

# *Università della Calabria*

---

FACOLTÀ DI FARMACIA E SCIENZE DELLA  
NUTRIZIONE E DELLA SALUTE

Dottorato di Ricerca in  
“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”  
XXII ciclo - Settore BIO/10

## **RUOLO DI iASPP NELLA REGOLAZIONE DEL MISMATCH REPAIR IN MELANOMA**

**Coordinatore**

*Prof. Giacinto Bagetta*

**Tutor**

*Prof. Giuseppe Genchi*

**Candidata**

*Valentina Senatore*

**Tutor all'estero**

*Dott. Daniele Bergamaschi*

---

**Anno Accademico 2009/2010**



# INDICE

INDICE .....	3
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUZIONE .....	9
1.1. LA PELLE.....	9
1.1.1. Struttura della pelle .....	9
1.1.2. I melanociti.....	11
1.2. IL MELANOMA .....	13
1.2.1. Melanomagenesi.....	13
1.2.2. Fattori di rischio.....	15
1.2.3. Melanoma e apoptosi .....	18
1.3. RIPARO DEL DNA .....	19
1.3.1. Meccanismi di riparo del DNA .....	19
1.3.2. Il meccanismo Mismatch Repair (MMR) .....	22
1.3.3. Mismatch repair nel ciclo cellulare e in apoptosi .....	24
1.3.4. MMR e melanoma .....	26
1.3.5. Modifiche post-traduzionali a carico delle proteine del MMR .....	27
1.4. LA FAMIGLIA DI P53 .....	28
1.4.1. P53 e MMR .....	30
1.5. LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE ASPP.....	30
1.5.1. Il componente inibitorio iASPP.....	31
1.5.2. iASPP in cancro e stati patologici .....	33
1.6. SCOPO DEL LAVORO .....	34
2. METODI .....	36
2.1. COLTURE CELLULARI .....	36
2.1.1. Isolamento dei melanociti dalla pelle umana .....	36

2.1.2.	Condizioni di coltura per i melanociti primari .....	37
2.1.3.	Cellule di melanoma .....	37
2.1.4.	Condizioni di coltura per le cellule di melanoma.....	37
2.1.5.	Altre linee cellulari .....	38
2.1.6.	Congelamento e scongelamento delle cellule .....	38
2.1.7.	Raccolta delle cellule .....	39
2.1.8.	Conta cellulare.....	39
2.2.	TECNICHE DI MANIPOLAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI .....	39
2.2.1.	Trasfezioni transienti .....	39
2.2.2.	Clonaggio del vettore pSUPERIOR.retro.puro .....	40
2.2.3.	Inserzione di short hairpin RNAs per il silenziamento di iASPP.....	41
2.2.4.	Produzione del virus e amplificazione del plasmide .....	42
2.2.5.	Infezione retrovirale.....	42
2.2.6.	Isolamento dell'RNA cellulare e produzione di cDNA.....	43
2.2.7.	PCR quantitativa (qPCR) .....	43
2.3.	TECNICHE DI TRASFORMAZIONE BATTERICA.....	44
2.3.1.	Trasformazione di batteri competenti.....	44
2.3.2.	Amplificazione dei plasmidi .....	44
2.3.3.	Purificazione del DNA plasmidico da E.coli .....	45
2.4.	TECNICHE PROTEICHE.....	45
2.4.1.	Lisi cellulare e concentrazione proteica.....	45
2.4.2.	Elettroforesi e Western Blot.....	46
2.4.3.	Immunoprecipitazione (IP) .....	47
2.5.	TECNICHE DI IMMUNOFLUORESCENZA.....	47
2.5.1.	Immunocitochimica a fluorescenza .....	47
2.5.2.	Saggio dell'annessina V per la misura dell'apoptosi (Citofluorimetria a flusso) .....	48
2.6.	ALTRI METODI.....	49
2.6.1.	Saggio della DL-DOPA .....	49
2.6.1.	Riparo del DNA: misura dell'attività di MutS $\alpha$ .....	49
2.6.2.	Metodi statistici .....	50

3. RISULTATI .....	51
3.1. COLTURE DI MELANOCITI PRIMARI.....	51
3.1.1. Isolamento dei melanociti primari.....	51
3.1.2. Verifica della purezza e dell'efficienza metabolica dei melanociti primari .....	52
3.1.3. Verifica della efficienza enzimatica dei melanociti.....	52
3.2. ESPRESSIONE DI FATTORI APPARTENENTI AL SISTEMA MMR IN CELLULE DI MELANOMA E MELANOCITI PRIMARI .....	53
3.3. ESPRESSIONE DI iASPP IN CELLULE DI MELANOMA E MELANOCITI PRIMARI.....	57
3.4. L'OVER-ESPRESSIONE DI iASPP IN CELLULE DI MELANOMA INFLUENZA IL SISTEMA MMR.....	59
3.4.1. Studio della conformazione di MSH2 indotta dall'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UISO-Mel6: fosforilazione .....	60
3.4.2. Studio della conformazione di MSH2 indotta dall'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UISO-Mel6: ubiquitinazione.....	62
3.4.3. MSH2 e iASPP co-localizzano con l'ubiquitina in cellule Uiso-Mel6 dopo trasfezione di iASPP.....	63
3.4.4. L'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UISO-Mel6 influenza l'attività di riparo del DNA mediata da MutS $\alpha$ .....	65
3.5. iASPP co-localizza con le proteine appartenenti al sistema MMR e lega MSH2 .....	66
3.5.1. Co-localizzazione fra iASSP e fattori appartenenti al sistema MMR .....	66
3.5.2. Legame fra iASSP e fattori appartenenti al sistema MMR.....	68
3.6. SILENZIAMENTO DEL GENE DI IASPP MEDIANTE ShRNAs E SUE CONSEGUENZE.....	71
3.6.1. Silenziamento del gene di iASPP mediante shRNAs .....	71
3.6.2. Effetto del silenziamento del gene di iASPP sull'espressione di fattori appartenenti al sistema MMR.....	72
3.6.3. Effetto del silenziamento del gene di iASPP sull'attività del complesso MutS $\alpha$ .....	73
3.6.4. Effetto del cisplatino su induzione dell'apoptosi, espressione genica e attività del complesso MutS $\alpha$ in cellule silenziate per iASPP .....	74
4. DISCUSSIONE .....	78

5.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	85
6.	PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSI.....	104
6.1.	Pubblicazioni inerenti al lavoro di tesi.....	104
6.2.	Partecipazioni a congressi .....	104
6.3.	Altre pubblicazioni.....	105

# ABSTRACT

Cutaneous melanoma is an aggressive malignancy accounting for 4% of skin cancers but 80% of all skin-cancer related deaths. Its incidence is rapidly rising and advanced disease is notoriously treatment-resistant. The role of apoptosis in melanoma pathogenesis and chemoresistance is poorly characterized. Mutations in p53 occur infrequently and are not critical for tumour development. This may alternatively result from p53 upstream or downstream pathway defects or from alterations of p53 family co-activators, including the ASPP family members (Apoptosis Stimulating Proteins of p53).

iASPP is the inhibitory member of the ASPP family. By binding p53, iASPP is believed to inhibit apoptosis in cancer, resulting in its oncogenic role. Recently it has been found highly expressed in several types of cancer, such as endometrial and hepatocellular carcinoma, acute leukemia and breast cancer. iASPP upregulation in some cases occurs with a concomitant downregulation of ASPP expression, the pro-apoptotic family member, thus providing a further option for targeting the p53 family in the treatment of cancers. So far, iASPP expression and its role in skin cancer is not yet been explored.

Recently great attention has been given to DNA repair processes in melanoma, particularly to Mismatch Repair (MMR). This is a DNA damage repair mechanism, correcting bases mismatches due to replication errors or exogenous agents' activity, whose defects have been demonstrated leading to genomic instability (microsatellite instability, MSI) frequently linked with cancer. MSI and altered expression of MMR factors such as MSH2 and MLH1 (both at mRNA and protein levels) has often been observed in primary and metastatic melanoma, compared to normal melanocytes and nevi.

Aim of this study is to investigate the role of iASPP in melanoma and particularly its involvement in DNA repair and apoptosis. In this work we used RT-PCR and western blot techniques to demonstrate that both MMR factors and iASPP were expressed at higher levels in several melanoma cell lines, mainly metastatic, compared to primary melanocytes extracted from human skin. We also observed a post-translational modification in the MSH2 protein (which is due at least to an ubiquitination) upon increased iASPP expression in three different melanoma cell lines, independently of p53 status. This results in an increase of DNA repair activity measured by MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6 complex) binding to a DNA bases mismatch. To confirm these results, we used a set of shRNAs targeting iASPP gene in metastatic melanoma cell line WM1158 and we found that the reduction of iASPP leads to a lower MSH2 protein expression, without affecting MLH1, and to a 50% reduction of MutS $\alpha$  activity. Immunoprecipitation experiments showed that iASPP directly binds endogenous MSH2 and MLH1 in melanoma cells and this interaction was confirmed by immunostaining where iASPP partially co-localized with MMR factors in the nucleus of melanoma cells. Moreover, iASPP silencing and its consequent reduction in expression and activity of MMR factors, is able to sensitize melanoma cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agent cisplatin.

Taken together these results confirm the antiapoptotic role of iASPP and suggest a novel role of iASPP in melanoma, such as a modulator of MMR that may help in the future to explain further its oncogenic role in cancer. This study is also the first report available about iASPP expression in melanoma, highlighting the importance of investigating further this important target gene in such a chemoresistant disease. Future studies will be necessary to further elucidate the mechanism by which iASPP interferes with the MMR system and how it affects apoptosis and cell cycle progression in melanoma disease.

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1. LA PELLE

### 1.1.1. Struttura della pelle

La pelle è il tessuto di rivestimento del corpo umano, la cui funzione principale è quella di proteggere gli organi interni favorendone gli scambi con l'esterno. Al suo interno sono riconoscibili tre strati: ipoderma, derma ed epidermide (Figura 1). L'ipoderma è lo strato localizzato sotto il derma. Si tratta per la maggior parte di un tessuto adiposo, infatti la sua principale funzione è quella di isolamento e fonte energetica di riserva nei periodi di digiuno.

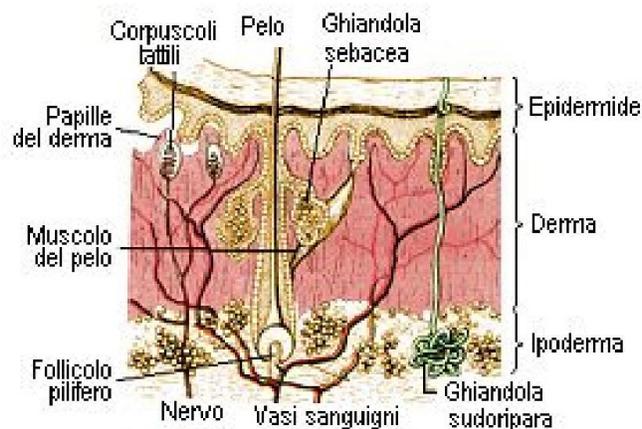
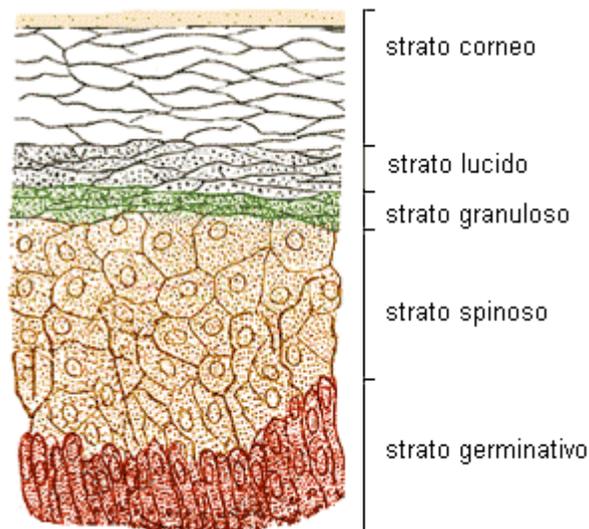


Figura 1: Struttura della pelle

Il derma è lo strato interno della pelle. Al suo interno troviamo le ghiandole sudoripare, i bulbi piliferi e le terminazioni nervose. Il derma nutre, ossigena e sostiene l'epidermide, che è priva di vasi. Elementi fondamentali del derma sono il collagene e l'elastina, che hanno rispettivamente la funzione di assicurare robustezza alla pelle e renderla elastica. L'epidermide e il derma sono uniti tra loro tramite papille dermiche, il cui fine è quello di aumentare l'area di contatto in modo da ottimizzare gli scambi.

L'epidermide è la parte più esterna, formata da una serie di cellule, per lo più cheratinociti, indurite dalla presenza della cheratina. Alla base ci sono una serie di cellule che si riproducono in continuo per andare a sostituire le cellule che muoiono e si staccano. L'epidermide è a sua volta organizzata dallo strato più profondo allo strato più superficiale in differenti strati in base alle caratteristiche morfologiche che i cheratinociti assumono durante il processo di differenziazione: strato basale, strato spinoso, strato lucido, strato granuloso e strato corneo (Figura 2).



**Figura 2: Ultrastruttura dell'epidermide**

I cheratinociti dello strato basale sono cellule cubiche, unite tra loro e a loro volta ancorate alla membrana basale, che unisce l'epidermide al derma. Nello strato basale

sono presenti altri tipi cellulari quali i melanociti, le cellule di Langerhans, le cellule di Merkel e infiltrati linfocitari. Lo strato spinoso è formato da cellule di aspetto diverso rispetto a quelle dello strato basale, più appiattite. Maturando queste cellule si portano verso la superficie epidermica. Tra le cellule presenti in questo strato ci sono le cellule di Langerhans che hanno funzione di difesa e sono ramificate. Lo strato lucido, di transizione, è costituito da 3-5 strati di cellule appiattite, ancora vitali ma prive di nucleo. Sono cellule ricche di filamenti che servono per "soffocare" la cellula mandandola incontro ad apoptosi. Questo strato non è sempre evidenziabile, essendo troppo sottile e poco colorabile per essere visualizzato al microscopio ottico in altre sedi. Lo strato granuloso contiene cellule pavimentose ricche di cheratina e di granuli di cheratoialina. L'ultimo strato dell'epidermide è quello corneo; qui le cellule sono ridotte a lamine essendo andate incontro a morte cellulare.

### 1.1.2. I melanociti

I melanociti, sono cellule di forma per lo più stellata che risiedono nello strato più profondo dell'epidermide (Figura 3), lo strato basale, dove presiedono alla produzione della melanina, pigmento che determina la colorazione della pelle nei diversi gruppi etnici e in risposta alla stimolazione tramite raggi UV.

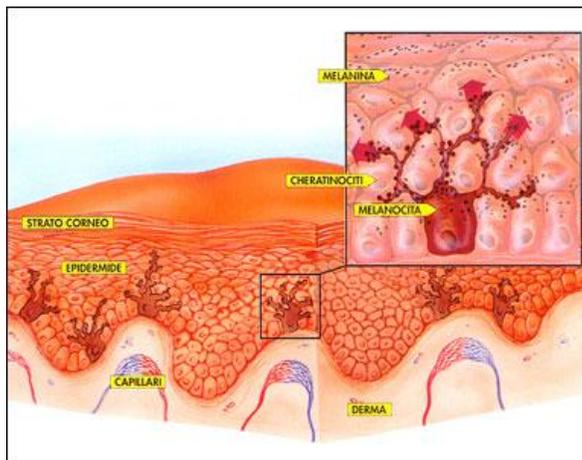
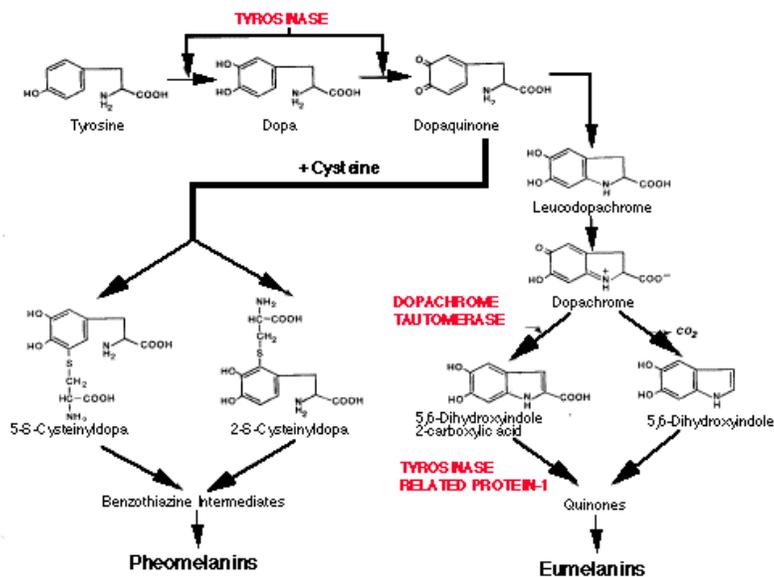


Figura 3: Localizzazione dei melanociti nell'epidermide

In genere non ci sono differenze nella distribuzione o densità di melanociti tra i differenti sessi e razze. Le differenze di colore della pelle sono dovute solo alla differente attività dei melanociti stessi e non al numero. I melanociti sono cellule per lo più senescenti, con un ciclo cellulare molto lento, di cui non è stato ancora determinata la frequenza di duplicazione in vivo. Fattori di crescita e UV pare accelerino l'attività mitotica di queste cellule. I melanociti sono l'unico tipo cellulare nella pelle a produrre le melanine, molecole ad alto peso molecolare legate a strutture proteiche con le quali formano le melano-proteine. Nell'uomo ci sono due classi di melanine le eumelanine (marroni) e le feumelanine (rossastre). Per entrambe, il substrato precursore è l'amminoacido tirosina. Sono cellule dendritiche che tramite i prolungamenti entrano in contatto con i cheratinociti, ai quali forniscono la melanina, che producono all'interno di organuli detti melanosomi secondo un complesso processo biochimico (Figura 4).



**Figura 4: Processo biochimico per la produzione di melanina**

La necessità di isolare il processo all'interno dei melanosomi risiede nella sua tossicità, in quanto è un processo che porta alla produzione di radicali liberi, tossici per

la cellula. Le melanine, una volta prodotte sono liberate nello spazio extracellulare e raggiungono i vicini cheratinociti, modulando la pigmentazione cutanea.

## **1.2. IL MELANOMA**

Il melanoma è il più aggressivo fra i tumori della pelle. Pur rappresentando solo il 4% di tutti i tumori a carico di tale organo, è responsabile di ben l'80% delle morti per tale tipo di cancro (Miller and Mihm, 2006). È un tumore che origina nei melanociti ed è ad oggi uno dei più aggressivi e con alto tasso di mortalità con cure disponibili inefficaci, soprattutto per le forme metastatiche, mentre le forme primarie sono curabili quasi esclusivamente mediante rimozione chirurgica.

I melanociti interessati, possono essere presenti nell'epidermide, nei bulbi piliferi, più raramente nelle mucose e nell'occhio. La cute è colpita nell'85% circa dei casi. Con l'eccezione delle più rare forme amelanotiche, il melanoma si presenta come una neoformazione pigmentata, più o meno estesa in superficie ed in profondità, con tendenza a metastatizzazione per via linfatica ed ematica; può insorgere su cute sana o su un nevo melanocitico preesistente.

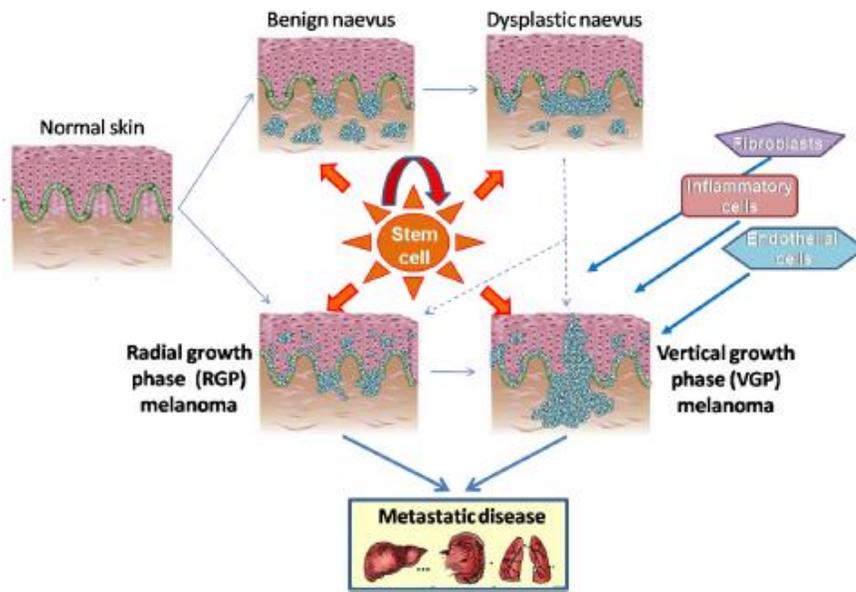
Nel 2006, la World Health Organization, stimava che nel mondo compaiono 160'000 nuovi casi di melanoma ogni anno e che le morti dovute a melanoma sono circa 48'000 (Lucas et al., News Release 2006) ma questi numeri sono in costante aumento di anno in anno. Per questo impressionante aumento di incidenza, questo tumore ha assunto una valenza di emergenza sanitaria nelle popolazioni maggiormente colpite e la necessità di trovare cure efficaci è di un certo interesse sociale.

### **1.2.1. Melanomagenesi**

Di grande importanza nella genesi del melanoma è considerata una mutazione molto frequente, riscontrata in diversi casi di tale tumore. Si tratta della mutazione V600E a carico del gene BRAF (di cui si discuterà più approfonditamente in seguito). L'80% dei casi di mutazioni di BRAF in melanoma è rappresentato da V600E. La frequenza è simile anche in nei benigni e displastici, suggerendo che questa mutazione

potrebbe essere uno degli eventi precoci della trasformazione neoplastica (Pollock et al., 2003). Una delle teorie ad oggi accettate sostiene infatti che il melanoma origini per il 75% dei casi da nei benigni. Questi sono aggregati di melanociti che proliferano in seguito ad una modificazione genetica (Michaloglou et al., 2008) ma che controllano la proliferazione grazie all'attivazione di programmi di senescenza mediati da p16/Rb. Quando i melanociti trovano il modo di sfuggire a tale stato di senescenza, ha inizio la fase di progressione del melanoma. Questa teoria è in accordo con il modello di Clark (Figura 6) (Clark et al., 1984), secondo cui, dopo la trasformazione dei nei benigni, le cellule attraversano due stadi: melanoma primario e RGP (Radial Growth-Phase). In tali casi, le cellule maligne rimangono circoscritte nello strato basale dell'epidermide. Successivamente, entrano nella fase VGP (Vertical Growth-Phase) attraversando il derma. Da questo momento in poi il tumore, se non trattato, può crescere ed espandersi degenerando in breve tempo nella fase successiva metastatica in cui le cellule tumorali raggiungono i vasi e in tal modo colpiscono altri organi vitali (Figura 5).

Sebbene il modello di Clark sia accettato a livello internazionale, è oggi riconosciuto che una certa porzione di casi di melanoma possa avere diverse origini. La teoria che si sta oggi facendo più avanti coinvolge possibili mutazioni in cellule staminali presenti nella pelle (Fang et al. 2005; Monzani et al. 2007; Topczewska et al. 2006). Le cellule staminali potrebbero iniziare la proliferazione maligna direttamente o anche attraverso i nei (Figura 5).



**Figura 5: Modello di Clark e teoria delle cellule staminali**

Sia il melanoma che i nei benigni originerebbero, secondo questa teoria, da una cellula staminale mutata e a seconda della severità della mutazione, il tessuto andrebbe incontro ad una proliferazione limitata (nei) o ad una proliferazione maligna (melanoma). Le cellule staminali che hanno originato la proliferazione, rimarrebbero nel tessuto melanotico a nutrire e stimolare le altre cellule, che progrediscono attraverso i vari stadi, alla metastasi.

### **1.2.2. Fattori di rischio**

Il principale fattore di rischio ad oggi identificato per il melanoma, è l'esposizione ai raggi ultravioletti (UVR) tant'è che il melanoma si verifica più frequentemente nelle aree della pelle più esposte ai raggi del sole. Gli UVR promuovono la formazione del tumore attraverso mutazioni dirette al genoma (UVB), produzione di fattori di crescita, abbassamento delle difese immunitarie e formazione di specie reattive dell'ossigeno

(UVA) (Jean et al., 2001). Vari studi hanno dimostrato come l'alta esposizione ai raggi del sole, soprattutto in età giovane, sia strettamente correlata al rischio di sviluppo del melanoma (Gandini et al., 2005). Inoltre l'uso di lampade abbronzanti artificiali, attualmente molto diffuso nei paesi occidentali, incrementa il rischio di melanoma in età giovanile (Green et al., 2007). Fattore altamente predisponente è il colore della pelle, in particolare, risultano più esposti soggetti con pelle chiara e capelli biondi o rossi, per lo più di origine caucasica. Il colore di pelle e capelli generalmente rispecchia la minore capacità dei melanociti di produrre pigmenti protettivi quali la melanina e si riflette nella minore predisposizione della pelle all'abbronzatura. Questo è da addurre alla variabilità polimorfica della proteina MC1R (Melanocortin-1 Receptor) (Palmer et al., 2000; Kennedy et al. 2001; Landi et al. 2005;), recettore posto sulla superficie dei melanociti che risponde alla stimolazione da parte degli ormoni  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanocytes Stimulating Hormone) e ACTH (Adenocorticotrophic Hormone) attivando un processo c-AMP dipendente che porta alla produzione di melanina all'interno dei melanosomi. Polimorfismi di interesse in melanoma sono associati anche ad altri geni implicati in pigmentazione quali ASIP (Agouti Stimulating Protein), TYR (Tyrosinase) e TYRP1 (Tyrosinase-Related Protein-1) (Brown et al. 2008; Gudbjartsson et al. 2008; Raimondi et al. 2008).

Diversi altri fattori genetici sono considerati in relazione con il rischio di sviluppare il melanoma. Tra questi, sono frequenti in casi di melanoma ereditario (40%) (Goldstein et al. 2006), ma rari in melanoma sporadico (Bataille et al., 2000), mutazioni del gene soppressore tumorale CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), localizzato sul cromosoma 9p21 che codifica per la proteina Ink4a o p16, la quale ha la funzione di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1 promovendo la fosforilazione di Rb (Retinoblastoma protein). Dallo stesso locus genico è codificato un altro oncosoppressore ARF o p19, implicato nell'attivazione di p53, trascritto mediante meccanismi di splicing alternativo e anche questo è, seppur raramente, mutato in melanoma.

Alterazioni genetiche molto comuni in melanoma risultano a carico della via delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) in particolare a carico di NRAS (incidenza del 15-25% in linee cellulari di melanoma e melanoma primario) (Ball et al., 1994;

Van-Elsas et al., 1995, 1996; Van't Veer et al., 1989) e uno dei suoi effettori BRAF, il cui gene è mutato con una frequenza del 50-70% (Davies et al., 2004; Gorden et al., 2003; Wan, 2004). Inattivazione o compromissione della funzione di queste proteine genera difetti nell'attivazione degli effettori MEK ed ERK della stessa cascata di trasduzione, risultando spesso in attivazione costitutiva di segnali proliferativi (Figura 6).

