvivenza tra gli animali trattati con TMZ e quelli non trattati con l'agente metilante, indica che la TMZ aumenta significativamente ( $P < 0.0001$ ) la sopravvivenza sia nei cloni di controllo Babe che nei cloni silenziati SiP-1 (Fig. 3.19 nella pagina seguente e Tabella 3.4 nella pagina successiva).

L'aumento della sopravvivenza, indotta dalla TMZ, nei topi inoculati con il clone silenziato SiP-1 è circa due volte e mezzo più elevata di quella provocata dal farmaco negli animali inoculati con il clone di controllo Babe (Tabella 3.4 nella pagina seguente).



(a) I topi (8 topi/gruppo) sono stati inoculati a livello i.c. con cloni di melanoma Babe o SiP-1 e trattati con TMZ come indicato nella sezione Materiali e Metodi. L'analisi statistica è stata effettuata usando l'ANOVA seguita dal test di Bonferroni nel caso di comparazioni multiple ed indica che le differenze tra i vari gruppi sono statisticamente significative ( $P < 0.05$ ) ad eccezione delle differenze tra il gruppo SiP-1 non trattato e Babe trattato con TMZ.

Figura 3.19: Chemiosensibilità *in vivo* alla TMZ dei cloni di melanoma di controllo o silenziati per PARP-1 nel modello intracerebrale.

Clone	Trattamento	MST (range)	ILS <sup>a</sup>
Babe 3	Nessuno	16.5 (15–19)	–
	TMZ (68 mg/kg)	22 (22–24)	33.3%
SiP G	Nessuno	23.5 (19–28)	–
	TMZ (68 mg/kg)	43 (30–49)	82%

<sup>a</sup>L'aumento della sopravvivenza (*lifespan* -ILS) dei topi trattati con i farmaci è stato calcolato confrontando la loro mediana (MST) con quella dei loro controlli inoculati soltanto con il veicolo del farmaco.

Tabella 3.4: Efficacia *in vivo* della TMZ nel clone di controllo o in quello silenziato per PARP-1 nel modello intracerebrale.

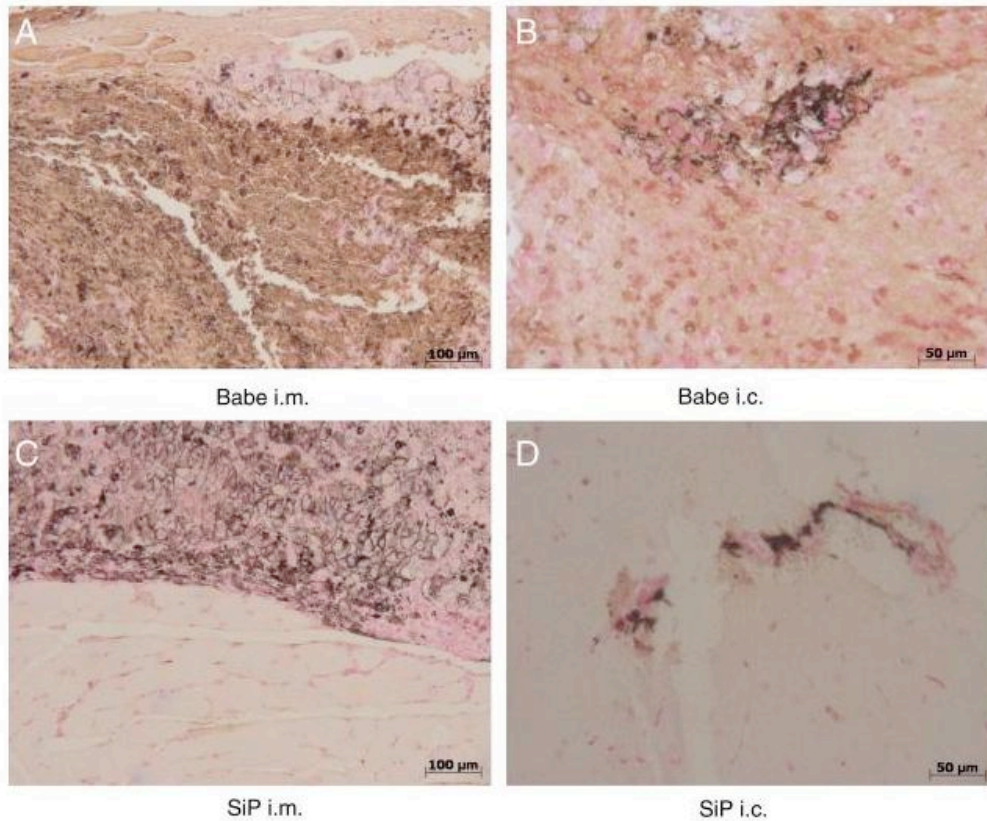
### 3.2.4 LA CRESCITA *IN VIVO* DELLE CELLULE DI MELANOMA SILENZIATE PER PARP-1 É ACCOMPAGNATA DA: UNA RIDOTTA FORMAZIONE DEI POLIMERI DI ADP-RIBOSIO, VASCOLARIZZAZIONE TUMORE-ASSOCIATA E REAZIONE INFIAMMATORIA

L'analisi immunoistologica dei polimeri di ADP-ribosio (PAR), indicante l'espressione della funzione di PARP-1, mostra una colorazione positiva nell'area tumorale e peritumorale soltanto nei campioni provenienti dai topi che sono stati inoculati con il clone Babe (Fig. 3.20, pannello A e B). Al contrario, nessuna colorazione PAR è stata osservata nei tessuti degli animali inoculati con il clone di melanoma SiP-1 (Fig. 3.20 [nella pagina successiva](#), pannello C e D).

E' noto che la riduzione della funzionalità di PARP-1 riduce la formazione di nuovi vasi sanguigni in risposta a stimoli angiogenici nei topi PARP-1 KO [?]. Con lo scopo di valutare l'influenza della mancata espressione di PARP-1, *in vivo*, sull'angiogenesi nel nostro modello, abbiamo analizzato la neo-formazione di microvasi nel tumore usando la colorazione immunoistochimica per la molecola 1 di adesione delle cellule endoteliali/piastrine (PECAM-1/CD31) che è un indicatore di angiogenesi. I risultati indicano che i campioni di melanoma provenienti dai topi inoculati con il clone di controllo Babe sono altamente vascolarizzati (Fig. 3.21 [nella pagina 72](#), pannello A e B), invece le sezioni di melanoma provenienti dai topi inoculati con il clone SiP-1 non presentano una colorazione distinguibile dei vasi (Fig. 3.21 [nella pagina 72](#), pannello C e D).

