



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.
Laurea di primo livello in Biologia Molecolare

Elaborato di Laurea

**Approcci di citogenetica molecolare su DNA elongato:
analisi ad alta risoluzione del sito fragile comune *FRA6E***

Tutor: Prof.ssa Antonella Russo
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Co-Tutor: Dott.ssa Laura Matricardi
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Laureanda: Elena Tosoni

Anno Accademico 2006/2007

1. Indice

1. <u>Abstract</u>	5
2. <u>Introduzione</u>	7
2.1 I siti fragili	7
2.2 <i>FRA6E</i>	7
2.3 Il problema della replicazione dei siti fragili comuni	8
2.4 Tecniche di citogenetica molecolare	9
3. <u>Materiali e Metodi</u>	11
3.1 Analisi bioinformatica: ricerca di cloni genomici	11
3.2 Colture batteriche e preparazione di BAC e PAC	11
3.2.1 Preparazione di gliceroli a partire da coltura liquida	12
3.2.2 Estrazione di DNA	12
3.2.3 Controllo del DNA estratto su gel di agarosio	13
3.3 Marcatura dei cloni attraverso <i>random priming</i>	13
3.3.1 Controllo della marcatura su gel di agarosio	13
3.4 FISH: <i>Fluorescence in situ hybridization</i> su DNA elongato	14
3.4.1 Preparazione di DNA elongato su vetrini	14
3.4.2 Precipitazione sonde	14
3.4.3 Denaturazione delle molecole estese di DNA e delle sonde	15
3.4.3.1 Denaturazione preparati	15
3.4.3.2 Denaturazione sonde	15
3.4.4 Ibridazione	15
3.4.5 Lavaggi di stringenza	15
3.4.6 Rilevazione del segnale	15
3.5 Analisi dei vetrini	16
4. <u>Risultati e Discussione</u>	17
4.1 Analisi bioinformatica: ricerca di cloni genomici	17
4.2 Estrazione di DNA	17
4.3 Preparazione dei gliceroli	18
4.4 Marcatura dei cloni genomici	19
4.5 FISH	21
4.5.1 FISH a singola sonda	21
4.5.2 FISH a tre sonde marcate con biotina (singola fluorescenza)	23
4.5.3 FISH a tre sonde marcate con biotina e digossigenina (doppia fluorescenza)	25
5. <u>Bibliografia</u>	27

1. Abstract

I siti fragili comuni sono larghe regioni di instabilità genomica che si trovano in tutti gli individui e appaiono come interruzioni cromatiche (*gap*) o rotture vere e proprie, in condizioni di stress. Alcuni geni di tali regioni presentano una funzione che suggerisce un possibile ruolo di geni oncosoppressori.

Per poter effettuare un'analisi dettagliata della struttura genomica a livello di singole molecole di DNA viene utilizzata la tecnica del *molecular combing*, con la quale si ottengono molecole di DNA elongate in modo uniforme ($1 \mu\text{m} = 2 \text{ kb}$). Queste regioni possono essere visualizzate grazie all'uso di cloni genomici (BAC e PAC) marcati che ibridano nella regione di interesse e l'applicazione della ibridazione *in situ* con fluorescenza. Inoltre, grazie ad approcci di immunofluorescenza, è possibile marcare DNA in replicazione e visualizzare le forche replicative sulle molecole elongate. Scopo di questo lavoro è l'identificazione di combinazioni di sonde adeguate a identificare la regione di interesse per i successivi studi di dinamica di replicazione.

2. Introduzione

2.1 I Siti Fragili

I siti fragili sono specifici *loci* che appaiono come interruzioni cromatiche (*gap*) o rotture vere e proprie, in cromosomi di cellule esposte in coltura a parziale inibizione della replicazione del DNA. Essi sono caratterizzati in due classi sulla base della frequenza in una popolazione: rari (o ereditabili), come il sito fragile del cromosoma X, sono presenti in meno del 5% della popolazione, sono associati con ripetizioni di tipo CGG_(n) o AT_(n) e segregano in maniera mendeliana. Essi si esprimono solo dopo sufficiente espansione delle sequenze ripetute ossia fanno parte della categoria delle mutazioni dinamiche (Arlt *et al.*, 2003). In contrapposizione, i siti fragili comuni (o costitutivi) sono larghe regioni di instabilità genomica che rappresentano una componente normale della struttura dei cromosomi. Tuttavia la probabilità di espressione dei siti fragili comuni è variabile da individuo ad individuo e differisce tra i diversi *loci*. Si conoscono quasi 90 diversi siti fragili comuni nel genoma umano (Arlt *et al.*, 2003).