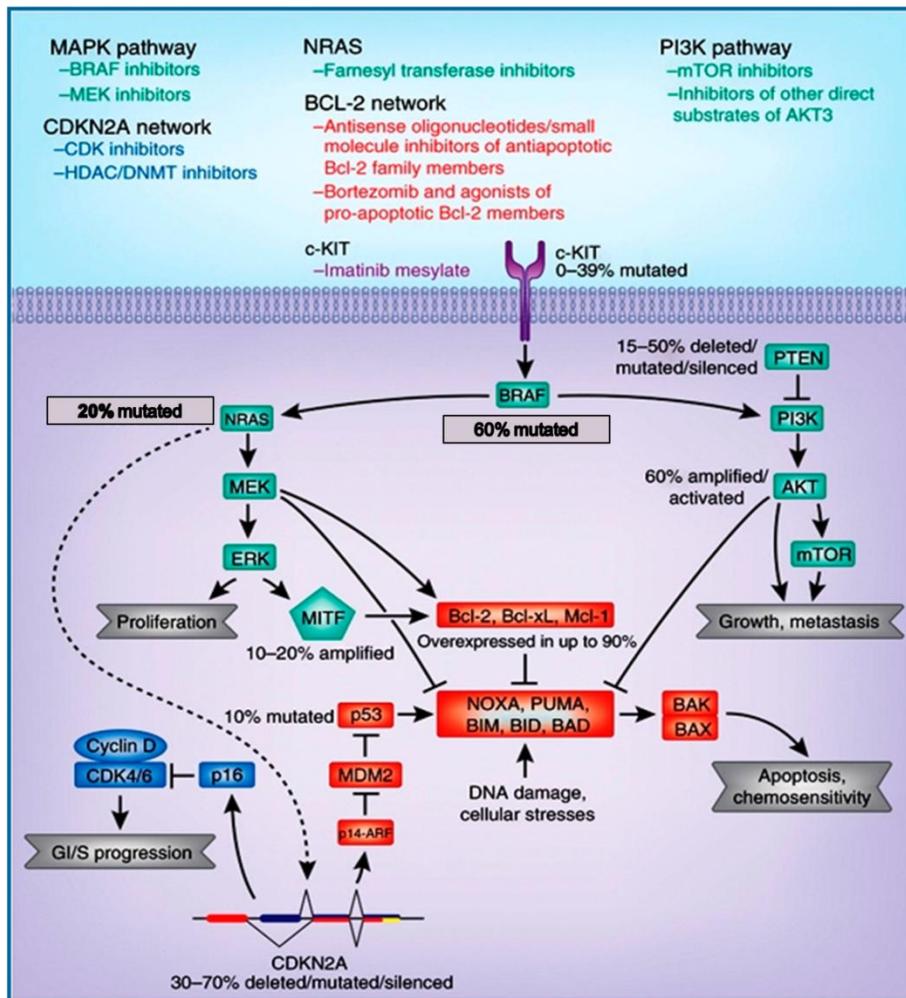


Figura 6: Vie metaboliche alterate in melanoma

Tra le altre vie proliferative alterate, quella di PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase) (Figura 6) che coinvolge gli effettori AKT e PTEN. In melanoma, spesso è stata osservata l'inattivazione di PTEN come evento tardivo (Guldborg et al., 1997) che può cooperare con l'attivazione oncogenica della via di RAF/BRAF così come con le alterazioni al gene CDKN2A, contribuendo alla tumorigenesi.

Al di là delle alterazioni genetiche, sono anche note alterazioni della via metabolica di NF- $\kappa$ B, mediante up-regolazione delle subunità NF- $\kappa$ B p50 and Rel-A (McNulty et al. 2001; Meyskens et al. 1999) o down-regolazione dell'inibitore di NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B (Dhawan and Richmond 2002; Yang and Richmond 2001).

### **1.2.3. Melanoma e apoptosi**

Altri fattori alterati in melanoma comprendono proteine coinvolte in apoptosi. In generale i melanomi manifestano meno apoptosi spontanea rispetto ad altri tipi di tumori (Mooney et al. 1995) e a volte è stata riscontrata overespressione di fattori antiapoptotici come Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub>, Mcl-1 (Cerroni et al. 1995; Selzer et al. 1998; Tang et al. 1998). Tra i fattori essenziali per il corretto svolgimento dell'apoptosi, ci si aspetterebbe un coinvolgimento della proteina p53, frequentemente mutata o compromessa in un numero molto elevato di tumori. Ma il suo ruolo non è stato ancora ben stabilito. Infatti, mutazioni a carico di p53, si manifestano con una frequenza minore del 10% (Papp et al., 1996). Essendo p53 per lo più wild type, il fallimento della induzione dell'apoptosi a questa di solito addotta può essere dovuto alla modifica dei segnali a monte o a valle di questa proteina. Uno dei meccanismi suggeriti per l'inattivazione del wild-type di p53 in melanoma, è la sua degradazione promossa da MDM2, proteina spesso overespressa in melanoma (Harland et al., 2005; Hernberg et al., 1998) e facente parte del sistema di turnover proteico mediato dal proteasoma.

Alcune spiegazioni, sono da ricercare nel fatto che i melanociti sono cellule programmate per sopravvivere per l'intera loro vita in situazioni di forte stress, situazioni che sono dannose per la maggior parte delle altre specie cellulari e che normalmente determinano l'attivazione di processi apoptotici. Infatti, come già evidenziato, il processo di produzione di melanina è di per sé un processo che porta alla produzione di radicali liberi. Inoltre, i melanociti hanno sviluppato un'attenuata

risposta ai raggi UV. Infatti, è noto che esprimono alti livelli di Bax (Bcl-2-Associated X protein) (Nishimura et al., 2005) e GADD45 $\alpha$  (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein 45 $\alpha$ ), la cui espressione è antiapoptotica (Fayolle et al., 2008). Questo può in parte spiegare la forte resistenza del melanoma ai comuni agenti terapeutici. D'altra parte, p53 è espressa a discreti livelli in melanoma. Alcuni studi mostrano come melanoma primari o metastatici siano positivi per p53 e a volte presentino anche una overespressione, ma in tal caso, secondo alcuni autori, la prognosi del paziente sembra essere peggiore (Sparrow et al., 1995). Questo è tuttavia in contrasto con un recente studio (Terzian et al., 2010) in cui l'espressione elevata di p53 sarebbe invece correlata con una migliore prognosi per il paziente, in quanto rallenterebbe la progressione del tumore, promuovendo l'arresto del ciclo cellulare. Ancora, alcuni target diretti di p53, attraverso cui la proteina esercita la sua azione apoptotica per via mitocondriale, risultano alterati nell'espressione. Durante la progressione del melanoma il fattore APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), un membro dell'apoptosoma, è spesso down-regolato (Soengas et al., 2001) così come PUMA (P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis), anch'essa implicata nei meccanismi apoptotici coinvolgenti i mitocondri (Karst et al., 2005).

### **1.3. RIPARO DEL DNA**

#### **1.3.1. Meccanismi di riparo del DNA**

Il DNA della cellula è costantemente esposto a differenti insulti che possono generare mutazioni e quindi alterare il comportamento della cellula. Gli insulti possono essere esogeni come radiazioni o farmaci, o endogeni come specie reattive dell'ossigeno generate da diversi tipi di stress. La scelta dell'uno o dell'altro meccanismo di riparo, dipende in particolare dal tipo di danno (Figura 8). I principali sistemi di riparazione includono:

1. Riparazione diretta del danno ad esempio da parte della O<sup>6</sup>-MetilGuaninaMetilTransferasi (MGMT) che rimuove specificamente gruppi metilici dalla posizione O<sup>6</sup> della guanina. Per questo tipo di riparazione non è richiesto nessun filamento di DNA come stampo.

2. Meccanismi di riparo per escissione, che rimuovono il nucleotide danneggiato sostituendolo con un nucleotide intatto complementare a quello presente nel DNA non danneggiato. I meccanismi di riparo per escissione, che riguardano i danni al singolo filamento di DNA, comprendono:

**a.** Base Excision Repair (BER) riparo per escissione di base: è un processo multifase di riparo del danno che coinvolge lesioni al DNA non ingombranti, causate per lo più da specie reattive dell'ossigeno (ROS). Entrambe le vie iniziano con l'attivazione di una N-MetilPurina DNA-Glicosilasi (MPG) che riconosce la base alterata e rompe il legame N-glicosidico tra la base danneggiata e lo zucchero fosfato della struttura del DNA. Questo taglio genera un sito apurinico/apirimidinico (AP: sito apurinico) o un sito abasico nel DNA ed una AP-endonucleasi 1 (APE1) elimina la base azotata, lasciando il fosfato e il desossiribosio. Una liasi poi toglie fosfato e zucchero così che una DNA-polimerasi legghi il nuovo nucleotide e la ligasi lo incorpori nel filamento. Il BER quindi può riparare la de-aminazione della Citosina in Uracile o la trasformazione della Guanina in 8-oxo-guanina, analogo dell'adenina.

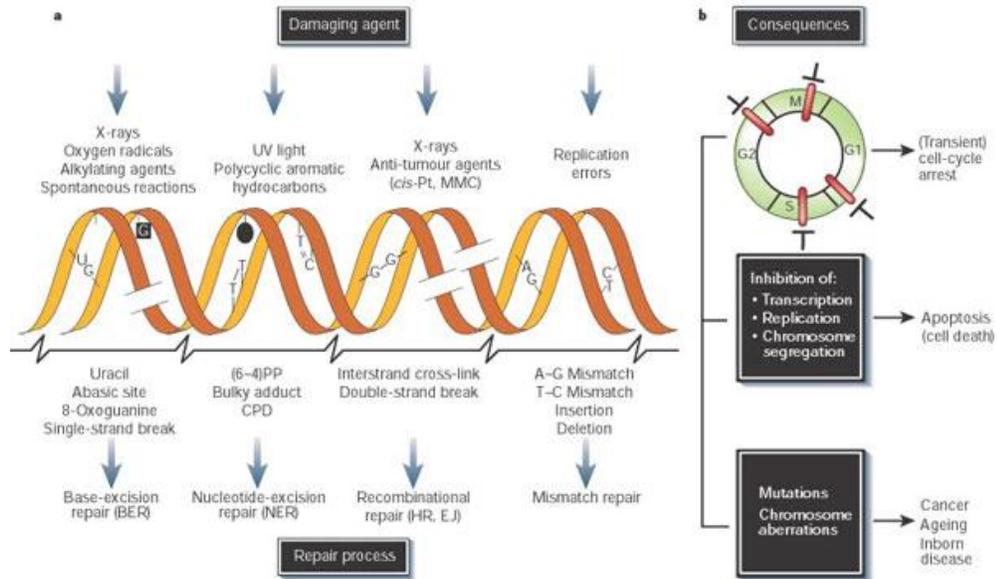
**b.** Nucleotide Excision Repair (NER) Riparazione per escissione di nucleotidi, ripara un danno che coinvolge filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi. In particolare, NER ha lo scopo di riparare dimeri di pirimidina formati in seguito ad esposizione a raggi ultravioletti o agenti ossidanti. Questo processo può essere suddiviso in due sottoprocessi noti come TCR (Transcription-Coupled Repair) and GGR (Global Genome Repair) (Costa et al, 2003). Il primo ripara specificamente errori dovuti alla trascrizione del DNA, coinvolgenti la DNA polimerasi II, il secondo monitora l'intero genoma e la risposta è iniziata dal complesso proteico UV-DDB (UV Damage DNA-Binding

protein) che è formato da due subunità, DDB1 o p127 (127 kDa) e DDB2 o p48 (48 kDa).

**3.** Mismatch Repair (MMR): corregge errori di replicazione e di ricombinazione genetica o *loops* di inserzioni/delezioni, che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del DNA oppure all'azione di agenti esogeni, come farmaci utilizzati nelle terapie anticancro quali ad esempio il cisplatino o altri agenti alchilanti.

**4.** Ricombinazione omologa: Ripara rotture presenti su entrambi i filamenti (Double Strand Breaks, DSBs) che possono essere dovute sia ad agenti esogeni che endogeni. Richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo per la riparazione della rottura. Il meccanismo di riparazione per ricombinazione è usato in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA si sta replicando o ha completato la duplicazione.

**5.** Non-Homologous End-Joining (saldatura delle estremità non omologhe): è anch'esso coinvolto nella riparazione dei DSBs e riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo. Tuttavia può esserci una perdita di sequenza durante questo processo e quindi tale riparo può essere mutagenico.

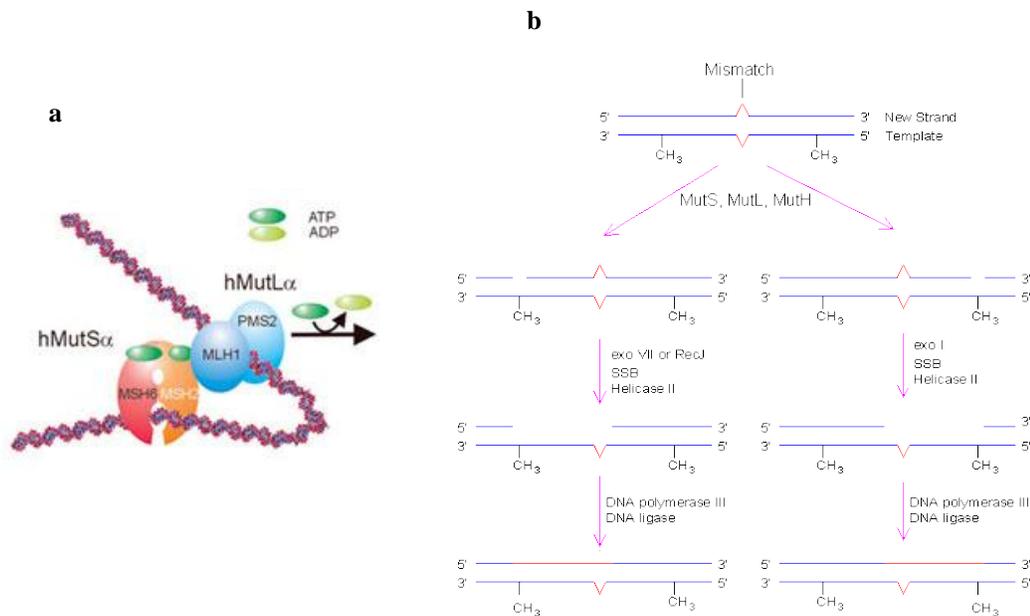


**Figura 7: Principali meccanismi di riparazione negli eucarioti**

### 1.3.2. Il meccanismo Mismatch Repair (MMR)

Le mutazioni al DNA possono essere causate da errori che avvengono durante i normali processi di replicazione della cellula. Questi errori o l'azione di agenti esogeni, generalmente possono provocare uno scorretto appaiamento di basi che viene prontamente riparato dal sistema MMR. Il coinvolgimento del sistema MMR nell'escissione e nel riparo delle basi erroneamente appaiate è il meccanismo più noto di riparazione ed è ormai abbastanza studiato nonché altamente conservato dai procarioti agli eucarioti (Modrich, 2006). I fattori coinvolti in MMR sono vari ma in particolare due dimeri ricoprono un ruolo fondamentale. Il dimero MutS è presente nelle forme MutS- $\alpha$  e MutS- $\beta$ . MutS- $\alpha$ , formato dalle proteine MSH2 e MSH6, è responsabile del riconoscimento di piccole distorsioni (loops) nel DNA mentre MutS- $\beta$ , dato dall'associazione di MSH2 con MSH3, è coinvolto nel riconoscimento di loops più estesi. Cronologicamente, sono questi due complessi ad iniziare l'azione di riparo (Figura 8a).

Dopo il riconoscimento del sito danneggiato da parte di MutS, il complesso MutL, presente nelle forme  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , in cui MLH1 si associa rispettivamente con PMS2, PMS1 e MLH3, viene reclutato per dare inizio all'escissione e alla sostituzione del frammento di DNA. L'intero processo si avvale dell'idrolisi di molecole di ATP e coinvolge, oltre alle proteine citate, una serie di altri enzimi, quali SSB (proteine stabilizzatrici dell'elica) esonucleasi (EXO), ligasi e polimerasi (Figura 8b).



**Figura 8: Meccanismo d'azione del sistema MMR** (a) Associazione dei complessi MutS e MutL al DNA danneggiato (b) Schema rappresentativo della cronologia del meccanismo di azione del sistema MMR

Oltre che in questo processo, il sistema MMR, sembra essere implicato nel riconoscimento di basi alchilate a causa di agenti quali N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), cisplatino e altri agenti ossidanti. Il riconoscimento di questi addotti al DNA attiva segnali cellulari correlati all'arresto del ciclo cellulare e/o all'apoptosi (Jiricny, 2006) che verranno discussi in seguito.

I processi di riparazione mediati dal sistema MMR falliscono quando uno o più componenti dello stesso sono mutati o malfunzionanti. Si stima che cellule difettose in MMR accumulino mutazioni del genoma in quantità 100-1000 volte superiore rispetto a cellule normali (Parsons et al., 1993; Bhattacharyya et al., 1994). L'accumulo di mutazioni favorisce un fenomeno noto come instabilità del microsatellite (MSI). Il microsatellite consiste in una serie di sequenze dinucleotidiche o trinucleotidiche ripetute e si parla di MSI quando le unità ripetute sono perse o moltiplicate in tessuti neoplastici se confrontate con quelle di tessuti sani. Questo fenomeno è rilevato soprattutto in tumori in cui vengono riscontrate mutazioni a carico di MSH2, MLH1 e PMS2, ma non di MSH6 (Boland et al., 2008). Mutazioni germinali di queste proteine sono responsabili di almeno il 50% dei casi di HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) o sindrome di Linch, un disordine ereditario per cui chi ne è affetto ha un'elevata probabilità di sviluppare cancro al colon in età molto giovane, nonché altri tipi di tumore come all'endometrio, alle ovaie, allo stomaco, al cervello molto prima della normale età media.

### **1.3.3. Mismatch repair nel ciclo cellulare e in apoptosi**

Esistono diverse evidenze che il sistema MMR possa influenzare il controllo del ciclo cellulare e l'apoptosi. Osservazione interessante riguarda l'aumento di espressione della proteina MSH2 in linfociti e leucociti in proliferazione (Marra et al., 1996) così come in cellule dell'endometrio (Hamid et al., 2002) e del tratto digestivo (Leach et al, 1996) in fase proliferativa. È stato ipotizzato che questo sia dovuto all'esigenza delle cellule di monitorare l'avvento di mutazioni dovute alla duplicazione.

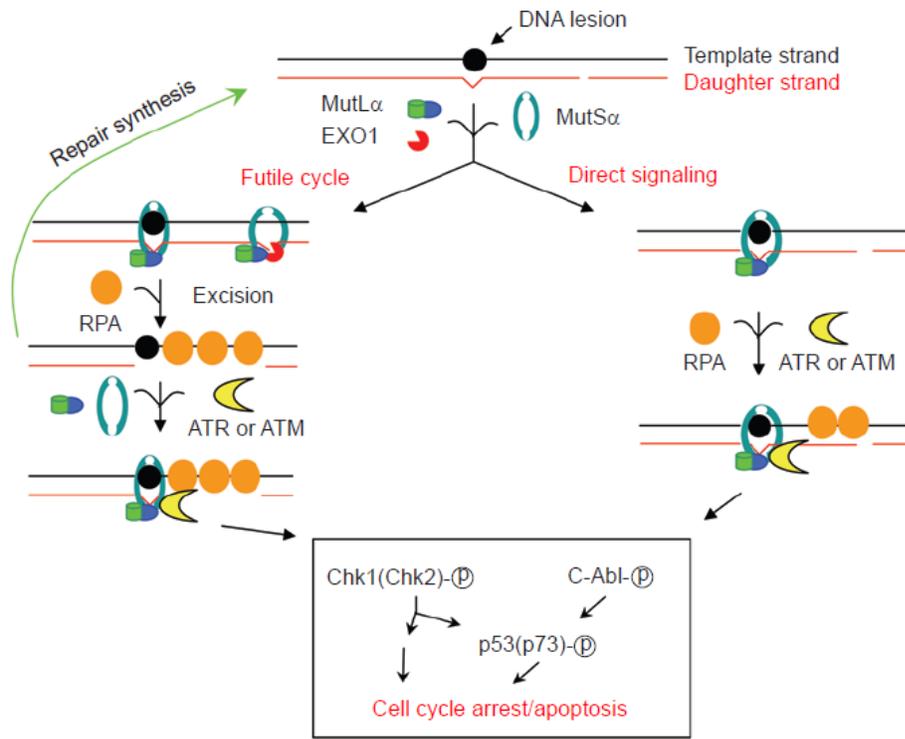
Le proteine del MMR funzionano, nel ciclo cellulare, anche come mediatori di segnali conseguenti al danno al DNA; in seguito all'esposizione a MNNG o agenti alchilanti, le cellule deficienti nelle proteine del MMR, mostrano scompensi nella fase G2/M del ciclo nonché ridotta attivazione dei segnali apoptotici mediati da p53/p73 indotti dagli stessi farmaci (Duckett et al 1999; Gong et al., 1999). L'attivazione dell'arresto del ciclo cellulare sembra essere regolato dalla via metabolica attivata da ATR/Chk1 nella quale MutS e MutL agiscono a monte (Stojic et al, 2004; Beardsley et

al., 2005; Yoshioka et al., 2006; Wang et al., 2003). Alcuni studi ritengono perfino che l'attivazione di ATR e Chk1 sia diretta, in quanto è stato dimostrato che MSH2 e MSH6, ma non le proteine del complesso MutL (in particolare MLH1) legano queste proteine (Wang et al, 2003, Liu et al., 2010). Recenti studi dimostrano inoltre un ruolo nell'arresto del ciclo cellulare mediato dal sistema MMR anche dell'effettore ATM, notoriamente coinvolto, insieme ad ATR nel controllo del ciclo cellulare mediato in particolare dall'effettore Chk2 (Matsuoka et al., 1998, 2000 Ahn et al., 2000). Adamson et al. (2005), hanno documentato una riduzione dell'arresto in fase G2/M, in cellule deficienti nel sistema MMR e in ATM. Hanno inoltre dimostrato come MSH2 interagisca fisicamente anche con Chk2. Insieme, tutti questi risultati dimostrano un sicuro coinvolgimento del MMR nel controllo del ciclo cellulare mediato da ATM e ATR (Figura 9).

Esistono due teorie che spiegano come MutS e MutL recluterebbero ATM e ATR. La prima afferma che la base errata presente su un filamento, provochi la duplicazione dell'errore sul filamento complementare. L'errore può essere riparato solo sul primo filamento perciò è necessario attivare un nuovo processo di MMR reclutando altre proteine per riparare il filamento complementare. Si genera così un ciclo futile che sarebbe in grado di attivare i sistemi ATM e ATR. La seconda teoria afferma invece che MutS e MutL, attivino tali vie metaboliche direttamente, quando legano il DNA danneggiato (Figura 9) (Li, 2008).

Il sistema MMR sembra anche essere implicato in apoptosi. Zhang et al. (1999) hanno dimostrato che l'overespressione in vitro di MSH2 e MLH1 induce apoptosi in cellule tumorali. Inoltre è stato dimostrato che cellule MEF (Mouse Embryo Fibroblast) che non esprimono MSH2 o MSH6, sono resistenti all'apoptosi mediata da UVB (Peters et al., 2006; Young et al., 2003). Alcune evidenze mostrano che, nonostante il meccanismo di riparazione primario attivato in seguito ad esposizione di cellule e tessuti a UVR sia NER, in melanoma, il meccanismo MMR sia anch'esso attivato in seguito ad esposizione ad UVR con conseguente influenza nell'arresto del ciclo cellulare e apoptosi (Seifert et al., 2007). Un coinvolgimento del MMR in apoptosi nel cancro della pelle è confermato ulteriormente dal fatto che topi MSH2 knock-out

sviluppano più facilmente tumori della pelle in seguito ad esposizione ai raggi UVB (Young et al., 2004).



*Cell Research (2008) 18:85-9*

**Figura 9: Modello di coinvolgimento di MMR nell'attivazione di segnali cellulari in seguito a danno al DNA**

#### 1.3.4. MMR e melanoma

Diversi studi riportano una elevata espressione di MSH2 e talvolta di MLH1, sia a livello proteico che di mRNA in vari tipi di cancro, tra cui il melanoma (Srivastava et al. 2004, Leach et al. 2000, Hussein et al., 2001, Rass et al, 2001, Castrilli et al, 2002), e questo fenomeno sembra essere associato ad un incremento della proliferazione. Diversi studi hanno descritto casi di MSI in nei displastici e melanoma (Hussein et al., 2001; Alvino et al., 2002; Shpitz et al., 2005). Inoltre, un difettoso sistema MMR

rappresenterebbe un fattore di rischio per lo sviluppo di melanoma in quanto l'analisi di cellule o tessuti cancerosi ha dimostrato talvolta la perdita di espressione dei geni codificanti per MSH2 e MLH1 (Korabiowska et al., 2000, 2004), oppure la presenza di mutazioni negli stessi geni (Hussein and Wood, 2003). Tuttavia, i casi di MSI in melanoma sembrano non essere frequentemente associati a mutazioni della proteina MSH2 sebbene la sua espressione sia livello proteico che di mRNA risulti piú elevata rispetto a quella di nei non neoplastici (Rass et al, 2001). Situazione analoga è stata riscontrata in pazienti affetti da melanoma primario delle mucose in un piú recente studio in cui si è osservata una piú alta immunoreattività di MSH2, MLH1, PMS2 rispetto a tessuti sani ma bassa percentuale di MSI (Marani et al 2007). I casi di MSI sembrano piuttosto associati alla perdita di espressione di fattori appartenenti al sistema MMR (Alvino et al, 2002). Questo porta ad ipotizzare una interferenza nei pathways metabolici dei casi di melanoma in cui tali fattori siano altamente espressi. Marani et al. (2007), ipotizzano che fattori appartenenti al MMR siano coinvolti nella proliferazione cellulare in quanto le cellule di melanoma altamente positive sono per lo piú pleomorfe. Altri studi confermano l'elevata espressione di proteine appartenenti al MMR, in particolare in tessuti metastatici quando confrontati con tessuti di melanomi primari (Kauffmann et al., 2008). Non molte informazioni sono disponibili a proposito dei segnali mediati dai fattori appartenenti al sistema MMR in melanoma, che si aggiungono all'attività di riparo del DNA. è disponibile tuttavia uno studio molecolare, che associa l'attività di comuni farmaci utilizzati in melanoma quali temolozomide e futemustine, al sistema MMR che medierebbe l'apoptosi promossa da questi farmaci (Naumann et al. 2009). Inoltre, Pepponi et al, nel 2003, avevano mostrato che cellule deficienti in MMR, sono altamente resistenti all'azione del temolozomide, dato confermato anche da Runger et al (2000).

### **1.3.5. Modifiche post-traduzionali a carico delle proteine del MMR**

Recentemente tre studi hanno posto l'attenzione su possibili vie di regolazione delle proteine del sistema MMR, in particolare sulle possibili fosforilazione e ubiquitinazione. Christmann et al (2002) hanno dimostrato che le proteine MSH2 e

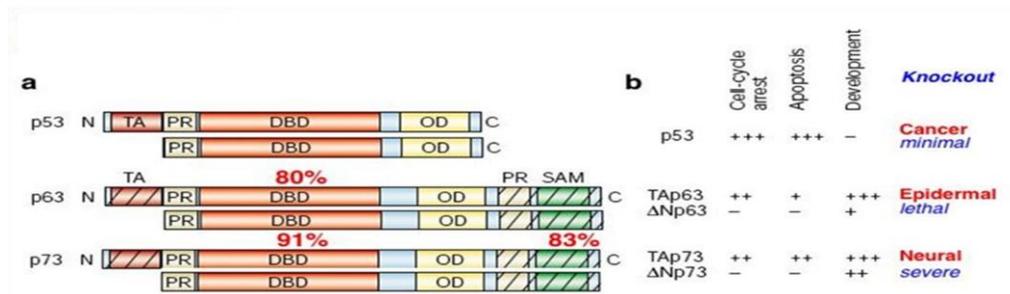
MSH6 sono fosforilate in vitro e in vivo e come la loro fosforilazione possa influenzare l'attività di legame delle proteine alle basi erroneamente accoppiate. Hernandez-Pigeon et al. (2004, 2005) hanno invece dimostrato che le stesse proteine sono degradate mediante il sistema del proteosoma, e più precisamente ubiquitinate. Inoltre, anche questi autori affermano che MSH2 e MSH6 siano fosforilate dalla protein chinasi C $\zeta$  e che tale fosforilazione prevenga la degradazione mediata dal proteosoma.

