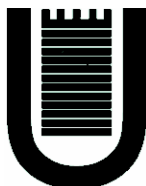


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"



Dottorato di Ricerca in Immunologia
XIX Ciclo

STUDIO DEL DANNO E DELLA RIPARAZIONE DEL DNA IN
CELLULE UMANE E MURINE DI SOGGETTI GIOVANI E
VECCHI

Candidata
Dr. Giulia Zanin

Relatore
Dott. Scarpaci Salvatore

Anno Accademico 2006-2007

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	RIPARAZIONE DEL DNA E DURATA DI VITA	3
1.2	DANNO DEL DNA	5
1.2.1	<i>Cause di danno.....</i>	6
1.2.2	<i>Tipi di danno.....</i>	6
1.2.3	<i>Meccanismi di riparo del DNA.....</i>	7
1.2.4	<i>Danno al singolo filamento.....</i>	8
1.2.5	<i>Rotture del doppio filamento (dsb).....</i>	9
1.2.5.1	Riparazione per ricombinazione omologa (HR).....	11
1.2.5.2	Riparazione per ricombinazione non omologa (NHEJ).....	12
1.2.6	<i>Diverse altre funzioni del complesso DNA-PK nei mammiferi.....</i>	16
2	SCOPO DELLA TESI.....	20
3	MATERIALI E METODI.....	21
3.1	SOGGETTI	21
3.2	CELLULE E PROCEDIMENTO DI IRRAGGIAMENTO.....	21
3.2.1	<i>Modello umano.....</i>	21
3.2.2	<i>modello murino.....</i>	22
3.3	ALKALINE SINGLE CELL GEL ASSAY (COMET ASSAY).....	24
3.4	PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CITOPLASMATICI E NUCLEARI.....	25
3.5	WESTERN BLOTTING	26
3.6	IMMUNOFLUORESCENZA	27
4	RISULTATI	29
4.1	MODELLO UMANO	29
4.1.1	<i>Riparazione del DNA in PBMC di soggetti giovani ed anziani.....</i>	29
4.1.2	<i>Danni del DNA in PBMC di soggetti giovani ed anziani.....</i>	31
4.1.3	<i>Espressione nucleare e citoplasmatica della proteina ku80 in PBMC di soggetti giovani ed anziani.....</i>	32
4.2	MODELLO MURINO.....	35
4.2.1	<i>Danni del DNA in linfociti di soggetti giovani ed anziani.....</i>	35
4.2.2	<i>Riparazione del DNA in linfociti di soggetti giovani ed anziani.....</i>	37
4.2.3	<i>Espressione nucleare e citoplasmatica della proteina ku80 in linfociti di soggetti giovani ed anziani.....</i>	40
5	DISCUSSIONE.....	42
6	BIBLIOGRAFIA	47

1 INTRODUZIONE

1.1 Riparazione del DNA e durata di vita

In tutti gli organismi, il DNA è il principale bersaglio di agenti chimici (mutageni ambientali, farmaci) e fisici (radiazioni ultraviolette, radiazioni ionizzanti) (1,2). Esso subisce danni e alterazioni che richiedono imperativamente un rapido riconoscimento ed una riparazione continua e accurata per preservare l' integrità dell' informazione genetica. E' vero che mutazioni di diverso grado sono alla base dell' evoluzione molecolare, ma la sopravvivenza stessa degli organismi sarebbe minacciata se non venissero riparati sia i danni potenzialmente mutageni e citotossici che i fattori endogeni ed esogeni sul DNA. Le alterazioni a livello del DNA, infatti, se non sono riparate o se non vengono corrette in maniera efficiente, possono provocare traslocazioni cromosomiche, perdita di materiale genetico, trasformazioni neoplastiche e morte cellulare. Inoltre, i danni accumulati nel DNA nel corso della vita, e casualmente distribuiti, potrebbero minare alcune fondamentali funzioni cellulari come la trascrizione, la replicazione e la riparazione del DNA (3-5). L' importanza della riparazione del DNA è suggerita dall' esistenza di alcune patologie ereditarie umane associate con difetti nel riparo del DNA, che determinano invecchiamento prematuro (sindrome di Werner) e una aumentata sensibilità ai carcinogeni (Xeroderma Pigmentoso), in cui risultano inattive o poco funzionanti alcune vie di riparazione. Studi in animali, nei quali i geni per il riparo del DNA sono stati inibiti, mostrano profili patologici simili (6-12).

La riparazione del DNA è un processo che opera costantemente nelle cellule dove, sia normali attività metaboliche che i fattori ambientali (quali i raggi UV) possono causare danno al DNA, determinando almeno 500000 singole lesioni molecolari per cellula al giorno. Tali lesioni provocano danno

strutturale alla molecola di DNA, e possono alterare in maniera drammatica il modo in cui la cellula legge le informazioni contenute nei suoi geni. Di conseguenza, il processo di riparo del DNA deve lavorare in continuazione, per correggerne qualsiasi danno nella struttura.

Tuttavia, quando la cellula invecchia, questo processo si rallenta fino ad un arresto totale. A questo punto la cellula va incontro ad uno dei tre possibili destini:

1. Uno stato di dormienza irreversibile, detto senescenza.
2. Il suicidio della cellula chiamato apoptosi o morte cellulare programmata.
3. La carcinogenesi, ossia la formazione del cancro.

Nel corso dell' invecchiamento la maggior parte delle cellule dell' organismo diviene inizialmente senescente; tuttavia, dopo un danno irreparabile al DNA va incontro ad apoptosi, un importante meccanismo per prevenire la trasformazione carcinogenica di una cellula potenzialmente pericolosa per l' organismo.

Quando le cellule divengono senescenti, le alterazioni nella biosintesi e nel turnover determinano una minore efficienza nel loro funzionamento, causando inevitabilmente malattia. Negli ultimi anni, numerosi studi in letteratura hanno avuto come obiettivo principale il ruolo della riparazione del DNA danneggiato nei processi di invecchiamento cellulare (13-20). Da molti di questi lavori è emerso che con l' età aumentano il numero di danni e di mutazioni che coinvolgono la molecola di DNA (21-26). Utilizzando cellule appartenenti a diverse specie animali è stato dimostrato che più il DNA danneggiato è riparato, più aumenta la durata di vita (27-32). Esiste perciò una correlazione positiva tra invecchiamento e contenuto di DNA danneggiato, ed una correlazione negativa tra invecchiamento ed efficienza di riconoscimento e riparazione del genoma dimostrate non solo nell' uomo ma

anche in numerose specie animali (33). La capacità di riparo del DNA in una cellula è vitale per l' integrità del suo genoma e quindi per il normale funzionamento della cellula stessa in tutto l' organismo. Sino ad oggi comunque, nonostante lo sforzo sperimentale eseguito per dimostrare una relazione causale tra senescenza, longevità e danno al DNA, si conosce ancora poco sulle alterazioni a livello molecolare dei meccanismi di riparazione del DNA nel corso dell' invecchiamento.

1.2 Danno del DNA

Il danno al DNA, causato da normali processi metabolici nella cellula, si verifica ad un tasso che varia da 50000 a 500000 lesioni molecolari per cellula al giorno. Tuttavia, molte cause di danneggiamento possono incrementare questa velocità. Nella cellule umane, ed in quelle eucariotiche in generale, il DNA è localizzato in due differenti compartimenti, nel nucleo e nei mitocondri. Il DNA nucleare (nDNA) esiste in strutture aggregate su larga scala note come cromosomi, che sono composte da avvolgimenti di DNA intorno a proteine simili a perle denominate istoni. Quando una cellula deve esprimere l' informazione genetica codificata nel suo nDNA, la relativa regione cromosomica viene svolta, i geni localizzati all' interno di essa vengono espressi, e quindi la regione viene nuovamente condensata nella sua conformazione quiescente. Il DNA mitocondriale (mtDNA) è situato nei mitocondri, è presente in copie multiple ed è strettamente associato con varie proteine a formare un complesso detto nucleoide. Nei mitocondri, le specie reattive dell' ossigeno (ROS), e i radicali liberi, originati dalla continua produzione di adenosintrifosfato (ATP) mediante fosforilazione ossidativa, creano un ambiente altamente ossidativo in grado di danneggiare il mtDNA. La cellula possiede però diversi meccanismi in grado di riconoscere e riparare

efficacemente e rapidamente molti tipi di alterazioni molecolari (34-37), e nonostante l' elevato numero di danni la stabilità genetica è molto alta (38).

1.2.1 Cause di danno

Il DNA può essere danneggiato da una varietà di cause, alcune spontanee, altre determinate da fattori ambientali. Il danno al DNA può essere perciò classificato in due tipi principali:

1. danno endogeno, come quello causato dall' attacco di radicali reattivi dell' ossigeno derivanti da sottoprodotti del normale metabolismo cellulare (mutazioni spontanee)
2. danno esogeno, causato da agenti esterni quali: radiazioni ultraviolette, radiazioni di diversa frequenza (raggi X e raggi gamma), idrolisi o distruzione termica, alcune tossine vegetali, mutageni chimici, chemioterapia o radioterapia.

Inoltre, durante la replicazione, si possono verificare occasionalmente degli errati accoppiamenti di basi; infatti la replicazione di DNA danneggiato prima di una divisione cellulare può portare all' incorporazione di basi scorrette complementari alle basi danneggiate. Una volta che le basi scorrette sono state ereditate dalle cellule figlie, queste ultime diventano cellule mutate. La chimica del danneggiamento del DNA è varia e complessa. Non rappresenta una sorpresa il fatto che la risposta cellulare al danneggiamento stesso comprende un' ampia varietà di sistemi enzimatici che catalizzano alcune delle più interessanti trasformazioni chimiche riguardanti il metabolismo del DNA.

1.2.2 Tipi di danno

Il danno endogeno coinvolge la struttura primaria piuttosto che la struttura secondaria della doppia elica. Esso può essere suddiviso in quattro classi:

1. *ossidazione* di basi e generazione di interruzioni nei filamenti di DNA ad opera di specie reattive dell'ossigeno.
2. *alchilazione* di basi (generalmente metilazione).
3. *idrolisi* di basi, come la depurinazione e la depirimidinazione.
4. *mismatch repair* (appaiaimento errato) di basi, dovute ad una replicazione errata del DNA in cui la base scorretta è "cucita" nel filamento che formerà la nuova molecola di DNA.

1.2.3 Meccanismi di riparo del DNA

Una cellula ha soltanto uno o due corredi di DNA genomico e, mentre le molecole proteiche e di RNA possono, se danneggiate, venire rimpiazzate rapidamente utilizzando l'informazione contenuta nel DNA, le molecole di DNA non sono sostituibili. Il mantenimento dell'integrità e dell'informazione contenuta nel DNA è, pertanto, un imperativo per la cellula e, a questo scopo, si è evoluto un insieme di sistemi di riparazione secondo il tipo di danno. Il numero e la varietà dei sistemi di riparazione riflettono l'importanza della riparazione del DNA per la sopravvivenza della cellula ed il grande numero di cause di danneggiamento del DNA. La riparazione del DNA è resa possibile essenzialmente dal fatto che la molecola di DNA è formata da due catene complementari. Le cellule utilizzano, come stampo per il ripristino, il filamento complementare non modificato di DNA, oppure il cromosoma fratello. In mancanza di un accesso all'informazione dello stampo, il riparo del DNA è soggetto ad errori.

Il danno al DNA altera la configurazione spaziale dell'elica e tali alterazioni possono essere rilevate dalla cellula. Una volta che il danno è stato localizzato, la cellula risponde con l'attivazione del checkpoint, ossia di meccanismi di sorveglianza che regolano vari aspetti del metabolismo

cellulare, capaci di inibire la replicazione o di portare la cellula ad apoptosi. Molecole specifiche di riparo del DNA vengono reclutate, e vanno a legarsi su o presso il sito di lesione, attivando altre molecole coinvolte nel meccanismo di riparo. I tipi di molecole coinvolte ed il meccanismo che viene attivato dipendono:

1. dal tipo di danno al DNA;
2. dal fatto che la cellula sia entrata o non in uno stato di senescenza;
3. dalla fase del ciclo in cui si trova la cellula.

1.2.4 Danno al singolo filamento

Quando uno solo dei due filamenti di un cromosoma presenta un difetto, l'altro filamento può essere usato come stampo per guidare la correzione del filamento danneggiato. Al fine di riparare il danno di una delle due eliche di DNA, ci sono numerosi meccanismi tramite i quali si può realizzare la riparazione del DNA. Questi includono:

1. Reversione diretta del danno mediante vari meccanismi specializzati. Esempi sono la metil guanina metil transferasi (MGMT) che rimuove specificamente gruppi metilici della guanina, e la fotolisi dei batteri, che rompe il legame chimico creato dai raggi ultravioletti tra basi adiacenti di timidina. Nessun filamento-stampo è richiesto per questo tipo di riparo.
2. Meccanismi di riparo per escissione, che rimuovono il nucleotide danneggiato sostituendolo con un nucleotide complementare. Questi comprendono:
 - Riparo per escissione di base (Base Excision Repair, o BER) che ripara il danno che coinvolge un singolo nucleotide,

causato da ossidazione, alchilazione, idrolisi, oppure deaminazione;

- Riparo per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, o NER), che ripara un danno che coinvolge filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi. Questi includono danni da voluminosa distorsione dell' elica, quali i dimeri di timina causati da luce UV, come pure le rotture di un singolo filamento. Una forma specializzata di NER nota come riparazione associata alla trascrizione (Transcription-Coupled Repair, o TCR) dispiega enzimi NER ad alta priorità per geni che sono attivamente trascritti;
- Mismatch Repair (MMR), che corregge errori di replicazione e di ricombinazione genetica che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del DNA.

