



Viviana De Nadal
INFN-Laboratori Nazionali di Legnaro,
Legnaro-Padova

CORSO DI FORMAZIONE DI
RADIOBIOLOGIA

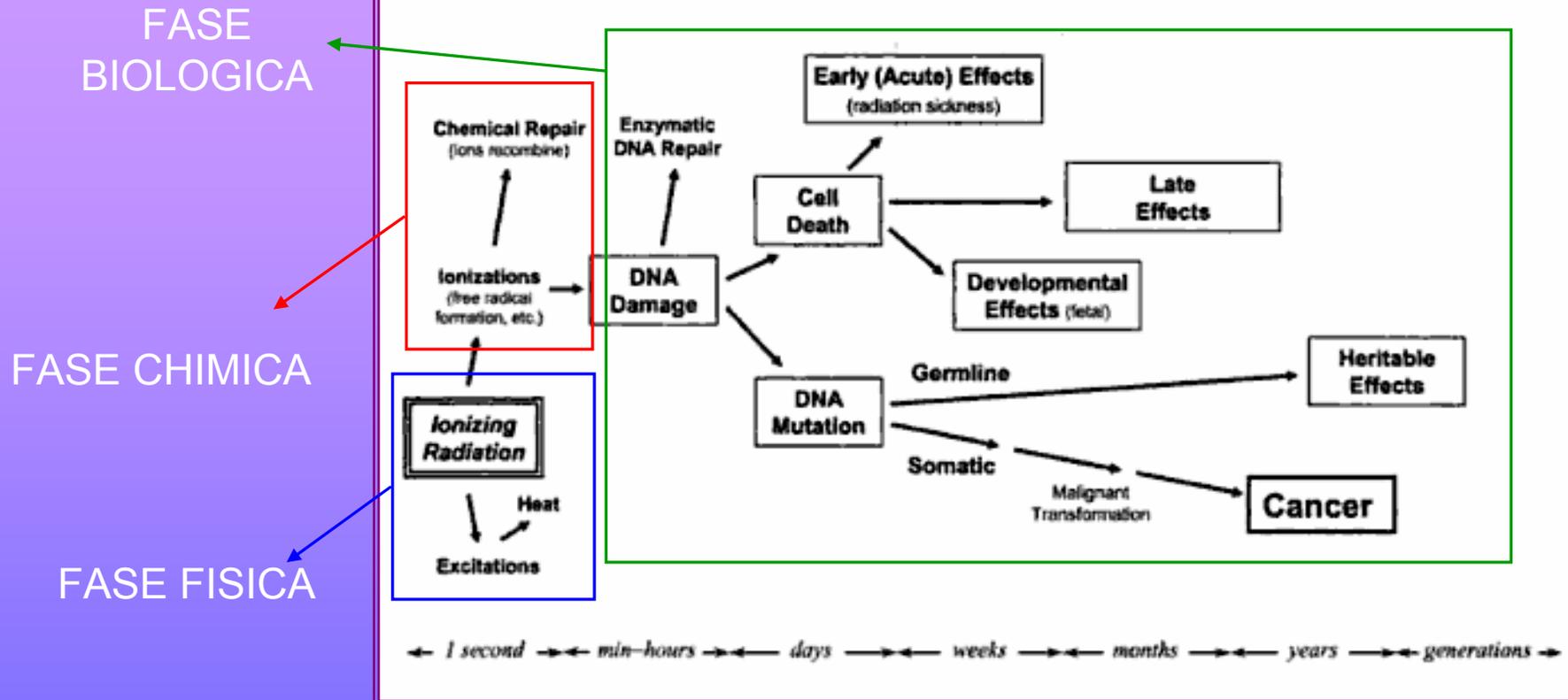
Torino, 11-12 Novembre 2010

MODULO 2

MODULO 2

- Azione diretta e indiretta delle radiazioni ionizzanti. Radiolisi dell'acqua e formazione di radicali liberi. Effetto ossigeno.
- Danno al DNA (danno alle basi, singole e doppie rotture) e processi di riparazione. Tecniche sperimentali di indagine del danno al DNA (sedimentazione; filtrazione; elettroforesi su gel; comet assay; immunocitochimica, immunofluorescenza).
- Danno a livello subcellulare: aberrazioni cromosomiche e tecniche sperimentali di indagine (Giemsa, FISH); micronuclei e tecniche sperimentali di indagine.

Classic Paradigm of Radiation Injury



Tratto da "Radiobiology for the radiologist", Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

EFFETTO
CHIMICO
PRIMARIO

EFFETTO BIOLOGICO

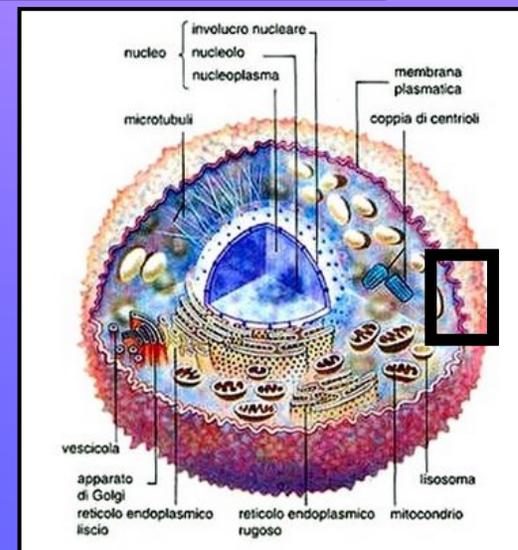
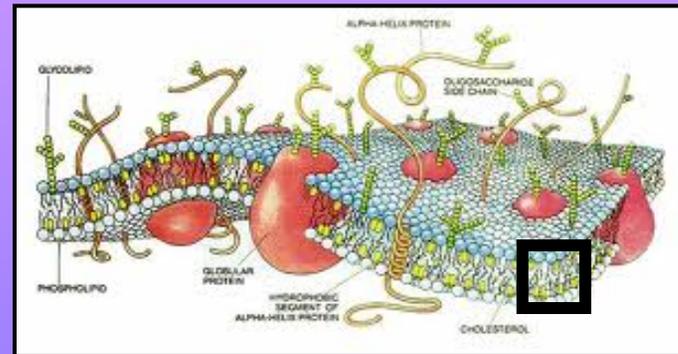
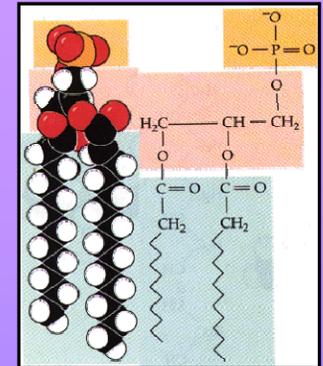
L'effetto biologico è generato da una modificazione di struttura e quindi di funzione delle molecole di importanza biologica

Un SISTEMA BIOLOGICO è formato da un elevato numero di molecole semplici e molecole complesse (proteine, carboidrati, lipidi)

A loro volta le molecole complesse sono raggruppate in strutture di secondo e terzo ordine formando organizzazioni morfologiche e funzionali, quali membrane cellulari/intracellulari e organuli che nel loro insieme formano l'unità biologica più semplice:

La CELLULA

SISTEMA BIOLOGICO DI ORDINE SUPERIORE MORFOLOGICAMENTE E FUNZIONALMENTE BEN DEFINITO



Negli organismi superiori le molecole di rilevanza biologica rappresentano il 20% della massa totale, mentre il restante 80% è costituito da molecole d'acqua

Si osservano effetti diversi se l'evento di interazione interessa:

una molecola di elevata organizzazione e complessità, presente in unica copia (DNA) o in basso numero di copie (RNA) e svolge una funzione fondamentale per la sopravvivenza della cellula

o

Una molecola semplice e aspecifica, che svolge una funzione di scarsa rilevanza biologica o se è presente un alto numero di molecole che svolgono la stessa funzione, compensandone o mascherandone l'inattivazione (es. enzimi)

L'effetto chimico primario
(modificazione di struttura delle molecole)
prodotto dalle radiazioni ionizzanti avviene per:

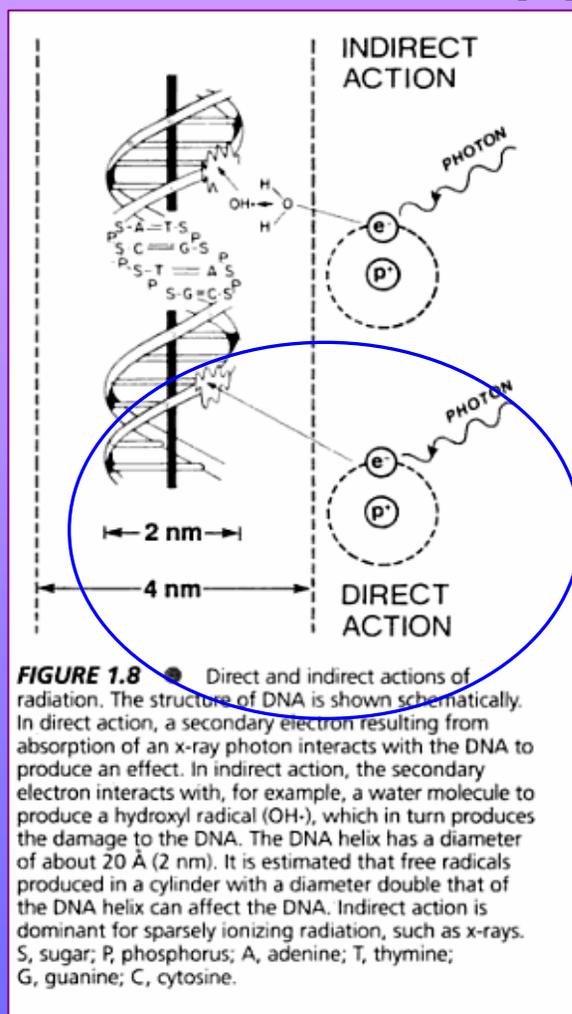
Azione diretta:
Interazione diretta delle
radiazioni con gli atomi delle
molecole biologiche

Azione indiretta:
trasferimento per via chimica dell'energia
assorbita dalle molecole d'acqua attivate
dall'interazione con le radiazioni

Scissione di uno o più legami interatomici: possono interessare la struttura primaria delle molecole o i rapporti di coordinazione con altre molecole nelle strutture di ordine superiore

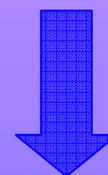
Formazione di legami nuovi: formazione di ponti tra atomi della stessa molecola o di molecole diverse

AZIONE DIRETTA



Tratto da "Radiobiology for the radiologist",
Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

La probabilità di un'interazione diretta tra radiazione e atomi della molecola di interesse biologico dipende dal numero di atomi che la compongono, dalla sua configurazione sterica e della sua concentrazione nel sistema

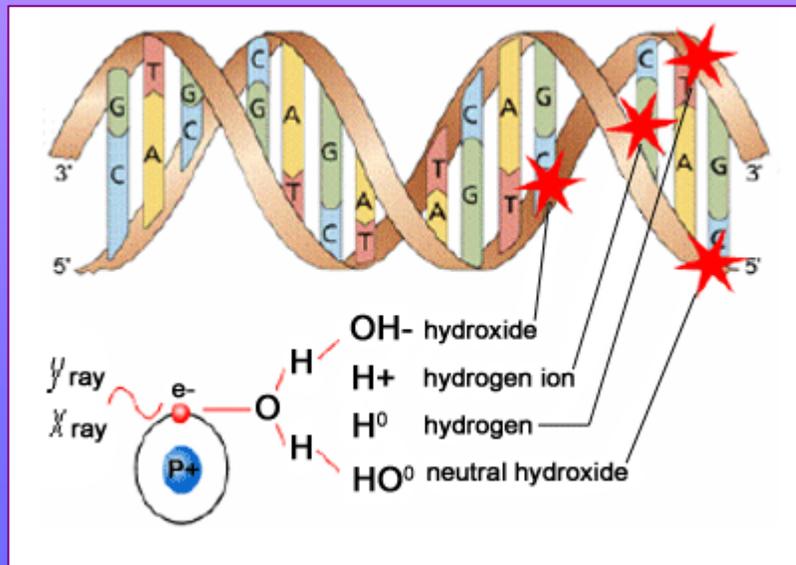


La frequenza con cui avviene un'interazione diretta tra la radiazione e gli atomi della molecola dipende unicamente dal volume della molecola "bersaglio" rispetto al volume del sistema stesso

Effetto dominante per radiazioni ad alto-LET
come i neutroni e le particelle alfa

AZIONE INDIRECTA

La radiazione interagisce con atomi o molecole, in particolare con l'H₂O, presenti nella cellula producendo radicali liberi che, diffondendo, raggiungono e danneggiano target critici



EVENTO	SCALA TEMPORALE
Incident x-ray photon	10 ⁻¹⁵
Fast electron (e ⁻)	10 ⁻¹⁰
Ion radicals	10 ⁻¹⁰
Free radical	10 ⁻⁹
Chemical changes from breakage of bonds	10 ⁻⁵
Biologic effect	Hours, days months, years

Radiolisi dell'acqua

Il fotone o la particella cedono ad una molecola d'acqua una quota della loro energia:



(e^-) :

1. Reazione con un'altra molecola d'acqua:

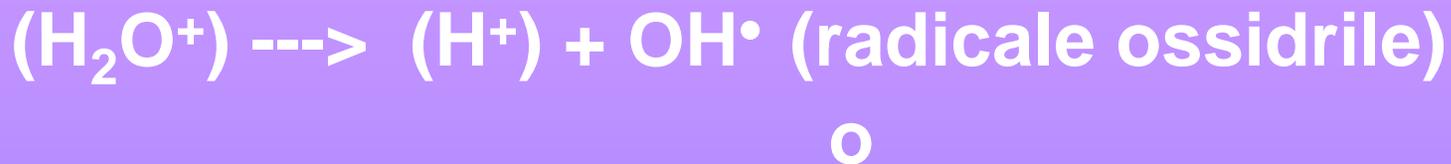


2. Dissociazione:



H₂O⁺ :

Dissociazione:



Reazione con un'altra molecola d'acqua:



OH[•] (radicale ossidrile)

- **altamente reattivo**
- **diffonde a breve distanza raggiungendo target biologici critici (2/3 del danno indotto al DNA dall'irraggiamento con x-ray)**

Prodotti finali : radicali liberi H• e OH•

1)RICOMBINAZIONE TRA LORO



La modalità di combinazione dei radicali liberi è influenzata da:

- LET delle radiazioni:

per radiazioni ad alto LET la distanza tra le interazioni primarie è bassa quindi predilige la combinazione tra loro dei radicali OH•

Per radiazioni a basso LET la distanza tra due interazioni primarie è maggiore della distanza percorsa dagli elettroni secondari, per cui si predilige la combinazione tra H• e OH•

- Presenza di O₂ :dato il suo alto potere ossidante reagisce con i radicali H• :



Portando alla formazione di perossido di idrogeno per ogni molecola di ossigeno molecolare

Prodotti finali : radicali liberi H• e OH•

2) COMBINAZIONE CON ALTRE MOLECOLE



o



Ponte inter/intra molecolare

o



Reazione a catena



Effetto dell'ossigeno

La presenza dell'ossigeno molecolare al momento dell'irradiazione può influire notevolmente sull'effetto biologico finale

potenziamento dell'efficacia biologica delle radiazioni =
Azione radiosensibilizzante

Meccanismo:

Per azione indiretta:

