

RADIOBIOLOGIA (AA 2010-2011)

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
Facoltà di Medicina e Chirurgia
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN FISICA MEDICA**

Prof. Mauro Belli

mauro.belli@iss.it mauro.belli@iss.infn.it

mau.belli1@gmail.com

**Parte 7
Rivelazione e misura delle DSB sul DNA cellulare**

Metodi di rivelazione delle DSB nel DNA cellulare

I principali metodi usati per la rivelazione e la misura delle DSB in DNA di alto peso molecolare (DNA cellulare) sono:

- Centrifugazione in gradiente di densità di saccarosio
- Elettroforesi a campo continuo (CFGE) o a campo pulsato (PFGE) con analisi della frazione rilasciata totale o con conteggio dei frammenti
- Determinazione con immunofluorescenza dell'istone fosforilato γ -H2AX

Misura del PM o della lunghezza dei frammenti

Misura di nDSB dalle dimensioni dei frammenti (1)

Molecole inizialmente tutte della stessa dimensione M_0
sulla quale sono prodotti n tagli equidistanti



Posto :

massa di ciascun frammento = M

si ha:

numero di frammenti = M_0/M

n_{DSB} = numero di tagli = numero di frammenti – 1

$$n_{DSB} = M_0/M - 1 \qquad n_{DSB} = M_0 \left(\frac{1}{M} - \frac{1}{M_0} \right)$$

Numero di tagli per unità di massa del bersaglio = $\frac{n_{DSB}}{M_0} = \frac{1}{M} - \frac{1}{M_0}$

Misura di nDSB dalle dimensioni dei frammenti (2)

Molecole inizialmente tutte della stessa dimensione M_0
sulla quale sono prodotti n tagli in posizione qualsiasi



Posto :

massa media di ciascun frammento = $\langle M \rangle = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum n_i}$

si ha:

numero di frammenti = $M_0 / \langle M \rangle$

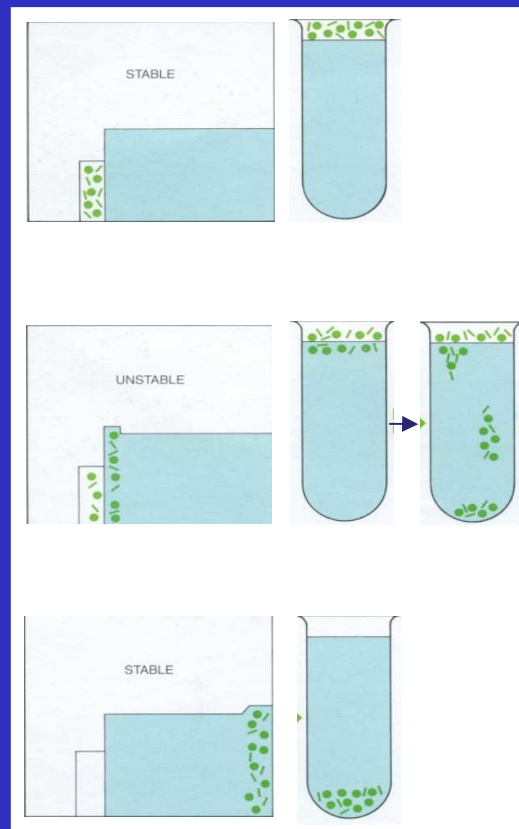
n_{DSB} = numero di tagli = numero di frammenti - 1

$$n_{DSB} = M_0 / \langle M \rangle - 1 \qquad n_{DSB} = M_0 \left(\frac{1}{\langle M \rangle} - \frac{1}{M_0} \right)$$

