

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"

DOTTORATO DI RICERCA IN IMMUNOLOGIA
XVI CICLO

**DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA IN PBMC DI
SOGGETTI GIOVANI E ANZIANI**

Candidato
Dr. Salvatore Scarpaci

Relatore
Prof. Gino Doria

Indice

1	INTRODUZIONE	3
1.1	RICOMBINAZIONE.	5
1.1.1	<i>Ricombinazione omologa</i>	8
1.1.2	<i>Ricombinazione non omologa</i>	9
1.2	ALTRE FUNZIONI DEL COMPLESSO DNA-PK NEI MAMMIFERI.	12
2	SCOPO DELLA TESI	15
3	MATERIALI E METODI	16
3.1	CELLULE E PROCEDIMENTO DI IRRAGGIAMENTO.....	16
3.2	ALKALINE SINGLE CELL GEL ASSAY (COMET ASSAY).	17
3.3	IMMUNOFLUORESCENZA.	18
3.4	ESTRATTI CITOPLASMATICI E NUCLEARI.....	19
3.5	PREPARAZIONE DELLA SONDA DI DNA.	20
3.6	EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY).	20
3.7	WESTERN BLOTTING.	21
4	RISULTATI	23
4.1	DANNI DEL DNA IN PBMC DI SOGGETTI GIOVANI E ANZIANI.....	23
4.2	RIPARAZIONE DEL DNA IN PBMC DI SOGGETTI GIOVANI E ANZIANI.	23
4.3	ATTIVITÀ DI LEGAME AL DNA DELL'ETERODIMERO KU 70/80.	26
4.4	ESPRESSIONE DI KU 70 E KU 80.	28
5	DISCUSSIONE	31
6	BIBLIOGRAFIA	35

1 Introduzione

Il mantenimento dell'integrità genomica è di grande importanza per la vita della cellula. Il DNA è il principale bersaglio di agenti chimici (mutageni ambientali, farmaci) e fisici (radiazioni UV e radiazioni ionizzanti)(1,2). Ciò nonostante, si è calcolato che in una singola cellula vengono prodotti quotidianamente circa 1000 danni causati da eventi ossidativi, di deaminazione e di demetilazione, generati dal metabolismo ossidativo della cellula e dall'azione di agenti chimici e fisici esogeni (3). Malgrado l'elevato numero di danni la stabilità genomica è molto alta. Ciò è dovuto al fatto che la cellula è provvista di sistemi enzimatici in grado di controllare, riconoscere e riparare i diversi tipi di alterazioni molecolari. Questi meccanismi comprendono enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi e la catalasi, e altre molecole con differenti attività, come la bilirubina e le proteine dello shock termico (4).L'importanza della riparazione del DNA è suggerita dall'esistenza di patologie umane in cui non sono attive alcune vie di riparazione. Si ha in tali casi una aumentata sensibilità verso agenti fisici quali radiazioni ultraviolette e ionizzanti con una più alta incidenza di eventi mutageni ed insorgenza di tumori (5,6). La capacità di riparare efficacemente i danni del DNA è correlata positivamente con la durata di vita dell'individuo. Diversi studi dimostrano che con l'invecchiamento aumentano sia le mutazioni che i danni al DNA (3,7-10). Usando cellule provenienti da diverse specie di mammiferi, è stato dimostrato che ad una maggiore capacità di riparare il DNA danneggiato corrisponde una durata maggiore di vita (11,12). Esiste dunque una correlazione positiva tra invecchiamento e contenuto intracellulare di DNA danneggiato ed una

correlazione negativa tra invecchiamento ed efficienza di riconoscimento e riparazione del danno al DNA dimostrate non solo nell'uomo, ma anche in una grande varietà di specie animali (11). La riparazione è un insieme di processi metabolici in grado di restituire la corretta struttura e funzione al DNA cellulare. La cellula deve coordinare la riparazione con gli altri processi cellulari quali la replicazione, la trascrizione ed il ciclo cellulare. Prima della divisione cellulare devono essere ultimate sia la replicazione che la segregazione cromosomica. Esistono nella cellula sistemi di controllo che possono rilevare errori e di conseguenza bloccare il ciclo cellulare all'inizio della fase S o della fase M. Le cellule possono sia riparare il danno che tollerarlo e continuare a replicarsi, oppure possono andare incontro ad apoptosi in risposta a livelli critici di danno del DNA.

Esistono sistemi in grado di riparare efficacemente e rapidamente molti tipi di danno, assicurando la stabilità dell'informazione presente nella molecola del DNA (13-15). Tuttavia, nella cellula sono presenti diversi meccanismi per la riparazione del DNA.

La riparazione per escissione (*excision repair*, ER) che comprende la riparazione per escissione di una base o di un nucleotide, (rispettivamente BER o NER), che utilizza l'informazione sul filamento integro di DNA per riparare il filamento danneggiato. Il mismatch repair, che avviene immediatamente dopo la replicazione del DNA nella fase S del ciclo cellulare, utilizza il filamento parentale per correggere una errata introduzione nucleotidica nel filamento neosintetizzato. La ricombinazione omologa (*homologous recombination*, HR), predominante in batteri e lieviti, dipende da una estesa omologia di sequenza. La ricombinazione non omologa (*non homologous end-joining*

NHEJ o *non homologous recombination*, NHR), predominante nei mammiferi, è indipendente dall'omologia di sequenza. Analisi genetiche degli effetti delle radiazioni ionizzanti su cellule di lievito e di topo, hanno inizialmente dimostrato che la sensibilità dei due organismi dipende da diverse vie di riparazione delle doppie rotture al DNA (*double strand breaks*, dsb). I mutanti radiosensibili di lievito erano deficienti nella HR, mentre le cellule di topo erano carenti nella NHR. Al contrario, recenti studi hanno dimostrato che entrambi i meccanismi contribuiscono alla riparazione delle dsb sia nei lieviti che nei mammiferi, ma che il loro contributo relativo può variare da specie a specie.

1.1 Ricombinazione.

Le dsb rappresentano normali intermedi durante processi fisiologici quali la meiosi e la ricombinazione V(D)J, ma anche lesioni prodotte da forche di replicazione collassate e da agenti nocivi, come le radiazioni ionizzanti e i radicali liberi, che possono causare rotture su entrambi i filamenti della molecola di DNA in uno specifico sito. Questo evento rappresenta il più serio tipo di danno al DNA poiché nessuno dei due filamenti è in grado di provvedere all'integrità della molecola e dell'informazione contenuta, contrariamente al caso del danno a un singolo filamento, dove uno dei filamenti della doppia elica rimane integro. La riparazione di tali rotture porta in genere ad una alterazione irreversibile del DNA. La ricombinazione è uno tra i più importanti processi coinvolti nella riparazione del DNA danneggiato, permettendo così che la corretta informazione genetica sia trasmessa alle cellule figlie (16,17). Nelle cellule eucariotiche, le dsb sono riparate attraverso due distinti meccanismi: HR e NHEJ (18-20). La ricombinazione omologa necessita

della presenza di un cromatide omologo intatto ed è perciò ristretta alle fasi S e G(2) del ciclo cellulare. La ricombinazione non omologa che semplicemente salda le due estremità della dsb, non richiede omologia di sequenza, può avvenire in tutte le fasi del ciclo cellulare ed è il principale meccanismo di riparazione nelle cellule di mammifero. La NHEJ è anche necessaria per il legame delle dsb generate durante la ricombinazione V(D)J e lo switch isotipico, processi essenziali per generare la variabilità dei recettori del sistema immunitario. La riparazione delle dsb richiede un sistema costituito da più componenti. Il danno viene prima riconosciuto da una proteina nucleare con attività elicastica, e la riparazione del DNA viene poi realizzata sotto il controllo di altre proteine. Nelle cellule eucariote, la riparazione delle dsb del DNA procede attraverso alcuni passaggi, ognuno dei quali è sotto il controllo di specifiche proteine con differenti proprietà funzionali e biochimiche. Dopo il riconoscimento del danno da parte dell'elicasi, una endonucleasi inizia la riparazione mediante una incisione a monte del taglio. In seguito una esonucleasi rimuove un piccolo oligonucleotide. Una polimerasi sintetizza il tratto di elica assente ed una ligasi salda i segmenti di DNA per completare il processo di riparazione (21).

In seguito alla formazione di lesioni del DNA, le diverse proteine coinvolte nella riparazione interagiscono con le proteine della cromatina, come l'istone H2AX. Successivamente a questa interazione, si ha un rimodellamento della cromatina che permette l'accesso al sito danneggiato e la riparazione della lesione in maniera regolata nel tempo. Negli eucarioti, la riparazione per ricombinazione è regolata da complessi multiproteici che sono organizzati in foci nel sito della lesione. Questi foci sono strutture di giga-dalton altamente dinamiche in grado di

riparare contemporaneamente lesioni multiple del DNA. Inoltre, la composizione di questi centri di riparazione dipende dal tipo di lesione del DNA ed è in stretta relazione con la fase del ciclo cellulare. Molti dei componenti dei foci di riparazione sono regolati tramite modificazioni post-traduzionali, quali la fosforilazione e l'ubiquitinazione. I foci di riparazione hanno quattro distinte fasi di sviluppo: 1) riconoscimento del danno del DNA e legame alle estremità libere del DNA del complesso Mre11 o dell'eterodimero ku70/80 rispettivamente per la HR e NHEJ; 2) modificazione delle estremità del DNA e legame del DNA a singolo filamento mediata dalla RPA, la quale recluta le proteine che regolano i checkpoint cellulari; 3) riparazione del DNA in fase S e G(2) per la HR e in tutte le fasi del ciclo per la NHEJ; 4) disassemblaggio dei complessi di riparazione e ripristino del ciclo cellulare.