#### **1.4. LA FAMIGLIA DI P53**

La proteina p53 è un oncosoppressore coinvolto nella mediazione di processi che si attivano in risposta a situazioni di stress e agenti, chimici e/o fisici, che causano danno al DNA (Vousden and Lu, 2002). L'attività di p53 come oncosoppressore è possibile grazie alla sua capacità di agire come un fattore di trascrizione per molti geni coinvolti nel mantenimento dell'integrità del genoma, nell'arresto del ciclo cellulare e/o in apoptosi, nonché senescenza cellulare (Vogelstein et al., 2004) e autofagia (White et al., 2009). Il coinvolgimento di p53 nello sviluppo del cancro è confermato dal fatto che animali difettosi in p53 o in cui il gene sia silente, mostrano una predisposizione a sviluppare spontaneamente una serie di tumori (Donehower et al., 1992; Harvey et al., 1995). Inoltre, mutazioni in p53 sono riscontrabili in almeno il 50% dei tumori umani così come, in pazienti affetti dalla rara sindrome di Li-Fraumeni che sviluppano in età molto giovane diversi tipi di cancro, come sarcomi, cancro al seno e al cervello, la proteina p53 è difettosa alla nascita a causa di una o più mutazioni germinali (Malkin, 1993).

Nel 1997 sono stati identificati due nuovi membri della famiglia di p53: p73 (Kaghad et al., 1997) e p63 (Schmale and Bamberger, 1997). Questi due nuovi fattori di trascrizione mostrano un elevato grado d'omologia con la sequenza genica di p53, che si riflette in un elevato grado di identità tra le tre proteine (Levrero et al., 2000). Inoltre, i membri di questa famiglia condividono una comune struttura modulare che consiste di un dominio di transattivazione (transactivation domain, TAD) posto all'estremità N-terminale, un dominio di legame al DNA (DNA binding domain, DBD) situato nella

porzione centrale ed un dominio di oligomerizzazione (oligomerization domain, OD) contenuto nella regione C-terminale (Figura 10a). A queste somiglianze strutturali segue una corrispondenza funzionale tra i diversi membri della famiglia; infatti p73 e p63 svolgono funzioni ed attività simili a quelle esercitate da p53 essendo anch'esse coinvolte nella regolazione dell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione dell'apoptosi (Figura 10b), ruolo che svolgono nelle loro diverse forme  $\Delta N$  e TA, generate da fenomeni di splicing alternativo a livello genico. I domini strutturali introdotti precedentemente mostrano un elevato grado di omologia tra i vari membri della famiglia. La regione maggiormente conservata è il DBD che mostra il 63% di omologia tra p73 e p53 ed il 60% di omologia tra p63 e p53. Questo spiega la capacità di p73 e di p63 di interagire con i medesimi siti canonici di legame di p53, e la conseguente transattivazione dei promotori ad essi associati. (De Laurenzi and Melino, 2000). p63 e p73 inoltre contengono all'estremità carbossi-terminale un ulteriore dominio di interazione proteina-proteina, costituito da un motivo SAM (Sterile Alpha Motif). Questo particolare dominio è implicato nell'interazione proteina-proteina e può mediare l'interazione con lipidi di membrana (Barrera et al., 2003).



**Figura 10: La famiglia di p53.** (a) Struttura delle proteine della famiglia di p53. (b) Schema riassuntivo delle diverse funzioni esercitate dai membri della famiglia di p53

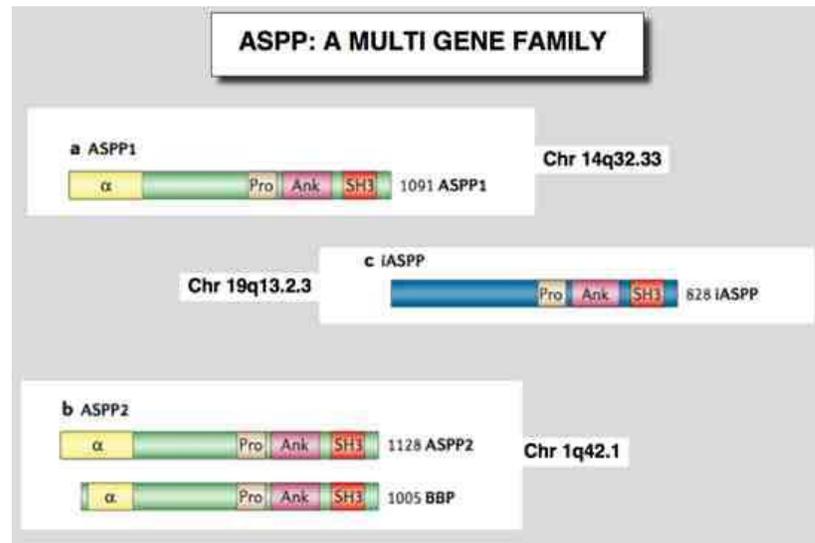
I tre componenti della famiglia di p53, sono tutti in grado di legare le proteine della famiglia ASPP, proteine in grado di influenzare la loro attività (Samuels-Lev et al. 2001).

### **1.4.1 P53 e MMR**

È stato suggerito un ruolo del MMR nell'apoptosi mediata dalla famiglia di p53. Il sistema MMR sembrerebbe stabilizzare p53 mediante fosforilazione (Roos et al., 2006) in seguito a danno al DNA generato da agenti chimici o radiazioni ionizzanti. Altri studi suggeriscono un'apoptosi dipendente dal sistema MMR in cellule di cancro al colon umane in seguito a trattamento con MNNG o N-methyl-N'-nitrosourea, mediata a sua volta da p53 e MLH1 (Davis et al., 1998). Inoltre, l'apoptosi indotta dai farmaci fotemustine e temolozomide, è mediata da p53 e MMR in cellule di melanoma (Naumann et al., 2007). Altri studi suggeriscono che p73, sia attivato in seguito a trattamento con cisplatino, mediante il sistema MMR (Agami et al., 1999; Gong et al., 1999; Yuan et al., 1999). D'altra parte, PMS2 (che lega MLH1 nel complesso MutL $\alpha$ ) interagisce direttamente con p73 $\alpha$  dopo esposizione a cisplatino. Ancora, Li et al. (2008) hanno dimostrato coinvolgimento della via MLH1/c-Abl/p73 $\alpha$  in risposta a trattamento con MNNG, nel mediare arresto delle cellule in fase G2 o apoptosi. Questa risposta sarebbe indipendente da p53.

## **1.5. LA FAMIGLIA DELLE PROTEINE ASPP**

Le proteine ASPP (Apoptotic-Stimulating Proteins of p53 or ankyrin-repeat-, SH3-domain- and proline-rich-region-containing protein) sono co-attivatori che influenzano il legame di p53 al DNA e la sua attività di trascrizione (Samuels-Lev et al. 2001) e così facendo ne regolano le sue funzioni apoptotiche. La famiglia comprende tre membri, di cui due, ASPP1 e ASPP2 con attività pro-apoptotica e uno, iASPP con attività anti-apoptotica (Figura 11). Tutti i membri di tale famiglia interagiscono con tutte e tre le proteine della famiglia di p53 che comprende anche p63 e p73 (Bergamaschi et al. 2003; Robinson et al. 2008; Samuels-Lev et al. 2001; Chikh et al, unpublished).



**Figura 11: Struttura delle proteine della famiglia ASPP**

ASPP1 and ASPP2 favoriscono le funzioni apoptotiche della famiglia di p53 stimolando selettivamente il loro legame con i promotori di geni target quali Bax e PIG3 senza influenzare il ciclo cellulare (CDKN1A, MDM2 and cyclin G1) (Samuels-Lev et al. 2001) (Figura 12). Una disregolazione di ASPP1/2 è stata osservata in diversi tipi di cancro, tra cui il cancro al polmone e alla mammella (Samuels-Lev et al. 2001; Liu et al. 2005; Moris et al. 2004; Mori et al. 2000). Inoltre, bassi livelli di ASPP2 sono stati associati ad una prognosi sfavorevole e a metastasi in linfoma e nel cancro alla mammella. (Cobleigh et al. 2005; Lossos et al. 2002).

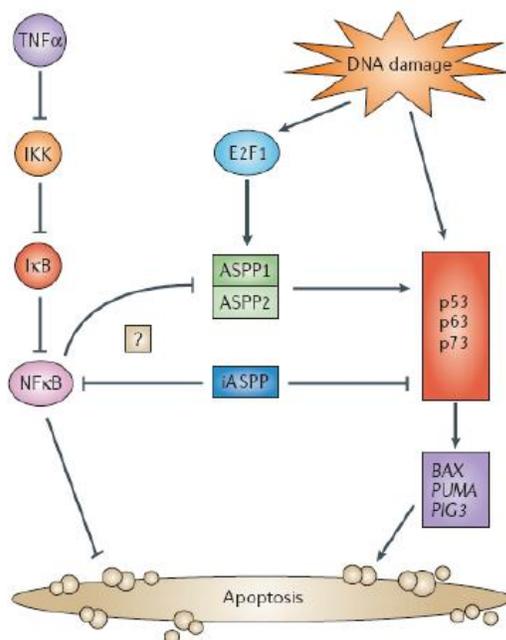
### **1.5.1. Il componente inibitorio iASPP**

Al contrario di ASPP1 e ASPP2, iASPP è riconosciuto come il membro della famiglia ASPP con un ruolo inibitorio nei confronti di p53. La proteina iASPP, prodotto del gene PPP1R13L, è stata per la prima volta identificata come inibitore dell'attività di trascrizione genica della subunità RelA del nuclear factor-kB (NF-kB),

fattore coinvolto nella risposta immunitaria e antinfiammatoria (Yang et al., 1999) e pertanto noto anche con il nome di RAI (RelA Associated Inhibitor). Legando RelA, iASPP bloccherebbe l'espressione genica di NF- $\kappa$ B, impedendone il legame con i relativi promotori sul DNA (Takada et al., 2002), ed inibendo i segnali proliferativi da esso mediati.

Dei tre componenti della famiglia ASPP, iASPP è il membro più conservato durante l'evoluzione genetica essendo l'unico identificato in *Caenorhabditis elegans* (Bergamaschi et al, 2003). Ad oggi, la funzione più nota di iASPP è quella di fattore anti-apoptotico, funzione che esercita principalmente come inibitore dei membri della famiglia di p53 ad esempio inibendo la trascrizione di fattori come Bax, PIG3, PUMA ma non di altri fattori come MDM2 e p21 (Bergamaschi et al. 2003). È noto che iASPP lega più fortemente la variante polimorfica p5372Pro e ciò sarebbe responsabile della maggiore attività apoptotica della variante p5372Arg (Bergamaschi et al, 2006). Il legame con tali proteine avviene a livello del DBD ma soprattutto della cassetta ricca in proline, mediante la sua porzione C-terminale, contenente un sito ricco in anchirine, un dominio SH3 e un dominio ricco di proline. (Gorina, and Pavletich, 1996; Robinson et al., 2008).

Il legame di iASPP con p53 nonché RelA, suggerirebbe un suo possibile ruolo nell'equilibrio fra segnali apoptotici e proliferativi nelle cellule, tuttora da chiarire (Figura 12).



**Figura 12: Coinvolgimento delle proteine ASPP nei segnali apoptotici**

### 1.5.2. iASPP in cancro e stati patologici

Vari studi hanno dimostrato un incremento dell'espressione di iASPP in diversi tipi di tumori quali carcinoma epatocellulare (Lu et al., 2010), leucemia acuta (Zhang et al., 2005), adenomi e carcinomi del colon-retto (Saebo et al., 2006) tumore della mammella (Liu et al., 2008), carcinoma dell'endometrio (Liu et al., 2010) e che l'uso di siRNA per ridurre l'espressione, favorisce il potenziale apoptotico di cellule tumorali mediata da agenti farmacologici (Liu et al., 2009; Zhang et al., 2005) che può essere p53 dipendente o indipendente. L'overespressione di iASPP in MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) favorisce altresì la formazione di tumori e causa la degradazione più veloce di p53 mediata dal proteosoma, sfavorendo l'apoptosi da essa mediata (Laska et al., 2009). In alcuni casi, l'overespressione di iASPP è concomitante alla downregolazione di ASPP e questo ha fatto pensare a tale proteina come un bersaglio di nuove terapie anti-cancro (Bell and Ryan 2008, Liu et al., 2010).

È anche nota in letteratura una mutazione spontanea nel gene PPP1R13L in modelli animali, che consiste nella ritenzione nell'mRNA trascritto di una regione di 92 bp e che provoca il prematuro stop nella traduzione della proteina corrispondente. Tale mutazione è responsabile di un particolare fenotipo nei topi, che consiste in pelo crespo e cardiomiopatia (Herron et al., 2005). L'espressione di iASPP in tali animali, risulta ridotta in particolare nelle cellule della pelle e del cuore. L'identificazione di tale mutazione apre la strada alla possibile scoperta di un ruolo di iASPP nella fisiologia dei tessuti epiteliali.

Recentemente una certa attenzione è stata data a vari polimorfismi del gene PPP1R13L. Tale gene è localizzato sul cromosoma 19q13.2-3, nel quale sono localizzati anche geni coinvolti nel meccanismo di riparazione del DNA noto come NER (Nucleotide Excision Repair), i cui polimorfismi sono stati associati spesso con il rischio di tumorigenesi. Un paio di polimorfismi del gene PPP1R13L sono risultati anch'essi associabili al rischio di sviluppare tumori tra cui il polimorfismo A4364G (rs1970764) localizzato sull'introne 1, risultato di interesse nel cancro ai polmoni (Vogel et al., 2007), alla mammella (Nexo et al., 2003) e nel cancro della pelle (Vogel et al., 2005).

## **1.6. SCOPO DEL LAVORO**

iASPP è una proteina di sicuro interesse farmacologico in cancro (Sullivan et al., 2007), a causa del ruolo che ricopre come inibitore delle proteine della famiglia di p53, ad oggi la famiglia di proteine più conosciute come oncosoppressori. È certo che iASPP possa influenzare in qualche modo l'attività cellulare apoptotica o proliferativa, in quanto anche inibitore del fattore di trascrizione NFκB (Yang et al., 1999), responsabile di attivare segnali proliferativi. È inoltre documentato che iASPP sia alterato in diversi tipi di tumori (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2005; Saebo et al., 2006; Liu et al., 2008; Liu et al., 2010). Recentemente è stato anche identificato come fattore essenziale nel mantenimento dell'integrità della pelle, interagendo in un feedback-loop con la proteina p63, già nota per la sua importanza nel mantenimento della stratificazione epiteliale

(Chikh et al, non pubblicato) e regolandone processi metabolici quali l'autofagia e di sopravvivenza. Quest'ultimo lavoro apre nuove prospettive di studio riguardo al ruolo che iASPP potrebbe ricoprire anche nella eziologia delle varie forme di cancro alla pelle.

Sulla base di queste osservazioni e poiché l'espressione e l'attività di iASPP nel più aggressivo dei tumori della pelle, ossia il melanoma, non sono mai state valutate, questo lavoro si pone l'obiettivo di studiare un possibile coinvolgimento e/o possibili alterazioni nell'espressione di tale fattore oncogeno in questo genere di tumore. Inoltre, scopo di questo lavoro, è anche quello di identificare se le alterazioni nell'espressione di tale fattore in melanoma, siano collegate e/o riconducibili anche a modificazioni di altre vie metaboliche, notoriamente coinvolte in cancro. In particolare, si è pensato che il sistema MMR potesse essere un buon candidato di studio, in quanto, come già citato, sono note in letteratura alterazioni dell'espressione dei suoi fattori e coinvolgimento nel controllo dell'apoptosi e del ciclo cellulare in melanoma e in altri tipi di cancro. Inoltre, il sistema MMR, sembra controllare e a sua volta essere controllato dalle proteine della famiglia p53, notoriamente modulate nella loro attività apoptotica da iASPP. I dati riportati in questo studio, in realtà, mostrano una via in parte indipendente da p53 nell'interazione fra iASPP e il MMR ma in tal modo aprono nuove prospettive di studio nell'identificazione di una relazione fra l'oncogenicità di iASPP e l'attività di riparo del DNA, come meccanismo di controllo della proliferazione cellulare maligna.

## **2.METODI**

### **2.1. COLTURE CELLULARI**

#### **2.1.1. Isolamento dei melanociti dalla pelle umana**

Come fonti di pelle umana, sono state utilizzate operazioni di chirurgia plastica o circoncisioni di routine dalle quali si ottengono campioni di diverse parti del corpo (Royal London Hospital). Il campione di pelle, non appena disponibile è stato posto in ghiaccio e il prima possibile conservato in terreno di coltura cellulare addizionato di siero e una soluzione di antibiotici e antimicotici (Dulbecco Modified Essential Medium, DMEM + Antibiotic-antimycotic mix (Gibco) + 10% Foetal Bovine Serum, FBS) a 4°C overnight, questo per minimizzare il rischio di contaminazioni da parte di microrganismi.

Poiché i melanociti risiedono nell'epidermide, questa è stata inizialmente separata dal vicino derma con lo scopo di evitare contaminazione da parte di tipi cellulari indesiderati, quali ad esempio i fibroblasti. Per fare questo, i campioni di pelle sono stati prima, in condizioni di sterilità, lavati abbondantemente con EDTA, per facilitare in uno step successivo, l'azione della tripsina, e poi liberati dall'eccesso di grasso e sangue risiedenti al di sotto del derma mediante l'uso di un bisturi e successivamente tagliati in porzioni molto piccole (circa 5 mm<sup>2</sup> l'uno). I frammenti sono stati quindi incubati in un tubo sterile da 15 ml in tripsina allo 0.25% a 37°C. Dopo due ore l'epidermide è stata allontanata dal derma usando due aghi e degradata per agitazione del tubo contenente la tripsina. Il tutto è stato poi filtrato per separare le cellule libere

dal resto del campione e sono state centrifugate a 800 g per 5 minuti prima di essere recuperate e messe in coltura.

### **2.1.2. Condizioni di coltura per i melanociti primari**

I melanociti primari sono stati coltivati in DMEM:F12 3:1 contenente 15% di FBS, 16 nM TPA (tetradecanoilforbolacetato, estere del forbolo, SIGMA), 0.1 nM tossina colerica (SIGMA), 10 nM endotelina-1, 2 ng/ml hSCF (human Stem Cell Factor), 50 µg/ml gentamicina (PAA). Al terzo giorno di coltura dopo l'isolamento, l'antibiotico geneticina (G418) è stato aggiunto in concentrazione 150 µM. Dopo dieci giorni la geneticina è stata rimossa e il terreno di coltura rinnovato due o tre volte a settimana. Le cellule sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C e in atmosfera condizionata al 10% di CO<sub>2</sub>.

### **2.1.3. Cellule di melanoma**

Le linee cellulari di melanoma utilizzate in questo lavoro di tesi, sono tutte immortalizzate ed elencate in Tabella 1.

### **2.1.4. Condizioni di coltura per le cellule di melanoma**

Le cellule sono state mantenute in coltura ad una temperatura di 37°C e in atmosfera condizionata al 10% di CO<sub>2</sub> e cresciute in terreno RPMI contenente 10% di FBS e 1% di glutammina, eccetto le linee cellulari Mel224, coltivata, oltre che con i nutrienti precedentemente elencati, anche in 0,05 % di amminoacidi non essenziali e UISO-Mel6, coltivata in MEM addizionato di 15% di FBS, 1% di glutammina e 0,1 % di amminoacidi non essenziali.

**Tabella 1: Lista delle linee cellulari di melanoma utilizzate in questo lavoro e loro provenienza**

<b>Nome</b>	<b>Stadio di progressione</b>	<b>Provenienza</b>
<b>5810P</b>	melanoma primario	M.Rodolfo (Ist. Tumori Milano)
<b>1402P</b>	melanoma primario	M.Rodolfo (Ist. Tumori Milano)
<b>10538P</b>	melanoma primario	M.Rodolfo (Ist. Tumori Milano)
<b>WM1552C</b>	RGP	L.Lanfrancone (Ifom, Milano)
<b>SBCL2</b>	RGP	BC. Giovanella (Houston, TX, USA)
<b>WM 793</b>	RGP/VGP	Wistar Institute (Philadelphia, PA, USA)
<b>WM 278</b>	VGP	Wistar Institute (Philadelphia, PA, USA)
<b>VMM39</b>	VGP	Kam C.Yeung (Toledo, OH, USA)
<b>Mel-224</b>	VGP	Kam C.Yeung (Toledo, OH, USA)
<b>3988M</b>	metastatico	M.Rodolfo (Ist. Tumori Milano)
<b>Mel-501</b>	metastatico	Kam C.Yeung (Toledo, OH, USA)
<b>DX3LT5.1</b>	metastatico	John Marshall (Londra, UK)
<b>WM 1158</b>	metastatico	Wistar Institute (Philadelphia, PA, USA)
<b>A375M</b>	metastatico	John Marshall (Londra, UK)
<b>C8161</b>	metastatico	Mary J.C. Hendrix (Chicago, IL, USA)
<b>Sk-mel-24</b>	metastatico	Kam C.Yeung (Toledo, OH, USA)
<b>Uiso-Mel6</b>	metastatico	T.K. DasGupta (Chicago, IL, USA)

### **2.1.5. Altre linee cellulari**

Le cellule Phoenix (HEK293T, cellule umane embrioniche renali trasformate con l'adenovirus E1a, che contengono una antigene T sensibile alla temperatura) sono state mantenute in coltura in DMEM contenente 10% di FBS e 1% di glutammina ad una temperatura di 37°C e in atmosfera condizionata al 10% di CO<sub>2</sub>.

### **2.1.6. Congelamento e scongelamento delle cellule**

Tutte le cellule usate in questo lavoro di tesi sono state congelate in criotubi con una soluzione contenente il 90% di FBS e il 10% di DMSO (dimetil-solfossido) inizialmente a -80°C e successivamente trasferite in azoto liquido. La rimessa in coltura

delle cellule è stata fatta avvenire per lento scongelamento del criotubo a temperatura ambiente e successivo piastramento in fiasche T25 con terreno di coltura abbondante. Il terreno di coltura è normalmente sostituito con terreno fresco il giorno dopo, per rimuovere ogni traccia di DMSO.

### **2.1.7. Raccolta delle cellule**

La raccolta delle cellule per successiva estrazione proteica o degli acidi nucleici, è stata effettuata staccando le cellule dalle fiasche o le piastre petri, mediante l'uso di 0.05% tripsina e incubazione di 5 minuti a 37°C. Le cellule sono state di seguito risospese in terreno di coltura completo per inattivare la tripsina, trasferite in un tubo da 15 ml e centrifugate a 800 g per 5 minuti. Il pellet contenente le cellule è stato recuperato e sottoposto a lisi cellulare.

### **2.1.8. Conta cellulare**

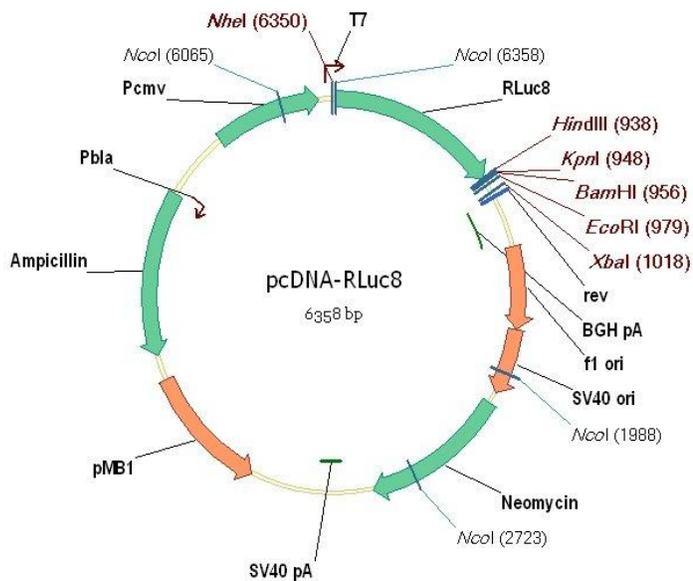
La conta cellulare è stata effettuata mediante la camera di Burker utilizzando il metodo di esclusione del Tripan Blue.

## **2.2. TECNICHE DI MANIPOLAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI**

### **2.2.1. Trasfezioni transienti**

Le cellule sono state seminate il giorno prima della trasfezione in piastre del diametro di 100 mm, in 8 ml di terreno di coltura in modo da ottenere una densità, il giorno successivo, del 50-60%. Per ottenere tale concentrazione, le cellule UISO-Mel6 sono state seminate in numero di 600'000, Mel224 e SkMel-24 in numero di 1'000'000. Tutte le trasfezioni sono state effettuate mediante FuGENE 6 (Roche) secondo il protocollo fornito dalla ditta, utilizzando il mezzo privo di siero contenente

FuGENE6 in rapporto 1:3 con il plasmide di interesse. Dopo una incubazione di circa 18 h, le cellule sono state raccolte. Il plasmide utilizzato è PCDNA 3.1 (Figura 13) esprime il gene iASPP contenente una tag V5 all’N-terminale (Xin Lu, Oxford).



**Figura 13: Mappa del vettore PCDNA 3.1**

### 2.2.2. Clonaggio del vettore pSUPERIOR.retro.puro

10 µg del vettore pSUPERIOR.retro.puro (Oligoengine, Figura 14) sono stati prima linearizzati tramite digestione con gli enzimi BgIII e HindIII overnight in un bagnetto a 37°C. L’avvenuta linearizzazione è stata verificata caricando 2 µl del prodotto di reazione in un gel di agarosio all’1% addizionato di etidio bromuro. Il vettore linearizzato è poi stato sottoposto a defosforilazione per prevenirne la ricircularizzazione, usando 0.1 unità di enzima fosfatasi alcalina (calf intestinal alkaline phosphatase, Promega) per un’ora a 37°C. Il prodotto è stato nuovamente caricato e corso su un gel di agarosio all’1% addizionato di etidio bromuro e la banda corrispondente, visualizzata tramite lampada a UV è stata identificata, estratta con

bisturi e il DNA recuperato mediante Strataprep Gel Extraction Kit (Stratagene) secondo le istruzioni della ditta.