1.2.5 Rotture del doppio filamento (dsb)

Un tipo particolarmente pericoloso di danno al DNA per le cellule in divisione è la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica dato che anche una sola dsb non riparata può risultare letale per la cellula (40), e provocare l' insorgenza di forme tumorali. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno. Essi sono generalmente conosciuti come 'Non-Homologous End-Joining' (saldatura delle estremità non omologhe o NHEJ), e 'Riparazione per ricombinazione' (o riparazione assistita da stampo, o ricombinazione omologa o HR) (41-43). La riparazione per ricombinazione richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo per il riparo di una rottura. Il macchinario responsabile per questo processo di riparo è praticamente identico al macchinario responsabile del crossingover nelle

cellule germinali durante la meiosi. Il meccanismo di riparo per ricombinazione è usato in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA si sta replicando o ha completato la duplicazione. Ciò permette ad un cromosoma danneggiato di essere riparato con l'impiego, come stampo, di un cromatide fratello neosintetizzato, come una copia identica che è, per di più, ordinatamente appaiata alla regione danneggiata. Molti geni nel genoma umano sono presenti in copie multiple fornendo diverse possibili fonti di sequenze identiche. Tuttavia, il riparo per ricombinazione che si basa su queste copie come stampi reciproci è problematico dal momento che porta a traslocazioni cromosomiche e ad altri tipi di riarrangiamento cromosomico. Il Non-Homologous End-Joining (NHEJ) riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo; può esserci però una perdita di sequenza durante questo processo e quindi tale riparo può divenire 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 il riparo per ricombinazione con impiego del cromatide fratello come stampo.

Dal momento che la grande maggioranza del genoma negli organismi pluricellulari è fatta di DNA che non contiene geni, il cosiddetto "junk DNA" o "DNA spazzatura", un NHEJ mutagenico è probabilmente meno pericoloso di un riparo assistito da stampo costituito da sequenze presenti in copia multipla, dato che in questo caso si produrrebbero riarrangiamenti cromosomici indesiderati. Il macchinario enzimatico usato per il NHEJ è anche utilizzato nelle cellule B per riunire rotture generate dalle proteine RAG durante la ricombinazione V (D) J, passo cruciale nella produzione della diversità degli anticorpi da parte del sistema immunitario o per lo switch isotipico (39).

1.2.5.1 Riparazione per ricombinazione omologa (HR)

Quando entrambi i filamenti di una doppia elica sono danneggiati, l'informazione per la riparazione deve provenire da un'altra molecola di DNA. La ricombinazione fornisce uno stampo per la sintesi di DNA che ripari l'interruzione. Nella ricombinazione omologa si forma una molecola di DNA con una sequenza di basi che deriva in parte da una molecola di DNA parenterale, e in parte da un'altra. Lo scambio di materiale genetico può avvenire fra qualunque coppia di sequenze omologhe sulle molecole di DNA parenterale. Una regione a singolo filamento di DNA derivata dal taglio di uno dei due filamenti di una doppia elica si accoppia con il filamento complementare spostando l'altro filamento. Nell'*E. coli*, la ricombinazione omologa dipende dai geni *rec*. La proteina *recA*, il prodotto del gene *recA*, catalizza la reazione di assimilazione del filamento, che è guidata dall'idrolisi dell'ATP. Il ruolo fondamentale della proteina *recA* nella ricombinazione omologa è dimostrato dal fatto che in mutanti *recA⁻* la frequenza di ricombinazione è 10^4 volte più bassa che nelle cellule normali. Essa forma filamenti nucleoproteici, promuove l'appaiamento tra sequenze di DNA omologhe e provvede al successivo trasferimento di filamenti (44). La proteina *recA*, infatti, per prima cosa si lega ad una regione di DNA a singolo filamento (ssDNA). Intorno all'ssDNA si forma un filamento di molecole *recA* che poi si lega ad un DNA a doppia elica. La proteina *recA* scorre rapidamente sulla doppia elica cercando una sequenza complementare a quella dell'ssDNA. Il DNA a doppia elica viene svolto in parte per facilitare la lettura della sua sequenza; quando viene trovata una sequenza complementare, la doppia elica viene ulteriormente svolta per permettere una commutazione dell'accoppiamento fra le basi. A questo punto l'ssDNA è appaiato al filamento complementare della sequenza bersaglio. Una volta iniziato in questo modo, lo scambio di filamenti continua in un processo chiamato migrazione della ramificazione (branch migration) (45). Il processo

di riparazione termina con la risoluzione dei filamenti del DNA incrociati con conseguente risultato di due doppie eliche intatte (46). Nel lievito questo meccanismo è svolto dal complesso RAD52 omologo di RecA (47-48). Anche nei mammiferi è stato isolato l' omologo hRAD51 al gene batterico RecA (49).

1.2.5.2 Riparazione per ricombinazione non omologa (NHEJ)

Questo fondamentale meccanismo di riparazione si è conservato nel corso dell' evoluzione in tutti gli eucarioti (50). Negli eucarioti superiori, la riparazione delle dsb richiede un sistema costituito da più componenti. Il danno viene prima riconosciuto da una proteina nucleare con attività elicastica, e la riparazione del DNA procede attraverso una serie di eventi molecolari, ognuno dei quali è sotto controllo di specifiche proteine con diverse proprietà biochimiche e funzionali. Dopo il riconoscimento del danno da parte dell' elicasi, una endonucleasi inizia la riparazione mediante un' incisione a monte del taglio. Una polimerasi sintetizza il tratto dell' elica assente ed una ligasi salda i segmenti di DNA per completare il processo di riparazione (51,52). Studi eseguiti su cellule eucariotiche trattate con i raggi X o con agenti chemioterapici hanno portato all' identificazione e caratterizzazione di diverse proteine che sono capaci di riconoscere il DNA danneggiato e di attivare il processo di riparazione (53-55). Tra tutte le proteine identificate, 5 sono quelle principalmente coinvolte in questo tipo di riparazione: ku70, ku80, DNA-PKcs, che formano il complesso DNA-PK, XRCC4 e la Ligasi IV.

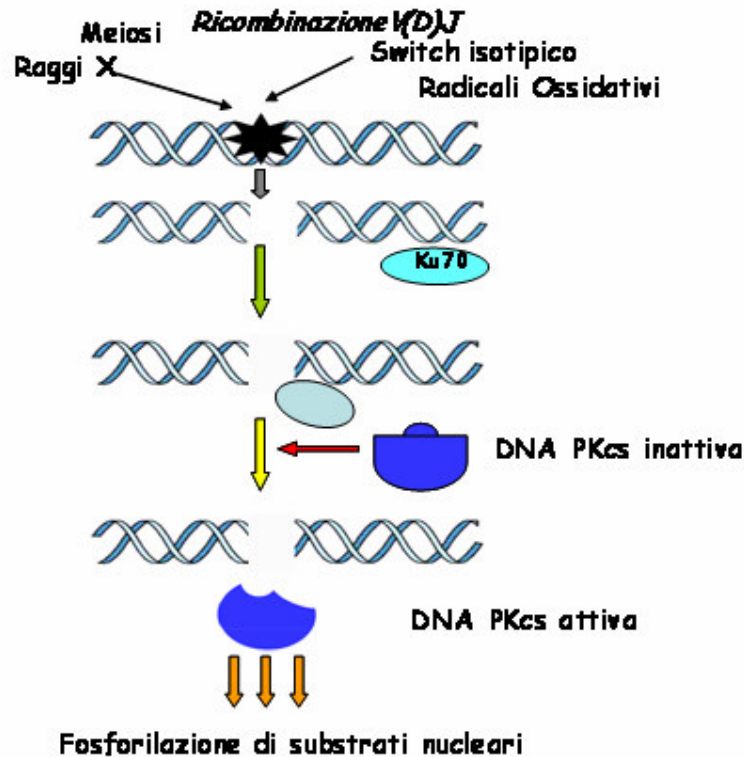


Figura 1: Schema della ricombinazione non omologa

Ku sembra essere una delle prime proteine a localizzare la rottura cromosomica (56-58); essa è una proteina eterodimerica costituita da due diverse subunità, una di 70 kDa con attività elicastica ed una di 80 kDa. L'eterodimero ku70/80, ma non le singole subunità, è in grado di legarsi alle estremità libere del DNA ed è attivato solo da DNA in forma lineare e non circolare o superavvolto (59-63). Una volta ancorato al DNA ku interagisce, attivandola, con una serina/treonina chinasi di 350 kDa, la DNA-PKcs che rappresenta la subunità catalitica del complesso DNA-PK (64-66). La proteina DNA-PKcs, per via del suo dominio chinasi all'estremità C-terminale, appartiene alla famiglia delle fosfatidilinositolo 3-chinasi proteine chinasi (PIKKs); altri membri sono: ATM, ATR e TRRAP (67,68). La DNA-PKcs può legare ed essere attivata dalle estremità del DNA senza richiedere la

presenza di ku, che invece, è richiesta per la stabilizzazione del legame della subunità catalitica al DNA (69). Le cellule eucariotiche possiedono diverse copie della proteina ku. Questa proteina svolge molte e differenti funzioni cellulari: essa è infatti coinvolta nel controllo della trascrizione e replicazione del DNA, nella ricombinazione V (D) J e nello switch isotipico (70-72). Topi knock-out per la proteina ku80 mostrano una severa immunodeficienza combinata dovuta all'arresto della maturazione dei linfociti T e B (73-76). Ku è in grado di legarsi non solo alle estremità libere del DNA ma anche ad altre modificazioni del doppio filamento, come forcine, nicks e gaps. Ku è capace di traslocare lungo la molecola del DNA in maniera ATP-indipendente (77-79). Questa proprietà assieme ad una debole attività elicastica potrebbe consentire a ku di aprire la doppia elica in prossimità del sito del danno che viene quindi riparato attraverso l'appaiamento di brevi sequenze omologhe presenti sui filamenti complementari (80,81). I dati disponibili a sostegno di questa ipotesi sono tuttavia ancora molto controversi. Alternativamente nella NHEJ ku potrebbe avere il compito di proteggere le estremità del DNA dall'attacco delle esonucleasi (82,83). Tuttavia, l'osservazione che intermedi intatti della ricombinazione V (D) J si accumulano in cellule difettive per DNA-PKcs e per ku80, non sembrerebbero confermare questa ipotesi. Ku potrebbe altresì allineare le estremità del DNA per facilitare la loro congiunzione, interagendo direttamente con altre proteine coinvolte nella riparazione (84,85). E' stato infatti descritto in vivo un'attività di legame di ku con la DNA ligasi III (86). Comunque, ku è la componente responsabile del legame al DNA della DNA-PK la quale, come attestato dalle evidenze disponibili, ha un ruolo chiave nel riconoscimento del danno, nella regolazione coordinata di altre funzioni correlate e nella riparazione. Studi cristallografici mostrano che la DNA-PKcs possiede un canale aperto abbastanza largo da accomodare DNA a doppio filamento (87,88), e che la struttura di ku legato al DNA

evidenzia che il complesso ha un anello aperto nel quale si inserisce il doppio filamento di DNA (89). In base a studi in vitro con proteine purificate o con estratti cellulari, si pensa che ku inizialmente si leghi alle estremità libere del DNA, traslochi di un giro di elica lungo il filamento di DNA, e successivamente recluti la DNA-PKcs e ne stabilizzi il legame al DNA (Fig.1) (90-92). La DNA-PKcs può bloccare le due estremità della dsb in un complesso contenente due molecole di DNA-PKcs, quindi, una funzione della DNA-PK nella riparazione delle dsb potrebbe essere quella di avvicinare le estremità della rottura e facilitarne il legame (93). L'altra funzione del complesso DNA-PK è reclutare, e probabilmente attivare, proteine coinvolte nella modificazione e nel legame delle estremità del DNA. L'assemblamento coordinato di ku e DNA-PKcs sul DNA è seguito dal reclutamento del complesso DNA ligasi IV-XRCC4 che è responsabile della fase di legame delle estremità libere del DNA (94-97). Il complesso DNA-PK fosforila la proteina XRCC4 in vitro e la fosforilazione di XRCC4 in vivo indotta dalle radiazioni ionizzanti è dipendente dalla presenza di DNA-PK (98,99). Il coinvolgimento di queste proteine nel NHEJ è stato confermato con la generazione di topi knock-out. Mutanti difettivi dei geni codificanti DNA-PKcs, ku70, ku80, XRCC4 e DNA ligasi IV mostrano una inefficiente riparazione delle dsb, un' aumentata sensibilità alle radiazioni ionizzanti e sono difettivi nella capacità di esplicitare una corretta ricombinazione V (D) J (100-103). Durante la NHEJ, la fase di legame delle estremità del DNA può essere preceduta da un processo di modificazione delle estremità del DNA così da generare estremità che siano compatibili con la fase successiva di legame. In questo processo sono coinvolte numerose proteine con attività esonucleasica, endonucleasica, polimerasica ed elicasica (104). Due di queste proteine vengono regolate dalla fosforilazione indotta dal complesso DNA-PK: 1) la WRN una elicasi/endonucleasi la cui carenza induce una grave sindrome

caratterizzata da invecchiamento precoce (105), e 2) la nucleasi Artemis deficiente nei SCID (106). Un passo avanti molto importante nella comprensione della riparazione delle dsb è stato compiuto recentemente con la scoperta che la DNA-PKcs è in grado di autofosforilarsi in vivo in risposta a lesioni del DNA. La fosforilazione della DNA-PKcs in risposta alle radiazioni ionizzanti è stata dimostrata con l'uso di anticorpi che riconoscono la forma fosforilata in Thr2609 della DNA-PKcs (107). La fosforilazione della DNA-PKcs è molto rapida, avviene entro pochi minuti dall'irraggiamento e molecole fosforilate in Thr2609 formano foci nel sito di rottura, evidenziando che l'evento di fosforilazione è parte integrante della risposta precoce alla formazione di dsb.

1.2.6 Diverse altre funzioni del complesso DNA-PK nei mammiferi

Il complesso DNA-PK è coinvolto in molti processi (Fig. 2). Esso, come visto, svolge un ruolo rilevante nella NHEJ ed è implicato nella risposta alle dsb; inoltre, è attivo nella protezione dei telomeri, nel signaling dell'apoptosi e solo recentemente si è scoperto essere coinvolto nell'immunità innata.