L'istone H2AX fosforilato (γ -H2AX) è essenziale per un efficiente riconoscimento e riparazione delle dsb, e molte molecole, spesso migliaia, di H2AX vengono rapidamente fosforilate ad ogni sito in cui è presente una dsb (22). Il sito di fosforilazione è una serina situata a 4 residui dal C-terminale che è evolutivamente conservata negli organismi, dalla giarda intestinalis all'uomo. Topi e lieviti privi di questo residuo di serina mostrano difetti nel riconoscimento e riparazione delle dsb. I topi knock-out per l'istone H2AX risultano più piccoli, ipersensibili alle radiazioni ionizzanti, difettivi nello switch isotipico e nella spermatogenesi, inoltre, cellule di questi topi mostrano un significativo aumento dei difetti genetici. Si è visto che l'istone H2AX è sostanzialmente immobile nella cromatina e che i cicli di fosforilazione-defosforilazione non sono seguiti da uno scambio diffusionale della molecola (23). Data la rapida induzione e amplificazione della forma

fosforilata dell'istone H2AX, e visto il rapporto di 1:1 tra il numero di foci di γ -H2AX e il numero di dsb (24), gli anticorpi che riconoscono l'istone H2AX fosforilato sono diventati degli ottimi reagenti per determinare la presenza di dsb.

1.1.1 Ricombinazione omologa.

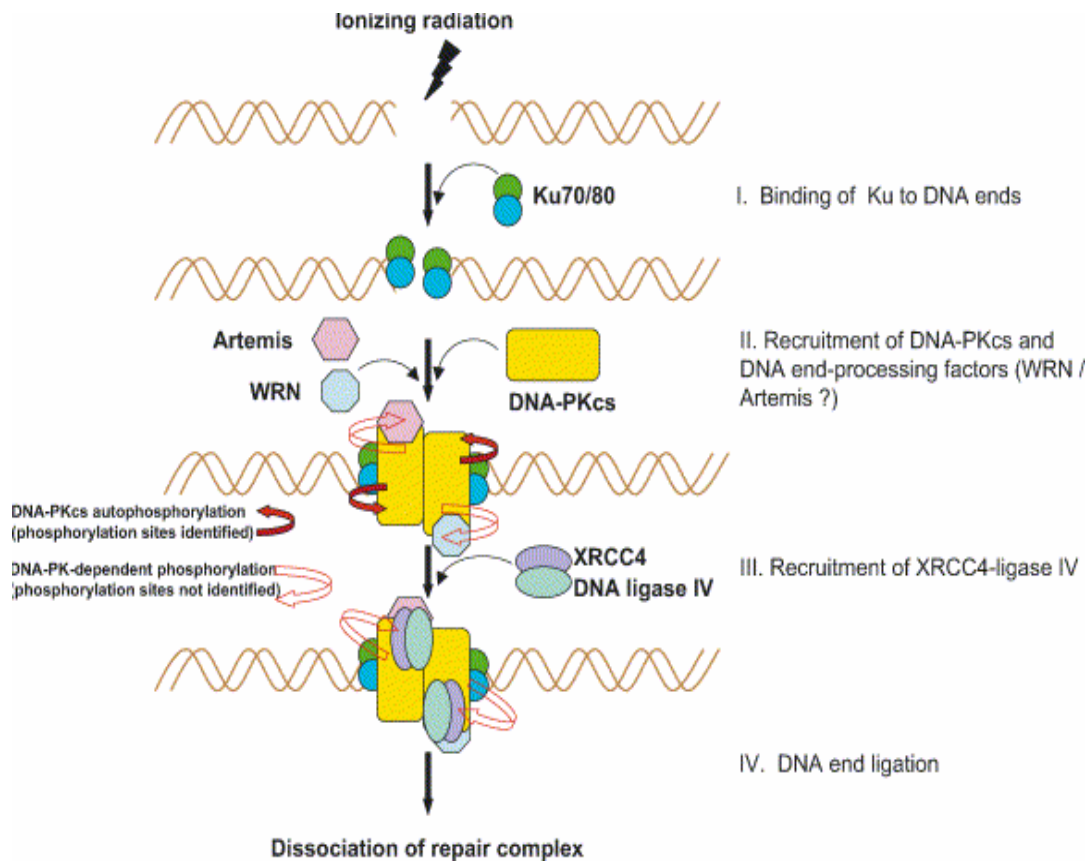
È stato dimostrato che batteri in crescita rapida con un alto numero di repliconi sono più resistenti alle radiazioni ionizzanti, che provocano dsb, rispetto a quelli in fase stazionaria e con poche copie di repliconi (13). Questi risultati suggeriscono che due molecole omologhe di DNA sono necessarie per la riparazione del DNA danneggiato.

Il meccanismo di riparazione necessita dell'interazione tra le estremità libere di un cromatide con il suo omologo. L'intero processo è mediato dai geni codificati dal gruppo di epistasi Rad52. In una fase precoce si ha la formazione di un filamento nucleoproteico, formato dalla proteina Rad51, per la ricerca della molecola omologa, una successiva fase, comporta la modificazione del sito della dsb con la produzione di un lunga estremità 3' a singolo filamento. Questo singolo filamento appena formato servirà per il legame con le proteine che favoriscono il riconoscimento dell'omologia, l'apertura del doppio filamento omologo, l'appaiamento e la successiva sintesi ad opera di una polimerasi che utilizza la molecola omologa come stampo. Il processo di riparazione termina con la risoluzione dei filamenti di DNA incrociati che porta ad avere due doppie eliche intatte (25).

1.1.2 Ricombinazione non omologa.

Studi su cellule eucariotiche trattate con raggi X o con agenti chemoterapici hanno portato alla identificazione e caratterizzazione di diverse proteine coinvolte nel NHEJ in grado di riconoscere il DNA danneggiato e di attivare il processo di riparazione. Tra le proteine identificate, 5 sono quelle principalmente coinvolte nel NHEJ: ku70, ku80, DNA-PKcs, che formano il complesso DNA-PK, XRCC4 e la Ligasi IV.

FIG. 1: Complesso della DNA-PK e ricombinazione NHEJ



Il complesso DNA-PK è una serina/treonina chinasi, la cui attività è stimolata dalle estremità libere a doppio filamento del DNA. Questo complesso svolge un ruolo fondamentale nel NHEJ. Esso è composto da una subunità catalitica (DNA-PKcs) di approssimativamente 470 kDa e

da una componente, ku, in grado di legare le estremità del DNA (26). La proteina DNA-PKcs, per via del dominio chinamico all'estremità C-terminale, appartiene alla famiglia delle fosfatidilinositolo 3-chinasi proteine chinasi (PIKKs) altri membri sono ATM, ATR e TRRAP (27). Ku è un eterodimero costituito da due proteine di approssimativamente 70 e 80 kDa, rispettivamente ku70 e ku80 (28, 29). L'eterodimero ku70/80, ma non le singole subunità separate, mostra attività di legame alle estremità libere del DNA. Studi cristallografici mostrano che la DNA-PKcs ha un canale aperto abbastanza larga da accomodare DNA a doppio filamento (30, 31), e che la struttura di ku legato al DNA mostra che il complesso ha un anello aperto nel quale si inserisce il doppio filamento di DNA (32). In base a studi in vitro con proteine purificate o con estratti cellulari, si pensa che ku inizialmente si leghi alle estremità libere del DNA, traslochi di un giro di elica lungo il filamento di DNA, e successivamente recluti la DNA-PKcs e ne stabilizzi il legame al DNA (Fig.1)(33-36). La DNA-PKcs può bloccare le due estremità della dsb in un complesso contenente due molecole di DNA-PKcs, quindi, una funzione della DNA-PK nella riparazione delle dsb potrebbe essere quella di avvicinare le estremità della rottura e facilitarne il legame (37, 38). L'altra funzione del complesso DNA-PK è reclutare e probabilmente, attivare proteine coinvolte nella modificazione e nel legame delle estremità del DNA. L'assemblamento coordinato di ku e DNA-PKcs sul DNA è seguito dal reclutamento del complesso DNA ligasi IV-XRCC4 che è responsabile della fase di legame delle estremità libere del DNA (39-42). Il complesso DNA-PK fosforila la proteina XRCC4 in vitro e la fosforilazione di XRCC4 indotta dalle radiazioni ionizzanti in vivo è dipendente dalla presenza di DNA-PK (43, 44). Il

