



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN
NEUROSCIENZE

XXI CICLO

Ruolo della chinasi ATM (Atassia Telangiectasica Mutata) nel meccanismo molecolare con cui agenti chemioterapici sensibilizzano linee tumorali all'apoptosi indotta da TRAIL.

Michele Mingardi

A.A. 2007/2008

Docente Guida/Tutor: Dott.ssa Daniela Barilà.

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi.

INDICE

INDICE	3
ABSTRACT	5
ABSTRACT in English.....	6
LA CHINASI ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated).....	7
Atassia Telangiectasica.....	7
Struttura e funzione di ATM.....	9
La trasduzione del segnale attivata da danno al DNA.....	11
Modello di risposta alla rottura su doppio filamento (DSBs: Double Strand Brakes).	13
Funzione di ATM nella risposta alla rottura a doppio filamento del DNA.....	14
Funzioni di ATM alternative alla trasduzione del segnale attivata da danno al DNA	16
Attivazione di ATM	18
Meccanismo di attivazione di ATM	19
Principali substrati di ATM.....	21
Approccio proteomico all'identificazione dei substrati di ATM.....	23
ATM nel sistema immunitario	25
Ruolo di ATM nella tumorigenesi.....	26
L'APOPTOSI INDOTTA DA RECETTORE DI MORTE: LA VIA DI TRAIL.....	28
L'apoptosi.....	28
La via di TRAIL.....	31
La regolazione della via di TRAIL: la famiglia delle proteine FLIP	34
La resistenza a TRAIL.....	36
Meccanismi di sensibilizzazione all'apoptosi indotta da TRAIL	38

FUNZIONI DEI MECCANISMI PROTEOLITICI INTRACELLULARI.....	43
L'E3 ubiquitin ligasi ITCH	45
Un nuovo meccanismo di regolazione di c-FLIP: la chinasi ATM	46
SCOPO DEL LAVORO.....	47
MATERIALI E METODI	48
RISULTATI	52
L'attività chinastica di ATM è necessaria per la sensibilizzazione di cellule linfoblastoidi all'apoptosi indotta da TRAIL.....	52
Il pretrattamento con il 5-fluorouracile richiede l'attività chinastica di ATM per abbassare i livelli della proteina c-FLIP _L e sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da TRAIL	54
Il trattamento con diversi chemioterapici che inducono danno al DNA favorisce l'induzione dell'attività chinastica di ATM e la riduzione dei livelli di FLIP _L in cellule derivanti da Linfoma di Hodgkin	58
L'attività chinastica di ATM modula la stabilità della proteina FLIP _L attraverso la via del proteasoma.....	61
Il 5-FU provoca l'abbassamento dei livelli di c-FLIP _L e sensibilizza le cellule di epatocarcinoma a TRAIL con un meccanismo indipendente da p53.....	62
L'E3 ubiquitin ligasi ITCH è un substrato diretto di ATM	65
DISCUSSIONE.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	76

ABSTRACT

L'Atassia-Telangectasica (AT) è una patologia neurodegenerativa autosomica, associata alla mutazione su entrambi gli alleli del gene che codifica per la chinasi ATM. L'AT è caratterizzata da una marcata perdita delle cellule del Purkinje e dei granuli, che porta all'atassia, dalla sensibilizzazione alle radiazioni ionizzanti e dall'alta incidenza dello sviluppo di tumori, principalmente a carico dell'apparato immunitario.

Abbiamo recentemente identificato ATM come un modulatore importante dell'apoptosi mediata da Fas, un membro della famiglia dei TNF *receptors*. ATM modula negativamente i livelli della proteina antiapoptotica FLIP, favorendo la morte cellulare. Recentemente TRAIL, un altro membro della famiglia del TNF, è stato proposto come un nuovo potenziale chemioterapico in grado di indurre apoptosi principalmente nelle cellule tumorali senza mostrare significativa tossicità nelle cellule normali.

Molte linee tumorali sono però resistenti a TRAIL ed il cotrattamento con chemioterapici che inducono danno al DNA attiva un meccanismo molecolare ancora poco chiaro. L'obiettivo di questo progetto è stato quindi quello di verificare l'ipotesi che ATM possa essere alla base di un meccanismo molecolare attraverso cui le rotture a doppia elica del DNA sono in grado di ridurre i livelli della proteina antiapoptotica c-FLIP ed incrementare la sensibilità cellulare alla morte apoptotica indotta dalla stimolazione del recettore per TRAIL. Abbiamo verificato quindi che cellule linfoblastoidi prive di ATM funzionale sono sensibilmente resistenti alla morte indotta dal recettore TRAIL. Tale resistenza all'apoptosi correla con alti livelli di espressione nelle cellule di FLIP. La ricostituzione di queste cellule con una forma cataliticamente attiva di ATM è sufficiente per abbassare i livelli di FLIP e ripristinare la sensibilità all'apoptosi indotta da TRAIL. Utilizzando un modello sperimentale di epatocarcinoma resistente a TRAIL abbiamo dimostrato, mediante inibizione di farmacologia o genetica di ATM, che l'attività chinasi di ATM è assolutamente necessaria per la sensibilizzazione di tali cellule a TRAIL mediata dall'agente chemioterapico 5-FU. Inoltre in questo sistema ATM media la degradazione di FLIP attraverso la via del proteasoma, in modo p53 indipendente ed agendo direttamente sull'ubiquitina ligasi ITCH.

Questo lavoro suggerisce quindi un meccanismo molecolare con cui il 5-FU ed altri chemioterapici, che provocano danno al DNA, sensibilizzano linee tumorali a TRAIL e propone che tale meccanismo possa essere utilizzato in un ampio spettro di tumori, in quanto indipendente dallo stato di p53, purché in tali tumori non sia compromessa la funzionalità di ATM. L'attività chinasi di ATM sembra quindi un prerequisito importante nella messa a punto di terapie combinate basate sulla sensibilizzazione alla morte da recettore, selettivamente sulle cellule tumorali, attraverso agenti che danneggiano il DNA. Inoltre viene proposto un meccanismo molecolare in cui ATM sembra essere implicato nella regolazione della stabilità proteica, agendo sulla via dell'ubiquitina proteasoma, la cui alterazione potrebbe avere un ruolo ancora da chiarire nello sviluppo dell'AT.

ABSTRACT in English

Ataxia Telangiectasia (A-T) is a rare genetic neurodegenerative disease, caused by the lack of functional ATM kinase, a major actor of the Double Strand Break (DSB) DNA-damage response. A-T is characterized by cerebellar degeneration, which leads to severe, progressive neuromotor dysfunction, immunodeficiency, genomic instability and extreme sensitivity to ionizing radiation and DSB-inducing agents. We have recently identified ATM as a novel modulator in the Fas-induced apoptosis. ATM is a negative modulator of the levels of the antiapoptotic c-FLIP protein and promote the cell death. Recently TRAIL, another member of the TNF family has been proposed as a new potential new chemioterapic drug, able to induce apoptosis specifically in tumour cell lines but not show any toxic effects in normal cells. However, since about 60% of tumour cells are resistant to TRAIL induced apoptosis, several combined therapy approaches aimed to sensitize cells to TRAIL have been proposed. Several therapies with DNA damaging agents trigger a molecular mechanism not completely understood. The object of this project is to identify whether the ATM kinase activity plays a role in the ability of chemioterapic induced FLIP downregulation which in turn sensitize cancer cell lines to TRAIL.

Using A-T lymphoid cells we could show that ATM deficiency causes resistance to TRAIL induced apoptosis. A-T cells upregulate FLIP protein levels, and this is related to an increased resistance to TRAIL-induced apoptosis. Reconstitution of ATM kinase activity was sufficient to decrease FLIP levels and to restore TRAIL sensitivity. Using hepatocarcinoma cell lines resistant to TRAIL, we found that genetic and pharmacological inhibition of ATM kinase activity impaired FLIP downregulation by chemioterapic drug 5-FU, supporting the hypothesis that ATM kinase activity is required to modulate FLIP protein levels. Furthermore we could show that FLIP levels are specifically modulated by the proteasomal pathway depending on ATM kinase, which act directly on E3 ubiquitin ligase ITCH. We could show also that this mechanism is independent on the p53 state, which is mutated in many tumours.

Therefore, this work suggests a molecular mechanism by which 5-FU and other chemioterapic drug that triggers DNA damage, sensitize tumoural cell lines to TRAIL induced apoptosis and propose the utilization of this mechanism in a wide range of tumours, because of its independence of the state of p53, but on condition that the kinase activity of ATM is not compromised.

Therefore we propose that the activity of ATM kinase plays a crucial role in the setting of combined therapies based on TRAIL sensitization through DNA damaging agents. Furthermore we propose a molecular mechanism in which ATM might regulate the protein stability, involving the ubiquitin proteasome pathway, whose alteration may be critical in the AT pathology development.

INTRODUZIONE

LA CHINASI ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated)

Atassia Telangectasica

L'Atassia Telangectasica (A-T), o Sindrome di Louis-Bar, è una patologia neurodegenerativa che si presenta precocemente nell'infanzia ed appartiene ad un gruppo di malattie umane globalmente conosciute come: "Sindromi di instabilità genomica"; ciascuna di queste patologie è prodotta dalla risposta difettiva ad una specifica lesione del DNA. I difetti genetici riguardano specifici meccanismi di risoluzione di uno o più tipi di danno al DNA, e danno origine a sindromi caratterizzate da particolari combinazioni sintomatologiche di varia entità quali: degenerazione tissutale, ritardo nella crescita e nello sviluppo, invecchiamento precoce, instabilità cromosomica, sensibilità ai corrispettivi agenti di danno al DNA e predisposizione all'insorgenza di cancro. In aggiunta, altre disfunzioni caratterizzano questa malattia, tra cui immunodeficienza, atrofia del timo e delle gonadi, ed elevata predisposizione allo sviluppo di leucemie e linfomi.

I pazienti AT presentano movimenti non coordinati (atassia), spesso associati a dilatazione dei vasi sanguigni degli occhi (telangiectasia). La principale manifestazione neurologica dell'AT è una progressiva ed inesorabile degenerazione della corteccia cerebellare, con una marcata perdita delle cellule del Purkinje e dei granuli; caratteristiche dell'AT sono inoltre il danneggiamento del sistema del movimento extrapiramidale e una neuropatia periferica. L'AT è una malattia multisistemica, ma è in primo luogo una malattia neurodegenerativa. Mentre il difetto nella risposta al danno al DNA potrebbe spiegare la risposta cellulare difettosa alle rotture del DNA nelle cellule AT e diverse caratteristiche della malattia, è stato concettualmente difficile mettere in relazione ciò con il sintomo evidente dell'AT, la progressiva degenerazione neuronale (Biton S et al., 2006). Inoltre è presente un'estrema sensibilità alle radiazioni ionizzanti ed alle sostanze radiomimetiche che producono rotture a doppia elica nel DNA [*Double Strand Break (DSB)*] (McKinnon PJ, 2004). Questa patologia unisce la maggior parte delle caratteristiche di una risposta difettiva al danno al DNA, che individua chiaramente

nella rottura a doppia elica nel DNA, la lesione che provoca questi difetti. Infatti, cellule in coltura da pazienti AT mostrano una generale incapacità nel rispondere alle *DSBs* (Figura 1). L'identificazione del gene per ATM, la cui mutazione è causa della malattia, ha sostenuto una rapida progressione nella comprensione delle basi molecolari di questa malattia. Inoltre, le manifestazioni cliniche e fenotipo cellulare che è causato dalla perdita ATM, collocano chiaramente questa proteina al vertice della cascata di risposta alle *DSBs* (Savitsky K *et al.*, 1995; Shiloh Y, 2003).

L'AT è una patologia autosomica recessiva che può essere provocata da più di 400 distinte mutazioni nel gene ATM; consistono in piccole mutazioni, inserzioni e cambiamenti di un singolo nucleotide e spesso conducono a difetti di *splicing*. Circa l'85% di queste mutazioni determina la mancata espressione della proteina o l'espressione di forme tronche e non funzionali. In pochi casi i pazienti AT presentano livelli normali di proteina, ma in questi casi essa è difettiva nella sua attività enzimatica. Gli eterozigoti presentano invece un'espressione ridotta di ATM, indicando che entrambi gli alleli contribuiscono alla produzione della proteina. È stato inoltre osservato che nonostante i livelli di mRNA specifico siano spesso abbondanti nei pazienti AT, la proteina mutata è instabile e prontamente condotta alla degradazione (Teraoka SN *et al.*, 1999; Becker-Catania SG *et al.*, 2000).

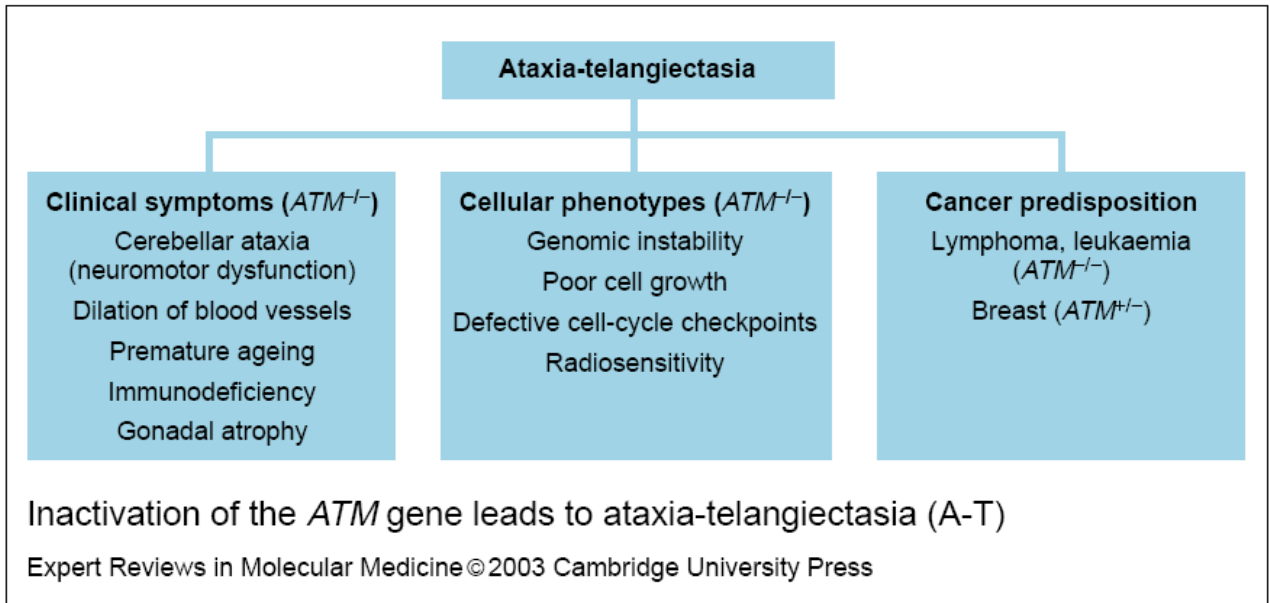


Figura 1. L'inattivazione del gene ATM porta all'Atassia Telangectasica. Sintomi clinici, fenotipo cellulare e predisposizione al cancro negli individui con mutazioni nel gene ATM (Pandita TK, 2003).

Struttura e funzione di ATM

Il gene ATM codifica una proteina di circa 370 kDa, che appartiene ad una famiglia di proteine conservate, la maggioranza delle quali possiede attività serina treonina chinasi. Tutte queste proteine contengono un motivo che è tipico delle fosfatidil inositolo 3-chinasi (PI3K), da cui sono state chiamate "*PI3K-like protein kinases*" (*PIKKs*); queste preferenzialmente fosforilano proteine piuttosto che lipidi (Shiloh Y, 2003).

Il dominio PI3K contiene il sito catalitico delle proteine chinasi attive della famiglia delle PIKKs. La proteina ATM è caratterizzata anche dalla presenza di altri domini strutturali: il dominio FAT, posto all'N-terminale del dominio chinasi, è conservato tra i membri della famiglia PIKK nelle proteine FRAP, ATR e TRRAP ed il dominio FATC, di 33 amminoacidi, posto al C-terminale della proteina. Recenti lavori dimostrano il ruolo cruciale di questi domini nella regolazione dell'attività catalitica di ATM (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003; Jiang X et al., 2006). Infatti, il dominio FAT contiene la serina 1981, sito che viene autofosforilato durante l'attivazione di ATM, consentendone così la dissociazione da omodimero inattivo a monomero attivo (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003). Il dominio FATC invece media l'interazione tra ATM e l'istone acetiltransferasi

Tip60, che ne regola l'attivazione in seguito a danno al DNA (Jiang X *et al.*, 2006). La funzione della grande regione N-terminale della proteina è invece pressoché sconosciuta, anche se è noto che una porzione è necessaria ad ATM per regolare la risposta cellulare al danno al DNA (Turenne GA *et al.*, 2001; Fernandes N *et al.*, 2005); essa contiene, infatti, siti di interazione con importanti substrati, quali p53, BRCA1 e c-Abl (Shafman T *et al.*, 1997; Khanna KK *et al.*, 1998; Gatei M *et al.*, 2000) (Figura 2).

Le proteine chinasi attive di questa famiglia, che risulta essere ampiamente conservata dai lieviti ai mammiferi, sono in grado di rispondere a vari tipi di stress mediante fosforilazione di proteine chiave nei corrispondenti pathway di risposta. Possono quindi interessare numerosi processi, dipendentemente dallo spettro dei loro substrati. Nei mammiferi quattro PIKKs sono coinvolte nella risposta al danno al DNA: la DNA *dependent protein kinase* (DNA-PK), ATM, ATR ed ATX. Mentre ATM e DNA-PK rispondono principalmente alle rotture a doppia elica del DNA, ATR ed ATX rispondono sia al danno da luce ultravioletta che rottura a doppia elica ed ATR anche al blocco delle forche di replicazione. mTOR/FRAP è invece l'unica chinasi attiva di questa famiglia che non è coinvolta nella risposta al danno al DNA; è invece implicata nella risposta alle variazioni dei livelli di nutrienti ed agli stimoli mitogeni, influenzando l'apparato tradizionale. (Shiloh Y, 2003).

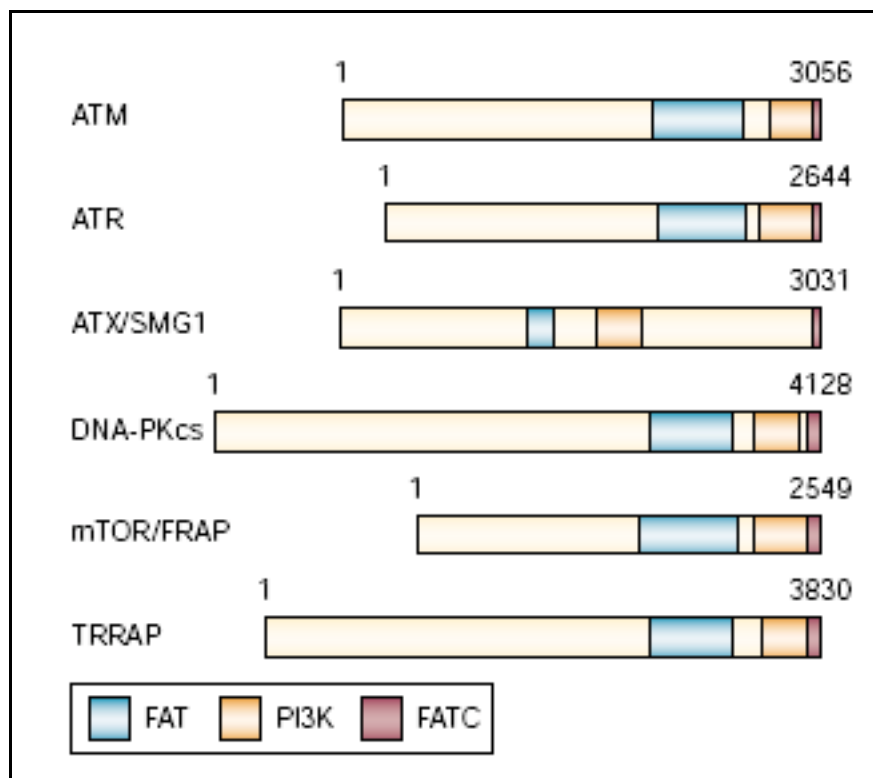


Figura 2. Dimensioni e motivi comuni nei membri della famiglia delle PIKK umane. Questa famiglia comprende sei proteine, le quali, eccetto TRRAP, hanno attività protein chinasi e mostrano tre motivi: il dominio FAT ed il dominio PI3K, che contiene il motivo fosfatidilinositolo-3 chinasi in cui è presente il sito catalitico nelle chinasi attive della famiglia (Shiloh Y., 2003).

La trasduzione del segnale attivata da danno al DNA

Le variazioni della sequenza del DNA germinale sono essenziali per il mantenimento di variabilità genetica. Cambiamenti nella sequenza di DNA nelle cellule somatiche sono invece di solito indesiderati e le cellule sono in possesso di rigorosi meccanismi di controllo contro tali modifiche. Alterazioni nella sequenza del DNA possono sorgere spontaneamente da cambiamenti nella chimica dei costituenti del DNA, da errori di replicazione e da danni inflitti al DNA. Il maggiore rischio per la stabilità del genoma proviene da agenti dannosi per il DNA, che possono essere endogeni (si formano durante il normale metabolismo cellulare) o provenienti dall'ambiente esterno. Agenti dannosi come ad esempio le radiazioni ionizzanti e sostanze chimiche reattive sono in grado di indurre numerose lesioni del DNA. Alcune di queste sono estremamente citotossiche se non riparate, mentre altre sono mutagene e possono influenzare la produzione, la struttura e la funzione delle proteine cellulari,

con conseguenze che vanno dal cattivo funzionamento della cellula alla trasformazione maligna. Non è sorprendente, quindi, che molti mutageni siano anche cancerogeni, e che vi sia un'elevata correlazione tra la loro cancerogenicità e la potenzialità mutagena. La risposta cellulare di base consiste nel tentare di riparare i danni, ma il tipo e la quantità dei danni potrebbero essere superiori alla capacità di risposta del macchinario di sopravvivenza e si avvia invece il processo di morte cellulare programmata (apoptosi). Il meccanismo di questa importante scelta tra un tentativo di sopravvivenza e la morte programmata non è ancora del tutto chiarito. I meccanismi di riparazione si possono suddividere in due principali categorie:

- Risposta a danno a singolo filamento.
- Risposta a danno a doppio filamento.

Alla prima categoria appartengono i seguenti meccanismi riparativi:

BER (*Base Excision Repair*): ha il compito di riparare il danno che coinvolge un singolo nucleotide.

NER (*Nucleotide Excision Repair*): ripara un danno che coinvolge da 2 a 30 nucleotidi.

MMR (*Mismatch Repair*): corregge errori di replicazione e ricombinazione genetica che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del DNA.

Alla seconda categoria appartengono i seguenti meccanismi riparativi:

NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*): capace di riunire due estremità tronche di DNA. Si tratta di un meccanismo *error prone* e per tale motivo spesso può portare a delezioni o mutazioni nella sequenza di DNA.

HR (*Homologous Recombination*): 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 (Figura 3).

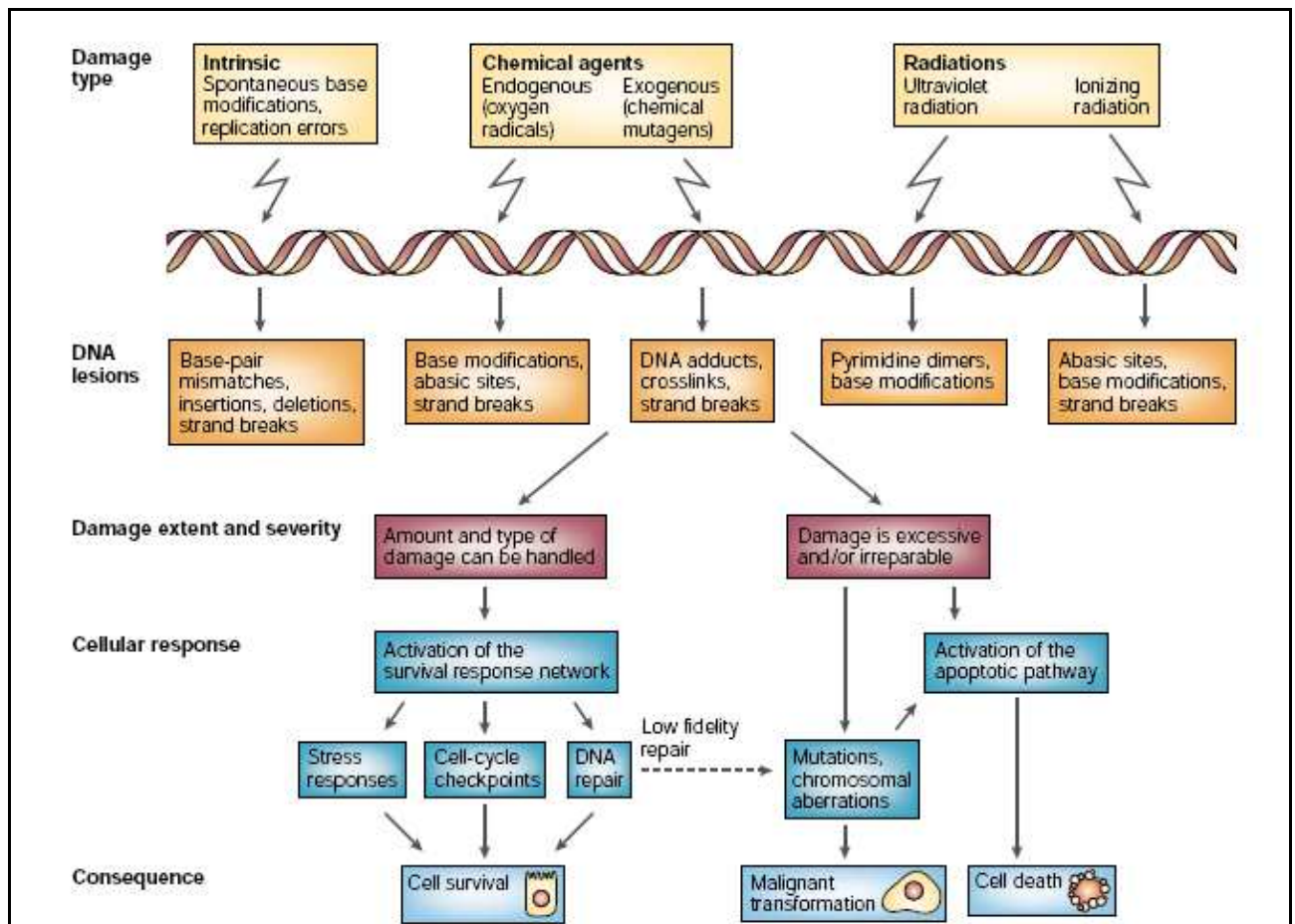


Figura 3. Risposte cellulari al danno al DNA. Tipi diversi di danno al DNA causano differenti tipi di lesioni e queste, a loro volta, vengono gestite dalla cellula in modo diverso. Il risultato può essere la sopravvivenza della cellula e la ripresa del normale ciclo vitale, la morte cellulare o la trasformazione tumorale. Il meccanismo di scelta tra il tentativo di sopravvivenza e la morte cellulare programmata non è completamente chiarito. La risposta di sopravvivenza è elaborata e comprende molte vie di segnalazione (Shiloh Y., 2003).

Modello di risposta alla rottura su doppio filamento (DSBs: Double Strand Brakes).

Le rotture a doppia elica del DNA si formano e vengono risaldate durante processi fisiologici, quali la ricombinazione meiotica e l'assemblaggio del *T-Cell receptor* e la ricombinazione *V(D)J* nei geni per le immunoglobuline, in cellule T e cellule B, rispettivamente. È lecito supporre che il meccanismo cellulare di riparo mantiene un costante e basso livello di attività, garantendo che l'apertura e il riparo di queste lesioni lasci la cellula integra. Quando le rotture a doppia elica sul genoma sono inflitte da agenti dannosi, come ad esempio i radicali liberi o di radiazioni ionizzanti, la

loro minaccia per la vita della cellula è sufficientemente grave da innescare, nel giro di pochi minuti, una rapida e decisiva risposta al danno al DNA. Recenti modelli raffigurano la risposta al danno al DNA attraverso vari passaggi. Secondo tali modelli, le rotture potrebbero essere rilevate prima da proteine sensore, che riconoscono la lesione stessa sul DNA, oppure alterazioni della cromatina conseguenti alla rottura del DNA. Le estremità rotte vengono quindi processate e, poiché la loro natura chimica è casuale, non possono servire direttamente come substrati per il meccanismo di riparo. Allora vengono messi in azione i trasduttori; questi sono in grado di trasmettere il segnale di danno agli effettori a valle. Grazie a questo sistema a staffetta di trasduttori ed effettori, un singolo trasduttore è in grado di influenzare in maniera rapida e diretta il funzionamento di diversi meccanismi di trasduzione del segnale. I trasduttori potrebbero anche essere coinvolti nell'assemblaggio del complesso di riparazione sul sito del danno sul DNA, poiché trasmissione del segnale e riparo della lesione probabilmente sono concomitanti e funzionalmente collegati.