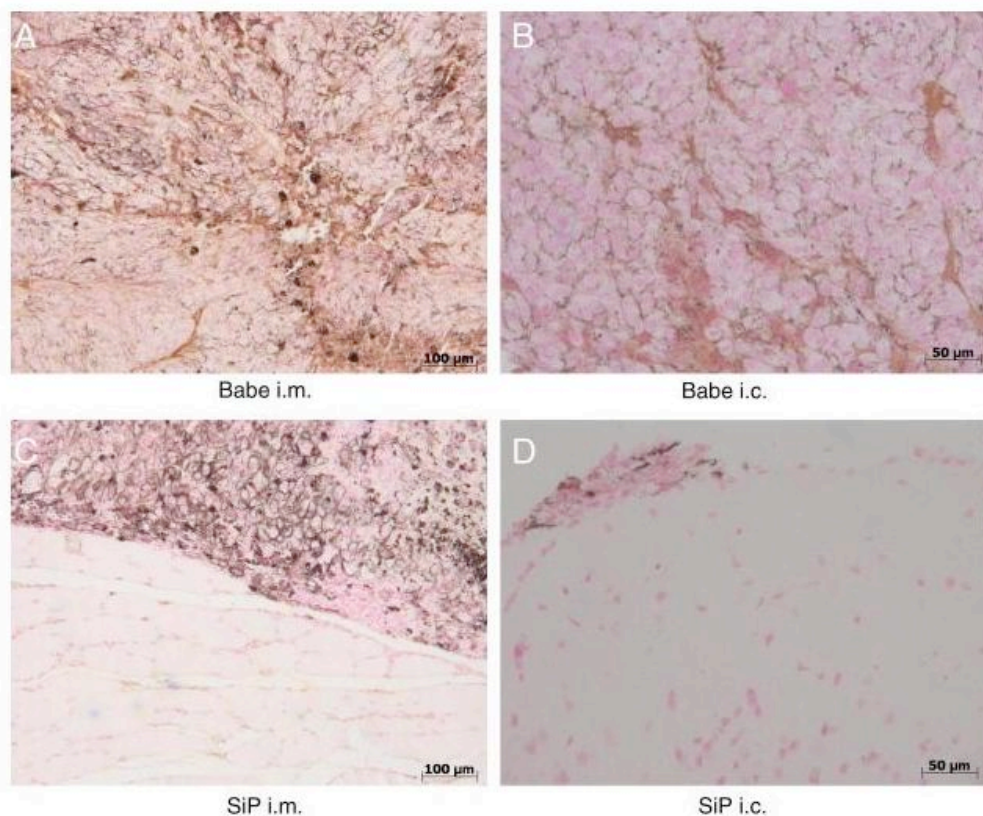
Poichè la componente infiammatoria in un tumore è essenziale nel suo sviluppo ed è dovuta al coinvolgimento di PARP-1 nella modulazione della reazione infiammatoria soprattutto attraverso la regolazione trascrizionale delle citochine pro infiammatorie, abbiamo analizzato l'espressione della citochina infiammatoria TNF- $\alpha$  nelle sezioni istologiche di melanoma. Inoltre, abbiamo anche effettuato l'analisi immunoistochimica del recettore per il fattore di necrosi tumorale indotto dai glucocorticoidi (GITR), anch'esso coinvolto nella risposta infiammatoria [92].

I risultati indicano che sia il TNF- $\alpha$  che il GITR sono altamente espressi nel clone di melanoma Babe che cresce a livello i.m., invece non ci sono segni tangibili di reazione infiammatoria nel clone di melanoma silenziato per PARP-1 (Fig. 3.22 [nella pagina 73](#)). Risultati simili sono stati ottenuti nel modello i.c. di melanoma (dati non mostrati).



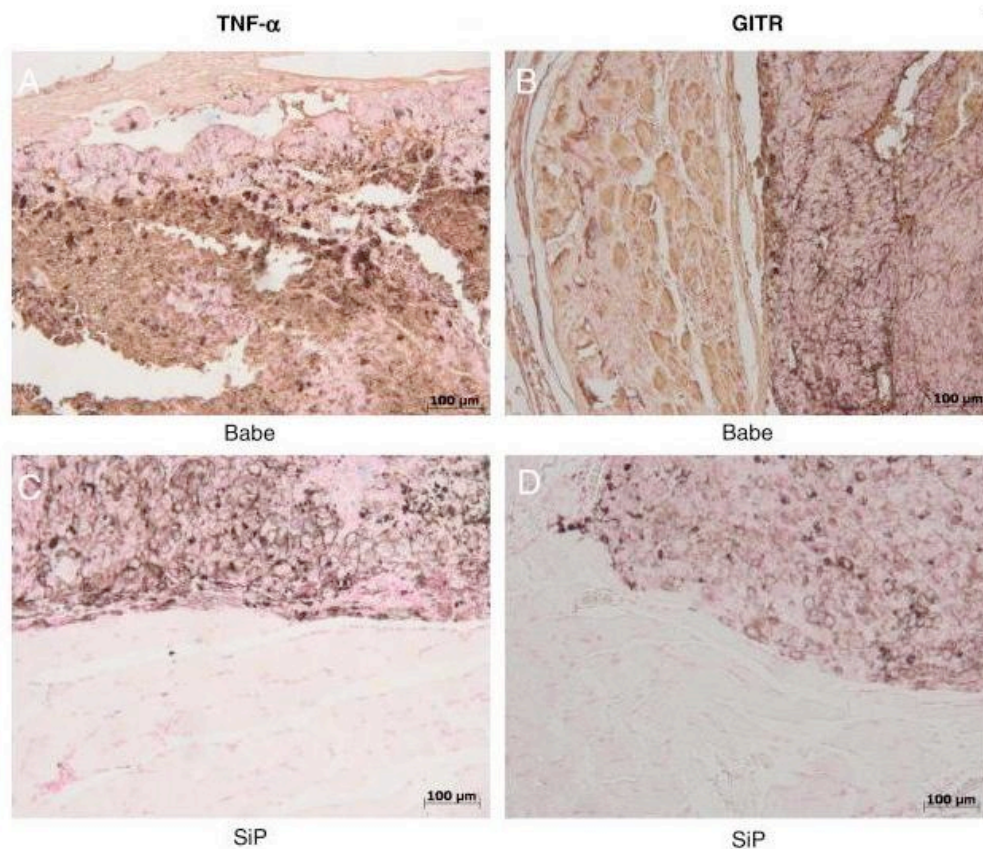
(a) La colorazione immunohistochemica con anticorpi anti-polimeri di ADP-ribosio, come indicatore dell'attivazione di PARP, è stata effettuata nei campioni prelevati al giorno 15 o 11 per il modello i.m. e i.c., rispettivamente dai topi (6 topi/gruppo) inoculati con il clone Babe (A e B) o il clone SiP-1 (C, e D). Nella figura sono mostrate le sezioni istologiche rappresentative della crescita del melanoma nel muscolo dell'arto posteriore (i.m.) (A, C) o nel cervello (i.c.) (B, D). L'evidente accumulo dei polimeri è evidenziato da una colorazione brunastra nei gruppi inoculati con Babe, in particolare nelle aree tumorali e peritumorali (A, B). Al contrario, non è stata osservata nessuna positività per i polimeri nei tessuti degli animali inoculati con il clone di melanoma SiP-1 (C, D). Profili immunohistochemici simili sono stati osservati in altri cinque campioni per gruppo.

Figura 3.20: Analisi immunohistochemica delle sezioni tumorali per le proteine poli-ADP-ribosilate (PAR)



(a) La formazione dei vasi è stata analizzata mediante colorazione immunohistochimica effettuata nei campioni tumorali, prelevati 15 o 11 giorni dopo l'inoculo rispettivamente nei modelli i.m ed i.c., da topi (6 topi/gruppo) inoculati con il cloni Babe (A, B) o SiP-1 (C, D). Nella figura sono mostrate le sezioni istologiche rappresentative della crescita del melanoma nel muscolo dell'arto posteriore (i.m.) (A, B) o nel cervello (i.c.) (C, D). In particolare, una colorazione positiva per PECAM/CD31, come indice di tumore altamente vascolarizzato, è stata trovata nei tessuti dei topi inoculati con il clone Babe. I vasi sanguigni sono evidenziati con strutture ramificate o piccole lacune vascolari che si colorano positivamente per PECAM/CD31 (A, C). Al contrario, i campioni di melanoma dei topi inoculati con il clone SiP non presentano una colorazione positiva distinguibile dei vasi (B, D). Profili immunohistochimici simili sono stati riscontrati in altri cinque campioni per gruppo.