coinvolgimento di queste proteine nel NHEJ è stato confermato mediante la generazione di topi knock-out. Mutanti difettivi dei geni codificanti DNA-PKcs, ku70, ku80, XRCC4 e DNA ligasi IV mostrano una inefficiente riparazione delle dsb, un' aumentata sensibilità alle radiazioni ionizzanti e sono difettivi nella capacità di una corretta ricombinazione V(D)J (45-49). Durante la NHEJ, la fase di legame delle estremità del DNA può essere preceduta da un processo di modifica delle estremità del DNA in modo da generare estremità che sia compatibili con la fase di legame. In questo processo sono coinvolte numerose proteine con attività esonucleasica, endonucleasica, polimerasica e elicasica (50). Due tra queste proteine sono regolate tramite fosforilazione indotta dal complesso DNA-PK: 1) la WRN una elicasi/endonucleasi la cui carenza induce una sindrome caratterizzata da invecchiamento precoce (51) , e 2) la nucleasi Artemis deficiente nei SCID (52). Un passo avanti molto importante nella comprensione della riparazione delle dsb è stato compiuto recentemente con la scoperta che la DNA-PKcs è in grado di autofosforilarsi in vivo in risposta a lesioni del DNA. La fosforilazione della DNA-PKcs in risposta alle radiazioni ionizzanti è stata dimostrata con l'uso di anticorpi che riconoscono la forma fosforilata in Thr2609 della DNA-PKcs (53). La fosforilazione della DNA-PKcs è molto rapida, avviene entro pochi minuti dall'irraggiamento e molecole fosforilate in thr2609 formano foci nel sito della rottura, dimostrando che l'evento di fosforilazione è parte della risposta precoce alla formazione di dsb.

1.2 Altre funzioni del complesso DNA-PK nei mammiferi.

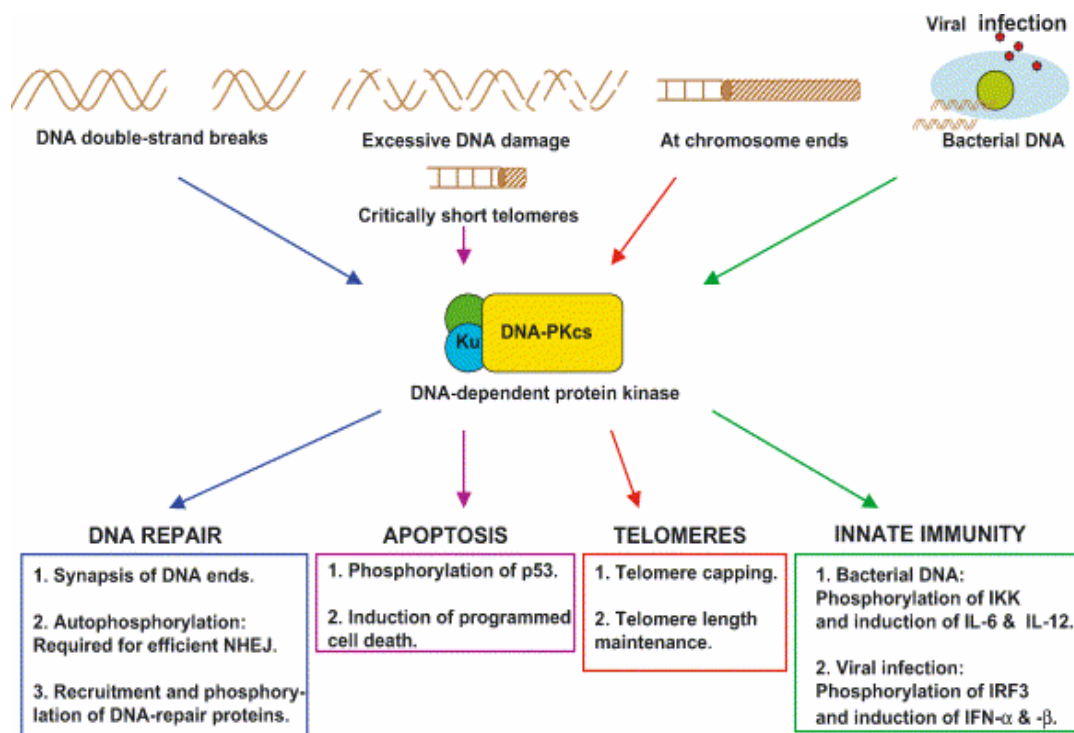
Il complesso DNA-PK è coinvolto in molti processi (Fig.2) come visto, svolge un ruolo rilevante nella NHEJ e nella risposta alle dsb; inoltre, ha un ruolo nella protezione dei telomeri, nel signaling dell'apoptosi e recentemente si è visto essere coinvolto nell'immunità innata.

Mentre la cellula deve rispondere rapidamente alla formazione di danni del DNA, deve allo stesso tempo evitare di riconoscere e trattare le estremità dei cromosomi come delle dsb. I telomeri sono strutture nucleoproteiche specializzate che proteggono le estremità dei cromosomi. Paradossalmente, componenti del complesso DNA-PK sono presenti nei telomeri, dove sono coinvolti nella formazione del capping delle estremità del cromosoma in modo da prevenire che queste siano identificate erroneamente come dsb. È stato dimostrato che ku è presente nei telomeri sia in lievito (54) che in cellule di mammifero (55-57) con la funzione di prevenire la fusione delle estremità di cromosomi diversi (56, 58). Anche la DNA-PKcs è presente nei telomeri (57) con funzioni simili a quelle di ku.

Oltre la riparazione, due altre risposte cellulari molto importanti indotte dalle dsb sono il blocco del ciclo cellulare che permette che la cellula abbia tempo sufficiente per riparare il danno e l'apoptosi che elimina le cellule che hanno subito dei danni eccessivi che non possono essere riparati. La capacità della cellula di attivare il programma di morte cellulare programmata in risposta al danno del DNA è di importanza critica per evitare l'insorgenza di tumori (59). Il complesso DNA-PK non sembra svolgere un ruolo rilevante nel signaling ai componenti del complesso del ciclo cellulare, ma, al contrario, ha un ruolo importante nel signaling dell'apoptosi. L'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti in

timociti murini, un processo dipendente da p53, diminuisce significativamente in carenza di DNA-PKcs (60). Il ruolo della DNA-PK nell'attivazione, mediata da p53, del processo di morte cellulare, non è limitata all'apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti ma anche a quella indotta dall'eccessivo accorciamento dei telomeri (61, 62). Mentre nelle fasi precoci dell'apoptosi il complesso DNA-PK ha una funzione regolatrice, nelle fasi tardive diventa il bersaglio di proteasi, la degradazione di proteine fondamentali nella riparazione del DNA potrebbe essere importante nella soppressione dei segnali anti-apoptotici (59).

FIG. 2: I diversi ruoli della DNA-PK nelle cellule di mammifero



Il complesso DNA-PK sembra, inoltre, essere coinvolto nell'attivazione della immunità innata in risposta a DNA batterico e ad infezioni virali. Il DNA batterico attiva l'immunità innata attivando macrofagi, monociti e

cellule dendritiche e inducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-6 e IL-12. l'induzione di queste citochine da parte del DNA batterico è difettiva in topi DNA-PKcs^{-/-}. La chinasi DNA-PKcs è in grado di legare DNA batterico e in seguito a tale legame fosforila la subunità beta di IKK attivando la via di trasduzione del segnale che porta all'attivazione di NF-κB e alla successiva induzione della produzione di IL-6 e IL-12 (63). Il complesso DNA-PK viene attivato anche in seguito ad infezione virale, il complesso DNA-PK attivato fosforila e stabilizza il fattore di trascrizione IRF-3 con conseguente produzione di IFN α e β nelle cellule infettate (64).

2 Scopo della tesi

La relazione tra la capacità dell'organismo di produrre una efficace risposta immunitaria e la capacità di riparare il DNA danneggiato suggerisce che difetti delle proteine che riconoscono e riparano i danni del DNA potrebbero causare alterazioni non solo nella risposta alle lesioni del DNA ma anche nella risposta del sistema immunitario agli agenti patogeni. Il legame tra la risposta immunitaria e la durata di vita, dimostrato da lavori sia nel topo (65, 66) che nell'uomo (67), ci hanno indotto ad analizzare i cambiamenti correlati della riparazione del DNA in cellule del sistema immunitario durante l'invecchiamento. In particolare, è stato dimostrato in lavori precedenti, sia in PBMC che in cellule T naive e memory (68, 69), una diversa distribuzione ed attivazione dei componenti del complesso DNA-PK tra cellule purificate da soggetti giovani e anziani. Questi studi sono stati effettuati mantenendo fisso ad 1 ora dall'irraggiamento il tempo di analisi, quindi non è stato determinato se le differenze riscontrate a quel dato tempo siano dovute ad un difetto del sistema di riparazione nell'anziano oppure siano dovute ad una diversa cinetica di attivazione e mobilizzazione delle proteine coinvolte nella riparazione dei danni radioindotti. Lo scopo di questo lavoro è di determinare se esiste una differenza nella cinetica di riconoscimento e riparazione del danno del DNA e di espressione e attivazione delle proteine del complesso DNA-PK in PBMC purificati da soggetti giovani e anziani.