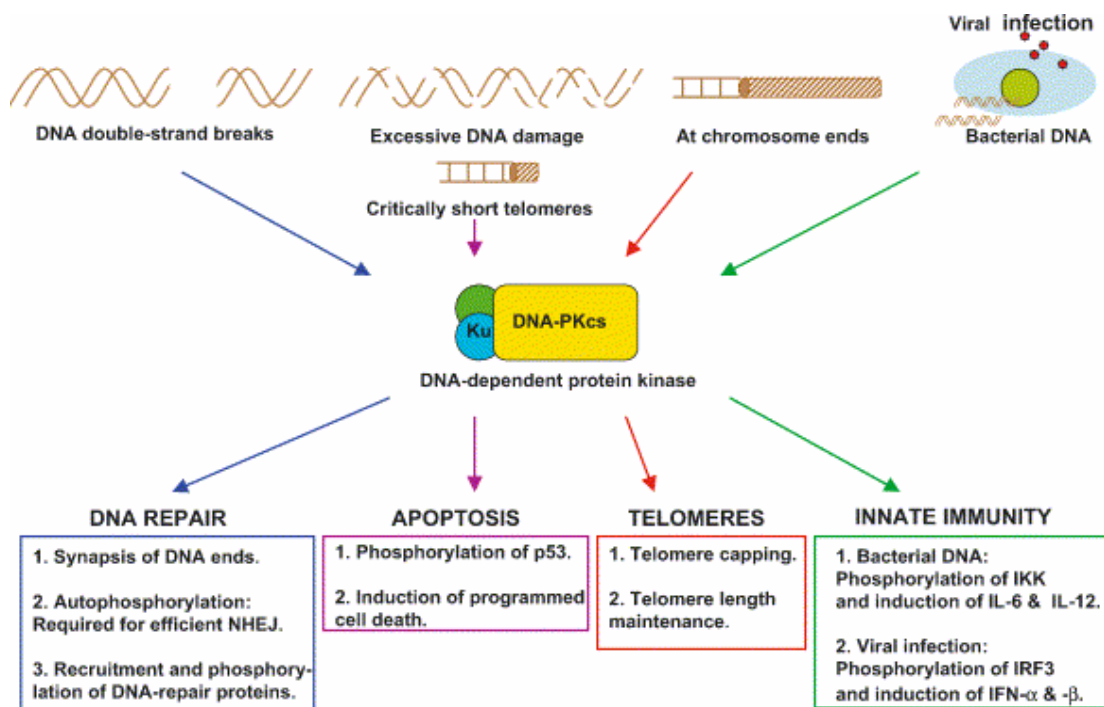


Figura 2: i diversi ruoli della DNA-PK nelle cellule di mammifero

Mentre la cellula deve rispondere rapidamente ed efficacemente alla formazione dei danni del DNA, allo stesso tempo deve evitare di riconoscere e trattare le estremità dei cromosomi come delle dsb. I telomeri sono infatti, delle strutture nucleoproteiche specializzate atte a proteggere le estremità dei cromosomi. Paradossalmente, componenti del complesso DNA-PK sono anche presenti nei telomeri, dove svolgono un ruolo nella formazione del capping delle estremità del cromosoma così da evitare che queste vengano riconosciute erroneamente come dsb. E' stato dimostrato che ku è presente nei telomeri sia del lievito (108), che nelle cellule di mammifero (109-111) con il compito importante di prevenire la fusione di estremità di cromosomi diversi (112-114). Anche la DNA-PKcs è presente nei telomeri (115) con funzioni paragonabili a quelle di ku.

Assieme alla riparazione, esistono altre due risposte cellulari molto importanti che sono indotte dalle dsb: 1) il blocco del ciclo cellulare, che

permette che la cellula abbia tempo sufficiente per riparare il danno subito, e 2) l'apoptosi, che elimina le cellule che hanno subito un grave insulto e che perciò non possono essere riparate efficacemente. La capacità che ha la cellula di attivare il meccanismo di morte programmata in risposta al danno del DNA è di estrema importanza per scongiurare l'insorgenza di formazioni neoplastiche (116). Il complesso DNA-PK non sembra avere un ruolo fondamentale nel signaling verso i componenti del complesso del ciclo cellulare, ma al contrario, gioca un ruolo importante nel signaling dell'apoptosi. L'apoptosi indotta da raggi X in timociti murini, dipendente da p53, diminuisce in maniera significativa in carenza di DNA-PK (117). Il ruolo della DNA-PK nell'attivare, mediante p53, il processo di morte cellulare, non si limita all'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti, ma si estende anche a quella implicata dall'eccessivo accorciamento dei telomeri (118,119). Mentre nelle fasi precoci dell'apoptosi il complesso DNA-PK ha una funzione regolatrice, nelle fasi successive diviene il bersaglio di proteasi, e la degradazione delle proteine fondamentali nella riparazione del DNA potrebbe essere importante nella soppressione dei segnali anti-apoptotici (113). Inoltre, il complesso DNA-PK sembra essere direttamente coinvolto nell'immunità innata con funzione di attivarla a seguito di DNA batterico e/o infezioni virali. Il DNA batterico allerta l'immunità innata attivando macrofagi, monociti e cellule dendritiche e porta alla produzione di citochine proinfiammatorie come IL-6 e IL-12. L'attivazione di queste citochine a seguito della presenza di DNA batterico è difettiva in topi DNA-PKcs^{-/-}. La proteina DNA-PKcs può legare DNA batterico e fosforilare, perciò, la subunità β di IKK attivando la via di trasduzione del segnale che porta all'attivazione di NF- κ B e alla successiva induzione della produzione di IL-2 e IL-12 (117). Inoltre, a seguito di infezione virale, il complesso DNA-PK viene attivato, e mediante successiva fosforilazione viene stabilizzato il fattore di

trascrizione IRF-3 con conseguente produzione di IFN α e β nelle cellule infettate (118).

2 SCOPO DELLA TESI

Poche informazioni sono ad oggi disponibili sui meccanismi di riconoscimento e di riparazione del danno al DNA in linfociti umani e murini. Difetti delle proteine coinvolte nel riconoscimento e nella riparazione del danno al DNA potrebbero causare importanti alterazioni, non solo nella risposta alle lesioni del materiale genetico, ma anche nella risposta del sistema immunitario agli agenti patogeni. Il legame che intercorre tra la risposta immunitaria e la durata della vita, dimostrato da lavori svolti sia nel topo (119,120) che nell'uomo (121), ci hanno indotto a studiare ed analizzare i possibili cambiamenti della risposta del DNA in cellule del sistema immunitario durante l'invecchiamento. In particolare, poiché il principale meccanismo di riparazione del DNA nelle cellule di mammifero coinvolge il complesso proteico DNA-PK, diversi autori hanno dimostrato in lavori precedenti, svolti sia su PBMC che su linfociti T naive e memory (122,123), che esiste una differente distribuzione tra citosol e nucleo, ed una diversa attivazione dei componenti del complesso proteico DNA-PK in cellule purificate da soggetti giovani ed anziani. Nella riparazione del danno radioindotto, tuttavia, non è stato ancora determinato se, le differenze riscontrate siano dovute ad un difetto del sistema di riparazione nel soggetto anziano, oppure se dipendano da una diversa cinetica di attivazione e mobilitazione delle proteine coinvolte. Lo scopo di questo lavoro è stato, pertanto, quello di determinare, su linfociti umani e murini, la cinetica di riconoscimento e di riparazione del danno radioindotto al DNA, e di studiare la differente espressione e attivazione della proteina del complesso DNA-PK maggiormente coinvolta nei processi di riparazione (ku80) in PBMC ed in cellule linfocitarie murine purificate da soggetti giovani ed anziani.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Soggetti

Nella prima fase dello studio, condotto sull' uomo, i linfomonociti (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) sono stati purificati da campioni di sangue periferico di donatori volontari di età compresa tra i 20 ed i 35 anni, reperiti presso l'Unità Ematologia dell' Università Cattolica di Roma e da soggetti anziani di età compresa tra i 70 e i 95 anni e residenti nella Casa di Riposo Roma III.

Nella seconda fase dello studio, condotto sulla specie murina, sono stati analizzati linfociti isolati dalla milza di topi C57BL/6 provenienti dalla Charles River e suddivisi per gruppi di età in topi giovani (2 mesi) e topi vecchi (12 mesi).

3.2 Cellule e procedimento di irraggiamento

3.2.1 Modello umano

I PBMC sono stati ottenuti dai campioni di sangue eparinizzato dopo centrifugazione per gradiente di densità su Ficoll-Isopaque (Lymphoprep R, Nycomed A.S, Norvegia) come descritto da Boyum (124). I PBMC alla concentrazione di 10^7 /ml sono stati distribuiti in piastre di coltura, irraggiati con 2 o 5 Gy di raggi X, o non irraggiati. La macchina a raggi X (Gilardoni, Italia) opera a 250 kV, 15 mA, con un filtro di Cu dello spessore di 0.5 mm, emettendo 1.4 Gy/min alla distanza di 50 cm dal fuoco. Dopo l' irraggiamento, le cellule sono state raccolte dalla piastra di coltura, lavate con terreno semplice e poi risospese in terreno di coltura completo composto da RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island Biological Co, NY, USA); 10% di siero fetale di vitello (Seromed, Germania), 10 µg/ml di gentamicina (EUROBIO; Francia) e 2

mM di L-Glutammina (Flow Labs, Scozia, GB). Le cellule (10^7 /ml) sono state lasciate senza stimolo in coltura o sono state stimulate con fitoemoagglutinina (phitoemoagglutinin, PHA, GIBCO) alla concentrazione finale dell' 1.2%. Le colture sono state incubate a 37°C. Alla fine dell' incubazione, le cellule sono state lisate e separate in tre aliquote per ogni punto sperimentale. Le tre aliquote sono state utilizzate per la preparazione degli estratti proteici citoplasmatici e nucleari, per l' esecuzione del Comet Assay e per la marcatura in immunofluorescenza.

3.2.2 modello murino

Nella fase iniziale della ricerca sul modello murino, sono stati messi a punto i metodi di analisi usando linfociti splenici di topi giovani (2 mesi di età), per poi compararli con quelli di topi vecchi (12 mesi di età).

Queste cellule sono state esaminate per determinare il danno spontaneo e radioindotto del DNA mediante visualizzazione con anticorpi fluorescenti anti-istone fosforilato γ -H2AX.

Le cellule alla concentrazione di 10^7 /ml sono state distribuite in piastre di coltura, irradiate con 1 Gy di raggi X o non irradiate. La dose di raggi X rispetto a quella utilizzata nell' uomo è stata inferiore perché da tests di laboratorio effettuati si è visto che già con quella quantità di radiazione si ottenevano risultati paragonabili a quelli umani (Fig. 3). Dopo l' irraggiamento le cellule sono state raccolte dalla piastra di coltura, lavate con terreno completo composto da RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island Biological Co, NY, USA); 10% di siero fetale di vitello (Seromed, Germania), 10 μ g/ml di gentamicina (EUROBIO; Francia) e 2 mM di L-Glutammina (Flow Labs, Scozia, GB), e risospese con terreno completo. Da entrambi i gruppi di cellule (irradiate e di ctrl) sono state prelevate delle aliquote e, per valutarne il

danno e la riparazione a tempo 0 e dopo 24h, sono state marcate con il marcatore di morte cellulare ioduro di propidio (IP).

Ogni gruppo di cellule (0 e 1 Gy) è stato diviso in 4 gruppi sperimentali per studiare la cinetica di riparazione a t0, 5, 15 e 30 minuti dopo l'irraggiamento, ed è stato aggiunto LPS 2µg/ml e messo in incubazione a 37°C. Alla fine dell' incubazione, le cellule sono state lavate con PBS 1X e separate in tre aliquote per ogni punto sperimentale. Le tre aliquote sono state utilizzate per la preparazione degli estratti proteici citoplasmatici e nucleari, e per la marcatura in immunofluorescenza.

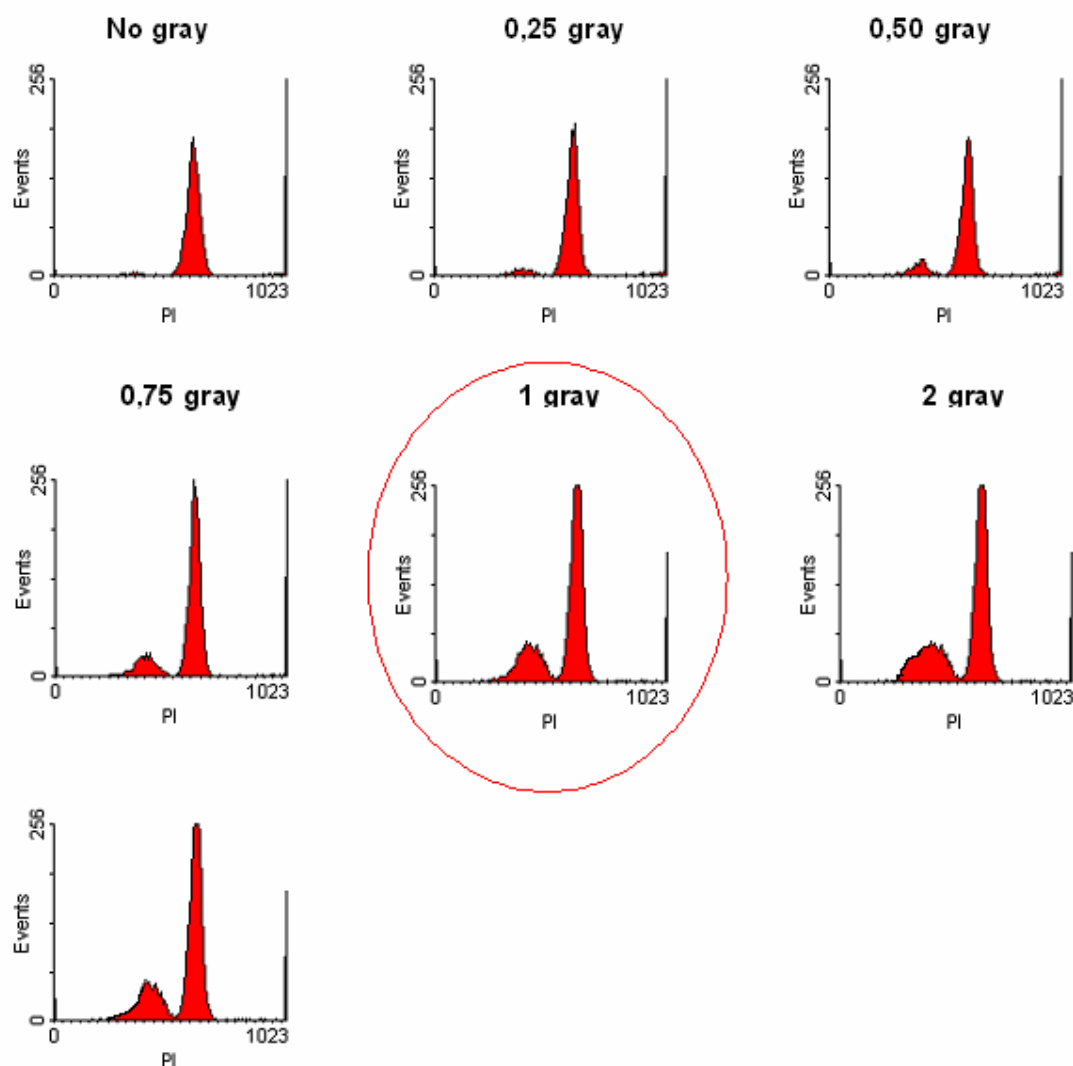


Figura 3: vitalità degli splenociti irraggiati a dosi crescenti di raggi X

3.3 Alkaline Single cell gel assay (COMET Assay)

Il test è stato eseguito seguendo il protocollo scritto da Singh (125). Le cellule (1.5×10^5 cellule/vetrino) sono risospese in 0.7% (v/v) di low-melting point agarosio (Bio-Rad Lab., CA, USA), e disposte fra uno strato inferiore di normal-melting point agarosio (Bio-Rad) allo 0.5% (v/v) e uno strato superiore di low-melting agarosio allo 0.7% (v/v) su un vetrino da microscopio (Carlo Erba, Milano, Italia). I vetrini così preparati sono stati immersi in una