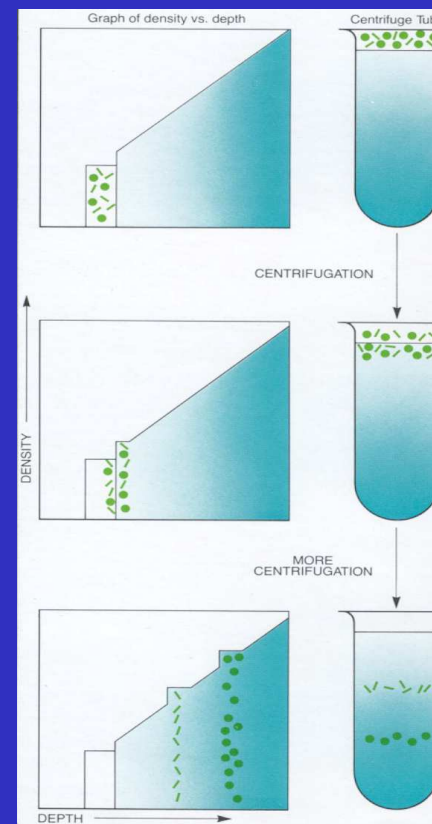
$$\text{Numero di tagli per unità di massa del bersaglio} = \frac{n_{DSB}}{M_0} = \frac{1}{\langle M \rangle} - \frac{1}{M_0}$$

Centrifugazione in gradiente di densità di saccarosio

senza gradiente



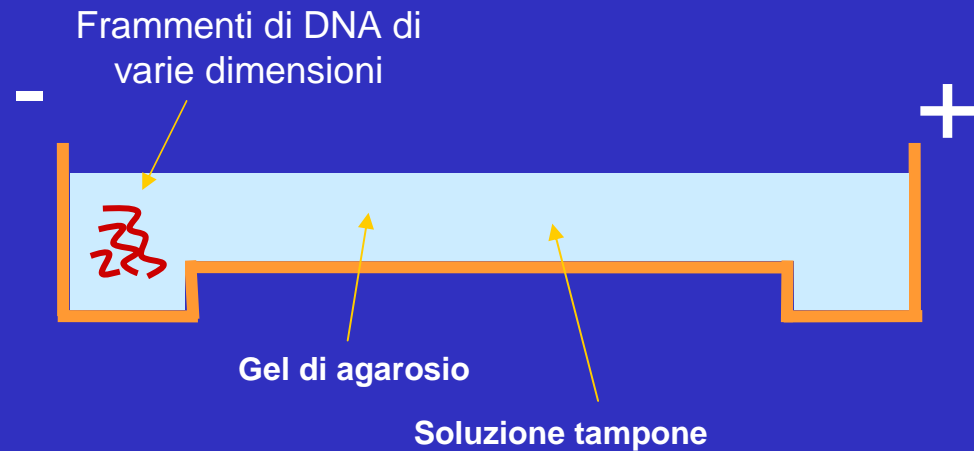
con gradiente



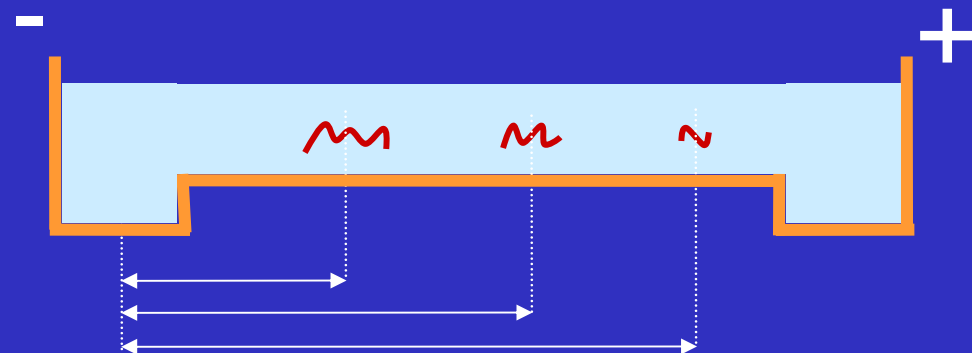
Il principio dell'elettroforesi su gel del DNA