Come si è detto, l'induzione della rottura cromosomica può avvenire in situazioni di stress (ad esempio trattamento con afidicolina) *in vitro*. Poiché è noto che i siti fragili comuni sono anche siti preferenziali di integrazione di DNA plasmidico in esperimenti di transfezione cellulare (Arlt *et al.*, 2003), essi potrebbero essere bersagli favoriti per l'integrazione *in vivo* di DNA virale (Arlt *et al.*, 2003; Popescu, 2003).

I siti fragili comuni non presentano, a differenza dei siti fragili rari, una chiara sequenza consenso che li contraddistingua; tuttavia è stato notato che al loro interno possono trovarsi geni particolarmente lunghi (più di 1 Mb) e caratterizzati dalla presenza di lunghe sequenze introniche come ad esempio *FHIT*, *PARK2* e *WWOX* presenti rispettivamente in *FRA3B*, *FRA6E* e *FRA16D* (Smith *et al.*, 2006). Alcuni di questi geni si pensa possano giocare un ruolo importante nello sviluppo del cancro: infatti molti tumori presentano delezioni o perdita di funzione in corrispondenza di questi geni. Essi presentano inoltre una funzione che suggerisce un possibile ruolo da geni oncosoppressori (Arlt *et al.*, 2003; Popescu, 2003).

2.2 FRA6E

FRA6E, localizzato sul cromosoma 6 umano in posizione 6q26, è il terzo sito fragile comune (CFS) più frequentemente osservato nella popolazione umana e si estende su una vasta regione di 9 Mb (Denison *et al.*, 2003; Russo *et al.*, in stampa). Diversi sono i geni identificati in questa regione tra cui *PARK2*, già citato precedentemente, associato alla sindrome di Parkinson giovanile

autosomica recessiva (Denison *et al.*, 2003). Questo gene da solo copre 1.36 Mb e comprende 11 piccoli esoni che producono un trascritto di 2.3 kb. La sua espressione è sottoregolata nel 60% dei tumori ovarici analizzati e molti tumori presentano un trascritto alternativo di *PARK2* la cui funzione non è stata ancora chiarita (Smith *et al.*, 2006).

2.3 Il problema della replicazione dei siti fragili comuni

Un modello per spiegare l'instabilità dei siti fragili comuni si basa sul ruolo di proteine quali ATR, BRCA1 ed altre implicate nel mantenimento della stabilità del genoma (Arlt *et al.*, 2003).

Come si è detto i siti fragili sono indotti da agenti che ritardano o inibiscono la replicazione o la riparazione del DNA e rappresentano probabilmente regioni di DNA a singolo filamento (non replicato) dove è avvenuto un blocco della forca replicativa seguito da parziale inibizione della DNA polimerasi (Arlt *et al.*, 2003). L'analisi di cellule con mutazioni in geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare o con geni coinvolti nella riparazione di rotture della doppia elica porta ad intuire un meccanismo dell'espressione dei siti fragili basato sullo stallo della forca replicativa: tale evento è riconosciuto durante la fase S del ciclo cellulare o durante il controllo della transizione G2/M, nella quale ATR e BRCA1 giocano un ruolo chiave.