soluzione di lisi (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM pH 10, DMSO 10%, Triton X-100 1%) per 1h a 4°C. Al termine della lisi, i vetrini sono stati disposti in una camera elettroforetica orizzontale ed immersi nel buffer freddo per elettroforesi alcalina (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM pH > 13). I vetrini vengono lasciati equilibrare nella soluzione di corsa per 25 minuti a 4°C per permettere lo svolgimento del DNA e l'evidenziazione del danno. La corsa elettroforetica avviene a 4°C per 25 minuti, a 30 V (1V/cm) e a 300 mA, usando un alimentatore Bio-Rad 300. Finita la corsa, i vetrini vengono lavati con un buffer neutralizzante (Tris-HCl 0.4 M pH 7.5), e marcati con una soluzione di bromuro di etidio (12 µg/ml, Sigma) ed infine esaminati con un ingrandimento finale di 200X con un microscopio fluorescente Olympus equipaggiato di una lampada al mercurio da 100 W. Le immagini sono state acquisite mediante una telecamera monocromatica CCD (Cohu Electronic Division, San Diego, CA, USA), e successivamente analizzate tramite un software (Delta Sistemi, Roma, Italia) in grado di acquisire immagini, calcolarne l'integrale del profilo dell'intensità di fluorescenza per ciascuna cellula, calcolarne la componente di fluorescenza dovuta al DNA presente nella testa e nella coda di ciascuna cometa, e quindi calcolarne tutta una serie di parametri derivati che rendono la misura della quantità dei danni presenti. Duecento cellule distribuite su 2 vetrini sono state analizzate per ciascun punto sperimentale. I risultati sono espressi come media della lunghezza della coda (mean tail).

3.4 Preparazione degli estratti citoplasmatici e nucleari

Al termine dell'incubazione, le cellule sono state centrifugate a 350g in una centrifuga Beckman TJ-6. Per allestire gli estratti citoplasmatici, i sedimenti sono stati risospesi e lisati in 0.5 ml di tampone per lisi (Hepes 20 mM pH

7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, PMSF 1 mM, NaF 200 mM, $Na_2P_2O_7$ 1 mM) e poi tenuti in ghiaccio per 20 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 25 μ l di Nonidet P-40 (10%) e immediatamente agitati. Gli omogenati sono stati poi centrifugati a 12000g in una microcentrifuga per 45 secondi a 4°C. I sopranatanti contenenti gli estratti citoplasmatici sono stati prelevati e conservati a -80°C. I sedimenti contenenti i nuclei sono stati trattati per ottenere gli estratti nucleari. I nuclei sono stati lisati tramite un tampone di estrazione NaCl (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, PMSF 1 mM, NaF 200 mM, $Na_2P_2O_7$ 1 mM e glicerolo 25%). La sospensione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e poi centrifugata a 12000g in una microcentrifuga per 5 minuti a 4°C. Le aliquote degli estratti nucleari sono state conservate a -80°C. Il contenuto proteico degli estratti citoplasmatici e nucleari è stato determinato mediante saggio di Bradford (126).

3.5 Western Blotting

Per valutare la quantità della proteina ku80 nel citoplasma e nel nucleo dei PBMC e nei linfociti splenici murini, gli estratti citoplasmatici e nucleari ad uguale concentrazione proteica sono stati denaturati mediante ebollizione in soluzione denaturante (0.6% SDS, 0.1 M TRIS-HCl pH 6.8, 37.8% glicerolo, 18.2% β -mercaptoetanolo, 0.005% blu di bromofenolo) e sottoposti ad SDS-PAGE utilizzando un gel di poliacrilammide al 7.5% in condizioni denaturanti. Il tampone di corsa elettroforetica è costituito da Tris-HCl pH 8.9 25 mM, glicina 200 mM ed SDS 0.1%. Le proteine sono state poi elettrotrasferite su filtro di PVDF (Immobilion-P 0.45 μ m, Millipore) a 30V per una notte a 4°C in tampone di trasferimento (Tris-HCl pH 8.9 25 mM, glicina 200 mM). I siti non occupati da proteine sono stati bloccati incubando le membrane con Tris-

HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0.1% contenete BSA al 5% per 1h a temperatura ambiente. Le membrane sono poi state incubate con anticorpi policlonali contro la proteina ku80 umana e murina (Serotec rispettivamente APH316 e APH 317). L'anticorpo policlonale anti ku80 e il monoclonale contro la β -actina (SIGMA, clone AC-15, A5441) sono stati utilizzati come controlli di caricamento per i campioni rispettivamente degli estratti nucleari e citoplasmatici. Dopo 1h di incubazione con l' anticorpo primario, gli immunoblot sono stati sviluppati utilizzando un anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina, e il substrato ECF (Amersham) è stato usato per sviluppare la reazione (chemiofluorescenza). La fluorescenza è stata acquisita mediante il phosphoimager/fluorimager STORM840 (Molecular Dynamics).

3.6 Immunofluorescenza

Il saggio è stato eseguito come descritto da Lobrich (127), al termine dell' incubazione, le cellule (1×10^6 per ogni punto sperimentale) sono state prelevate e fissate mediante sospensione in soluzione di paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell' incubazione in paraformaldeide, le cellule sono state lavate per 2 volte con PBS 1X e successivamente risospese alla concentrazione di 10^6 cellule/ml, 100 μ l di questa sospensione sono stati poi distribuiti su vetrini portaoggetti (Carlo Erba) precedentemente trattati con polilisina (Sigma). Dopo aver mantenuto i vetrini a temperatura ambiente per 1h per permettere l' adesione delle cellule alla polilisina, i vetrini sono stati incubati 5 minuti a temperatura ambiente con PBS 0.2% Triton X-100 per permeabilizzare la membrana cellulare. I PBMC sono stati poi incubati con l' anticorpo primario rabbit-anti- γ -H2AX (Trevigen) per 1h a temperatura ambiente. L'anticorpo è stato sciolto alla diluizione 1:250 in PBS contenente 5% di BSA. Successivamente i

vetrini sono stati incubati con l' anticorpo secondario (Anti-rabbit-Alexa Fluor 488, Molecular Probes) e lasciati in incubazione per 1h a temperatura ambiente. Si è aggiunto poi su ciascun campione il DAPI diluito 1:5000 in PBS per 2 minuti per mettere in evidenza il DNA. Al termine di ogni incubazione i vetrini sono stati lavati 3 volte in PBS. Infine su ogni campione si è aggiunto il Mounting Buffer (glicerolo al 70% in PBS) e si è coperto con vetrino coprioggetti. Le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza (Leica) ad un ingrandimento di 60X. Sono state acquisite 100 cellule per ogni punto sperimentale.

4 RISULTATI

4.1 Modello umano

4.1.1 Riparazione del DNA in PBMC di soggetti giovani ed anziani

La riparazione del DNA è stata valutata a livello di singole cellule mediante la visualizzazione dei siti di danno in immunofluorescenza con anticorpi fluorescenti diretti contro la forma fosforilata dell' istone H2AX presente nei siti nucleari di riparazione delle dsb (foci di riparazione).

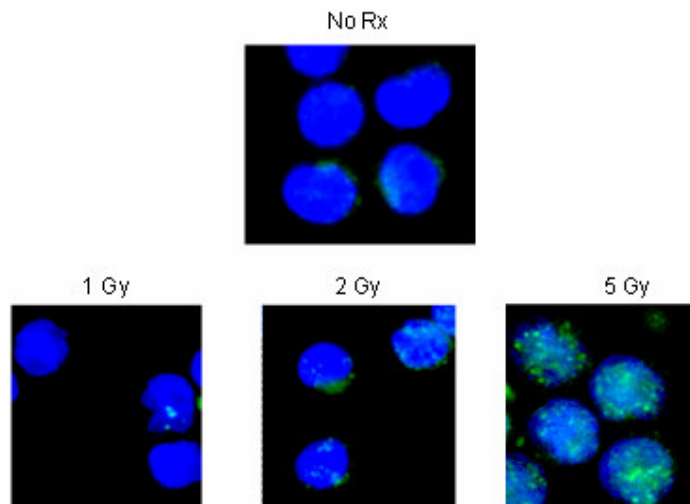


Figura 4: Foci di riparazione in PBMC irradiati con diverse dosi di raggi X. **Soggetti giovani**

Per verificare la dipendenza del numero di foci di riparazione rispetto alla dose di raggi X somministrati, i PBMC purificati da soggetti giovani e anziani sono stati esposti a dosi crescenti di 1, 2 e 5 Gy di RX o non trattati. Ad 1h dall' irraggiamento le cellule sono state analizzate per valutare il numero di foci formatesi. I risultati (Fig. 4) mostrano che i foci di riparazione aumentano progressivamente con la dose di raggi X con cui sono state

trattate le cellule. I foci di riparazione sono, inoltre, sebbene in numero esiguo, presenti anche in cellule non trattate, probabilmente a dimostrazione di riparazioni del DNA a seguito di rotture fisiologiche.

Ci si è soffermati quindi a valutare la formazione di foci di riparazione in PBMC irradiati solo con la dose maggiore di raggi X (5 Gy). Le cellule irraggiate di soggetti giovani e anziani sono state mantenute in coltura per tempi crescenti (15', 1h, 3h e 5h) e successivamente analizzate, mentre per i soggetti anziani i tempi di incubazione sono stati solo di 1h e 3h. I risultati mostrano che in cellule di soggetti giovani (Fig. 5) il trattamento con i raggi X induce rapidamente la comparsa dei foci di riparazione. I foci, presenti solo in misura ridotta in cellule non irraggiate, sono infatti presenti in numero elevato già subito dopo l'irraggiamento e permangono in maniera molto evidente fino ad 1h dall'irraggiamento, per poi diminuire a tempi maggiori fino a scomparire a 5h.

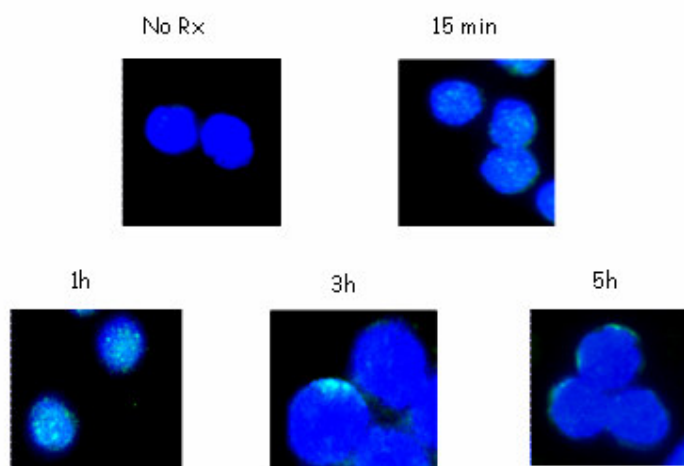


Figura 5: Foci di riparazione in PBMC irraggiati di soggetti giovani

Diversamente dai giovani, nei soggetti anziani (Fig. 6) i foci sono presenti e ben evidenti anche in cellule non irraggiate, ed il trattamento con i raggi X ne

induce un aumento sensibile anche se non così evidente come avviene nei PBMC di soggetti giovani. Inoltre i foci indotti in seguito al trattamento con i raggi X permangono fino a 3h dopo il trattamento.

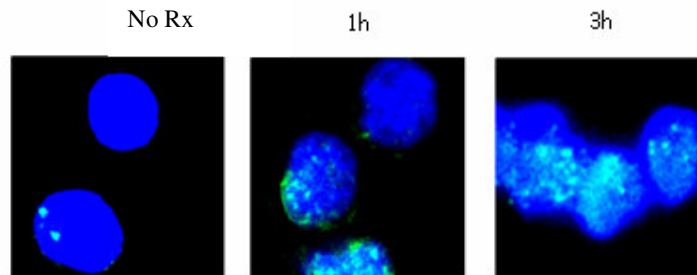


Figura 6: Foci di riparazione in PBMC irraggiati di soggetti anziani

Concludendo, i foci di riparazione radioindotti compaiono più precocemente e persistono meno a lungo nei soggetti giovani che negli anziani, suggerendo che l' invecchiamento ritarda i processi di riparazione del DNA.

4.1.2 Danni del DNA in PBMC di soggetti giovani ed anziani

I danni del DNA indotti dal trattamento con i raggi X in PBMC di soggetti giovani ed anziani sono stati determinati ed analizzati mediante il test della COMETA. I risultati (Fig. 7) mostrano che il trattamento con una dose di 5 Gy di raggi X induce al tempo 0 un aumento dei danni del DNA simile in entrambi i gruppi dei soggetti analizzati. Negli individui giovani, il danno al DNA permane costante fino a 3h, mentre negli anziani aumenta ad 1h per poi diminuire a 3h. Questi risultati indicano che il danno radioindotto al DNA è più grande negli anziani che nei giovani.