Funzione di ATM nella risposta alla rottura a doppio filamento del DNA

Come accennato in precedenza, nel caso di rotture a doppia elica del DNA, il primo e principale trasduttore è ATM, che trasmette il messaggio attraverso la fosforilazione di proteine substrato. In particolare l'attività della chinasi ATM è indotta da DSB e modula l'arresto del ciclo cellulare ed il riparo o la risposta apoptotica nel caso in cui il danno sia molto esteso, così da prevenire la replicazione del DNA in presenza di DNA danneggiato (D'Amours D *et al.*, 2002; Shiloh Y, 2003). Il complesso MNR (Mre11-Rad50-Nbs1) è stato individuato come il mediatore essenziale per il reclutamento e l'attivazione di ATM a livello dei siti DSB (Lee JH and Paull TT, 2005). MRE-11 è una proteina capace di legarsi al DNA che possiede attività esonucleasica 3'-5' oltre ad un'attività endonucleasica rivolta alle forcelle di replicazione del DNA. Rad50 è un membro della famiglia SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) e forma omodimeri che si associano a due molecole MRE11 per formare complessi tetramericici MRE11-RAD50 denominati: "*MR complex*". I due bracci del complesso suddetto permettono al tetramero di inserirsi tra le estremità libere del DNA oppure tra i cromatidi fratelli. Il terzo componente del complesso MNR, NBS1, presenta una regione capace di legare direttamente ATM, ed è necessario per il reclutamento di ATM a livello

dei siti di danno (Lee HJ and Paull TT, 2005). Inoltre ATM colocalizza e fosforila rapidamente l'istone H2AX (γ -H2AX), a livello del residuo di Ser139, lo stesso residuo riconosciuto e fosforilato anche da altre due chinasi appartenenti alla famiglia delle PIKK's, ossia ATR e DNA-Pk (Rogakou EP et al., 1998). Tale fosforilazione recluta direttamente MDC1 (*Mediator of DNA-damage Checkpoint protein 1*), che amplifica la fosforilazione di H2AX, probabilmente tenendo legato a sé ATM, oppure agendo in modo da impedire la defosforilazione dell'istone (Stucki M and Jackson SP., 2006). MDC1 e H2AX permettono che sul sito di danno vengano reclutati altri fattori addizionali; in questo modo vengono coordinati i processi di formazione degli IRIF (*Ionizing Radiation-Induced Foci*). Tali formazioni sono "foci", rilevabili a livello del sito di taglio su doppio filamento indotti dall'azione di radiazioni ionizzanti (Andegeko Y et al., 2001). A livello degli IRIF, H2AX e MDC1 reclutano 53BP1 un mediatore che agisce durante la fase di ricombinazione e che recluta a sua volta CHK2 e p53, attivandole (Figura 4).

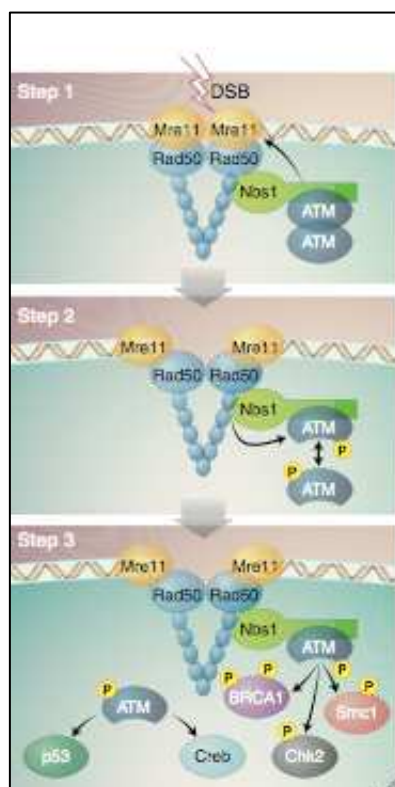


Figura 4: Step1 L'induzione di una lesione di tipo DSB sulla doppia elica di DNA comporta il repentino reclutamento del complesso MNR. Tale complesso forma un ponte tra le estremità libere del DNA tramite i bracci *coiled-coil* del dimero Rad50. I dimeri inattivi di ATM vengono reclutati a livello del DSB tramite l'interazione con la regione C-terminale di NBS1, in aggiunta all'interazione meno stabile con Rad50. **Step2** L'attività 3'-5' esonucleasica di MRE11 catalizza la reazione che porta alla formazione di ssDNA. A questo punto viene inviato il segnale di attivazione ai dimeri di ATM probabilmente tramite cambiamento conformazionale di NBS1. ATM si autofosforila in Ser1981 e da dimero passa alla forma di monomero attivo. Il complesso dovrebbe quindi promuovere un ulteriore cambiamento conformazionale di ATM che stimoli il reclutamento dei substrati. **Step3** Monomeri attivi di ATM rimangono sia vicino ai DSB's (dove fosforilano i substrati colocalizzati) sia si diffondono al di fuori dei siti DSB's per fosforilare i substrati nucleari come p53 e CREB. Tratto da (Abraham RT et al., 2004).

Funzioni di ATM alternative alla trasduzione del segnale attivata da danno al DNA

ATM aiuta la cellula a mantenere la propria stabilità genomica secondo un meccanismo diverso da quello promosso da danno al DNA. Negli ultimi anni si sono accumulate diverse prove riguardo alle funzioni fisiologiche svolte dalla chinasi ATM.

ATM sembra essere legata al controllo del mantenimento della lunghezza e dell'integrità dei telomeri. I telomeri sono delle strutture specializzate poste alle estremità dei cromosomi, che possiedono diverse funzioni tra le quali: salvaguardare l'integrità genomica, mantenere la capacità proliferativa cellulare e controllare l'attivazione dei *checkpoints* del ciclo cellulare. Pandita e colleghi (1996) riscontrarono che cellule derivanti da pazienti A-T sono caratterizzate da instabilità telomerica; frutto di tale instabilità sono le associazioni telomeriche, definite come *chromosome end-to-end association* che si osservano quando le cellule A-T entrano in metafase. Nelle cellule A-T è stato riscontrato inoltre un accorciamento delle sequenze telomeriche, anch'esso attribuito al mancato funzionamento della chinasi ATM (Pandita TK and Dhar S, 2000).

Nonostante numerosi lavori sostengano l'ipotesi che ATM sia una proteina prevalentemente nucleare, coinvolta nella trasduzione di segnali relativi al danno al DNA e che regolano il macchinario di controllo del ciclo cellulare, alcune pubblicazioni dimostrano che ATM è anche una proteina citosolica. In particolare, la quantificazione della quantità di proteina presente nei differenti compartimenti dopo frazionamento, dimostrano che circa il 20% della proteina è nei microsomi e l'80% nel nucleo; la conferma di tale localizzazione subcellulare si è avuta anche mediante colorazione specifica in microscopia elettronica (Watters D *et al.*, 1997). È stata osservata in alcuni tipi cellulari, una funzione citoplasmatica per ATM, in cui il trattamento con insulina ne attiva l'attività chinasi e stimola la fosforilazione della proteina di regolazione traduzionale 4E-BP1. Questa osservazione fornisce un potenziale collegamento per l'insulino-resistenza osservata nei pazienti con l'ataxia telangectasica (Yang DQ and Kastan MB, 2000). Inoltre, nel citoplasma, ATM localizza alle vescicole, interagendo con la β -adapina, uno dei componenti del complesso AP-2, che è coinvolto nell'endocitosi dei recettori mediata da clatrina. Questa interazione tra ATM e le proteine associate alle vescicole potrebbe svolgere un ruolo importante nella

regolazione delle vescicole stesse o nel trasporto di proteine nei neuroni. Disfunzioni in questi percorsi possono contribuire alla progressiva degenerazione cerebellare nei pazienti AT (Lim et al., 1998). Comprendere il ruolo di ATM nel sistema nervoso è fondamentale per la comprensione della malattia, ma ciò è rimasto in gran parte sfuggente. Le funzioni di ATM sono state studiate principalmente in colture di cellule proliferanti, in cui un ruolo importante della risposta al danno al DNA è quello di attivare il controllo del ciclo cellulare. In linea di principio, questi checkpoint non sono attivati nella fase post-mitotica delle cellule. È stato dimostrato che in un modello neuronale umano differenziato in coltura, in cui ATM è in prevalenza nucleare la risposta mediata da ATM alle DSBs è simile a quelle delle cellule in proliferazione. Inoltre, l'eliminazione di ATM in queste cellule non interferisce con il differenziamento neuronale, ma abolisce la risposta al danno al DNA, concludendo che ATM nucleare media la risposta alle DSB in maniera simile a quello delle cellule in proliferazione (Biton S et al., 2006).

Ma perché quindi una proteina importante per l'arresto del ciclo cellulare e per la riparazione del DNA è necessaria nel sistema nervoso? Una possibilità è che ATM agisca come un componente di vie che rilevano ed avviano la riparazione, o eliminano molecole danneggiate tra cui proteine, lipidi e il DNA. In questo contesto, si può prevedere un ruolo per ATM dopo il completamento dello sviluppo del cervello, quando la maggior parte delle cellule sono postmitotiche (e quindi non richiedono una funzione di controllo del ciclo cellulare), ma possono richiedere ATM per attivare riparazioni macromolecolari. Così, in sua assenza la riparazione non si verifica e, di conseguenza, le cellule potrebbero degenerare. Un sostegno a favore di questa ipotesi viene da alcuni lavori che evidenziano danni a proteine e lipidi, indotti da radicali liberi (Barlow C et al. 1999) o una minore capacità di sopravvivenza e funzionalità in seguito a stress ossidativo in topi *Atm* ^{-/-} (Chen P et al., 2003). Un'altra possibilità è che, durante lo sviluppo, ATM funzioni come una molecola che, direttamente o indirettamente attivi il controllo del ciclo cellulare o la riparazione in precursori neurali in proliferazione. In questo scenario, l'assenza di ATM può provocare l'accumulo di alterazioni genetiche in precursori neuronali in a mitosi prima di formare cellule mature all'interno del cervello. Tali anomalie potrebbero manifestarsi più tardi come neurodegenerazione (Allen DM et al., 2001). In alcuni tessuti postmitotici neuronali è stato anche osservato che ATM è in prevalenza citoplasmatica. Questi risultati suggeriscono che ATM potrebbe avere un

ulteriore ruolo nel differenziamento neuronale e la sopravvivenza cellulare e che la sua assenza possa portare ad anomalie negli organelli citoplasmatici come riflesso un aumento del numero dei lisosomi (Oka A and Takashima S, 1998; Barlow C et al., 2000).

Infine, in una pubblicazione di Wu ZH è stato dimostrato che ATM può traslocare nel citosol in seguito alla fosforilazione e legarsi alla proteina NEMO, una subunità regolatoria del complesso IKK che svolge un ruolo centrale nella regolazione fattore di trascrizione NF-kappaB (Wu ZH et al., 2006). Sebbene il ruolo della chinasi ATM nel citosol rimanga poco chiara, la comprensione di questa funzione potrebbe aiutare a spiegare come mutazioni del gene ATM possano causare molteplici effetti nel fenotipo AT. Infatti, un ruolo di ATM nella segnalazione intracellulare e nel citosol è stato suggerito da diversi cambiamenti fenotipici osservati in cellule AT, come ad esempio l'alto livello di fattori di crescita necessari per la proliferazione cellulare (Shiloh Y et al., 1982), l'insulino-resistenza in pazienti AT (Bar RS et al., 1978), e l'alterata regolazione dei livelli di actina citoscheletrica nelle cellule AT (McKinnon PJ and Burgoyne LA, 1985). Inoltre, un accumulo vescicole lipidiche citoplasmatiche e un aumento del numero di lisosomi in cellule di pazienti AT è stato osservato mediante microscopia elettronica (Schoonderwaldt H et al., 1973), suggerendo un alterato metabolismo lipidico o un'alterata attività enzimatica lisosomiale. Così, sebbene ATM sia attivato in modo maggiormente efficace da radiazioni e agenti radiomimetici, le grandi dimensioni della proteina e le sue molteplici localizzazioni subcellulari suggeriscono che esso possa avere più di una funzione (Kurz EU and Lees-Miller SP, 2004).

Attivazione di ATM

ATM si trova prevalentemente nel nucleo delle cellule in divisione e risponde rapidamente alle DSBs fosforilando numerosi substrati. Il segno distintivo della risposta di ATM è un rapido aumento della sua attività chinasi immediatamente successivo alla formazione delle DSBs. Evidenze sperimentali indicano che l'attivazione di ATM può comportare l'autofosforilazione. Un grande passo avanti nella comprensione di questo processo è derivato pubblicazione di Bakkenist e Kastan (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003), che hanno riferito che le molecole di ATM sono inattive in cellule integre e sono mantenute in questa condizione come dimeri o multimeri di ordine

superiore. In questa configurazione, il dominio chinasi di ogni molecola è bloccato dal dominio FAT degli altri (Figura 5). In seguito al danno al DNA, ogni molecola ATM fosforila le altre in un residuo di serina in posizione 1981 all'interno del dominio FAT; questa fosforilazione rilascia le due molecole di monomeri pienamente attivi. Pochi minuti dopo lo sviluppo di un numero esiguo di lesioni di tipo DSB, si attiva la maggior parte delle molecole di ATM.

Meccanismo di attivazione di ATM

Ci sono diverse ipotesi riguardo il meccanismo molecolare attraverso cui viene attivato ATM in seguito a danno al DNA. Bakkenist e Kastan forniscono la prova che il segnale di attivazione per ATM potrebbe essere la modifica della cromatina piuttosto che il contatto diretto di ATM con le rotture del DNA (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003). Mentre non è ancora chiaro se sia la rottura del doppio filamento di DNA di per sé o il cambiamento conformazionale della cromatina derivante dalla rottura ad avviare il processo di attivazione di ATM, meglio descritti sono altri eventi connessi con questo processo. NBS1 (un componente del complesso Mre11) è convenzionalmente ritenuto essere un substrato a valle di ATM. Tuttavia recenti studi suggeriscono che NBS1/MRN potrebbe funzione a monte di ATM, reclutando ATM in prossimità della sede del danno al DNA ed attivandone la sua funzione enzimatica (Uziel T et al., 2003). In aggiunta al reclutamento al complesso Mre11, per l'attivazione ATM sono inoltre necessarie una serie di modifiche post-traduzionali. Come accennato in precedenza, Bakkenist e Kastan hanno dimostrato che la fosforilazione in serina 1981 su ATM svolge un ruolo importante nella sua attivazione (Bakkenist CJ and Kastan MG, 2003). Vi è anche la prova che la defosforilazione di ATM influenza la sua attività enzimatica. Goodarzi (Goodarzi AA et al., 2004) ha dimostrato che l'acido ocadaico, inibitore delle protein fosfatasi, induce l'autofosforilazione della serina 1981 di ATM in cellule non irradiate, a concentrazioni che inibiscono l'attività in vitro della proteina fosfatasi 2A (PP2A). Inoltre risulta che la subunità catalitica e *scaffolding* del PP2A co-immunoprecipita con ATM in cellule irradiate, mentre è dissociato dal complesso dopo l'irradiazione. Questi risultati suggeriscono che PP2A associa con ATM in cellule non danneggiate mantenendolo in uno stato inattivo.

Inoltre Sun Y (Sun Y *et al.*, 2005) ha suggerito un ruolo diretto per l'istone acetiltransferasi TIP60 nell'attivazione di ATM in risposta al danno al DNA. ATM in cellule non stressate sembra essere associato attraverso il dominio FATC con TIP60. In seguito a danno al DNA, TIP60 è attivato ed acetila direttamente ATM; questo evento correlato con l'attivazione della chinasi.

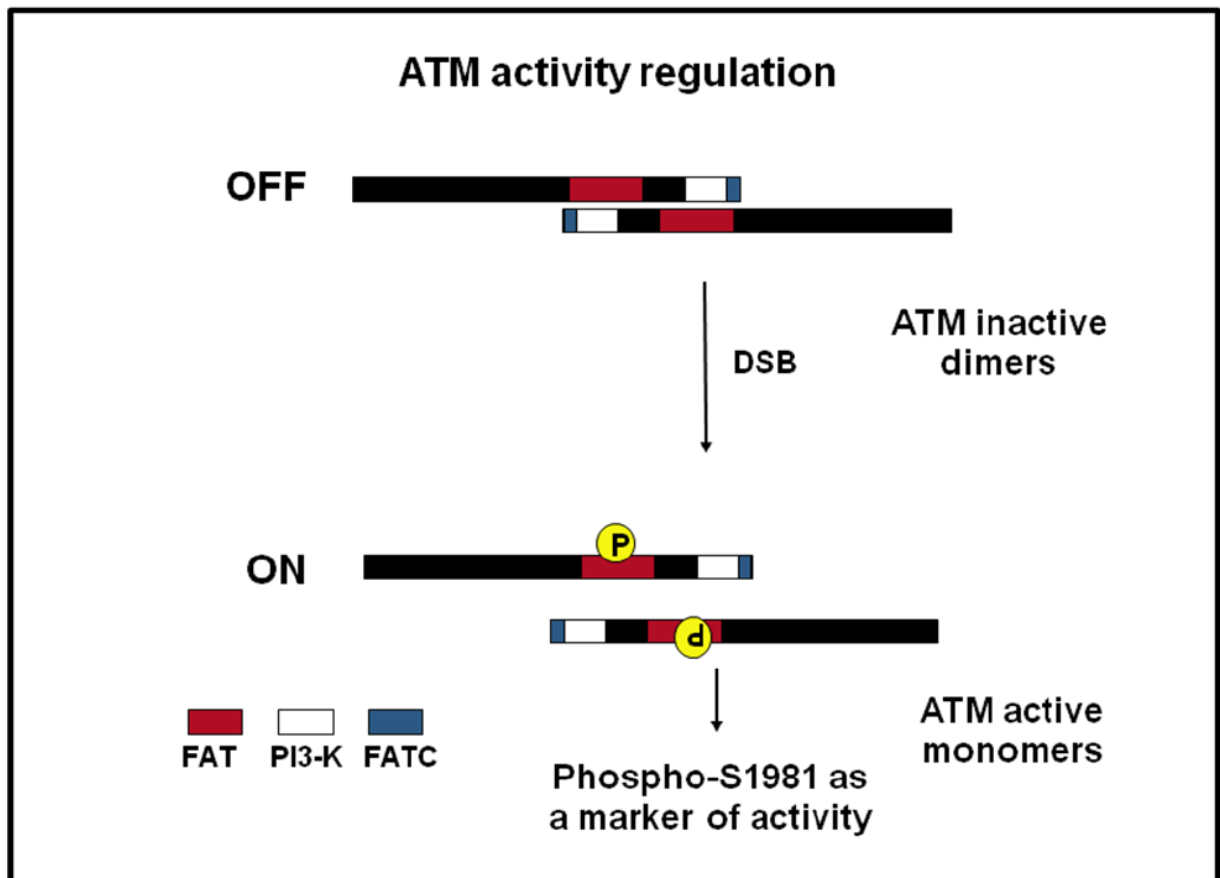


Figura 5. Modello di attivazione di ATM In cellule non danneggiate, la chinasi ATM forma dimeri inattivi, distribuiti in tutto il nucleo. Il dominio "FAT" di un ATM interagisce con il dominio chinasi di un altro; questo probabilmente blocca ATM in uno stato in cui non è in grado di interagire e fosforilare le proteine bersaglio. Lo sviluppo di rotture a doppio filamento di DNA (DSBs) da radiazioni ionizzanti causa modifiche intermolecolari tra i dimeri di ATM che conducono alla loro attivazione. Le due proteine ATM unite si fosforilano reciprocamente in serina 1981 formando monomeri attivi. Questa fosforilazione quindi è considerata un indicatore dell'attività di ATM (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003).

Principali substrati di ATM

La fosforilazione ATM-mediata o incrementa o reprime l'attività dei suoi substrati, interessando così specifici processi in cui queste proteine sono coinvolte. Simile ad altre PIKKs attive (con l'eccezione di mTOR / FRAP), ATM ha come bersaglio residui di serina o treonina seguita da glutammina (il motivo "SQ/TQ") (Traven A and Heierhorst J, 2005). Conoscenza dei substrati di una protein chinasi è essenziale per la comprensione delle sue funzioni biologiche. Così, quando ATM è stata identificata come membro della famiglia delle PIKK, in grado di fosforilare una varietà di substrati coinvolti nella segnalazione di rotture del DNA a doppio filamento, è stato evidente il ruolo chiave nel controllo del ciclo cellulare, nel riparo del DNA e nell'apoptosi (Shiloh Y, 2003). Uno dei primi processi che iniziano dopo DSBs è la massiva fosforilazione di una variante di una proteina istonica chiamata H2AX (Redon C et al., 2002). Foci fosforilati di H2AX sono rapidamente formati presso i siti di danno al DNA e sono ritenute essenziali per l'ulteriore reclutamento di fattori di riparazione, come ad esempio il complesso MRN. La fosforilazione di H2AX è un evento molto precoce nella cascata indotta da DSBs ed è riportato come dipendente da ATM, conseguente alla sua attivazione dopo DSB (Burma S *et al.*, 2001). Questo processo potrebbe dunque servire come un rapido e potente meccanismo per amplificare il segnale di danno tramite ripetute cicli di fosforilazione di H2AX e conseguente reclutamento di fattori di risposta.

Un altro importante substrato di ATM dopo danno al DNA è p53. Le cellule AT sono difettive in tutti i checkpoint del ciclo cellulare (Beamish H and Lavin MF, 1994). ATM svolge un complesso ruolo di regolazione del checkpoint G1/S, S e G2/M, fosforilando direttamente substrati o attivando altre chinasi per fare questo e garantendo il rigido mantenimento di dei checkpoint mediante un controllo a più livelli. Ciò è dimostrato per il checkpoint G1/S. Quando Kastan et al. (Kastan MB et al., 1992) hanno dimostrato un difetto nella stabilizzazione di p53 in risposta all'esposizione alle radiazioni, p53 è emerso come un mediatore di cruciale importanza nel checkpoint G1/S. Gli stessi in precedenza avevano dimostrato che le radiazioni esercitano la loro influenza sul checkpoint G1/S, ritardando il passaggio delle cellule alla fase S, al fine di facilitare la riparazione del DNA (Kastan MB et al., 1991). È noto ormai che ATM fosforila p53 sulla serina 15 ed è responsabile di altre fosforilazioni di p53 che contribuiscono all'efficienza della sua attivazione trascrizionale (Banin S et al., 1998),

responsabile dell'attivazione del checkpoint G1/S o dell'induzione dell'apoptosi (Lavin MF and Gueven N, 2006). ATM fosforila ed attiva anche CHK2, una chinasi checkpoint che fosforila p53 in serina 20 (Bartek J et al., 2001). Ciò interferisce con l'interazione p53-MDM2. La proteina oncogenica MDM2 è un inibitore diretto ed indiretto di p53, poiché agisce da ubiquitina ligasi su p53, mediandone la sua degradazione attraverso il proteasoma. ATM fosforila anche direttamente MDM2 in serina 395, interferendo con l'esportazione nucleare del complesso p53-MDM2 e, di conseguenza, con la degradazione di p53 (Khosravi R et al., 1999). Inoltre, è stato riferito che la fosforilazione di p53 in serina 46, importante per attivare il programma apoptotico, in seguito a radiazioni ionizzanti è regolata da ATM, il quale agisce come regolatore della proteina HIPK2 (Rinaldo C et al., 2007; Dauth I et al., 2007). Questa serie di modifiche dipendenti da ATM che attivano e stabilizzano p53, illustrano, anche se forse non completamente, l'elaborato modo in cui ATM gestisce un unico effettore, e indica che potrebbe regolare effettori diversi all'interno della stessa via di trasduzione del segnale.

La maggior parte di queste vie di trasduzione non sono state completamente caratterizzate ed il coinvolgimento dei substrati di ATM in esse è stato dedotto semplicemente dalla mancata attivazione di specifici checkpoint in seguito all'abolizione della fosforilazione ATM mediata di queste proteine. È possibile che tali proteine abbiano un duplice ruolo nei processi a monte ed a valle di ATM. Come accennato in precedenza, questo è il caso di NBS1: da un lato, si tratta di un componente del complesso MRN che è ritenuto essere coinvolto nella risposta iniziale del DSB; dall'altro lato, si tratta di un effettore a valle di ATM, in una via di controllo. Così l'emergente complessità dei rapporti tra ATM ed i suoi substrati sta disegnando nuovi complessi schemi di risposta al danno al DNA, che si discostano da quelli tradizionali, più lineari ed assegnano a diverse proteine più del ruolo 'a monte' o 'a valle' in questo schema (Figura 6).

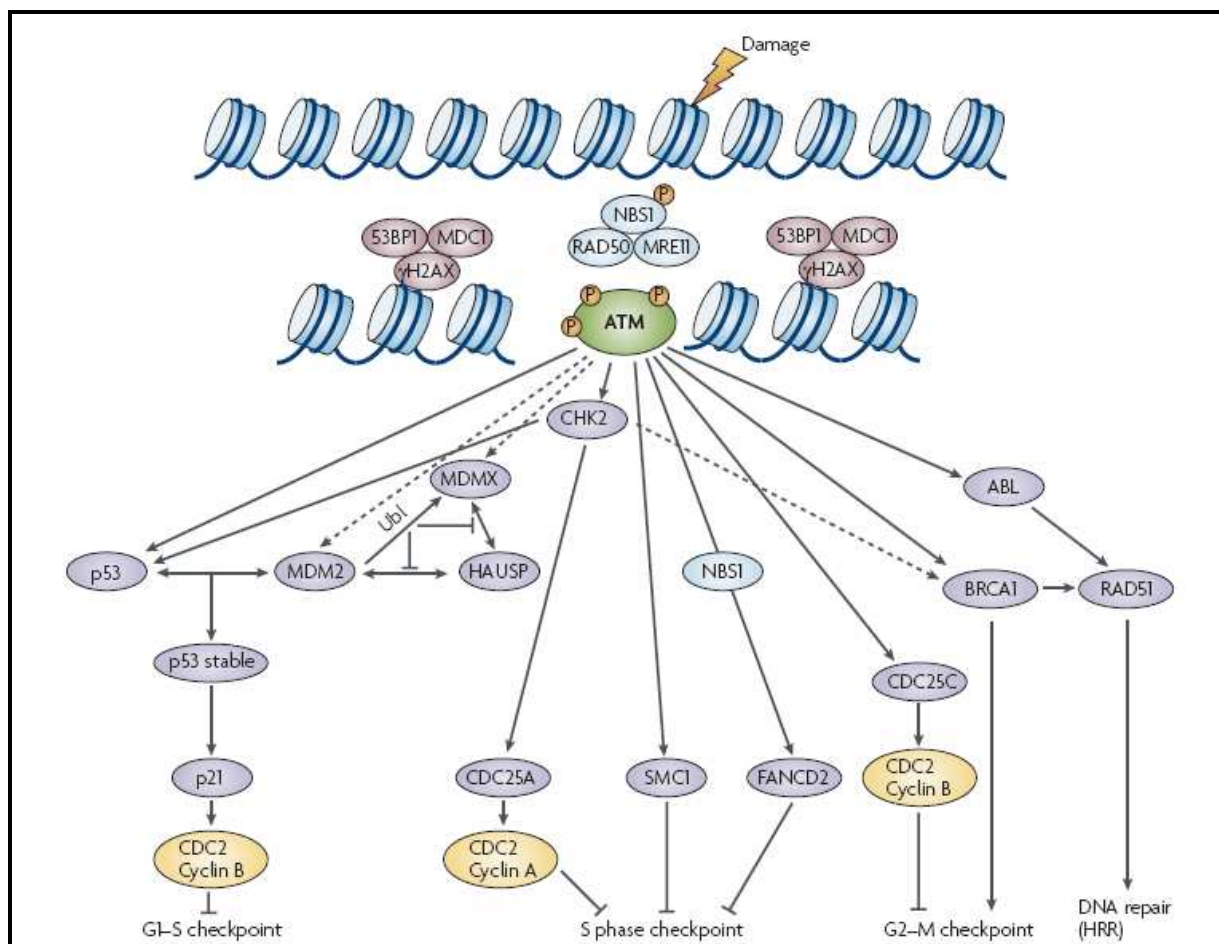


Figura 6. Rete di risposta di ATM in seguito a DSB (Lavin MF., 2008).

Approccio proteomico all'identificazione dei substrati di ATM

L'identificazione dei componenti a valle della rete di segnalazione ATM fornisce un necessario punto di partenza per studi funzionali e per stimolare la comprensione approfondita di malattie come l'ataxia telangiectasica, nonché il mancato controllo del ciclo cellulare nel cancro, un evento precoce nella progressione dei tumori. L'elenco dei substrati di ATM pubblicati è ben lungi dall'essere completo, e molte risposte dipendenti da ATM probabilmente coinvolgono substrati di ATM attualmente sconosciuti. La chiave per comprendere le reti delle chinasi è l'identificazione dei substrati in vivo; sono disponibili alcune metodiche per individuare tali substrati delle proteine chinasi in modo univoco, sebbene tale identificazione sia un impegno complesso. Sebbene sono emerse varie tecniche per individuare proteine fosforilate e substrati delle chinasi (Ptacek LJ et al., 2005; Dephoure N et al., 2005), poche hanno

dato conferma in vivo come siti di fosforilazione. Tuttavia recentemente diversi gruppi hanno fatto un'analisi proteomica su larga scala di proteine fosforilate dalle chinasi ATM. Mu et al. (Mu JJ et al., 2007) hanno analizzato i potenziali substrati di ATM ed ATR utilizzando anticorpi fosfospecifici che riconoscono motivi pS/T-Q, conosciuti come substrati noti di ATM e ATR, così da immunoprecipitare potenziali nuovi substrati. Le proteine che reagiscono con gli anticorpi fosfospecifici in risposta a danno al DNA, sono stati identificati mediante spettrometria di massa e il sottoinsieme dei potenziali substrati fosforilabili da parte di ATM ed ATR è stato validato *in vivo*. È interessante osservare che utilizzando questo approccio sono state identificate diverse proteine che appartengono al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) che sono necessarie nei mammiferi per meccanismo di controllo dei danni al DNA, rivelando l'ubiquitinazione come un importante meccanismo di regolazione a valle di ATM ed ATR per l'attivazione di punti di controllo. Inoltre recentemente Matsuoka et al. (Matsuoka S et al., 2007) eseguito hanno eseguito un'analisi proteomica su vasta scala di proteine fosforilate in risposta al danno al DNA su siti consenso riconosciuti da ATM e ATR ed hanno identificato più di 900 siti di fosforilazione che riguardano più di 700 proteine. Le proteine che sono state identificate dagli autori sono state classificate mediante analisi ontologica (Figura 7). L'analisi funzionale di questi dati ha indicato che le proteine identificate sono in prevalenza coinvolte nella risposta al danno al DNA. È interessante osservare però che sono state individuate anche un numero cospicuo di proteine e di reti non precedentemente collegati alla risposta al danno al DNA. Queste informazioni delineano uno scenario molto più ampio rispetto a quello precedentemente stimato ed aprono nuove prospettive di indagine sulle risposte al danno al DNA nei mammiferi.