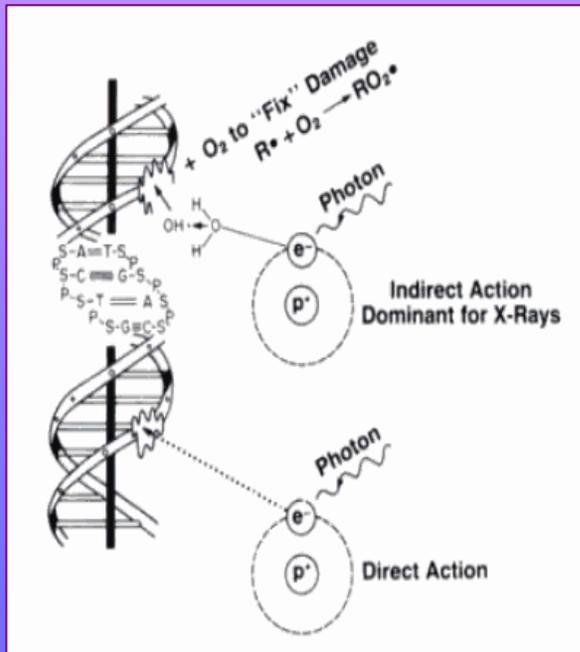
- $O_2 + H^\bullet \rightarrow HO_2^\bullet$
- $HO_2^\bullet + H^\bullet \rightarrow H_2O_2$
- Incremento della formazione di molecole H_2O_2 dotate di elevata attività ossidante apportando effetti chimici marcati sulle molecole biologiche
- Diminuzione della probabilità di reazione di ritorno con aumento della probabilità di combinazione di radicali OH^\bullet tra loro

Per azione diretta:

- In presenza di ossigeno



Rappresenta una forma non riparabile della molecola organica



Tratto da "Radiobiology for the radiologist",
Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

Cambiamento nella composizione chimica
del materiale esposto alla radiazione

- In assenza di ossigeno

la molecola target ionizzata è in grado di
riparare il danno

Ipotesi della fissazione del danno

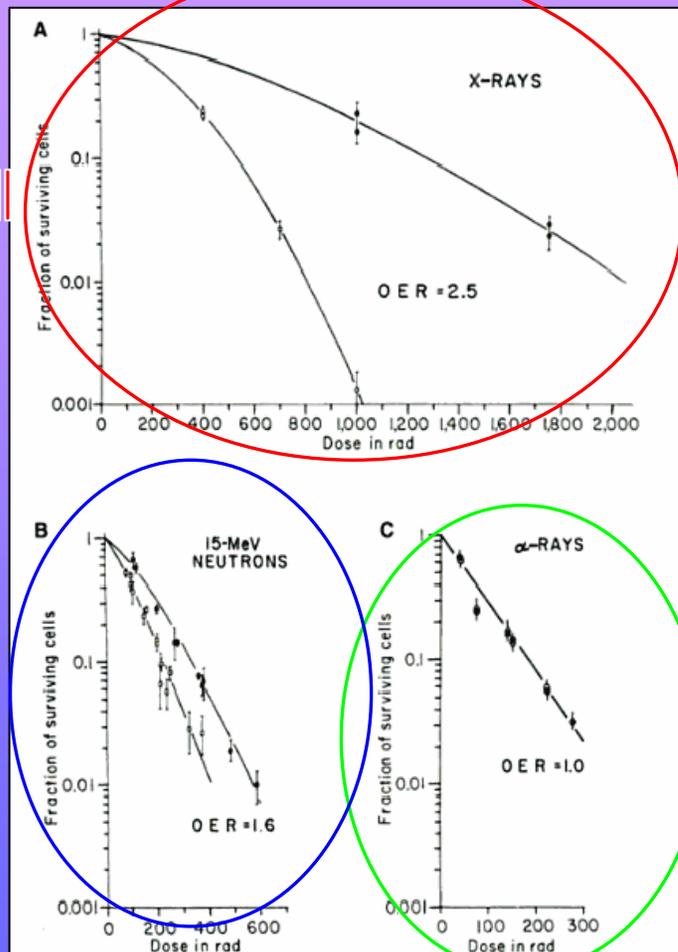
L'incremento dell'efficacia biologica prodotta dalla presenza di ossigeno si esprime in termini di:

OER (Oxygen Enhancement Ratio):

rapporto tra la dose somministrata in condizioni di ipossia e la dose somministrata in presenza di ossigeno necessaria per ottenere lo stesso effetto biologico.

1. Esiste una correlazione tra l'effetto di potenziamento dell'efficacia delle radiazioni dovuto alla presenza dell'ossigeno (OER) e il LET della radiazione

Per radiazioni a bassa densità di ionizzazione (raggi X e γ) il valore di OER è di 2.5



Per radiazioni di densità di ionizzazione intermedia (es. Neutroni veloci), OER assume valori intermedi tra 2.5 e 1

Per radiazioni ad alta densità di ionizzazione il valore di OER è pari a 1, NON c'è effetto ossigeno!!

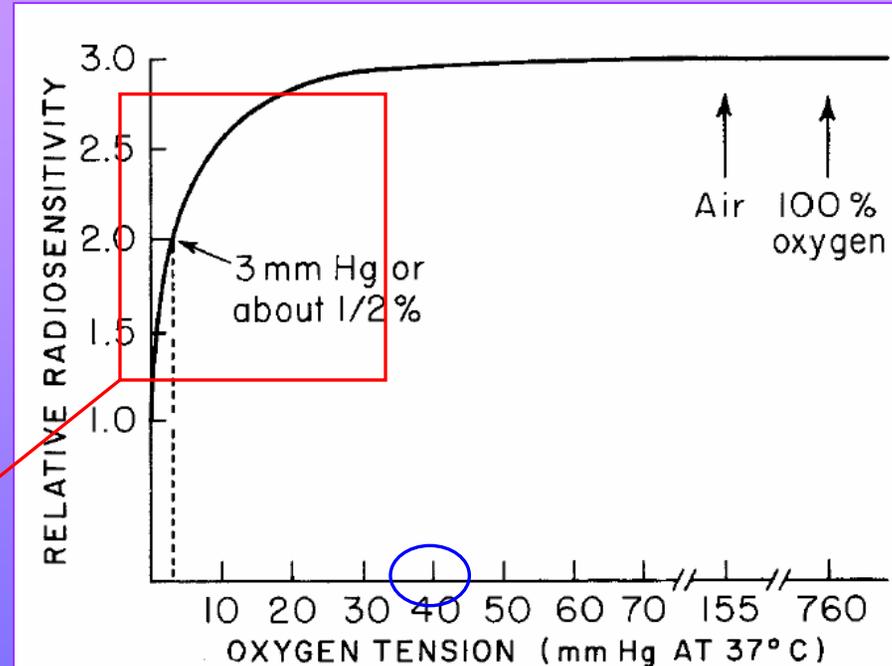
Tratto da "Radiobiology for the radiologist", Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

L'influenza dell'ossigeno è più rilevante per radiazioni sparsamente ionizzanti e meno rilevante per radiazioni densamente ionizzanti

2. Esiste una correlazione tra l'effetto di potenziamento dell'efficacia delle radiazioni dovuto alla presenza dell'ossigeno (espressa in termini di radiosensibilità) e la concentrazione di ossigeno stesso

Indicando arbitrariamente con 1 il valore di radiosensibilità in condizioni di anossia, l'incremento della radiosensibilità in condizioni di ossigenazione è 3 volte per radiazioni a basso LET e 1,6 pe radiazioni ad alto LET.

Per valori di pO_2 compresi tra 0 e 30 mm Hg: si osserva un aumento molto marcato con un'elevata pendenza della curva in corrispondenza di valori bassi di pressione dell' O_2

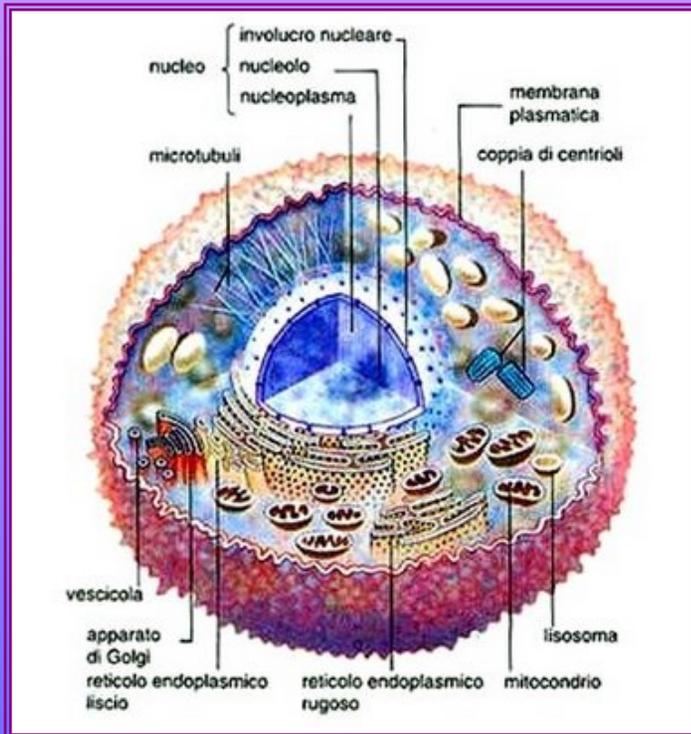


Tratto da "Radiobiology for the radiologist", Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

Per valori superiori a 40 mm Hg non si hanno ulteriori aumenti significativi dell'efficacia delle radiazioni

La CELLULA

SISTEMA BIOLOGICO DI ORDINE SUPERIORE
MORFOLOGICAMENTE E FUNZIONALMENTE BEN DEFINITO IN
GRADO DI ESISTERE IN FORMA INDIPENDENTE



La cellula è delimitata all'esterno dalla MEMBRANA PLASMATICA che funziona da barriera selettiva per gli scambi con l'ambiente.

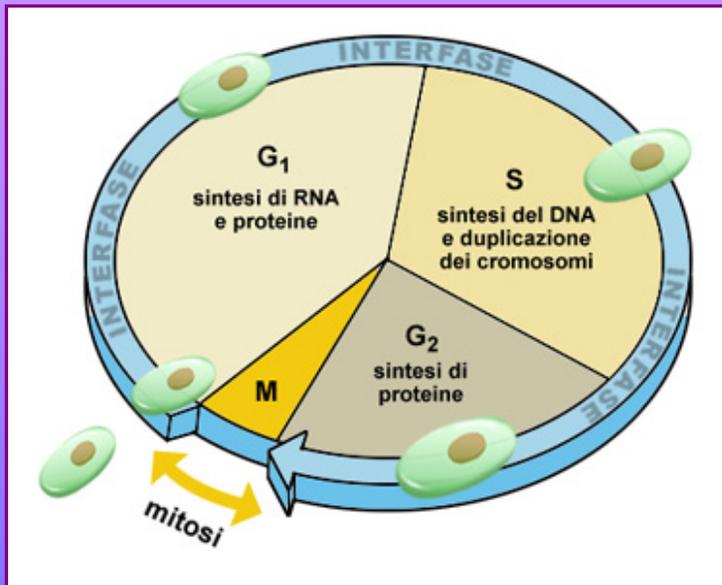
All'interno della cellula vi sono molteplici compartimenti detti organuli sospesi in un mezzo semifluido detto citosol assieme al quale formano il CITOPLASMA.

Tra gli organuli principali:

- Il nucleo contenente il materiale genetico sotto forma di DNA
- I mitocondri che producono l'ATP tramite respirazione ossidativa
- Il reticolo endoplasmatico coinvolto nella modificazione posttraduzionale delle proteina ed è coinvolto anche nell'assemblaggio delle altre membrane della cellula
- L'apparato del Golgi: ruolo nella sintesi, accumulo, smistamento e secrezione dei prodotti chimici
 - I lisosomi

Il ciclo cellulare:

è un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche



Il ciclo cellulare consta di due fasi: Mitosi e Interfase.

L'INTERFASE si divide in.

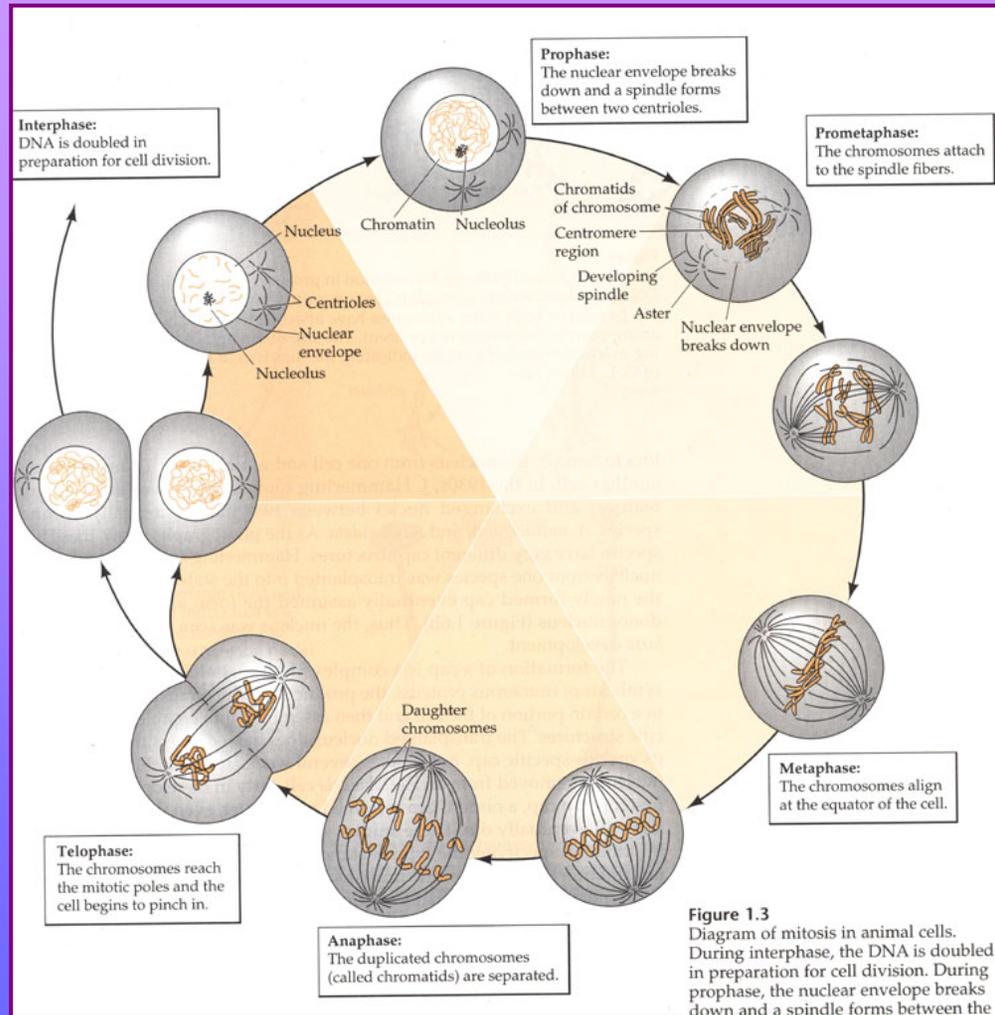
- G₁: la cellula si prepara alla replicazione del DNA;
- S: replicazione del DNA;
- G₂: la cellula si prepara alla MITOSI

La MITOSI avviene in:

- Profase
- Prometafase
- Metafase
- Anafase
- Telofase

Nel ciclo cellulare, sono presenti dei punti di controllo o checkpoints, localizzati a livello delle transizioni G₁/S e G₂/M, che garantiscono che tutti gli eventi della fase precedente del ciclo cellulare si siano completati prima che la cellula possa passare allo stadio successivo.