3 Materiali e metodi

3.1 Cellule e procedimento di irraggiamento.

I linfomonociti (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) sono stati purificati dal sangue periferico di donatori di sangue volontari di età compresa tra i 20 ed i 35 anni presso l'Unità Ematologica dell'Università Cattolica di Roma e da soggetti anziani di età compresa tra gli 70 e i 95 anni residenti nella Casa di Riposo Roma III. Dai campioni di sangue eparinizzato sono stati ottenuti i PBMC mediante centrifugazione per gradiente di densità su Ficoll-Isopaque (Lymphoprep R, Nycomed A.S, Norvegia) come descritto da Boyum (70). I PBMC alla concentrazione di 10^7 /ml sono stati distribuiti in piastre di coltura, irraggiati con 2 o 5 Gy di Raggi X, o non irraggiati. La macchina a raggi X (Gilardoni, Italia) opera a 250 kV, 15 mA, con un filtro di Cu dello spessore di 0.5 mm, emettendo 1.4 Gy/min alla distanza di 50 cm dal fuoco. Dopo l'irraggiamento, le cellule sono state raccolte dalle piastre di coltura, lavate con terreno semplice e poi risospese in terreno di coltura completo composto da RPMI 1640 (GIBCO; Grand Island, NY); 10% di siero fetale di vitello (Seromed, Germania), 10 μ g/ml di gentamicina (EUROBIO; Francia) e 2 mM di L-Glutammina (Flow Labs, Scozia, GB). Le cellule (10^7 /ml) sono state lasciate senza stimolo in coltura o sono state stimolate con fitoemoagglutinina (phytoemoagglutinin, PHA, GIBCO) alla concentrazione finale del 1.2%. Le colture sono state incubate a 37°C. Alla fine dell'incubazione, le cellule sono state separate in tre aliquote per ogni punto sperimentale. Le tre aliquote sono state

utilizzare per la preparazione degli estratti proteici citoplasmatici e nucleari, per l'esecuzione del Comet Assay e per la marcatura in immunofluorescenza.

3.2 Alkaline Single cell gel assay (COMET Assay).

Il test è stato eseguito seguendo il protocollo messo a punto da Singh (71). Le cellule (1.5×10^5 cellule/vetrino) sono risospese in 0.7% (v/v) di low-melting point agarosio (Bio-Rad Lab., CA, USA), e disposte fra uno strato inferiore di normal-melting point agarosio (Bio-Rad) allo 0.5% (v/v) e uno strato superiore di low-melting agarosio allo 0.7% (v/v) su un vetrino da microscopio (Carlo Erba, Milano, Italia). I vetrini così preparati sono stati immersi in una soluzione di lisi (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM pH 10, DMSO 10%, Triton X-100 1%) per 1 ora a 4°C. al termine della lisi, i vetrini sono stati disposti in una camera elettroforetica orizzontale immersi nel buffer freddo per elettroforesi alcalina (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM pH>13). I vetrini vengono lasciati equilibrare nella soluzione di corsa per 25 minuti a 4°C per permettere lo svolgimento del DNA e permettere di esprimere il danno. La corsa elettroforetica avviene a 4°C per 25 minuti, 30 V (1V/cm) e 300 mA, usando un alimentatore Bio-Rad 300. dopo la corsa, i vetrini vengono lavati con una soluzione neutralizzante (Tris-HCl 0.4 M pH 7.5), e marcati con una soluzione di bromuro di etidio (12 µg/ml, Sigma) e esaminato con un ingrandimento finale di 200X con un microscopio fluorescente Olympus equipaggiato con una lampada al mercurio da 100 W. Le immagini sono state acquisite mediante una telecamera monocromatica CCD (Cohu Electronic Division, San Diego, CA, USA). Le immagine sono state successivamente analizzate mediante

un software (Delta Sistemi, Roma, Italia) in grado di acquisire le immagini, calcolare l'integrale del profilo dell'intensità di fluorescenza per ciascuna cellula, calcolare la componente di fluorescenza dovuta al DNA presente nella testa e nella coda di ciascuna cometa, e quindi calcolare una serie di parametri derivati che danno una misura della quantità di danni presenti. Duecento cellule distribuite su due vetrini sono state analizzate per ciascun punto sperimentale. I risultati sono espressi come media della lunghezza della coda (mean tail).

3.3 Immunofluorescenza.

Il saggio è stato eseguito come descritto da Lobrich (72), al termine dell'incubazione, le cellule (1 milione per ogni punto sperimentale) sono state prelevate e fissate mediante sospensione in soluzione di paraformaldeide al 4% per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione in paraformaldeide, le cellule sono state lavate 2 volte con PBS 1X e successivamente risospese alla concentrazione di 10^6 cellule/ml, 100 μ l di questa sospensione sono stati distribuiti su vetrini portaoggetto (Carlo Erba) precedentemente trattati con polilisina (Sigma). Dopo aver mantenuto i vetrini a temperatura ambiente per 1 ora per permettere l'adesione delle cellule alla polilisina, i vetrini sono stati incubati 5 min a temperatura ambiente con PBS 0.2% Triton X-100 per permeabilizzare la membrana cellulare. I PBMC vengono poi incubati con l'anticorpo primario rabbit-anti- γ -H2AX (Trevigen) per 1 ora a temperatura ambiente. L'anticorpo è stato sciolto alla diluizione 1:250 in PBS contenente 5%BSA. Successivamente i vetrini vengono incubati con l'anticorpo secondario (Anti-rabbit-Alexa Fluor 488, Molecular Probes) e lasciati in incubazione per 1 ora a temperatura ambiente. Si aggiunge poi

su ogni campione il DAPI diluito 1:5000 in PBS per 2 minuti per mettere in evidenza il DNA. Al termine di ogni incubazione i vetrini sono stati lavati tre volte in PBS. Infine su ogni campione si aggiunge il Mounting Buffer (glicerolo al 70% in PBS) e si copre con vetrino coprioggetti. Le immagini vengono acquisite con un microscopio a fluorescenza (Leica) a un ingrandimento di 60X. Sono state acquisite 100 cellule per ogni punto sperimentale.

3.4 Estratti citoplasmatici e nucleari.

Al termine dell'incubazione, i PBMC sono stati centrifugati a 350g in una centrifuga Beckman TJ-6. Per preparare gli estratti citoplasmatici, i sedimenti sono stati risospesi e lisati in 0.5 ml di tampone per lisi (Hepes 20 mM pH7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, PMSF 1 mM, NaF 200 mM, Na₂P₂O₇ 1 mM) e poi tenuti in ghiaccio per 20 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 25 µl di Nonidet P-40 (10%) e immediatamente agitati. Gli omogenati sono stati poi centrifugati a 12000g in una microcentrifuga per 45 secondi a 4°C. I sopranatanti contenenti gli estratti citoplasmatici sono stati prelevati e conservati a -80°C. I sedimenti contenenti i nuclei sono stati trattati per ottenere gli estratti nucleari. I nuclei sono stati lisati tramite un tampone di estrazione NaCl (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1.5 mM, PMSF 1 mM, NaF 200 mM, Na₂P₂O₇ 1 mM e glicerolo 25%). La sospensione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e poi centrifugata a 12000g in una microcentrifuga per 5 minuti a 4°C. Le aliquote degli estratti nucleari sono stati conservati a -

80°C. Il contenuto proteico degli estratti citoplasmatici e nucleari è stato determinato mediante saggio di Bradford (73).

3.5 Preparazione della sonda di DNA.

Un frammento di DNA a doppio filamento è stato preparato nel seguente modo: 10 pmol di un oligomero di 56 basi (5'-GAT-CAG-TGA-TGG-AGT-TGG-CCA-CTC-CCT-CTC-TGC-GCG-CTC-GCT-CGC-TCA-CTG-AGG-CC-3') marcato all'estremità terminale 5' con il fluorocromo Cy5, è stato incubato per 10 minuti a 85°C con 10 pmol dell'oligonucleotide complementare Cy5-marcato. La reazione di appaiamento dei due filamenti complementare è fatta avvenire in 10 µl di tampone di annealing (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6; MgCl₂ 5 mM; DTT 0.1 mM; EDTA 0.01 mM. I filamenti di DNA marcati sono ottenuti da MWG.

3.6 EMSA (electrophoretic mobility shift assay).

È stato utilizzato un test di rallentamento della mobilità elettroforetica per determinare l'attività di legame della proteina ku70/80 alle estremità del DNA. La sonda di DNA marcata è stata incubata con 3 µg di estratto in presenza di 620 ng di plasmide circolare pUC9 come competitore aspecifico. La reazione è avvenuta a temperatura ambiente per 30 minuti in 20 µl di tampone di binding (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 0.5 M, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, glicerolo 10%). I campioni sono stati sottoposti a elettroforesi in un gel al 6% di poliacrilammide a 200V per 2 ore in tampone TBE (Tris-HCl pH 7.5 44.5 mM, H₃BO₃ 44.5 mM, EDTA 1 mM). Al termine della corsa elettroforetica, la

fluorescenza è stata acquisita mediante il phosphoimager/fluorimager STORM840 (Molecular Dynamics).