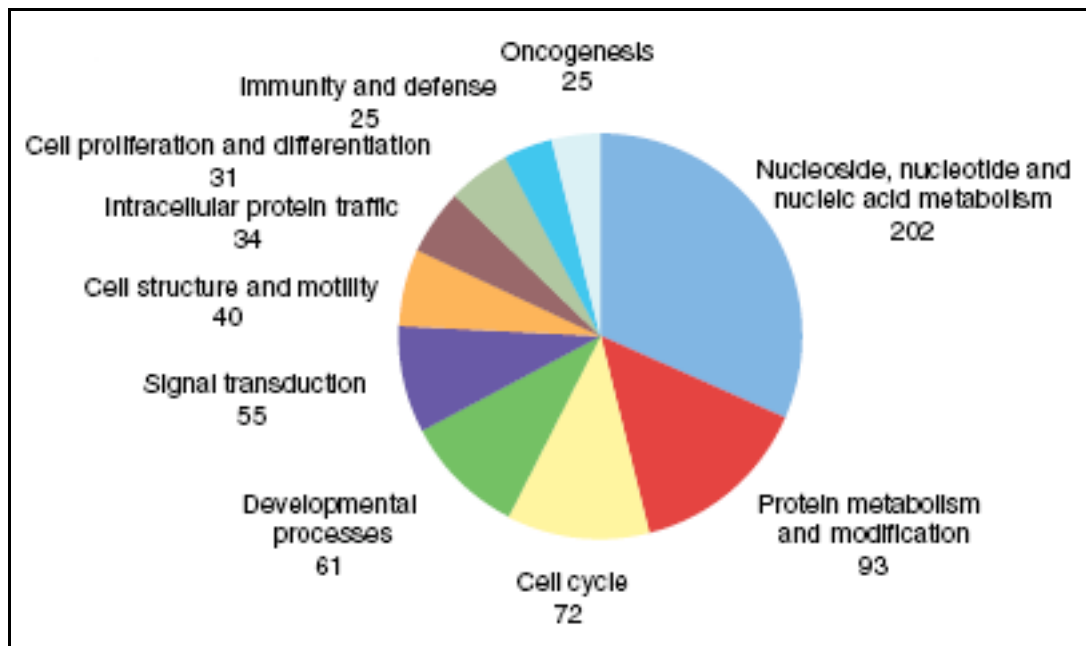


Figura 7. Analisi genetica ontologica dei possibili substrati, effettuata con il programma PANTHER. Delle 700 proteine identificate, 421 sono state associate con 769 processi biologici. Le proteine per le quali non è stato possibile assegnare un processo biologico sono state omesse da questo grafico. vengono visualizzate le categorie a cui sono state assegnate più di 20 proteine (Matsuoka S et al., 2007).

ATM nel sistema immunitario

Come le altre sindromi di instabilità genomica, l'A-T è una disfunzione predisponente al cancro. La maggiore suscettibilità al cancro nei pazienti AT è associata all'assenza della risposta ai danni al DNA, che si traduce nell'instabilità genomica (Shiloh Y, 2003; Khanna KK and Jackson SP, 2001). Tuttavia, nonostante il sistema nervoso sia fortemente interessato nell'AT, i tumori che si riscontrano in questa sindrome sono principalmente linfomi e leucemie (Gumy-Pause F et al., 2004; Taylor AM et al., 1996). Questa caratteristica clinica è in accordo con il ruolo centrale di ATM nella gestione delle DSBs generate durante lo sviluppo del sistema immunitario (Matei RE et al., 2006; Starczynski J et al., 2003). Il controllo dei danni al DNA ed il controllo del riparo delle rotture a doppia elica del DNA (DSBs) sono necessarie per preservare l'integrità del genoma durante la ricombinazione V(D)J, un processo necessario per riorganizzare segmenti dei geni delle cellule B e del recettore delle cellule T (TCR). Sebbene responsabile dell'enorme diversità del sistema immunitario, la rottura dei

cromosomi e la ricongiunzione durante la ricombinazione V(D)J contribuisce alla trasformazione oncogenica nel contesto di un controllo difettivo nel riparo dei danni al DNA. Le rotture a doppia elica del DNA sono tra le più pericolose lesioni che una cellula può subire, e la presenza di uno o pochi DSB non riparati può essere sufficiente ad innescare l'apoptosi (Guidos CJ et al., 1996). Errori nella riparazione delle rotture possono portare ad aberrazioni cromosomiche strutturali e possono promuovere l'oncogenesi. Le proteine che monitorano il danno al DNA possono avviare la cellula all'arresto del ciclo e alla riparazione del DNA. In alternativa, se il danno non è riparabile, l'attivazione della via apoptotica limita la propagazione dei cromosomi danneggiati. Così, difetti nelle proteine coinvolte nella ricongiunzione dopo rotture indotte dalla ricombinazione V(D)J preclude la generazione di recettori per gli antigeni, compromettendo profondamente lo sviluppo di cellule B e T e provocando gravi carenze immunitarie. È interessante notare che le mutazioni che colpiscono la risposta al danno al DNA portano ad un maggiore aumento di incidenza di leucemie e linfomi rispetto ad altri tumori, suggerendo che i linfociti in via di sviluppo siano particolarmente vulnerabili alle conseguenze oncogeniche di tali mutazioni. (Revy P et al., 2005). In particolare, topi che non esprimono ATM mostrano una sorprendente predisposizione a neoplasie linfoidi ed in particolare linfomi del timo, in seguito ai quali muoiono nel primo anno d'età (Shiloh Y, 2001; Shiloh Y and Kastan MB., 2001).

Ruolo di ATM nella tumorigenesi

Il mantenimento dell'integrità genomica è fondamentale per prevenire l'insorgere di una neoplasia. In quest'ottica, un efficiente apparato di risposta al danno al DNA è da considerarsi come una barriera inducibile contro la progressione tumorale. Questo meccanismo di risposta regolato da ATM è stato osservato principalmente nel contrastare la progressione tumorale negli stadi precoci di sviluppo. Infatti, in diversi campioni clinici di tessuti provenienti da varie fasi di tumori umani della vescica urinaria, della mammella, del polmone e del colon, già le prime lesioni precursori pre-tumoral (ma non i tessuti normali), esprimono i marcatori di una attiva risposta al danno al DNA. Questi includono la fosforilazione della chinasi ATM e Chk2, e la fosforilazione dell'istone H2AX e di p53. Simili risposte sono state indotte in cellule in coltura mediante

l'espressione di differenti oncogeni che deregolano la replicazione del DNA. È stato quindi postulato che già nelle fasi precoci della tumorigenesi (prima dell'instabilità genomica e della conversione in tumore maligno), le cellule attivano una rete di risposta al danno al DNA che ritardi o impedisca la progressione tumorale. Le mutazioni che compromettono questo controllo, tra cui i difetti della via di ATM-Chk2-p53, potrebbero consentire la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, una maggiore instabilità genomica e la conseguente progressione del tumore (Bartkova J et al., 2005; Bartek J et al., 2007).

Una grande parte della letteratura sulle mutazioni del gene ATM e il cancro tratta degli eterozigoti portatori di mutazioni AT. Per più di due decenni, ATM ha suscitato l'interesse degli epidemiologi a causa delle osservazioni della predisposizione del cancro tra i portatori eterozigoti di mutazione AT. Questi studi hanno evidenziato un'elevata incidenza di tumori maligni, in particolare del cancro al seno, tra i membri sani delle famiglie con un paziente AT (Khanna KK, 2000). Considerando la stima del 1-2% della frequenza di portatori di una mutazione AT nella popolazione generale, questa osservazione ha importanti implicazioni per la salute pubblica. Le mutazioni AT portano, nella maggior parte dei casi, a prodotti proteici incompleti ed instabili; questi alleli quindi non riescono affatto a produrre ATM. I portatori di tali mutazioni hanno quindi un livello ridotto di proteina ATM funzionale. Altre mutazioni AT portano a sostituzioni amminoacidiche (mutazioni missenso) o delezioni *in frame*, che producono una proteina cataliticamente inattiva. Nelle cellule dei portatori di queste mutazioni si osservano sia molecole di ATM funzionali sia inattive, in vari rapporti. Un meticoloso studio dei tipi di mutazioni di ATM nelle famiglie AT, con alta incidenza di tumori ha rivelato un'alta frequenza di mutazioni missenso (Stankovic T *et al.*, 1998). L'importanza delle mutazioni missenso nella predisposizione al cancro nei portatori di mutazione AT, può essere spiegato con l'effetto di dominante negativo della forma inattiva della proteina, che porta ad una riduzione della funzione di ATM.

Ulteriori elementi di prova dell'importanza delle mutazioni missenso di ATM che causano alterazioni genomiche è venuto dalla ricerca di mutazioni somatiche di ATM in tumori umani sporadici. In particolare le alterazioni del gene ATM, e soprattutto mutazioni missenso, sono stati riscontrate frequentemente nelle neoplasie linfoidi degli adulti (Gumy-Pause F et al., 2004). La perdita di eterozigosi in 11q22-23 (dove è

localizzato il gene ATM) è un evento frequente nei tumori linfoidei sporadici e numerosi studi hanno segnalato una netta prevalenza di alterazioni del gene ATM in diverse malattie linfoproliferative, aggiungendo elementi di prova all'ipotesi di un contributo di ATM nella patogenesi di questi tumori (Bullrich F, 1999; Stankovic T, 1999; Camacho E, 2002).

Più di recente sono state esaminate alterazioni del gene ATM nelle leucemie acute dell'infanzia e nei linfomi di Hodgkin. Sono state riscontrate frequentemente varianti missenso di ATM nella linea germinale (Gumy Pause F et al., 2003; Liberzon E et al., 2004) e due studi hanno dimostrato che alcune delle varianti si sono rilevate patogeniche, codificando una proteina funzionalmente anomala. Esaminando geni di ATM in bambini con HD per cercare singoli polimorfismi nucleotidici (SNP), è stata trovata una correlazione con specifiche mutazioni ed un fattore di rischio genetico per i linfomi di Hodgkin pediatrici (Takagi M et al., 2004; Oguchi K et al., 2003). Questi risultati suggeriscono che ATM possa essere anche coinvolto nella patogenesi delle neoplasie linfoidei infantili. Queste osservazioni inoltre sembrano riconciliare il dibattito sul ruolo delle mutazioni ATM nella predisposizione genetica al cancro (Khanna KK, 2000; Stankovic T et al., 1998; Gatti RA et al., 1999), e collocano il gene che codifica per la proteina ATM nell'elenco dei geni che sono coinvolti nella insorgenza del cancro nella popolazione generale.

L'APOPTOSI INDOTTA DA RECETTORE DI MORTE: LA VIA DI TRAIL

L'apoptosi

Gli organismi multicellulari spesso hanno bisogno di liberarsi di cellule che sono in eccesso, o potenzialmente pericolose. A tal fine, essi utilizzano un programma molecolare specificamente dedicato, importante quanto la divisione cellulare e la migrazione delle cellule, che consente all'organismo di controllare strettamente l'omeostasi di cellule e l'estensione dei tessuti (Hengartner MO, 2000). Vari scienziati nel corso degli ultimi due secoli hanno osservato questo fenomeno ed *apoptosi*, coniato da Currie e colleghi nel 1972 (Kerr JF et al., 1972) è il termine definitivamente adottato. La maggior parte dei cambiamenti morfologici che sono stati osservati da Kerr et al. sono causati da un gruppo di cisteina proteasi che sono attivate in particolare nelle cellule apoptotiche. Queste proteasi di morte sono tra loro omologhe, e fanno parte di

una grande famiglia di proteine, note come caspasi (Alnemri ES, 1997).Le caspasi sono altamente conservate attraverso l'evoluzione e si ritrovano dai mammiferi fino agli insetti ed ai nematodi. Nell'uomo sono state individuate più di una dozzina di caspasi e circa i due terzi di questi sono state associate a funzioni apoptotiche (Thornberry NA, 1998).

Le cellule che stanno andando incontro a morte per apoptosi mostrano una serie di caratteristiche morfologiche che sono conseguenza più o meno diretta dell'attività delle caspasi. Si osserva quindi dapprima un cambiamento nella forma della cellula, che diventa circolare a causa della digestione del citoscheletro ad opera delle caspasi. La cromatina si degrada e si condensa, addensandosi verso la membrana nucleare la quale andrà incontro essa stessa a degradazione a causa della digestione della lamina nucleare. La membrana nucleare ormai discontinua conterrà al suo interno il DNA frammentato, fino a formare dei corpi discreti di cromatina o unità nucleosomali. La membrana plasmatica si frammenta in corpi apoptotici, che vengono in seguito fagocitati.

Questa trasformazione facilmente visualizzabile è accompagnata da una serie di cambiamenti biochimici, come l'esternalizzazione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare e l'attivazione della cascata proteolitica delle caspasi (Hengartner MO, 2000) (Figura 8).

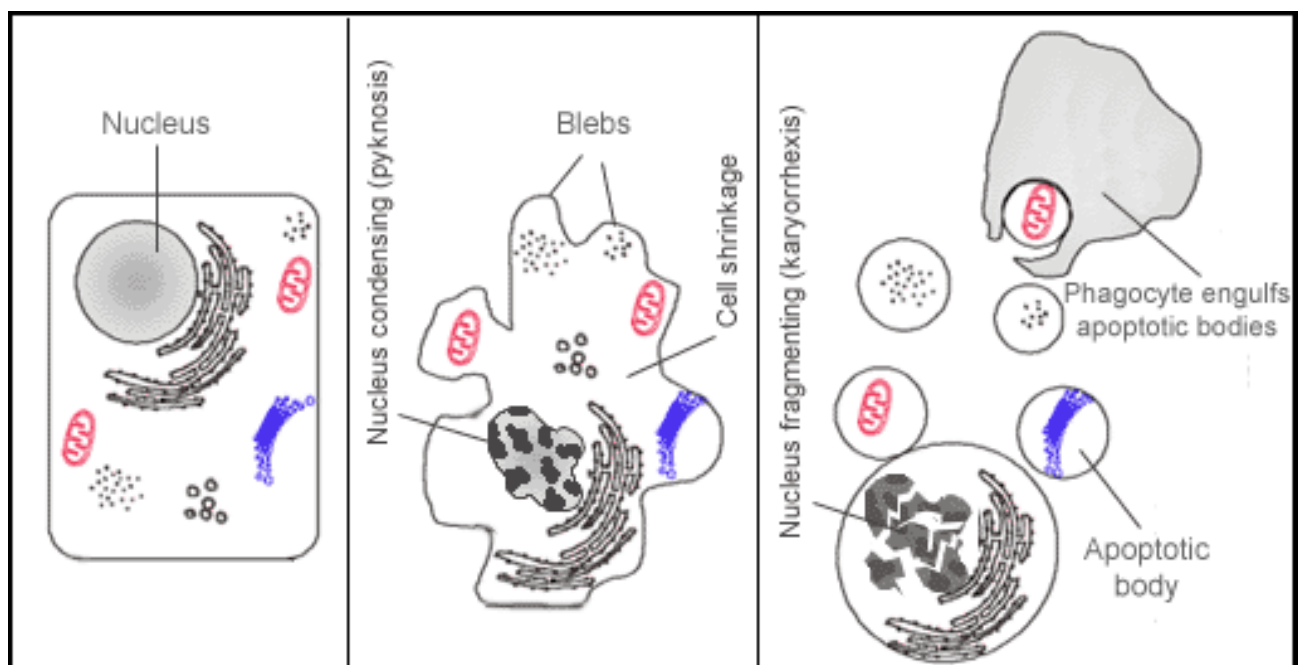


Figura 8. Evoluzione morfologica di una cellula in apoptosi (Nagata S, 2000)

L'apoptosi può essere attivata essenzialmente attraverso due vie distinte: la via intrinseca e la via estrinseca. In entrambi i casi le caspasi effettrici attivate a valle sono responsabili di tutti i cambiamenti biochimici e morfologici osservati durante l'apoptosi (Figura 9). Danni irreparabili al genoma, causati da agenti mutageni quali prodotti farmaceutici o radiazioni ionizzanti, attivano la via intrinseca, in cui i mitocondri rilasciano il citocromo c ed inizia l'assemblaggio dell'apoptosoma. Apaf-1, una proteina citoplasmatica oligomerica, lega il citocromo c rilasciato, andando quindi incontro ad un cambiamento conformazionale ATP-dipendente che consente il legame della pro-Caspase-9 attraverso i domini N-terminali CARD, presenti in entrambe le molecole (Hofmann K et al., 1997). Questo legame aumenta la concentrazione locale di Caspasi-9, portando alla dimerizzazione e promuovendo l'attivazione del circuito delle caspasi (Renatus M et al., 2001). Inoltre, la giustapposizione delle molecole di pro-Caspase-9 nel complesso, permette il taglio trans-catalitico (Srinivasula SM et al., 1998). Nella via estrinseca, il segnale apoptotico viene avviato direttamente dall'attivazione ligando-mediata dei recettori di morte, come i recettori CD95, TNF-R o DR4/5 sulla superficie cellulare e, a monte, le caspasi coinvolte sono la pro-caspasi-8 e pro-caspasi-10 (Kischkel FC et al., 2001; Duiker EW, 2006).

La morte da recettore e la via mitocondriale convergono a livello dell'attivazione della caspasi-3. L'interazione e l'integrazione tra la morte da recettore e la via mitocondriale è fornito da Bid, un membro proapoptotico della famiglia di Bcl2. Il taglio di Bid mediato dalla Caspasi-8 aumenta notevolmente la sua attività pro-apoptotica, provocandone la sua traslocazione nei mitocondri, dove promuove la fuoriuscita del citocromo c. Tuttavia, il contributo di questa interazione è minima e le due vie operano in gran parte indipendentemente l'una dall'altra (Hengartner MO, 2000).

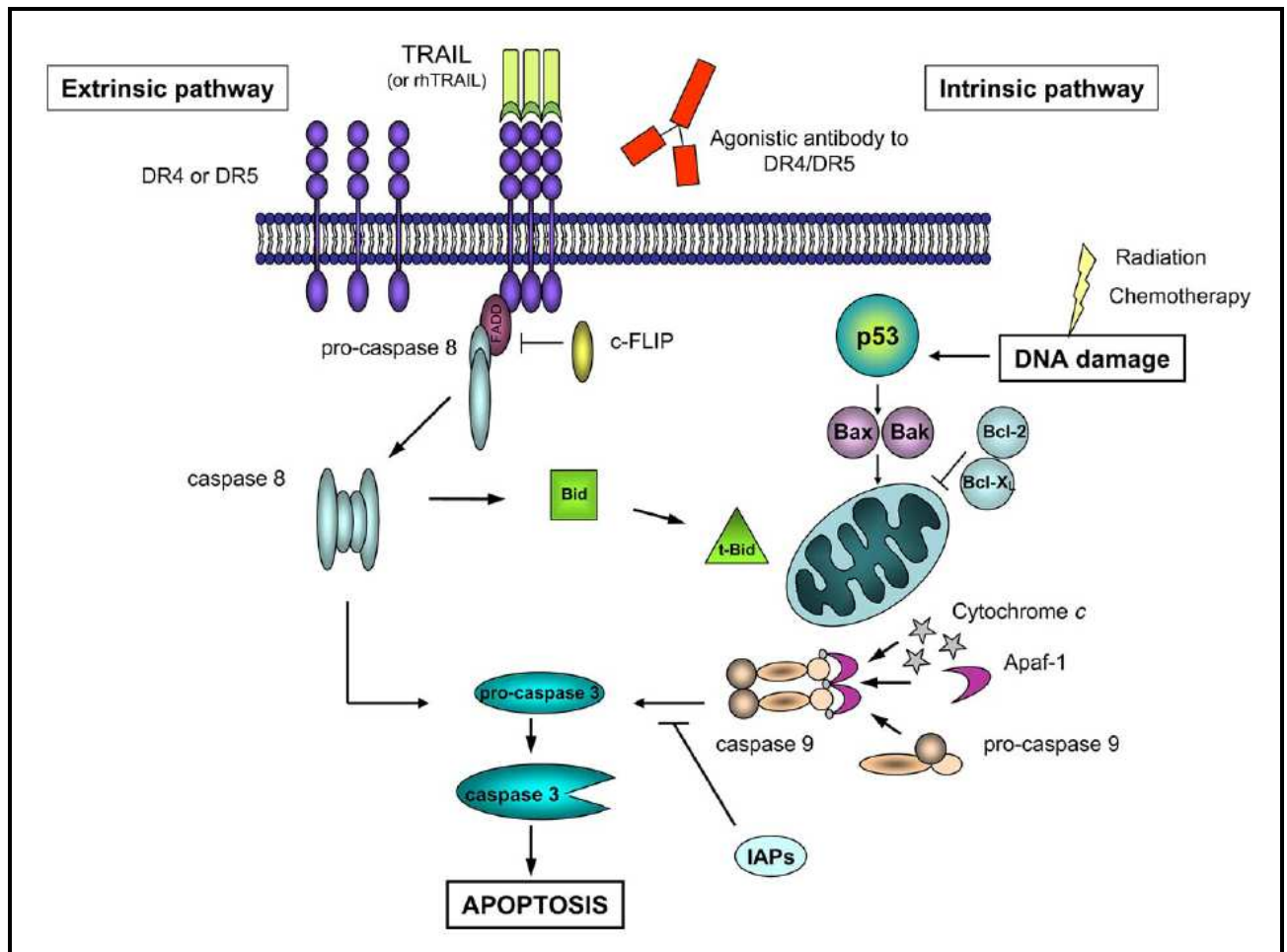


Figura 9. La via apoptotica. L'apoptosi avviata da recettore è denominata via estrinseca. Il ligando si lega al suo recettore e ciò porta al successivo assemblaggio del *death-inducing signaling complex* (DISC). Al DISC, la proteina adattatrice FADD agisce da ponte tra il complesso del recettore di morte e la caspasi-8 iniziatrice. Al momento del reclutamento da parte di FADD, la Caspasi-8 verrà attivata e quindi attiva le caspasi effettrici a valle quali la caspasi 3, 6 e 7. Quando viene attivata la via apoptotica intrinseca, i membri proapoptotici della famiglia Bcl-2 traslocano ai mitocondri, causando un ulteriore rilascio del citocromo c e di altri fattori mitocondriali nel *citosol*. Nel *citosol*, il citocromo c lega l'adattatore Apaf1 e la pro-caspasi 9, in presenza di dATP. Si forma così il complesso di segnalazione detto apoptosoma, in cui è attivata la caspasi 9, che può successivamente attivare le caspasi effettrici 3, 6 e 7 (Duiker EW et al., 2006).

La via di TRAIL

TRAIL è una proteina transmembrana che è stata inizialmente identificata e clonata basandosi sull'omologia di sequenza del suo dominio extracellulare con CD95L e con il TNF (Wiley SR et al., 1995). La sua porzione extracellulare carbossi-terminale può essere tagliata proteoliticamente dalla superficie cellulare ed associata in vescicola oppure in una forma solubile. Come la maggior parte degli altri membri della famiglia del

TNF, TRAIL forma degli omotrimeri che legano tre molecole di recettore (Hymowitz SG et al., 1999; Mongkolsapaya J, 1999). Studi funzionali hanno dimostrato che questo ligando ha una potente capacità di innescare apoptosi in un'ampia varietà di linee cellulari tumorali, ma non nella maggior parte delle cellule normali, evidenziando la sua potenziale applicazione terapeutica nel trattamento del cancro (Ashkenazi A et al., 1999; Walczak H et al., 1999). Al contrario di altri membri della famiglia del TNF, la cui espressione è strettamente regolata e sono spesso solo transitoriamente espressi in cellule attivate, l'mRNA di TRAIL è costitutivamente espresso in un'ampia gamma di tessuti. Ciò suggerisce che TRAIL non è citotossico per la maggior parte dei tessuti. (Wiley SR et al., 1995).

Studi condotti su topi *Knockout* indicano che TRAIL ha un ruolo importante nel controllo antitumorale delle cellule immunitarie (Cretney E et al., 2002; Smyth MJ et al., 2003), media l'apoptosi dei timociti ed è importante nell'induzione delle malattie autoimmuni (Lamhamedi-Cherradi SE et al., 2003).

Fino ad ora, sono stati caratterizzati cinque recettori per TRAIL: i due recettori agonistici DR4 e DR5 e tre recettori antagonisti (*decoy receptors*) DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-4) e l'osteoprotegerina (OPG). Oltre al loro dominio extracellulare, che è in grado di legare TRAIL, DR5 e DR4 contengono il *Death Domain (DD)* intracellulare che può innescare il segnale apoptotico in seguito al legame con TRAIL. Invece DcR1 e DcR2 non possono trasmettere il segnale apoptotico, a causa della mancanza del DD o della presenza di una forma tronca non funzionale. Il terzo recettore, l'osteoprotegerina, è un recettore della famiglia TNF che viene secreto e che può essere individuato nella circolazione, suggerendo che l'osteoprotegerina sia un antagonista solubile recettore per TRAIL. Anche se non è stata ancora del tutto chiarita, la funzione dell'osteoprotegerina e, in generale dei recettori antagonisti, sembra essere quella di inibire l'apoptosi indotta da TRAIL competendo con DR4 e DR5 per il legame con il ligando (Pan G et al., 1997; Wang S et al., 2003; Zhang L and Fang B, 2005). Il legame di TRAIL con DR4 e DR5 porta alla trimerizzazione dei recettori di morte e della via apoptotica mediata da recettore. I recettori attivati sono in grado di reclutare ed attivare una proteina adattatrice chiamata *Fas associated death domain (FADD)*, attraverso l'interazione tra il dominio di morte (DD) sul recettore e FADD. Il dominio effetore di morte (DED) di FADD recluta ed attiva la caspase-8, portando alla formazione del

death-inducing signaling complex (DISC). In alcuni tipi di cellule (tipo I), l'attivazione di caspase-8 è sufficiente ad innescare l'apoptosi, mentre in altri tipi di cellule (tipo II) è necessaria l'amplificazione del percorso estrinseco attraverso la via mitocondriale per indirizzare le cellule all'apoptosi (Figura 10) (Zhang L and Fang B, 2005).

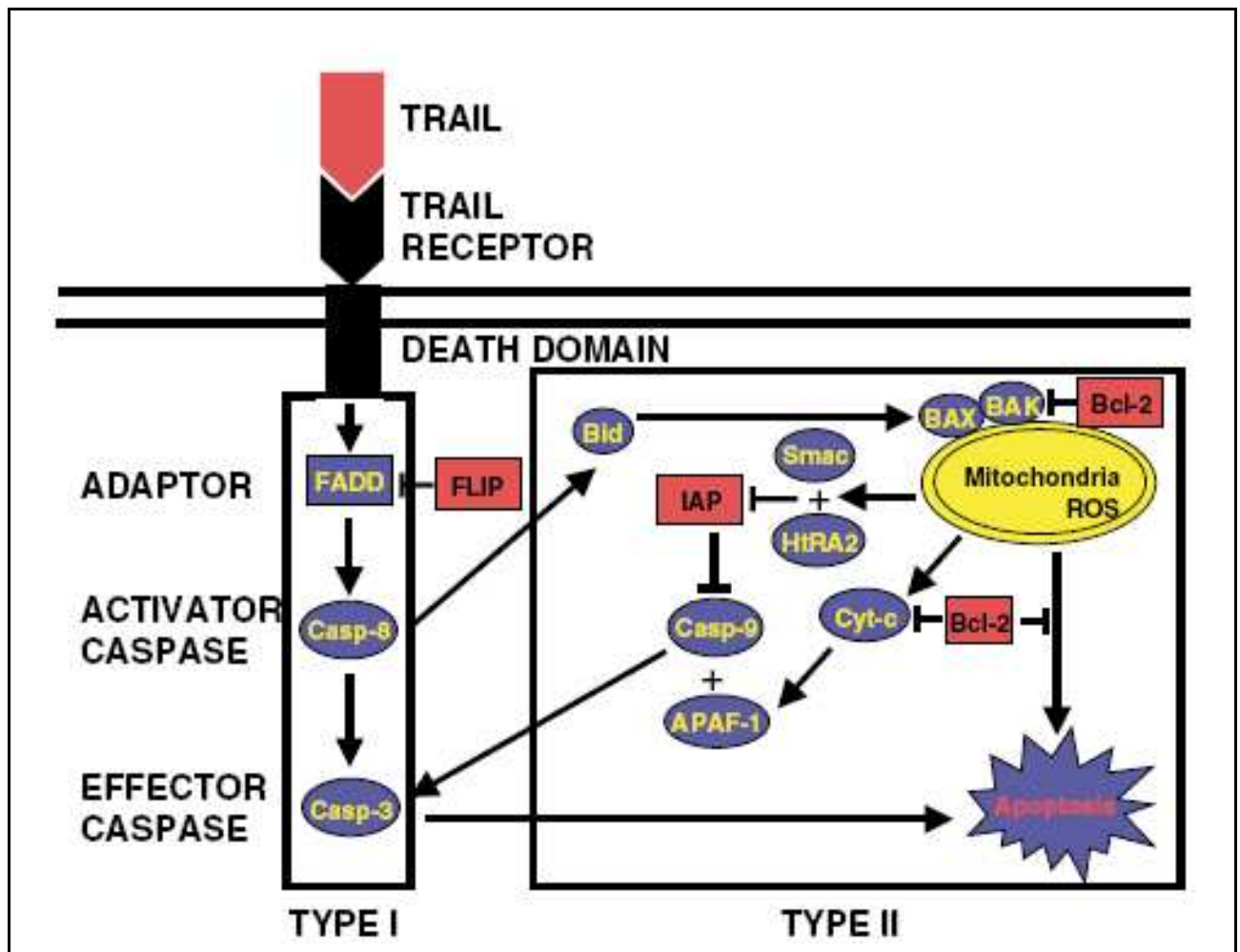


Figura 10 La via dell'apoptosi indotta da TRAIL (Zhang L and Fang B, 2005).