La divisione mitotica



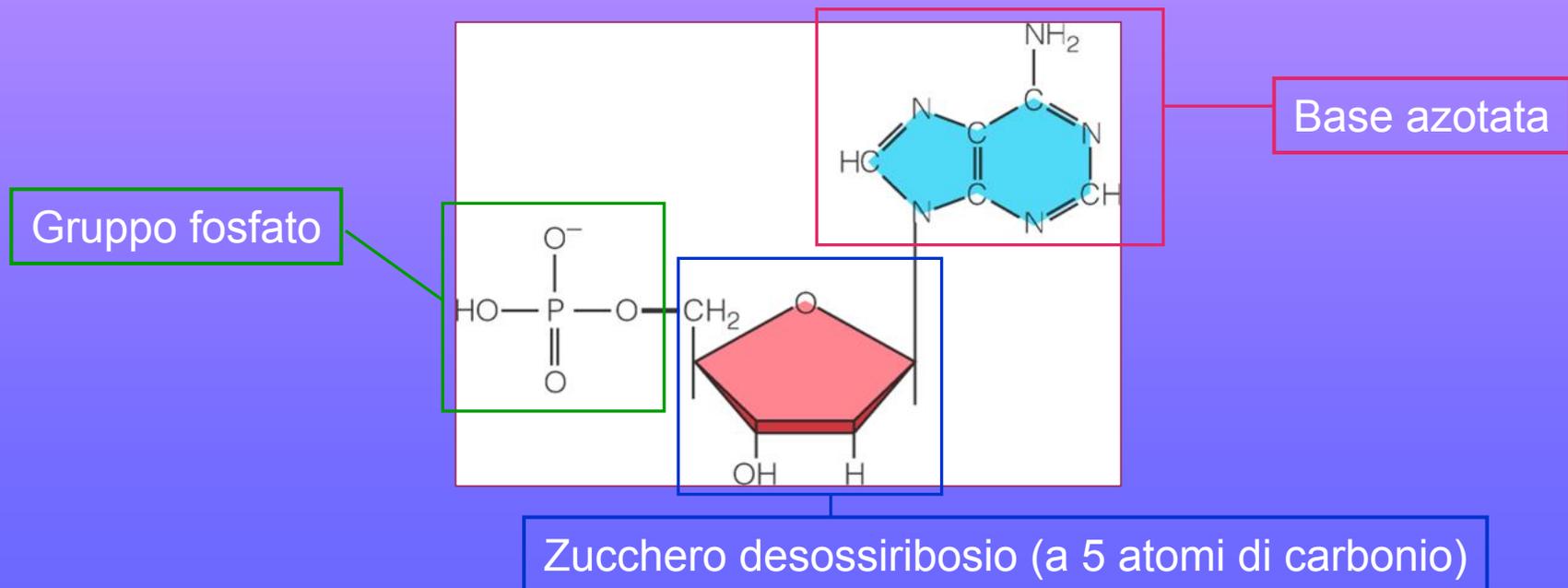
DNA

Acido DesossiriboNucleico

Macromolecola polimerica non ramificata costituita da una catena di unità monomeriche dette desossiribonucleotidi che costituisce il materiale genetico della maggior parte degli organismi.

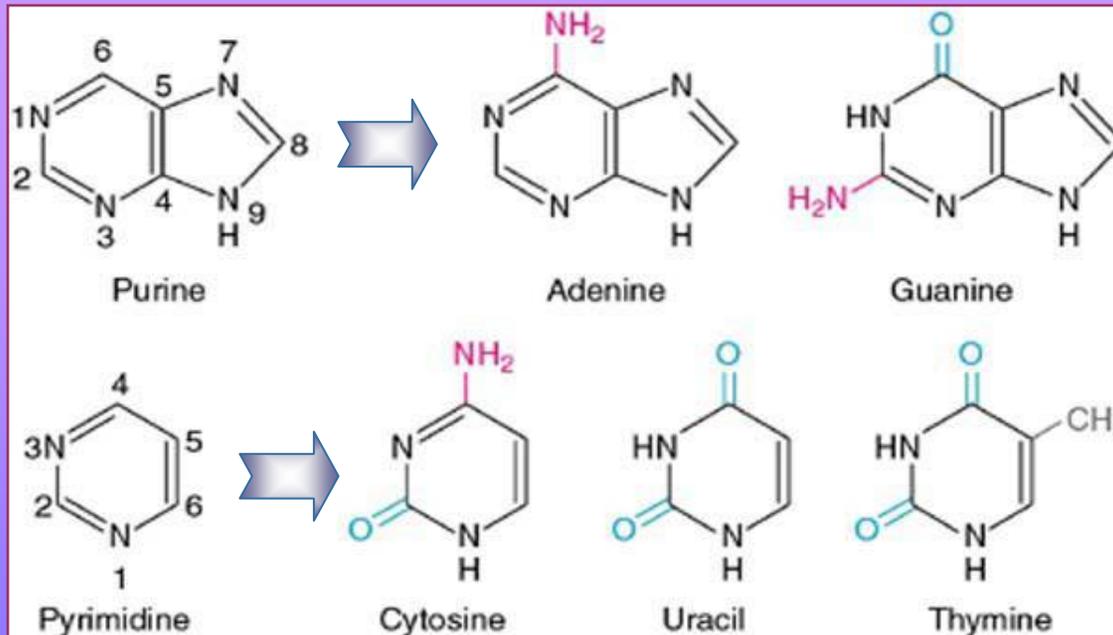
COMPOSIZIONE CHIMICA del DNA

Unità base: Desossiribonucleotidi



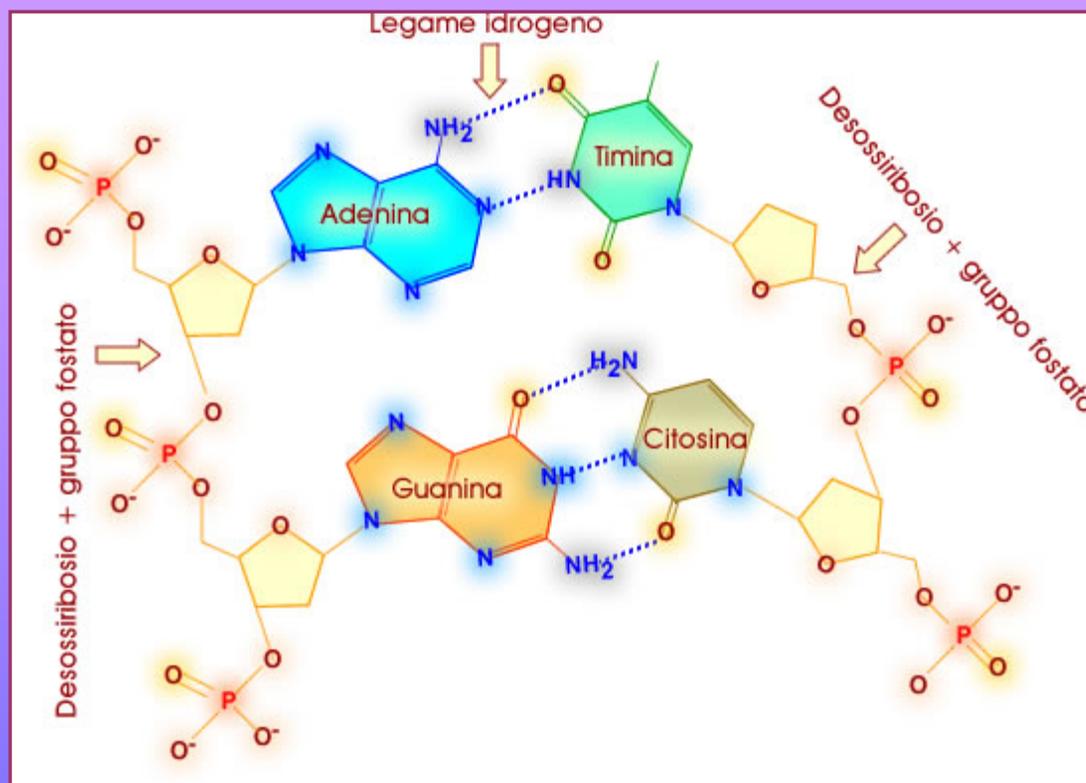
COMPOSIZIONE CHIMICA del DNA

Basi azotate



Le basi si appaiano in modo specifico costituendo le **coppie o paia di basi complementari** :
Adenina - Timina con 2 legami idrogeno
Guanina - Citosina con 3 legami idrogeno

COMPOSIZIONE CHIMICA del DNA



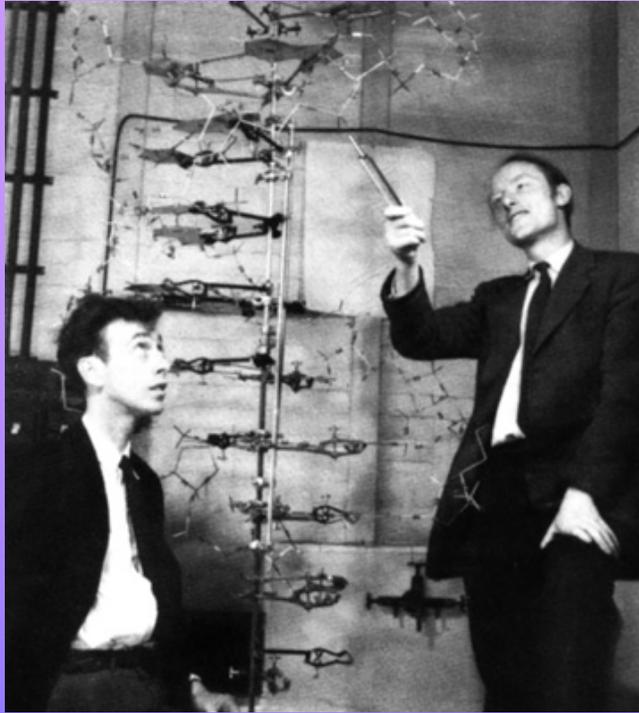
I nucleotidi sono uniti da un legame covalente tra il carbonio del pentoso di un nucleotide e il gruppo fosfato del nucleotide successivo

LEGAME FOSFODIESTERICO

Relativamente forte conferisce stabilità alla struttura ripetuta zucchero-fosfato del DNA

Le due estremità della molecola non sono uguali (catena antiparallela): ad un'estremità vi è un carbonio 5' e all'altra un carbonio 3'

Struttura fisica del DNA

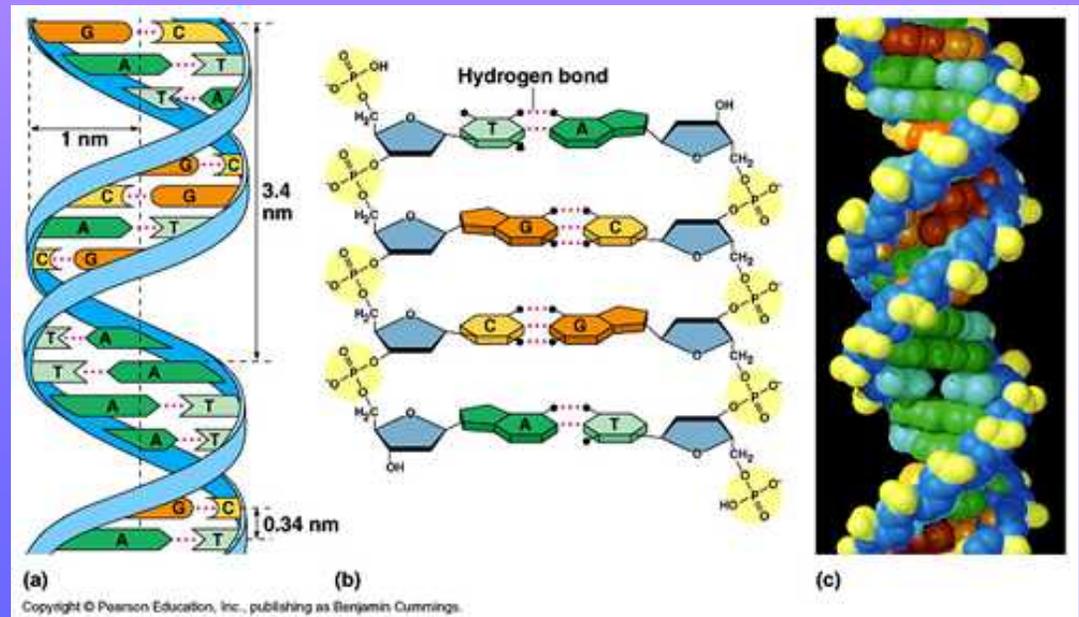


- Il diametro dell'elica è di 2nm;
- Le coppie di basi sono distanziate di 0,34nm e un giro completo dell'elica richiede 3,4nm,(10 coppie di basi per giro dell'elica)

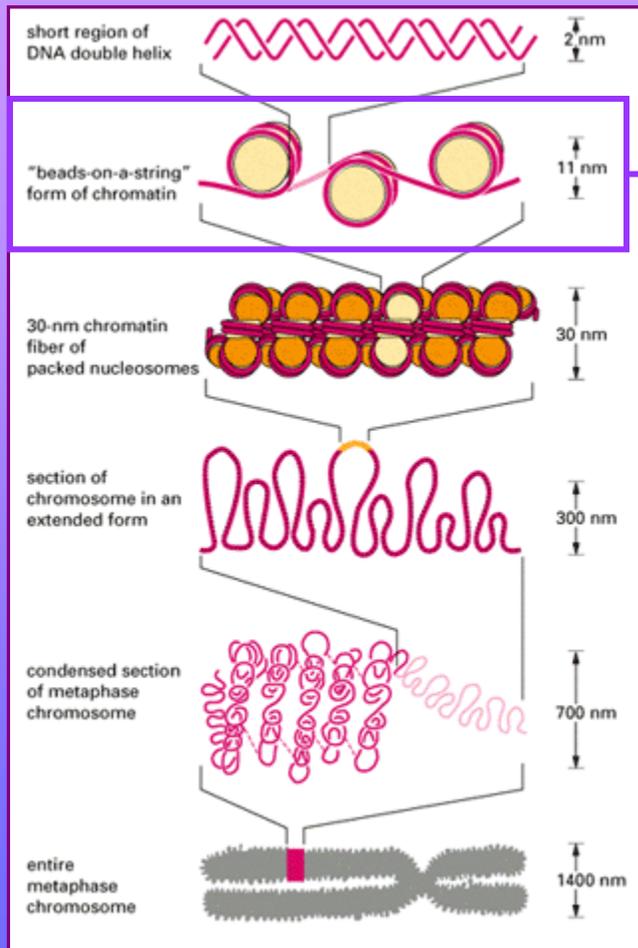
Watson e Crick nel 1953 proposero un modello per la struttura chimica e fisica del DNA:

MODELLO A DOPPIA ELICA

- Due catene polipeptidiche avvolte l'una intorno all'altra formando una doppia elica destrorsa;
- le due catene sono antiparallele;
- gli scheletri zucchero-fosfato si trovano all'esterno della doppia elica mentre le basi sono orientate verso l'asse centrale e disposte perpendicolarmente all'asse longitudinale del DNA.



Il DNA è presente nel nucleo in forma altamente organizzata e riconoscibile in diversi livelli di avvolgimento:



NUCLEOSOMA: consiste di un complesso centrale di otto proteine basiche dette istoni, attorno al quale si avvolge la doppia elica di DNA compiendo 1,75 giri corrispondenti a 146bp. Ogni nucleosoma è connesso con quello successivo da un corto segmento di DNA spaziatore.