Figura 3.21: Analisi immunohistochimica dell'espressione di PECAM/CD31 negli espianti di tumori di controllo o silenziati per PARP-1



- (a) La reazione infiammatoria è stata analizzata attraverso colorazione con anticorpi contro TNF- $\alpha$  (A, C) e GITR (B, D) delle sezioni istologiche dei noduli di melanoma prelevati il giorno 15, dai topi (6 topi/gruppo) inoculati con i cloni Babe (A, B) o SiP-1 (C, D). Nella figura sono mostrate sezioni istologiche rappresentative del melanoma cresciuto nel muscolo dell'arto posteriore. Si distingue una colorazione positiva per il TNF- $\alpha$  e il GITR nel clone di melanoma Babe. Inoltre l'espressione di GITR è evidente in associazione alle strutture vascolari (A, B). Al contrario, non è distinguibile alcuna colorazione positiva per TNF- $\alpha$  e GITR nei tessuti dei topi inoculati con il clone di melanoma silenziato per PARP-1 (C, D). Profili immunohistochimici simili sono stati rilevati in altri cinque campioni per gruppo.

Figura 3.22: Analisi immunohistochimica dell'espressione del TNF- $\alpha$  e del GITR negli espianti tumorali di controllo o silenziati per PARP-1.

## 4 DISCUSSIONE

### 4.1 L'ABOLIZIONE DELL'ESPRESSIONE DI PARP-1 AUMENTA LA CHEMIO-SENSIBILITÀ *IN VITRO*

Per cercare di chiarire lo specifico contributo delle proteine PARP-1 e PARP-2 nel riparo del DNA in seguito al danno prodotto da agenti metilanti, abbiamo silenziato stabilmente le linee cellulari per PARP-1 o per PARP-2. Cloni silenziati mostrano, *in vitro*, una cinetica di crescita caratterizzata da tempi di raddoppiamento simile a quella dei cloni di controllo. Inoltre, in seguito al trattamento con  $H_2O_2$ , che genera rotture nei filamenti di DNA attraverso la formazione di radicali ossidrilici ed induce l'attivazione di PARP, i cloni silenziati per PARP-1 non rispondono all'agente genotossico sintetizzando significative quantità di polimeri di ADP-ribosio. È interessante notare che l'abrogazione dell'espressione di PARP-1 protegge le cellule dalla necrosi precoce come osservato in studi precedenti [75]. La modesta espressione di PARP-2 evidenziabile nelle cellule di melanoma B16 non causa, nei cloni silenziati per PARP-1 una ulteriore incorporazione di  $NAD^+$  nei polimeri di ADP-ribosio di nuova sintesi in seguito al trattamento con  $H_2O_2$ , almeno per il breve periodo in cui viene effettuato il saggio, suggerendo un ruolo preminente di PARP-1 nella risposta a danni ossidativi del DNA. Questi dati sono in accordo con studi precedenti effettuati in fibroblasti silenziati per PARP-1 nei quali l' $H_2O_2$  non causa la sintesi di polimeri [68]. L'attività PARP rilevata nei cloni SiP-1 non trattati potrebbe derivare da altri membri della famiglia PARP, la cui attività sembra essere, almeno finora, indipendente dal danno al DNA. Le linee cellulari sono state trattate con composti metilanti, che generano differenti spettri di addotti metilici, come agenti singoli o in combinazione con inibitori di PARP e sono stati confrontati con i loro controlli. I cloni di melanoma silenziati per l'espressione di PARP-1 sono risultati molto più sensibili alla TMZ ed anche ad un inibitore della topoisomerasi I, rispetto ai cloni di controllo, come conseguenza del mancato intervento di PARP-1 nel riparo dei danni al

DNA indotti da questi farmaci antitumorali. Nel nostro modello sperimentale, infatti, il trattamento con la TMZ o con il metabolita attivo dell'irinotecano SN-38, induce un più precoce accumulo di cellule in fase G2/M nella linea silenziata per l'espressione di PARP-1, rispetto alle cellule di controllo. Questo risultato è in accordo con studi precedenti che mostrano un più marcato arresto in G2/M in assenza di PARP-1 in seguito ai trattamenti con agenti metilanti diversi dalla TMZ, con gli inibitori della topoisomerasi I o le radiazioni ionizzanti [77, 78, 79].

La chemio-sensibilità delle cellule silenziata per l'espressione di PARP-1, è stata, anche valutata in una linea cellulare tumorale di carcinoma della cervice uterina (Hela). I risultati dei nostri saggi indicano che le cellule Hela sono più resistenti alla TMZ rispetto alle cellule B16, in quanto le Hela esprimono alti livelli di MGMT. Le cellule Hela sono anche moderatamente più resistenti, rispetto alle B16, al metilante selettivo Me-Lex, che produce solo addotti metilici a livello della N3-Adenina. Questo effetto è dovuto agli alti livelli di attività MPG riscontrabili nelle cellule Hela. L'MPG è, infatti, il primo enzima che interviene tra quelli del sistema di riparo BER, rimuovendo le basi N3-metilpurine danneggiate in seguito al trattamento con Me-Lex.

Il silenziamento dell'espressione di PARP-1 nelle cellule Hela e B16 determina un significativo aumento della sensibilità anche al Me-Lex. L'osservazione che il silenziamento di PARP-1 aumenta la sensibilità all'agente metilante Me-Lex selettivo per N3-Adenina, e che la chemio-sensibilizzazione alla TMZ avviene anche nelle cellule con elevati livelli di MGMT nelle quali sono stati rimossi gli O<sup>6</sup>metil-addotti, dimostra fortemente il coinvolgimento di PARP-1 nel processamento e riparo delle N-metilpurine generate da questi composti.

Nelle linee cellulari silenziata per PARP-1 l'inibizione farmacologica *in vitro* dell'attività PARP, mediante il composto GPI 15427, aumenta ulteriormente la sensibilità alla TMZ e al Me-Lex. Nel caso della TMZ, l'inibitore di PARP porta la sensibilità del melanoma e delle cellule del carcinoma della cervice uterina silenziata per PARP-1, a livelli simili a quelli delle cellule di controllo trattate con la combinazione TMZ + GPI 15427. Nel caso del Me-Lex, l'inibitore di PARP riduce, invece, l'IC<sub>50</sub> del farmaco ad un valore più basso di quello ottenuto nelle cellule di controllo trattate con la combinazione Me-Lex + GPI 15427. Si può ipotizzare che l'inibizione di PARP-2 (o di altri PARP) sensibilizzi maggiormente le cellule al trattamento con Me-Lex a causa dell'alta percentuale di N3-MeA (>99%) generate da questo composto rispetto alla TMZ (9%) [80, 23].