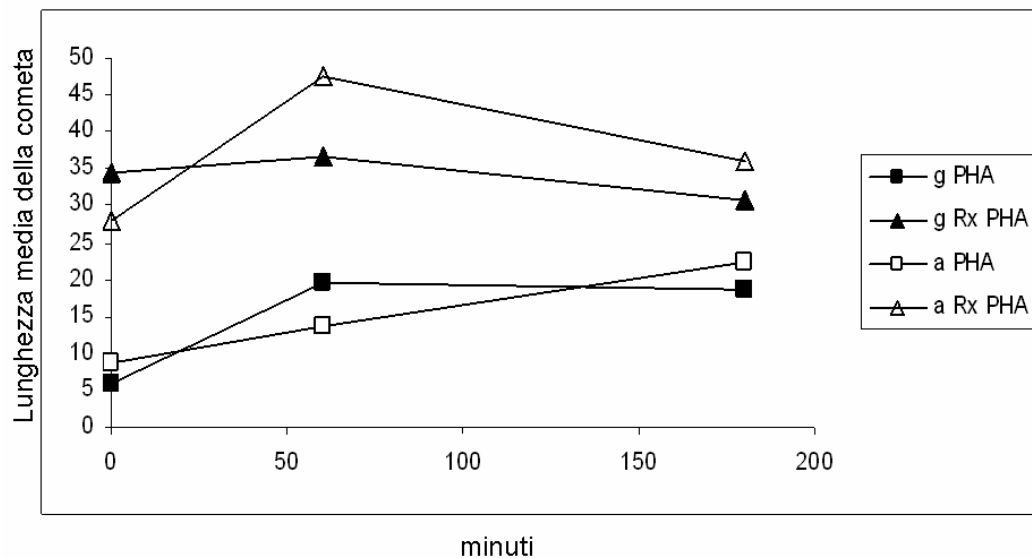


Figura 7: Danno del DNA in PBMC purificati da soggetti giovani (g) e anziani (a)

4.1.3 Espressione nucleare e citoplasmatica della proteina ku80 in PBMC di soggetti giovani ed anziani

Al fine di valutare se le differenze riscontrate nella riparazione tra soggetti giovani e anziani siano dovute ad una diversa distribuzione intracellulare della subunità proteica maggiormente coinvolta nel processo di riparazione (ku80), si è valutata mediante western blotting, la presenza del componente ku80 del complesso DNA-PK negli estratti citoplasmatici e nucleari di soggetti giovani (Fig. 8) ed anziani (Fig. 9).

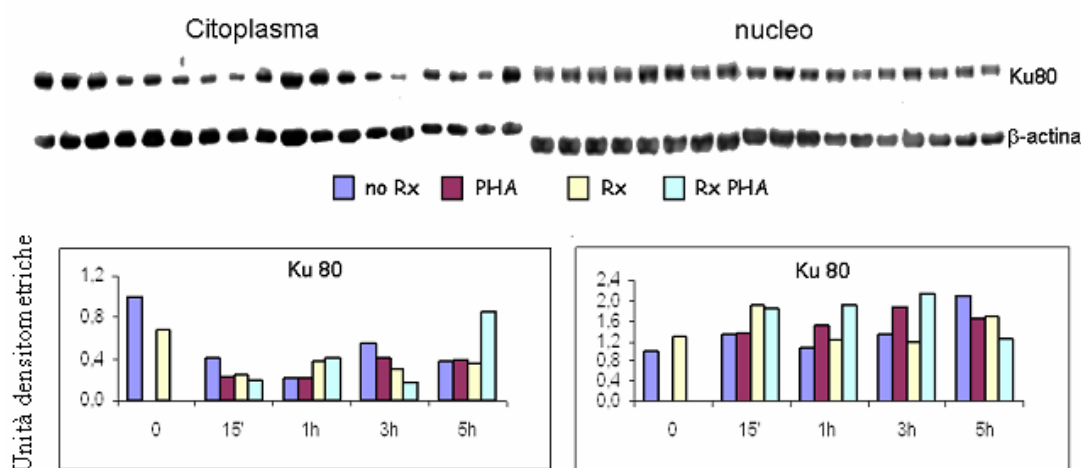


Figura 8: Espressione di ku 80 in PBMC di soggetti giovani

I dati ottenuti evidenziano che la quantità della proteina ku80 è dipendente dal trattamento ionizzante e dall' incubazione con la PHA. Nei soggetti giovani, l' irraggiamento e il trattamento con il mitogeno inducono un immediato decremento della subunità ku80 negli estratti citoplasmatici. La presenza di questa proteina nel comparto citoplasmatico si mantiene bassa sino a 5h dal trattamento ionizzante, eccetto che per il gruppo Rx e PHA a 5h dove è presente un incremento della proteina ku80 paragonabile a quello espresso in cellule non trattate al tempo 0. Questo decremento potrebbe suggerire una veloce traslocazione di ku80 nel nucleo dopo irraggiamento e/o stimolazione con PHA. Questa ipotesi trova conferma nella determinazione di ku80 negli estratti nucleari. I dati ottenuti evidenziano infatti, un incremento molto rapido di ku80 nelle cellule irraggiate, ed un aumento ancora maggiore nelle cellule trattate con PHA durante l' incubazione. Anche la sola stimolazione con il mitogeno porta ad un incremento nell' espressione di ku80 nel nucleo, sebbene si manifesti con una cinetica più lenta giacchè, il punto massimo di espressione si ha solo dopo 3h di incubazione diversamente

dai campioni non trattati col mitogeno in cui il massimo livello di espressione si ha a soli 15' dall' irraggiamento.

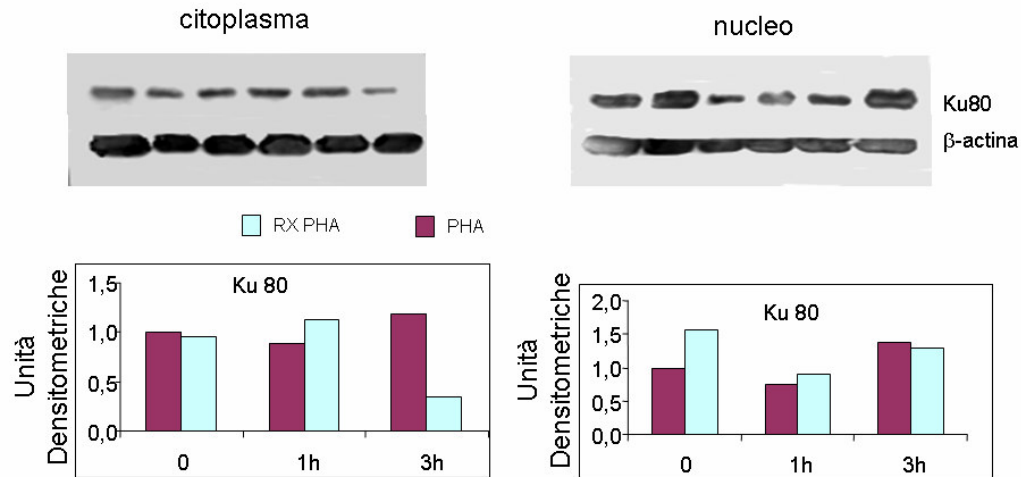


Figura 9: Espressione di ku 80 in PBMC di soggetti anziani

Nei soggetti anziani, al contrario, la quantità della proteina ku80 presente in sede citoplasmatica rimane costante ad 1h dall' irraggiamento per poi subire un decremento sensibile a 3h. Nel nucleo, i dati ottenuti mostrano che a seguito dell' irraggiamento vi è una netta diminuzione di ku80, a 1h, mentre a 3h mima livelli del tutto paragonabili a quelli iniziali. Il decremento della proteina ku80 negli estratti nucleari di soggetti anziani potrebbe suggerire una distruzione della proteina che ha ormai riparato il DNA e a seguire, la mancata attivazione di una nuova proteina proveniente dal citoplasma

4.2 Modello murino

4.2.1 Danni del DNA in linfociti di soggetti giovani ed anziani

A seguito dei risultati ottenuti, e delle analisi condotte sull' uomo, si è deciso di utilizzare e studiare anche il modello murino, al fine di validare un modello di riparazione cellulare murina, in soggetti giovani e vecchi, che potesse essere paragonabile a quello umano, e tale da poter essere usato in futuro per lo studio delle cellule staminali.

Dopo aver stimolato i linfociti splenici con LPS, il danno spontaneo e radioindotto da una sorgente di cesio (1 Gy di raggi X) del DNA è stato valutato mediante analisi citofluorimetrica delle cellule colorate con il marcatore di morte cellulare ioduro di propidio (IP). Subito dopo l' induzione del danno si osserva una minore percentuale di morte nelle cellule anziane rispetto a quelle giovani (Fig. 10 A,B). Tuttavia, dopo 24h si nota un recupero completo dell' integrità del DNA nei giovani, mentre in quelli anziani è solo parziale (Fig. 10 C,D) suggerendo che nei soggetti anziani esiste un difetto nella completa riparazione.

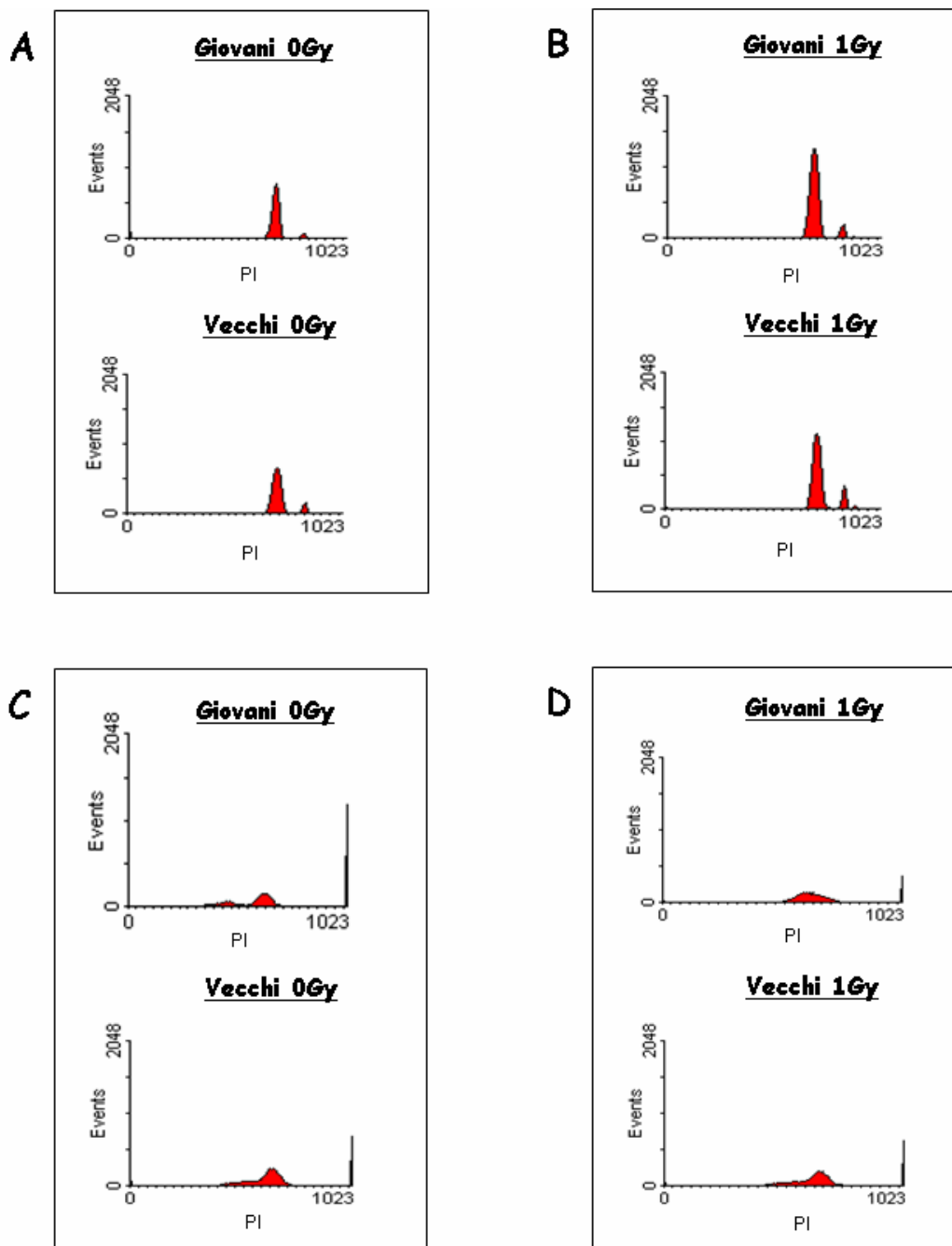


Figura 10: Valutazione del danno e della riparazione del DNA in linfociti di topi giovani e vecchi. Cellule non irradiate (A, C) o irradiate con raggi X (B, D) al tempo 0 (A, B) o dopo 24h dall' irraggiamento (C, D) e analizzate in citofluorimetria.

4.2.2 Riparazione del DNA in linfociti di soggetti giovani ed anziani

Dai dati ottenuti in immunofluorescenza, anche nel topo, si osserva una diversa cinetica di riparazione tra i linfociti provenienti da topi giovani (2 mesi) e quelli da topi vecchi (12 mesi).

Nel modello murino i tempi utilizzati per lo studio della cinetica di riparazione cellulare sono stati minori rispetto al modello umano, perché già dopo pochi minuti dall'irraggiamento si è notata la comparsa dei foci di riparazione.

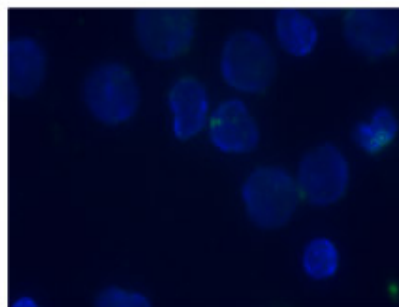
In seguito ad irraggiamento, infatti, si nota nelle cellule degli animali giovani, la formazione di un numero elevato di foci di riparazione, presenti nel nucleo subito dopo il trattamento con i raggi X (0-5'); questi diminuiscono tra i 15' e i 30'.