Il DNA è un polielettrolita anionico
(carico negativamente per la
presenza dei gruppi fosfati)

inizio elettroforesi



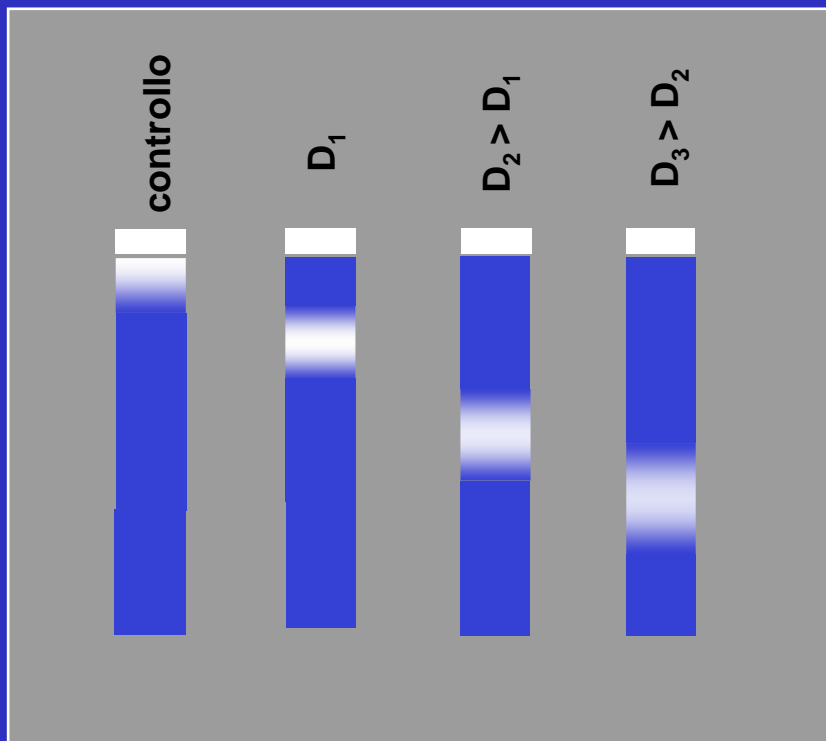
fine elettroforesi



I frammenti piccoli percorrono maggiori distanze di quelli grandi

L'elettroforesi a campo costante (CFGE)

Gel di agarosio dopo l'elettroforesi



Il DNA è visualizzato:

- con coloranti fluorescenti specifici per la doppia elica, oppure
- con marcatura radioattiva (le cellule sono precubate con timidina marcata con H-3 o C-14)

La misura della distribuzione dei frammenti richiede una calibrazione con marker di DNA di dimensioni note

L'elettroforesi a campo costante (CFGE) separa i frammenti in base alla loro massa solo se essi non superano dimensioni dell'ordine delle kbp

L'elettroforesi a campo costante (CFGE)

La mobilità del DNA nella CFGE è inversamente proporzionale alle sue dimensioni (PM).

Al di sopra di certe dimensioni limite, che dipendono dalle caratteristiche del gel (concentrazione) e dal campo elettrico, tutte le molecole hanno la stessa mobilità.

In pratica l'elettroforesi a campo costante (CFGE) separa i frammenti di DNA in base alla loro massa solo se essi non superano dimensioni dell'ordine delle kbp

La CFGE può essere utilizzata:

- per DNA molto frammentato, a seguito di esposizione ad altissime dosi,
- per studiare la formazione di frammenti in un intervallo di piccoli PM
- per avere informazioni sul valore medio del n. di frammenti misurando la massa di DNA totale che entra nel gel. Ciò è possibile a condizione che la frammentazione si possa ritenere casuale (modello “randomly broken stick”)