Per entrambi gli agenti metilanti, i livelli di chemio-sensibilizzazione causati dal silenziamento di PARP-1 sono più bassi rispetto a quelli ottenuti dall'inibi-

zione farmacologica dell'attività PARP nelle cellule di controllo, indicando che in assenza della proteina PARP-1 avviene ancora un certo livello di riparo delle lesioni N-metilpuriniche.

Si noti che la chemio-sensibilizzazione in seguito a trattamenti con l'inibitore di PARP avviene anche nelle cellule Hela che sono dotate di alti livelli di MGMT. Questa osservazione è in linea con recenti studi effettuati in cellule leucemiche in cui si dimostra che l'efficacia della combinazione di inibitori di PARP con TMZ può essere indipendente dall'attività del MGMT [72].

## 4.2 MODIFICAZIONI DEL CICLO CELLULARE NELLE LINEE TUMORALI SILENZIATE PER PARP-1 O PARP-2

È noto in letteratura che il danno al DNA causato da differenti farmaci induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, S, o G2, prevenendo, in questo modo, la replicazione del DNA danneggiato o mitosi aberranti, fin quando il danno è adeguatamente riparato. Il ciclo cellulare è regolato dall'attività di numerose proteine chinasi. Queste ultime sono centrali nel mantenere l'integrità genomica e la vitalità cellulare. Infatti, i difetti genetici che perturbano queste vie possono causare tumorigenesi o apoptosi in dipendenza della particolare natura e gravità del danno [81, 82].

I trattamenti con TMZ o Me-Lex, in combinazione con il GPI 15427 inducono, nelle cellule tumorali, differenti modificazioni del ciclo cellulare dipendenti dall'espressione di PARP-1; in particolare, determinano un arresto stabile del ciclo cellulare in G2/M solo nelle cellule silenziate per PARP-1. In queste cellule tali modificazioni del ciclo cellulare indotte dagli agenti metilanti sono evidenti precocemente (già a 24 h) e sono accompagnate da una progressiva diminuzione della percentuale di cellule in fase S. Una possibile spiegazione di queste modificazioni potrebbe essere ricercata nel fatto che il danno genotossico derivato dall'interruzione del processo di riparo ad opera del BER si verifici durante la prima replicazione [23]. Nelle condizioni sperimentali usate in questo studio, l'inibizione farmacologica di PARP combinata con il silenziamento di PARP-1 potrebbe interamente bloccare la capacità di enzimi alternativi ad agire come sensori del danno al DNA o come coordinatori del riparo determinando una ulteriore sensibilizzazione agli agenti metilanti. I nostri risultati sono in linea con quanto osservato nei fibroblasti derivati da topi PARP-1 KO trattati con l'agente metilante

ad ampio spettro metil metanesulfonato (MMS), come agente singolo o in combinazione con altri inibitori di PARP [78]. Questi autori hanno anche dimostrato che l'inibizione di PARP, nelle cellule KO, aumenta la citotossicità del MMS ed attribuiscono questo effetto potenziante ad una completa abrogazione della funzione del BER nelle cellule che hanno già un BER inefficiente a causa della perdita dell'espressione della proteina PARP-1.

Il clone silenziato per PARP-2 è stato generato per determinare il ruolo dell'abrogazione di tale enzima sugli effetti della TMZ. Le cellule B16 silenziate per PARP-2 non risultano maggiormente sensibili alla TMZ e l'inibizione farmacologica dell'attività PARP nelle cellule silenziate per PARP-2 determina solo un temporaneo accumulo di cellule in G2/M. Al contrario, nelle cellule B16 silenziate per PARP-1 la TMZ induce un rapido e più elevato aumento della percentuale di cellule in G2/M rispetto alle cellule di controllo. Questo accumulo in fase G2/M, però, è transitorio sia nelle linee SiP-1 che nelle linee Babe. L'inibizione farmacologica di PARP-1 e PARP-2 determina un arresto nella fase G2/M nelle cellule SiP-1, mentre nelle cellule Babe non è in grado di indurre un arresto permanente.

Il blocco del ciclo cellulare, in seguito ad un danno, innesca vie di trasduzione del segnale che concentrano il riparo del DNA e la progressione del ciclo, o, in caso di danno elevato, l'apoptosi per minimizzare la probabilità di replicazione o segregazione di filamenti di DNA danneggiati. I controlli del ciclo cellulare avvengono nella transizione G1/S e in fase G2/M. L'attivazione delle chinasi ATM o ATR si verifica entro pochi minuti dopo il danno al DNA ed entrambe possono fosforilare ed attivare Chk-1, la quale, a sua volta, fosforila la fosfatasi Cdc25 C, che resta sequestrata nel citoplasma. Poiché Cdc25C è responsabile della rimozione di due gruppi fosfato da CDK1 consentendone l'attivazione e la progressione delle cellule nella fase M, l'inattivazione di Cdc25C determina il blocco in G2/M [83].

L'analisi *western blotting* degli estratti cellulari, ottenuti dalle cellule di HeLa o di B16, mostra che la TMZ provoca un'induzione della fosforilazione di Chk-1 più intensa nel melanoma B16 rispetto alle cellule HeLa probabilmente perché il melanoma murino è caratterizzato da una bassa espressione dell'enzima di riparo MGMT ed è più sensibile al danno da O<sup>6</sup>-MeG. I trattamenti con TMZ o Me-Lex inducono una più elevata attivazione di Chk-1 e p53 nelle cellule SiP-1 rispetto alle cellule Babe di controllo. Il più alto livello di fosforilazione di queste proteine si osserva, inoltre, nelle cellule silenziate per PARP-1 esposte agli agenti metilanti in combinazione con il GPI 15427. L'induzione di fosforilazione della p53 e del Chk-1 è anche evidente nelle cellule HeLa SiP-1 trattate con il farmaco. Il fatto

che queste cellule siano resistenti al danno da O<sup>6</sup>-MeG a causa dell' alto livello di MGMT, dimostra che l'assenza di PARP-1 e la sua inibizione farmacologica compromettono il riparo delle N-metilpurine.

Il trattamento con l'agente metilante selettivo per la N3-Adenina Me-Lex favorisce l'attivazione della p53 e Chk-1 anche nelle cellule Hela SiP-1. Lo stesso trattamento anche in combinazione con l'inibitore di PARP nelle cellule che esprimono PARP-1 non è, invece, sufficiente ad indurre la fosforilazione di p53. L'assenza di attivazione di p53 e la minore induzione di Chk-1 nelle cellule di controllo trattate con Me-Lex rispetto a quelle trattate con la TMZ, indica che le N3-MeA sono di per sé meno tossiche delle O<sup>6</sup>-MeG.

L'UCN-01, un inibitore di Chk-1 [84], riduce marcatamente l'accumulo delle cellule in G2/M, indotto dai trattamenti con TMZ, usata come agente singolo o in combinazione con il GPI 15427, sia nelle cellule di controllo che in quelle silenziate per PARP-1, confermando il ruolo della via di trasduzione del segnale di Chk-1 nella risposta al danno indotto dal metilante. Il fatto che l'UCN-01 non previene completamente l'arresto delle cellule in G2 dopo il danno al DNA potrebbe essere dovuto al coinvolgimento dell'attivazione di p53 nell'arresto in G2/M. E' stato, infatti, dimostrato che la p53, anche se non è richiesta per l'iniziale arresto delle cellule tumorali in G2 dopo l'esposizione alle riazioni ionizzanti, è essenziale per il mantenimento dell'arresto in G2/M a lungo termine. Inoltre nell'arresto in fase G2/M possono essere anche coinvolti altri *pathways* oltre alla p53 [85].