Sebbene in numero esiguo, anche nelle cellule non irradiate è stata rilevata la presenza di foci di riparazione, dovuti ai danni al DNA, causati dai normali processi metabolici della cellula (Fig. 11 A).

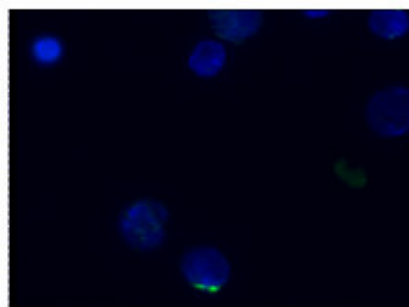
Negli animali vecchi, al contrario, la formazione dei foci di riparazione si rileva a 15' per poi raggiungere un massimo a 30' (Fig. 11 B).

Da questa analisi è evidente che i foci di riparazione sono presenti in numero maggiore negli animali vecchi rispetto a quelli giovani, probabilmente ad evidenziare come i danni cellulari in questi soggetti siano riparati più lentamente ed in misura minore durante l'invecchiamento.

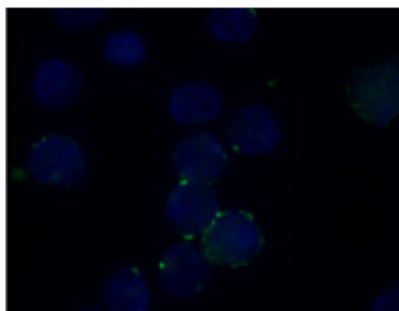
A



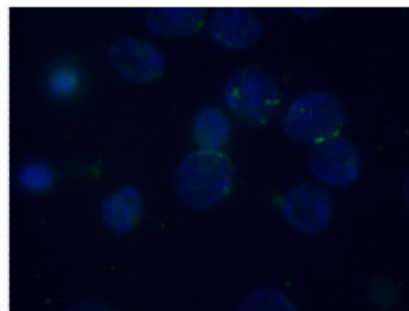
Giovani T=0' 0 Gy



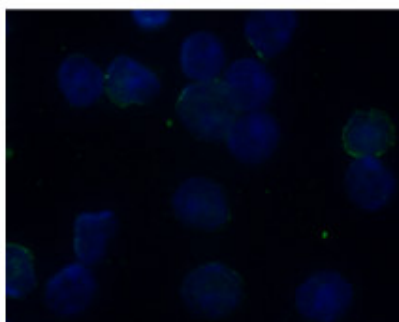
Vecchi T=0' 0 Gy



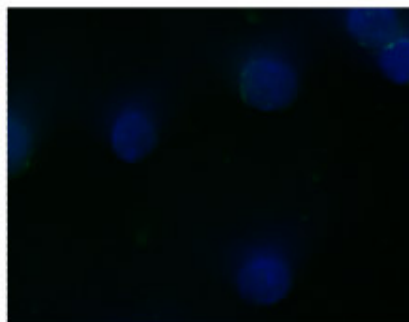
Giovani T=5' 0 Gy



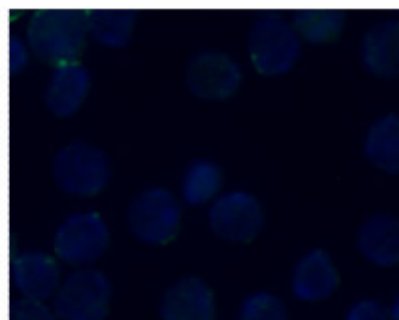
Vecchi T=5' 0 Gy



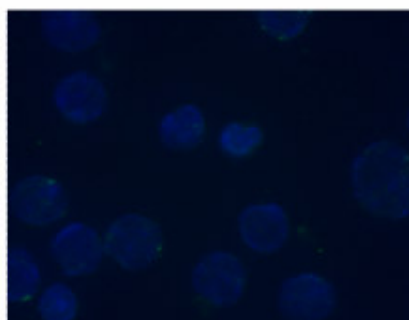
Giovani T=15' 0 Gy



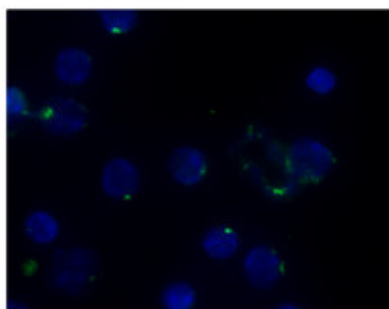
Vecchi T=15' 0 Gy



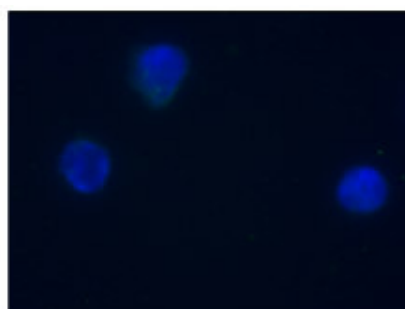
Giovani T=30' 0 Gy



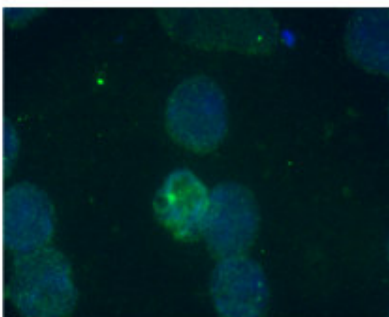
Vecchi T=30' 0 Gy

B

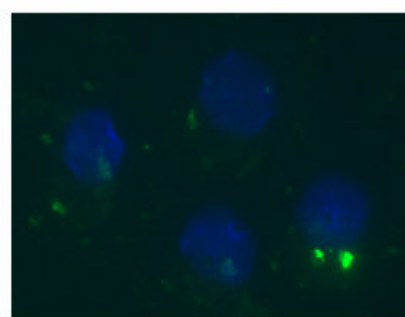
Giovani T=0' 1 gray



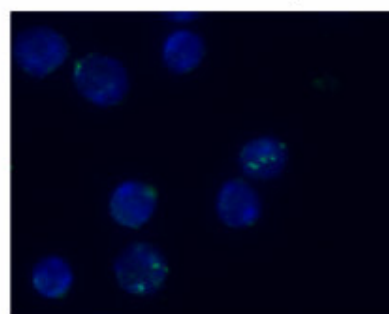
Vecchi T=0' 1 gray



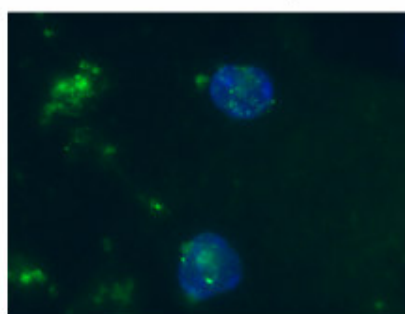
Giovani T=5' 16y



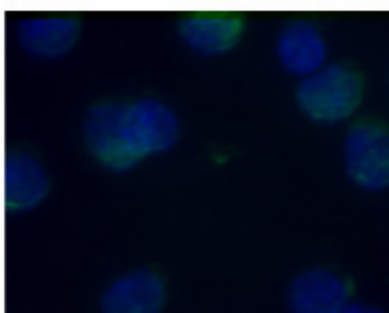
Vecchi T=5' 16y



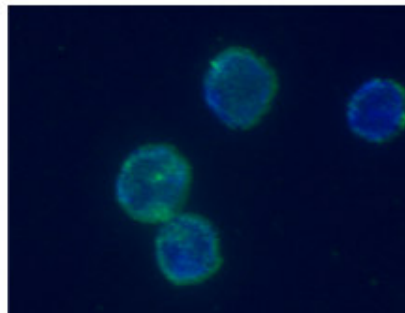
Giovani T=15' 16y



Vecchi T=15' 16y



Giovani T=30' 16y



Vecchi T=30' 16y

Figura 11: Formazione di foci indotti da raggi X in linfociti murini. Immunofluorescenze di linfociti di topi giovani (pannelli di sinistra) e di topi vecchi (pannelli di destra) non irradiati (A) o irradiati con 16y (B), fissate con PFA 1% a tempi diversi dopo l'irraggiamento e poi marcati con γ H2AX (verde) e DAPI (blu).

4.2.3 Espressione nucleare e citoplasmatica della proteina ku80 in linfociti di soggetti giovani ed anziani

Anche nel topo è stata valutata mediante western blotting la distribuzione citoplasmatica e nucleare della proteina ku80 in cellule linfocitarie di soggetti giovani (2 mesi) ed anziani (12 mesi). I risultati mostrano che il trattamento radiante induce nei soggetti giovani, entro i primi 5' dall' induzione del danno, una diminuzione di espressione della proteina ku80 nel comparto citoplasmatico, ed un conseguente aumento di ku80 in sede nucleare (Fig. 12A,C). Al contrario, nelle cellule di topi anziani ku80 è maggiormente presente nel nucleo tra i 15' e i 30' dal trattamento radiante (Fig. 12B,D).

Pertanto, i risultati esposti suggeriscono che le cellule dei topi anziani, quando sottoposte ad un danno del DNA, che ne determini rotture a doppio filamento, iniziano a riparare solo successivamente ai 15' dall' irraggiamento, mentre nei topi giovani la riparazione è più precoce ed avviene entro i 15', suggerendo un ritardo nei meccanismi di riparazione del DNA durante l' invecchiamento.

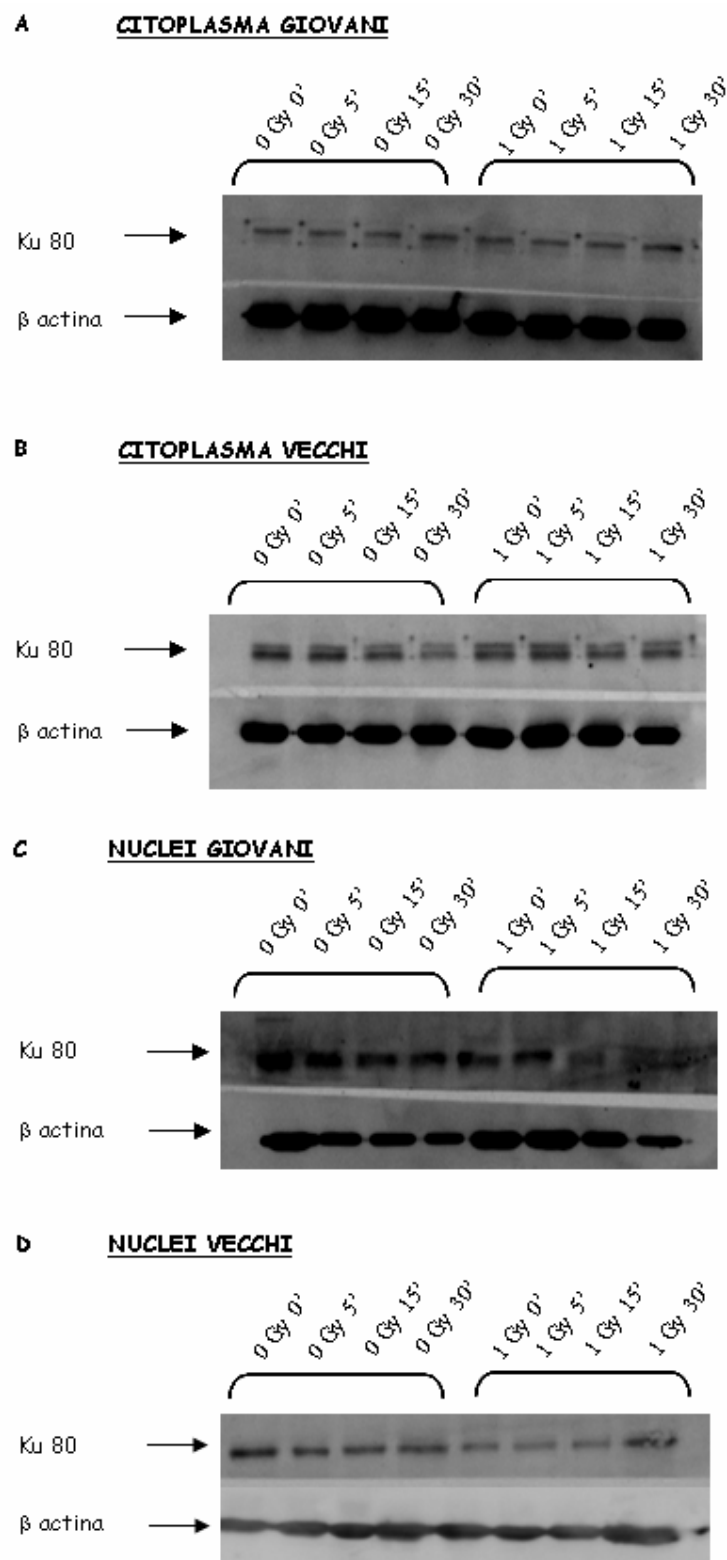


Figura 12: espressione della proteina ku 80 in linfociti murini non irradiati o irradiati con 1 Gy a tempi diversi nel citoplasma (A) o nel nucleo (C) di topi giovani e nel citoplasma (B) o nel nucleo (D) di topi vecchi

5 DISCUSSIONE

Lo scopo di questa tesi è stato quello di validare un modello di riparazione cellulare murina in soggetti anziani e giovani, simile a quello umano, tale da poter essere usato in futuro per lo studio delle cellule staminali.