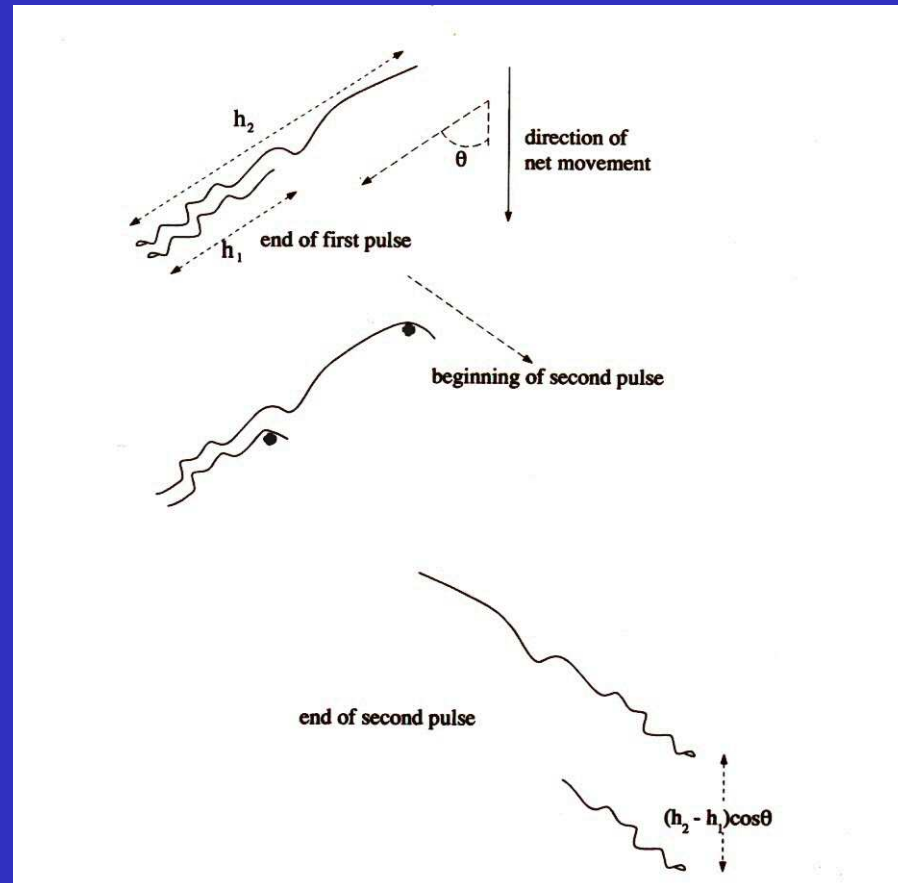
L'elettroforesi a campo pulsato

È usata per separare frammenti di DNA ad alto PM (DNA poco frammentato)

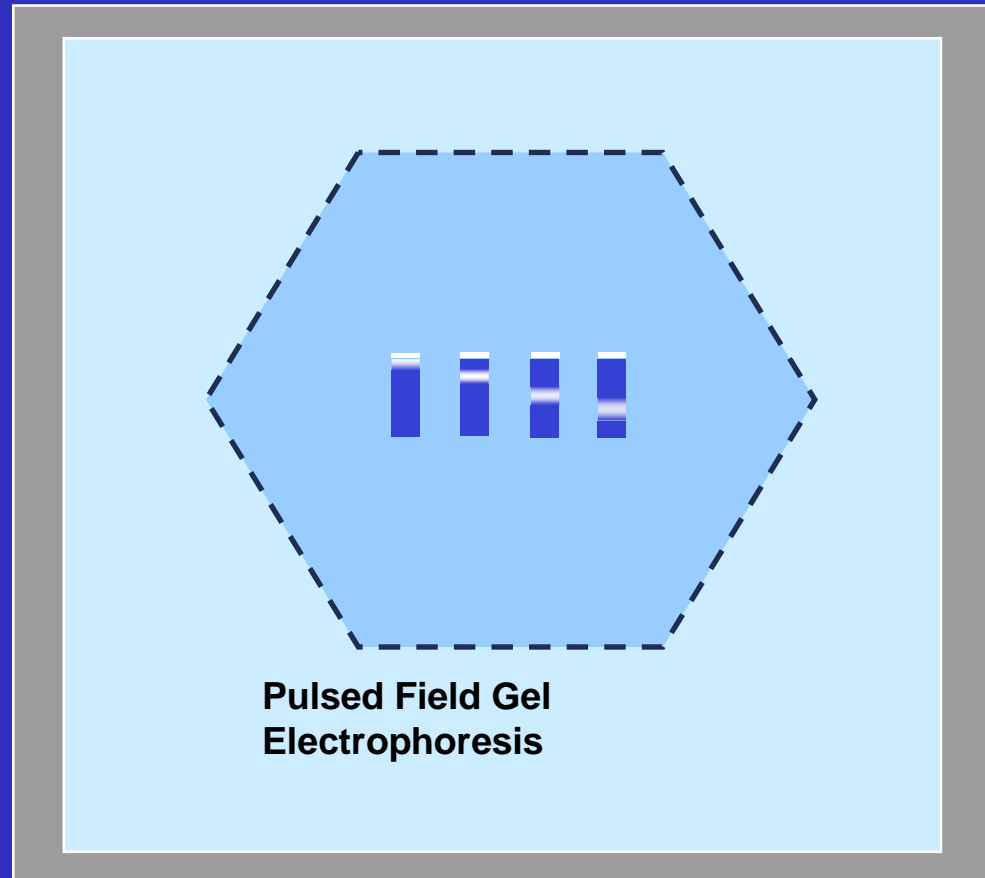
Dopo il primo impulso le due molecole assumono una forma allungata con le loro estremità frontali nella stessa posizione.