Questi risultati suggeriscono che una completa inibizione dell'attività di PARP unita all'assenza della proteina PARP-1 potrebbe rendere le cellule tumorali ipersensibili agli agenti metilanti attraverso il mantenimento del punto di controllo in G2/M che è strettamente mediato dalla fosforilazione di Chk-1 e/o di p53.

### 4.3 IL MELANOMA SILENZIATO PER PARP-1 HA UNA MINORE AGGRESSIVITÀ *IN VIVO*

Nel presente studio abbiamo dimostrato che l'abolizione dell'espressione di PARP-1 attraverso il silenziamento stabile del gene corrispondente, riduce l'aggressività del melanoma, come indicato dal ritardo della progressione tumorale *in vivo*. Infatti, i topi inoculati con cellule singeniche di melanoma silenziate per PARP-1 sviluppano dei noduli tumorali misurabili più tardivamente e di dimensioni più piccole rispetto ai topi inoculati con cellule di melanoma che esprimono PARP-1. Il ridotto potenziale di crescita *in vivo* delle cellule di melanoma silenziate per PARP-1 è anche dimostrato dal significativo aumento del tempo di sopravviven-

za dei topi inoculati a livello intracranico con cellule silenziate, un modello che mima la localizzazione nel SNC del melanoma maligno.

L'analisi dell'attivazione di PARP, della formazione di polimeri di ADP-ribosio nelle sezioni istologiche dei melanomi di controllo e della formazione di vasi nei tumori trapiantati, indica una evidente vascolarizzazione, mentre, non è stata trovata evidenza di vascolarizzazione o di sintesi di polimeri nei cloni silenziate per PARP-1. Si potrebbe ipotizzare che la perdita della regolazione della trascrizione genica, mediata da PARP-1, e la ridotta disponibilità di polimeri possa influenzare l'espressione e la funzione delle proteine necessarie per la formazione di una rete vascolare, che è un requisito essenziale per la crescita dei tumori, *in vivo*. Questi dati sono in linea con i recenti studi che dimostrano che la delezione genica o l'inibizione farmacologica di PARP-1 compromettono l'angiogenesi in risposta ai fattori di crescita vascolari [86, 87, 36]. L'inibizione di PARP-1 può quindi anche svolgere un'azione antitumorale attraverso la riduzione della neo-formazione di vasi tumore-associata, indipendentemente dal suo effetto sul riparo del DNA [88].

Il coinvolgimento di PARP-1 nell'angiogenesi è stato dimostrato in diversi modelli sperimentali, talora con risultati divergenti. Infatti, mentre l'inibizione farmacologica di PARP riduce la migrazione delle cellule endoteliali in risposta al VEGF [86, 87, 36], le modificazioni post-trascrizionali del VEGF attraverso i polimeri di ADP-ribosio inibiscono l'attività del VEGF [89]. Inoltre, il fattore di crescita insulino simile-1, che è un noto promotore dell'angiogenesi, regola negativamente la funzione di PARP-1 fosforilandolo e questo effetto potrebbe contribuire ad aumentare la trascrizione di VEGF [90]. Nel presente modello di melanoma silenziato per PARP-1, l'espressione del VEGF è simile a quella dei controlli ([36]). Perciò la riduzione dell'aggressività dei cloni di melanoma silenziate per PARP-1 potrebbe dipendere dalla modulazione di bersagli che ancora non sono stati identificati.

La crescita *in vivo* dei melanomi di controllo è accompagnata da un'intensa espressione del TNF- $\alpha$ , come evidenziato dall'analisi immunostochimica. Questo risultato è in accordo con precedenti studi che dimostrano una significativa infiltrazione del melanoma da parte di cellule del sistema immunitario, particolarmente macrofagi e mastociti, che secernono TNF- $\alpha$  e altre citochine [91]. Anche l'espressione di GITR risulta essere elevata nelle sezioni istologiche degli espianti melanoma di controllo. GITR è un recettore appartenente alla super-famiglia del TNFR che è espresso nei linfociti T, nei macrofagi e nei neutrofili [92]. Gli espianti di melanoma silenziate per PARP-1 analizzati nello stesso periodo di tempo, risul-

tano essere negativi sia per l'espressione del TNF- $\alpha$  sia per l'espressione di GITR in accordo con la limitata aggressività tumorale osservata *in vivo*. La reazione infiammatoria è meno presente nei cloni silenziati per PARP-1 che mostrano una ridotta infiltrazione ed invasione dei tessuti circostanti. L'assenza di PARP-1 fornisce, infatti, protezione dal danno tissutale in diversi modelli di infiammazione acuta e cronica; in particolare, gli inibitori di PARP riducono l'infiltrazione dei neutrofili nel sito di infiammazione, la produzione di citochine pro-infiammatorie e la severità della malattia. Questi effetti sono stati correlati alla capacità di PARP-1 di modulare la trascrizione delle molecole di adesione e delle proteine coinvolte nel mantenimento dell'integrità genomica [34]. I nostri risultati sulla riduzione *in vivo* dell'aggressività dei melanomi silenziati per PARP-1 potrebbero essere spiegati con un ritardato reclutamento delle componenti infiammatorie, che dovrebbero favorire lo sviluppo e la progressione tumorale. Al contrario, la mancanza di PARP-1 nelle cellule del microambiente tumorale e dei tessuti limitrofi non influenza la crescita del melanoma, come dimostrato dalla comparabile crescita dei cloni di melanoma osservata nei topi PARP-1 KO o in quelli di controllo. Le differenze ottenute tra i dati, *in vitro*, indicanti un uguale potenziamento proliferativo dei cloni silenziati per PARP-1 e dei cloni di controllo, e dei risultati *in vivo*, che mostrano, invece una ridotta aggressività dei cloni silenziati, potrebbero essere dovute al fatto che la mancanza di PARP-1 riduce lo sviluppo della rete vascolare all'interno della massa tumorale [36]. Tale effetto inibitorio potrebbe contribuire ad una ulteriore riduzione della crescita del melanoma *in vivo*.

I cloni di melanoma silenziati per l'espressione di PARP-1 mostrano un'elevata sensibilità alla TMZ, anche *in vivo*, sia nel modello intracerebrale, che simula la localizzazione tumorale nel SNC, sia nel modello ortotopico. Infatti, l'aumento della sopravvivenza, nei topi inoculati con le cellule SiP-1, ottenuto in seguito ai trattamenti con TMZ è due volte più alto rispetto a quello ottenuto nei topi inoculati con le cellule di melanoma di controllo, sottoposti allo stesso trattamento.

I trattamenti *in vivo* con la combinazione della TMZ insieme all'inibitore di PARP degli animali inoculati con le cellule di melanoma silenziate per PARP-1, determinano un'ulteriore riduzione della crescita tumorale rispetto ai trattamenti degli stessi animali con la sola TMZ. Inoltre l'efficacia antitumorale ottenuta dal trattamento con la TMZ nei topi inoculati con i tumori SiP-1 è più alta di quella osservata nei topi inoculati con il melanoma di controllo e trattati con TMZ + GPI 15427. La chemio-sensibilizzazione ottenuta *in vivo* attraverso il silenziamento stabile del gene PARP-1 sembra essere, quindi, superiore a quella ottenuta attra-

verso la sola inibizione farmacologica, suggerendo che una prolungata e completa abrogazione dell'attività di PARP-1 durante il trattamento con la TMZ sia richiesta per un'ottimale potenziamento della chemioterapia. L'assenza di espressione di PARP-1, diversamente dall'inibizione farmacologica, potrebbe ostacolare le interazioni proteina-proteina mediate da PARP-1 e questo effetto potrebbe contribuire all'aumentata chemio-sensibilità dei cloni di melanoma silenziati.