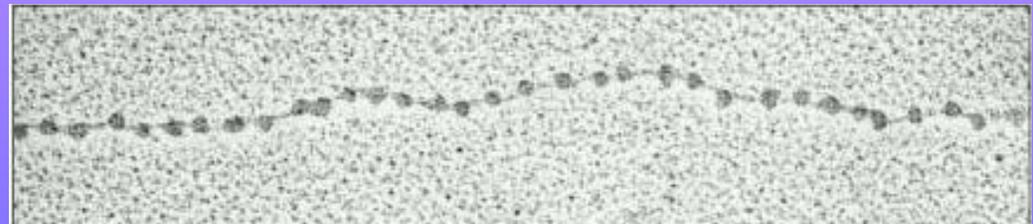
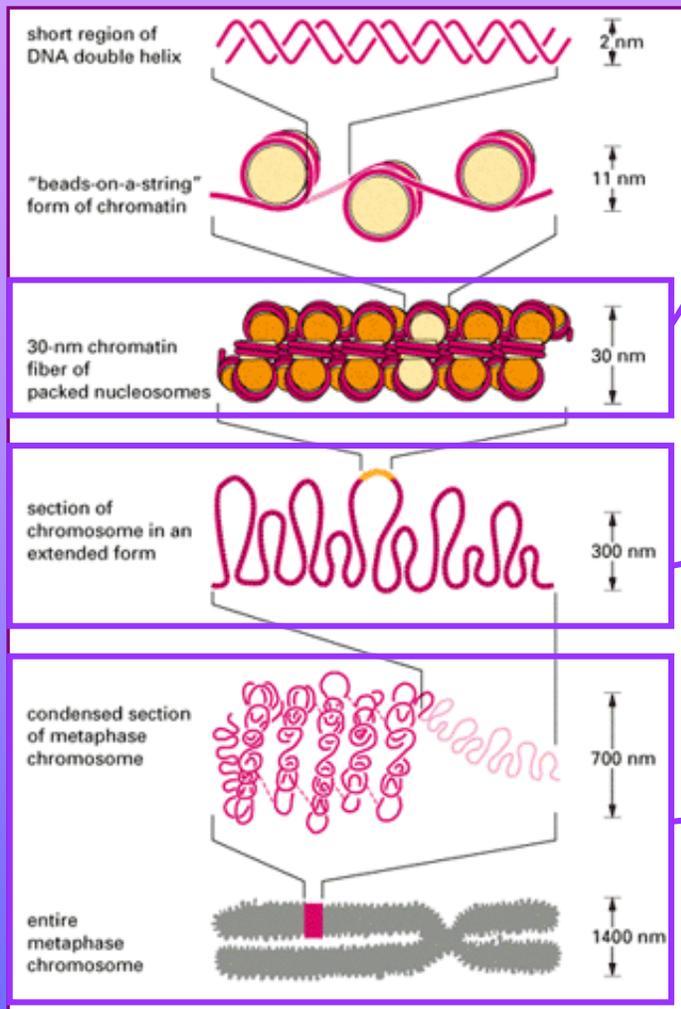


Foto da microscopio elettronico



I nucleosomi a loro volta si ripiegano in gruppi di 6 nucleosomi per giro, formando le FIBRE DI CROMATINA



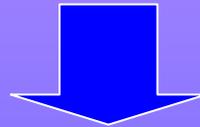
Foto da microscopio elettronico

Le fibre di cromatina a loro volta sono ripiegate formando i DOMINI AD ANSA ancorati ad un'impalcatura di proteine non istoniche

I domini ad ansa a loro volta durante la divisione mitotica si condensano ulteriormente formando le strutture visibili dette CROMOSOMI

Perché il DNA è la “molecola bersaglio” più importante?

- Per le funzioni che essa svolge: conserva e trasmette l'informazione riguardante la struttura, funzione, sviluppo e riproduzione della cellula;
- Da evidenze sperimentali si è visto:
 - con metodo indiretti, una notevole differenza in radiosensibilità tra nucleo e citoplasma cellulari ascrivibile alla presenza di DNA nel nucleo;
 - con metodi diretti, l'effetto letale dell'incorporazione nel DNA di radionuclidi

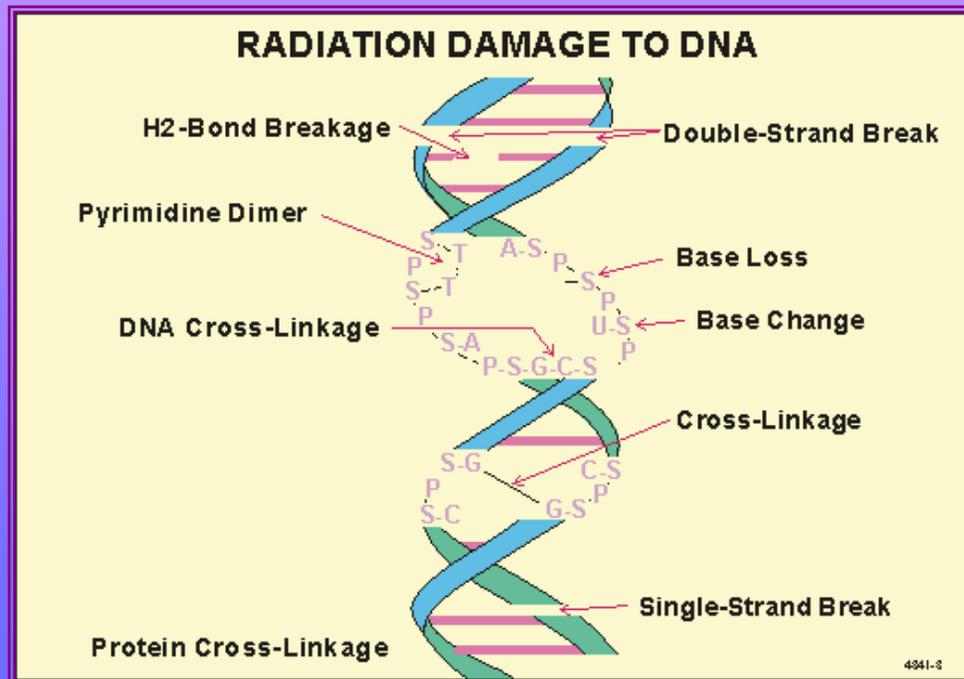


La stabilità e l'integrità del DNA sono prerequisiti fondamentali per lo svolgimento dei normali processi cellulari (metabolismo, replicazione, divisione cellulare) e il danno in esso indotto da agenti esogeni ed endogeni alla cellula possono portare a disfunzioni cellulari, cancerogenesi o morte cellulare

DANNO al DNA

Il DNA può essere danneggiato:

- sia da fonti esogene quali agenti chimici, raggi UV, radiazioni ionizzanti
- Sia da fonti endogene quali errori nella replicazione del DNA, specie dell'ossigeno reattive prodotte dal metabolismo cellulare, agenti alchilanti endogeni (nelle cellule umane ~2000-10000 lesioni/giorno)



Tipi di danno:

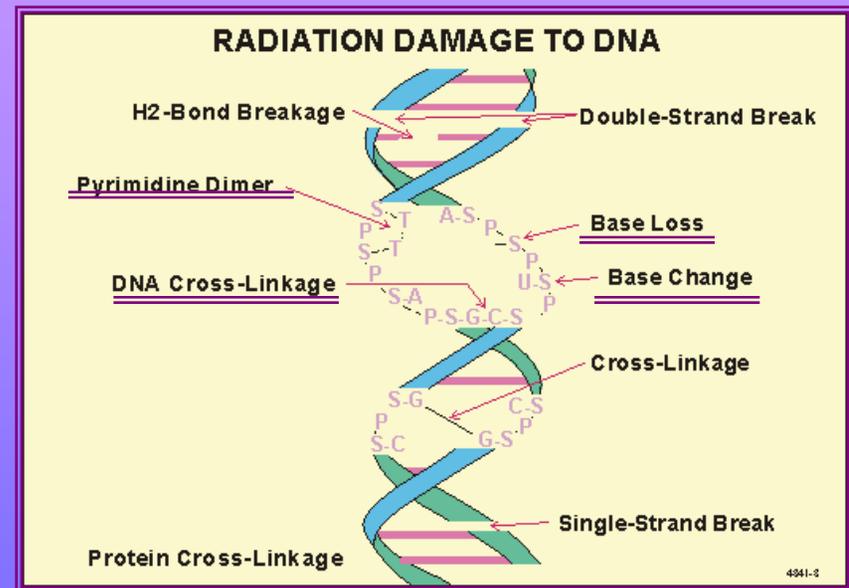
- Danno alle basi azotate;
- Rotture a singolo filamento SSB;
- Rotture a doppio filamento DSB;
- Cross-link DNA-DNA;
- Cross-link DNA - proteine

DANNO al DNA

1. Danno alle basi azotate:

Generato sia per azione diretta che per azione indiretta della radiazione ionizzante e consistono in:

- *Ossidazione* di basi [es. 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG)] e generazione di interruzioni nei filamenti di DNA ad opera di specie reattive dell'ossigeno
- *Deaminazione di basi* (es. Citosina in Uracile e 5-metilcitosina in timina);
- *alchilazione* di basi (generalmente metilazione), con formazione, ad esempio, di 7-metilguanina;
- *idrolisi* di basi, come la depurinazione e la depirimidinazione .

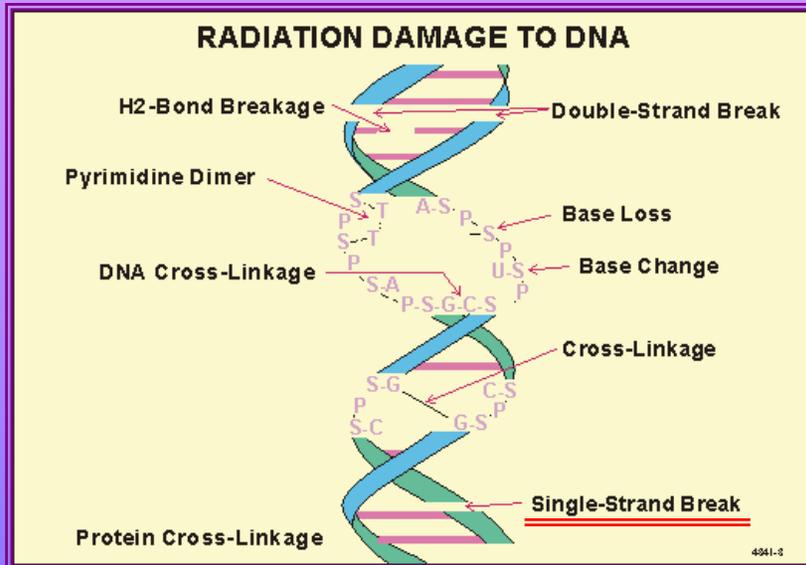


generati sia da alte dosi di radiazioni di basso LET sia da radiazioni di alto LET.

2. Danno ai nucleotidi: dimeri di pirimidine (timina)

DANNO al DNA

3. Rotture a singolo filamento SSB



Rotture che interessano uno dei due filamenti del DNA
Forma di danno al DNA più frequente indotta dalle radiazioni ionizzanti

Comportano lievi conseguenze biologiche poiché vengono facilmente riparate

DANNO al DNA

4. Rotture del doppio filamento:

Sono le lesioni più pericolose per l'integrità del genoma prodotte dalle radiazioni ionizzanti nei cromosomi

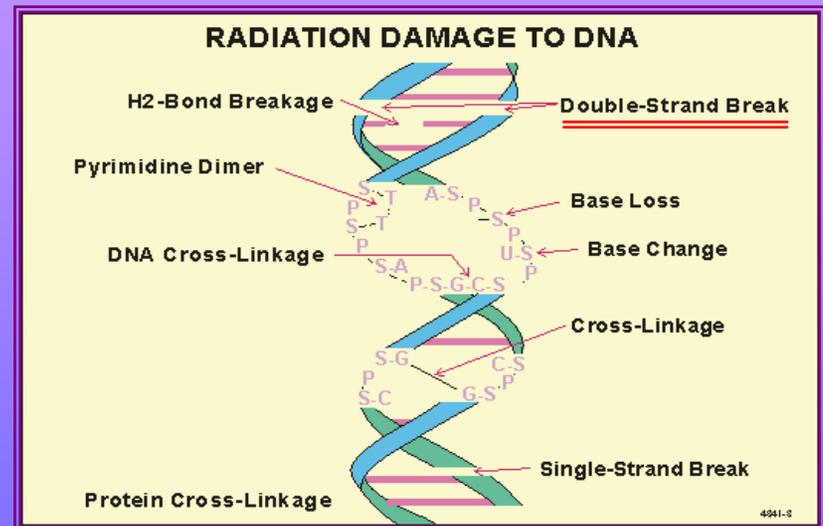
Possono essere prodotte:

- per azione diretta di radiazioni ad alto LET
- per azione indiretta (attacco multiplo di radicali generati in prossimità della doppia elica)



Si osserva la formazione di siti con cluster di danno detti LMDS (es. cluster di basi ossidate, singole rotture presenti su entrambi i filamenti della doppia elica in siti sufficientemente vicini l'uno all'altro da non permettere alle basi appaiate rimanenti e alla struttura della cromatina, di mantenere giustapposte le estremità (*sticky ends*) che si vengono a formare)

- Conseguenti a processi di riparo di basi o di zuccheri danneggiati molto vicini tra loro e presenti sui due filamenti del DNA



- Una mancata riparazione delle DSB porta alla morte cellulare
- Una riparazione errata porta ad aberrazioni cromosomiche e cancro

TECNICHE DI RILEVAZIONE DEL DANNO AL DNA

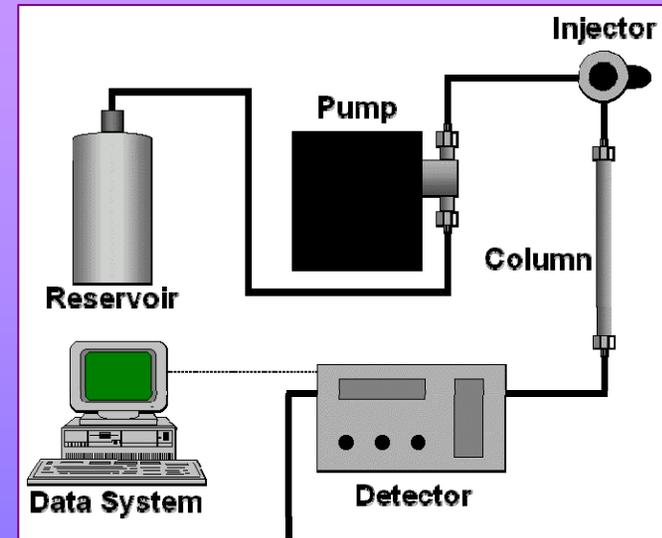
Danno alle basi:

- High pressure liquid chromatography (HPLC)
- Tritium release from labeled thymine
- Phosphate release
- Fluorescent labeling

High pressure liquid chromatography (HPLC)

Permette di separare due o più composti presenti in un solvente sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" posta all'interno della colonna cromatografica e una "fase mobile" che fluisce attraverso essa.

Alla fine della colonna è applicato un rilevatore (IR, UV-VIS, spettrofluorimetrico, spettrometro di massa) e un calcolatore che permettono una analisi in continuo dell'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate.