I meccanismi di reclutamento e di attivazione delle molecole coinvolte nel riconoscimento e nella riparazione del DNA danneggiato da agenti genotossici sono ancora ben poco conosciuti. Il complesso DNA-PK sembra possedere un ruolo di primaria importanza nella complementazione di cellule mutate di mammifero che sono carenti nella riparazione delle doppie rotture (dsb) del DNA (128-133). In questo lavoro si analizza il coinvolgimento del complesso DNA-PK ed il ruolo che esso svolge in risposta alle radiazioni ionizzanti su PBMC e linfociti purificati da soggetti umani e murini di diversa età, con particolare attenzione alla cinetica di uno dei componenti maggiormente coinvolto del complesso (ku80) in seguito all'irraggiamento. Negli esperimenti condotti su PBMC di diversi soggetti sono state utilizzate dosi crescenti (1 o 5 Gy) di raggi X che generano una modesta quantità di rotture del DNA con maggiore probabilità di un'accurata riparazione. Con dosi maggiori di irraggiamento, anche la frammentazione del DNA è maggiore con conseguente attivazione di meccanismi molecolari come il mismatch repair e l'apoptosi. I nostri risultati dimostrano che la proteina ku80 mantiene la capacità di legare il DNA in cellule umane e murine non irraggiate durante l'invecchiamento. Questo dato è di grande importanza poichè ku è implicato non solo nella riparazione delle dsb ma anche in diversi altri meccanismi cellulari, quali la protezione dei telomeri, e la ricombinazione V (D) J, entrambi correlati con l'invecchiamento. Inoltre, a seguito delle radiazioni ionizzanti, l'attivazione di ku, in termini di legame al DNA, risulta essere diversa tra individui giovani ed anziani. Infatti, conseguentemente al

trattamento con i raggi X i danni causati al DNA, evidenziati dai risultati ottenuti nel modello umano mediante il saggio *COMET*, sono maggiori negli anziani, e l'attività stessa di legame al DNA aumenta a seguito dell'irraggiamento nei soggetti giovani con una cinetica molto veloce che mostra un picco massimo dopo 1h dall'irraggiamento seguito da una diminuzione a tempi successivi; nei soggetti anziani, invece, i raggi X inducono una riduzione a 1h e un successivo aumento a 3h senza comunque mai superare i livelli delle cellule non trattate di controllo; analogamente nel modello murino subito dopo l'induzione del danno, si osserva in citofluorimetria, una minore percentuale di morte cellulare negli animali anziani rispetto a quelli giovani, tuttavia, dopo 24h si nota un recupero completo dell'integrità del DNA nei giovani, mentre in quelli anziani è solo parziale suggerendo che nei soggetti anziani esiste un ritardo nella completa riparazione.

Questi dati sembrerebbero dimostrare che nei soggetti anziani possa essere presente un difetto nell'attivazione del complesso DNA-PK in seguito all'induzione di dsb. Questa ipotesi è validata dai dati ottenuti tramite immunofluorescenza. Con la determinazione dei foci nucleari in cui è presente la forma fosforilata dell'istone H2AX è possibile determinare la formazione dei foci di riparazione in seguito al trattamento con raggi X. I risultati dimostrano chiaramente una diversa cinetica di riparazione tra i PBMC e i linfociti purificati da soggetti giovani e quelli da soggetti anziani. I dati presentati mostrano che esiste, nel modello umano, una differenza significativa già nelle fasi iniziali di riconoscimento del danno del DNA radioindotto, poiché nonostante i PBMC dei soggetti anziani subiscano maggiori danni dal trattamento con i raggi X, il numero di foci ad 1h è inferiore rispetto a quello presente nei soggetti giovani. Inoltre, mentre nei soggetti giovani a 3h dall'irraggiamento gran parte dei foci scompare, evidenziando la probabile avvenuta riparazione del danno, negli anziani, allo

stesso tempo di trattamento i foci sembrano essere presenti anche in numero maggiore rispetto a quelli visibili dopo 1h, suggerendo che il processo di riparazione è ancora in corso; analogamente anche nel modello murino, in seguito ad irraggiamento si nota, nelle cellule degli animali giovani, la formazione di un numero elevato di foci di riparazione, presenti nel nucleo subito dopo il trattamento con i raggi X (0-5'); questi diminuiscono tra i 15' e i 30'.

Negli animali vecchi, al contrario, la formazione dei foci di riparazione si rileva a 15' per poi raggiungere un massimo a 30'. Sebbene in numero esiguo, anche nelle cellule non irradiate è stata rilevata la presenza di foci di riparazione, dovuti ai danni al DNA, causati dalle normali rotture del DNA nella cellula.

I dati ottenuti in immunofluorescenza sembrano, quindi, dimostrare che i PBMC e le cellule linfocitarie purificate da soggetti anziani presentano una diversa cinetica di riparazione delle dsb, e che questo comportamento può essere probabilmente dovuto ad un difetto di attivazione del complesso DNA/PK tramite la sua subunità regolatoria ku. Per chiarire se le differenze riscontrate siano attribuibili ad una diversa quantità o ad una differente distribuzione cellulare di ku80 (la proteina maggiormente coinvolta nei processi di riparazione), siamo andati a studiare l' espressione di questa proteina nel nucleo e nel citoplasma di PBMC e di cellule linfocitarie murine irradiate. I risultati mostrano come nei PBMC umani di soggetti giovani e in quelli di soggetti anziani esiste una diversa mobilizzazione e una differente espressione di ku80 in risposta al trattamento radiante. Nei soggetti giovani, infatti, l' irraggiamento porta ad una rapida diminuzione citoplasmatica e ad un conseguente aumento dell' espressione nucleare di ku80, mentre nei soggetti anziani questo fenomeno è visibile solo dopo 3h dal trattamento; anche nel topo, i risultati evidenziano che il trattamento radiante induce nei

soggetti giovani, entro i primi 5' dall' induzione del danno, una diminuzione di espressione della proteina ku80 nel comparto citoplasmatico, ed un conseguente aumento di ku80 in sede nucleare. Al contrario, nelle cellule di topi anziani ku80 è maggiormente presente nel nucleo tra i 15' e i 30' dal trattamento radiante.

Pertanto, i risultati esposti suggeriscono che le cellule dei topi anziani, quando sottoposte ad un danno del DNA, che ne determini rotture a doppio filamento, iniziano a riparare solo successivamente ai 15' dall' irraggiamento, mentre nei topi giovani la riparazione è più precoce ed avviene entro i 15', suggerendo un ritardo nei meccanismi di riparazione del DNA durante l' invecchiamento.

Questi risultati inducono ad ipotizzare, che la proteina presente nel citoplasma abbia un ruolo di deposito e che in seguito alla formazione di dsb possa traslocare nel nucleo. Nei PBMC e nelle cellule linfocitarie murine purificate da soggetti anziani, questa migrazione sembra avvenire molto più lentamente, con conseguente riduzione della proteina nucleare, e correlata diminuzione dell' attività di legame dell' eterodimero ku70/80; ciò però non spiegherebbe il ridotto numero di foci di γ -H2AX. E' evidente, quindi, che i PBMC e le cellule linfocitarie di soggetti anziani sono carenti nei meccanismi che conducono ad un rapido riconoscimento e ad una efficiente riparazione delle dsb.

Recenti osservazioni (114,115) hanno anche dimostrato il ruolo fondamentale che la DNA-PK gioca nell' apoptosi. Il blocco del ciclo cellulare indotto dal danno del DNA può risolversi nella riparazione del materiale genetico e di conseguenza nella rimozione del blocco del ciclo, quando la riparazione è completa. Perciò, la diversa quantità della proteina ku80 componente il complesso DNA-PK che esiste tra soggetti giovani ed anziani potrebbe comportare una differente efficienza di induzione dell' apoptosi a seguito

della formazione di dsb con conseguente accumulo nelle cellule di soggetti anziani di alterazioni del genoma e una maggiore probabilità di sviluppo di tumori. Resta da valutare, quindi, se il trattamento con una dose di raggi X in grado di indurre apoptosi, provochi una differenza nella percentuale di cellule apoptotiche tra soggetti giovani e anziani.

Dai risultati ottenuti in questa tesi emerge evidente che, sebbene con lievi differenze, il modello murino ricalca quello umano nella cinetica di riparazione del danno radioindotto. Questo studio porta quindi ad ipotizzare che il modello murino, mimando quello umano, possa essere il candidato ideale per futuri studi ed applicazioni sulle cellule staminali.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Chadwick, K.H., & Leenhouts H.P. (1981). Molecular theory of radiation biology.
2. Collins A.R.(1993). Mutant rodent cell lines sensitive to UV, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics. *Mech. Ageing Dev.* 293: 99-118.
3. Cleaver J.E., Kaufmann, W.K., Kapp, L.N., & Park, S.D. (1983). Replicon size and excision repair as factors in the inhibition and recovery of DNA synthesis from ultraviolet damage. *Biochim. Biophys. Acta* 739: 207-215.
4. Mayne, L.V. (1984). Inhibitors of DNA synthesis (aphidicolin and araC/HU) prevent the recovery of RNA synthesis after UV-irradiation. *Mutation Res.* 131: 187-191.
5. Friedberg, E.C. (1985). DNA repair. W.H. Freeman, New York, NY.
6. Arlett, C.F., & Lehmann, A.R. (1978). Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. *Annual review of genetics* 12: 95-115.
7. Setlow, R.B. (1978). Repair deficient human disorders and cancer. *Nature* 271: 713-717.
8. Hanawalt, L.H., & Sarasin, A. (1986). Cancer prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends in Genetics* 2: 124-129.
9. Suzuki, D.T. Griffith, A.J.F., Miller, J.H., & Lewontin, R.C. (1992). *Genetica. Principi di analisi formale. Ed. Zanichelli, Bologna*, pp.592.
10. Quintiliani, M., & Sapor, O. (1981). Riparazione del DNA e radioprotezione. *G. Ital. Medicina del lavoro* 3: 175-181.
11. Hartwell, L.H., & Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1828.

12. Marx, J. (1994). DNA repair comes into its own. *Science* 266: 728-730.
13. Culotta, E., & Koshland, D.E. (1994). DNA repair works its way to the top. *Science* 266: 1926-1929.
14. Price, G.B., Modak, S.P., & Makinodan, T. (1971). Age-associated changes in the DNA of mouse tissue. *Science* 171: 917-920.
15. Nakanishi, Y., Kram, D., & Schreide, E.L. (1979). Aging and sister chromatid exchange. IV. Reduced frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchanges in vivo in mouse bone marrow cells with aging. *Cytogenet. Cell Genet.* 24: 61-67.
16. Chetsanga, C.J., Tuttle, M., Jacobini, A., & Johnson, C. (1977). Age-associated structural alterations in senescent mouse brain DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 474: 180-187.
17. Zahn, R.K. Reinmuller, J., Beyer, R., & Pondeljak, V. (1987). Age-correlated DNA damage in human muscle tissue. *Mech. Ageing Dev.* 41: 73-114.
18. Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., Pearson, J.D., Brant, L.J., Morrell, C.H., & Schneider, E.L. (1991). Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutation Res.* 256: 1-6.
19. Holmes, G.E., Bernestein, C., & Bernestein, H. (1992). Oxidant and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutation Res.* 257: 305-315.
20. Barnet, Y.A., & Barnet, C.R. (1998). DNA damage and mutation: contributors to the age-related in T cell-mediated immune responses? *Mech. Ageing Dev.* 102: 165-175.
21. Staiano-Coico, L., Darzynkiewicz, Z., Hefton, J.M., Dutowski, R., Darlington, G., & Weksler, M.E. (1983). Increased sensitivity of

- lymphocytes from people over 65 to cycle arrest and chromosomal damage. *Science* 219: 1335-1337.
22. Staiano-Coico, L., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R., & Weksler, M.E. (1984). Immunological studies of aging. IX. Impaired proliferation of T lymphocytes detected in elderly humans by flow cytometry. *J. Immunol.* 132: 1788-1792.
 23. Licastro, F., & Walford, R.L. (1985). Proliferative potential and DNA repair in lymphocytes from short-lived and long-lived strains of mice, relation to aging. *Mech. Ageing Dev.* 31: 171-186.
 24. Esposito, D., Fassina, G., Szabo, P., De Angelis, P., Rodgers, L., Weksler, M.E., & Siniscalco, M. (1989). Chromosomes of old humans are more prone to aminopterin-induced breakage. *Proc. Natl. Acad. USA* 86: 1302-1306.
 25. Kruk, P.A., Rampino, N.J., & Bohr, V.A. (1995). DNA damage and repair in telomeres: Relation to aging. *Proc. Natl. Acad. USA* 92: 258-262.
 26. Moriwaki, S.I., Ray, S., Tarone, R.E., Kraemer, K.H., & Grossman, L. (1996). The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: Reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutation Res.* 364: 117-123.
 27. Hart, R.W., & Setlow, R.B. (1974). Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and lifespan in a number of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. USA* 71: 2169-2173.
 28. Paffenholz, V. (1978). Correlation between DNA repair of embryonic fibroblasts and different life span of 3 inbred mouse strains. *Mech. Ageing Dev.* 7: 131-150.
 29. Hart, R.W., Sacher, G.A., & Hoskin, T.L. (1979). DNA repair in a short and a long-lived rodent species. *J. Gerontol.* 34:808-817.

30. Walford, R.L., & Bergmann, K. (1979). Influence of genes associated with main histocompatibility complex on deoxyribonucleic acid excision repair capacity and bleomycin sensitivity in mouse lymphocytes. *Tissue Antigens* 14: 336-342.
31. Hall, K.Y., Bergmann, K., & Walford, R.L. (1981). DNA repair, H-2, and aging in NZB and CBA mice. *Tissue Antigens* 16: 104-119.
32. Hall, K.Y., Hart, R.W., Bernirschke, A.K., & Walford, R.L. (1984). Correlation between ultraviolet-induced DNA repair in primate lymphocytes and fibroblast and species maximum achievable life span. *Mech. Ageing Dev.* 24: 163-173.
33. Tice, R.R., & Setlow, R.B. (1985). DNA repair and replication in aging organism and cells. In: C.E. Finch and E.L. Schneider (Eds.), *Handbook of the Biology of Aging, 2nd edn.*, Van Nostrand Reinhold. New York, NY. pp 173-224.
34. Regan, J.D., & Setlow, R.B. (1974). Two form of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogenesis and mutagens. *Cancer Res.* 34: 3318-3325.
35. Friedberg, E.C., Walker, G.C., & Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. *ASM press*: 407-593.
36. Sancar, G.B., Siede, W., & Van Zeland, A.A. (1996). Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress. *Mutation Res.* 362: 127-146.
37. Lindahl, T., & Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286: 1897-1905.
38. Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.
39. Kuby, J. (1997). Immunology. Third edition. W.H. Freeman and Company (ed.), New York.