3.7 Western blotting.

Per valutare la quantità delle proteine ku70 e ku80 nel citoplasma e nel nucleo dei PBMC, gli estratti citoplasmatici e nucleari ad uguale concentrazione proteica sono stati denaturati mediante ebollizione in soluzione denaturante (0.6% SDS, 0.1 M TRIS-HCl pH 6.8, 37.8% glicerolo, 18.2% β -mercaptoetanolo, 0.005% blu di bromofenolo) e sottoposti a SDS-PAGE utilizzando un gel di poliacrilammide al 7.5% in condizioni denaturanti. Il tampone di corsa elettroforetica è costituito da Tris-HCl pH 8.9 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0.1%. Le proteine sono state poi elettrotrasferite su filtro di PVDF (Immobilion-P 0.45 μ m, Millipore) a 30V per una notte a 4° C in tampone di trasferimento (Tris-HCl pH 8.9 25 mM, glicina 200 mM). I siti non occupati da proteine sono stati bloccati incubando le membrane con Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0.1% contenente BSA al 5%, per 1 ora a temperatura ambiente. Le membrane sono state poi incubate con anticorpi policlonali contro le proteine ku70 o ku80 umane (Serotec rispettivamente APH316 e APH317). L'anticorpo policlonale anti ku70 e il monoclonale contro β -actina (SIGMA, clone AC-15, A5441) sono stati utilizzati come controlli di caricamento per i campioni rispettivamente per gli estratti nucleari e citoplasmatici.

Dopo 1 ora di incubazione con l'anticorpo primario, gli immunoblot sono stati sviluppati utilizzando un anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina e il substrato ECF (Amersham) è stato utilizzato per

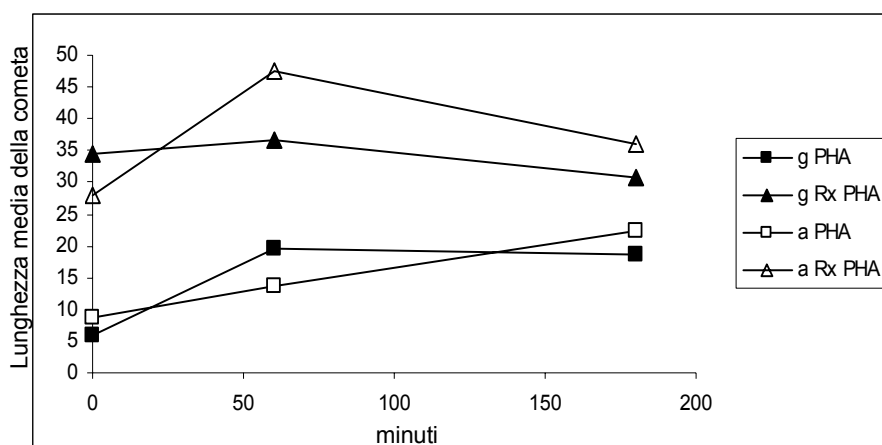
sviluppare la reazione (chemiofluorescenza). La fluorescenza è stata acquisita mediante il phosphoimager/fluorimager STORM840 (Molecular Dynamics).

4 Risultati

4.1 Danni del DNA in PBMC di soggetti giovani e anziani.

I danni del DNA indotti dal trattamento con raggi X sono stati determinati in PBMC di soggetti giovani e anziani mediante il metodo della COMETA. I risultati in Fig.3 mostrano che il trattamento con una dose di 5 Gy di raggi X induce al tempo 0 un aumento dei danni del DNA simile in entrambi i gruppi di soggetti analizzati. Nei soggetti giovani, il danno al DNA rimane costante fino a 3 ore, mentre negli anziani aumenta a 1 ora e diminuisce a 3 ore. Questi risultati indicano che il danno radioindotto al DNA è maggiore negli anziani che nei giovani.

Fig.3: Danno del DNA in PBMC purificati da soggetti giovani (g) e anziani (a)

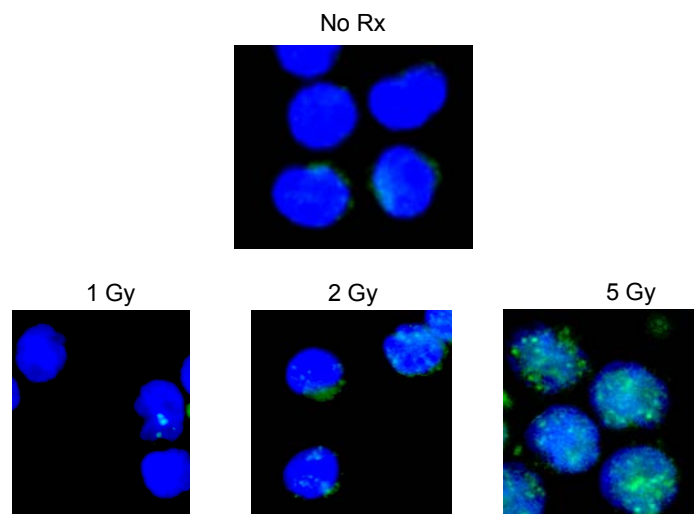


4.2 Riparazione del DNA in PBMC di soggetti giovani e anziani.

La riparazione del DNA è stata valutata a livello di singole cellule mediante la visualizzazione con anticorpi fluorescenti dei siti in cui essa

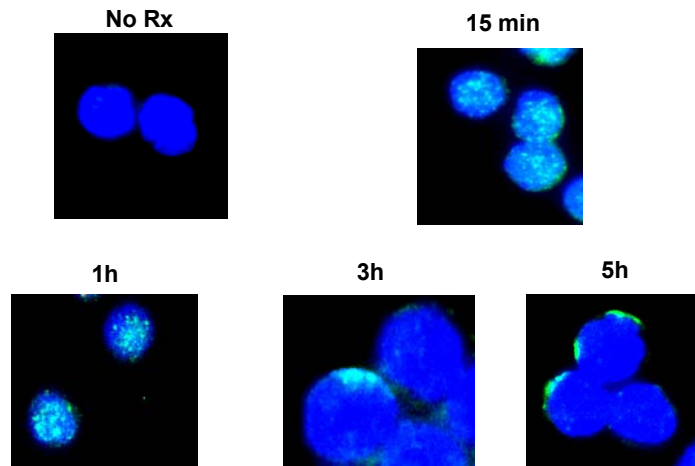
avviene (foci di riparazione). Gli anticorpi utilizzati sono specifici per la forma fosforilata dell'istone H2AX, che si trova nei siti nucleari dove inizia la riparazione delle dsb del DNA, il principale tipo di danno indotto dai raggi X.

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



Per verificare la dipendenza del numero di foci di riparazione rispetto alla dose di Rx, i PBMC purificati da soggetti giovani sono state trattate con 1, 2 e 5 Gy di Rx o non trattate. A un'ora dall'irraggiamento le cellule sono state analizzate per valutare la quantità di foci. I risultati in Fig.4 mostrano che i foci di riparazione aumentano con la dose di raggi X con cui sono state trattate le cellule. I foci di riparazione sono presenti in numero esiguo anche in cellule non irraggiate, probabilmente dovuti alla riparazione di rotture fisiologiche del DNA.

Fig.5: Foci di riparazione in PBMC irraggiati di soggetti giovani

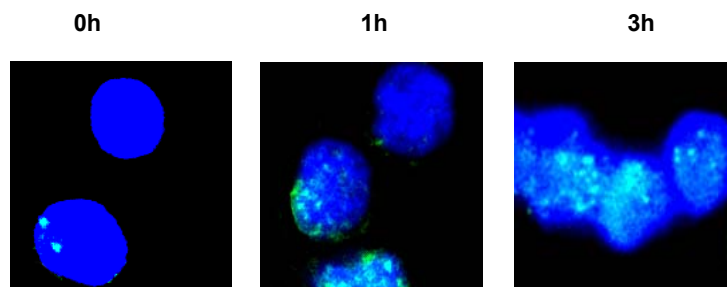


Si è passati quindi a valutare la formazione dei foci in PBMC trattati con 5 Gy di Raggi X. Le cellule irraggiate di soggetti giovani sono mantenute in coltura per 15min 1, 3 e 5 ore e successivamente analizzate, mentre per i soggetti anziani i tempi di incubazione sono 1 e 3 ore. I risultati mostrano che in cellule di soggetti giovani (Fig.5) il trattamento con raggi X induce rapidamente la comparsa dei foci di riparazione. I foci, presenti solo sporadicamente in cellule non irraggiate, sono infatti presenti in numero elevato già subito dopo l'irraggiamento e permangono fino ad 1 ora dall'irraggiamento. A tempi maggiori i foci di riparazione tendono a diminuire fino a scomparire a 5 ore.

A differenza dei giovani, in soggetti anziani (Fig.6) i foci sono presenti anche in cellule non irraggiate e il trattamento con raggi X ne induce un aumento anche se non così evidente come avviene nei PBMC di soggetti giovani. Inoltre i foci indotti in seguito al trattamento con raggi X sono presenti fino a 3 ore dopo il trattamento. La presenza della PHA durante

l'incubazione non sembra influenzare la formazione dei foci sia in soggetti giovani che anziani.