La dimerizzazione delle molecole di caspasi 8 al DISC porta alla formazione della caspasi 8 matura, che è in grado di attivare, a valle, le caspasi effettrici come la 3, 6 e 7, che eseguono l'apoptosi. Il taglio fisiologico della caspasi-8 richiede associazione con il DISC ed avviene in due fasi. Inizialmente il taglio genera un frammento p43 ed un p12, ulteriormente processato in un frammento p10. Successiva taglio della p43 legata

al recettore porta alla formazione del prodominio p26 e il rilascio della parte attiva contenente il sito p18 (Medema JP et al., 1997). L'attivazione della Pro-Caspasi-8 è assolutamente necessaria per innescare questa risposta apoptotica (Juo P et al., 1998) e la sua attività catalitica deve essere strettamente regolata al fine di evitare l'attivazione inappropriata ed una morte cellulare indesiderata (Peter ME, 2004). Diversi meccanismi contribuiscono al controllo della risposta apoptotica regolando l'attività della caspasi-8. In particolare, il più importante protagonista nel controllo dell'attivazione della caspasi-8 e della trasduzione del segnale della famiglia del TNF è la proteina FLIP che modula il reclutamento della caspasi-8 al DISC. (Peter ME, 2004).

La regolazione della via di TRAIL: la famiglia delle proteine FLIP

Negli esseri umani, difetti nella regolazione del programma di morte cellulare derivanti da un'insufficiente o eccessiva apoptosi sono associati allo sviluppo di diverse patologie, tra cui le patologie autoimmuni, il cancro e le patologie neurodegenerative (Green DR and Evan GI, 2002). Per evitare la morte incontrollata delle cellule o danni ai tessuti, l'apoptosi è strettamente controllata da una serie di inibitori. Esistono inibitori cellulari e virali che bloccano la morte cellulare a diversi livelli. Proteine della famiglia degli inibitori dell'apoptosi (IAP) legano direttamente ed inibiscono la caspasi-3, -6, -7 e -9 (Deveraux QL et al., 1999), mentre i membri della famiglia di Bcl-2 regolano apoptosi indotta dalla via mitocondriale (Adams JM and Cory S, 2001). L'attivazione delle caspasi iniziatrici, sia nella via intrinseca sia estrinseca è un passaggio regolatorio fondamentale dell'induzione della morte cellulare e si ottiene attraverso l'induzione dell'oligomerizzazione ad opera di proteine adattatrici (Bao Q and Shi Y, 2007). Negli ultimi anni, notevole interesse è stato centrato su tre gruppi membri della famiglia DED, che includono FADD, procaspasi-8/10 e c-FLIP (long, short e Raji), e molto è stato scoperto riguardo il loro assemblaggio attraverso le interazioni dei domini DED omotipici, per regolare il programma apoptotico. In aggiunta a FADD ed alle caspasi iniziatrici, un gruppo di proteine virali e cellulari contenenti il dominio DED chiamata FLIP sembra essere una componente integrale del DISC. La versione cellulare di FLIP è prevalentemente espressa in tre forme principali: la forma lunga (C-FLIP_L), altamente omologa alla procaspasi-8 e -10 ed in possesso di un tandem di DEDs all'ammino-

terminale e di un dominio proteasico cataliticamente inattivo al carbossi-terminale. Le forme brevi (c-FLIP_S e c-FLIP_R) sono composte solo dal tandem DEDs ammino-terminale seguita da una breve tratto carbossi-terminale, molto simile nella struttura al FLIP virale (Krueger A et al., 2001; Golks A et al., 2005). Anche se v-FLIP e c-FLIP_S sono stati caratterizzati come potenti inibitori dell'attivazione della procaspasi-8, la funzione di c-FLIP_L inizialmente è stata riferita essere sia proapoptotica che antiapoptotica. Nonostante il conflitto dei ruoli inizialmente riferito, ulteriore studio hanno sostiene l'idea che c-FLIP_L possa promuovere o inibire l'apoptosi in funzione dei suoi livelli di espressione. Quando altamente espresso, c-FLIP_L (e c-FLIP_S) sembra competere con la procaspasi-8. c-FLIP-L infatti presenta all'estremità carbossi-terminale una regione d'omologia con la caspasi 8 che consente alla molecola di assumere una struttura terziaria simile a quella assunta dalle caspasi-8 e -10. Nonostante la notevole somiglianza strutturale, c-FLIP_L non mostra però alcuna attività catalitica a causa della sostituzione di diversi aminoacidi. c-FLIP_L contiene inoltre una regione altamente conservata, presente anche in caspasi-8, corrispondente ad un sito di processamento in cui è presente il residuo di acido aspartico (Asp-341) tra i domini p10 e p20, a valle del quale avviene il taglio che genera una forma p43 (deleta del dominio p10). Il dominio DED presente nella proteina c-FLIP_L si lega alla proteina adattatrice FADD, che quindi opera reclutando c-FLIP_L, invece di caspasi-8, a livello del complesso del recettore. In questo modo c-FLIP_L agisce da inibitore negativo di caspasi-8 impedendo il processamento ed il successivo rilascio della forma attiva della molecola proapoptotica. c-FLIP_L forma quindi un eterodimero con caspasi-8 legandosi ad essa tramite due domini: DED e caspase-like-domain. Inoltre, in presenza di c-FLIP_L, sia la caspasi-8 sia il suo inibitore vengono parzialmente processati a livello del recettore; l'eterodimero così si divide in due porzioni: la subunità piccola, con attività protesica, di circa 10kDa e la rimanente porzione di circa 43 kDa costituita da FLIP-L e da caspasi-8 che rimane legata al recettore. Tuttavia, a livelli fisiologici di espressione, c-FLIP_L può essere reclutata al DISC, dove sostanzialmente promuove l'attivazione della procaspasi-8 incrementando il segnale apoptotico (Thome M and Tschopp J, 2001; Chang DW et al., 2002; Micheau O et al., 2002; Yu JW and Shi Y, 2008) (Figura 11).

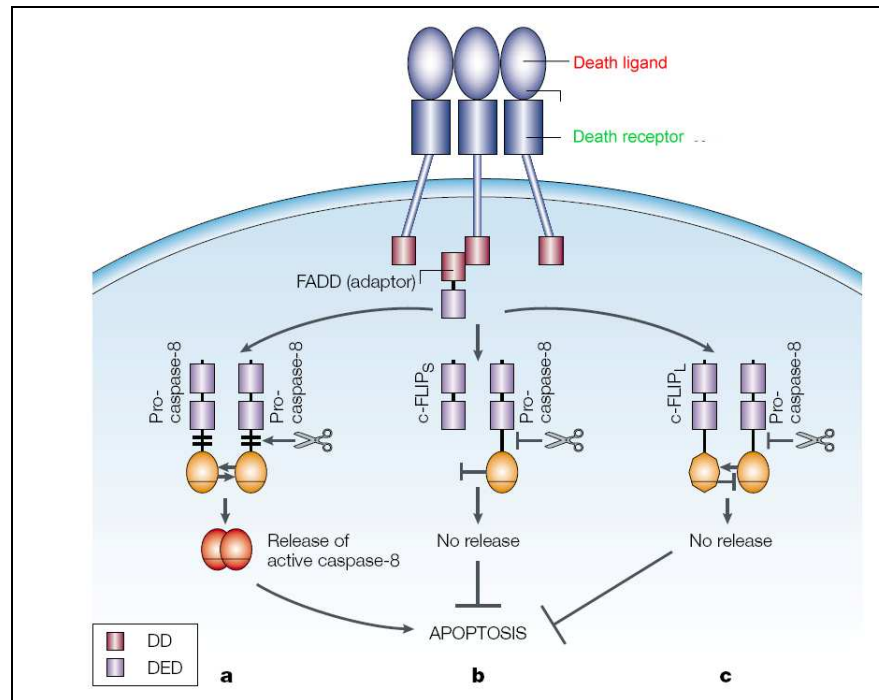


Figura 11. Via di segnalazione di morte in presenza o in assenza della proteina c-FLIP. Il legame del ligando con il recettore di morte porta al reclutamento della proteina adattatrice FADD. Queste interazioni sono dovute ad interazioni omofile tra i domini di morte (DD) dei recettori e le molecole adattatrici. FADD possiede un ulteriore dominio, il *Death Effector Domain* (DED), che serve a reclutare caspasi-8, ancora una volta attraverso interazioni omofile. **(a)** In assenza di FLIP, la caspasi-8 è reclutata ed attivata inizialmente da un taglio autocatalitico, seguita da un taglio tra la subunità grande e la subunità piccola e tra il dominio caspasi e il DED della caspasi vicina. Di conseguenza, il dimero attivo della proteasi caspasi-8 viene rilasciato nel citoplasma ed avvia la cascata apoptotica. **(b)** FLIP_S (e FLIP_V) hanno due DEDs che si legano al FADD ed a caspasi-8. FLIP_S (e FLIP_V) inibiscono il processamento di caspasi-8 a livello del recettore e proteggono la cellula dall'apoptosi. **(c)** FLIP_L ha due DEDs e un dominio *caspase-like* che manca di attività catalitica a causa di mancanza di un residuo di cisteina. In presenza di FLIP_L, sia la caspasi-8 sia FLIP_L sono reclutati e parzialmente processati a livello dei recettori. Poiché però non si verifica nessun taglio tra la caspasi ed il dominio DED, le proteine parzialmente processate rimangono legate al recettore e non può essere rilasciata nel citosol la caspasi-8 attiva. (Thome M and Tschopp J, 2001).

La resistenza a TRAIL

Una percentuale relativamente elevata (circa due terzi) delle linee cellulari tumorali testate finora sono sensibili agli effetti citotossici di TRAIL *in vitro*, mentre le restanti linee tumorali e la maggior parte delle cellule normali sono resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL, indicando che questo può rivelarsi un utile e potente chemioterapico (Walczak H et al., 1999; Gores GJ and Kaufmann SH, 2001). Pertanto, è importante capire i meccanismi implicati nella resistenza di alcune linee tumorali a TRAIL e

parallelamente indurre la sensibilizzazione all'apoptosi indotta da TRAIL. Quando si confrontano cellule tumorali con cellule non trasformate, le prime si rivelano più sensibili all'apoptosi indotta dal trattamento con TRAIL. La resistenza a TRAIL può essere causata da alterazioni molecolari che possono avvenire in diversi punti della via di segnalazione dell'apoptosi indotta da TRAIL. I principali meccanismi di resistenza che sono stati osservati nelle cellule tumorali sono: alterati livelli dei recettori DR4/5, alterati livelli dei recettori *decoy*, alterata presenza o funzionalità delle caspasi iniziatrici 8 e 10, elevata presenza della proteina antiapoptotica c-FLIP (Zhang XD et al., 1999).

DR4 e DR5, i due recettori agonisti per TRAIL sono in grado di trasmettere il segnale apoptotico in seguito al segnale per TRAIL. Si può quindi ipotizzare che disfunzioni in questi recettori possono causare resistenza a TRAIL. Polimorfismi in DR4 sono stati descritti in alcune linee di tumori ovarici, polmonari e gastrici, nella regione del DD, che correlano con una resistenza a TRAIL. La trasfezione di cellule di colon con un plasmide che esprime la forma polimorfica porta ad un'effettiva perdita della capacità di risposta apoptotica a TRAIL (Kim K et al., 2000). Altre mutazioni missenso in DR4 sono state osservate nel dominio di legame al ligando o nelle sue vicinanze, causando probabilmente un'alterata trimerizzazione o un'inefficace legame con TRAIL (Fisher MJ et al., 2001). Analoghe mutazioni sono state osservate nel gene per DR5 in tumori del seno, in linfomi non Hodgkin ed in epatocarcinomi, in cui è interessata la regione del DD (Lee SH et al., 1999).

Tuttavia, dopo l'identificazione dei diversi recettori per TRAIL, si è constatato che l'espressione degli mRNA dei recettori è ampiamente distribuita sia nelle cellule normali sia nei tessuti tumorali (Chaudhary PM et al., 1997). La scoperta dei due *decoy receptors* che possono legare TRAIL e che non sono in grado di indurre apoptosi, ma anzi competono con DR4 e DR5 per TRAIL, sembra spiegare il paradosso. Si è ipotizzato infatti che le cellule normali esprimano principalmente i *decoy receptors*, proteggendosi dall'apoptosi, mentre le cellule tumorali principalmente i recettori apoptotici (Gura T, 1997). Comunque, non è stata universalmente riconosciuta una correlazione tra la resistenza a TRAIL e la sovraespressione dei recettori *decoy*, nonostante alcuni studi correlino l'espressione leggermente superiore di DcR1 e DcR2, rispetto ai tumori sensibili. Riccioni ha descritto una correlazione tra la resistenza a

TRAIL di cellule primarie derivanti da leucemia mieloide acuta (AML) ed una maggiore espressione di recettore *decoy* (Riccioni R et al., 2005; Sheridan JP et al., 1997).

La mancata espressione della caspasi-8 e -10 in un ampio numero di linee di neuroblastoma fornisce la spiegazione al fatto che queste siano resistenti all'apoptosi mediata da TRAIL (Eggert A et al., 2001). La prova principale di questa ipotesi è che le linee cellulari *Jurkat* mancanti della Caspasi 8 si dimostrano completamente resistenti a TRAIL, mentre le corrispondenti cellule *wild type* sono sensibili. Inoltre l'inibitore di caspasi 8 Z-IETD-FMK è in grado di inibire l'apoptosi indotta da TRAIL nella maggior parte delle linee cellulari sensibili (Seol DW et al., 2001). Un analogo risultato è stato osservato utilizzando un più specifico approccio genetico nell'inibizione di Caspasi 8, mediante siRNA (Eggert A et al., 2001; Chun HJ et al., 2002). Comunque, in pochi casi la perdita di espressione di Caspasi 8 deriva dalla delezione del gene, mentre nella maggior parte dei casi è causata dal silenziamento genico mediante metilazione del DNA nella regione del promotore (Hopkins-Donaldson S et al., 2003). Infatti il trattamento di queste cellule con un agente demetilante reverte l'ipermetilazione del promotore di caspasi 8, ripristinandone l'espressione e la sensibilità all'apoptosi indotta da TRAIL (Fulda S et al., 2001).

Tuttavia, la perdita della caspasi 8 e 10 potrebbe non essere l'unico fattore responsabile della resistenza a TRAIL in alcune linee tumorali. La regolazione della via di TRAIL è anche conferita da un'aberrante deregolazione della proteina c-FLIP che, grazie alla sua omologia di sequenza con la caspasi 8 ne blocca il suo reclutamento al DISC impedendone l'attivazione e conferendo quindi resistenza a TRAIL. Infatti è stata riportata una correlazione tra l'alterato rapporto c-FLIP/Caspasi 8 e la resistenza a TRAIL in diverse linee tumorali, tra cui melanomi, epatocarcinomi, leucemie e linfomi (Okano H et al., 2003; Tepper CG et al., 1999; Thomas RK et al., 2002; MacFarlane M et al., 2002).

Meccanismi di sensibilizzazione all'apoptosi indotta da TRAIL

L'obiettivo principale che ci prefigge nell'indurre la sensibilizzazione delle cellule tumorali resistenti all'apoptosi da recettore è quello di non avere contemporaneamente fenomeni di tossicità nelle cellule normali. In un recente lavoro (Geserick P et al., 2007)

sono state analizzate diverse linee cellulari di melanoma umano, con diversa sensibilità all'apoptosi indotta da TRAIL con diversi livelli di espressione della proteina c-FLIP. L'elevata espressione di c-FLIP, associata a bassi livelli di Caspasi 8 correla con un'elevata resistenza a TRAIL; tale caratteristica è invece molto ridotta quando il rapporto tra queste proteine risulta invertito. In questo modello è stato sufficiente diminuire l'espressione dell'RNA di c-FLIP mediante *RNA interference* per sensibilizzare linee di melanoma resistente a TRAIL.

I due principali approcci che vengono seguiti per abbassare i livelli di FLIP e sensibilizzare le cellule resistenti sono: l'azione diretta sulle vie molecolari note per regolare negativamente i livelli di FLIP quali l'attivazione di p53 o il blocco della via dell'interleuchina-4 (IL-4) ed il trattamento con sostanze chemioterapiche.

p53 è un noto attivatore trascrizionale ed i suoi geni bersaglio possono indurre apoptosi mediante regolazione di geni connessi all'apoptosi (Riley T et al., 2008). Tale regolazione dei geni a valle di p53 è basata su una comune linea di principio, in cui i fattori pro-apoptotici sono up-regolati mentre i fattori anti-apoptotici vengono repressi. C-FLIP si è rivelata una notevole eccezione, poiché il suo mRNA è up-regolato da p53 *wild type*, in linee cellulari di tumore del colon (Zhou XD et al., 2005; Bartke T et al., 2001). I livelli di mRNA di c-FLIP però inaspettatamente decrescono in alcuni tumori del colon che hanno p53 mutato, laddove i livelli della proteina c-FLIP sono significativamente up-regolati. Questo potrebbe sembrare un risultato contraddittorio, anche se si può speculare che ci possa essere un altro meccanismo che possa agire sulla regolazione di c-FLIP oltre a quello trascrizionale. In un lavoro di Fukazawa (Fukazawa T et al., 2001) è stato dimostrato che p53 *wild type* è in grado di incrementare la degradazione di FLIP attraverso la via dell'ubiquitinazione-proteasoma, con il risultato di sensibilizzare le cellule umane tumorali di colon all'apoptosi. Così, livelli elevati di C-FLIP sono la conseguenza di una drastica diminuzione della degradazione quando p53 è mutato, rispetto ad una relativamente moderata down-regolazione dell'mRNA di c-FLIP nel tumore del colon (Zhou XD et al., 2005).

L'analisi della resistenza a TRAIL di tumori epiteliali di colon, mammella e del polmone ha dimostrato la correlazione con elevati livelli di proteine antiapoptotiche, tra cui cFLIP, Bcl-XL e Bcl-2. Queste cellule tumorali producono interleuchina-4 (IL-4), che amplifica i livelli di espressione di queste proteine. Bloccando l'IL-4 con uno specifico

anticorpo si riducono drasticamente i livelli di c-FLIP ed avviene una significativa diminuzione del tasso di crescita delle cellule epiteliali tumorali e la loro sensibilizzazione a TRAIL (Todaro M et al., 2008).

Il cotrattamento con diverse sostanze chemioterapiche si è dimostrato un valido supporto nella sensibilizzazione a TRAIL in funzione della loro abilità di abbassare i livelli di FLIP. Come dimostrato da numerosi studi preclinici, TRAIL induce apoptosi in modo efficiente in numerose linee cellulari tumorali, ma non nella maggior parte delle cellule normali. Tuttavia, molte linee di cellule tumorali e le cellule derivate da tumori umani primari hanno dimostrato di essere resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL (Bhojani MS, 2003). In cellule fresche isolate da mieloma multiplo umano TRAIL induce apoptosi rispetto ad altre cellule tumorali primarie resistenti a chemioterapici. Al contrario, linfociti B primari derivanti da pazienti con leucemia linfoblastica acuta e cronica, sono resistenti a TRAIL. La maggior parte delle cellule di linfoma analizzate (come la leucemia linfoblastica acuta, LAL, leucemia promielocitica acuta, la leucemia linfocitica cronica) sono anche resistenti a TRAIL (Snell V et al., 1997). Anche diverse linee primarie di epatocarcinoma (PHH) mostrano resistenza all'apoptosi indotta da TRAIL ma anche una capacità di sensibilizzazione in queste linee da parte di sostanze chemioterapiche (Ganten TM., 2006). Pertanto, in diversi studi, l'irradiazione (Shankar S et al., 2004; Wendt J et al., 2005) o farmaci chemioterapici, tra cui il 5-fluorouracile (Ganten TM., 2004), etoposide (Shankar S et al., 2005), cisplatino (Shin EC et al., 2002), oxaliplatino, irinotecan, gemcitabina (Ganten TM et al., 2006), sono stati utilizzati insieme a TRAIL per sensibilizzare le cellule tumorali per l'apoptosi indotta da TRAIL. Comunque tali cotrattamenti non possono essere di beneficio clinico, se sensibilizzano anche le cellule normali. Il 5-fluorouracile, l'irinotecan, la gemcitabina, l'etoposide non hanno mostrato un notevole tossicità quando somministrato da solo, né quando è associato a TRAIL nelle PHH per sensibilizzarle all'apoptosi (Ganten TM et al., 2006).

Il 5-fluorouracile (5-FU) appartiene alla classe degli analoghi nucleosidici, che agiscono sull'integrità del DNA, generalmente in seguito alla loro incorporazione durante la replicazione o durante la sintesi del DNA per il riparo per escissione, causando il blocco delle forche replicative e l'interruzione dell'elica. I sensori del danno al DNA ATM, ATR e DNA-PK riconoscono questi eventi ed attivano meccanismi di controllo che arrestano la progressione del ciclo cellulare ed avviano il meccanismo di

riparo del danno al DNA oppure la via apoptotica a seconda dell'entità del danno (Sampath D et al., 2003). Il 5-FU è spesso ampiamente usato associato alla radioterapia, in quanto ha anche un effetto diretto sul DNA (attraverso l'inibizione della timidilato sintasi) che diretto sull'RNA (attraverso l'incorporazione nelle 3 specie di RNA). Anche se l'interruzione della sintesi dell'RNA o del DNA può produrre citotossicità, numerose evidenze suggeriscono che la radiosensibilizzazione è il risultato dell'inibizione della timidilato sintasi (Lawrence TS et al., 1997).

Gli inibitori del proteasoma sono una nuova classe di sostanze chemioterapiche, con un grande potenziale terapeutico. La via dell'ubiquitina-proteasoma è il principale sistema non lisosomiale di degradazione delle proteine, che regola processi essenziali della cellula, quali il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale e l'apoptosi. Bersagli del proteasoma sono inclusi il sistema *nuclear factor-kappaB (NF-κB)/IκB*, p53, e le proteine inibitrici dell'apoptosi (IAPs). Recentemente è stato proposto che gli inibitori del proteasoma sensibilizzino le cellule per l'apoptosi indotta da TRAIL, in alcune cellule attraverso un meccanismo dipendente da *NF-κB*, ma in alcune indipendentemente da questo (Leverkus M et al., 2003; Ravi R et al., 2001). Quindi il meccanismo che porta alla sensibilizzazione è controversa e può differire sostanzialmente nei differenti tipi cellulari. La sensibilizzazione delle cellule di carcinoma a TRAIL può fornire una maggiore efficacia nel trattamento tumorale, anche associato ad una terapia combinata, che non è tossica per le cellule normali. In particolare è stato dimostrato che, sebbene gli epatociti primari umani si mantengono resistenti all'apoptosi da TRAIL, cellule di epatocarcinoma possono essere sensibilizzate con gli inibitori del proteasoma MG132 e PS341, con un meccanismo non dipendente da *NF-κB*, bensì da un'incrementata formazione del DISC con un deciso aumento dell'attivazione della Caspasi-8, anche in presenza di aumentati livelli di FLIP (Ganten TM et al., 2005). L'MG132 è in grado di sensibilizzare anche cellule di tumore della prostata, normalmente resistenti a TRAIL, attraverso un meccanismo che coinvolge una regolazione positiva delle proteine appartenenti alla famiglia AP1, c-FOS e c-JUN, che a loro volta reprimono la proteina antiapoptotica c-FLIP. C-FOS e c-JUN formano un eterodimero che si lega al promotore di c-FLIP reprimendone l'attività riducendo quindi i livelli di mRNA e proteina (Li W et al., 2007). Il principale rappresentante della classe di inibitori del proteasoma, con valenza terapeutica è il Bortezomib, che si è dimostrato efficace nel trattamento di diversi tipi di

tumori sia in vivo sia in vitro (Cortes J et al., 2004; O'Connor OA, 2004; O'Connor OA et al., 2005; Goy A et al., 2005). La prima indicazione su questo farmaco è stato sulle cellule plasmatiche di mieloma refrattario, un tumore che mostra anche *NF-κB* costitutivamente attivato. Il meccanismo di azione principale del Bortezomib è l'inibizione dell'attivazione di *NF-κB*, attraverso l'inibizione della degradazione di *IκB* (Hideshima T et al., 2002). La normale regolazione negativa di *NF-κB* avviene mediante il sequestro delle subunità di *NF-κB* in un complesso con *IκB* nel citoplasma, impedendone l'ingresso nel nucleo. La fosforilazione di *IκB* in risposta a stimoli extracellulari rilascia *NF-κB* e gli consente di traslocare nel nucleo ed esercitare la sua attività trascrizionale. Così, l'inibizione del proteasoma aumenta il pool di *IκB*, con conseguente inibizione di *NF-κB*. Anche i linfomi di Hodgkin (HL) sono tumori che hanno *NF-κB* costitutivamente attivato e ciò potrebbe contribuire in maniera significativa alla patogenesi dei HL; l'inibizione del proteasoma attraverso il Bortezomib può anche quindi essere efficace nel trattamento di tale patologia. Somministrando il Bortezomib si osserva l'inibizione della proliferazione e si induce apoptosi nelle linee cellulari HL in maniera dose- dipendente. Il profilo di espressione genica ha dimostrato regolazione differenziale di alcuni geni che posti in percorsi cellulari cruciali, tra cui i geni legati al ciclo cellulare e apoptosi. Tra questi molto interessante è una marcata diminuzione dell'inibitore della caspasi-8 c-FLIP. Ciò suggerisce che la stimolazione della via estrinseca dell'apoptosi TRAIL-mediata può essere il logico passo successivo, in combinazione con Bortezomib (Zhao X et al., 2008). Inoltre è noto da tempo che in molte linee di linfoma di Hodgkin la proteina c-FLIP è presente ad elevati livelli e ciò sembra quindi essere il principale meccanismo responsabile per la resistenza di tali linee all'apoptosi indotta dalla stimolazione del recettore per Fas (Thomas RK et al., 2002).

Recentemente, alcuni inibitori delle deacetilasi istoniche (HDAC), che inibiscono la crescita tumorale, sia in vitro e in vivo a dosi non tossiche, sono entrati nelle sperimentazioni cliniche. Lo stato di acetilazione degli istoni altera la struttura della cromatina, modulando in tal modo l'espressione genica ed è disciplinata dalla relativa attività delle acetiltransferasi istoniche e dalle HDACs. L'alterazione delle due attività è spesso associata a diversi tumori, tra cui leucemie e linfomi. Gli inibitori delle HDAC

esercitano il loro effetto antitumorale grazie alla loro capacità di indurre arresto della crescita e l'apoptosi (Johnstone RW, 2002; Melnick A and Licht JD 2002). La maggior parte degli studi che descrivono l'induzione dell'apoptosi da parte degli inibitori HDAC suggerisce che questa avvenga attraverso la via intrinseca, anche se in alcuni contesti cellulari possono essere coinvolte anche altre proteine che porterebbero all'attivazione della via estrinseca, principalmente in cellule di leucemia linfoide cronica. Oltre ad indurre apoptosi, ci sono alcuni studi che riportano un effetto di potenziamento della morte indotta da recettore per effetto degli inibitori delle HDAC. I meccanismi proposti comportano una maggiore espressione dei recettori di morte e dei loro ligandi o ma anche una diminuzione dei livelli di c-FLIP, c-IAP2 e XIAP (Aron JL et al., 2003). In un lavoro di Inoue (Inoue S et al., 2004) mostra che concentrazioni nanomolari di inibitori delle HDAC sensibilizzano cellule primarie resistenti derivanti da pazienti affetti da leucemia linfoide cronica all'apoptosi indotta da TRAIL, facilitando una maggiore formazione del DISC al recettore per TRAIL.

FUNZIONI DEI MECCANISMI PROTEOLITICI INTRACELLULARI

I meccanismi proteolitici intracellulari devono assolvere diverse funzioni, tra le quali:

- riconoscere ed eliminare le proteine non assemblate;
- eliminare le proteine danneggiate o mal ripiegate;
- conferire un'emivita breve a certe proteine normali le cui concentrazioni devono cambiare rapidamente in seguito ad alterazioni dello stato di una cellula.