40. Frankenberg-Schwager, M., & Frankenberg, D. (1990). DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int. J. Radiat. Biol.* 58: 569-575.
41. Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687-696.
42. Van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.* 2: 196-206.
43. Krejci, L., Chen, L., Van Komen, S., Sung, S., & Tomkinson, A. (2003). *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 74: 159-201.
44. Shinohara, A., & Ogawa, T. (1995). Homologous recombination and the roles of double strand-break repair. *TIBS* 20: 387-391.
45. Stryer, L. (1988). *Biochemistry (third edition)* 603: 791-792.
46. Thompson, L.H., & Schild, D. (2001). Homologous recombinant repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.* 477: 131-153.
47. Ogawa, T., Yu, X., Shinoara, A., & Egelman, E.H. (1993). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* 259: 1896-1899.
48. Chu, G. (1997). Double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272: 24097-24100.
49. Gupta, R.C., Bazemore, L.R., Goulp, E.I., Radding, C.M. (1997). Activities of human recombination protein RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 463-468.
50. Critchlow, S.E., & Jackson, S.P. (1998). DNA end-joining: from yeast to man.

51. Lieber, M.R., Grawunder, U., Wu, X., & Yaneva, M. (1997). Tying loose ends: roles of ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 99-104.
52. Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H.J., & van Gent, D.C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell. Biol.* 8: 483-489.
53. Gottlieb, T.M., & Jackson, S.P. (1994). Protein kinases and DNA damage. *TIBS* 19: 500-503.
54. Jackson, S.P. (1996). The recognition of DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 19-25.
55. Jeggo, P.A. (1998). DNA breakage and repair. *Adv. Genet.* 38: 185-218.
56. Troelstra, C., & Jaspers, N.G.J. (1994). Ku starts at the ends. *Curr. Biol.* 4: 1149-1151.
57. Rathmell, W.K., & Chu, G. (1994). A DNA end-binding factor involved in double-strand break repair in V (D) J recombination. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4741-4748.
58. Roth, D.B., Lindahl, T., & Gallert, M. (1995). How to make ends meet. *Curr. Biol.* 5: 496-499.
59. Weaver, D.T. (1995). What to do at the end: double strand break repair. *Trends Genet.* 11: 388-392.
60. Chen, F., Peterson, S.C., Story, M.D., & Chen, D.J. (1996). Disruption of DNA-PK in ku 80 mutant *xrs-6* and the implications in DNA double-strand break repair. *Mutation Res.* 362: 9-19.
61. Wu, X., & Lieber, M.R. (1996). Protein-protein and protein-DNA interactions regions within the DNA end-binding protein ku70/86. *Molec. Cell. Biol.* 16: 5186-5193.

62. Jin, S., & Weaver, D. (1997). Double-strand break repair by ku 70 requires heterodimerization with ku 80 and DNA binding functions. *Embo J.* 16: 6874-6885.
63. Cary, R.B., Chen, F., Shen, Z., & Chen, D.J. (1998). A central region of ku 80 mediates interaction with ku 70 *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 26: 974-979.
64. Gottlieb, T.M., & Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase requirement for DNA ends and association with ku antigen. *Cell.* 72: 131-142.
65. Jeggo, P.A. (1997). DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutation Res.* 384: 1-14.
66. Yaneva, M., Kowalewski, T., & Lieber, M.R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO. J.* 16: 5098-5112.
67. Poltoratsky, V. P., Shi, X., York, J.D., Lieber, M.R., & Carter, T. (1995). Human DNA-activated protein kinase (DNA-PK) is homologous to phosphatidylinositol kinases. *J. Immunol.* 155: 4529-4533.
68. Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 155-168.
69. Hammarsten, O., & Chu, G. (1998). DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of ku. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 525-530.
70. Boubnov, N. V., Hall, K., Willis, Z., Lee, S.E., He, D.M., Benjamin, D.M., Pulaski, C.R., Band, H., Reeves, W., Hendrickson, E.A., & Weaver, D.T. (1995). Complementation of the ionizing radiation sensitivity, DNA end binding, and V (D) J recombination defects of double-strand break repair mutants by the p86 ku autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 890-894.

71. Featherstone, C., & Jackson, S.P. (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutation Res.* 434: 3-15.
72. Kienker, L.J., Shin, E.K., & Meek, K. (2000). Both V (D) J recombination and radioresistance require DNA-PK kinase activity, though minimal levels suffice for V (D) J recombination. *Nucleic Acids Res* 28: 2752-2761.
73. Smider, V., Rathmell, W. K., Lieber, M.R., & Chu, G. (1994). Restoration of X-rays resistance and V (D) J recombination in mutant cells by ku cDNA. *Science* 266: 288-291.
74. Nussenzweig, A., Chen, G., Soares, V.D.C., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., & Li, G.C. (1996). Requirement for ku 80 in growth and immunoglobulin V (D) J recombination. *Nature* 382: 551-555.
75. Zhu, C., Bouge, M.A., Lim, D.S., Hasty, P., & Roth, D.B. (1996). Ku 86-deficient mice exhibit severe combined immunodeficiency and defective processing of V (D) J recombination intermediates. *Cell*. 86: 379-389.
76. Bogue, M.A., Wang, C., Zhu, C., & Roth, D.B. (1997). V (D) J recombination in ku 86 deficient mice: distinct effects on coding signal, and hybrid joint formation. *Immunity* 7: 37-47.
77. De Vries, D., Vandriel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C., & Vandervliet, P.C. (1989). HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA multimeric protein complex. *J. Mol. Biol.* 208: 65-78.
78. Paillard, S., & Strauss, F. (1991). Analysis of the mechanism of interaction of simian ku protein with DNA. *Nucleic. Acids Res.* 19: 5619-5624.
79. Bliss, T.M., & Lane, D.P. (1997). Ku selectively transfer between DNA molecules with homologous ends. *J. Biol. Chem.* 272: 5765-5773.

80. Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N.W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L., Chen, J., Zhang, J., Wang, S., Pongor, S., & Falaschi, A. (1994). Human elicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the ku autoantigen. *EMBO J.* 13: 4991-5001.
81. Ochem, A.E., Skopac, D., Costa, M., Rabilloud, T., Vuillard, L., Simoncsits, A., Giacca, M., & Falaschi, A. (1997). Functional properties of the separate subunits of human DNA helicase II/ku autoantigen. *J. Biol. Chem.* 272: 29919-29926.
82. Taccioli, G.E., Rathburn, G., Oltz, T., Stamato, T., Jeggo, P.A., & Alt, F.W. (1993). Impairment of V (D) J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 260: 207-210.
83. Boulton, S.J., & Jackson, S.P. (1996b). *Saccharomyces cerevisiae* ku 70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error prone DNA repair pathways. *EMBO J.* 15: 5093-5103.
84. Cary, R.B., Peterson, S.R., Wang, J.T., Bear, D.G., Bradbury, E.M., & Chen, D.J. (1997). DNA looping by ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4267-4272.
85. Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., & Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from ku80-deficient cells: implications for ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* 28: 2585-2596.
86. Ramsden, D.A., & Gellert, M. (1998). Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for ku in repair of DNA double-strands breaks. *EMBO J.* 17: 609-614.

87. Chiu, C.Y., Cary, R.B., Chen, D.J., Peterson, S.R., Stewart, P.L. (1998). Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J. Mol. Biol.* 284: 1075-1081.
88. Leuther, K.K., Hammarsten, O., Kornberg, R.D., Chu, G. (1999). Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA. *EMBO J.* 18: 1114-1123.
89. Walker, J.K.R., Corpina, R.A., Goldberg, J. (2001). Structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature.* 412: 607-614.
90. Gell, D., & Jackson, S.P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic. Acids. Res.* 27: 3494-3502.
91. Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of ku 80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol. Cell. Biol.* 19: 3267-3277.
92. Yoo, S., & Dynan, W.S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of ku protein. *Nucleic Acid Res.* 27: 4679-4686.
93. De Fazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21: 3192-3200.
94. Hsu, H.L., Yannone, S.M., Chen, D.J. (2002). Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA repair.* 1: 225-235.
95. Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J., Salles, B. (2003). Coordinated assembly of ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase UV recruitment. *J. Mol. Biol.* 326: 93-103.

96. Chen, L., Trujilo, K., Sung, P., & Tomkinson, A.E. (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 26196-26205.
97. Lee, J.W., Yannone, S.M., Chen, D.J., Povrik, L.F. (2003). Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in allignment-based gap filling for non-homologous DNA end joining in vitro. *Cancer. Res.* 63: 22-24.
98. Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R., Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interaction with DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 1794-1801.
99. Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X.J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., Sakaia, K., Yasuda, H., Hosoi, Y. (2000). Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett.* 478: 67-71.
100. Kurisama, A., Ouyang, H., Dong, L.J., Wang, S., Li, X., Cordon-Cardo, C., Chen, D.J., Li, G.C. (1999). Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1403-1408.
101. Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurisama, A., Soares, V.C., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G., Chen, D.J., Li, G.C. (1997). Ku 70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination in vivo. *J. Exp. Med.* 186: 921-929.
102. Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbum, G.A., Swat, W., Wang, J., Bronson, R.T., Malynn, B.A., Bryans, M., Zhu, C., Chaudhuri, J., Davidson, L., Ferrini, D., Stamato, T., Orkin, S.H., Greenberg, M.E., Alt, F.W. (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell.* 95: 891-902.

103. Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., Alt, F.W. (1998). Late embryonic lethality and impaired V (D) J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*. 396: 173-177.
104. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4: 712-720.
105. Yannone, S.M., Roy, S., Chan, D.W., Murphy, M.B., Huang, S., Campisi, J., Chen, D.J. (2001). Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 38242-38248.
106. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.,R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DANN-dependent protein kinase complex in non-homologous end joining and V (D) J recombination. *Cell*. 108: 781-794.
107. Chan, D.W., Chen, B.P., Prithivirajasingh, S., Kurisama, A., Story, M.D., Quin, J., Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double dtrand breaks. *Genes Dev.* 16: 2333-2338.
108. Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., Wellinger, R.J. (1998). Yeast ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science*. 280: 741-744.
109. Bianchi, A., & De Lange, T. (1999). Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 274: 21223-21227.
110. Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H., Chen, D.J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammalian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12454-12458.

111. d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., Jackson, S.P. (2001). Effects of DNA non-homologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr. Biol.* 11: 1192-1196.
112. Hsu, H.L., Gilley, D., Galande, S.A., Hande, M.P., Allen, B., Kim, S.H., Li, G.C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., Chen, D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.* 14: 2807-2812.
113. Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe against carcinogenesis. *Mutat. Res.* 511: 145-178.
114. Wang, S., Guo, M., Ouyang, H., Li, X., Cordon-Cardo, C., Kurisama, A., Chen, D.J., Fuks, Z., Ling, C.C., Li, G.C. (2000). The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1584-1588.
115. Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S.M., Taccioli, G.E., Blasco, M.A. (2002). Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO J.* 21: 6275-6287.
116. Espejel, S., Franco, S., Rodriguez-Perales, S., Bouffler, S.D., Cigudosa, J.C., Blasco, M.A. (2002). Mammalian ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 21: 2207-2219.
117. Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D.J., Li, G.C., Karin, M., Raz, E. (2000). DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell.* 103: 909-918.

118. Karpova, A.Y., Trost, M., Murray, J.M., Cantley, L.C., Howley, P.M. (2002). Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2818-2823.
119. Puel, A., Mevel, J.C., Bouthillier, Y., Feingold, N., Fridman, W.H., Mouton, D. (1996). Toward genetic dissection of high and low antibody responsiveness in Biozzi mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14742-14746.
120. Doria, G.: Biozzi mice. In Delves, P.J., Roitt, I.M. (1998). *Encyclopedia of Immunology*, second ed. Academic Press, New York, 342-346.
121. Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., Cossarizza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals. The lesson of centenarians. *Immunol. Today*. 16: 12-16.
122. Frasca, D., Barattini, P., Tocchi, G., Guidi, L., Pierelli, L., Doria, G. (2001). Role of DNA-dependent protein kinase in recognition of radiation-induced DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunol.* 13: 791-797.
123. Scarpaci, S., Frasca, D., Barattini, P., Guidi, L., Doria, G. (2003). DNA damage recognition and repair capacities in human naive and memory T cells from peripheral blood of young and elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.* 124: 517-524.
124. Boyum, Y. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* S97: 77-85.
125. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.

126. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
127. Rothkamm, K., & Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 5057-5062.
128. Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., & Jeggo, P.A. (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V (D) J recombination. *Science* 265: 1442-1445.
129. Lees-Miller, S.P., Godbout, R., Chan, D.W., Weinfeld, M., Day III, R.S., Barron, G.M., & Allalunis-Turner, J. (1995). Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 267: 1183-1185.
130. Liang, F.E., Romanienko, P.J., Weaver, D.T., Jeggo, P.A., & Jasin, M. (1996). Chromosomal double-strand break repair in ku80-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8929-8933.
131. McConnell, K., & Dynan, W.S. (1996). The DNA-dependent protein kinase: a matter of life and (cell) death. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8: 325-330.
132. Barnes, G., & Rio, D. (1997). DNA double-strand-break sensitivity, DNA replication, and cell cycle arrest phenotype of ku-deficient *Saccaromyces Cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 867-872.
133. Nussenzweig, A., Chen, G., Soares, V.D.C., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., & Li, G.C. (1996). Requirement for ku80 in growth and immunoglobulin V (D) J recombination. *Nature* 382: 551-555.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare soprattutto il Dott. Scarpaci, che è stato per me di grande insegnamento ed ha acconsentito a farmi da relatore. A lui dedico questa tesi.

Ringrazio il Prof. Doria, che con grande umanità mi ha permesso di frequentare e svolgere la tesi nel suo laboratorio.

Ringrazio tutte le ragazze del laboratorio di immunologia (Luigia, Stefania, Cecilia, Sara, Beatrice ed Ilaria) che oltre ad essermi colleghe, si sono dimostrate amiche sempre cortesi, gentili, e disponibili nei miei confronti.

Un ringraziamento particolare va a Stefania che più di tutte mi ha capita, sopportata e consigliata nella stesura di questo lavoro.

Grazie di cuore a Francesco che con amore mi ha sempre sostenuta e incoraggiata, restandomi vicino nei periodi brutti e felici.

Infine, un ringraziamento particolare a me stessa per la tenacia, la testardaggine e la volontà di fare nonostante tutto!