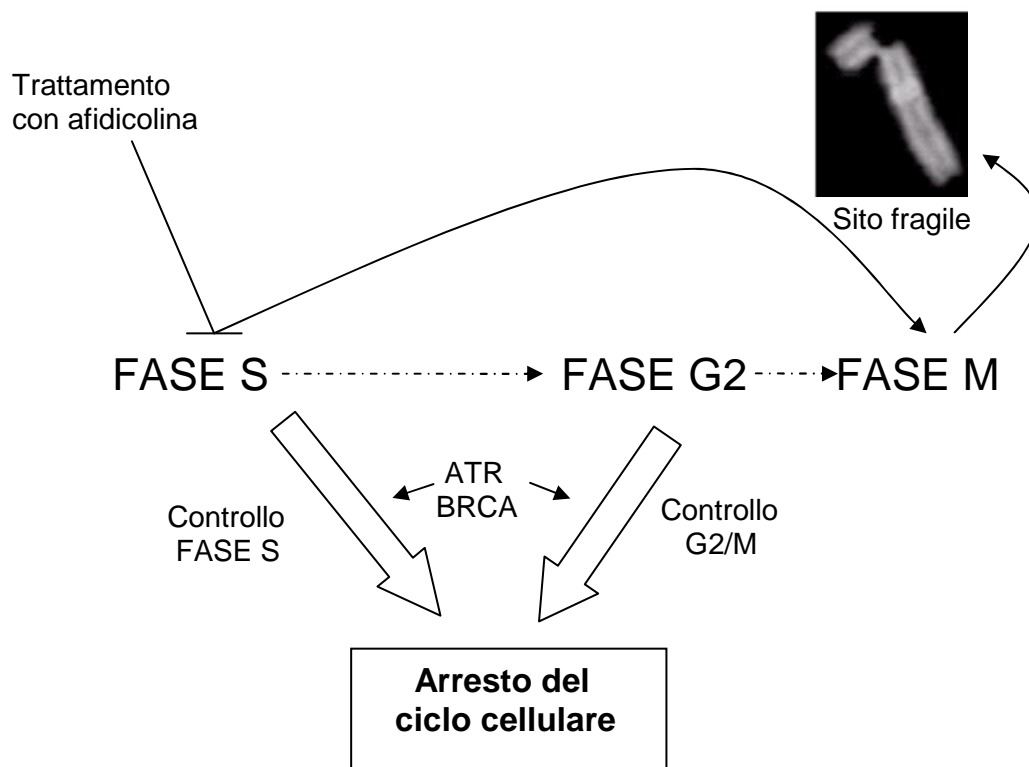


Figura 1. Modello dell'espressione dei siti fragili comuni (adattato da Arlt *et al.*, 2003).

2.4 Tecniche di citogenetica molecolare

Per caratterizzare dal punto di vista molecolare un sito fragile le metodologie di studio si basano sull'analisi di cromosomi metafasici mediante FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Ciò consente anzitutto di mappare accuratamente il sito fragile e di definirne la dimensione. I siti fragili non hanno un punto di rottura puntiforme, a livello di un nucleotide, ma lungo una sequenza molto più estesa. Vengono utilizzate sonde di DNA specifiche per la regione di interesse (cloni BAC, PAC, YAC) il cui segnale di ibridazione può essere visualizzato al microscopio a fluorescenza mediante anticorpi specifici coniugati con molecole fluorescenti che emettono determinate lunghezze d'onda. L'analisi della posizione della sonda rispetto alla rottura che può risultare prossimale, distale o bipartita se la sonda riconosce una regione appartenente al sito fragile, sempre prossimale o distale se la sonda si trova al di fuori (e rispettivamente estremità centromerica oppure all'estremità telomerica dello stesso sito), permette di definire i confini del sito fragile sul cromosoma. In questo modo si è compreso che la maggior parte dei siti fragili comuni fin qui studiati si estendono per regioni di 1 Mb o più (Arlt *et al.*, 2003). Un'analisi effettuata con più sonde appartenenti ad un contiguo di cloni permette inoltre di evidenziare i siti preferenziali di rottura all'interno della regione, mediante la percentuale relativa di posizioni prossimali o distali rispetto alla rottura. Diversi siti fragili compreso *FRA6E* risultano possedere uno o più *hotspot* di rottura intervallati da regioni caratterizzate da minore fragilità (Russo *et al.*, in stampa).

Anche per lo studio della dinamica replicativa la FISH è di grande utilità, ad esempio consente di discriminare tra regioni replicate e non del genoma in nuclei interfasici. Usando una sonda di DNA specifico per la regione di interesse, ci si attendono due segnali fluorescenti per nucleo, corrispondenti alla coppia di cromosomi omologhi. Tuttavia, se questi segnali risultano duplicati ciò suggerisce che la replicazione di quella regione sia avvenuta, al contrario invece per quanto riguarda la presenza di un segnale uniforme. Se si studia una popolazione proliferante non sincronizzata, la prevalenza di nuclei con due segnali entrambi duplicati è tipica di regioni ad attiva replicazione, mentre una prevalenza di segnali "singoli" indica che la regione è a replicazione tardiva. Se invece si osserva di frequente un segnale singolo ed uno duplicato nello stesso nucleo, ciò indicherà che esiste un'asincronia di replicazione a quel *locus*.