## 4.4 CONCLUSIONI

Questi risultati forniscono nuove evidenze di un coinvolgimento diretto di PARP-1 nell'aggressività dei tumori a cui contribuisce, almeno in parte, la modulazione del processo angiogenico. I risultati confermano, inoltre, il ruolo di PARP-1 nel riparo dei danni al DNA indotti dai metilanti e nella chemio-resistenza. Infine, l'ulteriore potenziamento della chemio-sensibilità da parte degli inibitori di PARP osservato nelle cellule silenziatae per PARP-1, dimostra il coinvolgimento di PARP-2, o di altri enzimi PARP, nel riparo degli addotti metilici.

Questi dati suggeriscono l'utilità di inibire sia PARP-1 che PARP-2 per aumentare l'efficacia della chemioterapia e per ridurre la progressione tumorale attraverso un meccanismo anti-angiogenico

## 5 Pubblicazioni generate nel corso del dottorato

### 5.1 Pubblicazioni inerenti al lavoro descritto nella tesi

Tentori L., Muzi A., **Dorio A.S.**, Scarsella M., Legnetti C., Shah G.M., Xu W., Campioni E., Gold B., Pellicciari R., Dantzer F., Zhang J., Graziani G. "Pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in PARP-1 silenced tumor cells increases chemosensitivity to temozolomide and a N3-adenine selective agent ". *Submitted*, 2010.

Tentori L., Muzi A., **Dorio A.S.**, Bultrini S., Mazzon E., Lacal P., Shah G., Zhang J., Navarra P., Nocentini G. "Stable depletion of poly (ADP-ribose) polymerase-1 reduces in vivo melanoma growth and increases chemosensitivity". *European Journal of Cancer*, 2008; 44 (9): 1302-1314.

### 5.2 Altre pubblicazioni

Vernole P., Muzi A., Volpi A., **Dorio A.S.**, Terrinoni A., Shahd Girish M. and Graziani G.. "Inhibition of homologous recombination by treatment with BVVDU (brivudin) or by RAD51 silencing increases chromosomal damage induced by bleomycin in mismatch repair-deficient tumour cells" *Mutation Research* 2009; 664, (1-2): 39-47.

Lacal Pedro M, Tentori L, Muzi A, Ruffini F, **Dorio A.S.**, Xu W, Arcelli D, Zhang J, Graziani G. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity down-regulates the expression of syndecan-4 and Id-1 in endothelial cells. *Int J Oncol.* 2009 Mar; 34 (3): 861-72.

Tentori L, **Dorio A.S.**, Muzi A, Lacal PM, Ruffini F, Navarra P, Graziani G. The integrin antagonist cilengitide increases the antitumor activity of temozolomide against malignant melanoma *Oncol Rep.* 2008 Apr; 19 (4): 1039-43.

Tentori L., Lacal P., Muzi A., **Dorio A.S.**, Leonetti C., Scarsella M., Ruffini F, Xud W., Mine W., Stoppacciaro A., Colarossi C., Wange Z., Zhangd J. and Graziani G. "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis" *European Journal of Cancer* 2007; 43 (14): 2124-2133.

# ABBREVIAZIONI

TMZ= temozolomide (3-metil-4-oxo-3H,4H-imidazo[4,3-d][1,2,3,5]-tetrazine-8-carbossamide)

SN-38= 7-Etil-10-idrossi-camptotecina

PARP-1= poli-ADP-ribosio polimerasi

PAR= polimeri di ADP-ribosio

PARG= poli ADP-ribosio glicoidrolasi

BER= (*base excision repair*) sistema di riparo per escissione di una base

DTIC= dacarbazina

MTIC= 5-(3-metiltriazeno)-imidazol-4-carbossamide

NER= (*nucleotide excision repair*) sistema di riparo per escissione di un nucleotide

MMR o MR=*mismatch repair system*

APE= endonucleasi del sistema di riparo BER

XRCC1= *X-ray repair cross-complementing 1*

Me-Lex= MeOSO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>lexitropsina

NAD= nicotinammide adenina dinucleotide

UCN-01= 7-idrossistaurosporina

GPI15427= [10-(4-metil-piperazina-1-ilmetil)-2H-7-oxa-1,2-diazabenzode-antracene-3-one

UPF1035= derivato del 5-benzoiloxisoquinolin-1(2H)-one

FSC= *forward scatter*

SSC= *side scatter*

MST= tempo medio di sopravvivenza

VEGF= fattore di crescita endoteliale vascolare

IGF-1= fattore di crescita insulino simile

GITR= *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*

TNFR= fattore di necrosi tumorale

MMS= *methyl methanesulfonate*

MGMT= metil guanina metil transferasi

Cdk= chinasi ciclina-dipendenti

DMEM= *Dulbecco's modified Eagle's medium*

PBS= tampone fosfato

NLS= segnale di localizzazione nucleare

DBD= dominio di legame al DNA

TBS-T= soluzione salina tamponata con trizma e tween 20

BRCA1= gene del cancro alla mammella

PCNA= antigene nucleare di proliferazione cellulare

NHEJ= saldatura delle estremità non omologhe

HR= ricombinazione omologa

MPF= fattore che promuove la maturazione

MPG= N-MetilPurina DNA Glicosilasi

# Bibliografía

- [1] Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. *Molecular Biology of the Gene*, 2004, ch. 9 and 10. Peason Benjamin Cummings; CSHL Press. 5th ed.
- [2] Peralta-Leal A., Rodríguez-Vargas J.M., Aguilar-Quesada R., Rodríguez M.I., Linares J.L., de Almodóvar M.R., Oliver F.J. PARP inhibitors: new partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med.*, 2009; 47: 13-26.
- [3] Frosina G. et al. Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 9573-9578.
- [4] Buermeyer A.B. et al. Mammalian DNA mismatch repai. *Annu. Rev. Genet.*, 1999; 33: 533-564.
- [5] Hartlerode A.J., Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J.*, 2009; 423: 157-168. Review.
- [6] Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 3723-3738.
- [7] Cortes U. and Wang Z. In "poly(ADP-ribosyl)ation", 2005; cap.3 (Burker A. ed.) Landes Sciences.
- [8] Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M., Althaus F.R.J. *Biol. Chem.*, 2000; 275: 40974-40980.
- [9] Yélamos J., Schreiber V., Dantzer F. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol Med.*, 2008; 14: 169-178.
- [10] Viràg L. In "poly(ADP-ribosyl)ation", 2005; cap.13 (Burker A. ed.) Landes Sciences.