La maggior parte delle proteine che sono degradate nel citosol sono portate in complessi proteici chiamati proteasomi, che sono presenti in molte copie e sono dispersi in tutta la cellula. I proteasomi agiscono su proteine che sono state marcate in modo specifico per la distruzione tramite l'attacco covalente di una piccola proteina contenente 76 residui aminoacidici chiamata ubiquitina. L'ubiquitina esiste nella cellula in forma libera o legata a substrati proteici. Vie proteolitiche diverse dipendenti

dall'ubiquitina impiegano simili ma distinti enzimi che coniugano l'ubiquitina e che sono associati a subunità di riconoscimento che hanno il compito di direzionarli verso proteine che portano un particolare segnale per la degradazione. Le proteine denaturate o mal ripiegate, oltre a quelle che contengono amminoacidi ossidati o comunque anormali, sono riconosciute e degradate da sistemi proteolitici che dipendono dall'ubiquitina. Gli enzimi che coniugano l'ubiquitina riconoscono presumibilmente segnali esposti su tali proteine in seguito a ripiegamento difettoso o a danneggiamento chimico; è probabile che questi segnali comprendano sequenze di amminoacidi o motivi conformazionali che sono nascosti, e quindi inaccessibili, nelle proteine che assumono la corretta conformazione. L'ubiquitinazione proteica dipende da un sistema composto da tre enzimi: E1, E2, E3. E1 è l'enzima che attiva l'ubiquitina utilizzando l'energia di una molecola di ATP; si lega sulla coda della molecola di ubiquitina formando un legame tra un proprio residuo Cys attivo e l'ubiquitina, dopodiché passa l'ubiquitina attivata ad un enzima E2. L'enzima E2 ha il compito di trasferire l'ubiquitina attivata alla proteina bersaglio o ad una catena di poliubiquitine. L'E3 ubiquitina-ligasi è l'enzima che conferisce specificità al sistema, reclutando i substrati proteici d'interesse (Welchman RL et al., 2005).

Il processo di fosforilazione ad opera di svariate chinasi è in grado sia di inibire sia di promuovere il processo di ubiquitinazione, che a sua volta è in grado di promuovere la degradazione proteica, oppure di regolare il traffico delle proteine di membrana. La fosforilazione regola l'ubiquitinazione delle proteine in tre diverse maniere:

- sia positiva, sia negativa, regola l'attività degli enzimi E3 ligasi responsabili del trasferimento dell'Ub sulla proteina bersaglio (Ichimura T et al., 2005; Gallagher E et al., 2006);
- promuove il riconoscimento tra E3 ubiquitina-ligasi e substrati bersaglio specifici (Cardozo T and Pagano M., 2004);
- influenza l'ubiquitinazione regolando l'interazione tra substrato e ligasi a livello della compartimentalizzazione subcellulare (Nakayama KI and Nakayama K, 2006).

È noto ormai da tempo che la serina/treonina chinasi ATM regola l'attività di diversi enzimi E3 ubiquitina ligasi. ATM fosforila direttamente MDM2 ed MDMX e tale evento fosforilati interferisce con il trasporto extranucleare del complesso p53-MDM2, e di conseguenza favorisce la degradazione di p53 (Khosravi R. et al., 1999). La perdita di ATM impedisce la degradazione di MDMX e di conseguenza lo stabilizzarsi dei livelli di p53 in seguito a stress da danno al DNA (Chen L et al., 2005). Nel 2004 Dornam e colleghi hanno identificato un nuovo regolatore negativo di p53: l'E3 ubiquitin ligasi COP1 (*constitutive photomorphogenic 1*). Nel 2006, Dornan et al. hanno rilevato che, in seguito a danno al DNA, ATM fosforila COP1 sul residuo Ser387 stimolandone l'autodegradazione. Le radiazioni ionizzanti (IR), utilizzate per infliggere danno al DNA ed attivare così ATM, provocano la rilocalizzazione ATM-dipendente della E3 ubiquitina ligasi.

L'E3 ubiquitin ligasi ITCH

La proteina Itch è un'E3 ubiquitina-ligasi contenente un HECT-domain (*Homologous To E6-AP C Terminus*). La ligasi presenta all'estremità N-terminale un dominio C2, seguito da alcuni domini WW; mentre all'estremità C-terminale è posto il dominio catalitico HECT. In seguito all'attivazione del recettore per il TNF α , viene attivata la proteina regolatoria JNK, membro delle MAP chinasi. È ormai risaputo che il bilanciamento tra l'attività di NF- κ B e JNK determina l'esito del segnale indotto da TNF α : mentre NF- κ B promuove la sopravvivenza della cellula, JNK promuove l'apoptosi indotta da TNF α (De Smaele E et al., 2001; Karin M and Lin A., 2002). L'attività di JNK controlla la morte indotta da TNF α attraverso il processamento proteasoma-dipendente della proteina c-FLIP_L, la sola molecola capace di inibire l'attività apoptotica del complesso II e la cui espressione dipende da NF- κ B (Micheau O and Tschopp J., 2003). JNK1 non agisce su c-FLIP_L tramite fosforilazione diretta ma attraverso l'attivazione della E3 ubiquitina ligasi ITCH, il primo membro della famiglia delle ubiquitine ligasi HECT di cui è stata dimostrato che l'attività catalitica dipende dalla fosforilazione diretta operata da JNK1 (Gao M. et al., 2004).

Un nuovo meccanismo di regolazione di c-FLIP: la chinasi ATM

In un lavoro pubblicato recentemente dal nostro laboratorio, è stato identificato un nuovo ruolo della proteina ATM come modulatore dell'apoptosi indotta dal recettore di morte Fas. L'apoptosi indotta da Fas gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi del sistema immunitario ed eventuali difetti nella via di trasduzione del segnale controllata dal recettore di morte Fas sono spesso associati allo sviluppo di linfomi e malattie autoimmuni. Investigando il ruolo di ATM nell'apoptosi indotta da Fas, cellule linfoblastoidi che non hanno una proteina ATM funzionale sono state caratterizzate come sensibilmente resistenti alla morte indotta dal recettore Fas. Tale resistenza all'apoptosi è correlata con alti livelli di espressione di FLIP nelle cellule. La ricostituzione di queste cellule con una forma cataliticamente attiva di ATM è sufficiente ad abbassare i livelli di FLIP e ripristinare la sensibilità all'apoptosi indotta da Fas. In accordo con questi dati, anche il trattamento di cellule positive per l'espressione di ATM con il radiomimetico neocarzinostatina (NCS), determina un forte decremento dei livelli di espressione di FLIP conseguente all'induzione dell'attività chinastica endogena di ATM. Inoltre, ciò correla con un consistente incremento di sensibilità di tali cellule all'apoptosi indotta da Fas. Al contrario, l'inibizione dell'attività chinastica di ATM tramite pretrattamento con uno specifico inibitore chimico o mediante specifici siRNAi, determina l'aumento dei livelli di FLIP ed induce resistenza all'apoptosi Fas-dipendente. L'espressione di aberranti livelli di FLIP è considerata una delle maggiori cause di resistenza all'apoptosi indotta da recettori di morte di diverse linee tumorali tra cui i linfomi di Hodgkin. In questo sistema, la sovraespressione di FLIP correla spesso con livelli molto bassi o comunque con una ridotta funzionalità di ATM. Abbiamo dimostrato che la sovraespressione di ATM in tale sistema è sufficiente a ridurre i livelli di FLIP e, conseguentemente, sensibilizza le cellule all'apoptosi indotta da Fas.

Alcuni dati sperimentali suggeriscono inoltre che ATM moduli principalmente la stabilità della proteina FLIP, che coerentemente viene degradata più velocemente in presenza di ATM, attraverso un meccanismo ancora da definire. Nel loro insieme questi dati hanno portato all'identificazione di un nuovo meccanismo molecolare attraverso il quale la chinasi ATM può regolare l'omeostasi del sistema immunitario e lo sviluppo di tumori a carico di questo apparato (Stagni V et al., 2008).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo progetto è stato quello di testare l'ipotesi che il meccanismo di modulazione dei livelli di FLIP da parte dell'attività chinasi di ATM potesse svolgere un ruolo importante nella sensibilizzazione di linee tumorali resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL mediato dal trattamento con diversi agenti chemioterapici, precedentemente descritti come induttori di danno al DNA.

Cellule linfoblastoidi derivate da pazienti A-T sono altamente resistenti a TRAIL, suggerendo che ATM possa svolgere un ruolo importante nella modulazione dell'apoptosi indotta da TRAIL, analogamente a quanto dimostrato per Fas in precedenza. Coerentemente, la ricostituzione di tali linee con ATM è sufficiente a risensibilizzarle a TRAIL. Utilizzando un modello sperimentale di epatocarcinoma resistente a TRAIL abbiamo dimostrato, mediante inibizione di farmacologia o genetica di ATM, che l'attività chinasi di ATM è assolutamente necessaria per la sensibilizzazione di tali cellule a TRAIL mediata dall'agente chemioterapico 5-FU. Utilizzando linee di linfoma di Hodgkin resistenti a TRAIL abbiamo dimostrato che il pretrattamento con diversi agenti che danneggiano il DNA, quali 5-FU, etoposide ed adramicina, è sufficiente ad indurre l'attivazione di ATM endogena e l'abbassamento dei livelli di FLIP con conseguente sensibilizzazione di tali cellule all'apoptosi indotta da TRAIL. Inoltre abbiamo dimostrato che in questo sistema ATM media la degradazione di FLIP attraverso la via del proteasoma in modo p53 indipendente.

I nostri studi suggeriscono per la prima volta un meccanismo molecolare con cui il 5-FU consente di sensibilizzare linee tumorali a TRAIL e suggeriscono l'idea tale meccanismo possa essere utilizzato in un ampio spettro di tumori perché indipendente dallo stato di p53, purché in tali tumori non sia compromessa la funzionalità di ATM. Proponiamo quindi, che l'attività chinasi di ATM sia quindi un prerequisito importante nella messa a punto di terapie combinate basate sulla sensibilizzazione alla morte da recettore attraverso agenti che danneggiano il DNA, selettivamente sulle cellule tumorali.

MATERIALI E METODI

COSTRUTTI DI DNA: pcDNA3, DNA3-Flag-ATM-WT, pcDNA3-Flag-ATMKD (gentilmente forniti da M. Kastan). shATM (5'-GATCCCCCTGGTTAGCAGAAACGTGCTTCAAGAGAGCACGTTTCTGCTAACCAGTT TTTGGAAA-3') (Elkon R et al., 2005), gentilmente fornito da Y. Shiloh; shp53 (Soddu S et al., 1996), gentilmente fornito dalla dott.ssa S. Soddu.

ANTICORPI (ed altri reagenti): sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-Phospho-Serine 1981 ATM (Cell Signaling), anti-ATM clone 2C1 (Santa Cruz Biotechnology), , anti-FLIP (S e L) Clone NF6 (ALEXIS), anti- β -Tubulina (SIGMA), anti FLAG-® M2 (SIGMA). Sono stati utilizzati i seguenti reagenti Neocarzinostatin (SIGMA), KU-55933 (gentilmente fornitoci da KUDOS), 5-fluorouracil (SIGMA), Etoposide (SIGMA) Adriamycin (Doxorubicin) (SIGMA), MG132 (SIGMA).

LINEE CELLULARI (adese): Le linee cellulari HepG2, HepG2 TR (TRAIL Resistant) e Hep3B, (gentilmente forniteci da H. Walkzac) e le HEK 293T, sono state coltivate in piastre sterili (Grainer) contenenti terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) cui è stato aggiunto l'1% di L-Glutamina, 1% di una soluzione di Penicillina [10000U/ml] e Streptomicina [10mg/ml], il 10% di siero fetale bovino (FBS). Tutti i composti sovraindicati sono prodotti e commercializzati dalla SIGMA Chemical Company. Tali cellule sono cresciute in incubatore "HERA cell 150" alla temperatura di 37°C, in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂.

LINEE CELLULARI (in sospensione): Le linee cellulari C3ABR (Lavin et al., 1981) ed L6 (Gilad et al., 1996) (gentilmente fornite da M. Lavin and Y. Shiloh) derivano da cellule linfoblastoidi umane rispettivamente prelevate da un paziente sano ed uno malato di Atassia Telangectasica. Sono state immortalizzate mediante infezione con virus di Epstein-Barr. Le linee L6-ATMwt, L6ATM-kin- e L6pcDNA3 sono cellule della linea L6 stabilmente trasfettate e rese quindi capaci di esprimere sia la chinasi cataliticamente attiva (wt) che quella mutata nel dominio chinasi (kin-) (Stagni V et al., 2008). La linea L591 deriva da un paziente con linfoma di Hodgkin (Diehl V et al.,

1985). Le C3ABR e le L591 sono mantenute in coltura in terreno RPMI (RPMI 1640 , Sodio Piruvato 1.0 mM, 10mM HEPES) a cui è aggiunto l'1% di L-Glutammina, l'1% di una soluzione di Penicillina [10000U/ml] e Streptomicina [10mg/ml] ed il 10% di FBS; le L6, le AT44 e le AT3189 hanno la percentuale di FBS al 15%. Le linee AT-44 (forniteci dalla prof.ssa L. Chessa) e AT-3189 (forniteci dal dott. E. Cundari) derivano da cellule linfoidi umane prelevate da un paziente malato di Atassia Telangectasica.

TRASFEZIONE CON LIPOFECTAMINA 2000: Tale tecnica è stata utilizzata per effettuare trasfezioni transienti sulle HepG2-TR. La LIPOFECTAMINA (Invitrogen) è un lipide cationico, costituito da una coda policationica che si associa strettamente alla carica negativa dei gruppi fosfato degli acidi nucleici e da una porzione lipidica che facilita il passaggio del complesso DNA-LIPOFECTAMINA attraverso la membrana cellulare. La lipofectamina è stata utilizzata secondo un rapporto 1:2 con il DNA plasmidico. In piastre da 60 mm sono stati trasfettati 5 µg di DNA plasmidico e 10 µl di Lipofectamina 2000. DNA e Lipofectamina 2000 vengono aggiunti a 500 µl di Opti-MEM® Medium ed aggiunto alle cellule nelle piastre contenenti DMEM con 1% L-Glutammina in assenza di antibiotici e di siero. Si lasciano esprimere i plasmidi per un massimo di 16 h, dopodiché si preleva il DMEM 1% L-Glutammina e lo sostituisce con il normale terreno di coltura. A 48 h dall'inizio della trasfezione si effettua la lisi cellulare.

TRASFEZIONE CON CALCIO-FOSFATO: Tale tecnica è stata utilizzata per effettuare trasfezioni transienti sulle HEK-293T e prevede il mescolamento di una soluzione tampone HEPES contenente ioni fosfato insieme a una soluzione di cloruro di calcio (CaCl_2) e H_2O contenente i costrutti di DNA da trasfettare. Il mescolamento delle due soluzioni produce un precipitato di calcio fosfato, che andrà a legare la molecola di DNA. Tramite endocitosi i precipitati di DNA e sali vengono incorporati nella cellula. Per la formazione del precipitato sono stati aggiunti al DNA sciolto in 0.5 ml di acqua bidistillata sterile, una soluzione di 0.5 ml di CaCl_2 500mM; la miscela quindi viene aggiunta goccia a goccia ad 1 ml di soluzione HNP (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 70mM di Na_2HPO_4) in presenza di ossigeno (insufflando aria con una pipetta da 2 ml). Si lasciano esprimere i plasmidi per un massimo di 16 h, dopodiché si preleva il DMEM 1% L-Glutammina e lo sostituisce con il normale terreno di coltura. A 48 h dall'inizio della trasfezione si effettua la lisi cellulare.

ANALISI DELL' APOPTOSI: Le linee cellulari C3ABR, L6, L6pcDNA, L6-Flag-ATM-wt (5x10⁵ per ml) sono state trattate con 250 ng/ml di TRAIL. Dove indicato le cellule sono state anche preincubate con 5-Fluorouracile (100 mg/ml per 4 o 8 ore). L'apoptosi è stata quindi valutata mediante analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia, visualizzata mediante marcatura con ioduro di propidio (Sigma), usando un citofluorimetro a flusso (FACScan) (Becton Dickinson). La colorazione con lo ioduro di propidio è stata eseguita come descritto da Kalejta et al. (Kalejta et al. 1999). L'apoptosi specifica è stata ricavata con la seguente formula:

$$\frac{(\% \text{ delle cellule apoptotiche stimolate} - \% \text{ delle cellule apoptotiche non stimolate})}{(100 - \% \text{ delle cellule apoptotiche non stimolate})}$$

IMMUNOBLOTTING: le cellule sono state lisate utilizzando un tampone di lisi (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 mM NaF, 1 mM orthovanadate, 10 µg/ml TPCK, 5 µg/ml TLCK, 1 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml soybean trypsin inhibitor, 1µg/ml aprotinin) (Barilà D et al. 2003). Per l'*immunoblotting*, 80-100 µg di estratto di proteine totali, dosato con il metodo di Bradford, è stato risolto mediante SDS-PAGE, trasferito su una membrana di nitrocellulosa ed ibridato con specifici anticorpi primari. Successivamente la membrana viene incubata con uno specifico anticorpo secondario che riconosce la frazione FC del primario e che è coniugato con una perossidasi di rafano (HRP). Tutti gli immunoblots sono stati rivelati con metodo di chemiluminescenza (ECL-Amersham) su lastra fotografica (Kodak).

IMMUNOPRECIPITAZIONE: con questa tecnica è stata isolata una specifica proteina da una miscela proteica. Alla base dell'intera procedura c'è la reazione di riconoscimento selettivo di un anticorpo con uno specifico antigene proteico. Tale riconoscimento comporta la formazione di un complesso antigene-anticorpo; il frammento Fc dell'anticorpo viene riconosciuto dalla proteina G coniugata ad una resina di sefariosio. Recuperando la resina di sefariosio si ottiene la separazione della proteina di interesse dalle rimanenti presenti nel lisato proteico di partenza. È stato incubato 1 mg di estratto cellulare per due ore alla temperatura di 4°C nel tampone di lisi contenente inibitori ed il sefariosio coniugato con lo specifico anticorpo primario.

L'immunoprecipitato viene infine lavato per tre volte con tampone di lisi contenente inibitori.

SAGGIO CHINASICO: sono state trasfettate in modo transiente cellule HEK-293T con un costrutto pcDNA-FLAG ATM wild type con il metodo del calcio fosfato e, trascorso il tempo necessario affinché la proteina fosse espressa dalle cellule, queste sono state stimulate con il radiomimetico NCS (100 ng/ml per 1 ora), in modo da provocare danno al DNA e la conseguente attivazione di ATM. È stata quindi immunoprecipitata la proteina ATM-FLAG ora attivata ed è stata incubata a vari tempi con i substrati GST-c-FLIP, GST-ITCH e GST-p53, prodotto e purificato da E. coli in presenza di ATP con il gruppo fosfato in γ marcato con l'isotopo radioattivo ^{32}P (Perkin Elmer). La reazione di incorporazione è avvenuta in un opportuno tampone chinasi contenente Hepes (20mM), NaCl (50 mM), MgCl_2 (10mM), MnCl_2 (10mM), DTT (1mM), incubato per 15 e 30 minuti a 30°C. Per ciascun punto di reazione sono stati utilizzati 5 μCi di ^{32}P . Abbiamo quindi separato su gel di acrilamide il prodotto del saggio chinasi ed abbiamo visualizzato, mediante autoradiografia, in quale dei substrati fosse avvenuta l'incorporazione del ^{32}P ad opera di ATM.

RISULTATI

L'attività chinasi di ATM è necessaria per la sensibilizzazione di cellule linfoblastoidi all'apoptosi indotta da TRAIL.

Recentemente è stato pubblicato dal nostro laboratorio che cellule linfoblastoidi derivanti da pazienti con Atassia Telangectasica (AT) sono significativamente resistenti all'apoptosi indotta da Fas; è stato osservato inoltre che la caratteristica resistenza all'apoptosi mediata dalla stimolazione del recettore Fas, correla con un incremento nelle cellule AT dell'espressione della proteina antiapoptotica c-FLIP_L. Abbiamo dimostrato quindi che l'attività chinasi di ATM può modulare negativamente i livelli di c-FLIP_L ed essere quindi un elemento importante per la modulazione della sensibilità cellulare all'apoptosi indotta da Fas (Stagni V et al., 2008). TRAIL è stato dimostrato indurre apoptosi in seguito a legame a due dei suoi recettori DR4 e DR5, sostanzialmente in modo del tutto analogo a Fas (Wang S et al., 2003). Ci siamo quindi chiesti se l'attività chinasi di ATM potesse svolgere un ruolo importante anche nella modulazione dell'apoptosi indotta da TRAIL.

Per investigare se ATM possa mediare l'apoptosi indotta da TRAIL, abbiamo comparato la sensibilità di due linee cellulari linfoblastoidi largamente usate negli studi sull'attività di ATM, una derivante da un donatore sano (C3ABR) utilizzato come controllo (Lavin et al., 1981) ed una derivante da un paziente AT (L6) (Gilad et al., 1996). Le cellule sono state incubate in presenza di hizTRAIL (*human isoleucine zipper*) ricombinante, prodotto e purificato da E. coli. L'aggiunta di una coda di isoleucine favorisce la multimerizzazione di TRAIL che di conseguenza è in grado di legare il recettore e favorirne la trimerizzazione e l'attivazione e di innescare quindi la risposta apoptotica (Ganten et al., 2006). L'apoptosi è stata quindi valutata mediante analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia, visualizzata mediante marcatura con ioduro di propidio. In tal modo abbiamo dimostrato che cellule AT sono significativamente resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL (Figure I). Lo stesso risultato è stato ottenuto anche utilizzando altre due linee cellulari derivate da pazienti AT, quali le GM-03189 e le AT-044 (Figura I A).

Per validare ulteriormente la nostra ipotesi ci siamo avvalsi di due linee cellulari precedentemente generate nel nostro laboratorio a partire dalla linee AT L6, stabilmente ricostituite per l'espressione di ATM (L6-FLAG-ATM-wt) oppure stabilmente trasfettate con il solo vettore vuoto come controllo (L6-pcDNA3) (Stagni V et al., 2008). In accordo con l'ipotesi postulata, la ricostituzione dell'espressione di ATM nelle cellule L6-FLAG-ATM-WT sensibilizza drammaticamente queste cellule all'apoptosi indotta da TRAIL, rispetto alle stesse cellule trasfettate con un vettore vuoto di controllo (Figure I B). Globalmente questi esperimenti consentono di concludere che ATM modula in modo significativo la sensibilità cellulare all'apoptosi indotta da TRAIL.

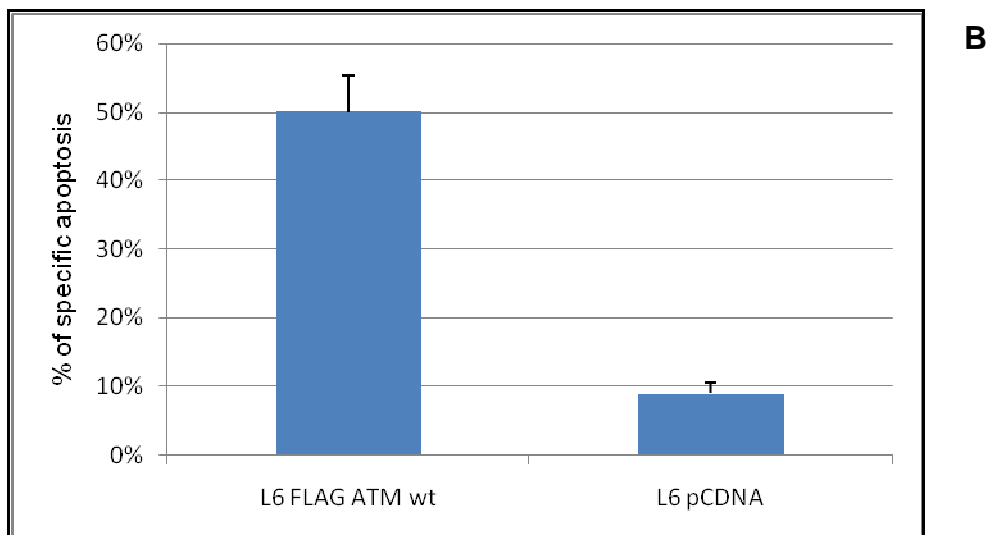
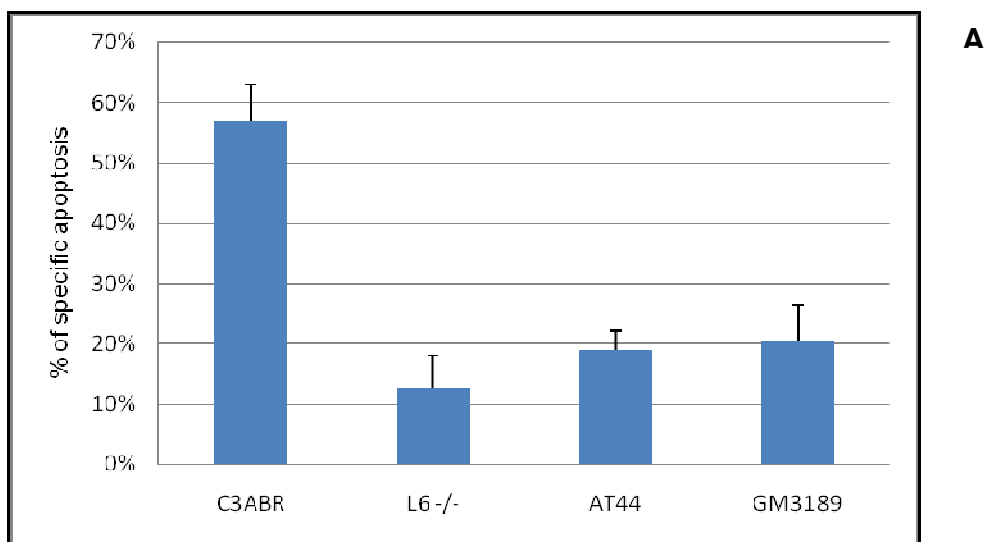
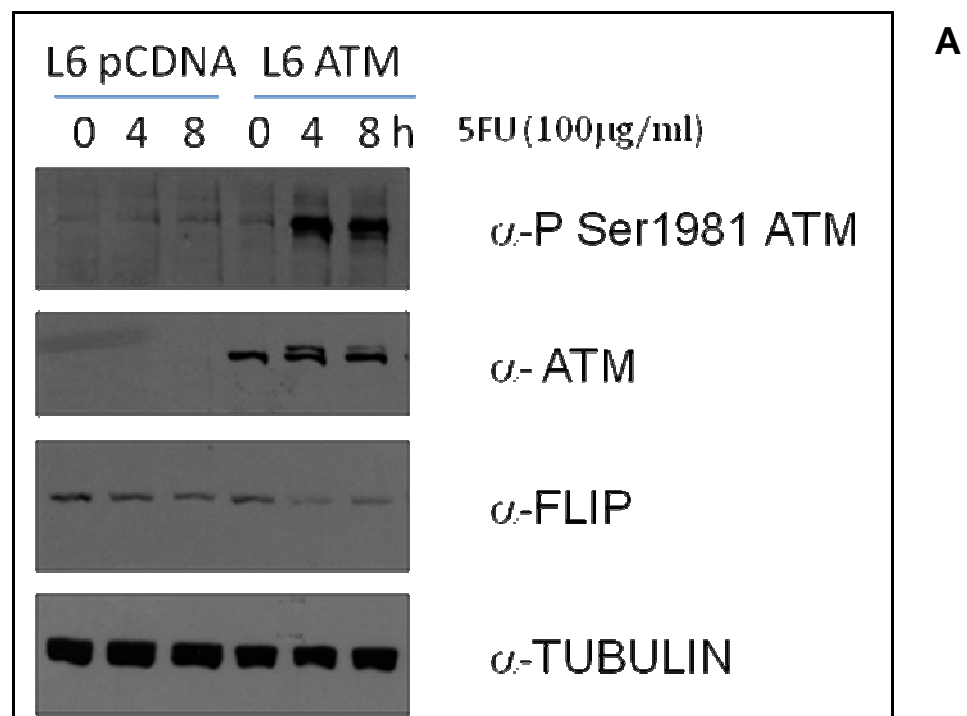


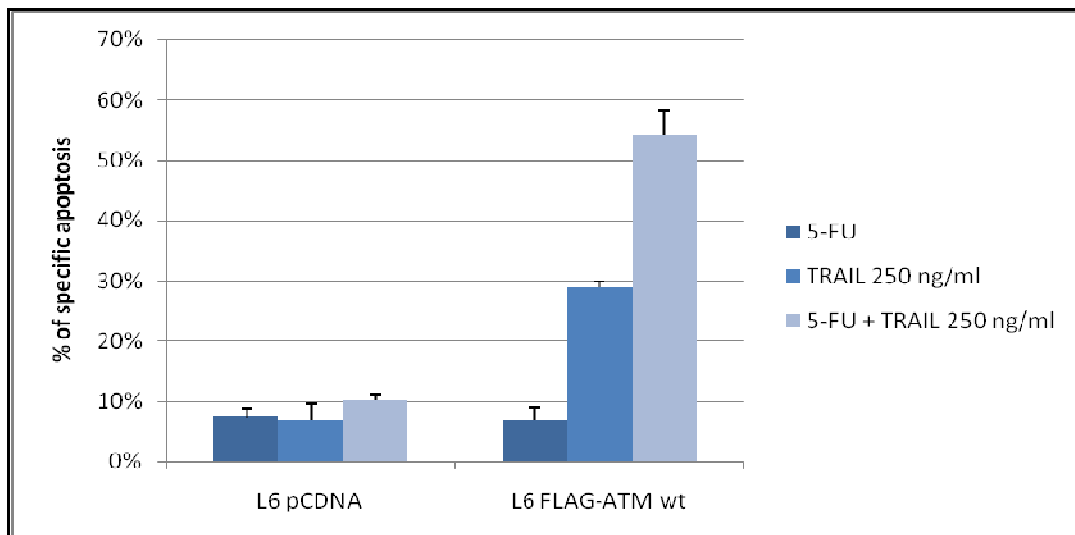
Figura I. Le cellule che non esprimono ATM sono resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL. (A) Stimolazione di cellule linfoblastoidi che esprimono ATM (C3ABR) e cellule che non esprimono ATM (L6-/-, AT44, GM3189) sono state trattate con 250 ng/ml di TRAIL. (B) Stimolazione di cellule linfoblastoidi che sono state ricostituite con un vettore che esprime ATM (L6 FLAG-ATM wt) e cellule che sono state ricostituite con un vettore vuoto (L6 pcDNA) sono state trattate con 250 ng/ml di TRAIL. L'apoptosi è stata determinata mediante l'analisi della frammentazione del DNA con analisi dell'ipodiploidia al citofluorimetro.