Per determinare la relazione tra origini e tempo di replicazione è necessario invece utilizzare tecniche di FISH a maggiore risoluzione. La FISH su molecole estese di DNA (*molecular combing*, vedi Fig. 3) è una tecnica di citogenetica molecolare ad elevata risoluzione per lo studio della struttura dei genomi e/o per l'analisi della replicazione del DNA a livello di singole molecole. L'applicazione del *molecular combing* (Lebofsky e Bensimon, 2006, Caburet *et al.*, 2002) permette di allungare molecole di DNA in maniera controllata e prevede due fasi: legame delle estremità di singole molecole sulla superficie di un vetrino silanizzato, cioè carico positivamente, ed estensione in modo uniforme di ogni molecola grazie all'azione di una forza costante che si genera quando il vetrino viene estratto dalla soluzione di DNA. Inoltre la tensione prodotta dal menisco aiuta le molecole ad allinearsi alla superficie. È stato dimostrato che la relazione fra la lunghezza delle molecole estese e le sue dimensioni in kb è costante ($1 \mu\text{m} = 2 \text{ kb}$). Dopo il

combing, le regioni di interesse sono visualizzate con ibridazione *in situ* e tecniche di immunofluorescenza grazie al legame irreversibile delle molecole alla superficie. Le sonde sono rilevate e i segnali sono amplificati con diversi strati di specifici anticorpi coniugati con diversi fluorofori. Le origini di replicazione e la velocità di replicazione possono essere determinate dall'incorporazione lungo intervalli temporali definiti di nucleotidi modificati (alle cellule in replicazione vengono infatti forniti in successione IdU e CldU). Dall'immagine acquisita si osserveranno filamenti costituiti da tratti verdi e rossi, il segnale verde rileva la IdU, il primo analogo introdotto, mentre quello rosso la CldU. Le forche replicative analizzabili ed informative (vedi schema Fig. 2) saranno solo quelle bidirezionali e complete ovvero che presentano in entrambe le direzioni prima un segnale verde e successivamente rosso. Con queste forche è possibile quindi definire l'origine di replicazione e la velocità secondo la legge spazio/tempo.

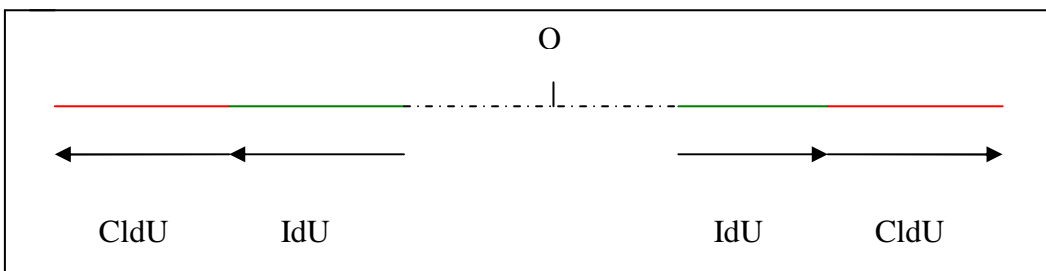


Figura 2. Schema rappresentante una forca replicativa bidirezionale.