Fig.6: Foci di riparazione in PBMC irraggiati di soggetti anziani

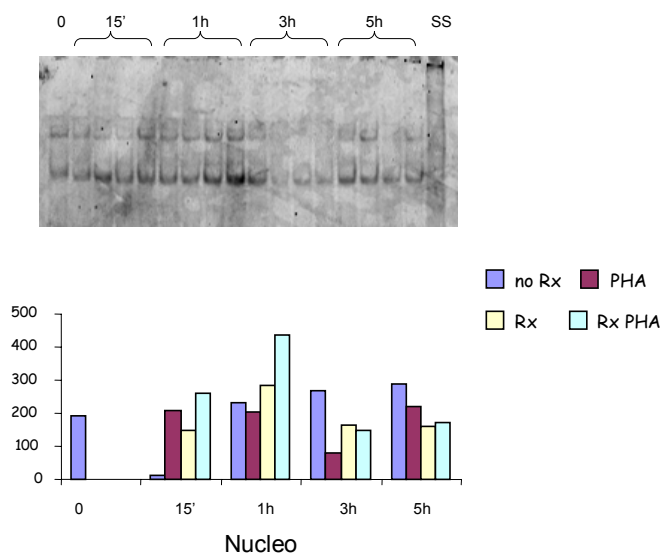


In conclusione, i foci di riparazione indotti dai raggi X compaiono più precocemente e persistono meno a lungo nei giovani che negli anziani, suggerendo che l'invecchiamento ritarda i processi di riparazione del DNA.

4.3 Attività di legame al DNA dell'eterodimero ku 70/80.

Poiché i danni indotti dalle radiazioni ionizzanti sono riparati principalmente mediante il meccanismo di ricombinazione non omologa, è stata valutata l'attività di legame al DNA dell'eterodimero ku 70/80 mediante EMSA in estratti citoplasmatici e nucleari di PBMC purificati da soggetti giovani e anziani. Come dimostrato in lavori precedenti (68), in soggetti giovani, solo gli estratti nucleari sono in grado di legare il DNA.

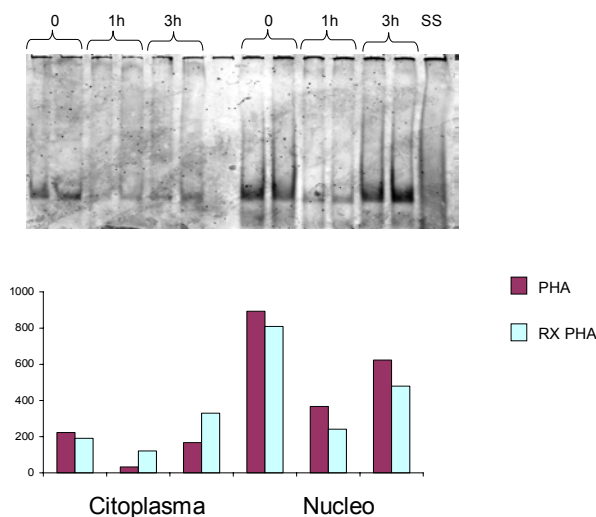
Fig.7: Attività di legame dell'eterodimero ku 70/80 in PBMC di soggetti giovani



I risultati (Fig.7) ottenuti in soggetti giovani mostrano che il trattamento con raggi X induce a 1 ora e in alcuni casi a 3 ore dall'irraggiamento un aumento della capacità dell'eterodimero presente nel nucleo di legare il DNA. L'attività di legame al DNA si riduce poi a 5 ore fino a tornare ai livelli del controllo non irraggiato.

Nei soggetti anziani, Fig.8, anche in estratti citoplasmatici l'eterodimero ku 70/80 è in grado di legare il DNA. Questo legame diminuisce in seguito al trattamento con raggi X ma rimane presente anche dopo 3 ore. In estratti nucleari, l'attività di legame al DNA dell'eterodimero ku 70/80 è maggiore rispetto a quella presente negli estratti citoplasmatici ma si riduce a 1 ora per poi aumentare a 3 ore dall'irraggiamento.

Fig.8: Attività di legame dell'eterodimero ku 70/80 in PBMC di soggetti anziani

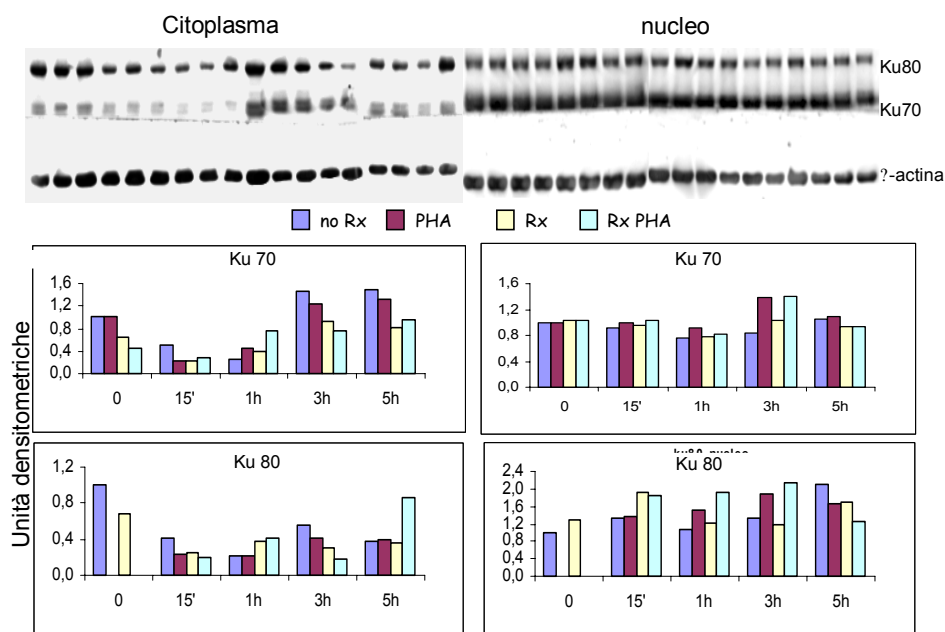


4.4 *Espressione di ku 70 e ku 80.*

Per valutare se le differenze nella capacità di legame al DNA dell'eterodimero ku 70/80 siano dovute ad una diversa distribuzione intracellulare delle subunità ku 70 e ku 80, si è determinata mediante western blotting la presenza dei componenti del complesso DNA-PK in estratti citoplasmatici e nucleari di soggetti giovani (Fig.9) e anziani (Fig.10).

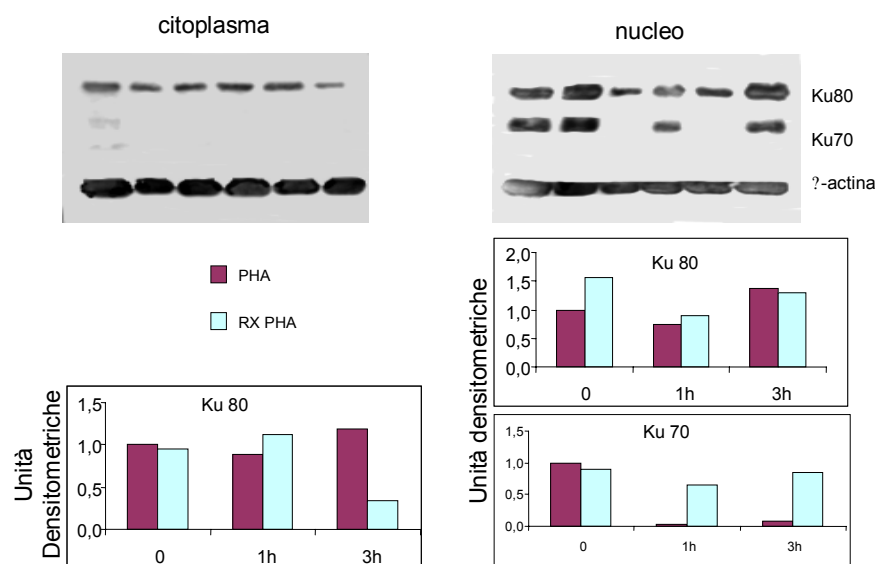
I risultati mostrano che la quantità della proteina ku 70 non varia negli estratti nucleari di PBMC di soggetti giovani. Il trattamento con raggi X e la stimolazione con PHA non inducono modificazioni nella quantità di ku 70 nucleare presente. Al contrario, la quantità di ku 70 citoplasmatica diminuisce a 15 minuti e a 1 ora dai raggi X per poi tornare a livelli paragonabili al non trattato a 3 e 5 ore.

Fig.9: Espressione di ku 70 e ku 80 in PBMC di soggetti giovani



La quantità di ku 80 è invece, modulata in seguito all'irraggiamento e all'incubazione con PHA. Nei giovani, i raggi X e la stimolazione con PHA inducono una rapida diminuzione di ku 80 negli estratti citoplasmatici. I livelli di questa proteina nel citoplasma si mantengono bassi fino a 5 ore dal trattamento fatta eccezione per il gruppo Rx e PHA a 5 ore dove è evidente un aumento della proteina ku 80 fino ai livelli espressi in cellule non irraggiate al tempo 0. Questa riduzione potrebbe essere dovuta ad una rapida traslocazione di ku 80 nel nucleo in seguito al trattamento con raggi X e/o alla stimolazione con PHA. Questa ipotesi è confermata dalla determinazione della proteina ku 80 negli estratti nucleari. I risultati mostrano infatti un aumento di ku 80 molto rapido nelle cellule trattate con Rx, aumento ancora più evidente con aggiunta di PHA durante l'incubazione. La stimolazione con solo PHA induce anche un aumento della espressione di ku 80 nucleare anche se con una cinetica più lenta, il massimo di espressione si ha infatti, dopo 3 ore di incubazione mentre dopo 15 minuti in seguito all'irraggiamento.