Rotture A SINGOLO E DOPPIO FILAMENTO DEL DNA

Le tecniche di indagine possono essere utilizzate per l'individuazione sia di SSB che di DSB modificando le condizioni di pH in cui vengono eseguiti:

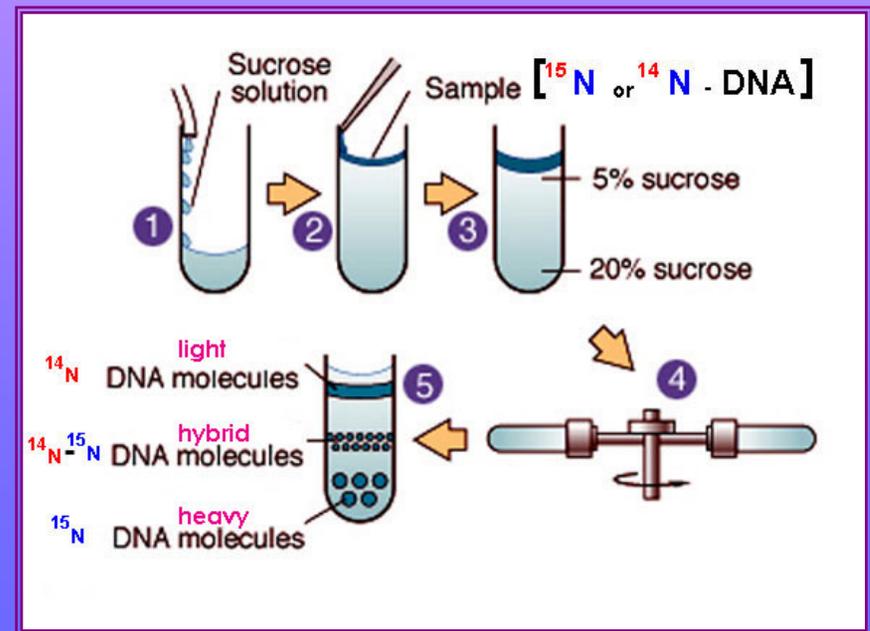
- Per le SSB in condizioni alcaline pH = 12
- Per le DSB in condizioni neutre pH = 7

METODI:

- Per sedimentazione
- Per filtrazione
- Per elettroforesi (PFGE, Comet assay)
- Per immunoistochimica/immunofluorescenza

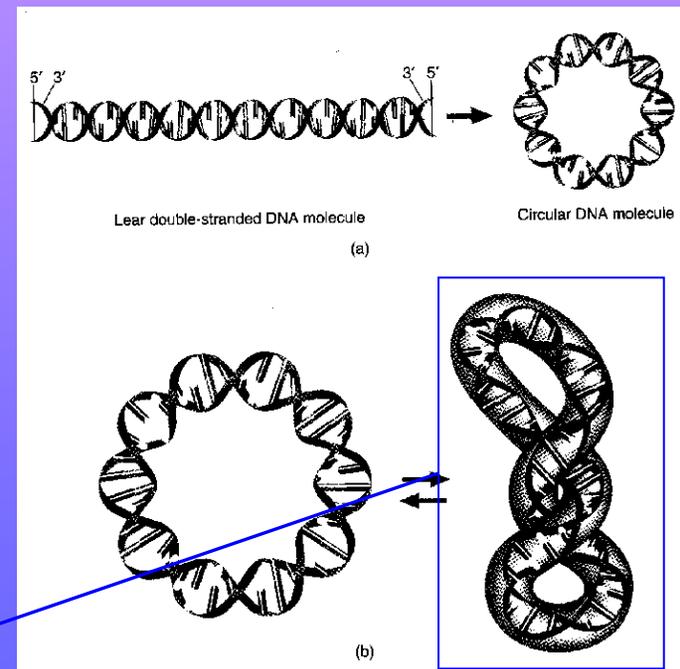
Per sedimentazione: Centrifugazione in gradiente di Sucrosio

- Sucrose solution with gradient varying from 5%-30%
- Cell DNA radiolabeled (e.g. ^{14}C , marcatori fluorescenti)
- Cell lysis induced, DNA released (depending on solution as single strand or double strand) to sucrose solution
- Sucrose solution with DNA then centrifuged
- Larger DNA fragments travel differently through the sucrose solution than small fragments
- Fractions of the fluid are then collected and assayed for ^{14}C to evaluate amount of DNA present at each gradient level
- Strand break frequency is estimated from distribution of fragment size



Sedimentazione dei “nucleoidi”

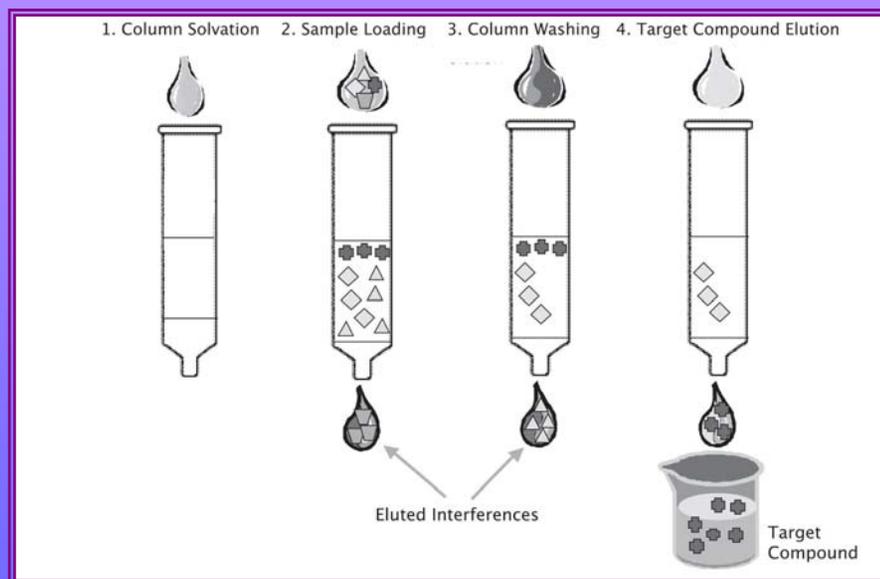
- Sucrose gradient solution is used
- Cells are lysed at neutral pH in the presence of high salt concentration and non-ionic detergent
- Interphase nucleus opens up, and chromatin strands are revealed. The individual broken strands are called nucleoids, and consist of supercoiled DNA still wrapped around residual protein structures
- Single strand DNA breaks allow the chromatin fragments to relax the supercoil and enlarge
- Differently sized chromatin fragments travel differently through the sucrose solution
- Sometimes, a fluorescent dye is added, and resulting halos can be measured by microscopy (= the *halo method*)



Supercoiled DNA

Per filtrazione: Neutral filter elution

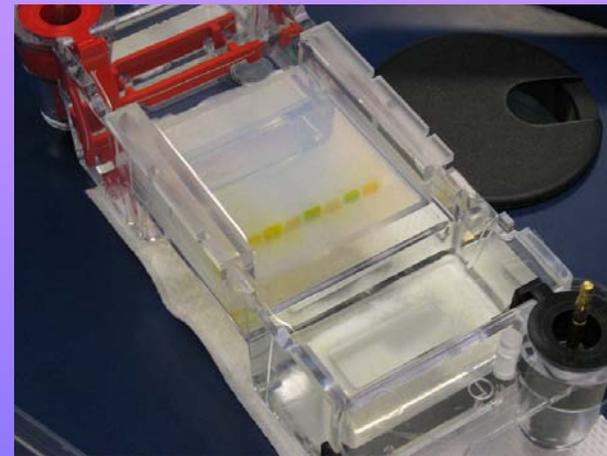
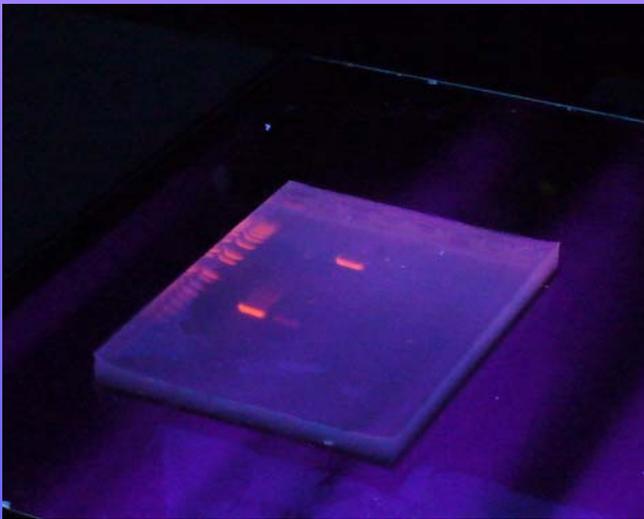
- Filter with pore size ~2 μ m (DNA fiber has diameter ~25nm, 100x smaller)
- Cell DNA is radiolabeled (e.g. 14 C)
- Cell lysis induced, DNA released (depending on solution as single strand or double strand) on top of filter
- Elution buffer solution is used to wash DNA fragments through the filter
- Rate of DNA elution is related to size of DNA fragments
- Double strand breaks are assayed at pH 7.4-9.6, single strand breaks are assayed at more alkaline pH 12.3



Elettroforesi

L'**elettroforesi** è una tecnica classicamente utilizzata per analizzare e separare particelle elettricamente cariche immerse in un fluido per effetto di un campo elettrico applicato mediante una coppia di elettrodi al fluido stesso.

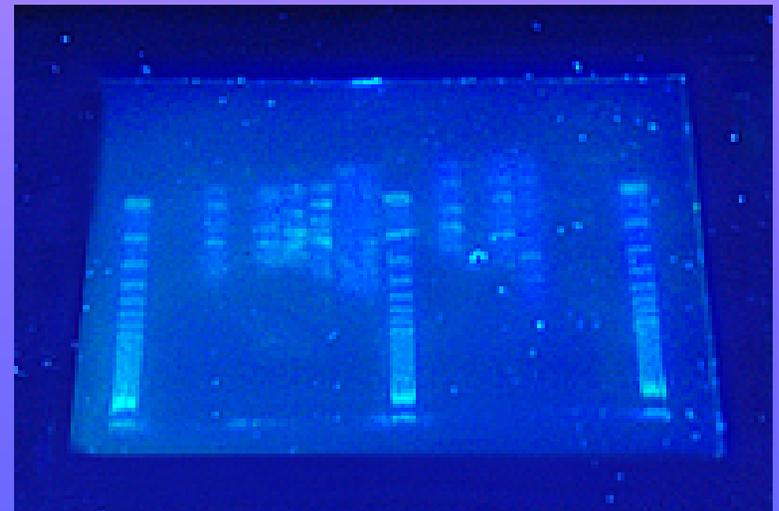
ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO sfrutta le cariche presenti nelle molecole di DNA O RNA (caricate negativamente) per farle migrare, in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio.



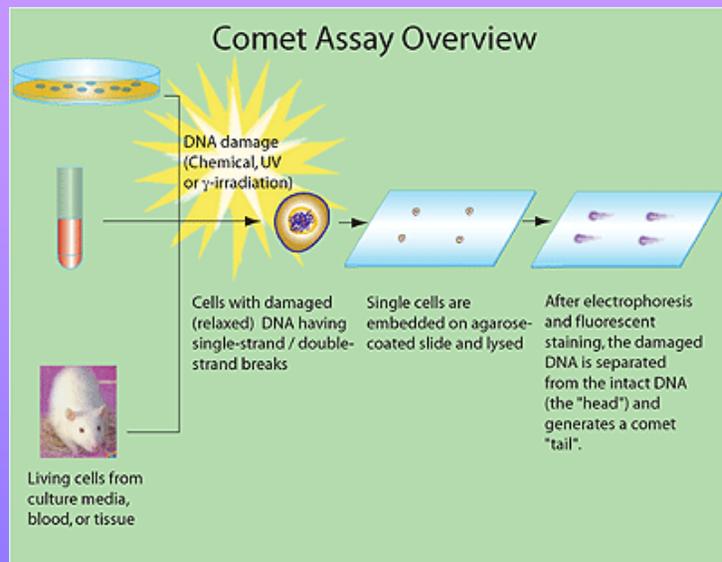
Le molecole vengono separate in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori del gel rispetto a quelle più grandi, quindi si avrà una separazione in funzione della velocità

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

- Agarose gel
- Cell DNA is radiolabeled (e.g. ^{14}C) or DNA-specific fluorescent dye is used after the electrophoresis
- Cell lysis induced, DNA released (depending on solution as single strand or double strand) to agarose gel
- Fragments of DNA carry a net negative charge
- Electric field is applied to the agarose gel, and DNA fragments travel at speed inversely related to their size
- Constant field electrophoresis can work, but separation of fragments is improved by pulsing the field at different directions to axis of migration

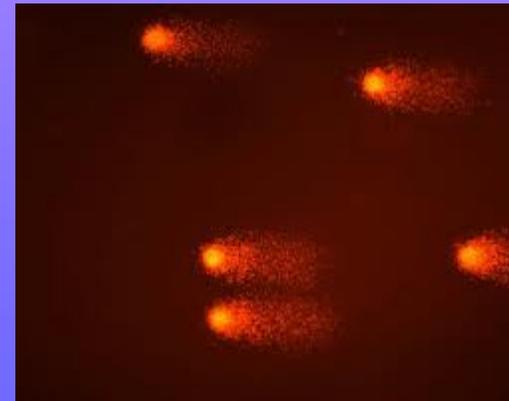


Single-cell gel electrophoresis (Comet assay)

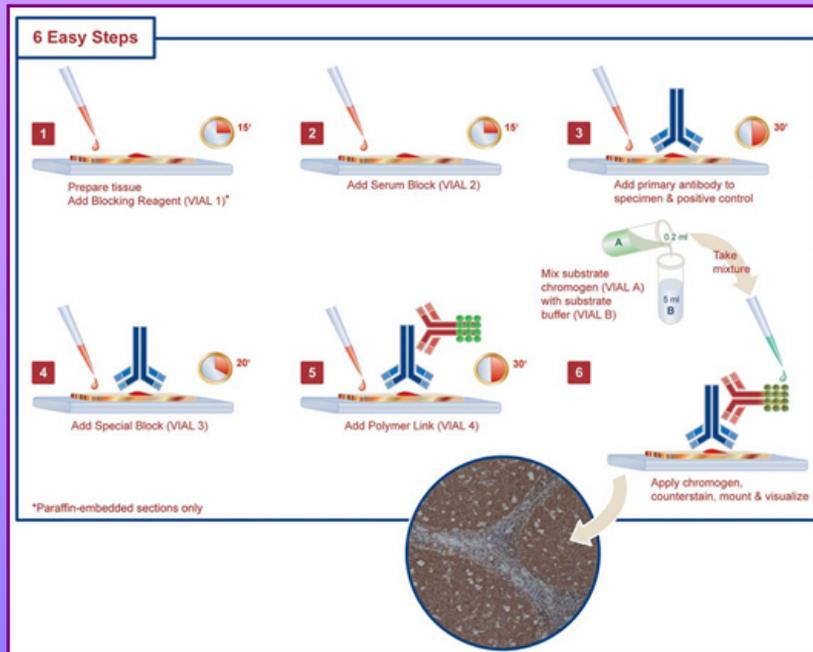


- Cells are embedded in agarose gel and then lysed to release DNA in-situ
- Electric field is applied, and DNA fragments migrate away from the DNA mass in the nucleus outward
- The shape of the resulting migration structure resembles a comet, hence the name

- Double strand breaks are assayed at neutral pH, while single strand breaks are assayed at alkaline pH
- High sensitivity to SSB, though not as much for DSB

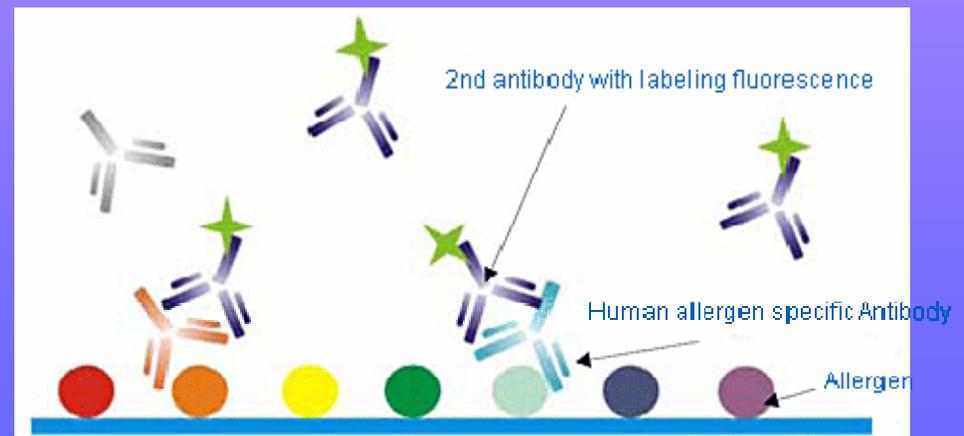


Immunoistochimica/Immunofluorescenza

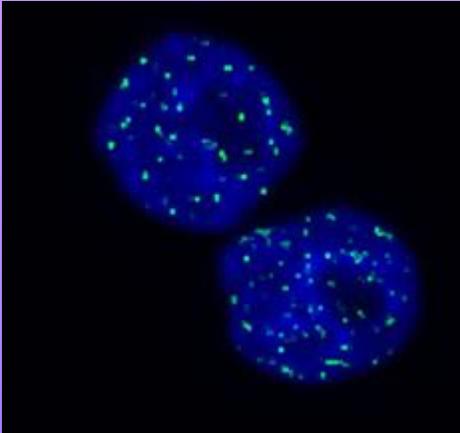


Metodiche che utilizzano reazioni antigene-anticorpi per marcare specifiche molecole in sezioni di tessuti, la cui localizzazione è determinata con metodi

- enzimatici (perossidasi, fosfatasi)
- fluorescenti.