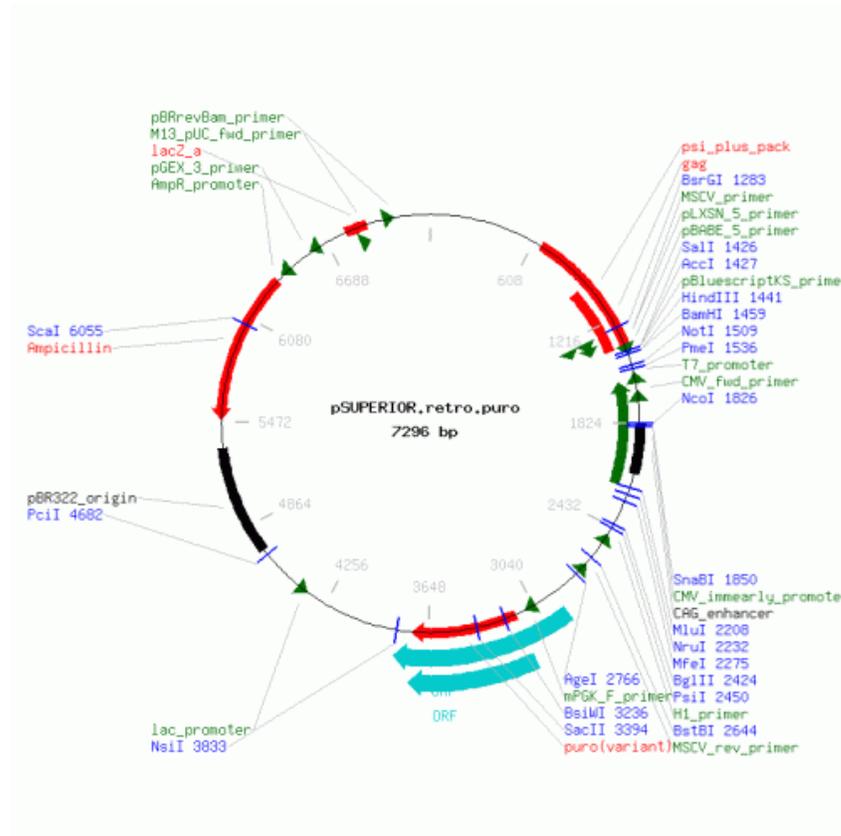


Figura 14: Mappa del vettore pSuperior (Oligoengine)

### 2.2.3. Inserzione di short hairpin RNAs per il silenziamento di iASPP

Le sequenze oligonucleotidiche forward e reverse contenenti la sequenza in grado di silenziare il gene di iASPP sono state appaiate secondo McIntyre e Fanning (2006). 10 µl di ogni frammento sono stati incubati a 95°C per 10 minuti e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. La fosforilazione è stata effettuata tramite la E kinase (New England Biolabs) secondo le istruzioni della ditta. L'inserzione del frammento di interesse è stata effettuata in presenza della DNA ligasi T4 (Promega) in

un volume finale di 10  $\mu$ l a 16°C overnight. L'inserto e il vettore sono stati miscelati in rapporto 3:1. Le sequenze nucleotidiche utilizzate sono tre: 5'-AGTAAAGTCTAGCAGGATA-3'; 5'-TCGAGAAGTGCGACCCTTA-3'; 5'-GCAGACGTCGAGCAGAGTA-3'. Le sequenze scramble sono state gentilmente fornite dalla prof.ssa Edel ÓToole (ICMS, London).

#### **2.2.4. Produzione del virus e amplificazione del plasmide**

La produzione del virus è stata fatta avvenire in cellule Phoenix, seminate in piastre petri da 60 mm a confluenza di circa il 50%. Il giorno dopo, i plasmidi contenenti le rispettive sequenze per l'shRNA contro il gene di iASPP ed una sequenza scramble utilizzata come controllo sono stati trasfettati utilizzando Fugene6 (DNA:Fugene6 1:2.5) come precedentemente descritto. La selezione delle cellule infette è stata poi effettuata con puromicina (0.9-1.25  $\mu$ g/ml) dopo 48 ore dalla trasfezione. Le cellule Phoenix sono cellule deputate all'integrazione del DNA d'interesse nel genoma virale, esprimendo tutte le proteine necessarie alla sua produzione. Una volta che il virus è prodotto, viene rilasciato nel mezzo di coltura e questo può essere recuperato, congelato a -80°C, e successivamente utilizzato per l'infezione delle cellule di melanoma.

#### **2.2.5. Infezione retrovirale**

Le cellule di melanoma WM1158 sono state seminate il giorno prima ad una confluenza di circa il 40-50% in multiwell da 6 pozzetti. Dopo 16 ore il terreno di coltura è stato aspirato e rimpiazzato da terreno fresco contenente 5  $\mu$ g/ml di polibrene (Millipore) e le cellule lasciate a temperatura ambiente per 10 minuti. Nel frattempo la sospensione contenente il virus è stata scongelata e 2 ml trasferiti in un tubo da 5 ml contenente 5  $\mu$ g/ml di polibrene. Il terreno di coltura delle cellule è stato quindi sostituito con quello contenente il virus e la multiwell centrifugata per un'ora a 350 g a 32°C. Il supernatante è stato successivamente aspirato, le piastre lavate con PBS e

successivamente incubate in normale terreno di coltura a 37°C per 48 ore. La selezione delle cellule infette è stata poi effettuata con puromicina (0.9-1.25 µg/ml).

#### **2.2.6. Isolamento dell'RNA cellulare e produzione di cDNA**

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule di melanoma, è stata effettuata mediante opportuno kit (Qiagen RNA Mini Kit) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta. L'mRNA è stato trasformato in cDNA mediante la tecnica della Reverse Transcriptase PCR basata sull'utilizzo di primer poli-dT (Invitrogen, OligodT<sub>12-18</sub>) che si appaiano complementariamente alla coda di poli-A presente sull'mRNA maturo. La trascrittasi inversa utilizzata è la Superscrip II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e la quantità dell'RNA di partenza usato è 500 ng-1µg.

#### **2.2.7. PCR quantitativa (qPCR)**

Le qPCR sono state effettuate in multiwell da 96 pozzetti usando la Master Mix Brilliant II SYBR Green QPCR (Agilent Technologies) in un volume finale di 25 µl comprendente 100 ng di cDNA per ogni campione. I dati sono stati raccolti, usando un AB7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem) impostando una reazione a tre cicli, secondo quanto consigliato dalla ditta Agilent Technologies. Le reazioni sono state fatte avvenire in triplicato e l'analisi effettuata mediante il metodo della quantificazione relativa (riferimento), usando come gene housekeeping, il gene GUS. La variazione dell'espressione genica è stata calcolata utilizzando la formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  usando come calibratore la media dei  $\Delta CT$  di tre linee cellulari di melanociti primari. I primers utilizzati per la procedura sono elencati in Tabella 2.

**Tabella 2: Sequenze di primers utilizzate nella qPCR**

<b>Gene</b>	<b>Primers Forward</b>	<b>Primers Reverse</b>
<b>MSH2</b>	5'-TTCATGGCTGAAATGTTGGA-3'	5'-ATGCTAACCCAAATCCATCG-3'
<b>MLH1</b>	5'-TGCAGGCATTAGTTTCTCAG-3'	5'-TTGATGAAGAGTAAGAAGATGC-3'
<b>iASPP</b>	5'-TCCTTTGAGGCTTCACCCTG-3'	5'-CGTGGATTTCTCATCATCACCG-3'
<b>GUS</b>	5'-AAACGATTGCAGGGTTTCAC-3'	5'-CTCTCGTCGGTGACTGTTCA-3'

## **2.3. TECNICHE DI TRASFORMAZIONE BATTERICA**

### **2.3.1. Trasformazione di batteri competenti**

Le cellule di *Escherichia coli* (*E.coli*) chimicamente competenti (Invitrogen, One Shot Top Ten) sono state scongelate lentamente a 4°C per 20 minuti. La sospensione cellulare è stata poi addizionata di 20 ng di DNA plasmidico e lasciata per ulteriori 20 minuti a 4°C, dopodiché sottoposta a shock termico per favorire la trasformazione, a 42°C per 30 secondi, seguito da un ulteriore minuto a 4°C. 500 µl della sospensione sono stati risospesi in 5 ml di mezzo di coltura Luria Bertani (LB) e incubati a 37°C per un'ora in assenza di antibiotici di selezione. 200 µl sono stati poi piastrati su agar contenente Ampicillina (Sigma) 150 µg/ml per la selezione dei batteri che hanno inglobato il plasmide d'interesse, e lasciati a crescere overnight a 37°C.

### **2.3.2. Amplificazione dei plasmidi**

Le piastre batteriche utilizzate per la selezione sono state conservate per due settimane a 4°C o utilizzate immediatamente per l'amplificazione del plasmide. È stata selezionata una singola colonia batterica e isolata dalla piastra mediante un sottile fil di ferro e successivamente incubata in 400 ml di terreno LB in una beuta, sotto agitazione

continua, overnight a 37°C, per favorire la crescita batterica, in presenza dell'antibiotico selezionante Ampicillina in concentrazione 150 µg/ml.

### **2.3.3. Purificazione del DNA plasmidico da E.coli**

Il giorno dopo, l'avvenuta crescita batterica è stata verificata osservando la torbidità della sospensione e il contenuto della beuta è stato trasferito in un tubo da centrifuga da 500 ml e centrifugato a 4000 rpm per 10 minuti in una centrifuga preparativa usando il rotore Beckman JA-10. Il supernatante è stato scartato e il pellet contenente le cellule batteriche è stato sottoposto a procedura di isolamento del DNA plasmidico utilizzando un Plasmid Maxi Kit (Qiagen). La soluzione di DNA è stata risospesa in acqua e la concentrazione e la purezza verificate usando lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000. Le soluzioni risultate pure ( $OD_{260/280} \geq 1.9$ ) sono state conservate a -20°C fino al momento dell'uso.

## **2.4. TECNICHE PROTEICHE**

### **2.4.1. Lisi cellulare e concentrazione proteica**

Dopo la raccolta, le cellule sono state lisate mediante un tampone contenente 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA per essere sottoposte a Western Blot oppure mediante un altro tampone contenente 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, utilizzato specificamente per le immunoprecipitazioni. Entrambi i tamponi sono stati addizionati con inibitori delle proteasi contenuti nel Protease Inhibitor Cocktail (Roche) secondo le indicazioni della ditta. Quando richiesto, il tampone è stato inoltre addizionato con inibitori delle fosfatasi NaF 100 mM, 0.2 mM  $NaVO_4$ ,  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM. La quantificazione del contenuto proteico è stata effettuata utilizzando il metodo di Bradford (Bradford, 1986) mediante il BioRad Protein Assay Reagent. La lettura a 595 nm dell'assorbanza della soluzione proteica è stata effettuata usando un

micro-plate reader HT-Multi-Mode (Bio-Tek) usando come riferimento una retta di calibratura costruita con Albumina di Siero di Bue (BSA) a concentrazioni note.

#### **2.4.2. Elettroforesi e Western Blot**

Per la corsa elettroforetica 20-50 µg di proteine sono stati risospesi in Lemmli Buffer (REF) e caricati su un gel di elettroforesi al 10% secondo la tecnica dell'SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Electrophoresis) per la separazione delle proteine. Dopo corsa elettroforetica, il trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa è stato ottenuto tramite elettro-trasferimento, in un tampone a basso contenuto salino (Tris/HCl 50 mM, glicina 80 mM, SDS 0.1 %, metanolo 20 %) a 55V per due ore a temperatura ambiente, in opportuna tanica di trasferimento. Le membrane sono state poi sottoposte a bloccaggio dei siti aspecifici con 5% di latte a basso contenuto di acidi grassi, in TBST (Tris/HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, Tween 20 0.1%) e in seguito incubate con un anticorpo primario, per 2 ore a temperatura ambiente oppure over-night a 4°C. In seguito è stata effettuata l'incubazione con anticorpo secondario (Dako) per un'ora, coniugato a perossidasi di rafano (diluizione 1:5000). Le membrane sono state poi lavate con TBST per 20 minuti e la visualizzazione delle bande proteiche è stata effettuata esponendole ad una soluzione di ECL plus Western blotting Detection Reagent (GE Healthcare) secondo il protocollo fornito dalla ditta. Le membrane sono state poi messe a contatto con una lastra radiografica in una cassetta opportuna per il tempo desiderato. Gli anticorpi primari utilizzati sono: anti-MSH2 mouse (Ab-1) GB12 (Calbiochem), anti-MLH1 rabbit (N-20, Santa Cruz), anti-iASPP mouse (Sigma), anti-V5 mouse (Invitrogen), anti-V5 rabbit (Sigma), anti-GAPDH (Abcam), anti-fosfotirosina (Promega), anti-ubiquitina PD41 (Cell-signalling).

### **2.4.3. Immunoprecipitazione (IP)**

Per ogni campione su cui effettuare l'IP o campione controllo IgG, sono stati utilizzati 30 µg di resina Protein G-Sepharose (Amersham) diluita ed equilibrata 1:1 in PBS. La resina è stata poi lavata con un tampone di lisi, utilizzato anche per l'estrazione delle proteine cellulari. 1 mg di proteine in tampone di lisi, vengono sottoposte ad un processo di purificazione delle aspecificità ovvero incubate a 4°C con 30 µl di resina per un'ora, sotto rotazione continua. Dopodiché la sospensione è sottoposta a centrifugazione a 10000 g per 2 minuti e il supernatante re-incubato con un nuovo campione di resina. Ad esso è stato aggiunto l'anticorpo primario e in un ulteriore campione utilizzato come controllo solamente le IgG, dello stesso isotipo dell'anticorpo primario usato per a precipitazione.(1.5 µg circa). Il tutto è incubato overnight a 4°C sotto rotazione continua. Il giorno dopo, la sospensione è stata centrifugata e la resina legante il complesso anticorpo-proteina recuperata. La resina è stata lavata due volte in tampone di lisi e due volte in un tampone contenente 50 mM Tris, pH 8.0 e glicerolo al 10% contenente gli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi indicati sopra. Al termine dei lavaggi, la resina è stata risospesa in Lemmli Buffer 2X, incubata 5 minuti a 95°C e centrifugata. Il supernatante è stato recuperato e caricato su un gel di elettroforesi SDS-PAGE e sottoposto a Western blot.

## **2.5. TECNICHE DI IMMUNOFLUORESCENZA**

### **2.5.1. Immunocitochimica a fluorescenza**

Le cellule in numero di 70'000 sono state seminate in multiwell da 12 pozzetti, ognuno contenente un vetrino. Il giorno dopo, il vetrino è stato recuperato oppure, le cellule sono state precedentemente sottoposte a trasfezioni transienti, come descritto sopra e il vetrino recuperato dopo 16 ore. Il vetrino è stato poi trasferito in una nuova multiwell da 12 pozzetti e le cellule fissate sullo stesso tramite incubazione in formaldeide al 4% a temperatura ambiente per 15 min. Di seguito è stata effettuata la

permeabilizzazione in Triton X-100 al 3% in PBS per 2 minuti, per consentire il successivo ingresso degli anticorpi. La prima incubazione è stata effettuata con l'anticorpo primario opportuno overnight a 4°C in Goat Serum (GS) al 5%. Quando richiesto, il nucleo cellulare è stato evidenziato mediante l'utilizzo di DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole, Invitrogen) in concentrazione 1:10000 in PBS per dieci minuti. Gli anticorpi secondari sono stati incubati di seguito per 40 minuti a temperatura ambiente, al buio, diluiti 1:500 in GS al 5%. Tra un'incubazione e l'altra vengono effettuati due lavaggi da cinque minuti ciascuno in PBS. Dopo l'anticorpo secondario, i vetrini sono messi a contatto con una soluzione di mantenimento della fluorescenza (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) e visualizzati al microscopio confocale il giorno dopo.

La purezza delle colture di melanociti primari è determinata tramite l'anticorpo Mel-5 (Dako). Gli altri anticorpi usati per immunofluorescenza sono: anti-MSH2 rabbit (Abcam), anti-MLH1 rabbit N-20 (Santa Cruz), anti-iASPP mouse (Sigma), anti-V5 mouse (Invitrogen), anti-V5 rabbit (Sigma). Gli anticorpi secondari usati sono Alexa fluor 594 goat anti-mouse/rabbit e 488 goat anti-mouse/rabbit (Invitrogen).

### **2.5.2. Saggio dell'annessina V per la misura dell'apoptosi (Citofluorimetria a flusso)**

Evento precoce nel fenomeno apoptotico è rappresentato dalla traslocazione dei residui di fosfatidilserina dal versante citosolico della membrana cellulare a quello esterno. L'annessina V è una proteina in grado di legare molto specificamente tali residui fosfolipidici e la coniugazione con agenti fluorescenti di tale proteina ne permette l'utilizzo in tecniche di immunofluorescenza.

Le cellule sono state trattate con l'agente chemioterapeutico cisplatino in concentrazione 10  $\mu$ M e raccolte dopo 24 ore. Le stesse sono state risospese poi in 400  $\mu$ l di 1 X Binding Buffer (BD Pharmingen) e addizionate di 5  $\mu$ l of Annessina V-FITC (BD Pharmingen). Dopo una incubazione di 15 minuti al buio per salvaguardare la fluorescenza, le cellule sono state addizionate del colorante DAPI (200 ng/ml) per la

selezione delle cellule vitali e poi analizzate al citofluorimetro a flusso (LSR II, Beckton Dickinson).

## **2.6. ALTRI METODI**

### **2.6.1. Saggio della DL-DOPA**

L'efficiente attività enzimatica dei melanociti nel produrre la melanina è determinata mediante il metodo DOPA-staining. Un eccesso di LD-DOPA nel terreno di coltura, stimola la produzione di melanina e i melanociti, se positivi, risultano scuri alla visualizzazione al microscopio ottico. Per effettuare il saggio, è necessario fissare inizialmente i melanociti sulla piastra di coltura cellulare o su un vetrino. Questo si ottiene incubando le cellule in formaldeide al 4% a temperatura ambiente per 15 min. La permeabilizzazione delle cellule per consentire l'ingresso della LD-DOPA è effettuata in Triton X-100 1%. A questo punto le cellule vengono incubate per quattro ore a 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, in terreno di coltura e in seguito visualizzate al microscopio ottico.

### **2.6.1. Riparo del DNA: misura dell'attività di MutS $\alpha$**

Gli estratti nucleari sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di un Nuclear Extraction kit (Active Motif) e analizzati usando il GTBP Dna Repair Kit in accordo con le istruzioni della ditta. In breve, il kit si basa sul metodo ELISA e contiene una multiwell da 96 pozzetti. In ogni pozzetto è stato immobilizzato un oligonucleotide lineare contenente un appaiamento di basi scorretto G-T. Questo è normalmente riconosciuto dal complesso MSH2/MSH6 (MutS $\alpha$ ). I lisati nucleari sono stati caricati sui pozzetti e sottoposti all'azione di un primo anticorpo (primario) in grado di riconoscere il complesso e di un secondo (secondario) coniugato a perossidasi di rafano. I campioni sono stati poi messi a contatto con una soluzione di sviluppo e dopo 30 minuti, si è osservata la comparsa di una colorazione blu. La misura dell'attività è

stata studiata come variazione dell'assorbanza a 450 nm in un micro-plate reader HT-Multi-Mode (Bio-Tek), usando come bianco un campione privo di lisato nucleare e come controllo positivo un estratto nucleare di cellule Raji fornito nel kit.

### **2.6.2. Metodi statistici**

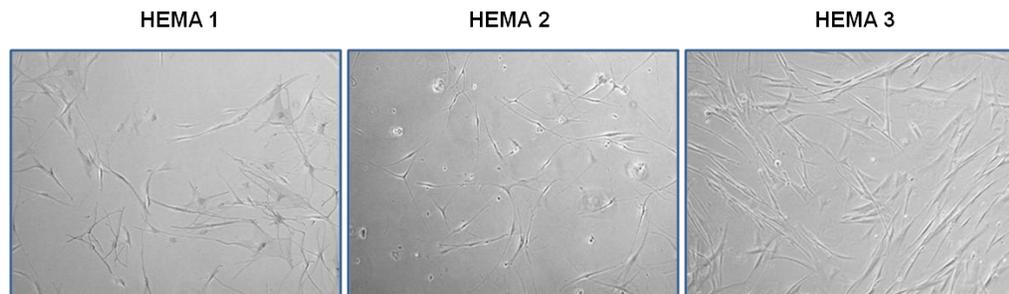
I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD) di almeno tre esperimenti indipendenti. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante l'analisi della varianza di ANOVA.

# 3.RISULTATI

## 3.1. COLTURE DI MELANOCITI PRIMARI

### 3.1.1. Isolamento dei melanociti primari

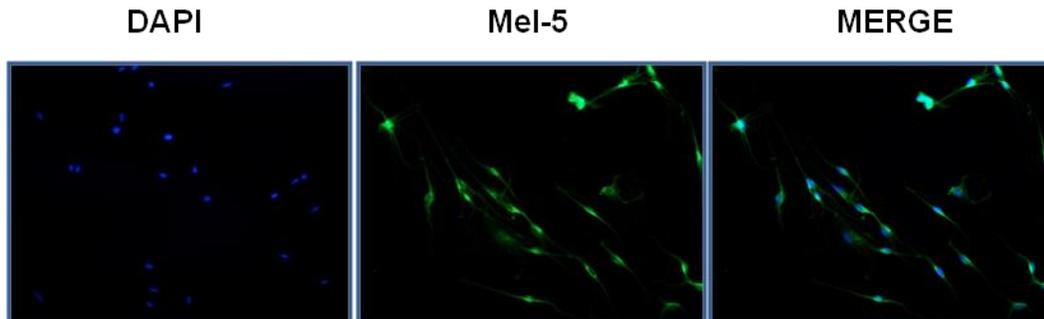
Sono state isolate da pelle umana sei linee cellulari di melanociti primari (HEMA 1-6). Una linea cellulare è stata ottenuta da pelle addominale, quattro da pelle del prepuzio, una da pelle del viso. In Figura 15 sono mostrate tre linee cellulari fotografate al microscopio ottico e come si può vedere, i melanociti possono assumere una forma stellata, multidendritica o bidendritica. Questo dipende dallo stadio di coltura nonché dalle caratteristiche peculiari del donatore.



**Figura 15: Linee cellulari di melanociti primari in coltura.** Immagini delle linee cellulari Hema 1, Hema 2, Hema 3, fotografate al microscopio ottico

### 3.1.2. Verifica della purezza e dell'efficienza metabolica dei melanociti primari

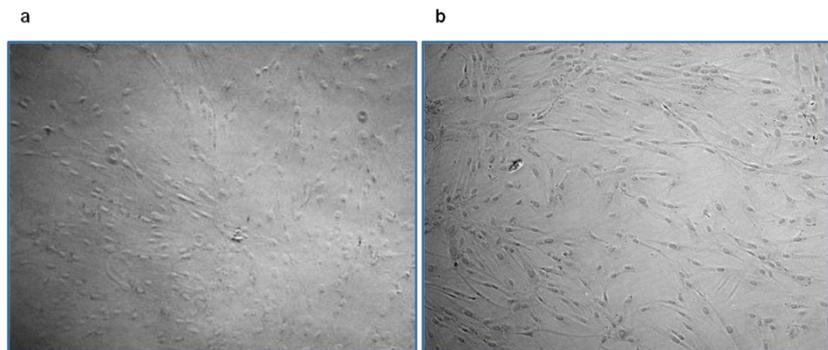
La purezza delle colture dei melanociti è stata verificata tramite l'uso dell'anticorpo Mel-5. Tutte le linee cellulari sono risultate di purezza compresa fra il 90 e il 95%. La purezza è stata verificata mediante conta cellulare delle cellule positive allo staining con Mel-5 confrontate con le cellule positive alla colorazione DAPI-Blu. Per ogni linea cellulare sono state analizzate almeno 3 differenti figure, a differenti passaggi di coltura, ottenute con il microscopio a fluorescenza (Figura 16).



**Figura 16:** Analisi della purezza di colture di melanociti primari, verificata mediante l'uso dell'anticorpo Mel-5. La figura è rappresentativa di almeno 3 risultati simili ottenuti per ogni linea cellulare

### 3.1.3. Verifica della efficienza enzimatica dei melanociti

Le linee cellulari sono risultate non solo pure ma anche enzimaticamente attive. L'efficienza metabolica è stata verificata mediante il saggio della DL-DOPA. La figura 17 mostra come i melanociti sottoposti a tale saggio (Figura 17b) risultino di colore più scuro rispetto ai melanociti che non siano stati trattati con la DL-DOPA e questo dimostra la produzione della melanina. Anche in tal caso, per ogni linea cellulare sono state analizzate almeno 3 differenti figure, a differenti passaggi di coltura

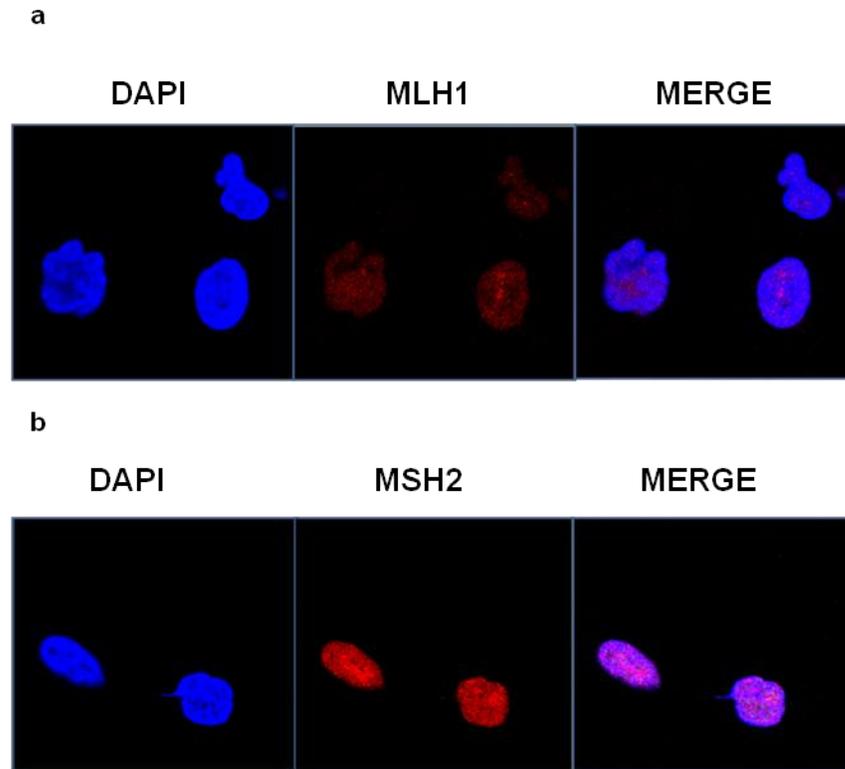


**Figura 17: Saggio della DL-DOPA.** Analisi dell'efficienza enzimatica dei melanociti primari mediante saggio della DL-DOPA. (a) Melanociti in condizioni basali. (b) Melanociti sottoposti al saggio della DL-DOPA

Da tutte e sei le linee cellulari sono stati estratti RNA e proteine e questi sono stati usati in questo lavoro, quando necessario, come controlli di riferimento.

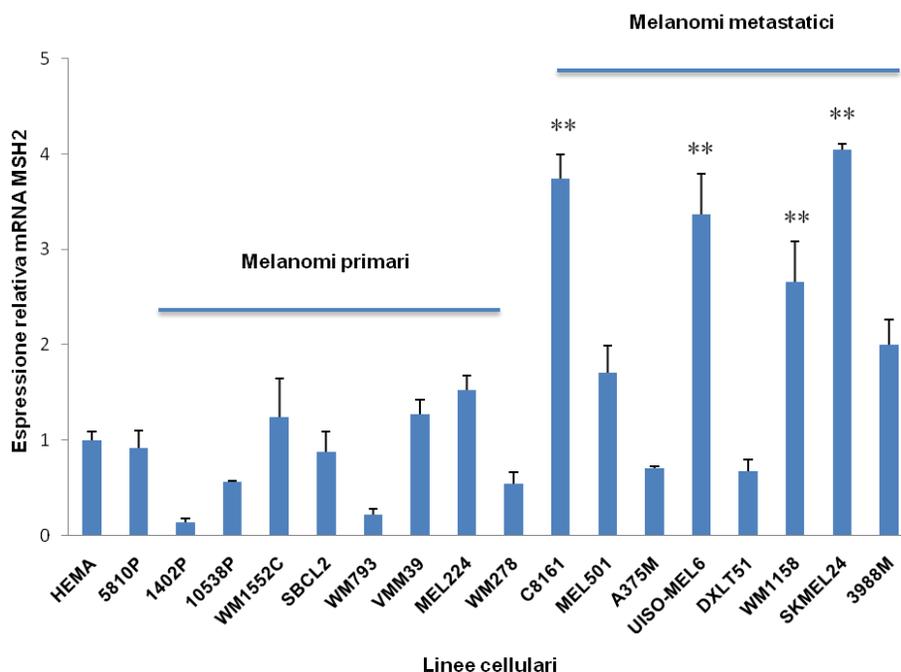
### **3.2. ESPRESSIONE DI FATTORI APPARTENENTI AL SISTEMA MMR IN CELLULE DI MELANOMA E MELANOCITI PRIMARI**

Il primo approccio sperimentale è stato quello di valutare l'espressione di fattori appartenenti al sistema MMR in una varietà di cellule di melanoma a differenti stadi di progressione, a confronto con cellule di melanociti primari estratte da pelle umana. L'espressione di tali fattori è stata studiata sia a livello proteico mediante western blot che a livello dell'mRNA mediante PCR quantitativa. Ne è stata anche osservata la localizzazione mediante tecniche di immunofluorescenza. I fattori presi in considerazione sono MSH2 e MLH1, giudicati come rappresentativi del sistema MMR e dei quali si hanno a disposizione, per quanto riguarda il melanoma, diversi dati in letteratura nonché buoni anticorpi per la loro visualizzazione. Entrambe le proteine, localizzano nel nucleo, evidenziato in cellule UISO-Mel6, di melanoma metastatico, mediante colorazione con DAPI-blu (Figura 18).