- [11] Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat. Rev.*, 1997; 23: 35–61.
- [12] Fronza G., Gold B. The biological effects of N<sup>3</sup>-methyladenine. *J. Cell. Biochem.*, 2004; 91: 250–257.
- [13] Gerson S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.*, 2004; 4: 296-307.
- [14] Pegg A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res.*, 2000; 462: 83-100.
- [15] Tentori L., Orlando L., Lacal P.M., Benincasa E., Faraoni I., Bonmassar E., D’Atri S., Graziani G. Inhibition of O<sup>6</sup>-alkylguanine DNA-alkyltransferase or poly (ADP-ribose) polymerase increases susceptibility of leukemic cells to apoptosis induced by temozolomide. *Mol Pharmacol.*, 1997; 52: 249-258.
- [16] Terzah M. Horton, Gaye Jenkins, Debananda Pati, Linna Zhang, M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O<sup>6</sup>-methylguanine- DNA methyltransferase activity. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 2232-2242.
- [17] Quiros Steve, Roos Wynand P, Kaina Bernd. Processing of O(6)-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle*, 2010; 63: 1099-1111;
- [18] Karran P., Offman J., Bignami M. Human mismatch repair, drug-induced DNA damage and secondary cancer. *Biochimie.* 2003; 85:1149-1160.
- [19] Nguewa P. A., Fuertes M. A., Alonso C. & Perez J. M. Pharmacological modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death: exploitation in cancer chemotherapy. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 64: 1007–1014.
- [20] H. Li and J. Zhang: PARP inhibitors. *IDrugs*, 2001; 4: 804-812.
- [21] McLick J., Hakam A., Bauer P.I., Kun E., Zacharias D.E., and Glusker J.P. Benzamide-DNA interactions: deductions from binding, enzyme kinetics and from X-ray structural analysis of a 9-ethyladenine-benzamide adduct. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1987; 909: 71–83.

- [22] Tentori L., Portarena I., Graziani G. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res.*, 2002; 45: 73-85.
- [23] Tentori L., Graziani G. Chemiopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res.*, 2005; 52: 25-33.
- [24] Tentori L., Vernole P., Lacal P.M., Madaio R., Portarena I., Levati L., et al. Cytotoxic and clastogenic effects of a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester in mismatch repair deficient leukemic cells. *Leukemia*, 2000; 14: 1451-1459.
- [25] Tentori L., Balduzzi A., Portarena I., Levati L., Vernole P., Gold B., et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor increases apoptosis and reduces necrosis induced by a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 817-828.
- [26] Tentori L., Portarena I., Vernole P., Gold B., Graziani G.. Apoptotic and genotoxic effects of a methyl sulfonate ester that selectively generates N3-methyladenine and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in normal peripheral blood lymphocytes. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2002; 49: 217-224.
- [27] Tentori L., Forini O., Fossile E., Muzi A., Vergati M., Portarena I., et al. N3-methyladenine induces early poly (ADP-ribosylation), reduction of NF-kB DNA binding ability and nuclear upregulation of telomerase activity. *Mol. Pharmacol.*, 2005; 67: 572-581.
- [28] Kawato Y., Aonuma M., Hirota Y. et al. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.*, 1991; 51: 4187-4191.
- [29] Severin S.E. et al. Molecular Mechanism of Tumor Angiogenesis. *Biochemistry*, 2002; 68: 286-300.
- [30] Distler J.W., Hirth A., Kurowska-Stolarska M., Gay R.E., Gay S., Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, 2002; 47: 149-161.
- [31] Klagsbrun M. et al. Molecular Angiogenesis. *Chemistry and Biology*, 1999; 6: 217- 224.

- [32] Bergers G. et al. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 2003; 3: 401- 410.
- [33] Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1995; 146: 1029-1039.
- [34] Jagtap P., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005; 4: 421–40.
- [35] R. Aguilar-Quesada, J.A. Muñoz-Gámez and D. Martín-Oliva et al. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Curr. Med. Chem.*, 2007; 14: pp. 1179–1187.
- [36] Tentori L., Lacal P.M., Muzi A., et al. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition or PARP-1 gene deletion reduces angiogenesis. *Eur. J. Cancer*, 2007; 43: 2124–2133.
- [37] Martin-Oliva D., Aguilar-Quesada R., O'valle F., et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, 2006; 66: 5744–5756.
- [38] Pugh C.W., Ratcliffe Pj. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.*, 2003; 9: 677-684.
- [39] Jean-Christophe Amé, Véronique Rolli, Valérie Schreiber, Claude Niedergang, Françoise Apiou, Patrice Decker, Sylviane Muller, Thomas Höger, Josiane Ménissier-de Murcia and Gilbert de Murcia. PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 17860-17868.
- [40] Yelamos J., Monreal Y., Saenz L., Aguado E., Schreiber V., Mota R., Fuente T., Minguela A., Parrilla P., De Murcia G., Almarza E., Aparicio P., De Murcia M. *J. Embo J.*, 2006; 25: 4350-4360.
- [41] Schreiber V., Ricoul M., Amè J.C., Dantzer F., Meder V., Splenlehauer C., Stiegler P., Niedergang C., Sabatier L., Favaudon V., De Murcia J., De Murcia G. In "Poly(ADPribosyl)ation", 2005; cap.2 (Burker A. ed.) Landes Sciences.

- [42] Antony W. Oliver, Jean-Christophe Ame<sup>Â</sup>, S. Mark Roe, Valerie Good, Gilbert de Murcia and Laurence H. Pearl. Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Research*, 2004; 32: 456-464.
- [43] V. Schreiber, et al., Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1, *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 23028– 23036.
- [44] Mortusewicz O. et al. Feedback-regulated poly(ADP-ribosil)ation by PARP-1 is required for rapide response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acid Res.* 2007; 35: 7665-7675.
- [45] F. Dantzer, et al., Functional interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2, *Mol. Cell Biol.*, 2004; 24: 1595–1607.
- [46] Dantzer F., Mark M., Quenet D., Scherthan H., Huber A., Liebe B., Monaco L., Chicheportiche A., Sassone-Corsi P., De Murcia G., De Murcia M.J. *Proct. Natl. Sci. USA*, 2006; 103: 14854-14859.
- [47] Roberto Pellicciari, Emidio Camaioni, Gabriele Costantino, Laura Formentini, Paola Sabbatini, Francesco Venturoni, GçkÅen Eren, Daniele Bellocchi, Alberto Chiarugi, and Flavio Moroni. On the Way to Selective PARP-2 Inhibitors. Design, Synthesis, and Preliminary Evaluation of a Series of Isoquinolinone Derivatives. *Chem. Med. Chem.*, 2008; 3: 914 – 923.
- [48] Silvia Lapenna and Antonio Giordano. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews | Drug Discovery*, 2009; 8: 547-566.
- [49] van den Heuvel S, Hat-low E: Distinct roles for cyclindependent kinases in cell cycle control. *Science*, 1993; 262: 2050-2054.
- [50] Picard A., Strausfeld U., Doree M. Concerted roles of cyclin A, cdc25+ mitotic inducer, and type 2A phosphatase in activating the cyclin B/cdc2 protein kinase at the G,/M phase transition. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 1991; 56: 503-513.
- [51] Parker L., Piwnica-Worms H. Inactivation of the p34cdc2xyclyin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*, 1992; 257: 1955-1957.
- [52] Morgan D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995; 374: 131-134.