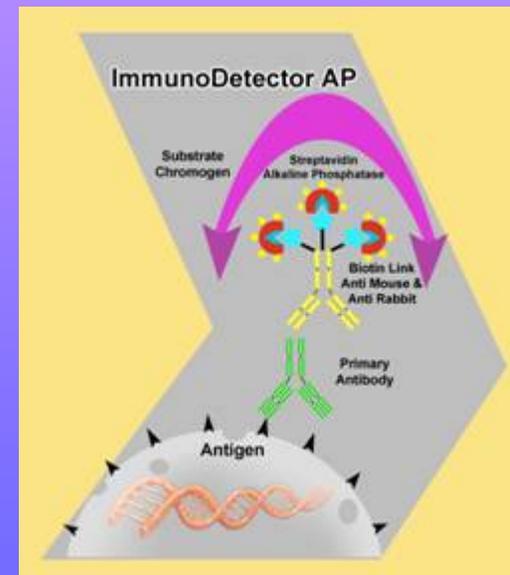


Gamma-H2AX assay



- IHC is very labor intensive and not easily implemented in a routine practice, but allows detection of ~10X lower level of DNA damage

- This assay is a highly sensitive method for detecting presence (and/or repair) of individual DSBs



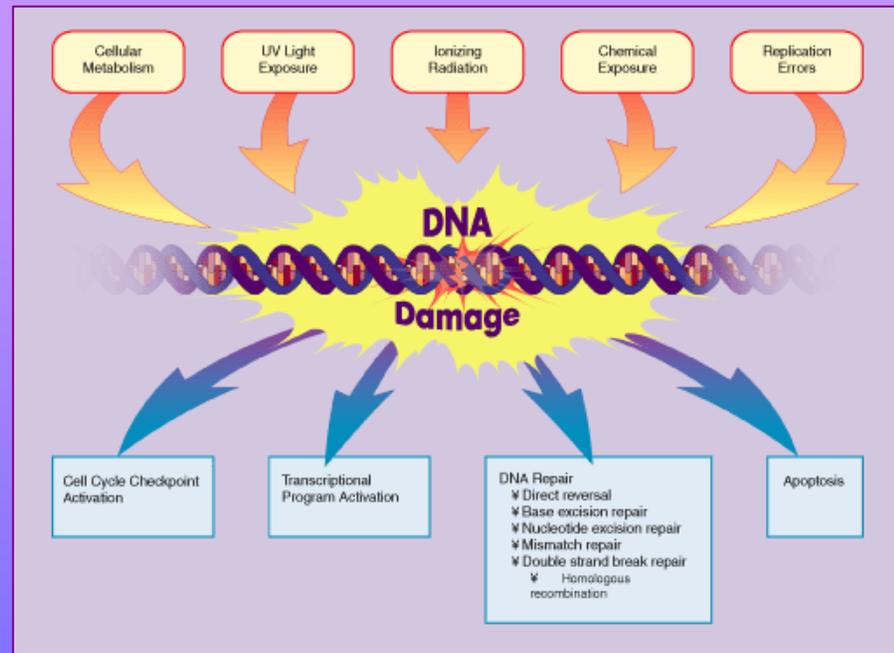
Risposta al danno al DNA

La CASCATA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE è divisibile nei seguenti step:

“segnale” = danno al DNA



1. “sensing” = individuazione della presenza del danno mediato da proteine leganti il DNA-danneggiato
2. “transducing” = attivazione di una cascata di protein-chinasi (trasduttori) che amplificano e diversificano il segnale della presenza del danno
3. “effecting” = induzione di una serie di processi costituenti la risposta cellulare al danno al DNA



Meccanismi di riparazione per escissione

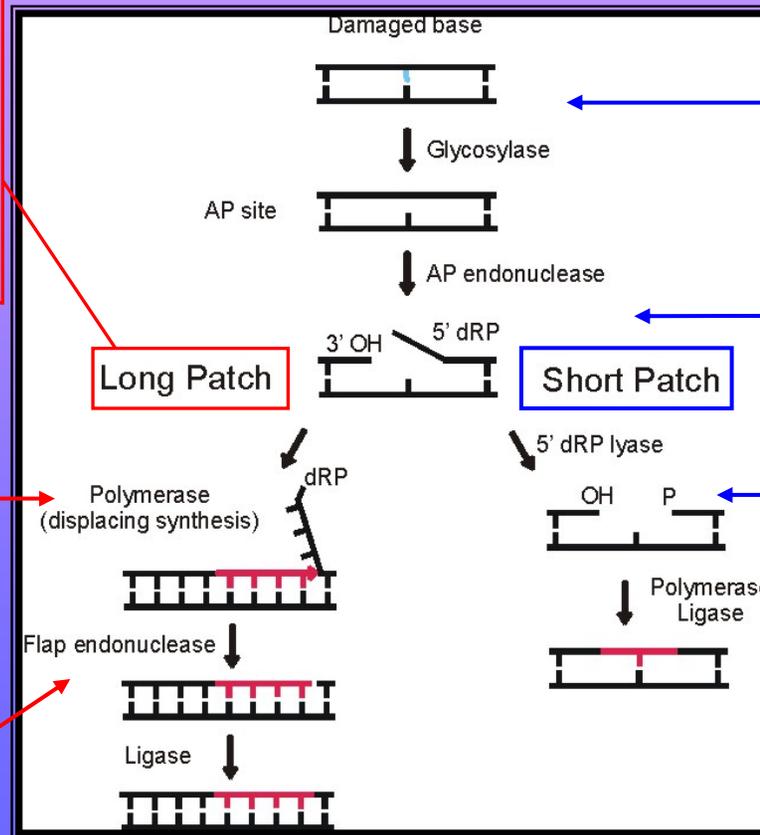
1) Base Excision Repair (BER)

Riparazione mediante asportazione di basi

Viene attivata quando vi sono più basi danneggiate vicine o quando la base danneggiata è resistente all'attività liasica della DNA pol beta con sostituzione di 2-10 nucleotidi

RCF/PCNA/DNA polimerasi δ/ϵ catalizzano l'aggiunta del nuovo oligonucleotide rimuovendo quello preesistente

La FEN1 endonucleasi taglia l'oligonucleotide "flap" preesistente



Asportazione della base danneggiata per opera di una glicosilasi con formazione di un sito Apurinico/Apirimidinico;

Una AP endonucleasi taglia il legame fosfodiesterico all'estremità 5' del sito AP

Eliminazione del 5' desossiribofosfato abasico da parte della DNA polimerasi beta con attività liasica e aggiunta del nucleotide

Base Excision Repair (BER)

Riparazione mediante asportazione di basi

Alterazioni nella via di riparazione BER portano ad un aumento del tasso di mutazione, ma non incrementano la radiosensibilità cellulare.

Eccezione: mutazione del gene XRCC1



aumento di 1.7 volte della sensibilità alle radiazioni

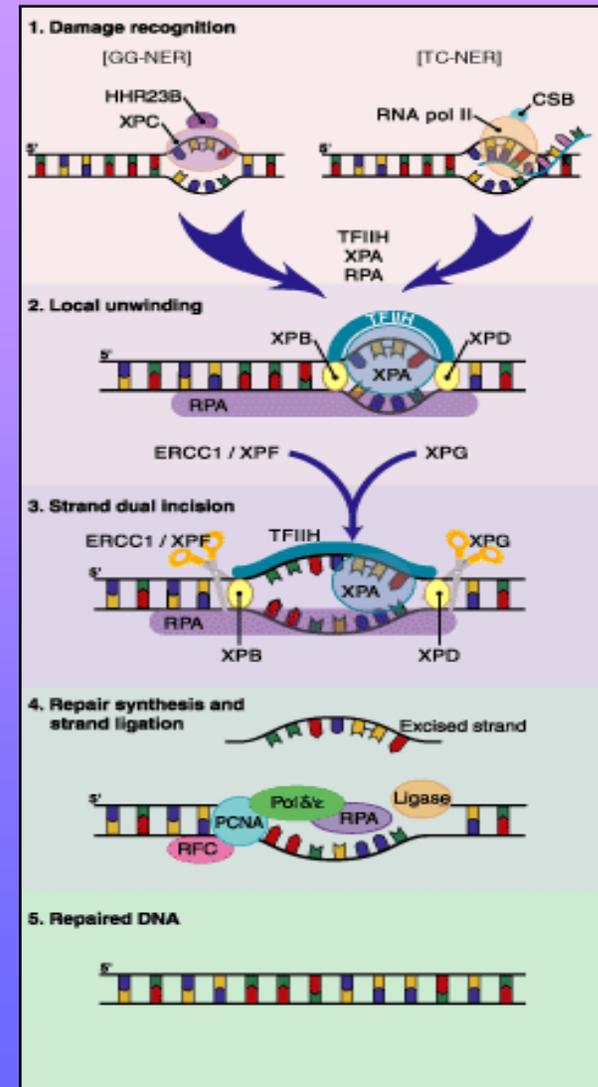
2) Nucleotide Excision Repair (NER)

Riparazione mediante asportazione di nucleotidi

Ripara danni che coinvolgono filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi includendo danni da voluminosa distorsione dell'elica, quali i dimeri di pirimidina, crosslink tra i filamenti di DNA e le rotture di un singolo filamento.

NER richiede l'azione di più di 30 proteine coinvolte in step successivi:

- 1) riconoscimento del danno (XPA ed XPE);
- 2) separazione della doppia elica comprendendo il sito di danno (XPB e XPD, elicasi);
- 3) taglio del filamento alle estremità del sito (XPF, XPG, a monte e a valle della lesione);
- 4) Rimozione dell'oligonucleotide danneggiato, sintesi dell'oligonucleotide corretto (DNA polimerasi δ/ϵ);
- 1) ligazione (DNA ligasi I).



Nucleotide Excision Repair (NER)

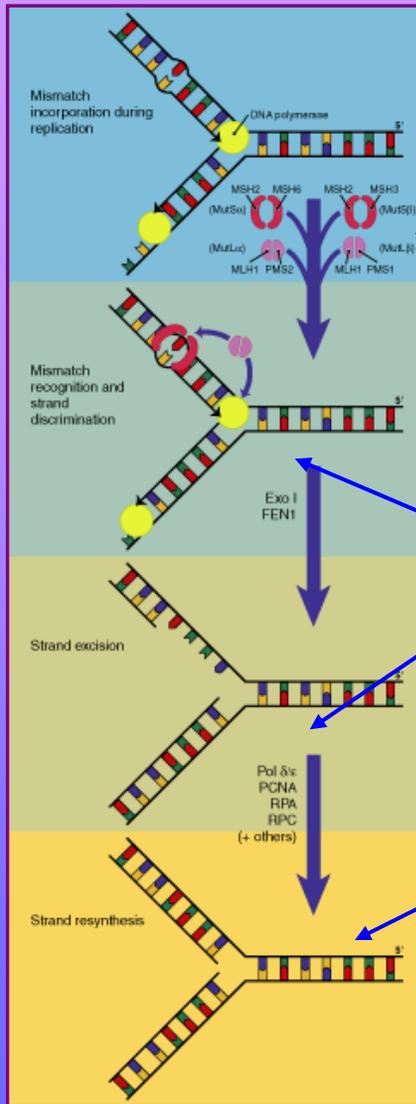
Riparazione mediante asportazione di nucleotidi

Mutazioni nei geni che codificano per le proteine coinvolte nella via di riparo NER non portano ad un aumento della radiosensibilità alle radiazioni ionizzanti.

Tuttavia se tale via di riparazione non è efficiente si osserva un aumento della sensibilità al danno indotto al DNA dai raggi UV e ad alcuni agenti anticancro.

L'insorgenza di mutazioni nei geni che codificano per proteine coinvolte nella via di riparazione NER nella linea germinale porta alla manifestazione fenotipica di alcune malattie come Xeroderma pigmentosum e Cockayne Syndrome.

MISMATCH REPAIR



Meccanismo di riparazione di inserzioni, delezioni e mismatch di basi dovuti ad errori che possono avvenire durante i processi di replicazione e ricombinazione del DNA

Riconoscimento della lesione

Excisione di un oligonucleotide contenente la lesione

Sintesi del nuovo oligonucleotide e ligazione

Riparazione cross-link

Il meccanismo di riparazione dei ponti DNA-DNA e DNA-proteina non è del tutto definito.

Probabilmente è necessaria una combinazione delle due vie
NER e HRR

Meccanismi di riparazione delle rotture del doppio filamento di DNA

- 'Homologous Recombination Repair' (Riparazione per ricombinazione omologa) (HRR)

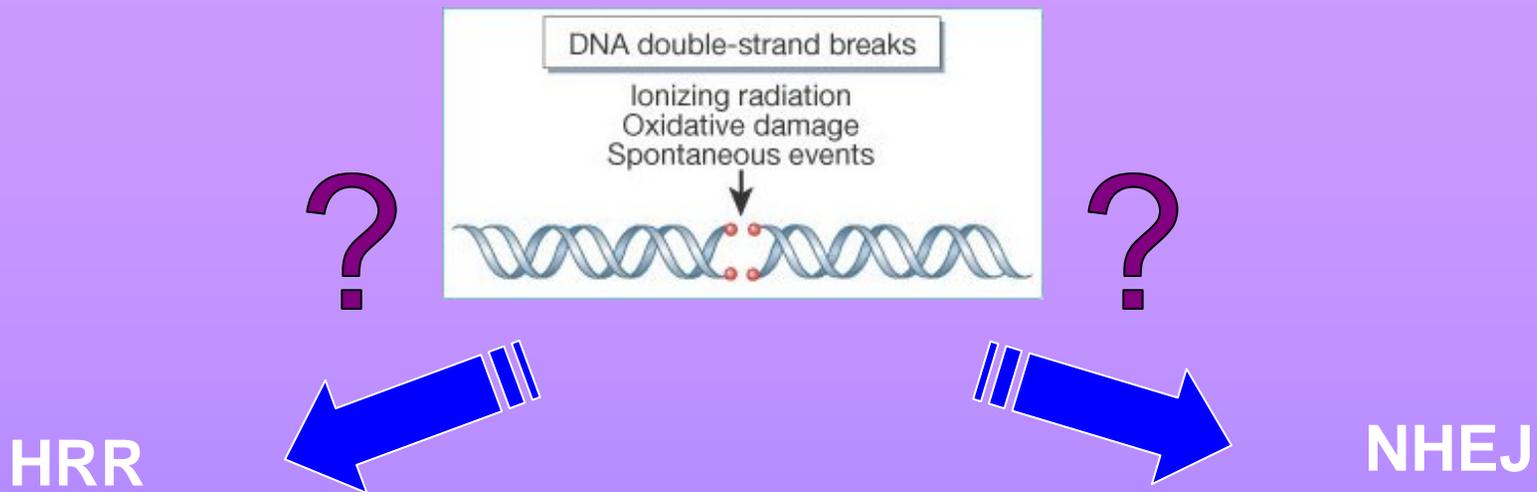


È un meccanismo Error-free, poiché la riparazione viene svolta copiando l'informazione dal cromatido/cromosoma omologo non danneggiato

- 'Non-Homologous End-Joining' (saldatura delle estremità non omologhe) (NHEJ)



è un meccanismo error-prone e genera molte delle lesioni premutageniche nel DNA delle cellule umane