**Figura 18: Localizzazione di MSH2 e MLH1 in UIISO-Mel6.** Localizzazione delle proteine MSH2 (a) e MLH1 (b) (rosso) in cellule di melanoma metastatico UIISO-Mel6 mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu

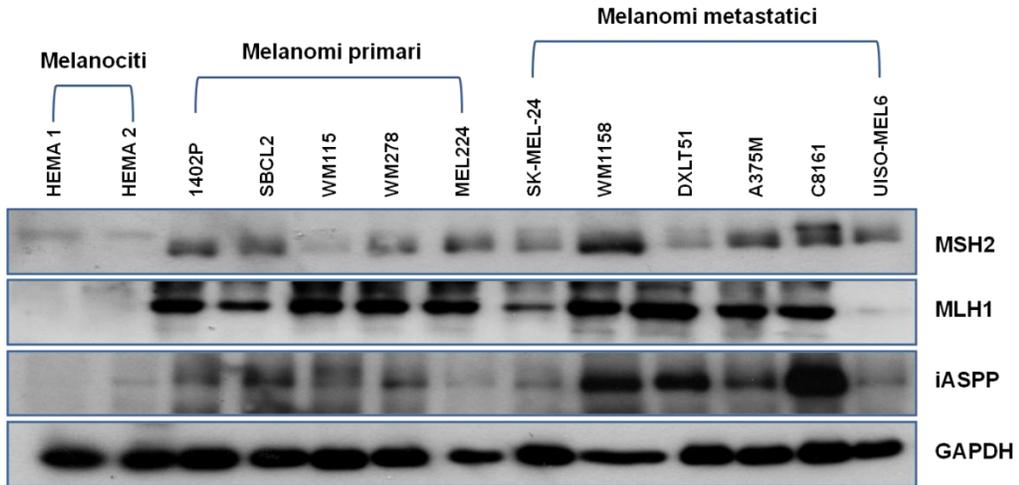
L'analisi quantitativa dell'mRNA (Figura 19) mostra una più alta espressione di MSH2 in cellule di melanoma metastatiche se confrontate con melanociti primari. In quattro delle 8 linee cellulari analizzate (C8161, UIISO-Mel6, WM1158, Sk-Mel-24), la più elevata espressione di MSH2 risulta altamente significativa se confrontata con l'espressione in melanociti primari. Non si osservano invece variazioni di espressione significative nelle linee cellulari derivanti da melanoma primari.



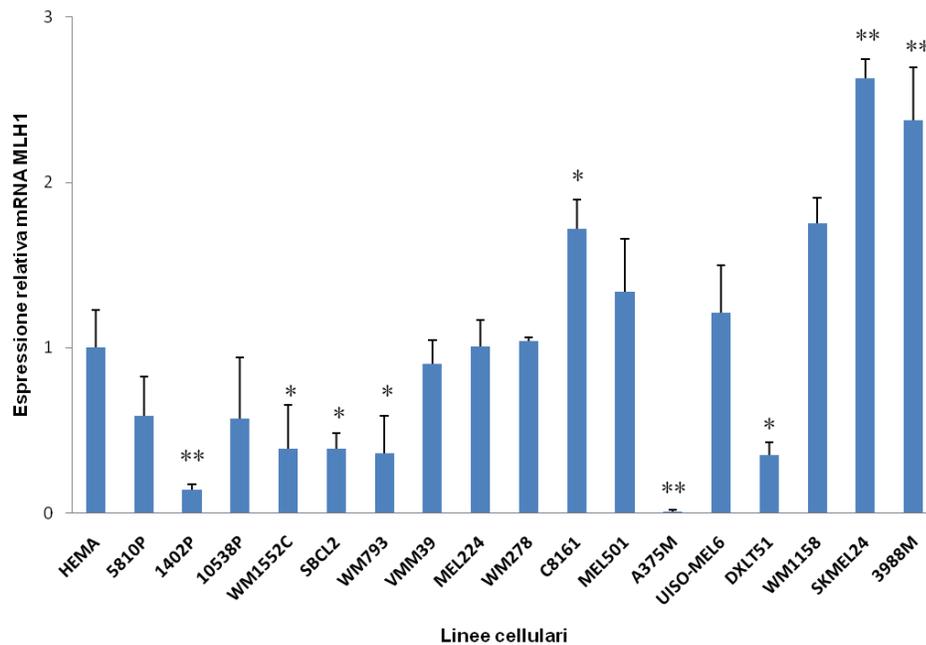
**Figura 19: Espressione genica di MSH2 in linee cellulari di melanoma** Espressione relativa dell'mRNA di MSH2 in cellule di melanoma, valutata mediante qPCR. I melanociti primari (HEMA) sono stati usati come calibratore (3 colture primarie differenti). Il gene GUS è stato usato come normalizzatore. I dati sono espressi come media ±SD di tre esperimenti indipendenti. \*\* p< 0.01

A livello proteico (Figura 20), si evidenzia una alta espressione di MSH2 sia in cellule di melanoma primarie che metastatiche unitamente alla presenza di più di una banda proteica in alcune linee cellulari che dimostra come la proteina possa essere presente in più forme, non in tutte le linee cellulari e quanto meno nei melanociti. Questi sembrano esprimere solo la banda a peso molecolare maggiore, mentre alcune cellule di melanoma le esprimono entrambe o solo la banda di peso molecolare minore.

MLH1 è anch'esso espresso in maniera ubiquitaria e ad alti livelli soprattutto come proteina nelle linee cellulari di melanoma (Figura 20) e non risulta, dall'analisi a livello endogeno, tramite WB, soggetto a modificazioni conformazionali. L'mRNA di MLH1 (Figura 21) risulta alterato in diverse linee cellulari di melanoma a confronto con melanociti primari. In alcuni casi, l'espressione risulta ridotta, in altri casi più elevata.



**Figura 20: Espressione proteica di fattori appartenenti al sistema MMR e di iASPP.** Espressione a livello proteico di MSH2, MLH1 e iASPP in cellule di melanoma e melanociti primari (HEMA), effettuata mediante Western Blot. GAPDH è utilizzato come controllo di loading



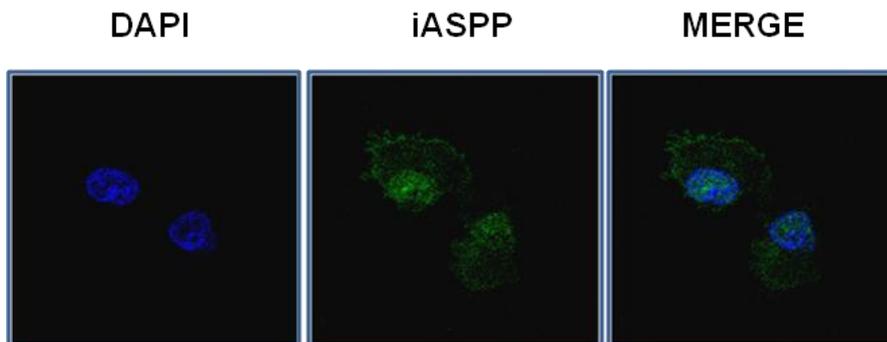
**Figura 21: Espressione dell'mRNA di MLH1 in linee cellulari di melanoma** Espressione relativa dell'mRNA di MLH1 in cellule di melanoma, effettuata mediante qPCR. I melanociti primari (HEMA) sono stati usati come calibratore (3 colture primarie differenti). Il gene GUS è stato usato come normalizzatore. I dati sono espressi come media ±SD di tre esperimenti indipendenti. \*p< 0.05, \*\* p<0.01

Ogni linea cellulare sembra rappresentare un caso a sé ma le variazioni più significative sembrano ancora una volta riguardare le cellule metastatiche, con tre linee (C8161, Sk-Mel-24 e 3988M) che esprimono livelli significativamente più alti del gene MLH1 e due (A375M e DXLT51) livelli significativamente più bassi, rispetto alla sua espressione in melanociti primari.

Sia per MSH2 che per MLH1, non sembra esistere una corrispondenza univoca tra i livelli di mRNA e delle proteine, suggerendo diversi possibili livelli di controllo dell'espressione di tali geni.

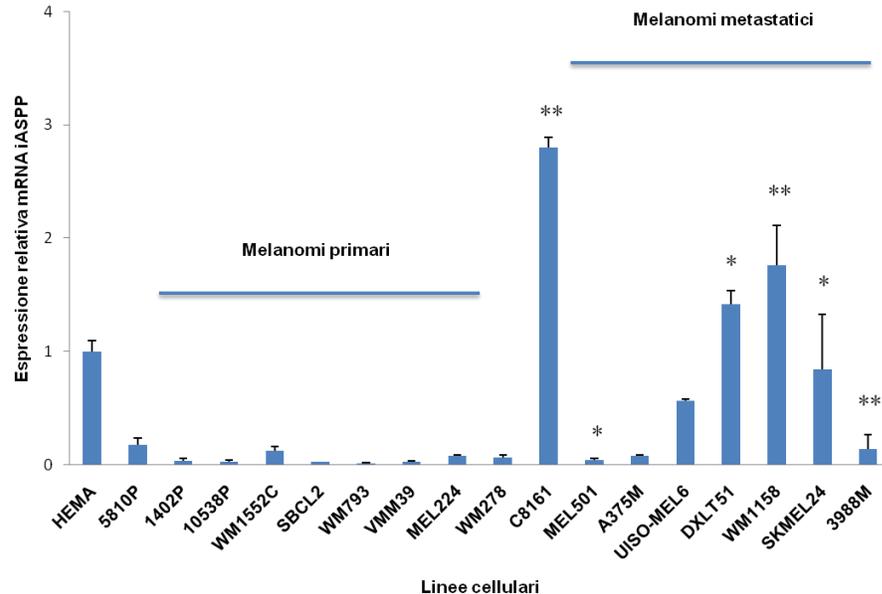
### 3.3. ESPRESSIONE DI iASPP IN CELLULE DI MELANOMA E MELANOCITI PRIMARI

Unitamente all'espressione di fattori coinvolti nel sistema MMR, si è studiata l'espressione, a livello proteico e di mRNA, di iASPP in cellule di melanoma messe a confronto con melanociti primari. La proteina iASPP localizza (Figura 22), a differenza delle proteine del MMR, in parte nel nucleo, in parte nel citoplasma di cellule di melanoma UISO-Mel6, confermando il pattern di espressione osservato in altre linee cellulari primarie e/o cancerogene (per esempio U2OS, MCF-7, Saos-2, Hecat) (Slee et al., 2004).



**Figura 22: Localizzazione di iASPP in UISO-Mel6.** Localizzazione di iASPP (verde) in cellule di melanoma metastatico UISO-Mel6 mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu.

Anche in tal caso, l'espressione di iASPP si è rivelata superiore in cellule di melanoma piuttosto che melanociti, questo è una costante solo a livello proteico (Figura 20). L'espressione dell'mRNA di iASPP (Figura 23) mostra invece una espressione di iASPP ridotta, ma non significativamente, in cellule di melanoma primario. Nel melanoma metastatico, risulta in alcuni casi alterato in maniera significativa. In particolare l'aumento dell'espressione di questo gene rispetto ai melanociti primari, risulta altamente significativa nelle linee cellulari C8161 e WM1158, mentre i dati sono solo significativi per DXLT51 e Sk-Mel-24. Una riduzione significativa dei livelli di iASPP si osserva invece in cellule metastatiche 3988M e Mel501.



**Figura 23: Espressione dell'mRNA di iASPP in UIISO-Mel6.** Espressione relativa dell'mRNA di iASPP in cellule di melanoma, effettuata mediante qPCR. I melanociti primari (HEMA) sono stati usati come calibratore (3 colture primarie differenti). Il gene GUS è stato usato come normalizzatore. I dati sono espressi come media ±SD di tre esperimenti indipendenti. \*p<0.05, \*\* p< 0.01

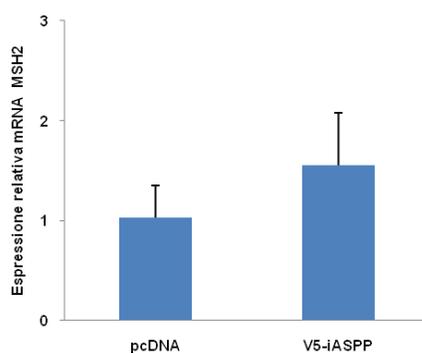
Una corrispondenza fra i livelli elevati di espressione del gene di iASPP con i livelli proteici, si osserva in particolare nella linea cellulare C8161, linea cellulare di melanoma metastatico particolarmente aggressivo. Ritornando all'espressione proteica

di MSH2 (Figura 20), si nota come la suddetta linea cellulare, sia anche quella in cui la banda superiore di MSH2 risulta ben evidente e più espressa.

### 3.4. L'OVER-ESPRESSIONE DI iASPP IN CELLULE DI MELANOMA INFLUENZA IL SISTEMA MMR

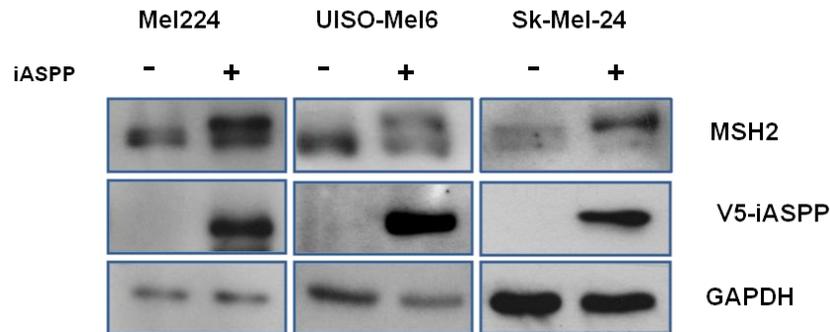
Tra le cellule di melanoma nelle quali si è analizzata l'espressione della proteina iASPP, è stata rilevata una ridotta espressione in tre linee cellulari, una primaria (Mel224) e due metastatiche (Uiso-Mel6 e Sk-Mel-24). Pertanto, per gli esperimenti preliminari, in assenza di una linea cellulare che non esprimesse iASPP a livelli endogeni, si è scelto di trasfettare queste linee cellulari con un vettore vuoto o lo stesso contenente il gene codificante V5-iASPP e studiare l'espressione delle proteine MSH2 e MLH1 in seguito all'aggiunta di iASPP esogeno.

L'analisi dei livelli di mRNA di MSH2 in seguito ad overespressione di iASPP, si riflette in un aumento statisticamente non significativo di MSH2 (Figura 24), che però sembra essere sufficiente per indurre una notevole stabilizzazione dell'espressione proteica (Figura 25).



**Figura 24: Espressione genica di MSH2 in cellule di melanoma UIISO-Mel6 overesprimenti V5-iASPP.** Espressione relativa dell'mRNA di MSH2 in cellule di melanoma UIISO-Mel6 overesprimenti V5-iASPP, effettuata mediante qPCR. Il gene GUS è stato usato come normalizzatore. I dati sono espressi come media  $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

L'overespressione di V5-iASPP in tutte le suddette linee cellulari, genera un aumento dell'espressione e un cambiamento di conformazione in MSH2, con conseguente aumento del peso molecolare apparente, evidenziabile mediante western blot come la comparsa o lo shift della banda proteica ad esso corrispondente, ad un più elevato peso molecolare (Figura 25).



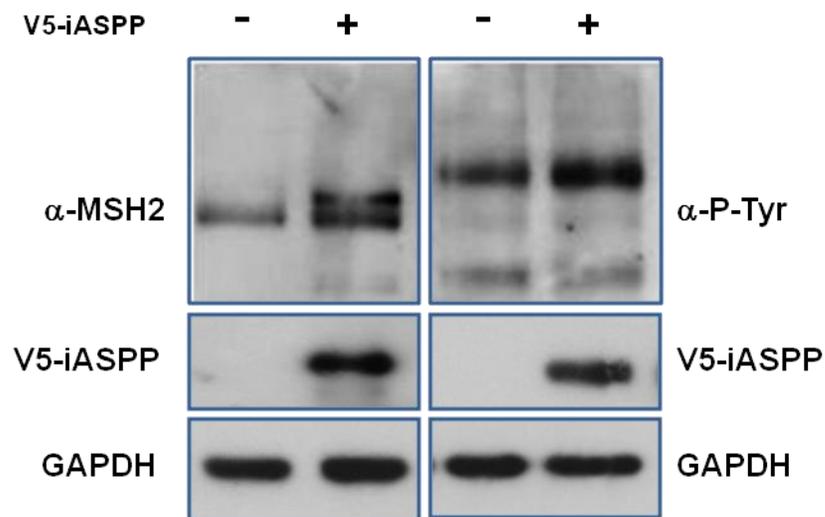
**Figura 24: Effetto di iASPP sulla conformazione di MSH2 in cellule di melanoma.** Espressione e shift di MSH2 analizzati mediante WB in cellule di melanoma trasfettate (+) e non (-) con V5-iASPP. Laddove non è presente V5-iASPP, le cellule sono state trasfettate con il vettore vuoto PCDNA. GAPDH è utilizzato come controllo di loading

Questa stessa banda risulta più evidente, in condizioni fisiologiche basali, nelle cellule C8161. La linea cellulare UIO-Mel6 non esprime la proteina p53, nota come uno dei fattori che interagiscono con iASPP, ma questo non sembrerebbe influenzare il fenomeno osservato ed anzi dimostrerebbe come tale modificazione conformazionale possa avvenire indipendentemente da p53. Nessun cambiamento di espressione o conformazione è invece stato osservato per MLH1 (risultato non mostrato).

### 3.4.1. Studio della conformazione di MSH2 indotta dall'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UIO-Mel6: fosforilazione

Il passo successivo è stato il tentativo di indagare i meccanismi molecolari alla base di questa presunta modifica conformazionale indotta da iASPP su MSH2. A tal proposito, per verificare se si trattasse di una fosforilazione su un residuo di tirosina, i

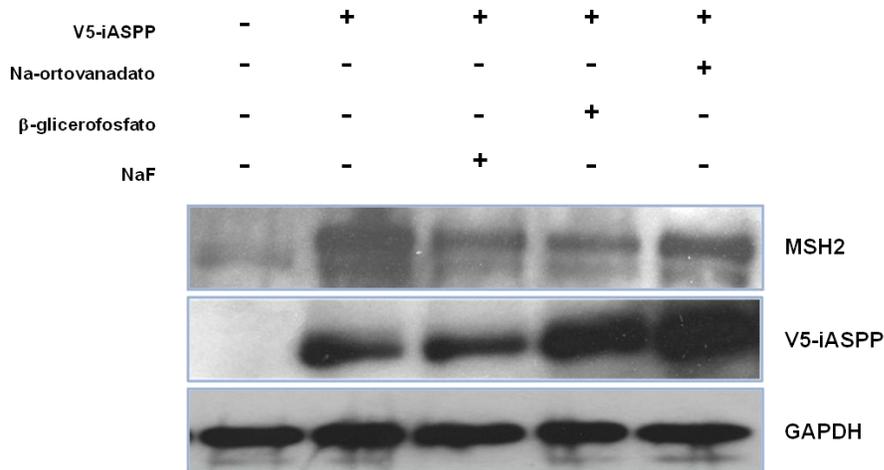
lisati delle cellule UISO-Mel6, trasfettate e non con V5-iASPP, sono stati sottoposti a Western Blot, caricati in doppio su gel di elettroforesi e trasferiti sulla stessa membrana di cellulosa. Questo ha consentito di confrontare l'altezza delle bande ottenute in seguito a sviluppo del film. Una metà membrana è stata incubata con l'anticorpo anti-MSH2 e l'altra metà con l'anticorpo anti-fosfotirosina. Quest'ultimo lega specificamente qualunque residuo di tirosina che sia fosforilato. La figura 26 mostra come la banda d'interesse, scompaia nella membrana incubata con l'anticorpo anti-tirosina.



**Figura 26: Studio della fosforilazione di MSH2.** Espressione e shift di MSH2 (sinistra) e analisi mediante anticorpo anti-fosfo-tirosina (destra, anti-P-Tyr) mediante WB in cellule UISO-Mel-6 trasfettate (+) e non (-) con V5-iASPP. Laddove non è presente V5-iASPP, le cellule sono state trasfettate con il vettore vuoto PCDNA

Risultati simili sono stati ottenuti usando differenti tamponi di lisi cellulare, contenenti diversi inibitori di fosfatasi: NaF, inibitore di fosfatasi alcaline e fosfatasi a serina e treonina;  $\beta$ -glicerofosfato, inibitore delle fosfatasi a serina e treonina; Na-ortovanadato, inibitore delle fosfatasi a tirosina. Qualora si trattasse di una fosforilazione, ci si aspetterebbe un incremento dell'espressione della banda a peso

molecolare piú elevato rispetto al controllo (prima linea), ottenuto senza l'aggiunta di nessun inibitore. Ciò non accade, dimostrando come la modifica conformazionale di MSH2 indotta da iASPP possa difficilmente essere il risultato di una fosforilazione (Figura 27).

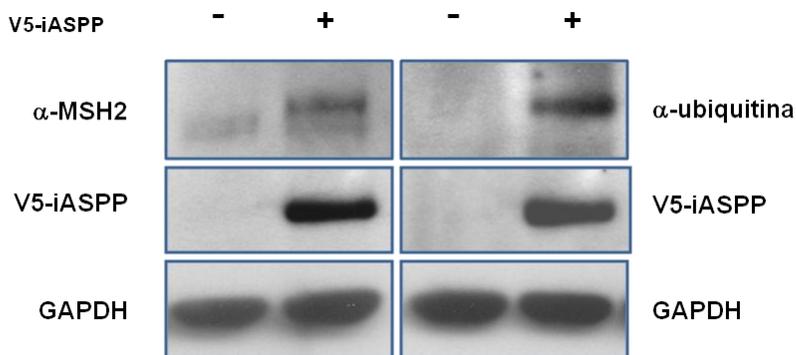


**Figura 27: Studio della conformazione di MSH2 in presenza di inibitori delle fosfatasi.** Espressione e shift di MSH2 in presenza di diversi inibitori delle fosfatasi analizzata mediante WB in cellule UISO-Mel6 trasfettate con V5-iASPP. GAPDH è utilizzato come controllo di loading

### 3.4.2. Studio della conformazione di MSH2 indotta dall'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UISO-Mel6: ubiquitinazione

Il secondo tipo di modificazione esaminato è l'ubiquitinazione. A tal proposito i lisati e delle cellule UISO-Mel6, trasfettate e non con V5-iASPP, anche in questo caso, sono stati sottoposti a Western Blot, caricati in doppio su gel di elettroforesi e trasferiti sulla stessa membrana di cellulosa, con lo stesso procedimento indicato per l'anticorpo anti-fosfotirosina. I due anticorpi usati in questo caso, sono stati anti-MSH2 e un anticorpo anti-ubiquitina (PD41), in grado di riconoscere proteine, mono- e poli-ubiquitinate. L'analisi delle proteine ha rivelato che l'anticorpo anti-ubiquitina riconosce specificamente una banda nel campione trasfettato con V5-iASPP che

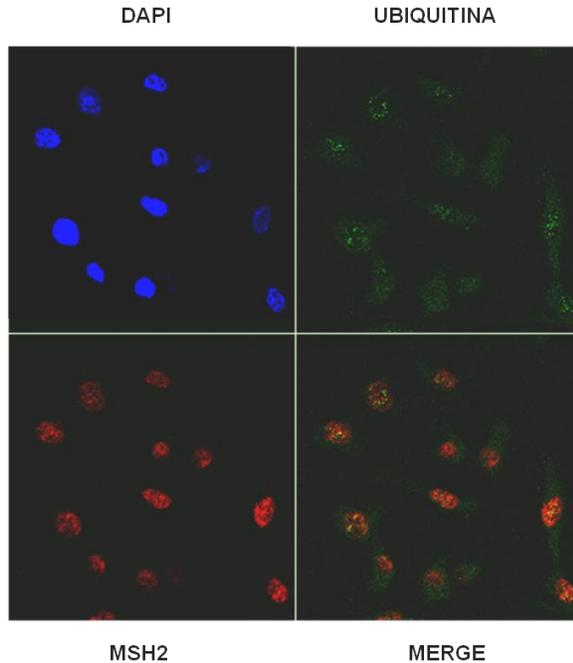
corrisponde esattamente all'altezza della banda superiore di MSH2, mostrando come la modifica conformazionale a carico di MSH2 comprenda per lo meno un'ubiquitinazione (Figura 28).



**Figura 28: Studio dell'ubiquitinazione di MSH2.** Espressione e shift di MSH2 (sinistra) e analisi con anticorpo anti-ubiquitina (destra) mediante western blot in cellule UISO-Mel-6 trasfettate (+) e non (-) con V5-iASPP. Laddove non è presente V5-iASPP, le cellule sono state trasfettate con il vettore vuoto PCDNA

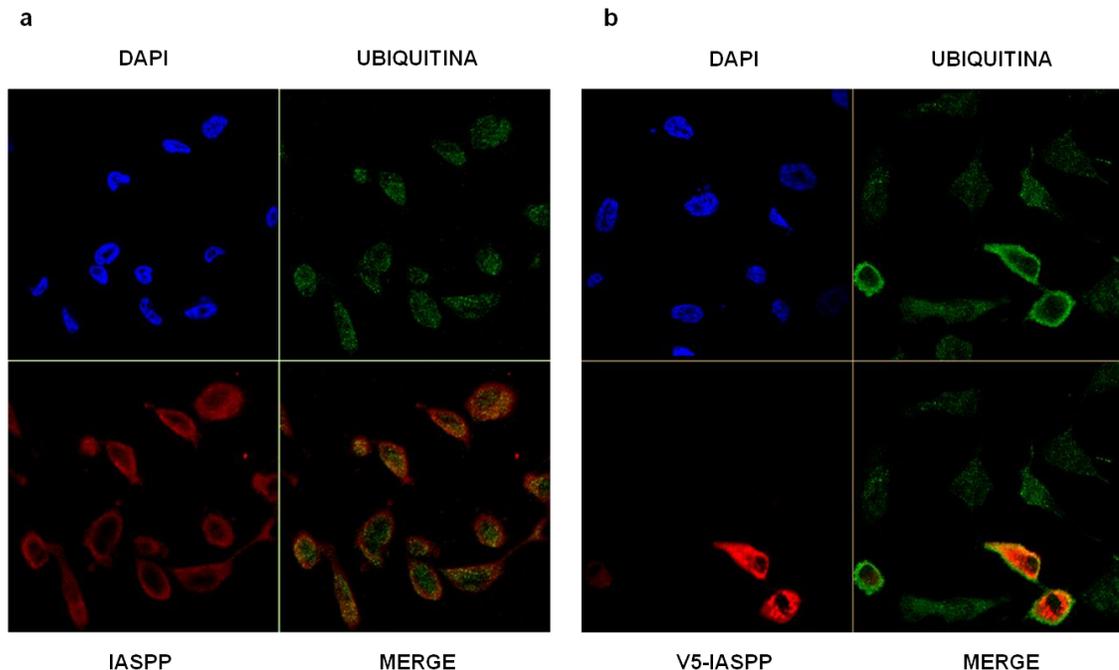
### 3.4.3. MSH2 e iASPP co-localizzano con l'ubiquitina in cellule Uiso-Mel6 dopo trasfezione di iASPP

L'overespressione di V5-iASPP in cellule Uiso-Mel6 è stata anche seguita al microscopio confocale e la possibile ubiquitinazione di MSH2 è stata verificata mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-ubiquitina incubato in concomitanza dell'anti-MSH2 (Figura 29). Mediante questa tecnica, si è dimostrata la co-localizzazione delle due proteine, a sostegno della tesi che la proteina sia ubiquitinata.