Il pretrattamento con il 5-fluorouracile richiede l'attività chinastica di ATM per abbassare i livelli della proteina c-FLIP_L e sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da TRAIL

TRAIL è stato recentemente proposto come un potenziale nuovo chemioterapico in quanto in grado di indurre apoptosi principalmente nelle cellule tumorali senza per altro mostrare significativa tossicità in cellule normali (Duiker EW et al., 2006). Un ostacolo importante all'utilizzo di TRAIL in terapia tumorale, deriva dall'osservazione che circa il 60% delle linee tumorali sono significativamente resistenti a TRAIL (Walczak H et al., 1999). Una delle maggiori cause di resistenza è associata all'alta espressione della proteina antiapoptotica FLIP_L. Abbiamo precedentemente dimostrato che ATM sensibilizza le cellule all'apoptosi indotta da TRAIL favorendo la degradazione della proteina FLIP_L (Stagni V et al., 2008). Ci siamo quindi chiesti se tale meccanismo potesse essere alla base di alcuni approcci mirati a sensibilizzare cellule resistenti a TRAIL, basati sul trattamento combinato con alcuni agenti chemioterapici, noti per indurre danno al DNA. In particolare, il pretrattamento con 5-FU, (un antimetabolita, analogo delle basi pirimidiniche che agisce compromettendo la stabilità del DNA in cui viene incorporato), inibisce i livelli di espressione di FLIP_L e sensibilizza a TRAIL linee di epatocarcinoma resistenti (Ganten et. al., 2004). Abbiamo quindi verificato l'ipotesi che l'attività chinastica di ATM possa essere necessaria per la sensibilizzazione dipendente da 5-FU all'apoptosi indotta da TRAIL. Le linee linfoblastoidi deficienti per l'espressione di ATM (L6-pcDNA3) o stabilmente ricostituite con un vettore che gli consente di esprimere ATM (L6-ATM-wt) sono state incubate con 5-FU per vari tempi. Abbiamo quindi analizzato mediante *immunoblotting* l'attivazione di ATM, rilevata mediante anticorpi anti fosfo-Serina 1981, un marcatore noto dell'attivazione ATM (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003), nonché i livelli della proteina c-FLIP_L. Il trattamento con 5-FU induce l'attività chinastica di ATM parallelamente ad una marcata

discesa dei livelli di c-FLIP_L. Al contrario in cellule deficienti per l'espressione di ATM non si osserva alcuna variazione nei livelli di FLIP_L (figura II A). Ciò suggerisce che l'attività chinastica di ATM è assolutamente necessaria affinché il 5-FU possa mediare il decremento dei livelli di FLIP_L. Coerentemente, la preincubazione con il 5-FU non sortisce alcun effetto sulla sensibilizzazione all'induzione apoptotica da TRAIL in cellule che non hanno ATM, mentre le stesse cellule ricostituite con ATM presentano una sensibilità basale all'induzione all'apoptosi da TRAIL, che viene ulteriormente incrementata dall'azione del 5-FU (Figura II B). Pertanto, in questo sistema sperimentale, l'attività chinastica di ATM è necessaria per trasdurre la riduzione dell'espressione di c-FLIP_L e la sensibilizzazione all'apoptosi indotta da TRAIL, mediata dal pretrattamento con 5-FU.



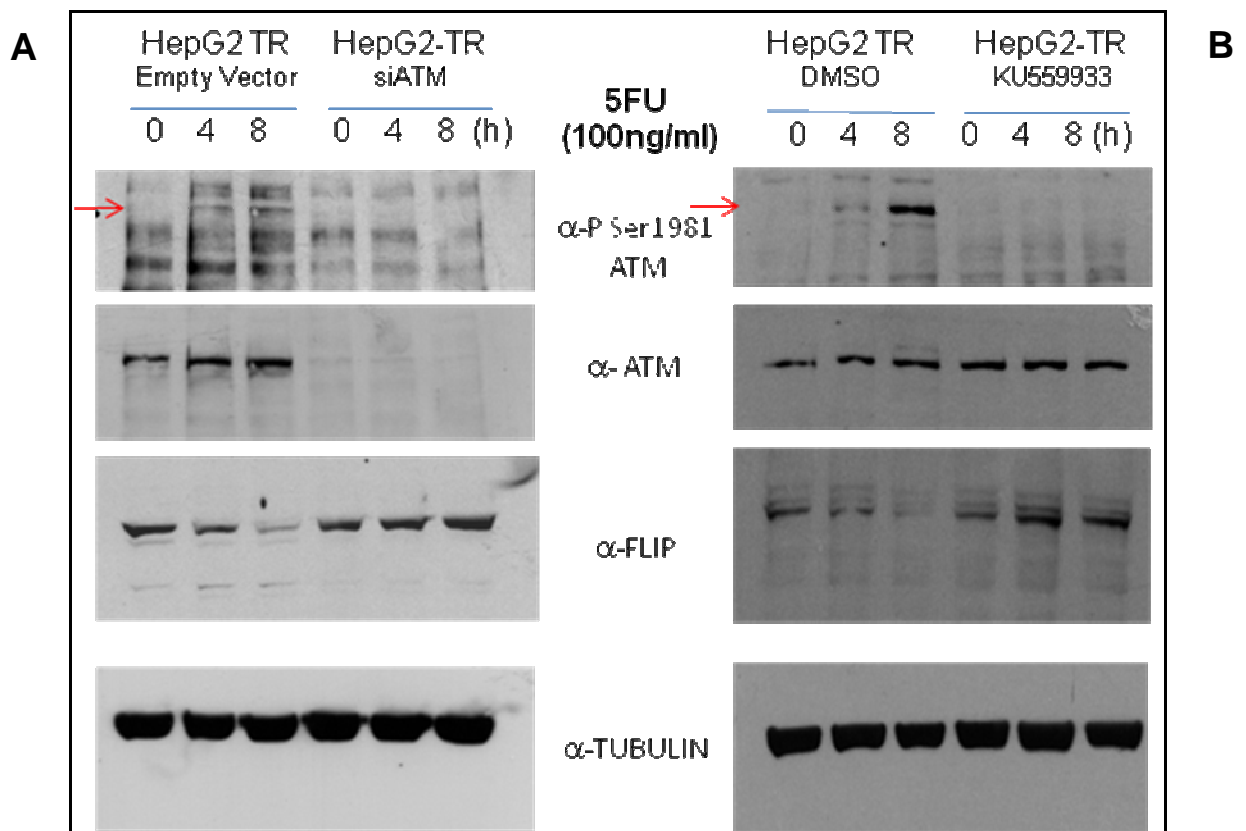


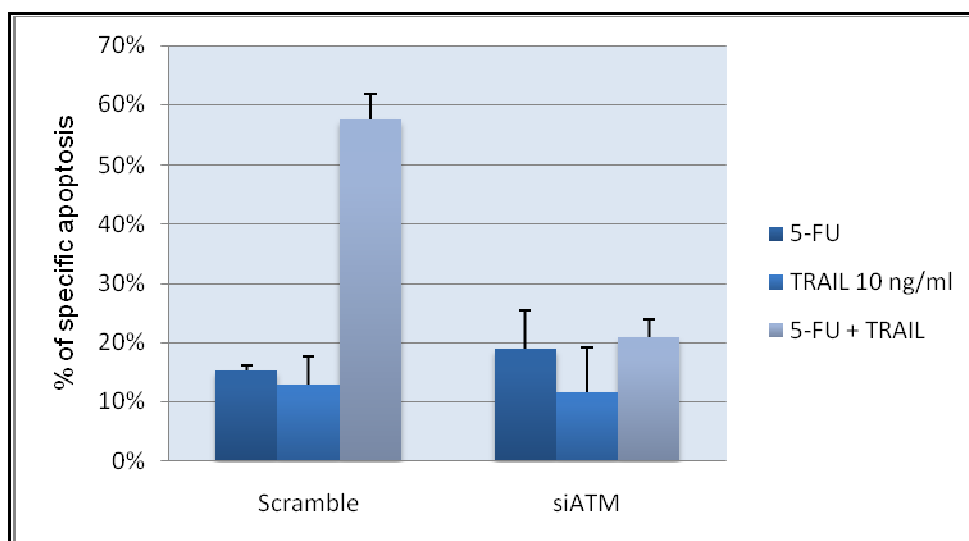
B

Figura II. Il 5-FU attiva la chinasi ATM, riduce i livelli di FLIP_L e sensibilizza all'apoptosi indotta da TRAIL (A) cellule linfoblastoidi ricostituite con un vettore che esprime ATM (L6 FLAG-ATM wt) e cellule ricostituite con un vettore vuoto (L6 pCDNA) sono state trattate con 100 µg/ml di 5-FU. Successivamente l'estratto proteico è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli delle proteine sono stati analizzati mediante *western blot*. (B) Le stesse cellule sono state preincubate per 8 ore con 100 µg/ml di 5-FU ed in seguito trattate per 16 ore con 250 ng/ml di TRAIL. L'apoptosi è stata determinata mediante l'analisi della frammentazione del DNA con analisi dell'ipodiploidia al citofluorimetro.

Come accennato, il pretrattamento con 5-FU è stato proposto come approccio per sensibilizzare a TRAIL cellule di epatocarcinoma resistenti (Ganten TM et al., 2004). Ci siamo quindi chiesti se l'attività chinasi di ATM potesse essere necessaria, anche in questo contesto, per modulare i livelli di FLIP_L e la conseguente sensibilizzazione a TRAIL. Per verificare questa ipotesi ci siamo avvalsi della stessa linea cellulare utilizzata da Ganten TM et al, 2004, HepG2-TR, una linea cellulare precedentemente selezionata dalle HepG2 per essere resistente all'apoptosi indotta da TRAIL e che può essere resa sensibile a TRAIL mediante pretrattamento con il 5-FU (Ganten TM et al., 2004). Abbiamo quindi potuto dimostrare, mediante *immunoblotting* con anticorpi specifici che, anche in questo sistema cellulare il 5-FU, analogamente alle linee linfoidi, è in grado di innescare l'attivazione della chinasi ATM e che ciò correla con un parallelo abbassamento dei livelli di c-FLIP_L (Figura III A e III B). Inoltre, l'inibizione genetica e farmacologica dell'attività chinasi di ATM impedisce che il pretrattamento con il 5-FU regoli negativamente i livelli di c-FLIP_L, supportando l'ipotesi che l'attività chinasi di

ATM sia necessaria per modulare i livelli della proteina c-FLIP_L (Figura III A e III B). Infatti, l'inibizione dell'espressione di ATM mediante l'utilizzo di un costrutto che consente l'espressione di uno specifico *small interference* RNA per ATM (shATM) impedisce in modo significativo la capacità del 5-FU di abbassare i livelli di c-FLIP_L (Figura III A). Analogamente, l'inibizione farmacologica dell'attività chinastica di ATM, ottenuta utilizzando il KU-55933, uno specifico inibitore di ATM (Hickson I et al., 2004), somministrato alle cellule prima di trattarle con il 5-FU, reverte il decremento di c-FLIP_L indotto dal trattamento con il 5-FU, che invece avviene nel controllo in cui le cellule sono trattate con il solo DMSO (Figura III B). Tali esperimenti consentono di concludere che anche in questo sistema l'attività chinastica di ATM è necessaria per consentire la trasduzione del segnale a valle del trattamento con 5-FU e l'abbassamento dei livelli di FLIP_L. Coerentemente con queste osservazioni, cellule in cui l'espressione di ATM è stata fortemente ridotta mediante espressione del costrutto shATM, perdono la capacità di essere sensibilizzabili all'apoptosi indotta TRAIL, come osservato mediante analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia dopo marcatura con ioduro di propidio (Figura III C).





C

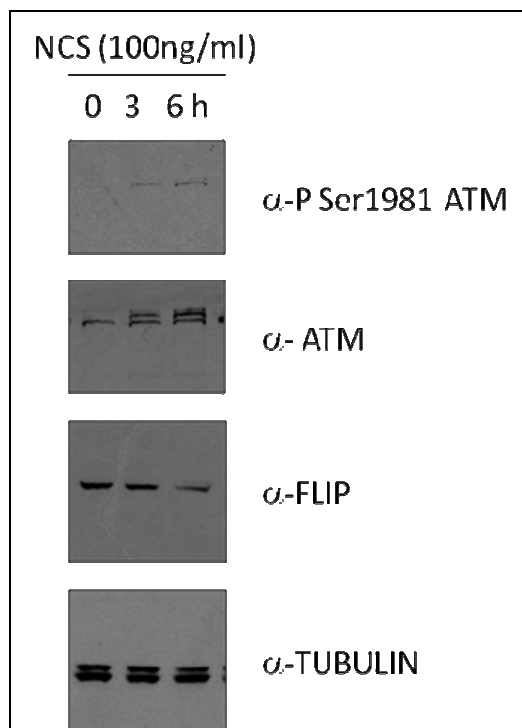
Figura III. Il 5-FU non è in grado di abbassare i livelli di c-FLIP_L e sensibilizzare all'apoptosi indotta da TRAIL quando viene inattivato ATM. (A) Cellule di epatocarcinoma resistenti a TRAIL (HepG2TR) trasfettate in modo transiente con un vettore vuoto o con *interference* di ATM sono state trattate con 100 µg/ml di 5-FU. Successivamente l'estratto proteico è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli delle proteine sono stati analizzati mediante *western blot*. (B) le stesse cellule sono state trattate con DMSO come controllo o con KU55933, un inibitore specifico di ATM (10 µM prima di essere trattate con 100 µg/ml di 5-FU). (C) le cellule trasfettate con il vettore vuoto o con *interference* di ATM sono state preincubate per 8 ore con 100 µg/ml di 5-FU ed in seguito trattate per 16 ore con 250 ng/ml di TRAIL. L'apoptosi è stata determinata mediante l'analisi della frammentazione del DNA con analisi dell'ipodiploidia al citofluorimetro.

Il trattamento con diversi chemioterapici che inducono danno al DNA favorisce l'induzione dell'attività chinastica di ATM e la riduzione dei livelli di FLIP_L in cellule derivanti da Linfoma di Hodgkin

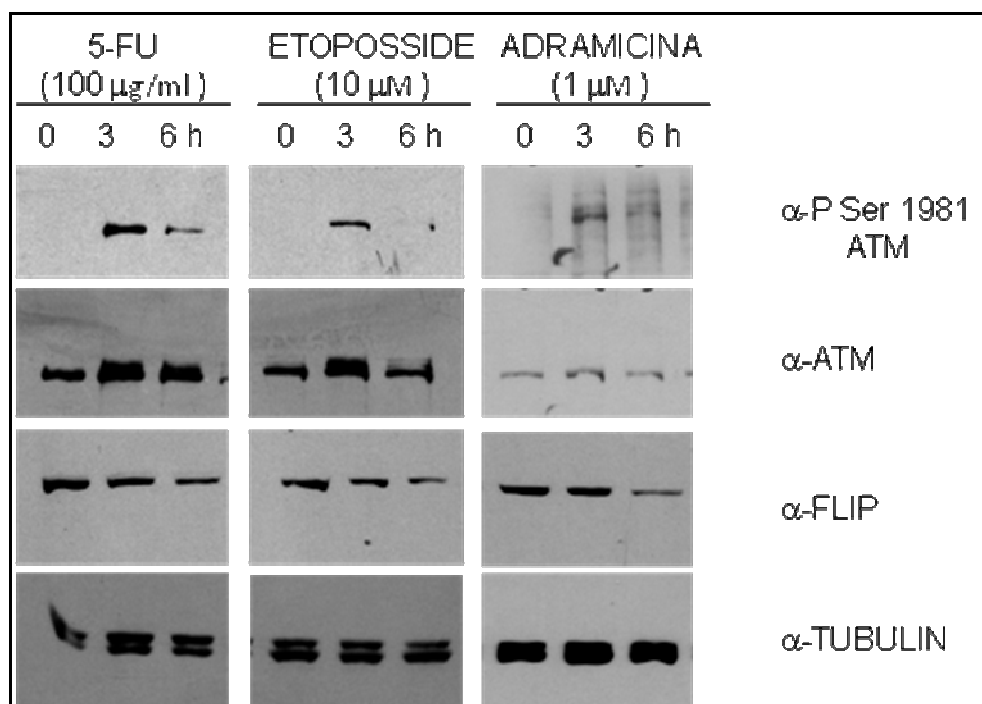
Linee cellulari derivate da linfoma di Hodgkin sono fortemente resistenti a Fas e TRAIL, in quanto caratterizzate da un'aberrante espressione elevata di FLIP_L (Thomas RK et al., 2002). e da un'aberrante riduzione dell'espressione di ATM (Gumy Pause F et al., 2003; Liberzon E et al., 2004). In tale sistema è stato dimostrato che l'abbassamento dei livelli di FLIP_L è sufficiente a sensibilizzare le stesse cellule a TRAIL. Inoltre, abbiamo precedentemente osservato che la sovraespressione di ATM è in grado di indurre la riduzione dei livelli di FLIP_L e di sensibilizzare le stesse cellule

all'apoptosi indotta da Fas (Stagni V et al., 2008). Ci siamo quindi chiesti se in questo sistema l'induzione dell'attività endogena di ATM potesse essere sufficiente a mediare l'abbassamento dei livelli di FLIP_L. La linea cellulare derivante da Linfoma di Hodgkin, L591, e' stata quindi incubata in presenza di neocarzinostatina (NCS), una sostanza radiomimetica che notoriamente induce l'attivazione della chinasi ATM (Uziel T et al., 2003). L'attivazione di ATM è visualizzabile attraverso la fosforilazione della serina 1981 (Bakkenist CJ and Kastan MB, 2003). L'attivazione della chinasi ATM determina la forte diminuzione del livello della proteina c-FLIP_L (Figura IV A). Abbiamo quindi voluto testare la capacità di diverse sostanze note come agenti che danneggiano il DNA e che sono comunemente utilizzate come chemioterapici, per verificare la loro abilità di attivare ATM in modo analogo all'NCS e, soprattutto, la loro abilità ad abbassare i livelli di c-FLIP_L.

Le cellule sono state pertanto incubate per diversi tempi con delle sostanze usate in trattamenti clinici come chemioterapici, noti per provocare danno al DNA: Il 5-FU, appartenente alla classe degli analoghi nucleosidici, che agiscono sull'integrità del DNA, generalmente in seguito alla loro incorporazione durante la replicazione o durante la sintesi del DNA per il riparo per escissione, causando il blocco delle forche replicative e l'interruzione dell'elica (Sampath D et al., 2003), l'adramicina e l'etoposside, entrambi inibitori della topoisomerasi II, che agiscono formando un complesso tra il DNA e la topoisomerasi ed ostacolando la fase specifica del processo catalitico che consiste nella rigiunzione del DNA precedentemente tagliato (Nitiss JL., 2002; Montecucco A and Biamonti G, 2007). L'attivazione di ATM ed i livelli di FLIP_L sono stati rivelati mediante *immunoblotting* con specifici anticorpi. Come mostrato, il trattamento con ciascuna delle sostanze testate induce l'attivazione di ATM, cui si associa una marcata diminuzione dei livelli proteici di FLIP_L (Figura IV B). Pertanto possiamo concludere che il trattamento con questi chemioterapici può essere utilizzato per abbassare i livelli di FLIP_L e potrebbe fornire un nuovo meccanismo per sensibilizzare cellule tumorali all'apoptosi indotta da TRAIL.



A



B

Figura IV. Sostanze che danneggiano il DNA attivano ATM ed abbassano i livelli della proteina FLIP_L. (A) Cellule di Linfoma di Hodgkin (L591) sono state trattate per 3 e 6 ore con 100 ng/ml di NCS. (B) le cellule L591 sono state trattate per 3 e 6 ore con le seguenti sostanze chemioterapiche.

Rispettivamente 5-FU (100 µg/ml), Etoposide (10µM), Adramicina (10 µM). Successivamente l'estratto proteico è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli delle proteine sono stati analizzati mediante *western blot*.

L'attività chinastica di ATM modula la stabilità della proteina FLIP_L attraverso la via del proteasoma

In precedenza è stato dimostrato che l'attività chinastica di ATM non modula in modo significativo l'espressione di FLIP_L a livello trascrizionale, mentre è in grado di modulare la stabilità della proteina FLIP_L (Stagni V et al., 2008). Ci siamo quindi domandati se ATM possa modulare la degradazione di FLIP_L attraverso la via del proteasoma. Abbiamo quindi incubato cellule che non hanno ATM (L6-pcDNA3) e cellule in cui l'espressione di ATM è stata ricostituita mediante espressione di un costrutto che codifica per la proteina *wt* (L6-ATM-*wt*) oppure per un suo mutante cataliticamente inattivo (L6-ATM-kin-), in presenza o in assenza dell'inibitore del proteasoma MG132. Il livello di espressione di FLIP è stato quindi rilevato mediante *immunoblotting* con specifici anticorpi. Coerentemente con quanto osservato in precedenza, cellule che non esprimono ATM funzionale presentano livelli di FLIP_L sensibilmente maggiori delle stesse cellule esprimenti ATM-*wt* (Figura V). Inoltre, l'inibizione del proteasoma, induce un forte accumulo di FLIP_L nelle sole cellule che esprimono ATM-*wt*. Lo stesso trattamento non altera i livelli di FLIP in assenza di ATM o in presenza di una sua forma cataliticamente inattiva (Figura V A). Un analogo risultato è stato ottenuto trattando le stesse cellule con il Bortezomib, un altro inibitore del proteasoma (Figura V B). Questi esperimenti suggeriscono quindi che i livelli della proteina FLIP_L siano specificamente modulati dalla via del proteasoma in modo dipendente dall'attività chinastica di ATM.

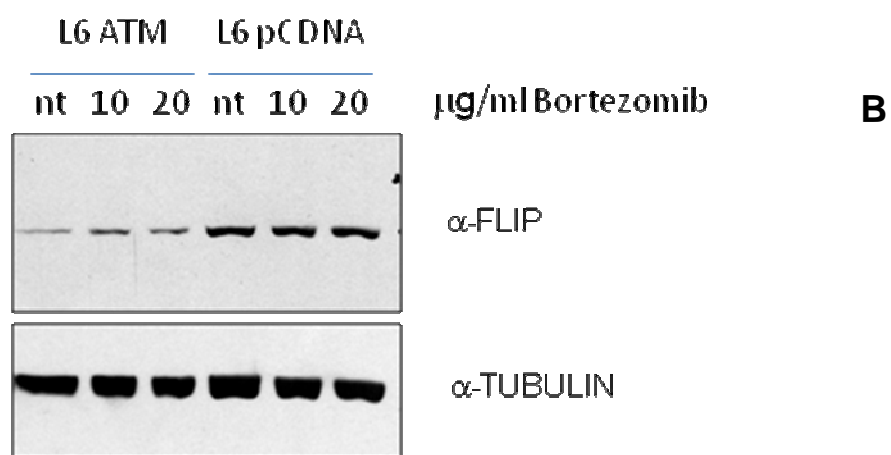
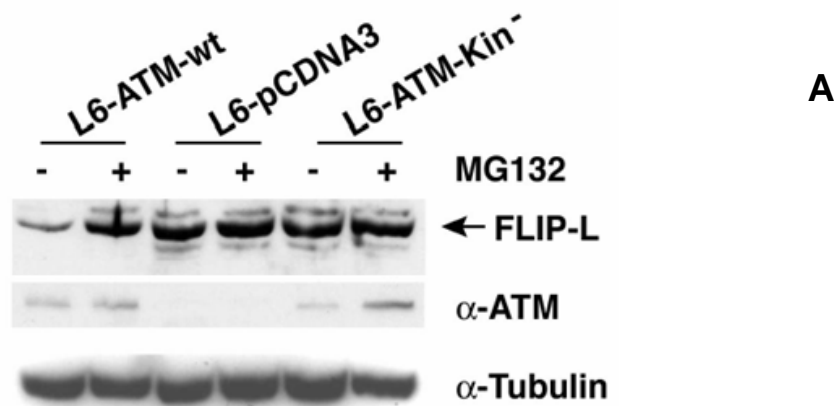


Figura V. L'attività chinastica di ATM modula la stabilità della proteina c-FLIP attraverso la via del proteasoma. (A) cellule linfoblastoidi ricostituite con un vettore che esprime ATM (L6 FLAG ATM wt) e cellule ricostituite con un vettore vuoto (L6 pcDNA) sono state trattate con 10 μ M di MG132 per 1 ora. Successivamente l'estratto proteico è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli delle proteine sono stati analizzati mediante *western blot*. (B) Le stesse cellule sono state trattate per 2 ore con il BORTEZOMIB alla concentrazione di 10 e 20 μ M.

Il 5-FU provoca l'abbassamento dei livelli di c-FLIP_L e sensibilizza le cellule di epatocarcinoma a TRAIL con un meccanismo indipendente da p53

Il fattore di trascrizione p53 è considerato uno dei maggiori oncosoppressori e la sua funzionalità è alterata in oltre in 50% dei tumori umani. p53 è anche uno dei substrati principali di ATM e ne media molte funzioni (Khanna KK et al., 1998). Inoltre, p53 è in grado di modulare la stabilità proteasoma dipendente della proteina FLIP_L (Fukazawa T et al., 2001). Queste tre importanti osservazioni ci hanno indotto a

verificare se p53 potesse svolgere un ruolo importante all'interno del meccanismo molecolare da noi proposto mediante il quale l'attività chinastica di ATM modula l'espressione della proteina FLIP_L. Per rispondere a questa domanda, abbiamo analizzato la capacità del 5-FU di provocare l'abbassamento dei livelli di FLIP in un modello di epatocarcinoma, le Hep3B, che sono state caratterizzate per essere prive di p53 (Farshid M and Tabor E, 1992). In questo sistema, il 5-FU è in grado di sensibilizzare le cellule Hep3B all'apoptosi indotta da TRAIL (Ganten TM et al., 2004), suggerendo quindi che l'assenza di p53 non alteri la funzionalità di questa risposta. Coerentemente con quanto pubblicato, abbiamo osservato mediante *immunoblotting*, che il 5-FU provoca in queste cellule l'attivazione di ATM e l'abbassamento dei livelli di FLIP_L in modo del tutto analogo a quanto osservato nelle cellule HepG2-TR (Figura VI A). Per supportare ulteriormente l'ipotesi che p53 non sia necessario per la regolazione dei livelli di FLIP_L in modo dipendente da ATM, l'espressione di p53 è stata bloccata geneticamente e farmacologicamente, utilizzando sia uno specifico costrutto per l'espressione di siRNA di p53 (shp53) oppure preincubando le cellule HepG2-TR con la pifitrina, un ben caratterizzato inibitore di p53 (Komarov PG et al., 1999). In entrambi i casi, il 5-FU, attivando ATM, abbassa i livelli di FLIP_L (Figura VI A). E' inoltre molto interessante osservare che l'inibizione dell'attività o dell'espressione di p53 non altera la capacità del 5-FU di sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da TRAIL, come rivelato mediante analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia (Figura VI B). L'insieme di questi dati ci ha quindi portato a concludere che l'attività chinastica di ATM modula i livelli della proteina c-FLIP_L in modo indipendente da p53. Pertanto tale meccanismo molecolare può essere utilizzato per sensibilizzare diversi tumori a TRAIL indipendentemente dallo stato di p53.

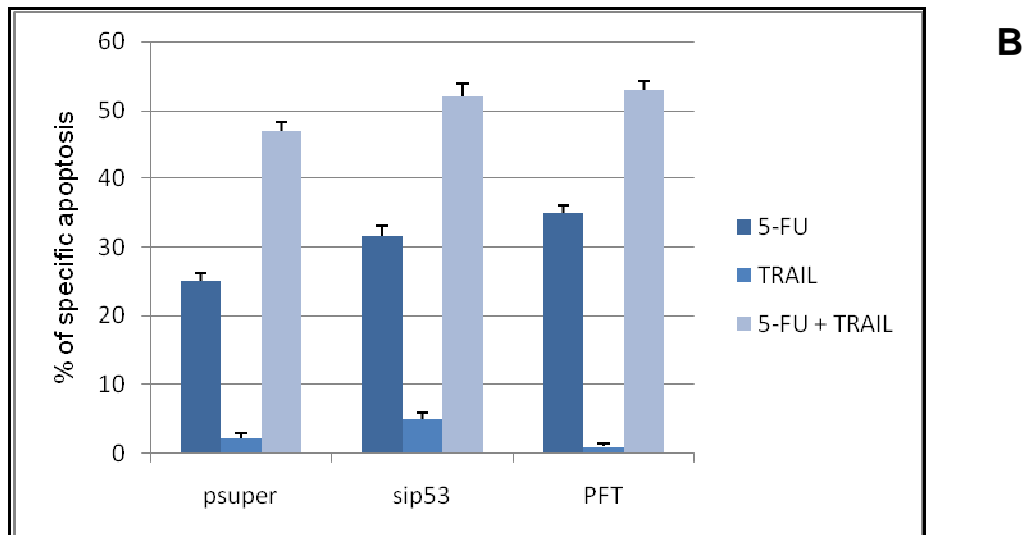
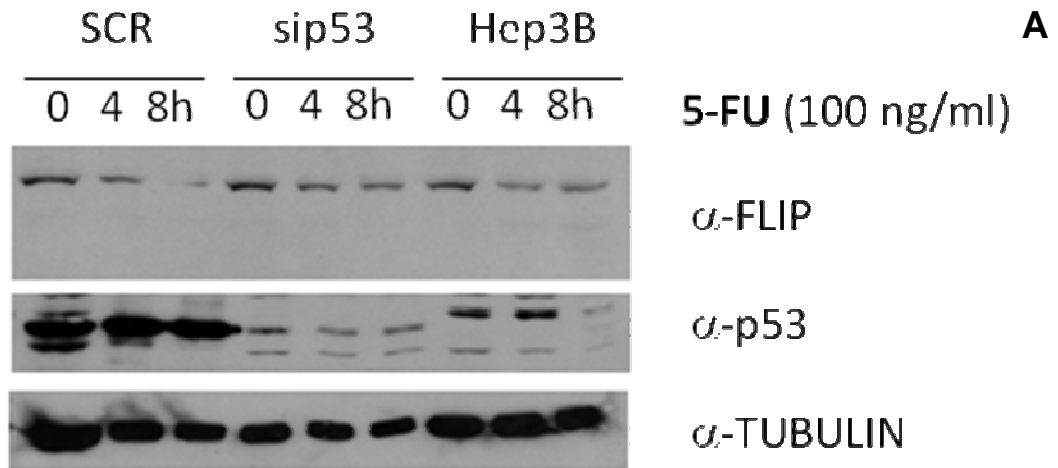


Figura VI. Il meccanismo di sensibilizzazione delle cellule di epatocarcinoma da parte del 5-FU è indipendente da p53. (A) Cellule di epatocarcinoma resistenti a TRAIL con espressione normale di p53 (HepG2TR) sono state trasfettate in modo transiente con un vettore vuoto o con *interference* di p53 e sono state trattate con 100 μ g/ml di 5-FU. Analogo trattamento è stato effettuato su cellule Hep3B, che non esprimono p53. Successivamente l'estratto proteico è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli delle proteine sono stati analizzati mediante *western blot*. (B) le cellule trasfettate con il vettore vuoto o con *interference* di p53 sono state preincubate per 8 ore con 100 μ g/ml di 5-FU ed in seguito trattate per 16 ore con 250 ng/ml di TRAIL. Le hepG2TR sono state preincubate con l'inibitore di p53 Pifitrina (PFT) 10 μ M. L'apoptosi è stata determinata mediante l'analisi della frammentazione del DNA con analisi dell'ipodiploidia al citofluorimetro.