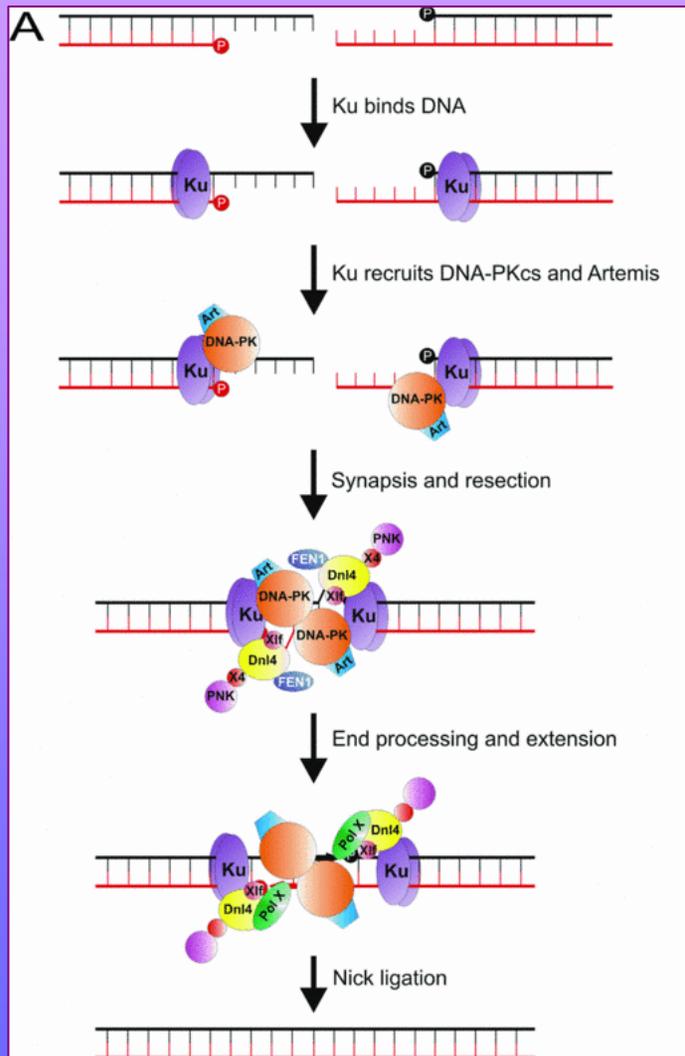


La scelta di quale dei due meccanismi di riparazione venga attivato dipende dalla fase del ciclo cellulare e quindi dalla quantità di DNA disponibile:

- HRR viene privilegiato nelle fasi S/G2 durante le quali è disponibile un cromatidio fratello da utilizzare come template
- NHEJ viene privilegiato nella fase G1 durante la quale il DNA non è stato ancora duplicato

Ma vi sono anche altri fattori che determinano quale dei due meccanismi venga attivato: è stata osservata la contemporanea attivazione dei due processi anche in cellule danneggiate in fase G2 di ciclo cellulare

'Non-Homologous End-Joining' NHEJ



Il meccanismo può essere suddiviso in 4 step:

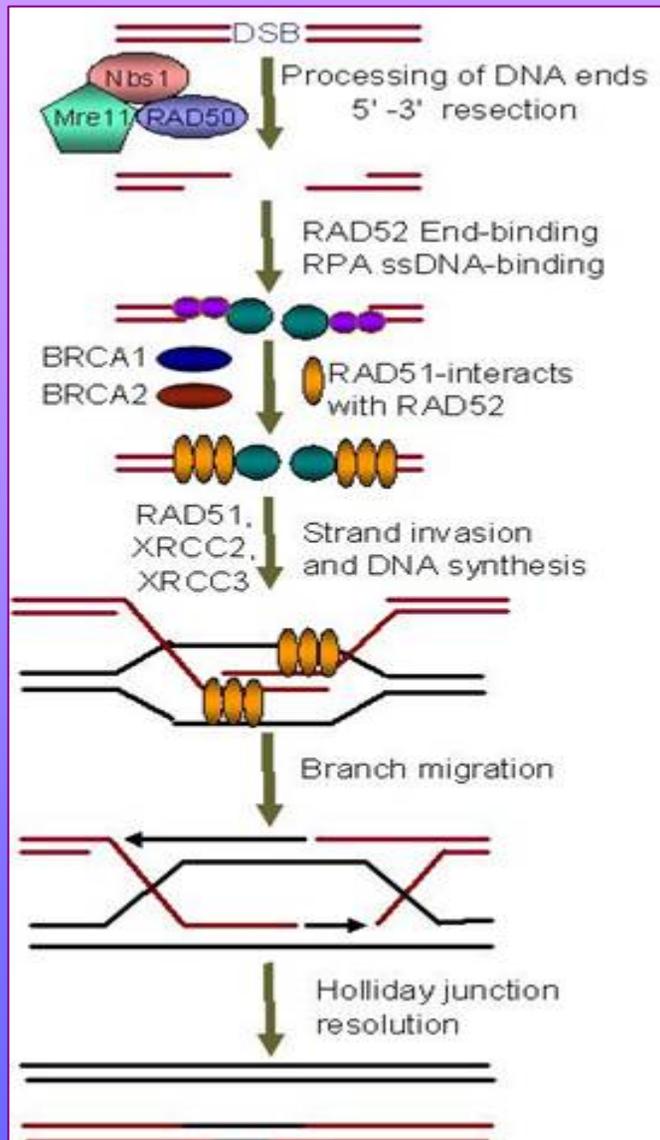
1. Riconoscimento delle estremità

2. Processamento delle estremità

3. "fill-in synthesis o end bridging

4. Ligazione

'Homologous Recombination Repair' (HRR)



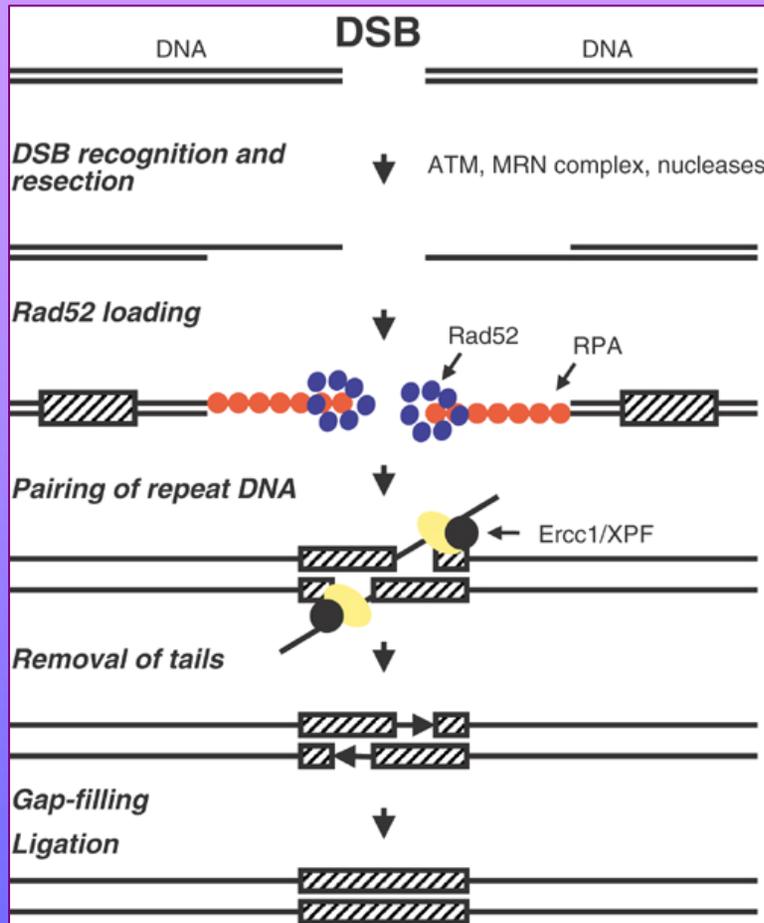
La risposta immediata consiste nell'attivazione di una serie di sensori che inducono il riparo del DNA e impediscono che la cellula prosegua attraverso il ciclo cellulare finchè il danno non sia stato riparato:

ATM e ATR



Fosforilano l'istone H2AX che recluta la proteina oncosoppressore BRCA1 al sito di rottura per regolare il complesso proteico del processamento delle estremità esposte

Single Strand Annealing (SSA)



Valerie K., *Oncogene* 2003

È un meccanismo intermedio al NHEJ e al HRR:

Le estremità del DNA vengono digerite da un'endonucleasi fino a che le sequenze omologhe non vengono esposte su entrambe le estremità

Le code non omologhe vengono tagliate con annealing delle estremità così ottenute.

L'SSA condivide parte dell'apparato del meccanismo HRR
Vi è la perdita di parte del materiale genetico

Nel caso in cui il danno non venga riparato venga riparato male, si ha
l'insorgenza di una
MUTAZIONE

Esistono due classi di mutazioni:

- Un cambiamento che avviene a livello della sequenza di un gene viene chiamata **MUTAZIONE GENICA**
- Un cambiamento nell'organizzazione di un cromosoma viene chiamata **ABERRAZIONE CROMOSOMICA o MUTAZIONE CROMOSOMICA**

ABERRAZIONI CROMOSOMICHE RADIO-INDOTTE

Si distinguono in due gruppi:

- **Aberrazioni cromosomiche:** nel caso in cui il danno avvenga quando la cellula si trova in interfase, prima che il materiale genetico sia stato duplicato. In tal modo, quando il DNA replicherà in fase S, anche il cromatidio fratello porterà la stessa rottura
- **Aberrazioni cromatidiche:** nel caso in cui il danno avvenga quando la cellula si trova in tarda interfase dopo che il DNA ha già duplicato. La radiazione potrebbe rompere solo uno dei due cromatidi fratelli, lasciando l'altro integro.

Esempi di aberrazioni radio-indotte:

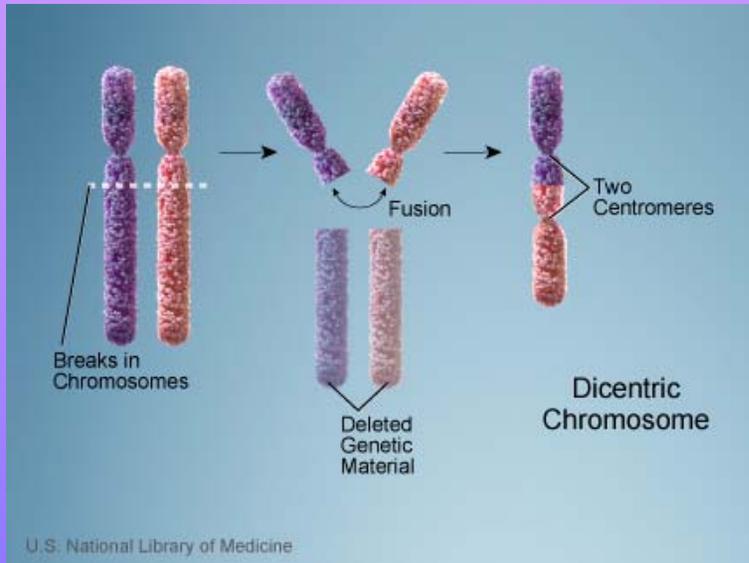
- Aberrazioni Letali per la cellula (portano alla morte riproduttiva):

CROMOSOMICHE	CROMATIDICHE
Cromosomi dicentrici	Ponti anafasici
Cromosomi ad anello	

- Aberrazioni non letali per la cellula:

CROMOSOMICHE	CROMATIDICHE
Traslocazioni simmetriche	Piccole delezioni interstiziali

Dicentrico



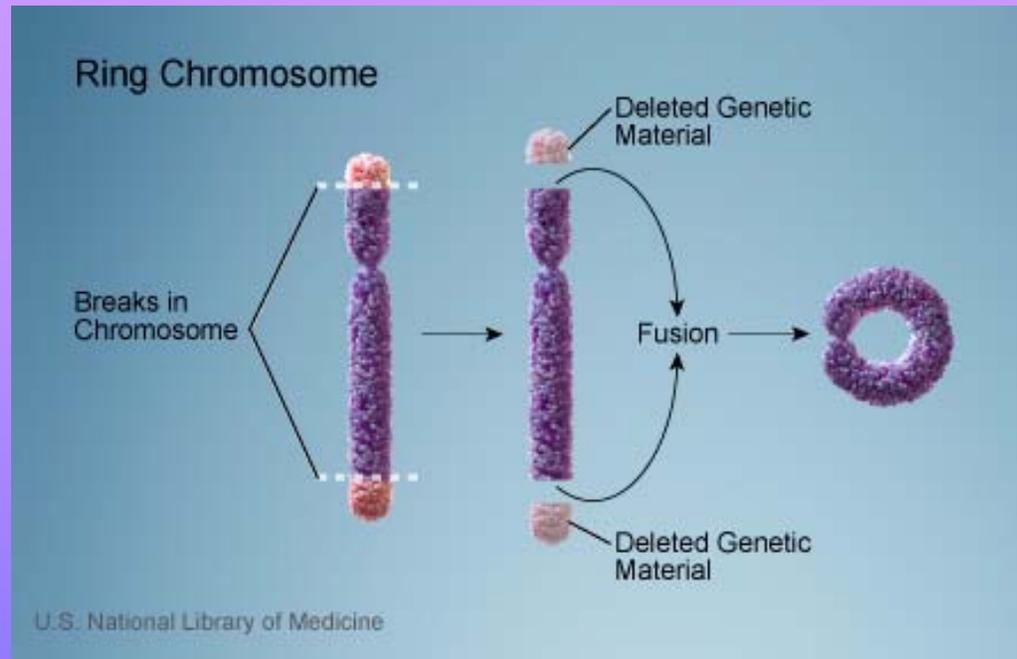
- Danno prodotto in interfase precoce su due cromosomi vicini;
- Le estremità libere dei due cromosomi si congiungono tra loro
- Si forma un cromosoma con due centromeri =

DICENTRICO

+

FRAMMENTO ACENTRICO
(senza centromero)

Cromosoma ad anello

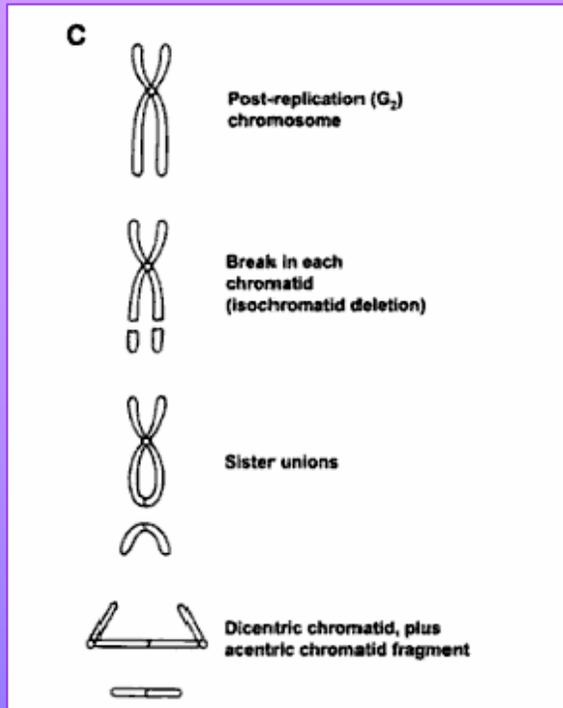


- Si verifica una rottura su ognuno dei due bracci di un cromosoma in pre-replicazione (G1);
- le estremità così formate si attaccano tra loro formando un cromosoma AD ANELLO che replicherà durante la fase S