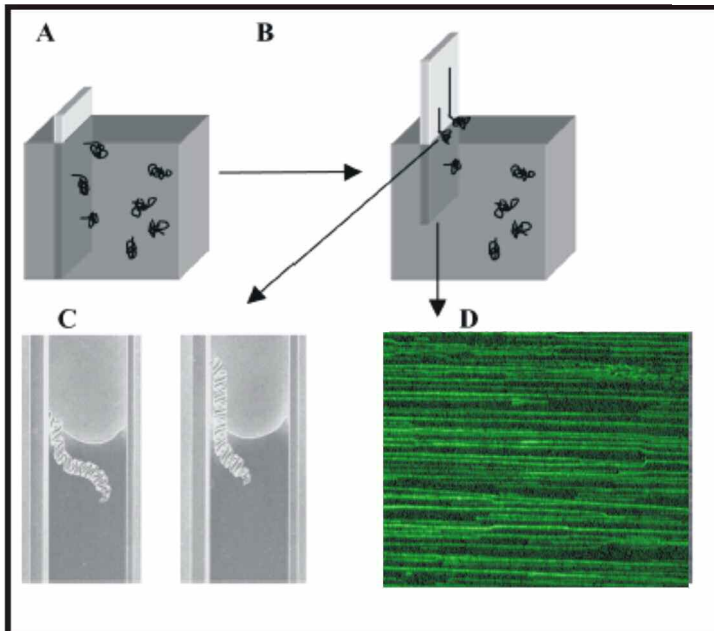


Figura 3. Le fasi del *molecular combing* (adattato da Lebofsky *et al.*, 2003).

3. Materiali e Metodi

3.1 Analisi bioinformatica: ricerca di cloni genomici

Per avviare questo studio ho partecipato anzitutto alla ricerca di cloni genomici adeguati. Le regioni che si intendono analizzare sono molto vaste ed è stato utile suddividerle in sottoregioni per poterle meglio caratterizzare. I cloni selezionati verranno utilizzati come sonde per identificare la regione di interesse su molecole estese di DNA attraverso la tecnica dell'ibridazione *in situ* fluorescente. La ricerca si basa sulla costruzione di motivi di ibridazione a tre sonde adiacenti ma non consecutive, come mostrato in Fig. 4; i cloni devono essere di dimensioni e distanze diverse tra loro, in quanto solo con questo pattern è possibile riconoscere posizione e orientamento delle sonde anche in caso di rottura delle molecole di DNA sulle quali le sonde ibridano. La distanza tra le sonde non deve essere superiore ai 100-250 kb in quanto aumenta la possibilità di visualizzare segnali di ibridazione su filamenti non integri, ed inoltre il campo visivo della telecamera è di circa 200 μm , ovvero 400 kb.

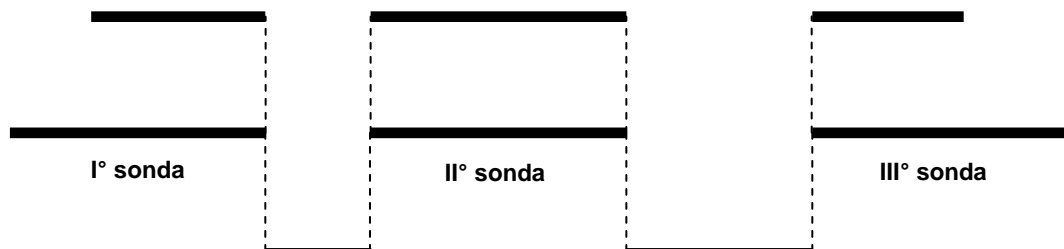


Figura 4. Schema del pattern di combinazioni di sonde adiacenti, ma non consecutive. La distanza tra sonde, che è una costante, consente di riconoscere la prima e la terza sonda anche nel caso ibridino su un filamento non integro (filamento superiore).

3.2 Colture batteriche e preparazione di BAC e PAC

Dopo aver scelto i cloni genomici, essi sono stati ordinati presso il *Children's Hospital Oakland Research Institute* (CHORI), USA. Questi sono BAC (cromosomi artificiali batterici) e PAC (cromosomi artificiali di P1) trasformati in *E. coli* ceppo DH10. I batteri sono stati forniti in terreno solido di coltura addizionato con l'antibiotico per il quale hanno la resistenza (BAC = cloramfenicolo, PAC = kanamicina).

Per la preparazione di una sospensione batterica, i batteri vengono seminati su piastre contenente LB agar nel quale viene aggiunto l'antibiotico specifico, cloramfenicolo alla concentrazione finale (C_f) di 170 $\mu\text{g/ml}$ oppure kanamicina alla C_f di 50 $\mu\text{g/ml}$. Dopo aver incubato le piastre a 37°C *overnight*, si ottengono colonie singole che vengono poi trasferite con un'ansetta sterile in LB liquido contenente l'antibiotico alla concentrazione sopra citata. Dopo incubazione

overnight a 37°C in agitazione, il giorno successivo si osserva la torbidità del terreno, indice di crescita batterica.