**Figura 29: Co-localizzazione di MSH2 con l'ubiquitina:** Co-localizzazione della proteina MSH2 (rosso) con l'ubiquitina (verde) in cellule di melanoma metastatico UIISO-Mel6 trasfettate con V5-iASPP mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu

Una forte co-localizzazione è stata dimostrata anche tra iASPP e l'ubiquitina. Questo risultato è evidenziato nella figure 30a e 30b che mostrano come iASPP co-localizzi con l'ubiquitina sia quando espresso in cellule UIISO-Mel6 a livello endogeno, sia quando le stesse cellule siano trasfettate con il plasmide over-esprimente V5-iASPP. In particolare, nella figura 30b, l'uso di un anticorpo anti-V5 ha permesso di evidenziare solo le cellule che over-esprimono iASPP (rosso). Se si confrontano i livelli di ubiquitina tra le suddette cellule e quelle che non hanno inglobato il plasmide, si nota come, i livelli di ubiquitina aumentino all'aumentare dell'espressione di iASPP. Questo è mostrato dalla più intensa colorazione verde che le cellule assumono quando osservate al microscopio confocale. Ciò potrebbe dimostrare che anche iASPP sia ubiquitinato e/o che faccia parte in qualche modo del sistema proteosomico.

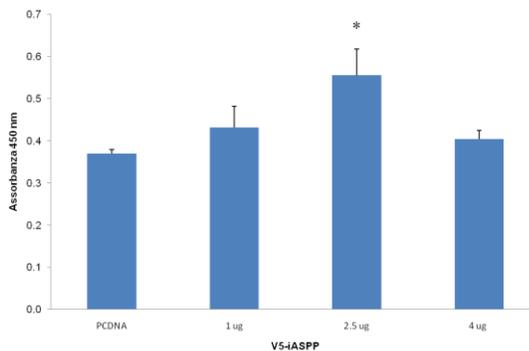


**Figura 25: Co-localizzazione di iASPP con l'ubiquitina:** co-localizzazione delle proteine iASPP (rosso) e ubiquitina (verde) in cellule di melanoma metastatico UISO-Mel6 mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu. (a) Co-localizzazione della proteina iASPP endogena (rosso) con l'ubiquitina (verde) iASPP endogeno è evidenziato mediante l'anticorpo LX4903. (b) V5-iASPP, dopo trasfezione è evidenziato con anticorpo anti-V5.

#### 3.4.4. L'over-espressione di iASPP in cellule di melanoma UISO-Mel6 influenza l'attività di riparo del DNA mediata da MutS $\alpha$

Dal momento che la principale funzione di MSH2 è quella di riparo del DNA, si è proceduto a valutare se la modifica conformazionale indotta su MSH2 da iASPP avesse influenza su questa. Poiché l'attività di riparo di MSH2 è dipendente dalla formazione del complesso MutS $\alpha$  con la proteina MSH6, la possibilità di MSH2 di influenzare il riparo del DNA è stata studiata come capacità del complesso MutS $\alpha$  di riconoscere il DNA contenente un appaiamento scorretto di basi G-T mediante opportuno GTBP DNA repair kit, basato sul metodo ELISA. Il risultato ottenuto è un aumento dell'attività di legame del complesso MutS $\alpha$  in correlazione alla quantità di plasmide trasfettato nelle cellule UISO-Mel6, dopo 18 ore dalla avvenuta trasfezione, fino a 2.5  $\mu$ g. Questa è infatti la concentrazione di plasmide in grado di indurre un

significativo aumento di attività rispetto al controllo, rappresentato dalla trasfezione con plasmide vuoto. La trasfezione con 4  $\mu\text{g}$  di plasmide, riporta l'attività del complesso MutS $\alpha$  a quella basale (Figura 31).



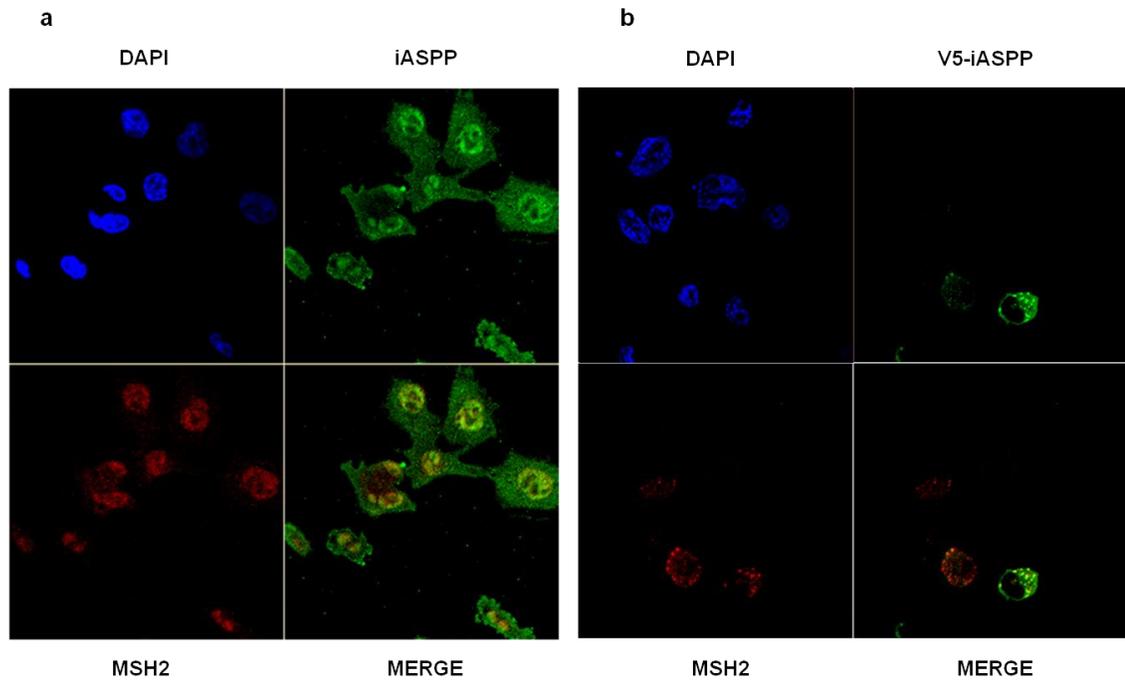
**Figura 31: Effetto di V5-iASPP sull'attività di MutS $\alpha$ :**Attività di MutS $\alpha$ , misurata mediante il GTBP DNA repair kit, in estratti nucleari di cellule UIISO-Mel6 (5  $\mu\text{g}$ ) trasfettate con differenti quantità del plasmide esprimente V5-iASPP. Il controllo è rappresentato dalla trasfezione con vettore vuoto PCDNA. I dati sono espressi come media  $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$

### 3.5. iASPP co-localizza con le proteine appartenenti al sistema MMR e lega MSH2

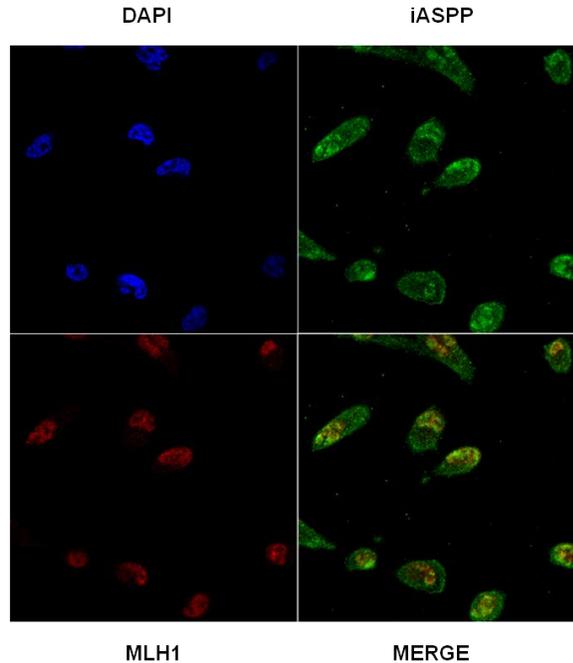
#### 3.5.1. Co-localizzazione fra iASSP e fattori appartenenti al sistema MMR

Per capire se il meccanismo con cui iASSP influenza l'attività del sistema MMR sia diretto o indiretto, si è voluto studiare se esistesse qualche interazione fra le proteine del sistema MMR e iASSP. L'utilizzo di tecniche di immunofluorescenza ha permesso di dimostrare co-localizzazione di iASSP con MSH2 e MLH1 in UIISO-Mel6. La co-localizzazione è parziale come mostrato nelle Figura 32 e 33. Nella figura 32b è stato possibile evidenziare solo le cellule over-esprimenti V5-iASPP mediante l'uso di

un anticorpo anti-V5. In tali cellule è evidente come ad alti livelli di iASPP corrisponda un aumento dei livelli della proteina MSH2, osservabile come aumento dell'intensità del colore rosso delle cellule osservate al microscopio confocale. Questo è in accordo con i risultati ottenuti mediante western blot (Figura 25).



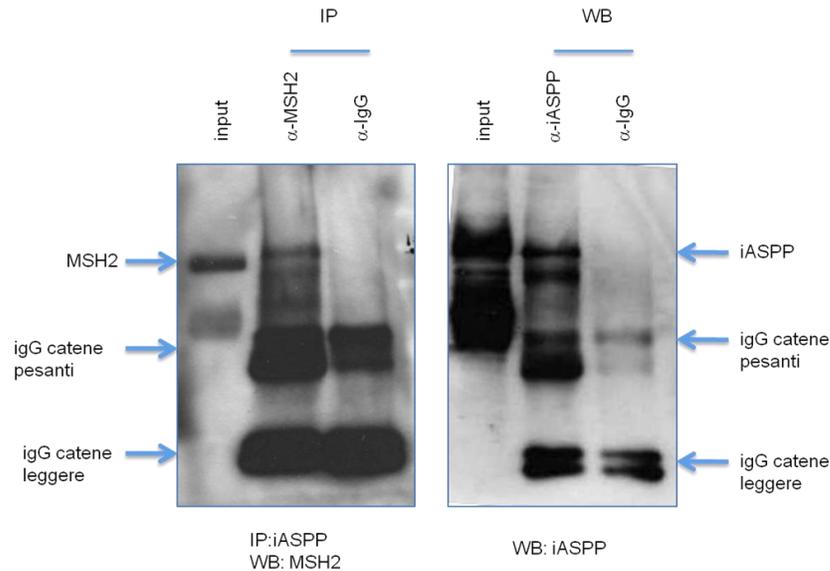
**Figura 32: Co-localizzazione fra MSH2 e iASPP:** co-localizzazione delle proteine MSH2 (rosso) e iASPP (verde) in cellule di melanoma metastatico UIO-Mel6 mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu. (a) iASPP endogeno è evidenziato mediante l'anticorpo LX4903. (b) V5-iASPP, dopo trasfezione è evidenziato con anticorpo anti-V5.



**Figura 33: Co-localizzazione fra MLH1 e iASPP:** co-localizzazione delle proteine MLH1 (rosso) e iASPP (verde) in cellule di melanoma metastatico UISO-Mel6 mediante tecniche di immunofluorescenza. Il nucleo delle cellule è evidenziato con colorazione DAPI-blu.

### 3.5.2. Legame fra iASPP e fattori appartenenti al sistema MMR

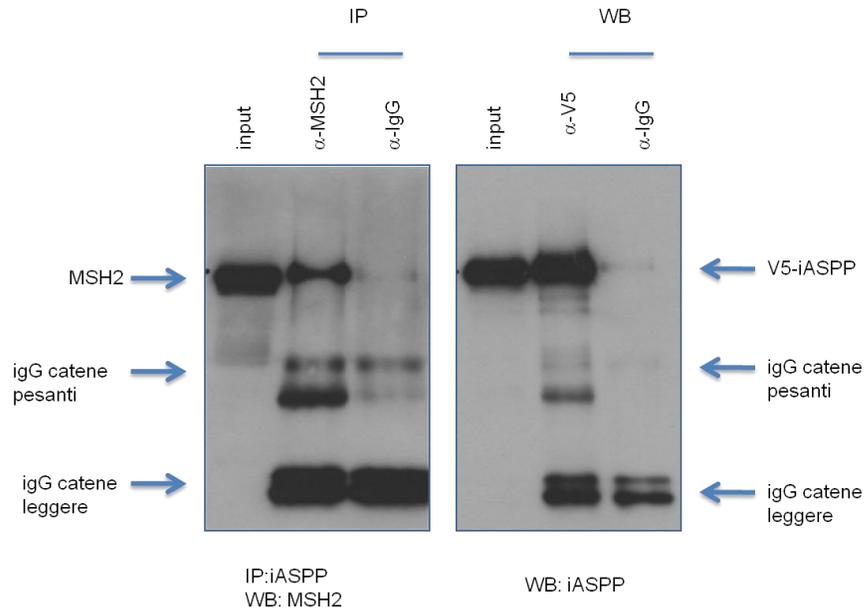
Inoltre, in cellule UISO-Mel6, l'immunoprecipitazione (IP) di iASPP con un anticorpo specifico per la proteina endogena, ha rivelato che questo è in grado di legare in condizioni fisiologiche la proteina MSH2, quindi iASPP e MSH2 interagiscono tra di loro in assenza di alcun tipo di danno al DNA. La Figura 34 mostra come la forma di MSH2 che precipita sia quella corrispondente alla banda a peso molecolare piú alto (quella cioè che rappresenta la modificazione conformazionale indotta da iASPP) non evidenziabile nel controllo (input) probabilmente perché espressa a bassi livelli. Questa isoforma è resa evidente solo dall'arricchimento mediante IP della proteina MSH2 legata ad iASPP e sembra essere l'unica forma a legarsi.



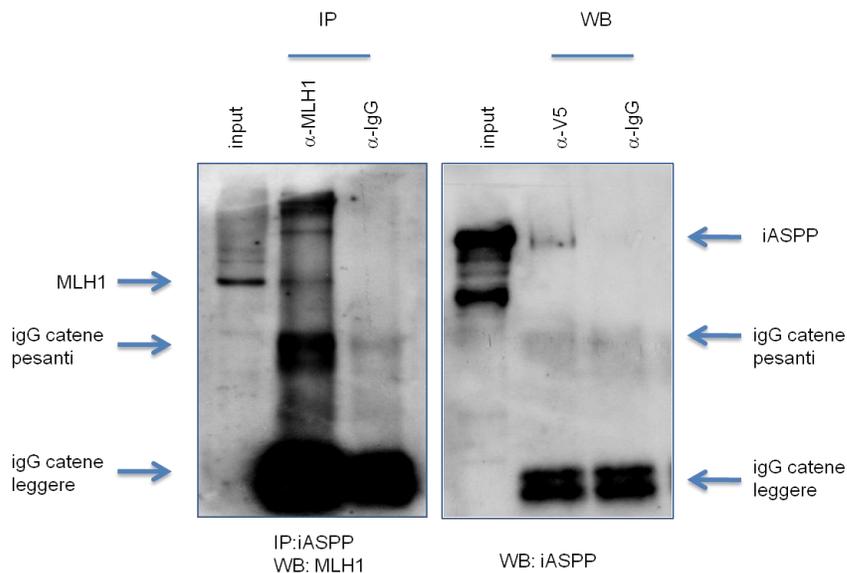
**Figura 34: Co-precipitazione di MSH2 e iASPP:** Interazione tra MSH2 e iASPP endogeni in cellule di melanoma UIISO-Mel6 dimostrata tramite tecniche di immunoprecipitazione in vitro e successivo Western Blot. A sinistra immunoprecipitazione di iASPP e incubazione con l'anticorpo anti-MSH2. A destra, dimostrazione dell'avvenuta precipitazione di iASPP mediante incubazione con anticorpo anti-iASPP.

Questo è confermato dalla purificazione di V5-iASPP tramite IP in cellule UIISO-Mel6 sottoposte a trasfezione (Figura 35). In quest'ultimo caso, la precipitazione di iASPP è stata fatta avvenire con un anticorpo anti-V5 rabbit. Ciò che si nota mettendo a confronto i due risultati è che la isoforma di MSH2 che lega iASPP è quella corrispondente alla banda superiore evidenziata nel western blot, suggerendo che iASPP induca la nuova isoforma di MSH2 e legghi proprio quest'ultima di peso molecolare apparentemente più alto.

Pur non influenzando l'espressione e/o la conformazione di MLH1, iASPP, a livelli endogeni, è in grado di legare anche questa proteina. Il risultato è mostrato in Figura 36.



**Figura 35: Co-precipitazione di MSH2 e V5-iASPP:** Interazione tra MSH2 e V5-iASPP dopo trasfezione in cellule di melanoma UIISO-Mel6 dimostrata tramite tecniche di immunoprecipitazione in vitro e successivo Western Blot. A sinistra immunoprecipitazione di iASPP con anticorpo anti-V5 rabbit e incubazione con l'anticorpo anti-MSH2. A destra, dimostrazione dell'avvenuta precipitazione di V5-iASPP mediante incubazione con anticorpo anti-V5 mouse.

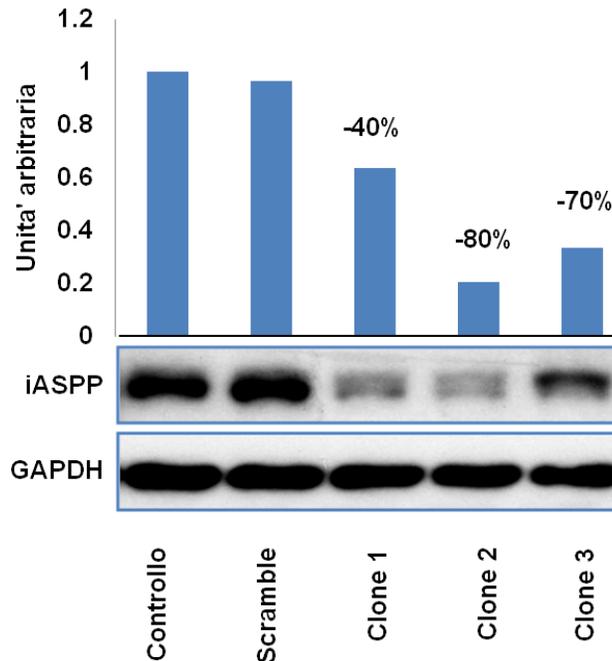


**Figura 36: Co-precipitazione di MLH1 e iASPP:** Interazione tra MLH1 e iASPP endogeni in cellule di melanoma UIISO-Mel6 dimostrata tramite tecniche di immunoprecipitazione in vitro e successivo Western Blot. A sinistra immunoprecipitazione di iASPP e incubazione con l'anticorpo anti-MLH1. A destra, dimostrazione dell'avvenuta precipitazione di iASPP mediante incubazione con anticorpo anti-iASPP.

## **3.6. SILENZIAMENTO DEL GENE DI IASPP MEDIANTE ShRNAs E SUE CONSEGUENZE**

### **3.6.1. Silenziamento del gene di iASPP mediante shRNAs**

Per verificare che l'effetto osservato su MSH2 fosse effettivamente dovuto all'attività di iASPP, si è pensato di sottoporre il gene codificante la proteina, a silenziamento stabile, mediante l'uso di shRNAs. La tecnica è stata applicata a cellule di melanoma WM1158, nelle quali, tramite qPCR e WB, si sono osservati livelli discreti di espressione di iASPP ed MSH2. Il silenziamento genico di iASPP è stato ottenuto mediante infezione virale nelle cellule WM1158 di 3 costrutti di shRNAs, le cui sequenze sono indicate nella sezione Metodi. Il metodo e i costrutti utilizzati, sono stati validati precedentemente in linee cellulari di cheratinociti Hacat (Chikh et al., dati non ancora pubblicati) e sono indipendenti dalla linea cellulare utilizzata, in quanto funzionano anche su altre linee di melanoma (risultato non mostrato). Mediante l'utilizzo di questi tre costrutti, sono stati ottenuti tre cloni (clone 1, clone 2 e clone 3). Nei cloni 1 e 2, si è ottenuta una riduzione maggiore dell'espressione di iASPP, mentre il costrutto utilizzato per ottenere il clone 3, si è rivelato inefficiente (Figura 37). Il clone scelto per i successivi esperimenti è il clone 2, dove la riduzione dell'espressione proteica di iASPP è di circa l'80%, come risultato dall'analisi densitometrica della banda ad esso relativa, mostrata in Figura 37.

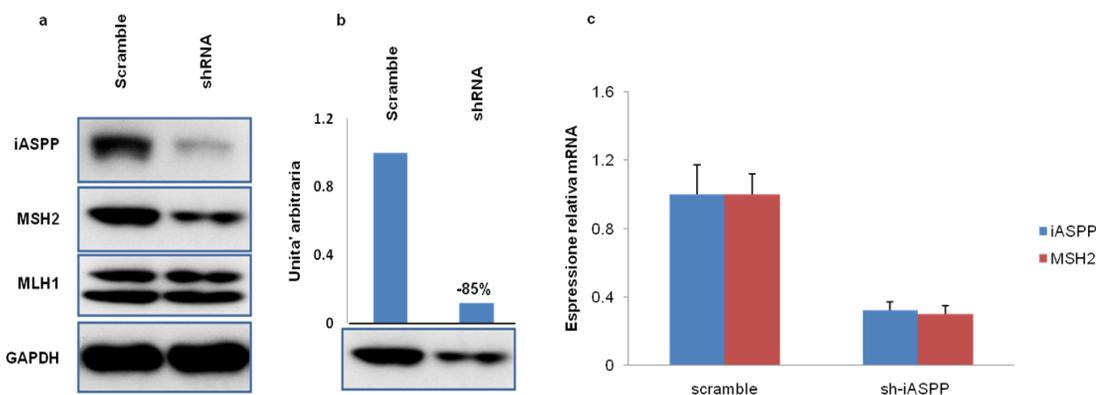


**Figura 37: Silenziamento di iASPP:** Analisi dell'espressione di iASPP a livello proteico mediante WB in cellule di melanoma WM1158, dopo silenziamento tramite tre shRNAs, che hanno generato i cloni cellulari 1, 2 e 3. Il controllo è rappresentato dalle cellule in condizioni basali. Il controllo negativo è rappresentato da sequenze di shRNA scramble. GAPDH è stato utilizzato come controllo di loading. La quantificazione dell'espressione, mostrata nella parte alta della figura, è stata effettuata mediante densitometria ottica e GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore.

### 3.6.2. Effetto del silenziamento del gene di iASPP sull'espressione di fattori appartenenti al sistema MMR

I lisati delle cellule WM1158, controllo e shRNA, sono stati sottoposti a SDS-PAGE e WB per la valutazione dell'espressione di MSH2 e MLH1. Dalle stesse cellule è stata effettuata l'estrazione dell'RNA cellulare, analizzato mediante PCR quantitativa. I risultati della Figura 37, mostrano come l'espressione di MSH2, sia a livello proteico (38a e 38b) che genico (38c), sia sensibilmente ridotta in cellule che abbiano subito il silenziamento di iASPP. Inoltre si osserva una esatta corrispondenza tra la riduzione dell'espressione genica di iASPP e di MSH2, entrambe ridotte del valore del 70 % rispetto allo scramble. D'altro canto, la proteina MLH1 non risulta affetta nella sua

espressione dalla riduzione di espressione di iASPP (Figura 38a), in accordo con i risultati dell'overespressione, che non mostravano alcun cambiamento sia di conformazione che di espressione di tale proteina.

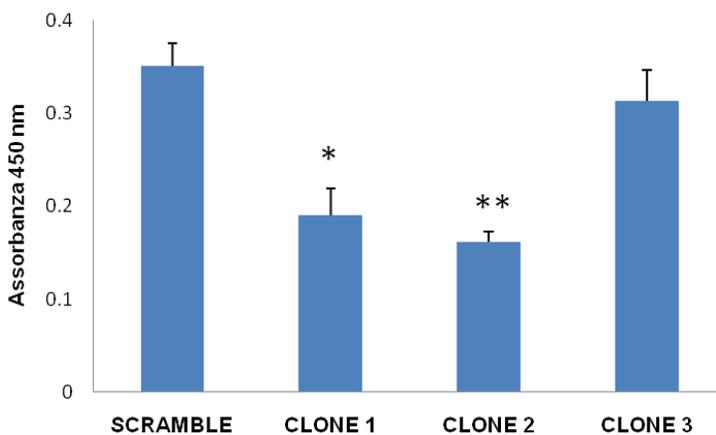


**Figura 268: Effetto del silenziamento di iASPP sui fattori appartenenti al sistema MMR:** a) Analisi dell'espressione delle proteine MSH2 e MLH1 dopo silenziamento di iASPP tramite shRNA, analizzata in cellule di melanoma WM1158 mediante WB. Lo scramble rappresenta il controllo. GAPDH è utilizzato come normalizzatore. b) Quantificazione relativa della riduzione di espressione di MSH2 mediante densitometria ottica. GAPDH è stato utilizzato come normalizzatore. c) Analisi dell'espressione genica di MSH2 dopo silenziamento di iASPP tramite shRNA, analizzata in cellule di melanoma WM1158 mediante pcr quantitativa. Lo scramble rappresenta il controllo. Il gene GUS è utilizzato come normalizzatore.

### 3.6.3. Effetto del silenziamento del gene di iASPP sull'attività del complesso MutS $\alpha$

Avendo stabilito che l'overespressione di iASPP in cellule di melanoma è in grado di influenzare positivamente l'attività di riparo del DNA mediata da MutS $\alpha$ , si è pensato che il silenziamento del suo gene (PPP1R13L) dovesse avere l'effetto contrario, ovvero una riduzione del suo contributo nel MMR. Per questo l'attività del complesso MutS $\alpha$  è stata nuovamente analizzata negli estratti nucleari delle cellule WM1158 esprimenti iASPP e in quelli in cui iASPP fosse stato silenziato. I risultati riportati in Figura 39, mostrano come l'attività del complesso MutS $\alpha$  sia sensibilmente

ridotta in cellule in cui il gene iASPP sia silente. In particolare, l'attività rilevata nel clone 2 risulta ridotta di oltre il 50% e la riduzione risulta altamente significativa rispetto al controllo, rappresentato dallo scramble. Ciò è in linea con la riduzione dell'espressione proteica di MSH2 osservata in precedenza (Figura 38).