L'E3 ubiquitin ligasi ITCH è un substrato diretto di ATM

Il meccanismo molecolare con cui ATM modula la stabilità proteica di FLIP_L è ancora da chiarire. In letteratura ATM è stato descritto come modulatore dell'ubiquitinazione e della degradazione proteasoma dipendente di diverse proteine (Taylor A et al., 2002; Mu JJ et al., 2007). In particolare, ATM modula la stabilità di NEMO fosforilandola direttamente ed alterandone l'accessibilità al proteasoma, mentre modula la stabilità di p53 in modo indiretto, fosforilando e modulando in tal modo l'attività delle ubiquitine ligasi Mdm2 e COP-1 che ne regolano la degradazione ubiquitina-proteasoma dipendente (Wu ZH et al., 2006; Khosravi R. et al., 1999; Maya R et al., 2001; Dornan D et al., 2006).

Alla luce di queste osservazioni possiamo quindi ipotizzare almeno due meccanismi molecolari: 1) ATM modula la stabilità di FLIP_L mediante fosforilazione diretta di FLIP stesso; 2) ATM modula la stabilità di FLIP_L mediante fosforilazione di un'E3-ubiquitina ligasi preposta al controllo dei livelli di FLIP_L. Recentemente l'E3-ubiquitina ligasi ITCH è stata identificata come un modulatore importante della stabilità di FLIP_L nella via di traduzione del segnale a valle del recettore TNF (Chang L et al., 2006). Inoltre è stata anche descritta una regolazione dell'attività di ITCH in risposta a danno del DNA.

Abbiamo quindi voluto testare i due possibili meccanismi molecolari chiedendoci se ATM potesse fosforilare direttamente FLIP_L e/o fosforilare ITCH. ATM fosforila prevalentemente residui di Ser e Thr all'interno del motivo S/TQ. L'analisi della sequenza aminoacidica di FLIP_L e di ITCH ha mostrato la presenza in entrambe le proteine di potenziali siti target di ATM (Figura VII). Abbiamo quindi trasfettato in modo transiente cellule HEK 293T con un costrutto pcDNA-FLAG ATM *wild type* e, trascorso il tempo necessario affinché la proteina fosse espressa dalle cellule, le abbiamo stimulate con il radiomimetico NCS in modo da provocare danno al DNA e la conseguente attivazione di ATM. Abbiamo quindi immunoprecipitato la proteina ATM-FLAG ora attivata, e l'abbiamo incubata a vari tempi con i substrati GST-c-FLIP, GST-ITCH e GST-p53 come substrato di controllo positivo in quanto noto per essere fosforilato da ATM in seguito a danno al DNA. in presenza di ATP con il gruppo fosfato in γ marcato con l'isotopo radioattivo ³²P. Abbiamo quindi separato su gel di acrilamide il prodotto del saggio chinasi ed abbiamo visualizzato, mediante autoradiografia, in quale dei

substrati fosse avvenuta l'incorporazione del ^{32}P ad opera di ATM. E' possibile osservare l'incorporazione di fosforo radioattivo in ATM immunoprecipitata (Figura IX). Inoltre, la proteina di controllo GST-p53 risulta essere fosforilata in modo crescente in dipendenza del tempo di incubazione con la chinasi ATM purificata (Figura IX), indicando la riuscita del saggio chinasi. È molto interessante notare che mentre la proteina GST-FLIP_L non risulta fosforilata, ATM induce la fosforilazione della proteina GST-ITCH, anche se con una cinetica più rapida rispetto a p53. Ciò ci consente di concludere che ITCH è un substrato di ATM *in vitro* e suggerisce l'ipotesi che ATM possa modulare la stabilità di FLIP_L mediante la fosforilazione di ITCH.

MSAEVIHQVEEALDTDEKEMLLFLCRDVAIDVPPNVRDLLDIR
ERGLSVGDLAELLYRVRFDLLKRILKMDRKAVETHLLRNPHL
VSDYRVLMAEIGEDLDKSDVSSLIFLMKDYMGRGKISKEKSF
LVVELEKLNLVAPDQLDLEKCLKNIHRIDLKTKIQKYKQSVQGA
GTSYRNVLQAAIQKSLKDPSNNFRLHNGRSKEQRLKEQLGAQQ
EPVKKSIQESEAFLPQSIPEERYKMKSKPLGICLIIDCIGNETELL
RDTFTSLGYEVQKFLHLSMHGISQILGQFACMPEHRDYDSFVC
VLVSRGGSSVYGVQTHSGLPLHHIRRMFMGDSCPYLAGKPK
MFFIQNYVVSEGQLEDSSLLEVDGPAMKNVEFKAQKRGLCTVH
READFFWSLCTADMSLLEQSHSSPSLYLQCLSQLRQERKRPL
LDLLNGYMYDWNSRVSAKEKYYVWLQHTLRKKLILSYT

A

MSDSGSQLGSMGSLTMKSQLQITVISAKLKENKKNWFGPSPYV
EVTVDGQSKKTEKCNNTNSPKWKQPLTVIVTPVSKLHFRVWSH
QTLKSDVLLGTAALDIYETLKSNNMKLEEVVTLQLGGDKEPTE
TIGDLSICLDGLQLESEVVTNGETTCESENGVSLCLPRLECNSAIS
AHCNLCLPGLSDSPISASRVAGFTGASQNDGSRKDETRVST
NGSDDPEDAGAGENRRVSGNNSPSSNGGFKPSRPPRPSRPP
PPTPRRPASVNGSPSATSESDGSSTGSLPPTNTNTNTSEGATS
GLIPLTISGGSGPRPLNPVTAAPLPPGWEQRVDQHGRVYYVD
HVEKRTTWDRPEPLPPGWERRVDNMGRIYYVDHFTRTTTWQR
PTLESVRNIEQWQLQRSQLQGAMQQFNQRFIYGNQDLFATSQ
SKEFDPLGLPPGWEKRTDSNGRVYFVNHNTRTQWEDPRSQ
GQLNEKPLPEGWEMRFTVDGIPYFVDHNRRTTTYIDPRTGKSA
LDNGPQIAYVRDFKAKVQYFRFWCQQLAMPQHITVTRKTLFE
DSFQQIMSFSPQDLRRRLWVIFPGEEGLDYGGVAREWFFLLSH
EVLNPMYCLFEYAGKDNCLQINPASYINPDHLKYFRFIGRFIAM
ALFHGKFIDTGFSLPFYKRILNKPVGLKDLESIDPEFYNSLIWVKE
NNIEECDLEMYFSVDKEILGEIKSHDLKPNGGNILVTEENKEEYI
RMVAEWRLSRGVVEEQTAFFEGFNEILPQQYLQYFDAKELEVL
LCGMQEIDLNDWQRHAIYRHYARTSKQIMFWFVQVKEIDNEKR
MRLQFVTTTCRLPVGGFADLMGSNGPQKFCIEKVGKENWLP
SHTCFNRDLPPYKSYEQLKEKLLFAIETEGFGQE

B

Figura VII. Sequenza amminoacidica delle proteine c-FLIP e ITCH. (A) Sequenza della proteina c-FLIP. Sono evidenziati le tre serine seguite da glutammina (SQ), motivo consenso per i siti putativi di fosforilazione da parte di ATM. (B) Sequenza della proteina ITCH. Sono evidenziati le sei serine seguite da glutammina (SQ) e le tre treonine seguite da glutammina, entrambi motivo consenso per i siti putativi di fosforilazione da parte di ATM (Traven A and Heierhorst J, 2005).

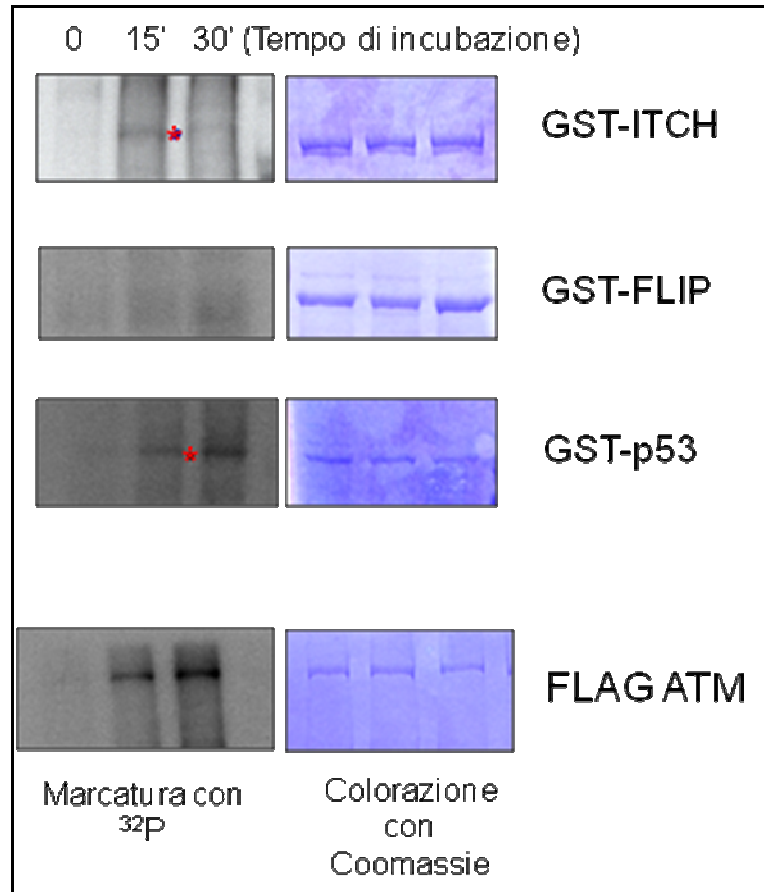


Figura VIII. L'ubiquitina ligasi ITCH è un substrato diretto di ATM. La linea cellulare HEK 293T è stata transientemente trasfettata con un plasmide codificante ATM FLAG wt. Prima dell'estrazione proteica le cellule vengono incubate con NCS (100 ng/ml per 1 ora). L'estratto proteico (1mg) è stato immunoprecipitato con un anticorpo anti-FLAG, diretto contro il TAG di ATM. L'immunoprecipitato è stato successivamente incubato con le GST substrato per 15 o 30 minuti a 30°C in presenza di ATP con fosforo radioattivo. Successivamente l'immunoprecipitato è stato risolto per SDS PAGE ed i livelli di fosforilazione sono stati rilevati mediante autoradiografia. Nella colonna di destra sono visualizzati i livelli delle proteine substrato mediante colorazione del gel con il colorante Coomassie.

DISCUSSIONE

Ciò che viene richiesto ad una terapia antitumorale è di avere un'elevata efficacia nei confronti delle cellule neoplastiche, ma anche una bassa tossicità nei confronti delle cellule normali. L'osservazione che TRAIL uccida selettivamente le cellule tumorali, lo colloca tra i più promettenti nuovi agenti chemioterapici per la terapia antitumorale (Ganten TM et al., 2006). La maggior parte delle linee tumorali è però resistente all'apoptosi indotta da TRAIL e ciò presuppone quindi l'identificazione di quelle vie molecolari che possano essere implicate nella sensibilizzazione delle cellule tumorali a TRAIL. In merito a questo, i due principali obiettivi che si cerca di perseguire sono di ottenere un'efficace sensibilizzazione delle cellule tumorali, senza coinvolgere la resistenza dei tessuti normali. Alcuni dei più ben caratterizzati approcci chemioterapici sono stati proposti in combinazione con TRAIL e, tra questi, agenti che danneggiano il DNA, quali il 5-FU (Ganten TM., 2004), il cisplatino (Shin EC et al., 2002), l'etoposide (Shankar S et al., 2005), e l'adramicina (Dumitru CA et al., 2007), gli inibitori delle HDAC (Johnstone RW, 2002), quali la tricostatina, nonché inibitori del proteasoma, quali il Bortezomib (Zhao X et al., 2008). Sebbene questi cotrattamenti sensibilizzino significativamente le cellule tumorali a TRAIL e, in molti casi non incrementano la tossicità nelle cellule normali, il meccanismo molecolare alla base di questo effetto è ancora ampiamente da chiarire.

Una delle principali caratteristiche della resistenza a TRAIL è rappresentata dall'espressione aberrante della proteina FLIP. Questa caratteristica è stata descritta in diverse linee di epatocarcinoma, così come in linee di linfoma di Hodgkin ed in diverse altre linee tumorali (Okano H et al., 2003; Tepper CG et al., 1999; Thomas RK et al., 2002; MacFarlane M et al., 2002). È interessante osservare che l'abbassamento dei livelli di FLIP è ritenuto un valido strumento per incrementare la sensibilità a TRAIL (Geserick P et al., 2008); inoltre, diverse sostanze usate in chemioterapia quali il 5-FU ed il bortezomib, sono state riportate come agenti utili per incrementare la sensibilità a TRAIL attraverso la loro capacità di abbassare i livelli di FLIP (Ganten TM et al., 2004; Sayers TJ et al., 2003).

Nel nostro laboratorio è stato recentemente identificato un nuovo meccanismo molecolare attraverso il quale le rotture a doppia elica del DNA sono in grado di ridurre i livelli della proteina anti-apoptotica c-FLIP e incrementare la sensibilità cellulare alla morte apoptotica indotta da Fas (Stagni V et al., 2008). In questo lavoro è stato dimostrato che l'attività chinasi di ATM è responsabile della regolazione della stabilità della proteina anti-apoptotica FLIP_L. Infatti, quando la chinasi è cataliticamente inattiva o del tutto assente i livelli della proteina sono fortemente indotti, con conseguente resistenza all'induzione dell'apoptosi Fas-dipendente. Al contrario, l'attivazione di ATM in seguito a trattamento con neocarzinostatina (NCS), un agente radiomimetico determina una notevole diminuzione dei livelli di FLIP, con la conseguente sensibilizzazione delle cellule all'apoptosi indotta da Fas. È stato dimostrato quindi che la modulazione dell'espressione di FLIP avviene a livello post-trascrizionale e che l'attivazione di ATM influenza negativamente la stabilità della proteina FLIP. In questa situazione, la modulazione dell'attività chinasi di ATM è cruciale nella sensibilità a Fas e, mentre l'inibizione genetica e farmacologica induce resistenza a Fas, la sua induzione può incrementarne la sensibilità. In virtù della similitudine della via di segnalazione di Fas e TRAIL, abbiamo postulato che l'attività chinasi di ATM possa essere importante anche nella modulazione della sensibilità a TRAIL.

In accordo con questa ipotesi, abbiamo mostrato che diverse linee cellulari linfoblastoidi derivate da pazienti AT e che quindi non esprimono la chinasi ATM funzionale sono resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL (Figura I). La sensibilità a TRAIL può però essere recuperata in seguito alla ricostituzione dell'espressione di ATM (Figura I), supportando l'ipotesi che ATM sia necessario per l'apoptosi indotta da TRAIL. In accordo con ciò, il trattamento con 5-FU non è in grado di abbassare i livelli di FLIP e sensibilizzare le cellule linfoblastoidi a TRAIL in cellule che non hanno ATM, mentre le stesse cellule ricostituite con ATM presentano una sensibilità basale all'induzione all'apoptosi da TRAIL, che viene ulteriormente incrementata dall'azione del 5-FU (Figura II), consentendo la conclusione che l'attività chinasi di ATM è necessaria per la sensibilizzazione a TRAIL dipendente dal 5-FU.

Utilizzando un sistema di epatocarcinoma in cui è stato in precedenza dimostrato che il trattamento con il 5-FU incrementa la sensibilità a TRAIL mediante la riduzione dell'espressione della proteina FLIP (Ganten TM et al., 2004), abbiamo quindi potuto

dimostrare che l'inibizione genetica o farmacologica della funzionalità di ATM, porta alla perdita della sensibilizzazione di queste cellule a TRAIL in dipendenza dal 5-FU (Figura III). Pertanto il 5-FU necessita dell'attività chinasi di ATM per indurre la sensibilizzazione in cellule tumorali resistenti a TRAIL. È stato riportato in diverse pubblicazioni che la chinasi ATM è regolata in modo aberrante, con diversi meccanismi, in alcuni tumori (Stankovic T et al., 1998; Khanna KK, 2000). Quindi, in accordo con i nostri dati, deve essere verificata il funzionamento di ATM nell'allestimento di una terapia combinata con TRAIL ed agenti che provocano danno al DNA, affinché questo non sia di impedimento, in questa circostanza, per questo approccio farmacologico. Un'importante caratteristica che supporta il valore del trattamento con il 5-FU nella sensibilizzazione delle cellule tumorali a TRAIL è la mancanza di una particolare citotossicità, a queste dosi, per le cellule normali. Infatti, mentre le linee cellulari di epatocarcinoma sono efficientemente sensibilizzate a TRAIL mediante il 5-FU, applicando lo stesso protocollo sperimentale ad epatociti primari umani, questi non sembrano essere coinvolti nella sensibilizzazione (Ganten TM et al., 2006). È interessante ricordare che è stata dimostrata l'induzione dell'attività di ATM in stadi molto precoci dello sviluppo tumorale (Bartkova J et al., 2005; Bartek J et al., 2007). Questa osservazione suggerisce l'ipotesi che nelle cellule tumorali ATM possa essere particolarmente prona all'induzione della sua attività chinasi indotta da agenti che danneggiano il DNA. Questo potrebbe quindi tradursi in una più rapida riduzione dei livelli di FLIP, sufficiente ad innescare la sensibilità a TRAIL. Di contro, in cellule normali l'attivazione di ATM e la conseguente citotossicità, può richiedere dosi più alte di agenti che danneggiano il DNA.

Le linee cellulari derivanti da Linfomi di Hodgkin sono resistenti all'apoptosi indotta da Fas e da TRAIL. In un precedente lavoro (Stagni V et al., 2008) abbiamo dimostrato che la sovraespressione di ATM in queste cellule è un grado di provocare l'abbassamento dei livelli di FLIP e la conseguente sensibilizzazione all'apoptosi indotta da TRAIL. Usando la stessa linea cellulare, abbiamo mostrato che agenti che danneggiano il DNA e che sono in grado di attivare ATM endogeno, in conseguenza di ciò riducono i livelli della proteina FLIP (Figura IV A). Questo esperimento ci ha portato ad ipotizzare che lo stesso meccanismo possa essere alla base del meccanismo di azione di alcune sostanze usate come chemioterapici, di cui è nota la capacità di

indurre danno al DNA. Abbiamo quindi utilizzato il 5-FU, l'adramicina e l'etoposide su una linea di linfoma di Hodgkin, potendo osservare che ATM viene attivato e che in conseguenza di ciò i livelli di FLIP si riducono sensibilmente (Figura IV B). Esperimenti futuri consentiranno di verificare che tali pretrattamenti possono essere utilizzati in questo sistema sperimentale per sensibilizzare le cellule all'apoptosi.

Il meccanismo molecolare attraverso cui ATM modula la stabilità di FLIP è ancora largamente da chiarire. In precedenza è stato dimostrato che l'attività chinastica di ATM non modula in modo significativo l'espressione di FLIP a livello trascrizionale, mentre è in grado di modularne la stabilità e che la sua degradazione proteica non avviene in cellule in cui non è presente ATM (Stagni V et al., 2008). In questo lavoro abbiamo mostrato che ATM promuove la degradazione proteica di FLIP attraverso la via del proteasoma (Figura V). In letteratura è stato riportato che p53 è in grado di promuovere la degradazione della proteina FLIP attraverso la via del proteasoma (Fukazawa T et al., 2001). Infatti la sovraespressione di p53 provoca l'abbassamento dei livelli di FLIP e l'apoptosi in linee cellulari tumorali e questo effetto viene bloccato mediante pretrattamento con inibitori del proteasoma (Fukazawa T et al., 2001). Poiché p53 nella maggior parte dei tumori è mutato o non espresso, ed ATM è ben conosciuto come modulatore dell'attività di p53 (Khanna KK et al., 1998), ci siamo domandati se l'abbassamento dei livelli di FLIP dipendesse da ATM necessiti di p53. In accordo con il lavoro di Ganten et al. del 2004, che dimostra che il trattamento con il 5-FU è in grado di innescare l'abbassamento dei livelli di FLIP nelle Hep3B, cellule di epatocarcinoma che non esprimono p53, abbiamo mostrato che nelle stesse cellule il trattamento con il 5-FU provoca, mediante l'attivazione di ATM la riduzione dei livelli di FLIP, in maniera analoga a ciò che avviene nelle HepG2-TR, cellule di epatocarcinoma che esprimono p53. Inoltre il 5-FU è in grado di ridurre i livelli di FLIP e di sensibilizzare le cellule a TRAIL anche in cellule HepG2-TR in cui p53 è stato silenziato geneticamente o mediante l'uso di uno specifico inibitore farmacologico (Figura VI A e B). Questo risultato suggerisce quindi che gli agenti che provocano danno al DNA, ampiamente utilizzati in terapia per sensibilizzare le cellule tumorali a TRAIL, possono essere utilizzati anche in quei tumori in cui p53 è spesso mutato o assente, in quanto il loro funzionamento non sembra dipendere strettamente da questo.

Recentemente è stato dimostrato che in risposta all'attivazione di ATM viene indotta la via dell'ubiquitina proteasoma (Taylor A et al., 2002). Il ruolo di ATM come modulatore di questa via è in accordo con un recente approccio proteomico che ha portato a definire una rete di relazioni assai più complessa di quanto si era ritenuto. Infatti sono stati identificati più di 700 potenziali nuovi substrati, tra cui diversi componenti dell'apparato dell'ubiquitina-proteasoma (Matsuoka S et al., 2007). È stato dimostrato che la chinasi ATM è in grado di modulare l'ubiquitinazione di proteine sia mediante fosforilazione diretta della proteina bersaglio in seguito alla quale viene regolata la sua interazione con l'apparato proteasoma-ubiquitina, sia mediante fosforilazione dell'E3 ubiquitina ligasi che direttamente ubiquitina la proteina bersaglio. La fosforilazione ATM-dipendente della proteina NEMO promuove il suo esporto nucleare dipendente dall'ubiquitina (Wu ZH et al., 2006). Inoltre E3 ubiquitina ligasi, quali COP1 e MDM2 sono state identificate come nuovi substrati di ATM (Khosravi R. et al., 1999; Maya R et al., 2001; Dornan D et al., 2006). Tutti questi dati suggeriscono quindi che ATM possa essere implicato nella regolazione della stabilità di FLIP o mediante fosforilazione diretta dello stesso FLIP o, in alternativa, mediante la fosforilazione di alcuni componenti della via dell'ubiquitina. Anche se è stato mostrato che la fosforilazione è in grado di modulare la stabilità della proteina FLIP_S (Meinander A et al., 2007), non ci sono attualmente dati disponibili sulla modulazione dell'ubiquitinazione di FLIP_L in seguito a fosforilazione. Come ampiamente descritto in letteratura, ATM generalmente modula l'attività di alcuni suoi effettori mediante la loro diretta fosforilazione principalmente all'interno di siti specifici definiti "siti SQ/TQ", composti da un residuo di serina o treonina seguito da un glutammato (Dornan D. et al., 2006 ; Cortez D. et al., 1999; Khoravi R. et al., 1999; Shiloh Y., 2003). Mediante analisi della sequenza di FLIP_L è stato possibile identificare tre putativi siti bersaglio per ATM. I dati che mostriamo, pur se preliminari, sembrano però suggerire che ATM non fosforili FLIP (Figura VIII). È stato invece recentemente descritta l'ubiquitinazione di FLIP a valle della stimolazione del recettore per il TNF, come modulatore del segnale apoptotico (Chen L et al., 2006). Il TNF innesca l'attivazione di JNK, il quale fosforila direttamente l'E3 ubiquitina ligasi ITCH, promuovendone la sua attività e la degradazione di FLIP. Questa osservazione suggerisce la possibilità che ATM possa modulare i livelli di FLIP agendo sull'attività dell'ubiquitina ligasi ITCH. Gli esperimenti presentati finora

suggeriscono che ATM possa modulare la funzione di ITCH in dipendenza dalla sua attività chinasi. Anche l'analisi della sequenza di ITCH ha evidenziato diversi siti putativi di fosforilazione da parte di ATM (Figura A). Molti di questi siti sono collocati nelle quattro regioni WW, necessarie per l'interazione con le proteine substrato. In letteratura sono riportati diversi lavori che indicano che la fosforilazione di ITCH ne possa regolare l'interazione con i substrati e l'attività enzimatica. La fosforilazione in treonina 30 collocata nel WW3 abroga l'interazione con diversi substrati, a causa di un cambiamento conformazionale che preclude la possibilità di formare legami idrogeno con il substrato (Morales B et al., 2007). La chinasi JNK1 regola l'attività di ITCH in risposta al TNF mediante la fosforilazione diretta di tre residui specifici (Ser199, Thr222 e Ser232) presenti nella regione PRR (*Proline Rich Region*) dell'ubiquitina ligasi (Figura A). La fosforilazione di questi siti è necessaria e sufficiente per rompere l'interazione inibitoria tra un dominio WW ed il dominio chinasi HECT, a cui segue un cambio conformazionale che incrementa l'attività catalitica di ITCH (Gallager E et al., 2006). Al contrario la tirosina chinasi Fyn fosforila ITCH in Tyr 371, inibendone l'attività (Chun Y, Weidong Z et al., 2006) (Figura A). Poiché dal saggio chinasi che abbiamo allestito è risultato che FLIP non è fosforilata da ATM, abbiamo effettuato un analogo esperimento utilizzando come substrato la proteina ITCH. In questo caso abbiamo invece osservato che ITCH è fosforilata da ATM, indicando che questo potrebbe essere un substrato diretto di ATM, che potrebbe essere attivato in seguito a danno al DNA.

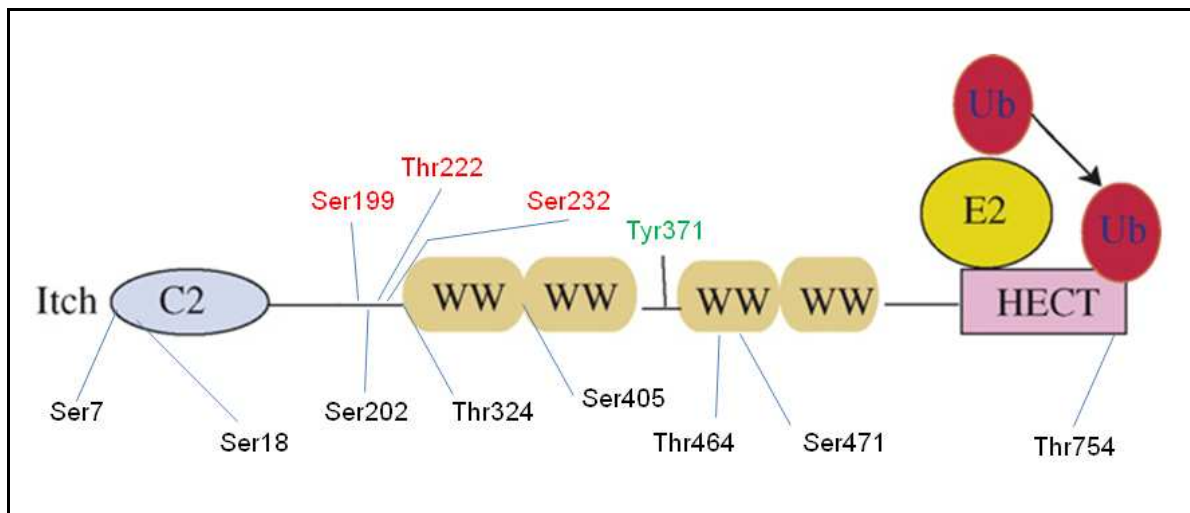


Figura A. Rappresentazione schematica della proteina ITCH. Sono evidenziate in nero le serine e treonine seguite da glutammina (S-T/Q), potenziali siti fosforilabili da ATM, e la loro collocazione nei domini di ITCH. In verde la tirosina inibitoria fosforilata da Fyn ed in rosso le serine e treonine bersaglio di JNK1. (Modif. da Liu YC et al., 2007).