+

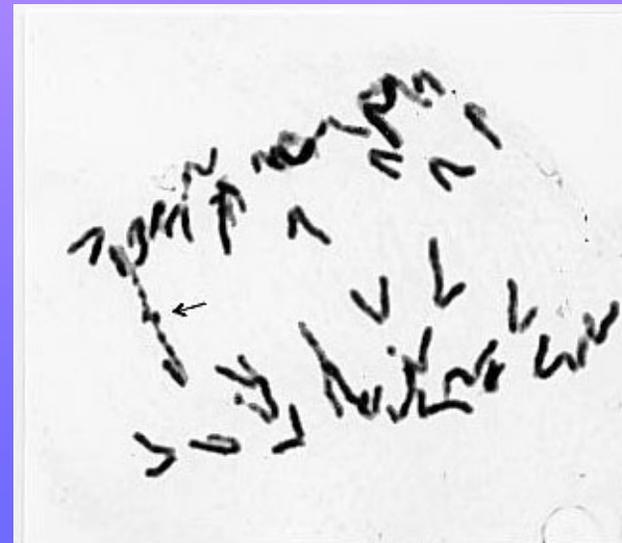
FRAMMENTI ACENTRICI

Ponte anafasico

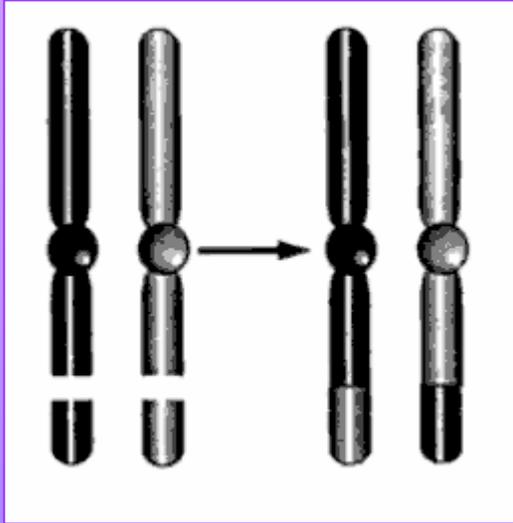


Tratto da "Radiobiology for the radiologist"
Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

- Durante la divisione mitotica (anafase) il fuso mitotico si lega al centromero del cromosoma portante il ponte, non potendo però completare la divisione dei due cromatidi fratelli, comportando la perdita dell'intero cromosoma



Traslocazione simmetrica

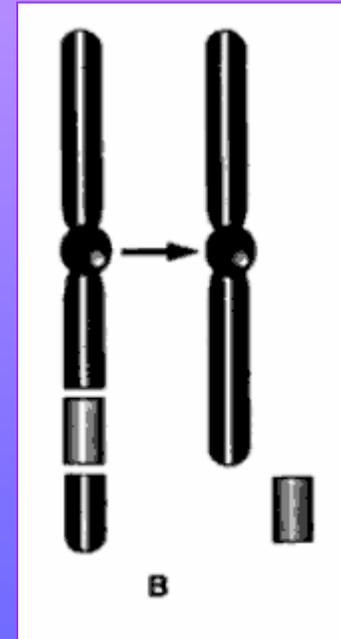


Tratto da "Radiobiology for the radiologist",
Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

- Si genera a seguito di rottura in due differenti cromosomi in fase G1 del ciclo cellulare.
- I due frammenti generati si ricongiungono con il cromosoma sbagliato

Piccole delezioni interstiziali

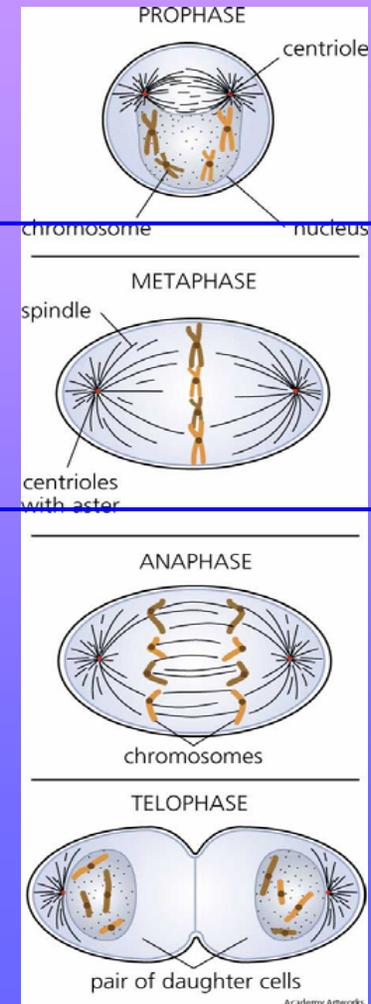
Risultano da due rotture sullo stesso braccio di un cromosoma, portando alla perdita del materiale genetico compreso tra le due rotture stesse



Tratto da "Radiobiology for the radiologist",
Eric J. Hall, Amato J. Giaccia

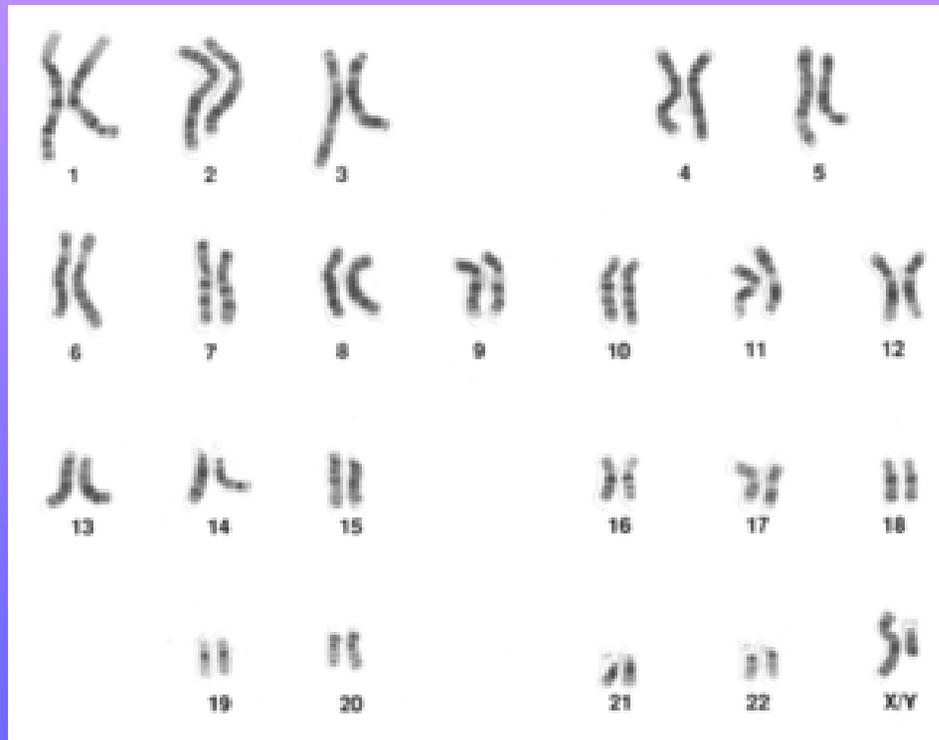
Tecniche di rilevazione delle aberrazioni cromosomiche

Le tecniche di rilevazione delle aberrazioni cromosomiche utilizzano preparati cromosomici metafasici:
fase del ciclo cellulare in cui i cromosomi appaiono visibili dato il loro alto grado di condensazione



Colorazioni: Giemsa, DAPI, Ioduro di propidio

Permette di valutare il numero e la morfologia dei cromosomi



BANDEGGIO CROMOSOMICO

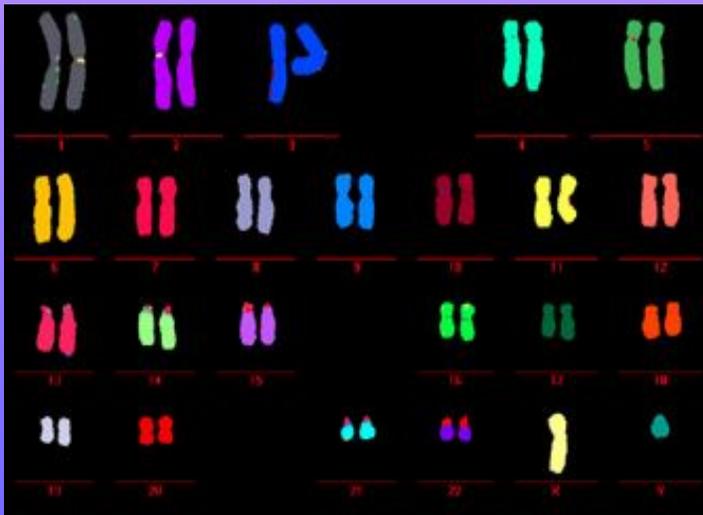
- BANDE G: trattamento con Tripsina, colorazione con Giemsa. Bande scure ricche in A e T
- BANDE Q: colorazione con Quinacrina (o DAPI o Hoechst), coloranti fluorescenti che si legano preferenzialmente alle zone ricche in A e T
- BANDE R: denaturazione al calore in soluzione salina, poi colorazione con Giemsa. Denaturazione delle zone ricche in A e T, quindi si ottiene un pattern di bandeggio “reverse” rispetto alle bande G
- BANDE C: denaturazione in soluzione satura di idrossido di bario, poi colorazione Giemsa. Mettono in evidenza l'eterocromatina costitutiva
- BANDE T: Trattamento aggressivo con calore e colorazione Giemsa, servono a evidenziare un gruppo di bande R localizzate in prossimità dei telomeri



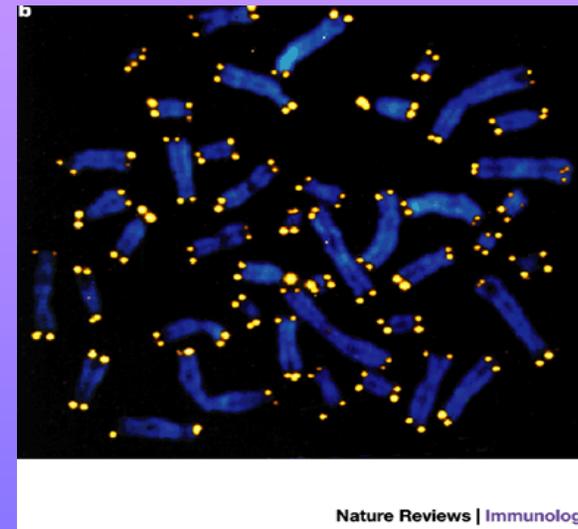
Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

Utilizza delle sonde a fluorescenza che si legano in modo selettivo a specifiche regioni del cromosoma. Per individuare il sito di legame tra sonda e cromosoma si utilizzano tecniche di microscopia a fluorescenza.

Q-FISH: si basa sulla metodolgia della FISH tradizionale ma permette un'analisi quantitativa delle sequenze target

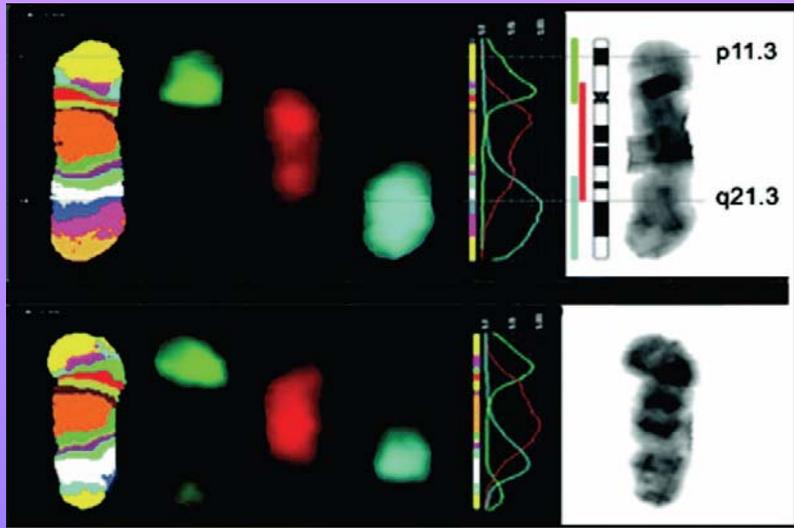


© 2006 University of Cambridge Veterinary School



La Multicolor FISH (M-FISH) permette la simultanea visualizzazione di tutti cromosomi con colori diversi. In questo modo è possibile analizzare l'intero genoma umano con un singolo esperimento di ibridazione in situ.

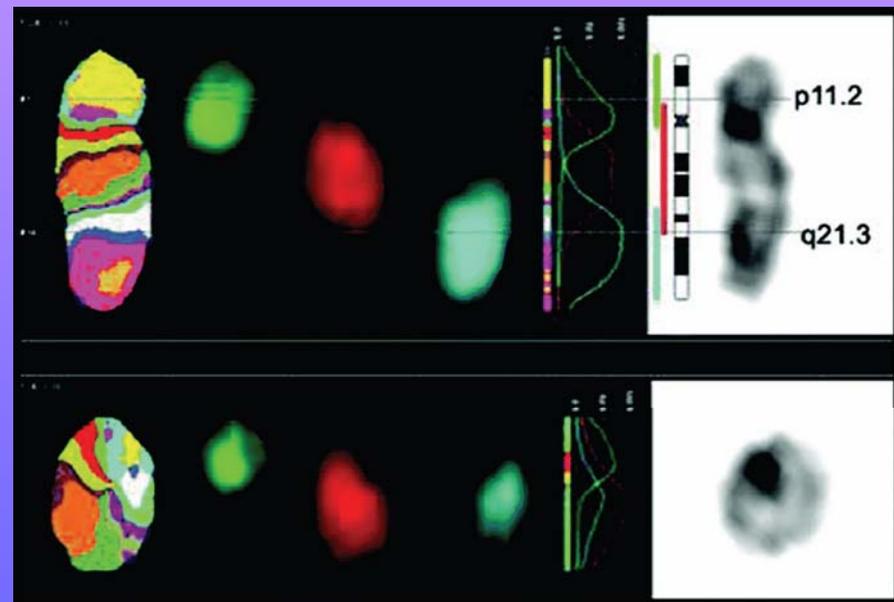
Multicolor banding (mBAND)



Hu et al, *JMD* 2006

- Le bande colorate consentono di identificare: aberrazioni cromosomiche, riarrangiamenti cromosomici particolarmente complessi e scambi intracromosomici (es. inversioni, delezioni, duplicazioni e inserzioni)

Permette di marcare regioni cromosomiche con una risoluzione di poche megabasi



Hu et al, *JMD* 2006

I MICRONUCLEI

Si formano durante la progressione metafase/anafase di una cellula in divisione mitotica e sono costituiti da cromosomi interi o da frammenti di cromosomi derivanti:

- da un evento di ritardo anafasico (ritardata migrazione del cromosoma durante l'anafase, conseguente perdita del cromosoma e mancata incorporazione nel nucleo di una delle cellule figlie)

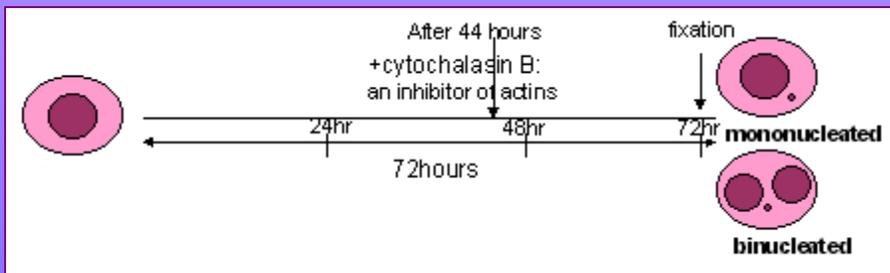
○

da un frammento di cromosoma acentrico che non si integra nel nucleo delle cellule figlie.

- I micronuclei sono quindi conseguenza sia di rotture di un singolo filamento (SSB) che di entrambi i filamenti (DBS) del DNA

TEST DEL MICRONUCLEO

- Consiste nell'aggiunta di citocalasina B (inibitore dell'actina che impedisce la progressione della divisione cellulare) al terreno di coltura cellulare dopo un certo numero di ore dall'irraggiamento e la lasciando agire per ulteriori 24 ore
- Al termine si procede con il fissaggio e la colorazione del nucleo



Testi consigliati:

- J.E. Coggle: *Biological Effects of Radiation*. Taylor & Francis, London, 2° Ed., 1983
o, in edizione italiana:
- J.E. Coggle: *Effetti biologici delle radiazioni*. edizione a cura di L. Bussi, Edizioni Minerva Medica, 1991
- Eric J.Hall, Amato J. Giaccia: *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams Wilkins, 6th Ed., 2006.
- C. Martinenghi: *Radiobiologia*. Cortina Raffaello Ed., 1984
- Peter J. Russel: *Genetica*. EDISES, 3th ed., 1998