3.2.1 Preparazione di gliceroli a partire da una coltura liquida

Il glicerolo è una soluzione viscosa che non crea cristalli di ghiaccio che potrebbero rovinare la membrana dei batteri durante la conservazione a -80°C e ne evita così la morte.

Si preleva la sospensione batterica e la si centrifuga 5 min a 6000 rpm a temperatura ambiente; si elimina il terreno liquido di coltura. Il pellet si risospende in un volume di LB:glicerolo 1:1, nel quale si aggiunge il relativo antibiotico alle condizioni già indicate. Si trasferisce la sospensione in provette con tappo a vite che si conservano a -80°C.

3.2.2 Estrazione di DNA

Questa è una tecnica che permette l'estrazione di DNA da batteri, nel nostro caso utilizzata per purificare BAC e PAC.

Si preleva la sospensione batterica e la si centrifuga 5 min a 6000 rpm a temperatura ambiente, si elimina il terreno liquido di coltura. Si risospende il pellet nella Soluzione I di Risospensione (glucosio 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM e H₂Omq), contenente lisozima alla concentrazione di 4 mg/ml. Tale enzima è in grado di rompere il legame NAM-NAG presente nel peptidoglicano della parete dei batteri, una reazione endonucleasica.

Si aggiunge poi la Soluzione II di Lisi (NaOH 0.2 N, SDS 1% e H₂Omq), si mescola per inversione lentamente e si incuba 4 min a temperatura ambiente. Questo passaggio è molto delicato in quanto la soluzione deve lisare la membrana, ma non intaccare il DNA di interesse altrimenti esso si degrada. Per bloccare la reazione di lisi si aggiunge la Soluzione III di precipitazione fredda (CH₃COOK 3M, CH₃COOK 11.5% e H₂Omq), si mescola per inversione lentamente e si incuba in ghiaccio almeno 5 min. Si centrifuga 20 min a 14000 rpm a 4°C per precipitare i frammenti cellulari. Si preleva il surnatante contenente il DNA e si aggiunge 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico 25:24:1. Si agita per 30 secondi per inversione e si incuba 5 min a temperatura ambiente. Si centrifuga 3 min a 14000 rpm a 4°C, si trasferisce la fase acquosa in una provetta e si aggiunge un volume di cloroformio, si centrifuga per 3 min a 14000 rpm a 4°C e si preleva il surnatante contenente il DNA pulito. L'aggiunta di queste ultime soluzioni serve a purificare il DNA dalle proteine cellulari, che grazie alle centrifugazioni precipitano nel fondo della provetta. Si aggiunge un volume di isopropanolo, 1µl di glicogeno e si mescola per inversione. Il glicogeno si lega al DNA senza indurre danni, e così si può visualizzare più facilmente la sua presenza in soluzione. Si centrifuga 15 min a 14000 rpm 4°C, si elimina il surnatante e si lava il pellet con EtOH 70%. Si centrifuga 10 min a 14000 rpm 4°C e si risospende il pellet con TE 1X o H₂Omq. Si preferisce comunque il TE in quanto il DNA si mantiene più stabile in questa soluzione. Si aggiunge infine RNAsi (C_f 40µg/ml) e si incuba 30 min a 37°C. Il trattamento con RNAsi è di notevole importanza in quanto degrada l'RNA che fino al passaggio precedente è presente in soluzione con il DNA.

3.2.3 Controllo del DNA estratto su gel di agarosio

Dopo l'estrazione si controlla il DNA in un gel di agarosio all'1% in un buffer di TAE 1X; il gel quando solidifica forma delle maglie attraverso le quali il DNA può migrare se sottoposto ad una differenza di potenziale. Per ottenere una separazione migliore dei frammenti eventualmente si può far correre il DNA in un gel all'0.8% così la quantità di agarosio è minore e si formano maglie più larghe. Nella preparazione del gel si aggiunge anche il bromuro di etidio (C_f 500 ng/ml) che si intercala nel DNA e se transilluminato con UV e ne permette la visualizzazione.