L'insieme di questi dati individua nell'attività chinasi di ATM un elemento cruciale per la sensibilizzazione di cellule tumorali a TRAIL, in terapie basate su un approccio combinato, utilizzando sostanze chemioterapiche che provocano danno al DNA. In quest'ottica l'analisi di ATM assume una grande importanza in un contesto di messa a punto di una terapia combinata. Il trattamento con chemioterapici che producono danno al DNA può rappresentare un valido approccio per la sensibilizzazione a TRAIL di molti tumori in cui la funzione di ATM è conservata, indipendentemente dallo stato di p53. Inoltre abbiamo identificato una nuova via di trasduzione del segnale, in cui il danno al DNA e l'attività chinasi di ATM partecipano alla modulazione della stabilità proteica, intervenendo nella via del proteasoma, probabilmente mediante l'azione su un'E3 ubiquitina ligasi, nota per essere in grado di regolare i livelli di FLIP.

L'identificazione di ATM come un importante modulatore della via di degradazione dipendente dall'ubiquitina-proteasoma suggerisce che la perdita di questa funzione possa contribuire in modo importante anche al fenotipo AT. Approcci di proteomica mirati ad analizzare alterazioni del profilo di ubiquitinazione in cellule AT consentiranno di caratterizzare ulteriormente questo punto. In tale contesto è

importante ricordare che alterazioni dell'ubiquitinazione sono alla base di molte patologie neurodegenerative e pertanto la definizione dei meccanismi molecolari che ci sono alla base risulta essere di fondamentale importanza.

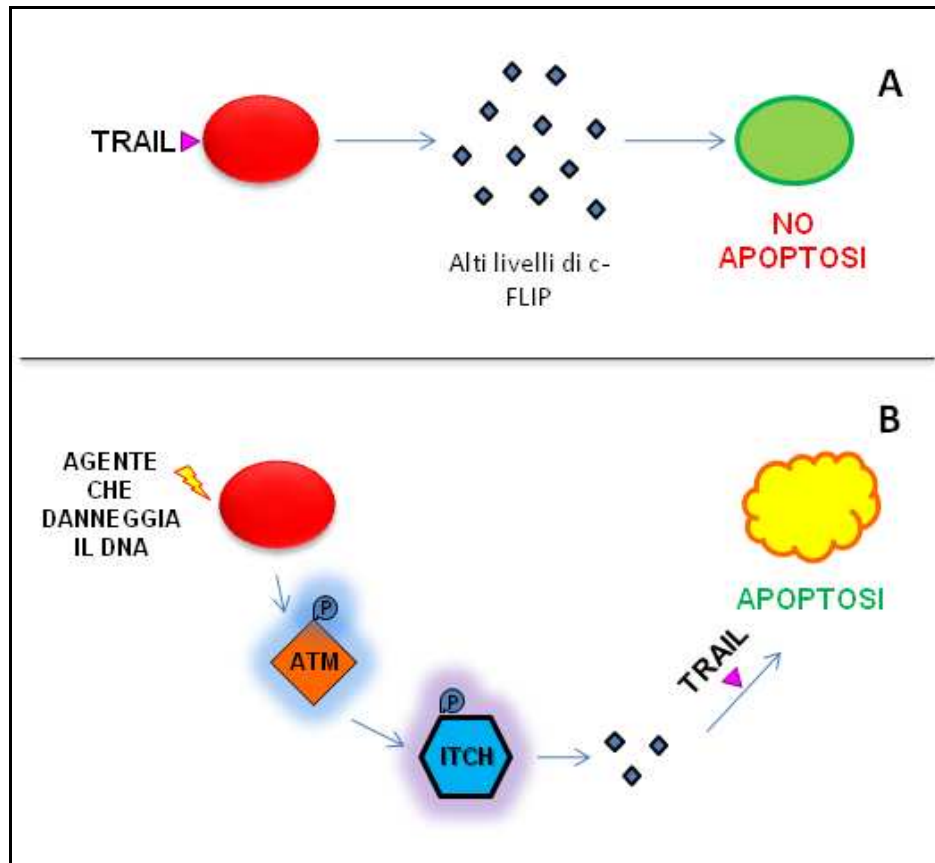


Figura B. MODELLO PROPOSTO DI MECCANISMO DI SENSIBILIZZAZIONE MEDIATO DA ATM NELLE CELLULE RESISTENTI A TRAIL. (A) Una cellula tumorale resistente a TRAIL, in cui alti livelli di FLIP impediscono che la cellula vada in apoptosi. (B) se la cellula viene trattata con sostanze che danneggiano il DNA si attiva ATM, che fosforila l'ubiquitin ligasi ITCH attivandola. Questa ubiquitina FLIP che, attraverso la via del proteasoma viene degradata rendendo la cellula sensibile a TRAIL, che attiva la via apoptotica.

BIBLIOGRAFIA

- Abraham RT. (2004) PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. Aug-Sep; 3(8-9):883-7.
- Adams JM and Cory S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. Jan; 26 (1):61-6.
- Allen DM, van Praag H, Ray J, Weaver Z, Winrow CJ, Carter TA, Braquet R, Harrington E, Ried T, Brown KD, Gage FH, Barlow C. (2001) Ataxia telangiectasia mutated is essential during adult neurogenesis. *Genes Dev*. Mar 1;15(5):554-66.
- Alnemri ES. (1997) Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*. Jan;64(1):33-42.
- Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G. (2001) Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. Oct 12; 276(41):38224-30.
- Aron JL, Parthun MR, Marcucci G, Kitada S, Mone AP, Davis ME, Shen T, Murphy T, Wickham J, Kanakry C, Lucas DM, Reed JC, Grever MR, Byrd JC. (2003) Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood*. Jul 15; 102(2):652-8.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*. Jul;104(2):155-62.
- Bakkenist CJ, Kastan MB. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. Jan 30;421(6922):499-506.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. Sep 11; 281(5383):1674-7.
- Bao Q and Shi Y. (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*. Jan; 14(1):56-65.

- Bar RS, Levis WR, Rechler MM, Harrison LC, Siebert C, Podskalny J, Roth J, Muggeo M. (1978) Extreme insulin resistance in ataxia telangiectasia: defect in affinity of insulin receptors. *N Engl J Med.* May 25; 298(21):1164-71.
- Barlow C, Dennery PA, Shigenaga MK, Smith MA, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Wynshaw-Boris A, Levine RL. (1999) Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 17; 96(17):9915-9.
- Barlow C, Ribaut-Barassin C, Zwingman TA, Pope AJ, Brown KD, Owens JW, Larson D, Harrington EA, Haeberle AM, Mariani J, Eckhaus M, Herrup K, Bailly Y, Wynshaw-Boris A. (2000) ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 18; 97(2):871-6.
- Bartek J, Falck J, Lukas J. (2001) CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dec; 2(12):877-86.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. (2007) DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene.* Dec 10; 26(56):7773-9.
- Bartke T, Siegmund D, Peters N, Reichwein M, Henkler F, Scheurich P, Wajant H. (2001) p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene.* Feb 1; 20(5):571-80.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* Apr 14; 434(7035):864-70.
- Beamish H and Lavin MF. (1994) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int J Radiat Biol.* Feb; 65(2):175-84.
- Becker-Catania SG, Chen G, Hwang MJ, Wang Z, Sun X, Sanal O, Bernatowska-Matuszkiewicz E, Chessa L, Lee EY, Gatti RA. (2000) Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Mol Genet Metab.* Jun; 70(2):122-33.
- Biton S, Gropp M, Itsykson P, Pereg Y, Mittelman L, Johe K, Reubinoff B, Shiloh Y. (2006) ATM-mediated response to DNA double strand breaks in human neurons derived from stem cells. *DNA Repair* Jan 4;6(1):128-34.

- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, Albitar M, Reed JC, Croce CM. (1999) ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* Jan 1;59(1):24-7.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem.* Nov 9;276(45):42462-7.
- Camacho E, Hernández L, Hernández S, Tort F, Bellosillo B, Beà S, Bosch F, Montserrat E, Cardesa A, Fernández PL, Campo E. (2002) ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood.* Jan 1;99(1):238-44.
- Cardozo T. and Pagano M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol.5; 739-751.
- Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. (2002) c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* Jul 15;21(14):3704-14.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.* Dec;7(6):821-30.
- Chen P, Peng C, Luff J, Spring K, Watters D, Bottle S, Furuya S, Lavin MF. (2003) Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. *J Neurosci.* Dec 10;23(36):11453-60.
- Chen L. et al. (2005). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J.* Vol 24 no. 19; 3411-3422.
- Cortes J, Thomas D, Koller C, Giles F, Estey E, Faderl S, Garcia-Manero G, McConkey D, Ruiz SL, Guerciolini R, Wright J, Kantarjian H. (2004) Phase I study of bortezomib in refractory or relapsed acute leukemias. *Clin Cancer Res.* May 15;10(10):3371-6.
- Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. (2002) Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol.* Feb 1;168(3):1356-61.

- D'Amours D, Jackson SP. (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* May;3(5):317-27.
- Dauth I, Krüger J, Hofmann TG. (2007) Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res.* Mar 1;67(5):2274-9.
- Dephoure N, Howson RW, Blethrow JD, Shokat KM, O'Shea EK. (2005) Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 13;102(50):17940-5.
- De Smaele E. et al. (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signaling. *Nature* Vol.414; 308-313.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. (1999) Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.* Oct 1;18(19):5242-51.
- Diehl V, Pfreundschuh M, Fonatsch C, Stein H, Falk M, Burcher H, Schaadt M. (1985) Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. *Cancer Surv.*;4(2):399-419
- Duiker EW, Mom CH, de Jong S, Willemse PH, Gietema JA, van der Zee AG, de Vries EG. (2006) The clinical trail of TRAIL. *Eur J Cancer.* Sep;42(14):2233-40.
- Dumitru CA, Carpinteiro A, Trarbach T, Hengge UR, Gulbins E. (2007) Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis.* Aug;12(8):1533-41.
- Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, Brodeur GM. (2001) Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res.* Feb 15;61(4):1314-9.
- Farshid M and Tabor E. (1992) Expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *J Med Virol.* Dec;38(4):235-9.
- Fernandes N, Sun Y, Chen S, Paul P, Shaw RJ, Cantley LC, Price BD. (2005) DNA damage-induced association of ATM with its target proteins requires a protein interaction domain in the N terminus of ATM. *J Biol Chem.* Apr 15;280(15):15158-64.
- Fisher MJ, Virmani AK, Wu L, Aplenc R, Harper JC, Powell SM, Rebbeck TR, Sidransky D, Gazdar AF, El-Deiry WS. (2001) Nucleotide substitution in the ectodomain of

- trail receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* Jun;7(6):1688-97.
- Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N. (2001) Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene.* Aug 23;20(37):5225-31.
- Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene.* Sep 13;20(41):5865-77.
- Gallagher E et al. (2006). Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Biochemistry PNAS* Vol.103, no.6; 1717-1722.
- Ganten TM, Haas TL, Sykora J, Stahl H, Sprick MR, Fas SC, Krueger A, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Stremmel W, Krammer PH, Walczak H. (2004) Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitisation of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs. *Cell Death Differ.* Jul;11 Suppl 1:S86-96.
- Ganten TM, Koschny R, Haas TL, Sykora J, Li-Weber M, Herzer K, Walczak H. (2005) Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology.* Sep;42(3):588-97.
- Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Büchler P, Haas TL, Schader MB, Untergasser A, Stremmel W, Walczak H. (2006) Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res.* Apr 15;12(8):2640-6.
- Gao M. et al. (2004). Jun turnover is controlled through JNK dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* Vol.306; 271-275.
- Gatei M, Scott SP, Filippovitch I, Soronika N, Lavin MF, Weber B, Khanna KK. (2000) Role for ATM in DNA damage-induced phosphorylation of BRCA1. *Cancer Res.* Jun 15;60(12):3299-304.
- Gatti RA, Tward A, Concannon P. (1999) Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab.* Dec;68(4):419-23.

- Geserick P, Drewniok C, Hupe M, Haas TL, Diessenbacher P, Sprick MR, Schön MP, Henkler F, Gollnick H, Walczak H, Leverkus M. (2008) Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene*. May 15;27(22):3211-20.
- Golks A, Brenner D, Schmitz I, Watzl C, Krueger A, Krammer PH, Lavrik IN. (2006) The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell Death Differ*. Mar;13(3):489-98.
- Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK. (2004) Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J*. Nov 10;23(22):4451-61.
- Gores GJ and Kaufmann SH. Is TRAIL hepatotoxic? *Hepatology*. Jul;34(1):3-6.
- Goy A, Younes A, McLaughlin P, Pro B, Romaguera JE, Hagemester F, Fayad L, Dang NH, Samaniego F, Wang M, Broglio K, Samuels B, Gilles F, Sarris AH, Hart S, Trehu E, Schenkein D, Cabanillas F, Rodriguez AM. (2005) Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. Feb 1;23(4):667-75.
- Green DR, Evan GI. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*. Feb;1(1):19-30.
- Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT, Danska JS. (1996) V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev*. Aug 15;10(16):2038-54.
- Gumy Pause F, Wacker P, Maillet P, Betts D, Sappino AP. (2003) ATM gene alterations in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Hum Mutat*. May;21(5):554.
- Gumy-Pause F, Wacker P, Sappino AP. (2004) ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia*. Feb;18(2):238-42.
- Gumy-Pause F, Wacker P, Sappino AP. (2005) ATM gene and lymphoid malignancies. *Leukemia*. Feb;18(2):238-42.
- Gura T. (1997) How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science*. Aug 8;277(5327):768.
- Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*. Oct 2;407(6805):770-6.
- Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC. (2004) Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*. Dec 15;64(24):9152-9.

- Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. (2002) NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem.* May 10;277(19):16639-47.
- Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. (1997) The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci.* May;22(5):155-6.
- Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahel R. (2003) Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ.* Mar;10(3):356-64.
- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A, de Vos AM. (1999) Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell.* Oct;4(4):563-71.
- Ichimura T et al. (2005). 14-3-3 proteins modulate the expression of epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* Vol.280; 13187-13194.
- Inoue S, MacFarlane M, Harper N, Wheat LM, Dyer MJ, Cohen GM. (2004) Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death Differ.* Dec;11 Suppl 2:S193-206.
- Jiang X, Sun Y, Chen S, Roy K, Price BD. (2006) The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA- PKcs and ATM. *J Biol Chem.* 2006 Jun 9;281(23):15741-6.
- Johnstone RW. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* Apr;1(4):287-99.
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol.* Sep 10;8(18):1001-8.
- Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y, Craig RW. (2001) Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res.* Aug 15;51(16):4279-86.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* Nov 13;71(4):587-97.

- Karin M. & Lin A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* Vol.3; 221-227.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* Aug;26(4):239-57.
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. (1998) ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* Dec;20(4):398-400.
- Khanna KK. (2000) Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst.* May 17;92(10):795-802.
- Khanna KK, Jackson SP. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* Mar;27(3):247-54.
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 21;96(26):14973-7.
- Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, (2000). Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res.*;6:335–346.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.* Dec 7;276(49):46639-46.
- Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* Sep 10;285(5434):1733-7.
- Khosravi R. et al. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *PNAS* Vol.96 no.26; 14973-14977.
- Koschny R, Ganten TM, Sykora J, Haas TL, Sprick MR, Kolb A, Stremmel W, Walczak H. (2007) TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. *Hepatology.* Mar;45(3):649-58.
- Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. (2001) FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol.* Dec;21(24):8247-54.

- Kurz EU and Lees-Miller SP. (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*. Aug-Sep;3(8-9):889-900.
- Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. (2003) Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL -/- mice. *Nat Immunol*. Mar;4(3):255-60.
- Lavin MF and Gueven N. (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*. Jun;13(6):941-50.
- Lavin MF. (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oct;9(10):759-69.
- Lawrence TS, Tepper JE, Blackstock AW. (1997) Fluoropyrimidine-Radiation Interactions in Cells and Tumors. *Semin Radiat Oncol*. Oct;7(4):260-266.
- Lee JH and Paull TT. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. Apr 22;308(5721):551-4.
- Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, Lee JH, Han SY, Park JY, Oh RR, Jang JJ, Han JY, Lee JY, Yoo NJ. (1999) Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. Nov 15;59(22):5683-6.
- Leverkus M, Sprick MR, Wachter T, Mengling T, Baumann B, Serfling E, Bröcker EB, Goebeler M, Neumann M, Walczak H. (2003) Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Mol Cell Biol*. Feb;23(3):777-90.
- Li W, Zhang X, Olumi AF. (2007) MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res*. Mar 1;67(5):2247-55.
- Liberzon E, Avigad S, Yaniv I, Stark B, Avrahami G, Goshen Y, Zaizov R. (2004) Molecular variants of the ATM gene in Hodgkin's disease in children. *Br J Cancer*. Jan 26;90(2):522-5.
- Lim DS, Kirsch DG, Canman CE, Ahn JH, Ziv Y, Newman LS, Darnell RB, Shiloh Y, Kastan MB. (1998) ATM binds to beta-adaptin in cytoplasmic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 18;95(17):10146-51.
- MacFarlane M, Harper N, Snowden RT, Dyer MJ, Barnett GA, Pringle JH, Cohen GM. (2002) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene*. Oct 3;21(44):6809-18.

- Matei IR, Guidos CJ, Danska JS. (2006) ATM-dependent DNA damage surveillance in T-cell development and leukemogenesis: the DSB connection. *Immunol Rev.* Feb;209:142-58.
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* May 25;316(5828):1160-6.
- Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* May 1;15(9):1067-77.
- McKinnon PJ and Burgoyne LA. (1985) Evidence for the existence of an actin-derived protein in ataxia-telangiectasia lymphoblastoid cell lines. *Exp Cell Res.* Jun;158(2):413-22.
- McKinnon PJ. (2007) ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Rep.* Aug;5(8):772-6.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* May 15;16(10):2794-804.
- Melnick A and Licht JD. (2002) Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol.* Jul;9(4):322-32.
- Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grütter MG. (2002) The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* Nov 22;277(47):45162-71.
- Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY, Screaton GR. (1999) Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol.* Nov;6(11):1048-53.
- Montecucco A and Biamonti G. (2007) Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett.* Jul 8;252(1):9-18.
- Mu JJ, Wang Y, Luo H, Leng M, Zhang J, Yang T, Besusso D, Jung SY, Qin J. (2007) A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem.* Jun 15;282(24):17330-4.
- Nagata S. (2000) Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12–18

- Nakayama KI and Nakayama K. (2006). Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*. Vol.6 no.5; 369-381.
- Nitiss JL. (2002) DNA topoisomerases in cancer chemotherapy: using enzymes to generate selective DNA damage. *Curr Opin Investig Drugs*. Oct;3(10):1512-6.
- O'Connor OA. (2004) The emerging role of bortezomib in the treatment of indolent non-Hodgkin's and mantle cell lymphomas. *Curr Treat Options Oncol*. Aug;5(4):269-81.
- O'Connor OA, Wright J, Moskowitz C, Muzzy J, MacGregor-Cortelli B, Stubblefield M, Straus D, Portlock C, Hamlin P, Choi E, Dumetrescu O, Esseltine D, Trehu E, Adams J, Schenkein D, Zelenetz AD. (2005) Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. Feb 1;23(4):676-84.
- Oguchi K, Takagi M, Tsuchida R, Taya Y, Ito E, Isoyama K, Ishii E, Zannini L, Delia D, Mizutani S. (2003) Missense mutation and defective function of ATM in a childhood acute leukemia patient with MLL gene rearrangement. *Blood*. May 1;101(9):3622-7.
- Oka A and Takashima S. (1998) Expression of the ataxia-telangiectasia gene (ATM) product in human cerebellar neurons during development. *Neurosci Lett*. Aug 21;252(3):195-8.
- Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T. (2003) Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*. Jul;83(7):1033-43.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. Apr 4;276(5309):111-3.
- Pandita TK, Hall EJ, Hei TK, Piatyszek MA, Wright WE, Piao CQ, Pandita RK, Willey JC, Geard CR, Kastan MB, Shay JW. (1996) Chromosome end-to-end associations and telomerase activity during cancer progression in human cells after treatment with alpha-particles simulating radon progeny. *Oncogene*. Oct 3;13(7):1423-30.
- Pandita TK and Dhar S. (2000) Influence of ATM function on interactions between telomeres and nuclear matrix. *Radiat Res*. Aug;154(2):133-9.
- Pandita TK. (2003) A multifaceted role for ATM in genome maintenance. *Expert Rev Mol Med*. Jun 20;5(16):1-21.

- Peter ME. (2004) The flip side of FLIP. *Biochem J*. Sep 1;382(Pt 2):e1-3.
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. Dec 1;438(7068):679-84.
- Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, G elinas C, Fuchs EJ, Bedi A. (2001) Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol*. Apr;3(4):409-16.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W. (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev*. Apr;12(2):162-9.
- Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. (2001) Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 4;98(25):14250-5.
- Revy P, Buck D, le Deist F, de Villartay JP. (2005) The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv Immunol*;87:237-95.
- Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D, Pelosi E, Vitale A, Chierichini A, Cedrone M, Fo a R, Lo Coco F, Peschle C, Testa U. (2005) TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica*. May;90(5):612-24.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. May;9(5):402-12.
- Rinaldo C, Prodosmo A, Siepi F, Soddu S. (2007) HIPK2: a multitalented partner for transcription factors in DNA damage response and development. *Biochem Cell Biol*. Aug;85(4):411-8.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. Mar 6;273(10):5858-68.
- Sampath D, Rao VA, Plunkett W. (2003) Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene*. Dec 8;22(56):9063-74.
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR,

- Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. Jun 23;268(5218):1749-53.
- Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, Blazar BR, Zhang X, Elliott PJ, Murphy WJ. (2003) The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood*. Jul 1;102(1):303-10.
- Schoonderwaldt H, Joosten E, Gabreëls F, Gabreëls-Festen A, Notermans SL, Korten JJ. (1973) Ataxia-telangiectasia (Louis Bar syndrome): with special reference to findings in the peripheral nervous system. *Psychiatr Neurol Neurochir*. Nov-Dec;76(6):459-72.
- Seol DW, Li J, Seol MH, Park SY, Talanian RV, Billiar TR. (2001) Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res*. Feb 1;61(3):1138-43.
- Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. (1997) Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature*. May 29;387(6632):520-3.
- Shankar S, Singh TR, Chen X, Thakkar H, Firnin J, Srivastava RK. (2004) The sequential treatment with ionizing radiation followed by TRAIL/Apo-2L reduces tumor growth and induces apoptosis of breast tumor xenografts in nude mice. *Int J Oncol*. May;24(5):1133-40.
- Shankar S, Chen X, Srivastava RK. (2005) Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate*. Feb 1;62(2):165-86.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. Aug 8;277(5327):818-21.
- Shiloh Y, Tabor E, Becker Y. (1982) Colony-forming ability of ataxia-telangiectasia skin fibroblasts is an indicator of their early senescence and increased demand for growth factors. *Exp Cell Res*. Jul;140(1):191-9.
- Shiloh Y. (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*. Feb;11(1):71-7.

- Shiloh Y, Kastan MB. (2001) ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res.*;83:209-54.
- Shiloh Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* Mar;3(3):155-68.
- Shin EC, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K, Kim SJ, Hong SS, Park JH. (2002) Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med.* May 31;34(2):114-22.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H. (2003) Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity.* Jan;18(1):1-6.
- Snell V, Clodi K, Zhao S, Goodwin R, Thomas EK, Morris SW, Kadin ME, Cabanillas F, Andreeff M, Younes A. (1997) Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies. *Br J Haematol.* Dec;99(3):618-24.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* Jun;1(7):949-57.
- Stagni V, di Bari MG, Cursi S, Condò I, Cencioni MT, Testi R, Lerenthal Y, Cundari E, Barilà D. (2008) ATM kinase activity modulates Fas sensitivity through the regulation of FLIP in lymphoid cells. *Blood.* Jan 15;111(2):829-37.
- Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM. (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet.* 1998 Feb;62(2):334-45.
- Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, Moss PA, Taylor AM. (1999) Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* Jan 2;353(9146):26-9.
- Starczynski J, Simmons W, Flavell JR, Byrd PJ, Stewart GS, Kullar HS, Groom A, Crocker J, Moss PA, Reynolds GM, Glavina-Durdov M, Taylor AM, Fegan C, Stankovic T, Murray PG. (2003) Variations in ATM protein expression during normal lymphoid differentiation and among B-cell-derived neoplasias. *Am J Pathol.* Aug;163(2):423-32.
- Stucki M and Jackson SP. (2006) gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst).* May 10;5(5):534-43.

- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA*. Sep 13;102(37):13182-7.
- Takagi M, Tsuchida R, Oguchi K, Shigeta T, Nakada S, Shimizu K, Ohki M, Delia D, Chessa L, Taya Y, Nakanishi M, Tsunematsu Y, Bessho F, Isoyama K, Hayashi Y, Kudo K, Okamura J, Mizutani S. (2004) Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood*. Jan 1;103(1):283-90.
- Taylor A, Shang F, Nowell T, Galanty Y, Shiloh Y. (2002) Ubiquitination capabilities in response to neocarzinostatin and H(2)O(2) stress in cell lines from patients with ataxia-telangiectasia. *Oncogene*. Jun 27;21(28):4363-73.
- Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF. (1996) Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*. Jan 15;87(2):423-38.
- Teraoka SN, Telatar M, Becker-Catania S, Liang T, Onengüt S, Tolun A, Chessa L, Sanal O, Bernatowska E, Gatti RA, Concannon P. (1999) Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am J Hum Genet*. Jun;64(6):1617-31.
- Tepper CG and Seldin MF. (1999) Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood*. Sep 1;94(5):1727-37.
- Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze JL, Draube A, Vockerodt M, Re D, Diehl V, Wolf J. (2002) Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed- Sternberg cells. *Am J Pathol*. Apr;160(4):1521-8.
- Thome M and Tschopp J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol*. Oct;1(1):50-8.
- Thornberry NA. (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*. May;5(5):R97-103.
- Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G. (2008) Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ*. Apr;15(4):762-72.
- Traven A and Heierhorst J.(2005) SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins. *Bioessays*. Apr;27(4):397-407.

- Turenne GA, Paul P, Laflair L, Price BD. (2001) Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene*. Aug 23;20(37):5100-10.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J*. Oct 15;22(20):5612-21.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*. Feb;5(2):157-63.
- Wang S, El-Deiry WS. (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*. Nov 24;22(53):8628-33.
- Watters D, Khanna KK, Beamish H, Birrell G, Spring K, Kedar P, Gatei M, Stenzel D, Hobson K, Kozlov S, Zhang N, Farrell A, Ramsay J, Gatti R, Lavin M. (1997) Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene*. Apr 24;14(16):1911-21.
- Wendt J, Radetzki S, von Haefen C, Hemmati PG, Güner D, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. (2006) Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene*. Feb 16;25(7):972-80.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. Dec;3(6):673-82.
- Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. (2006) Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*. Feb 24;311(5764):1141-6.
- Yang DQ and Kastan MB. (2000) Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol*. Dec;2(12):893-8.
- Yu JW and Shi Y. (2008) FLIP and the death effector domain family. *Oncogene*. Oct 30;27(48):6216-27.
- Zhang XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P. (1999) Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein

expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res.* Jun 1;59(11):2747-53.

Zhang L and Fang B. (2005) Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther.* Mar;12(3):228-37.

Zhao X, Qiu W, Kung J, Zhao X, Peng X, Yegappan M, Yen-Lieberman B, Hsi ED. (2008) Bortezomib induces caspase-dependent apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and is associated with reduced c-FLIP expression: a gene expression profiling study with implications for potential combination therapies. *Leuk Res.* Feb;32(2):275-85.

Zhou XD, Yu JP, Chen HX, Yu HG, Luo HS. (2005) Expression of cellular FLICE-inhibitory protein and its association with p53 mutation in colon cancer. *World J Gastroenterol.* Apr28; 11(16):2482-5.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare Daniela per avermi accolto nel suo laboratorio. Per l'opportunità di crescita scientifica, lavorativa e umana che mi ha dato. Per aver saputo trovare il modo di interagire con me, come con ciascun membro del laboratorio, in maniera individuale e personalizzata. Per la fiducia, che ha saputo avere ed ha saputo infondermi.

Ringrazio poi Venturina, per il conforto nei momenti difficili, in cui lei risponde sempre: "...non ti preoccupare, che ci sono passata anch'io"; per la sua grande umanità, spontanea e sincera, per le sue torte e perché, rara custode del sacro fuoco, è riuscita a trasmettere un po' del suo entusiasmo nelle cose di scienza...

Ringrazio Simonetta, la mia vittima preferita, che forse più di tutti ha subito i miei periodi di stress, pazientando stoicamente senza quasi mai risentirsi; per avermi aiutato nel lavoro (se i blot sono puliti, è grazie ai suoi lavaggi...) e per esserci stata per fare due chiacchiere quando serviva.

Ringrazio Silvia perché piuttosto che vedere tante cose dallo stesso punto di vista, è meglio vedere la stessa cosa da punti diversi. O no...?

Ringrazio Maria Giovanna, per avermi fatto conoscere le cellule e come trattarle, per la pazienza che ha avuto e per aver temuto che scappassi via...

Ringrazio poi Roberto, che mi ha dato tante soddisfazioni (...), Caterina, Antonio (certamente...) e Francesca per aver contribuito a rendere piacevole l'atmosfera del laboratorio. Ringrazio poi Maria Teresa con cui, tra una chiacchiera ed un pettegolezzo, ho pure passato le cellule al FACS.

Ringrazio inoltre i miei genitori per tutto quello che fanno ed hanno fatto. Per essermi stati vicini e presenti, sempre.

Ringrazio infine Maria Rosaria, che in corso d'opera è diventata pure mia moglie, per com'è. In ogni momento. *"Ovunque proteggi la grazia del tuo cuore"*.