All'inizio del secondo impulso (campo ad un angolo $> 90^\circ$) le estremità posteriori cominciano a muoversi, ciascuna verso il poro più vicino.

Alla fine del secondo impulso la molecola più lunga rimane indietro rispetto a quella più corta di una distanza proporzionale alla differenza di lunghezza.



L'elettroforesi a campo pulsato



Conteggio diretto dei frammenti

Con la PFGE si può determinare la frammentazione del DNA anche quando l'assunzione di frammentazione casuale non può ritenersi valida, come nel caso di particelle densamente ionizzanti (o di alto LET).

Il numero di DSB è valutato dal conteggio diretto dei frammenti, allargando quanto è possibile l'intervallo di dimensioni analizzato (*Loebrich et al. Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 493 – 503, 1996)

$$N_{tot}^{exp} = \sum_i (F_i^{exp} \cdot \Delta M_i) = \sum_i \frac{f_i}{M_i}$$

Dove f_i è la quantità di massa (normalizzata) dei frammenti di dimensioni M_i

Per ottenere il numero di DSB introdotto dalla radiazione si sottrae a questo numero il corrispondente valore del controllo non irradiato

Induzione di DSB in funzione della dose

Dalle misure con centrifugazione su gradiente e con elettroforesi (dosi relativamente alte) risulta che l'induzione di DSB è lineare con la dose:

$$N_{\text{dsb}} = y_{\text{dsb}} \cdot d$$

In cellule di mammifero (hamster cinese)

$$y_{\text{dsb}}(\text{X, gamma}) = (2.8 - 6.0) 10^{-9} \text{ bp}^{-1} \text{ Gy}^{-1}$$

(Prise et al, Int. J. Radiat. Biol., 1998)

RBE di radiazioni densamente ionizzanti

$y_{\text{dsb}} / y_{\text{dsb}}(\text{X, gamma})$:

0.8 - 1.3 p, He-4 ($L \leq 120 \text{ keV}/\mu\text{m}$)