- [53] Evans T., Rosenthal E.T., Youngblom J., Distel D., Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983; 33: 389-396.
- [54] Cortez D., Guntuku S., Qin J., Elledge S.J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signalling. *Science*, 2001; 294: 1713-1716.
- [55] Lim D.S., Kim S.T., Xu B., Maser R.S., Lin J., Petrini J.H., Kastan M.B. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature*, 2000; 404: 613-617.
- [56] Banin S., Moyal L., Shieh S., Taya Y., Anderson C.W., Chessa L., Smorodinsky N.I., Prives C., Bartek, J., Lukas, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001; 13: 738-747.
- [57] Canman C.E., Lim D.S., Cimprich K.A., Taya Y., Tamai K., Sakaguchi K., Appella E., Kastan M.B., Siliciano J.D. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998; 281: 1677-1679.
- [58] Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003; 421: 499-506.
- [59] Haines D.S., Landers J.E., Engle L.J., George D.L. Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; 14: 1171-1178.
- [60] Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 1993; 7: 1126-1132.
- [61] Clarke A.R., Gledhill S., Hooper M.L., Bird C.C., Wyllie A.H. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*, 1994; 9: 1767-1773.
- [62] Sanchez Y., Wong C., Thoma R.S., Richman R., Wu Z., Piwnica W.H., Elledge S.J. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, 1997; 277: 1497-1501.

- [63] ] Zeng Y., Forbes K.C., Wu Z., Moreno S., Piwnica-Worms H., Enoch T. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. *Nature*, 1998; 395: 507-510.
- [64] Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., Vogelstein B. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell.*, 1997; 1: 3-11.
- [65] Taylor, W. R. and Stark, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001; 20: 1803–1815.
- [66] Jackson J. R., Gilmartin A., Imburgia C., Winkler J. D., Marshall L. A., Roshak A. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell-cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res.*, 2000; 60: 566-572.
- [67] Takai H., Naka K., Okada Y., Watanabe M., Harada N., Saito S., Anderson C.W., Appella E., Nakanishi M., Suzuki H., Nagashima K., Sawa H., Ikeda K., Motoyama N. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J.*, 2002; 21: 5195-5205.
- [68] Shah R.G., Ghodgaonkar M.M., Affar el B., Shah G.M. DNA vector-based RNAi approach for stable depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2005; 331:167–174.
- [69] Bai P., Houten S.M., Huber A., Schreiber V., Watanabe M., Kiss B., de Murcia G., Auwerx J., Ménissier-de Murcia J., Poly(ADP-ribose) polymerase-2 controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 37738-37746.
- [70] Zhang Y., Chen F-X., Mehta P. and Gold B. The design of groove and sequence selective alkylation of DNA by sulfonate esters tethered to lexitropsin. *Biochemistry*, 1993; 32: 7954-7965.
- [71] Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., D'Amati G., Vergati M., Portarena I., Xu W., Kalish V., Zupi G., Zhang J., Graziani G. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumour activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 5370-5379.

- [72] Horton T.M., Jenkins G., Pati D., Zhang L., Dolan M.E., Ribes-Zamora A., Bertuch A.A., Blaney S.M., Delaney S.L., Hegde M., Berg S.L. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity. *Mol. Cancer. Ther.*, 2009; 8: 2232-2242.
- [73] Bakondi E., Bai P., Szabo E.E., et al. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem.*, 2002; 50: 91-98.
- [74] Wang Z-Q., Auer B., Stingl L., et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.*, 1995; 9: 509-20.
- [75] Herceg Z., Wang Z.Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res.*, 2001; 477: 97-110.
- [76] Preuss I., Thust R., Kaina B. Protective effect of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int. J. Cancer*, 1996; 65: 506-512.
- [77] Lu H.R., Wang X., Wang Y. A stronger DNA damage-induced G2 checkpoint due to over-activated CHK1 in the absence of PARP-1. *Cell Cycle*, 2006; 5: 2364-2370.
- [78] Horton J.K., Stefanick D.F., Naron J.M., Kedar P.S., Wilson S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents signaling pathways for cell cycle arrest after DNA methylating agent exposure. *J Biol Chem.*, 2005; 280: 15773-15785.
- [79] Albert J.M., Cao C., Kim K.W., et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances cell death and improves tumor growth delay in irradiated lung cancer models. *Clin Cancer Res.*, 2007; 13: 3033-3042.
- [80] Encell L., Shuker D.E., Foiles P.G., Gold B. The in vitro methylation of DNA by a minor groove binding methyl sulfonate ester. *Chem. Res. Toxicol.*, 1996; 9: 563-567.
- [81] Walworth N. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000; 12: 697-704.

- [82] Zhou B. B., and Elledge S. *Nature*, 2000; 408: 433–439.
- [83] Peng C.Y., Graves P.R., Thoma R.S., Wu Z., Shaw A.S., Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science*, 1997; 277: 1501-1505.
- [84] Graves P.R., Yu L., Schwarz J.K., Gales J., Sausville E.A., O'Connor P.M., Piwnicka-Worms H. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 5600-5605.
- [85] Stark G.R., Taylor W.R. Control of the G2/M transition. *Mol. Biotechnol.*, 2006; 32: 227-248.
- [86] Rajesh M., Mukhopadhyay P., Ba' tkai S., et al. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase inhibits angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 350: 352–357.
- [87] Rajesh M., Mukhopadhyay P., Godlewski G., et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2006; 350: 1056–1062.
- [88] Miknyoczki S., Chang H., Grobelny J., et al. The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-8983, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 2290–2302.
- [89] Kumar V.B., Viji R.I., Kiran M.S., Sudhakaran P.R. Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF. *J. Cell. Physiol.*, 2007; 211: 477–485.
- [90] Beckert S., Farrahi F., Perveen Ghani Q., et al. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 341: 67–72.
- [91] Torisu H., Ono M., Kiryu H., et al. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int. J. Cancer*, 2000; 85: 182–188.
- [92] Nocentini G., Ronchetti S., Cuzzocrea S., Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 1165–1169.

- [93] Jenkins M.A. Role of MSH6 and PMS2 in the dna mismatch repair process and carcinogenesis. *Surg Oncol Clin N Am.*, 2009; 18: 625-636.
- [94] Quénet D., El Ramy R., Schreiber V., Dantzer F. The role of poly(ADP-ribose)ation in epigenetic events. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2009; 41: 60-65.
- [95] Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E., Pascal J.M. A third zinc binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 4105-4114.
- [96] Yélamos J., Schreiber V., Dantzer F. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol. Med.*. 2008; 14: 169-178.
- [97] Tentori L., Graziani G. Recent approaches to improve the antitumour efficacy of temozolomide. *Curr. Med. Chem.*. 2009; 16: 245-257.
- [98] Emma Bolderson, Derek J. Richard, Bin-Bing S. Zhou, and Kum Kum Khanna. Recent Advances in Cancer Therapy Targeting Proteins Involved in DNA Double-Strand Break Repair. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 6367-6377.
- [99] Marie-France Langelier , Kristin M. Servent, Elizabeth E. Rogers, and John M. Pascal. A Third Zinc-binding Domain of Human Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Coordinates DNA-dependent Enzyme Activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 4105-4114.
- [100] Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., Vergati M., Xu W., Calvin D., Morgan L., Tang Z., Woznizk K., Alemu C., Hoover R., Lapidus R., Zhang J., Graziani G.: Brain distribution and efficacy as chemosensitizer of an oral formulation of PARP-1 inhibitor GPI 15427 in experimental models of CNS tumors. *Int J Oncol.*, 2005; 26: 415-22.