Fig.10: Espressione di ku 70 e ku 80 in PBMC di soggetti anziani



Negli anziani, la proteina ku 80 presente nel citoplasma rimane costante a 1 ora dal trattamento con i raggi X per poi diminuire a 3 ore. Nel nucleo, i risultati mostrano che i raggi X inducono una evidente diminuzione di ku 80, a 1 ora infatti la quantità della proteina è sensibilmente inferiore mentre a 3 ore ritorna a livelli paragonabili a quelli iniziali. La diminuzione della proteina ku 80 negli estratti nucleari di soggetti anziani potrebbe essere dovuta ad una degradazione della proteina una volta che questa abbia svolto il suo ruolo nella riparazione del DNA e a un mancato contributo da parte di nuova proteina proveniente dal citoplasma.

5 Discussione

I meccanismi di reclutamento e di attivazione delle molecole coinvolte nel riconoscimento e nella riparazione del DNA danneggiato da agenti genotossici sono poco conosciuti. Il complesso DNA-PK sembra svolgere un ruolo di primo piano, poiché è coinvolto in tre dei quattro gruppi di complementazione di cellule mutate di mammifero carenti nella riparazione delle doppie rotture del DNA (74, 75). In questo lavoro si descrive il coinvolgimento del complesso DNA-PK nella risposta ai raggi X in PBMC purificati da soggetti di diversa età, con particolare attenzione alla cinetica dei componenti del complesso in seguito all'irraggiamento. Negli esperimenti con PBMC sono state utilizzate dosi (2 o 5Gy) di raggi X che generano una modesta quantità di rotture del DNA (76, 77) con maggiore probabilità di un'accurata riparazione. Con dosi maggiori di irraggiamento, la frammentazione del DNA è maggiore con attivazione di meccanismi come il mismatch repair e l'apoptosi.

I risultati qui presentati mostrano che l'eterodimero ku 70/80 conserva la capacità di legare il DNA in cellule non irraggiate durante l'invecchiamento. Questa osservazione è molto rilevante in quanto ku è importante non solo nella riparazione delle dsb ma anche in altri meccanismi cellulari, quali la protezione dei telomeri, e la ricombinazione V(D)J, entrambi correlati con l'invecchiamento. D'altra parte, l'attivazione di ku, in termini di legame al DNA, indotta dalle radiazioni ionizzanti è diversa tra individui giovani e anziani. Nonostante i danni del DNA indotti dal trattamento con i raggi X siano maggiori negli anziani, come mostrano i risultati ottenuti mediante il metodo COMET, l'attività di legame al DNA aumenta in seguito

all'irraggiamento nei soggetti giovani con una cinetica molto veloce con un massimo dopo 1 ora dall'irraggiamento seguita da una diminuzione a tempi successivi, nei soggetti anziani, i raggi X inducono una riduzione a 1 ora e un successivo aumento a 3 ore senza comunque mai superare i livelli delle cellule non trattate. Questi dati sembrerebbero dimostrare che in soggetti anziani ci possa essere un difetto nell'attivazione del complesso DNA-PK in seguito all'induzione di dsb.

Questa ipotesi è confermata dai dati ottenuti tramite immunofluorescenza. Con la determinazione dei foci nucleari in cui è presente la forma fosforilata dell'istone H2AX è possibile determinare la formazione dei foci di riparazione in seguito al trattamento con raggi X. I risultati dimostrano una diversa cinetica di riparazione tra i PBMC purificati da soggetti giovani e anziani. I dati presentati mostrano che esiste una differenza già nelle fasi iniziali di riconoscimento del danno del DNA radioindotto, poiché nonostante i PBMC dei soggetti anziani subiscano maggiori danni dal trattamento con raggi X, il numero di foci ad 1 ora è inferiore rispetto a quello presente nei soggetti giovani. Inoltre, mentre nei soggetti giovani, a 3 ore dall'irraggiamento gran parte dei foci scompare, dimostrando l'avvenuta riparazione del danno, negli anziani, allo stesso tempo dal trattamento i foci sembrano essere anche in numero maggiore rispetto a quelli visibili dopo 1 ora, suggerendo che il processo di riparazione è ancora in corso. Insieme i dati ottenuti in immunofluorescenza e in EMSA mostrano che PBMC purificati da soggetti anziani non riescono a riparare efficientemente le dsb e che questo difetto è probabilmente dovuto ad un difetto di attivazione del complesso DNA-PK tramite la sua subunità regolatoria ku. Per dimostrare se le differenze riscontrate siano attribuibili ad una differente

quantità o ad una diversa distribuzione cellulare di ku 70 e ku 80, siamo andati a valutare l'espressione di queste proteine nel nucleo e nel citoplasma di PBMC irraggiati. I risultati delle Fig 9 e Fig.10 mostrano come nei PBMC di soggetti giovani e in quelli di soggetti anziani ci sia una diversa mobilizzazione e una differente espressione di ku 70 e ku 80 in risposta al trattamento con raggi X. Come si può vedere, nei soggetti giovani, l'irraggiamento induce una rapida diminuzione citoplasmatica e un conseguente aumento dell'espressione nucleare di ku 70 e ku 80, mentre nei soggetti anziani questo fenomeno è visibile solo dopo 3 ore dal trattamento solo per ku 80. Questi risultati inducono a ipotizzare, soprattutto per ku 80 la cui mobilizzazione è più evidente, che la proteina presente nel citoplasma funga da deposito e che in seguito alla formazione di dsb possa in caso di necessità traslocare nel nucleo. Nei PBMC purificati da soggetti anziani, questa traslocazione sembra avvenire più lentamente, questo difetto di traslocazione avrebbe come conseguenza la riduzione della proteina nucleare, la diminuzione dell'attività di legame dell'eterodimero ku 70/80, ma non spiegherebbe il ridotto numero di foci di γ -H2AX. È evidente, quindi, che i PBMC di soggetti anziani sono carenti nei meccanismi che portano ad un rapido riconoscimento e ad una efficiente riparazione delle dsb.

Recenti osservazioni (60, 61) hanno anche mostrato un ruolo della DNA-PK nell'apoptosi. Il blocco del ciclo cellulare indotto dal danno del DNA può risolversi nella riparazione del DNA e di conseguenza nella rimozione del blocco del ciclo, quando la riparazione è completa. Per cui la diversa quantità delle proteine componenti il complesso DNA-PK tra soggetti giovani e anziani potrebbe risultare in una differente efficienza nell'induzione dell'apoptosi in seguito alla formazione di dsb con

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

6 Bibliografia

1. Chadwick K.H., Leenhouts H.P.:Molecular theory of radiation biology. 1981
2. Collins A.R.: Mutant rodent cell lines sensitive to UV, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics. *Mutat. Res.*, 293, 99-118, 1993
3. Barnett and Barnett: DNA damage and mutation: contributors to the age-related alterations in T cell-mediated immune responses? *Mech Ageing Dev*, 102, 165-175, 1998
4. Lindahl T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715, 1992
5. Arlett C.F., Lehmann A.R.: Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. *Annual Rev. Genet.*, 12, 95-115, 1978
6. Setlow R.B.: Repair deficient human disorders and cancer. *Nature*, 271, 713-717,1978.
7. Chetsanga C.J., Tuttle M., Jacoboni A., Johnson C.:Age-associated structural alterations in senescent mouse brain DNA. *Biochim Biophys Acta*, 474,180-187, 1977
8. Nakanishi Y., Kram D., Schneider E.L.: Aging and sister chromatid exchange. IV. Reduced frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchanges in vivo in mouse bone marrow cells with aging. *Cytogenet Cell Genet.*, 24, 61-67, 1979
9. Zahn R.K., Reinmuller J., Beyer R., Pondeljak V.: Age-correlated DNA damage in human muscle tissue. *Mech Ageing Dev*, 41, 73-114, 1987

10. Holmes G.E., Bernstein C., Bernstein H.: Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutat Res.*, 275, 305-315, 1992
11. Hart R.W., Setlow R.B.: Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 71, 2169-2173, 1974.
12. Walford R.L., Bergmann K.: Influence of genes associated with the main histocompatibility complex on deoxyribonucleic acid excision repair capacity and bleomycin sensitivity in mouse lymphocytes. *Tissue Antigens*, 14, 336-342, 1979.
13. Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W.: DNA repair and mutagenesis. *ASM Press*, 407-593, 1995
14. Regan J.D., Setlow R.B.: Two form of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogenesis and mutagens. *Cancer Research*, 34, 3318-3325, 1974
15. Hanawalt P.C. et al.: Genomic heterogeneity of DNA repair; Role in aging. *Annals New York Academy Science USA*, 663, 17-25, 1992
16. Lengauer C., Kinzler K.W. e Vogelstein B.: Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-649, 1998
17. Mills K.D., Ferguson D.O. e Alt F.W.: The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol. Rev.* 194, 77-95, 2003
18. Jackson S.P.: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23, 687-696, 2002
19. Van Gent D.C., Hoeijmakers J.H. e Kanaar R.: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.*, 2, 196-206, 2001
20. Krejci L., Chen L., Van Komen S., Sung P., Tomkinson A.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 74, 159-201, 2003