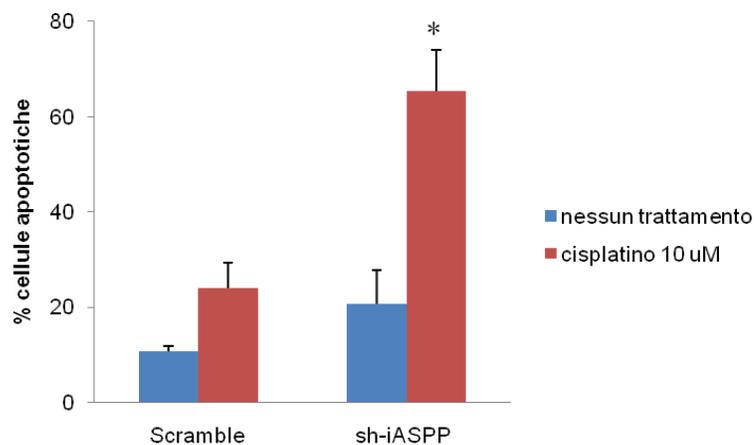


**Figura 3927: Effetto del silenziamento di iASPP sull'attività di MutS $\alpha$ :** Attività di MutS $\alpha$ , misurata mediante il GTBP DNA repair kit, in estratti nucleari (5  $\mu$ g) di cellule UI50-Mel6 trattate con tre differenti shRNAs che hanno generato i cloni 1, 2 e 3. Il controllo è rappresentato da sequenze di siRNA scramble. I dati sono espressi come media  $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

#### **3.6.4. Effetto del cisplatino su induzione dell'apoptosi, espressione genica e attività del complesso MutS $\alpha$ in cellule silenziate per iASPP**

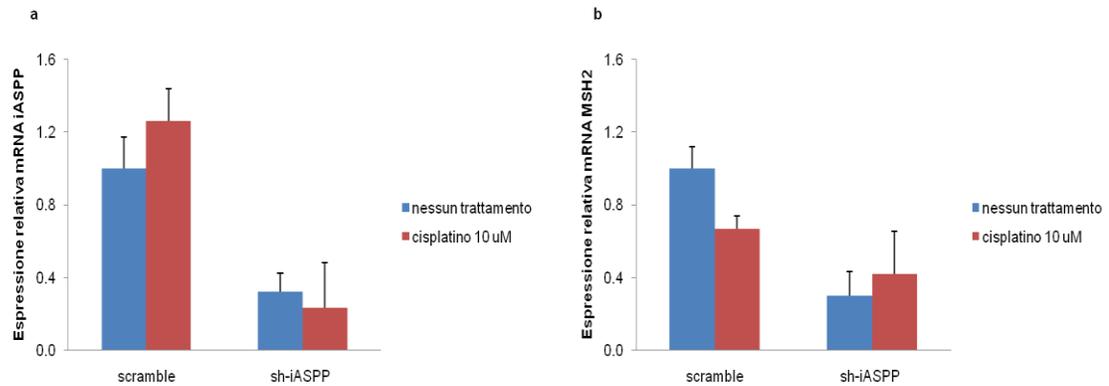
Poiché è noto che la proteina iASPP in cancro esercita un'azione anti-apoptotica, si è voluto studiare l'effetto che ha il silenziamento genico a carico di tale proteina in cellule di melanoma, sull'apoptosi indotta da un comune chemioterapico usato nella terapia del melanoma e di altri tipi di cancro. Le cellule WM1158 che hanno subito il silenziamento stabile di iASPP sono state trattate con una concentrazione di cisplatino pari a 10  $\mu$ M per un tempo di 24 ore e l'apoptosi è stata quantificata con il saggio

dell'annessina V mediante tecniche citofluorimetriche. Come mostrato in Figura 40, il silenziamento del gene codificante iASPP, sensibilizza le cellule di melanoma all'apoptosi indotta dal cisplatino. Più precisamente, nelle condizioni sopra descritte, il cisplatino è in grado di indurre poco più del 20% di morte cellulare per apoptosi nelle cellule controllo (scramble), mentre le cellule dove iASPP sia stato silenziato, mostrano una percentuale di cellule apoptotiche maggiore del 60%, confermando iASPP come un fattore anti-apoptotico.



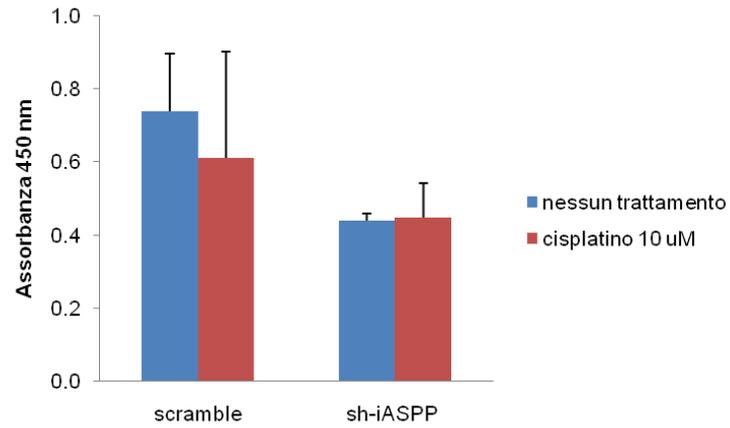
**Figura 40: Effetto del silenziamento di iASPP sull'apoptosi indotta da cisplatino:** Misura dell'apoptosi in cellule WM1158 silenziate per il gene iASPP mediante saggio dell'annessina V. Il controllo è rappresentato dalle cellule trattate con sequenze di shRNA scramble. I dati sono espressi come media  $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$

Dalle stesse cellule è stato poi estratto l'RNA cellulare per analizzare se l'espressione genica di iASPP e MSH2 fosse influenzata dall'azione del cisplatino. I risultati sono riportati in Figura 41 e dimostrano come non ci siano cambiamenti significativi dell'espressione dei due fattori a livello genico quando le cellule trattate con gli scramble o silenziate per il gene di iASPP, siano state sottoposte all'azione del cisplatino 10  $\mu$ M.



**Figura 41: Effetto del cisplatino sull'espressione genica di iASPP e MSH2:** a) Analisi relativa dell'espressione genica di iASPP in cellule di melanoma metastatico WM1158 silenziate per iASPP mediante PCR quantitativa. b) Analisi relativa dell'espressione genica di MSH2 in cellule di melanoma metastatico WM1158 silenziate per iASPP mediante PCR quantitativa. Lo scramble rappresenta il controllo. Il gene GUS è utilizzato come normalizzatore.

Poiché, come dimostrato sopra, iASPP è coinvolto nella regolazione del sistema Mismatch Repair, ci si è chiesti se il trattamento con cisplatino, alle condizioni e al tempo descritto, potesse influenzare l'attività del complesso MutS $\alpha$  in cellule WM1158 silenziate per il gene iASPP. La Figura 42 rivela come l'attività del complesso MutS $\alpha$ , pur riducendosi nelle cellule silenziate per iASPP in assenza di alcun trattamento a conferma di quanto precedentemente descritto, risulta invariata in seguito a trattamento con cisplatino.



**Figura 42: Effetto del cisplatino sull'attività di MutS $\alpha$ :** Attività di MutS $\alpha$ , misurata mediante il GTBP DNA repair kit, in estratti nucleari (10  $\mu$ g) di cellule WM1158 silenziate per iASPP. Il controllo è rappresentato da sequenze di shRNA scramble. I dati sono espressi come media  $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti.

## 4.DISCUSSIONE

Il melanoma è la forma più aggressiva di cancro della pelle, il cui numero di casi è in costante aumento, specialmente nei paesi occidentali, nei pazienti di origine caucasica. Questo tipo di tumore, rappresenta un fenomeno di interesse sociale, perché genera un gran numero di morti, soprattutto in età giovanile. Inoltre, il melanoma è notoriamente refrattario ai più comuni approcci terapeutici. Una delle cause è sicuramente da addurre alla deregolazione di alcuni segnali molecolari cruciali (RAF/RAS/ERK/MEK), che inducono un grande aumento della proliferazione e della crescita cellulare associate ad una diminuzione della sensibilità delle cellule all'apoptosi rendendo il melanoma, uno dei tumori più aggressivi con limitate prospettive terapeutiche.

Il presente lavoro, si inserisce in questo contesto, ossia nel tentativo di spiegare, almeno in parte, la diminuita sensibilità apoptotica osservata in melanoma, come conseguenza di pathways molecolari alterati: uno già noto in parte come deregolato in melanoma (sebbene i meccanismi non siano ben chiari) ossia l'attività di riparo mediata dal sistema Mismatch Repair (MMR), e un altro ad oggi inesplorato in melanoma, ossia quello in cui è direttamente coinvolto il fattore anti-apoptotico iASPP. In questo studio si dimostra come iASPP possa controllare il sistema MMR e questo pone immediatamente l'interrogativo se, i fattori coinvolti nel sistema MMR, non siano alterati in seguito ad un alterazione di iASPP, (noto per avere attività oncogenica), o viceversa.

Recentemente, una certa attenzione è stata posta sul coinvolgimento del sistema MMR in melanoma. Tale coinvolgimento, sembra non andare in una sola direzione, dal momento che talvolta sono stati riportati casi di perdita di espressione dei geni e relative proteine, facenti parte di questo sistema (Korabiowska et al., 2000, 2004; Hussein et al., 2001), ma sono anche noti in letteratura casi che ne dimostrano una più

elevata espressione. Rass et al. già nel 2001 avevano riportato una più alta immunoreattività dei tessuti di melanoma metastatico di MSH2, quando confrontati con nei non maligni nonché un'alta espressione dell'mRNA di MSH2 in linee cellulari di melanoma, quando confrontate con colture di cheratinociti Hacat. È anche noto uno studio in cui siano stati individuati casi di melanoma primario delle mucose (Marani et al., 2007) risultati nell'osservazione di alti livelli di espressione proteica di MSH2 e MLH1 in alcuni tessuti. Kauffmann et al (2008) analizzando i profili di espressione genica (microarray) in tessuti di melanomi primari che abbiano dato vita a metastasi, confrontati con melanomi non metastatici, riportano alterazione di diversi geni, coinvolti nel riparo del DNA. Alcuni dei geni alterati sono proprio quelli coinvolti nel sistema di riparo MMR, tra cui in particolare EXO1, MSH2 e MSH6

Questi ultimi dati, sono in accordo con gli studi presentati in questa tesi che dimostrano una elevata espressione dell'mRNA di MSH2 in linee cellulari metastatiche piuttosto che primarie, così come di MLH1, se confrontate con melanociti. Una più alta espressione proteica, si osserva tuttavia in tutte le linee cellulari studiate, sia primarie che metastatiche, suggerendo possibili livelli di controllo del turnover proteico che riguardano questi fattori. L'elevata espressione di MSH2 e MLH1 potrebbe essere in accordo con la proliferazione maligna che caratterizza il melanoma e tutti gli altri tumori. D'altra parte, in più di un caso è stato osservato l'aumento di espressione della proteina MSH2 in cellule in proliferazione (Marra et al., 1996; Hamid et al., 2002; Leach et al, 1996). È chiaro che l'espressione proteica di MSH2 e MLH1 non significa necessariamente che le proteine siano attive, sebbene mutazioni nei geni corrispondenti siano, seppur possibili (Hussein and Wood, 2003), piuttosto rare (Rass et al, 2001). A dimostrazione di questo, l'attività del riparo al DNA nelle linee cellulari di melanoma usate in questo lavoro di tesi, è risultata simile o più elevata rispetto a melanociti primari (risultato non mostrato). Questo dimostrerebbe che le proteine coinvolte sono attive e inoltre suggerirebbe che, in assenza di stimoli esterni, ossia in condizioni fisiologiche, l'attività di riparo in tali melanomi non è alterata e che quindi l'overespressione delle proteine possa essere il risultato di una deregolazione di una qualche via molecolare alterata collegata al Mismatch Repair. Inoltre, l'attività proteica di MSH2 e MSH6 è confermata nella linea cellulare UISO-Mel6, in quanto,

l'overespressione della proteina iASPP indotta in tali cellule, riesce a modularla positivamente. Questo, oltre a confermare appunto l'integrità del MMR nei riguardi di tali fattori, induce a pensare che la modifica conformazionale osservata in MSH2 e indotta da iASPP, sia una forma attiva della stessa proteina in quanto ne facilita il legame con il DNA da riparare. Conferma ulteriore, arriva dal silenziamento di iASPP in cellule di melanoma, che riduce sia l'espressione di MSH2 che la sua attività di legame al DNA da riparare.

Questa influenza di iASPP su MSH2, lascia anche presupporre un meccanismo di azione diretto, ancora non svelato, su tale proteina, in quanto le due, co-localizzano nel nucleo e si legano l'una all'altra. L'influenza di iASPP sul sistema MMR, potrebbe non riguardare solo MSH2. Sebbene non sia stata osservata alcuna modifica in MLH1, sia a livello conformazionale che di espressione, dopo trasfezione di iASPP in cellule di melanoma, è pur vero che anche queste due proteine co-localizzano e si legano l'una all'altra. È pertanto possibile che l'attività dei complessi MutL, di cui MLH1 fa parte, siano in qualche modo influenzati almeno nella loro attività e a tal proposito, sono richiesti ulteriori approfondimenti.

I risultati mostrati in questo lavoro, suggeriscono che MSH2 sia ubiquitinata in seguito ad overespressione di iASPP. L'ubiquitinazione dei fattori MSH2 e MSH6 è stata già dimostrata in lavori precedenti (Hernandez-Pigeon et al., 2004; 2005) ma in tal caso gli autori discutono unicamente la degradazione mediata dal sistema del proteosoma, piuttosto che una modulazione dell'attività. I nostri risultati suggeriscono invece che l'ubiquitinazione di proteine del sistema MMR possa essere, almeno in certe condizioni, un sistema di regolazione proteica e che influenzi l'attività di riparazione. Non si tratterebbe del primo caso osservato in cui l'ubiquitinazione di proteine promuove il riparo del DNA. È il caso infatti anche della proteina PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), la cui ubiquitinazione partecipa nella riparazione del DNA post-replicativa mediata dalla ubiquitina-ligasi Rad6 (Hoegge et al., 2002). Sarebbe infatti che, l'ubiquitinazione riportata in questo lavoro, possa mediare sia la regolazione che il turnover della proteina MSH2. Questo è suggerito dal fatto che ad alte concentrazioni di V5-iASPP trasfettato in cellule di melanoma (4µg), l'attività di riparo ritorna simile a quella basale, dopo essersi elevata fino a 2.5 µg e che a tale

concentrazione, sia osservabile tramite WB, una degradazione di MSH2 evidenziabile dalla comparsa di un “ladder” proteico (risultato non mostrato). Inoltre è stata osservata anche, tramite immunocitofluorescenza, una parziale ri-localizzazione della proteina MSH2 dal nucleo al citoplasma, dove il proteosoma è localizzato.

D'altra parte, iASPP potrebbe essere a sua volta ubiquitinato o far parte del sistema proteosomico. È stata infatti osservata in questo lavoro, una forte co-localizzazione di iASPP con l'ubiquitina, prevalentemente a livello citosolico. A tal proposito la figura 32 rivela come, iASPP, quando espresso ad alti livelli, appaia nelle cellule in corpi tondeggianti, in cui talvolta si aggregano le proteine ubiquitinate del citosol (Johnston et al, 1998). Inoltre, la degradazione di iASPP mediante proteosoma è stata recentemente dimostrata (Laska et al., 2010). Nello stesso lavoro ci sono evidenze che l'induzione dell'espressione di iASPP accelera la degradazione di p53 mediata dal proteosoma. Un dato che, insieme a quelli mostrati in questa tesi, fa pensare ulteriormente ad un possibile ruolo di iASPP nella regolazione della stabilità proteica mediata dal proteosoma stesso.

iASPP è una proteina nota soprattutto, in cancro, per la sua attività anti-apoptotica, che esercita legando la proteina p53, agendo come suo inibitore (Bergamaschi et al. 2003). Inoltre diversi studi hanno dimostrato un incremento dell'espressione di iASPP in diversi tipi di tumori (Lu et al., 2010; Zhang et al, 2005; Saebo et al., 2006; Liu et al., 2008; Liu et al., 2010), suggerendo che la sua alterata regolazione possa avere un ruolo nella carcinogenesi e che possa essere un ottimo bersaglio terapeutico nelle terapie anticancro. L'espressione delle proteine della famiglia ASPP non è stata mai d'altra parte studiata in melanoma. Questo studio rappresenta quindi la prima evidenza di una possibile alterazione a carico di tale famiglia, in questo tipo di tumore. È chiaro che l'espressione di iASPP sia più elevata, sia a livello proteico che genico, soprattutto in cellule a carattere metastatico. Questo dato è in accordo con Liu et al. (2010) che hanno osservato come un'alta espressione di iASPP nell'adenocarcinoma dell'endometrio, è associata a invasione e metastasi linfonodali. L'associazione di iASPP con le metastasi, suggerisce un ruolo di questa proteina nell'adesione cellulare. D'altra parte, una nota mutazione inattivante di iASPP è riconosciuta avere un ruolo nell'integrità di tessuti epiteliali (Herron et al., 2005) e

uno studio non ancora pubblicato, di cui la presente è co-autrice (Chikh et al., dati non ancora pubblicati) dimostra il sicuro coinvolgimento di iASPP nella fisiologia della pelle, influenzando il mantenimento dell'integritá epiteliale, interagendo in un feedback-loop con la proteina p63, giá nota per la sua importanza nel mantenimento della stratificazione epiteliale.

Un'altra via metabolica a cui iASPP è noto partecipare, è la via del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, del quale è un inibitore (Yang et al., 1999; Takada et al., 2002). Una delle alterazioni metaboliche in melanoma, coinvolge proprio una up-regolazione delle subunità di NF- $\kappa$ B, p50 and Rel-A (McNulty et al. 2001; Meyskens et al. 1999) o una down-regolazione dell'inibitore di NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B (Dhawan and Richmond 2002; Yang and Richmond 2001). Rel-A è proprio la subunità a cui iASPP si legherebbe per esercitare la sua azione inibitoria. Per cui ci si chiede se la disregolazione dell'espressione di iASPP non abbia anche una qualche relazione con questo pathway molecolare anch'esso alterato in melanoma.

La concomitante elevata espressione di fattori appartenenti al sistema MMR e il fattore iASPP, nonché il controllo dell'espressione genica di MSH2, risultata dal silenziamento di iASPP in cellule di melanoma metastatiche, apre nuove prospettive sui possibili meccanismi in cui iASPP sia coinvolto. Non molti dati sono tuttora disponibili sul meccanismo d'azione di iASPP, a parte quelli che dimostrano l'interazione con le proteine della famiglia di p53 (Bergamaschi et al. 2004, 2006; Robinson et al. 2008; Samuels-Lev et al. 2001; Mantovani et al., 2007; Chick et al, non pubblicato). In questo lavoro però, gli effetti sul riparo del DNA, attribuiti da iASPP, sembrano essere indipendenti da p53, in quanto la linea cellulare UISO-Mel6, usata per la maggior parte degli esperimenti, non esprime p53, sebbene, risultati non ancora pubblicati, dimostrano altresí nella stessa un'elevata espressione di p63. Il coinvolgimento della famiglia di p53, resta quindi ancora da chiarire e ulteriori studi saranno necessari a questo scopo, tenendo presente che MSH2 è uno dei target trascrizionali di p53 (Scherer et al., 2000) e che quest'ultima risulta fosforilata in presenza di tale proteina (Roos et al., 2006).

É noto inoltre che le proteine del sistema MMR siano implicate nell'attivazione dell'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M mediata da ATR/Chk1 (Stojic et al, 2004;

Beardsley et al., 2005; Yoshioka et al., 2006; Wang et al., 2003), nonché da ATM/Chk2 (Adamson et al., 2005). Altri studi, coinvolgono il sistema MMR nell'attivazione di segnali apoptotici in melanoma (Seifert et al., 2007) in seguito all'azione di raggi UVB. Sono noti diversi studi in cui si discute il coinvolgimento del sistema MMR nell'apoptosi mediata dall'agente terapeutico cisplatino, sia in cellule normali che cancerose. Il cisplatino infatti è un agente alchilante, il cui danno può essere riconosciuto dal sistema MMR. È stato ampiamente dimostrato che cellule deficienti in Mismatch Repair risultano resistenti all'apoptosi mediata dal cisplatino (Aebi et al., 1996; Drummond et al., 1996; Brown et al., 1997; Fink et al., 1997; Papouli et al., 2004) ma ci sono anche recenti studi che riportano risultati contrari. Ad esempio, Pani et al. (2007) mostrano come linee cellulari di cancro alle ovaie deficienti in MMR, siano più resistenti all'azione apoptotica del cisplatino se confrontate con cellule competenti in MMR. Inoltre, uno studio effettuato su pazienti malati di cancro al polmone, ha dimostrato che una più lunga sopravvivenza di pazienti trattati con cisplatino è strettamente correlata ad una minore espressione di MSH2, determinata istochimicamente su tessuti cancerosi (Kamal et al., 2010). È stato inoltre riportato che fattori appartenenti al MMR in melanoma, siano regolati dalla proteina oncogenica Myc. In particolare, la down-regolazione di Myc in cellule di melanoma, risulta in una ridotta espressione di MSH2 e MLH1 e in una maggiore apoptosi indotta da radiazioni ionizzanti (Bucci et al., 2003). Nel presente lavoro, sono riportati risultati simili che dimostrano come il silenziamento dell'oncogene iASPP, favorisca la riduzione dell'espressione di MSH2 risultando in un incremento dell'apoptosi mediata da cisplatino. La spiegazione di tale comportamento potrebbe essere che la riduzione di espressione e quindi di attività di MSH2 renda le cellule di melanoma meno capaci di riparare il danno dovuto sia alla normale replicazione del DNA durante il ciclo cellulare, sia provocato dal cisplatino, favorendo un accumulo di errori che la cellula non può più riparare e che favoriscono l'attivazione di segnali apoptotici. Resta tutt'ora da chiarire quali siano questi segnali apoptotici attivati e ulteriori studi saranno necessari anche per stabilire quale sia l'effetto sulla progressione del ciclo cellulare.

I risultati mostrati in questa tesi, rendono interessante l'approfondimento del ruolo che iASPP gioca nel melanoma con particolare attenzione al controllo del

Mismatch Repair da esso mediato. Il cross-talk fra iASPP-MSH2 ed eventualmente iASPP-MLH1 potrebbe essere un fattore da tenere in considerazione da un punto di vista terapeutico dal momento che la ridotta chemiosensibilità riscontrata in melanoma potrebbe anche essere addotta da un'elevata attività di riparo al DNA mediata dal MMR attraverso iASPP.

## 5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

ADAMSON AW, BEARDSLEY DI, KIM WJ, GAO Y, BASKARAN R, BROWN KD (2005). Methylator-induced, mismatch repair-dependent G2 arrest is activated through Chk1 and Chk2. *Mol Biol Cell*. 16(3):1513-26.

AEBI S, KURDI-HAIDAR B, GORDON R ET AL. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.*, 56, 3087–3090.

AGAMI R, BLANDINO G, OREN M, AND SHAUL Y (1999). Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 399 809-813

AHN JY, SCHWARZ JK, PIWNICA-WORMS H, CANMAN CE (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*. 60(21):5934-6.

ALVINO E, MARRA G, PAGANI E, FALCINELLI S, PEPPONI R, PERRERA C, HAIDER R, CASTIGLIA D, FERRANTI G, BONMASSAR E, JIRICNY J, ZAMBRUNO G, D'ATRI S (2002). High-frequency microsatellite instability is associated with defective DNA mismatch repair in human melanoma. *J Invest Dermatol*. 118(1):79-86.

ARMSTRONG BK, KRICKER A (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 63(1-3):8-18.

BALL NJ, YOHN JJ, MORELLI JG, NORRIS DA, GOLITZ LE, HOFFFLER (1994). JPRas mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Derm* 102(3):285-90,

BARRERA FN, POVEDA JA, GONZÁLEZ-ROS JM, NEIRA JL (2003). Binding of the C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 to lipid membranes. *J Biol Chem.* 278(47):46878-85.

BATAILLE V (2000). Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clinical and Exp Derm;* 25:464-470,

BEARDSLEY DI, KIM WJ, BROWN KD (2005). N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine activates cell-cycle arrest through distinct mechanisms activated in a dose-dependent manner. *Mol Pharmacol.* 68(4):1049-60

BELL HS AND RYAN KM (2008). iASPP inhibition: increased options in targeting the p53 family for cancer therapy. *Cancer Res* 68(13):4959-4962.

BERGAMASCHI D, GASCO M, HILLER L, SULLIVAN A, SYED N, TRIGIANTE G, YULUG I, MERLANO M, NUMICO G, COMINO A, ATTARD M, REELFS O, GUSTERSON B, BELL AK, HEATH V, TAVASSOLI M, FARRELL PJ, SMITH P, LU X, CROOK T (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 3(4):387-402.

BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, ÓNEIL NJ, TRIGIANTE G, CROOK T, HSIEH JK, ÓCONNOR DJ, ZHONG S, CAMPARGUE I, TOMLINSON ML, KUWABARA PE, LU X (2003). iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 33: 162-167

BERGAMASCHI D, SAMUELS Y, SULLIVAN A, ZVELEBIL M, BREYSSSENS H, BISSO A, DEL SAL G, SYED N, SMITH P, GASCO M, CROOK T, LU X (2006). iASPP preferentially binds the proline rich region of p53 and modulates the apoptotic function of codon 72 polymorphic p53. *Nat Genet* 38: 1133–1141.

BHATTACHARYYA NP, SKANDALIS A, GANESH A, GRODEN J, MEUTH M (1994). Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(14):6319-23.

BOLAND CR, KOI M, CHANG DK, CARETHERS JM (2008). The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*.7(1):41-52.

BROWN KM, MACGREGOR S, MONTGOMERY GW, CRAIG DW, ZHAO ZZ, IYADURAI K, HENDERS AK, HOMER N, CAMPBELL MJ, STARK M, THOMAS S, SCHMID H, HOLLAND EA, GILLANDERS EM, DUFFY DL, MASKIELL JA, JETANN J, FERGUSON M, STEPHAN DA, CUST AE, WHITEMAN D, GREEN A, OLSSON H, PUIG S, GHIORZO P, HANSSON J, DEMENAIS F, GOLDSTEIN AM, GRUIS NA, ELDER DE, BISHOP JN, KEFFORD RF, GILES GG, ARMSTRONG BK, AITKEN JF, HOPPER JL, MARTIN NG, TRENT JM, MANN GJ, HAYWARD NK (2008). Common sequence variants on 20q11.22 confer melanoma susceptibility. *Nat Genet*. 40(7):838-40.

BROWN R, HIRST GL, GALLAGHER WM, MCILWRATH AJ, MARGISON GP, VAN DER ZEE AG AND ANTHONY DA (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* 15, 45–52.

BUCCI B, D'AGNANO I, AMENDOLA D, CITTI A, RAZA GH, MICELI R, DE PAULA U, MARCHESE R, ALBINI S, FELSANI A, BRUNETTI E, VECCHIONE A (2005) Myc down-regulation sensitizes melanoma cells to radiotherapy by inhibiting MLH1 and MSH2 mismatch repair proteins. *Clin Cancer Res*.11(7):2756-67.

CASTRILLI G, FABIANO A, LA TORRE G, MARIGO L, PIANTELLI C, PERFETTI G, RANELLETTI FO, PIANTELLI M (2002). Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. Apr;31(4):234-8.

CERRONI L, SOYER HP AND KERL H (1995). bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 17(1):7-11.

CHRISTMANN M, TOMICIC MT AND KAINA B (2002) Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutS $\alpha$  mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res.* 30(9): 1959-1966.

CLARK WH JR, ELDER DE, GUERRY DT, EPSTEIN MN, GREENE MH, VAN HORN M (1984) A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 15:1147-65.

COBLEIGH MA, TABESH B, BITTERMAN P, BAKER J, CRONIN M, LIU ML, BORCHIK R, MOSQUERA JM, WALKER MG, SHAK S (2005). Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res.* 11(24 Pt 1):8623-31.

DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, et al (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-954.

DAVIS TW, WILSON-VAN PATTEN C, MEYERS M, KUNUGI KA, CUTHILL S, REZNIKOFF C, GARCES C, BOLAND CR, KINSELLA TJ, FISHEL R, BOOTHMAN DA (1998). Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res.* 58(4):767-78.