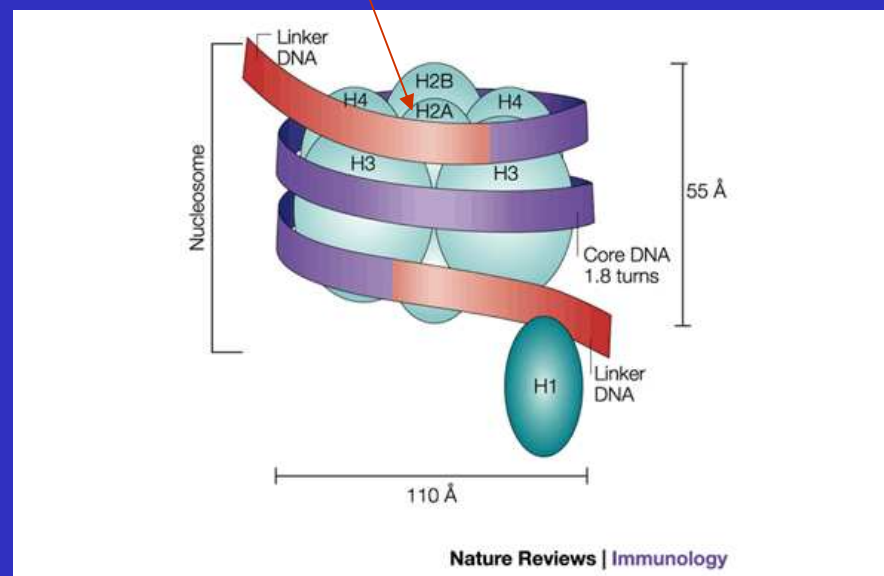
0.3 - 1.0 C, Ne, O, Fe ($L \sim 125 - 400 \text{ keV}/\mu\text{m}$)

Il metodo dell'istone H2AX

SI BASA SUL RICONOSCIMENTO DELLA DOPPIA ROTTURA DA PARTE DEI SISTEMI CELLULARI

Rapida fosforilazione dell'istone H2AX in risposta a radiazioni ionizzanti e altri agenti che producono DNA DSB¹. L'istone H2AX è una forma variante dell'istone H2A e viene fosforilato (γ -H2AX) a livello della serina 139 entro pochi minuti dall'induzione della DSB. La fosforilazione raggiunge valori massimi dopo circa 20-30 minuti.

H2A o H2AX



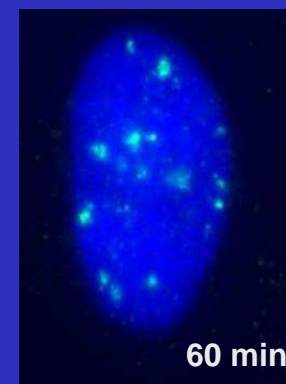
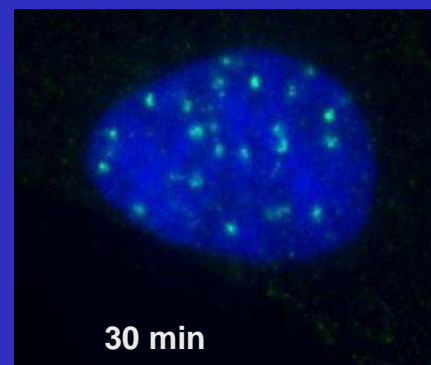
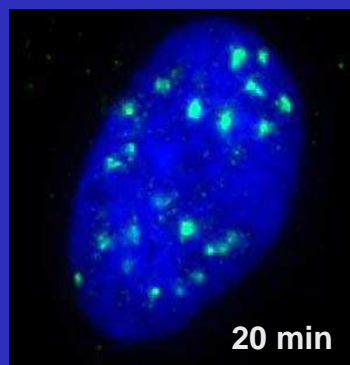
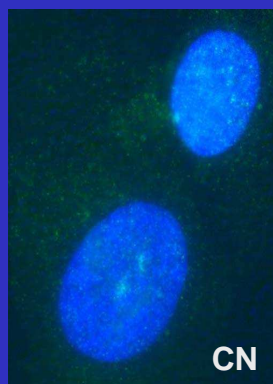
vantaggi: si applica a dosi più basse di quelle necessarie con i metodi precedenti

¹ E.P.Rogakou *et al.*, 1998, J. Biolog. Chem, 273 pp. 5858-5868
M.Belli – Radiobiologia - UniCa–Sc.Sp.Fis.Med 2011

Il metodo dell'istone H2AX

La formazione dell'istone fosforilato (γ -H2AX) può essere messa in evidenza grazie all'uso di anticorpi specifici fluorescenti.