- 21.Lieber M.R., Grawunder U., Wu X. e Yaneva M.: Tying loose ends: roles of ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 99-104, 1997
- 22.Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S. e Bonner W.M.: DNA double strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.*, 273, 5858-5868, 1998
- 23.Siino J.S. et al.: Photobleaching of GFP-labeled H2AX in chromatin: H2AX has low diffusional mobility in the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 1318-1323, 2002
- 24.Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G. e Bonner W.M.: Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.*, 158, 486-492, 2002
- 25.Thompson L.H. e Schild D.: Homologous recombination repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat. Res.*, 477, 131-153, 2001
- 26.Smith G.C. e Jackson S.P.: The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.*, 13, 916-934, 1999
- 27.Shiloh Y.: ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 155-168, 2003
- 28.Doherty A.J. e Jackson S.P.: Dna repair: now Ku makes ends meet? *Curr. Biol.*, 11, 920-924, 2001
- 29.Fearherstone C. e Jackson S.P.: Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat. Res.*, 434, 3-15, 1999
- 30.Chiu C.Y., Cary R.B., Chen D.J., Peterson S.R., Stewart P.L.: Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J. Mol. Biol.*, 284, 1075-1081, 1998

31. Leuther K.K., Hammarsten O., Kornberg R.D., Chu G.: Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DANN. *Embo J.*, 18, 1114-1123, 1999
32. Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J.: structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412, 607-614, 2001
33. Gell D., Jackson S.P.: mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acid Res.*, 27, 3494-3502, 1999
34. Singleton B.K., Torres-Arzayus M.I., Rottinghaus S.T., Taccioli G.E., Jeggo P.A.: The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol. Cell Biol.*, 19, 3267-3277, 1999
35. Hammarsten O., Chu G.: DNA-dependent protein kinase: DANN binding and activation in the absence of Ku. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 525-530, 1998
36. Yoo S., Dynan W.S.: Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acid Res.*, 27, 4679-4686, 1999
37. Cary R.B., Peterson S.R., Wang J., Bear D.G., Bradbury E.M., Chen D.J.: DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 4267-4272, 1997
38. De Fazio L.G., Stansel R.M., Griffith J.D., Chu G.: Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J.*, 21, 3192-3200, 2002
39. Hsu H.L., Yannone S.M., Chen D.J.: Defining interactions between DNA-PK and ligase IV/XRCC4. *DNA repair*, 1, 225-235, 2002

- 40.Calsou P., Delteil C., Frit P., Drouet J., Salles B.: Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase UV recruitment. *J. Mol. Biol.*, 326, 93-103, 2003
- 41.Chen L., Trujillo K., Sung P., Tomkinson A.e.: Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 275, 26196-26205, 2000
- 42.Lee J.W., Yannone S.M., Chen D.J., Povirk L.F.: Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for non-homologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res.*, 63, 22-24, 2003
- 43.Leber R., Wise T.W., Mizuta R., Meek K.: The XRCC4 gen eproduct is a target for and interaction with DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 1794-1801, 1998
- 44.Matsumoto Y., Suzuki N. Namba N., Umeda N., Ma X.J., Morita A., Tomita M., Enomoto A., Serizawa S., Hirano K., Sakaia K., Yasuda H., Hosoi Y.: Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS Lett.*, 478, 67-71, 2000
- 45.Kurisama A., Ouyang H., Dong L.J., Wang S., Li X., Cordon-Cardo C., Chen D.J., Li G.C.: Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 1403-1408, 1999
- 46.Ouyang H., Nussenzweig A., Kurisama A., Soares V.C., Li X., Cordon-Cardo C., Li W, Cheong N., Nussenzweig M., Iliakis G., Chen D.J., Li G.C.: Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination in vivo. *J. Exp. Med.*, 186, 921-929, 1997

47. Nussenzweig A., Chen C., da Costa Soares V., Sanchez M., Sokol K., Nussenzweig M.C., Li G.C.: Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature*, 382, 551-555, 1996
48. Gao Y., Sun Y., Frank K.M., Dikkes P., Fujiwara Y., Seidl K.J., Sekiguchi J.M., Rathbun G.A., Swat W., Wang J., Bronson R.T., Malynn B.A., Bryans M., Zhu C., Chaudhuri J., Davidson L., Ferrini D., Stamato T., Orkin S.H., Greenberg M.E., Alt F.W.: A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*, 95, 891-902, 1998
49. Frank K.M., Sekiguchi J.M., Seidl K.J., Swat W., Rathbun G.A., Cheng H.L., Davidson L., Kangaloo L., Alt F.W.: Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396, 173-177, 1998
50. Lieber M.R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K.: Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 712-720, 2003
51. Yannone S.M., Roy S., Chan D.W., Murphy M.B., Huang S., Campisi J., Chen D.J.: Werner syndrome protein is regulated and phosphorylated by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 276, 38242-38248, 2001
52. Ma Y., Pannicke U., Schwarz K., Lieber M.R.: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DANN-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108, 781-794, 2002
53. Chan D.W., Chen B.P., Prithivirajasingh S., Kurisama A., Story M.D., Qin J., Chen D.J.: Autophosphorylation of the DNA-dependent protein

- kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double strand breaks. *Genes Dev.*, 16, 2333-2338, 2002
- 54.Gravel S., Larrivee M., Labrecque P., Wellinger R.J.: Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science*, 280, 741-744, 1998
- 55.Bianchi A., de Lange T.: Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.*, 274, 21223-21227, 1999
- 56.Hsu H.L., Gilley D., Blackburn E.H., Chen D.J.: Ku is associated with the telomere in mammalian. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 12454-12458, 1999
- 57.d'Adda di Fagagna F., Hande M.P., Tong W.M., Roth D., Lansdorp P.M., Wang Z.Q., Jackson S.P.: Effects of DNA non-homologous end – joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 11, 1192-1196, 2001
- 58.Hsu H.L., Gilley D., Galande S.A., Hande M.P., Allen B., Kim S.H., Li G.C., Campisi J., Kohwi-Shigematsu T., Chen D.J.: Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.*, 14, 2807-2812, 2000
- 59.Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H.: DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe against carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 511, 145-178, 2002
- 60.Wang S., Guo M., Ouyang H., Li X., Cordon-Cardo C., Kurisama A., Chen D.J., Fuks Z., Ling C.C., Li G.C.: The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 1584-1588, 2000

61. Espejel S., Franco S., Sgura A., Gae D., Bailey S.M., Taccioli G.E., Blasco M.A.: Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *Embo J.*, 21, 6275-6287, 2002
62. Espejel S., Franco S., Rodriguez-Perales S., Bouffler S.D., Cigudosa J.C., Blasco M.A.: Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J.*, 21, 2207-2219, 2002
63. Chu W., Gong X., Li Z., Takabayashi K., Ouyang H., Chen Y., Lois A., Chen D.J., Li G.C., Karin M., Raz E.: DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell*, 103, 909-918, 2000
64. Karpova A.Y., Trost M., Murray J.M., Cantley L.C., Howley P.M.: Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 2818-2823, 2002
65. Puel A., Mevel J.C., Bouthillier Y., Feingold N., Fridman W.D., Mouton D.: Toward genetic dissection of high and low antibody responsiveness in Biozzi mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 14742-14746, 1996
66. Doria G.: Biozzi mice. In Delves P.J., Roitt I.M. *Encyclopedia of Immunology*, second ed. Academic Press, New York, 342-346, 1998
67. Franceschi C., Monti D., Sansoni P., Cossarizza A.: The immunology of exceptional individuals. The lesson of centenarians. *Immunol. Today*, 16, 12-16, 1995
68. Frasca D., Barattini P., Tocchi G., Guidi L., Pierelli L., Doria G.: Role of DNA-dependent protein kinase in recognition of radiation-induced DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. Immunol.*, 13, 791-797, 2001

69. Scarpaci S., Frasca D., Barattini P., Guidi L., Doria G.: DNA damage recognition and repair capacities in human naive and memory T cells from peripheral blood of young and elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.*, 124, 517-524, 2003
70. Boyum Y.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, S97, 77-85, 1968
71. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191, 1988
72. Rothkamm K., Lobrich M.: Evidence for a lack of DNA double strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 5057-5062, 2003
73. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976
74. Weaver D.T.: What to do at an end: DNA double-strand break repair, *Trends Genet.*, 11, 388-392, 1995
75. Jeggo P.A., Taccioli G.E. e Jackson S.P.: Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK- *Bioessays*, 17, 949-957, 1995
76. Ahn S.Y., Nevaldine B., Hahn P.J.: Direct measurement by pulsed-field gel electrophoresis of induction and rejoining of X-ray induced double-strand breaks in cultured mouse cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 59, 661-675, 1991

77.Erixon K., Cedervall B.: Linear induction of DNA double-strand breakage with X-ray dose, as determined from DNA fragment size distribution. *Radiat. Res.*, 142, 153-162, 1995