DE LAURENZI V, MELINO G (2000). Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci.*;926:90-100.

DHAWAN P AND RICHMOND A (2002). A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells. *J Biol Chem* 277(10):7920-7928.

DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY CA JR, BUTEL JS, BRADLEY A (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

DRUMMOND JT, ANTHONY A, BROWN R AND MODRICH P (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLalpha and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J. Biol. Chem.* 271, 19645–19648.

DUCKETT DR, BRONSTEIN SM, TAYA Y, MODRICH P (1999). hMutSalpha- and hMutLalpha-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22):12384-8.

FANG D, NGUYEN TK, LEISHEAR K, FINKO R, KULP AN, HOTZ S, VAN BELLE PA, XU X, ELDER DE, HERLYN M (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65(20):9328-37.

FAYOLLE , POURCHET J, CARON DE FROMENTEL C, PUISIEUX A, DORÉ J, VOELTZEL T (2008). Gadd45a Activation Protects Melanoma Cells from Ultraviolet B-Induced Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* 128, 196–202.

FINK D, ZHENG H, NEBELS, NORRIS PS, AEBI S, LIN TP, NEHME A, CHRISTEN RD, HAAS M, MACLEOD CL AND HOWEL SB (1997). In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.*, 57, 1841–1845.

GANDINI S, SERA F, CATTARUZZA MS, PASQUINI P, PICCONI O, BOYLE P AND MELCHI CF (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41(1):45-60.

GOLDSTEIN AM, CHAN M, HARLAND M, HAYWARD NK, DEMENAI S, BISHOP DT, AZIZI E, BERGMAN W, BIANCHI-SCARRA G, BRUNO W, CALISTA D, ALBRIGHT LA, CHAUDRU V, CHOMPRET A, CUELLAR F, ELDER DE, GHIORZO P, GILLANDERS EM, GRUIS NA, HANSSON J, HOGG D, HOLLAND EA, KANETSKY PA, KEFFORD RF, LANDI MT, LANG J, LEACHMAN SA, MACKIE RM, MAGNUSSON V, MANN GJ, BISHOP JN, PALMER JM, PUIG S, PUIG-BUTILLE JA, STARK M, TSAO H, TUCKER MA, WHITAKER L, YAKOBSON E (2007) Features associated with germline CDKN2A

mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 44(2):99-106.

GONG J, COSTANZO A, YANG H-Q, MELINO G, KAE LIN WG, LEVRERO M AND WANG JYJ (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 399:806-809

GORDEN A, OSMAN I, GAI W, HE D, HUANG W, DAVIDSON A, HOUGHTON AN, BUSAM K, POLSKY D (2003). Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Research*, 15;63(14):3955-7.

GORINA, S., AND N. P. PAVLETICH (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 274:1001-1005.

GREEN AC, WILLIAMS GM (2007). Point: sunscreen use is a safe and effective approach to skin cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Oct;16(10):1921-2.

GUDBJARTSSON DF, SULEM P, STACEY SN, GOLDSTEIN AM, RAFNAR T, SIGURGEIRSSON B, BENEDIKTSDOTTIR KR, THORISDOTTIR K, RAGNARSSON R, SVEINSDOTTIR SG, MAGNUSSON V, LINDBLOM A, KOSTULAS K, BOTELLA-ESTRADA R, SORIANO V, JUBERÍAS P, GRASA M, SAEZ B, ANDRES R, SCHERER D, RUDNAI P, GURZAU E, KOPPOVA K, KIEMENEY LA, JAKOBSDOTTIR M, STEINBERG S, HELGASON A, GRETARSDOTTIR S, TUCKER MA, MAYORDOMO JI, NAGORE E, KUMAR R, HANSSON J, OLAFSSON JH, GULCHER J, KONG A, THORSTEINSDOTTIR U, STEFANSSON K (2008). ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet* 40(7):886-91.

GULDBERG P, THOR STRATEN P, BIRCK A, AHRENKIEL V, KIRKIN AF, ZEUTHEN J (1997). Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res.* 1, 57(17):3660-3.

HAMID AA, MANDAI M, KONISHI I, NANBU K, TSURUTA Y, KUSAKARI T, KARIYA M, KITA M, FUJII S (2002). Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma. *Cancer*. 94(4):997-1005.

HARLAND M, TAYLOR CF, CHAMBERS PA, KUKALIZCH K, RANDERSON-MOOR JA, GRUIS NA, DE SNOO FA, TER HUURNE JA, GOLDSTEIN AM, TUCKER MA, BISHOP DT, BISHOP JA (2005). A mutation hotspot at the p14ARF splice site. *Oncogene* 30;24(28):4604-4608.

HARVEY M, VOGEL H, MORRIS D, BRADLEY A, BERNSTEIN A, DONEHOWER LA (1995). A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genet.* 9, 305–311,

HERNANDEZ-PIGEON H, LAURENT G, HUMBERT O, SALLES B, LAUTIER D. (2004) Degradation of mismatch repair hMutSalph heterodimer by the ubiquitin-proteasome pathway. *FEBS Lett.* 562(1-3):40-4.

HERNANDEZ-PIGEON H, QUILLET-MARY A, LOUAT T, SCHAMBOURG A, HUMBERT O, SELVES J, SALLES B, LAURENT G, LAUTIER D (2005). hMutS alpha is protected from ubiquitin-proteasome-dependent degradation by atypical protein kinase C zeta phosphorylation. *J Mol Biol.* 348(1):63-74.

HERNBERG M, TURUNEN JP, VON BOGUSLAWSKY K, MUHONEN T, PYRHÖNEN S (1998). Prognostic value of biomarkers in malignant melanoma. *Melanoma Res* 8(3):283-91.

HERRON BJ, RAO C, LIU S, LAPRADE L, RICHARDSON JA, OLIVIERI E, SEMSARIAN C, MILLAR SE, STUBBS L, BEIER DR (2005). A mutation in NFkB interacting protein 1 results in cardiomyopathy and abnormal skin development in wa3 mice. *Hum Mol Genet.* 14(5):667-77.

HOEGE C, PFANDER B, MOLDOVAN GL, PYROWOLAKIS G, JENTSCH S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. 419(6903):135-41.

HUSSEIN MR, ROGGERO E, SUDILOVSKY EC, TUTHILL RJ, WOOD GS, SUDILOVSKY O (2001). Alterations of mismatch repair protein expression in benign melanocytic nevi, melanocytic dysplastic nevi, and cutaneous malignant melanomas. *Am J Dermatopathol*. 23(4):308-14.

HUSSEIN MR, WOOD GS .(2003). hMLH1 and hMSH2 gene mutations are present in radial growth-phase cutaneous malignant melanoma cell lines and can be induced further by ultraviolet-B irradiation. *Exp Dermatol*. 12(6):872-5.

JEAN S, BIDEAU C, BELLON L, HALIMI G, DE MEO M, ORSIERE T, DUMENIL G, BERGE-LEFRANC JL AND BOTTA A (2001). The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365 nm UVA: study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* 1522(2):89-96.

JIRICNY J. (2006).The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(5):335-46.

JOHNSTON JA, WARD CL, KOPITO RR (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 143(7):1883-98.

KAGHAD M, BONNET H, YANG A, CREANCIER L, BISCAN JC, VALENT A, MINTY A, CHALON P, LELIAS JM, DUMONT X, FERRARA P, MCKEON F, CAPUT D (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 90(4):809-19.

KAMAL NS, SORIA JC, MENDIBOURE J, PLANCHARD D, OLAUSSEN KA, ROUSSEAU V, POPPER H, PIRKER R, BERTRAND P, DUNANT A, LE CHEVALIER T, FILIPITS M, FOURET P (2010). MutS homologue 2 and the long-term benefit of adjuvant chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 16(4):1206-15.

KARST AM, DAI DL, MARTINKA M, LI G (2005). PUMA expression is significantly reduced in human cutaneous melanomas. *Oncogene*. 3;24(6):1111-6.

KAUFFMANN A, ROSSELLI F, LAZAR V, WINNEPENNINCKX V, MANSUET-LUPO A, DESSEN P, VAN DEN OORD JJ, SPATZ A, SARASIN A. (2008 ) High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. *Oncogene*. 27(5):565-73

KENNEDY C, TER HUURNE J, BERKHOUT M, GRUIS N, BASTIAENS M, BERGMAN W, WILLEMZE R, BAVINCK JN (2001). Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 117(2):294-300.

KORABIOWSKA M, BRINCK U, DENGLER H, STACHURA J, SCHAUER A AND DROESE M (2000). Analysis of the DNA mismatch repair proteins expression in malignant melanomas. *Anticancer Res* 20:4499–4505

KORABIOWSKA M, KONIG F, VERHEGGEN R, SCHLOTT T, CORDON-CARDO C, ROMEIKE B AND BRINCK U (2004). Altered expression and new mutations in DNA mismatch repair genes MLH1 and MSH2 in melanoma brain metastases. *Anticancer Res* 24:981–986.

LANDI MT, BAUER J, PFEIFFER RM, ELDER DE, HULLEY B, MINGHETTI P, CALISTA D, KANETSKY PA, PINKEL D, BASTIAN BC (2006). MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science*. 8;313(5786):521-2.

LANDI MT, KANETSKY PA, TSANG S, GOLD B, MUNROE D, REBBECK T, SWOYER J, TER-MINASSIAN M, HEDAYATI M, GROSSMAN L, GOLDSTEIN AM, CALISTA D, PFEIFFER RM (2005). MC1R, ASIP, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. *J Natl Cancer Inst*. 97(13):998-1007.

LASKA MJ, LOWE SW, ZENDER L, HEARN S, VOGEL U, JENSEN UB, BRIC A, NEXØ BA (2009) Enforced expression of PPP1R13L increases tumorigenesis and invasion through p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Mol Carcinog.*48(9):832-42.

LASKA MJ, VOGEL UB, JENSEN UB, NEXØ BA (2010). p53 and PPP1R13L (alias iASPP or RAI) form a feedback loop to regulate genotoxic stress responses. *Biochim Biophys Acta.*[Epub ahead of print].

LEACH FS, HSIEH JT, MOLBERG K, SABOORIAN MH, MCCONNELL JD, SAGALOWSKY AI (2000). Expression of the human mismatch repair gene hMSH2: a potential marker for urothelial malignancy. *Cancer.* 88(10):2333-41.

LEACH FS, POLYAK K, BURRELL M, JOHNSON KA, HILL D, DUNLOP MG, WYLLIE AH, PELTOMAKI P, DE LA CHAPELLE A, HAMILTON SR, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (1996). Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 56(2):235-40.

LEVRERO M, DE LAURENZI V, COSTANZO A, GONG J, WANG JY, MELINO G (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 10):1661-70.

LI GM (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research* 18:85-98.

LI LS, MORALES JC, HWANG A, WAGNER MW, BOOTHMAN DA(2008) DNA Mismatch Repair-dependent Activation of c-Abl/p73 $\alpha$ /GADD45 $\alpha$ -mediated Apoptosis. *J Biol Chem.* 283(31): 21394–21403.

LIU H, WANG M, DIAO S, RAO Q, ZHANG X, XING H, WANG J. (2009). siRNA-mediated down-regulation of iASPP promotes apoptosis induced by etoposide and daunorubicin in leukemia cells expressing wild-type p53. *Leuk Res.* 33(9):1243-8.

LIU WK, JIANG XY, REN JK, ZHANG ZX (2010). Expression pattern of the ASPP family members in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Onkologie*.;33(10):500-3.

LIU Y, FANG Y, SHAO H, LINDSEY-BOLTZ L, SANCAR A, MODRICH P (2010). Interactions of human mismatch repair proteins MutSalpha and MutLalpha with proteins of the ATR-Chk1 pathway. *J Biol Chem*. 285(8):5974-82.

LIU ZJ, CAI Y, HOU L, GAO X, XIN HM, LU X, ZHONG S, GU SZ, CHEN J (2008). Effect of RNA interference of iASPP on the apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Invest*. 26(9):878-82.

LIU ZJ, CAI Y, HOU L, GAO X, XIN HM, LU X, ZHONG S, GU SZ, CHEN J (2008). Effect of RNA interference of iASPP on the apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Invest*. 26(9):878-82.

LOSSOS IS, NATKUNAM Y, LEVY R, LOPEZ CD (2002).Apoptosis stimulating protein of p53 (ASPP2) expression differs in diffuse large B-cell and follicular center lymphoma: correlation with clinical outcome. *Leuk Lymphoma*. 43(12):2309-17.

LU B, GUO H, ZHAO J, WANG C, WU G, PANG M, TONG X, BU F, LIANG A, HOU S, FAN X, DAI J, WANG H, GUO Y (2010) Increased Expression of iASPP, Regulated by Hepatitis B Virus X Protein-Mediated NF-kappaB Activation, in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. Jun 20 Epub ahead of print.

LUCAS R (2006) Global Burden of Disease of Solar Ultraviolet Radiation, Environmental Burden of Disease Series, July 25, 2006; No. 13. *News release*, World Health Organization

MALKIN D (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. Apr;66(2):83-92.

MARANI C, ALVINO E, CAPORALI S, VIGILI MG, MANCINI G, RAHIMI S (2007). DNA mismatch repair protein expression and microsatellite instability in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Histopathology*. 50(6):780-8.

MARRA G, CHANG CL, LAGHI LA, CHAUHAN DP, YOUNG D, BOLAND CR (1996) Expression of human MutS homolog 2 (hMSH2) protein in resting and proliferating cells. *Oncogene*. 13(10):2189-96.

MATSUOKA S, HUANG M, ELLEDGE SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395):1893-7.

MATSUOKA S, ROTMAN G, OGAWA A, SHILOH Y, TAMAI K, ELLEDGE SJ (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(19):10389-94.

MCNULTY SE., TOHIDIAN NB AND MEYSKENS FL, Jr. (2001). RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B. *Pigment Cell Res* 14(6):456-465.

MEYSKENS FL JR., BUCKMEIER JA, MCNULTY SE AND TOHIDIAN NB (1999). Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress. *Clin Cancer Res* 5(5):1197-1202.

MICHALOGLOU C, VREDEVELD LC, MOOI WJ, PEEPER DS (2008). BRAF (E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 27(7):877-95.

MILLER A J AND MIHM MC, Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med* 355(1):51-65.

MODRICH P (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem*. 281(41):30305-9.

MONZANI E, FACCHETTI F, GALMOZZI E, CORSINI E, BENETTI A, CAVAZZIN C, GRITTI A, PICCININI A, PORRO D, SANTINAMI M, INVERNICI G, PARATI E, ALESSANDRI G, LA PORTA CA (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*. 43(5):935-46.

MOONEY EE, RUIS PERIS JM, ÓNEILL A, SWEENEY EC (1995). Apoptotic and mitotic indices in malignant melanoma and basal cell carcinoma. *J Clin Pathol* Mar;48(3):242-4.

MORI T, OKAMOTO H, TAKAHASHI N, UEDA R, OKAMOTO T (2000). Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines. *FEBS Lett.* Jan 14;465(2-3):124-8.

MORIS, ITO G, USAMI N, YOSHIOKA H, UEDA Y, KODAMA Y, TAKAHASHI M, FONG KM, SHIMOKATA K AND SEKIDO Y (2004). p53 apoptotic pathway molecules are frequently and simultaneously altered in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 100(8):1673-1682.

NAUMANN SC, ROOS WP, JÖST E, BELOHLAVEK C, LENNERZ V, SCHMIDT CW, CHRISTMANN M, KAINA B. (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer.* 100(2):322-33.

NAUMOVSKI L, CLEARY ML (1996) The p53-binding protein 53BP2 also interacts with bcl2 and impedes cell cycle progression at G2/M. *Mol Cell Biol* 16: 3884–3892.

NEXØ BA, VOGEL U, OLSEN A, KETELSEN T, BUKOWY Z, THOMSEN BL, WALLIN H, OVERVAD K, TJØNNELAND A (2003). A specific haplotype of single nucleotide polymorphisms on chromosome 19q13.2-3 encompassing the gene RAI is indicative of post-menopausal breast cancer before age 55. *Carcinogenesis.* 24(5):899-904.

NISHIMURA EK, GRANTER SR, FISHER DE. (2005). Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science.* 307(5710):720-4.

PALMER JS, DUFFY DL, BOX NF, AITKEN JF, ÓGORMAN LE, GREEN AC, HAYWARD NK, MARTIN NG, STURM RA (2000): Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet, Jan;66(1):176-86.*

PAPOULI E, CEJKA P AND JIRICNY J (2004). Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res.*, 64, 3391–3394.

PAPP T, JAFARI M, SCHIFFMANN D (1996) Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions. *J Cancer Res Clin Oncol.* 122(9):541-548.

PARSONS R, LI GM, LONGLEY MJ, FANG WH, PAPADOPOULOS N, JEN J, DE LA CHAPELLE A, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, MODRICH P (1993). Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell.* 75(6):1227-36.

PEPPONI R, MARRA G, FUGGETTA MP, FALCINELLI S, PAGANI E, BONMASSAR E, JIRICNY J, D'ATRI S. (2003). The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 304(2):661-8.

PETERS AC, YOUNG LC, MAEDA T, TRON VA, ANDREW SE (2003). Mammalian DNA mismatch repair protects cells from UVB-induced DNA damage by facilitating apoptosis and p53 activation. *DNA Repair (Amst).* 2(4):427-35.

POLLOCK , PM, HARPER, UL, HANSEN, KS et al (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33: 19–20.

RAIMONDI S, SERA F, GANDINI S, IODICE S, CAINI S, MAISONNEUVE P, FARGNOLI MC (2008). MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 122(12):2753-60.

RASS K, GUTWEIN P, WELTER C, MEINEKE V, TILGEN W, REICHRATH J (2001). DNA mismatch repair enzyme hMSH2 in malignant melanoma: increased immunoreactivity as compared to acquired melanocytic nevi and strong mRNA expression in melanoma cell lines. *Histochem J.* 33(8):459-67.

ROBINSON RA, LU X, JONES EY, SIEBOLD C (2008). Biochemical and structural studies of ASPP proteins reveal differential binding to p53, p63, and p73. *Structure*. 16(2):259-68.

ROOS WP AND KAINA B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 12(9):440-50.

RÜNGER TM, EMMERT S, SCHADENDORF D, DIEM C, EPE B, HELLFRITSCH D. (2000). Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol*. 114(1):34-9.

RÜNGER TM, EMMERT S, SCHADENDORF D, DIEM C, EPE B, HELLFRITSCH D. (2000). Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide. *J Invest Dermatol*. 114(1):34-9.

SAEBØ M, SKJELBRED CF, NEXØ BA, WALLIN H, HANSTEEN IL, VOGEL U, KURE EH (2006). Increased mRNA expression levels of ERCC1, OGG1 and RAI in colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer*. Aug 16;6:208.

SAMUELS-LEV Y, ÓCONNOR DJ, BERGAMASCHI D, TRIGIANTE G, HSIEH JK., ZHONG S, CAMPARGUE I, NAUMOVSKI L, CROOK T AND LU X (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8(4):781-794.

SCHERER SJ, MAIER SM, SEIFERT M, HANSELMANN RG, ZANG KD, MULLER-HERMELINK HK, ANGEL P, WELTER C, SCHARTL M (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* 275(48):37469-73.

SCHERER SJ, MAIER SM, SEIFERT M, HANSELMANN RG, ZANG KD, MULLER-HERMELINK HK, ANGEL P, WELTER C, SCHARTL M (2000). p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* 275(48):37469-73.

SCHMALE H, BAMBERGER C (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene*. 15(11):1363-7.

SEIFERT M, SCHERER SJ, EDELMANN W, BÖHM M, MEINEKE V, LÖBRICH M, TILGEN W, REICHRATH J (2008). The DNA-mismatch repair enzyme hMSH2 modulates UV-B-induced cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 128(1):203-13.

SELZER E, SCHLAGBAUER-WADL H, OKAMOTO I, PEHAMBERGER H, POTTER R AND JANSEN B (1998). Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 8(3):197-203.

SHIMODAIRA H, YOSHIOKA-YAMASHITA A, KOLODNER RD, WANG JY (2003). Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5): 2420-2425.

SLEE EA, GILLOTIN S, BERGAMASCHI D, ROYER C, LLANOS S, ALI S, JIN B, TRIGIANTE G, LU X (2004). The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization. *Oncogene*. 2004 23(56):9007-16.

SOENGAS MS, CAPODIECI P, POLSKY D, MORA J, ESTELLER M, OPITZ-ARAYA X, MCCOMBIE R, HERMAN JG, GERALD WL, LAZEBNIK YA, CORDÓN-CARDÓ C, LOWE SW (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 11;409(6817):207-11.

SPARROW LE, ENGLISH DR, HEENAN PJ, DAWKINS HJ, TARAN J (1995). Prognostic significance of p53 over-expression in thin melanomas. *Melanoma Res*. 5(6):387-92.

SRIVASTAVA T, CHATTOPADHYAY P, MAHAPATRA AK, SARKAR C, SINHA S (2004). Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 66(1-2):51-7.

STOJIC L, MOJAS N, CEJKA P, DI PIETRO M, FERRARI S, MARRA G, JIRICNY J (2004). Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Dev.* 18(11):1331-44.

SULLIVAN A, LU X (2007). ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer.* 96(2):196-200

TAKADA N, SANDA T, OKAMOTO H, YANG JP, ASAMITSU K, SAROL L, KIMURA G, URANISHI H, TETSUKA T, OKAMOTO T. (2002) RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF-kappaB and Sp1 actions. *J Virol.* 76(16):8019-30

TANG L, TRON VA, REED JC, MAH KJ, KRAJEWSKA M, LI G, ZHOU X, HO VC and Trotter MJ (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4(8):1865-1871.

TERZIAN T, TORCHIA EC, DAI D, ROBINSON SE, MURAO K, STIEGMANN RA, GONZALEZ V, BOYLE GM, POWELL MB, POLLOCK P, LOZANO G, ROBINSON WA, ROOP DR, BOX NF (2010). p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 [Epub ahead of print]

TOPCZEWSKA JM, POSTOVIT LM, MARGARYAN NV, SAM A, HESS AR, WHEATON WW, NICKOLOFF BJ, TOPCZEWSKI J, HENDRIX MJ (2006). Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med.* 12(8):925-32.

VAN'T VEER LJ, BURGERING BM, VERSTEEG R, BOOT AJ, RUITER DJ, OSANTO S, SCHRIER PI, BOS JL (1989): N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol* 9:3114-3116.

VAN-ELSAS A, ZERP S, VAN-DER-FLIER S, KRUSE-WOLTERS M, VACCA A, RUITER DJ, SCHRIER P (1995) Analysis of N-ras mutations in human cutaneous

melanoma: tumor heterogeneity detected by polymerase chain reaction/single-stranded conformation polymorphism analysis. *Recent Results Cancer Res* 139:57-67.

VAN-ELSAS A, ZERP SF, VAN-DER-FLIER S, et al (1996). Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 149:883-893.

VOGEL U, SØRENSEN M, HANSEN RD, TJØNNELAND A, OVERVAD K, WALLIN H, NEXØ BA, RAASCHOU-NIELSEN O (2007). Gene-environment interactions between smoking and a haplotype of RAI, ASE-1 and ERCC1 polymorphisms among women in relation to risk of lung cancer in a population-based study. *Cancer Lett.* 247(1):159-65.

VOUSDEN KH, LU X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2(8):594-604

WAN PT (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell,* 19;116(6):764-6.

WANG Y AND QIN J (2003) MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26):15387-92

WANG Y, QIN J (2003). MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(26):15387-92

WHITE E AND LOWE SW (2009): Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev.* 23, 784–787.

YANG J AND RICHMOND A (2001). Constitutive I $\kappa$ B kinase activity correlates with nuclear factor- $\kappa$ B activation in human melanoma cells. *Cancer Res* 61(12):4901-4909.

YANG JP, HORI M, SANDA T, OKAMOTO T (1999). Identification of a novel inhibitor of nuclear factor-kappaB, RelA-associated inhibitor. *J Biol Chem.* May 28;274(22):15662-70.

YANG J-P, HORI M, TAKAHASHI N, KAWABE T, KATO H, OKAMOTO T (1999). NFkB subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene* 18: 5177–5186

YOSHIOKA K, YOSHIOKA Y, HSIEH P (2006). ATR kinase activation mediated by MutSalpha and MutLalpha in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. *Mol Cell.* 22(4):501-10.

YOUNG LC, PETERS AC, MAEDA T, EDELMANN W, KUCHERLAPATI R, ANDREW SE, TRON VA (2003). DNA mismatch repair protein Msh6 is required for optimal levels of ultraviolet-B-induced apoptosis in primary mouse fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 121(4):876-80.

YOUNG LC, THULIEN KJ, CAMPBELL MR, TRON VA, ANDREW SE (2004). DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an in vivo study. *Carcinogenesis.* 25(10):1821-7.

YUAN ZM, SHIOYA H, ISHIKO T, SUN X, GU J, HUANG Y, LU H, KHARBANDA S, WEICHSELBAUM R, AND KUFU D. (1999) p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399:814-817.

ZHANG H, RICHARDS B, WILSON T, LLOYD M, CRANSTON A, THORBURN A, FISHEL R, MEUTH M (1999). Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res.* 59(13):3021-7.

ZHANG X, WANG M, ZHOU C, CHEN S, WANG J. (2005). The expression of iASPP in acute leukemias. *Leuk Res* 29(2):179-83.

# 6.PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSI

## 6.1. Pubblicazioni inerenti al lavoro di tesi.

CHIKH A, MATIN RNH, **SENATORE V**, LAVERY D, RAIMONDI C, OSTANO P, BHATA A, KHALAF S, BRAUN KM, CHIORINO G, HARWOOD A AND BERGAMASCHI D. iASPP/p63 auto-regulatory feedback loop is essential for epithelial integrity. (submitted).

MATIN RNH, CHIKH A, **SENATORE V**, CHIORINO G, MESHER D, LEIGH IM, PROBY CM, MELINO G, HARWOOD CA & BERGAMASCHI D. Oncogenic p63 in melanoma. (in preparation)

## 6.2. Partecipazioni a congressi

**SENATORE V**, CHIKH A, GENCHI G AND BERGAMASCHI D (2010): iASPP involvement in DNA repair in melanoma. *William Harvey Day 2010*, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, 26<sup>th</sup> Oct 2010 London (UK).

CHIKH A, **SENATORE V**, MATIN RNH AND BERGAMASCHI D (2010): iASPP/p63 auto-regulatory feedback loop is essential for epithelial integrity and autophagy. *William Harvey Day 2010*, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, 26<sup>th</sup> Oct 2010 London (UK).

**SENATORE V, GENCHI G AND BERGAMASCHI D:** p53 polymorphism at codon 72: apoptosis and DNA repair in melanoma (2009). In “*XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine*” 21-22 maggio 2009 Parghelia (VV, Italy).

### **6.3. Altre pubblicazioni**

**SENATORE V, CIONE E, GNONI A, GENCHI G** (2010). Retinoylation reactions are inversely related to the cardiolipin level in testes mitochondria from hypothyroid rats...*J Bioenerg Biomembr.* 42(4):321-8.

PINGITORE A, CIONE E, **SENATORE V, GENCHI G.** (2009). Adrenal glands and testes as steroidogenic tissue are affected by retinoylation reaction. *J Bioenerg Biomembr.* Jun;41(3):215-21.

CIONE E, TUCCI P, **SENATORE V, PERRI M, TROMBINO S, IEMMA F, PICCINI, GENCHI G.** (2008). Synthesized esters of ferulic acid induce release of cytochrome c from rat testes mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 40(1):19-26.

CIONE E, **SENATORE V, TUCCI P, GIUDETTI AM, GENCHI F, GNONI GV, GENCHI G.** (2007). Dietary fatty acid composition differently influences retinoylation reaction in rat testes mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 39(2):203-9.