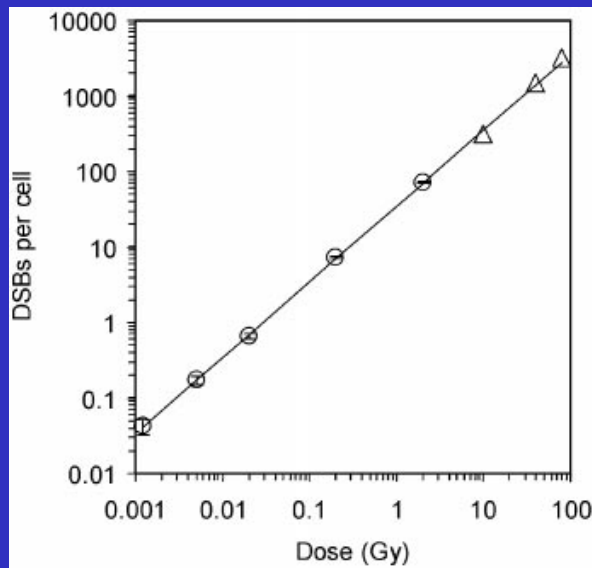
Osservando le cellule irradiate al microscopio si distinguono dei *foci* fluorescenti, il cui numero corrisponde al numero di DSB indotte nel DNA.



Foci dell'istone γ -H2AX in fibroblasti umani irradiati con 1 Gy raggi gamma

Determinazione delle DSB a basse dosi

Impiego di tecniche d'immunofluorescenza per rivelare DSB indotte nelle cellule da **basse dosi** di RI
(*Rotkham and Loebrich, PNAS 2002*)



Tecnica dell'istone fosforilato γ -H2AX

- Il numero di foci è lineare con l'aumentare della dose e si raccorda con il numero di DSB misurato a dosi più alte con il metodo elettroforetico
- Ogni focus γ -H2AX rappresenta una DSB
- La risposta per l'induzione di foci è lineare alle basse dosi

DSB vs effetti cellulari

La produzione di DSB non riflette gli effetti cellulari

- diverso andamento della risposta con la dose (lineare per l'induzione di DSB, generalmente curvilineo per gli effetti cellulari)
- diversa dipendenza dalla qualità della radiazione (LET) (l'induzione di DSB è molto meno dipendente dal LET rispetto agli effetti cellulari)

In particolare **RBE_{DSB} vs LET** (RBE per la produzione di DSB data dal rapporto $y_{DSB}(\text{radiazione considerata}) / y_{DSB}(X, \text{gamma})$) non riproduce l'andamento dell'RBE per l'inattivazione (o per l'induzione di mutazioni):

RBE_{in} (o RBE_{mut}) vs LET

DSB vs effetti cellulari

Il rapporto
 $y_{\text{DSB}} / y_{\text{DSB}}(X, \text{gamma}) = \text{RBE per DSB radioindotte vs LET}$
non riproduce l'andamento di
 $\text{RBE}_{\text{in}} (\text{o } \text{RBE}_{\text{mut}}) \text{ vs LET}$

Possibili motivi:

1. N_{dsb} non valutato correttamente dalle tecniche usate (Loebrich et al 1996, Loebrich 1997)
2. la produzione iniziale di DSB non è direttamente rappresentativa dell'effetto biologico, a causa del processamento delle DSB da parte della cellula.

Esistono diverse classi di dsb caratterizzate da diversa riparabilità, la cui proporzione dipende dalla qualità della radiazione (Goodhead et al 1985, Ward 1988, Goodhead 1994)

Possibili soluzioni

1. metodi più accurati (ad es. conteggio dei frammenti dai profili di frammentazione,)
2. valutazione della riparabilità mediante cinetiche di riparazione

Fine