Per poter visualizzare durante la corsa elettroforetica il campione viene aggiunto 1 μ l di *loading buffer* (blu di bromofenolo 0.25%, xilene cianolo e saccarosio in acqua).

Per valutare la qualità del DNA estratto si valuta come la banda si presenta nel gel: se ben definita indica un DNA integro, in caso di *smear* più o meno evidente sta ad indicare un DNA più o meno degradato. Il marker λ /Hind III è usato come riferimento di peso molecolare e stima della quantità di DNA, concentrazione ng/ μ l, confrontando l'intensità delle bande.

3.3 Marcatura dei cloni attraverso *random priming*

Il DNA estratto viene marcato con biotina o digossigenina mediante *random priming*, per essere poi utilizzato come sonda nella tecnica di ibridazione *in situ* fluorescente.

Al DNA stampo doppia elica vengono aggiunti dei *primer* esanucleotidici aspecifici che, dopo un'opportuna denaturazione, ibridano con esso. Si forniscono poi alla reazione un cocktail di dNTPs contenente un nucleotide marcato (biotina-16-dUTP oppure digossigenina-11-dUTP) e la Klenow, subunità della DNA polimerasi di *E. coli* che possiede attività polimerasica ma non nucleasica, e si avvia la reazione di allungamento. Poiché tutte le combinazioni di sequenze sono rappresentate nella miscela di esanucleotidi, il legame dei *primer* al DNA stampo avviene in modo casuale, e la marcatura risulta uniforme lungo tutto il DNA; si ottengono così frammenti amplificati nell'intervallo da 100-1000 pb.

3.3.1 Controllo della marcatura su gel di agarosio

La marcatura si controlla con gel di agarosio all'1% in un buffer di TAE 1X. La preparazione dei campioni prevede 1/10 del volume totale di marcatura e l'aggiunta di *loading buffer* per controllare la migrazione del DNA durante l'elettroforesi. Si caricano come riferimento 10 μ l di marker di peso molecolare λ /Hind III. Come risultato da questo controllo si dovrebbe ottenere uno *smear*, che indica la formazione dei frammenti amplificati in modo casuale di varie lunghezze.

3.4 FISH: Fluorescence in situ hybridization su DNA elongato

La FISH è una tecnica che permette di individuare determinate regioni grazie all'ibridazione di sonde marcate e rilevate con un sistema di immunofluorescenza. La FISH può essere applicata sia su preparati cromosomici che interfascici, su fibra cromatinica o su molecole estese di DNA. In questa esperienza ho applicato questa ultima variante, che si divide in diverse fasi.

3.4.1 Preparazione di DNA elongato su vetrini

La tecnica del *molecular combing* (Lebofsky e Bensimon, 2006) permette la preparazione di DNA esteso su vetrini coprioggetto 22X22. La tecnica del *molecular combing* permette di allungare molecole di DNA in maniera controllata e costante, prevede due fasi: legame delle estremità di singole molecole sulla superficie di un vetrino silanizzato, cioè carico positivamente, ed estensione in modo uniforme di ogni molecola grazie all'azione di una forza costante che si genera quando il vetrino viene estratto dalla soluzione di DNA. Inoltre la tensione prodotta dal menisco favorisce l'allineamento delle molecole alla superficie.

I preparati di DNA, ottenuti mediante una procedura che ne consente l'estrazione ad alto peso molecolare, erano già disponibili in laboratorio, e derivano da linfociti umani primari.

L'estensione su vetrini silanizzati avviene mediante un apparecchio dedicato (Genomic Vision) che controlla le fasi sopra descritte. I preparati sono immediatamente fissati con una goccia di colla sul vetrino portaoggetto e, posti ad incubare 4 ore a 60°C.

I vetrini possono quindi essere immediatamente sottoposti alle procedure di ibridazione e immunofluorescenza, oppure vengono conservati a -20°C per essere utilizzati successivamente (fino ad almeno un anno).

3.4.2 Precipitazione sonde

Con la precipitazione delle sonde marcate singolarmente si crea il cocktail per l'ibridazione sulle molecole estese di DNA da analizzare.

Le sonde vengono precipitate con il DNA *Cot-1*, la frazione arricchita nelle sequenze altamente ripetute del genoma; vengono così saturati i siti ripetuti delle sonde e del DNA elongato, e si evita un'ibridazione aspecifica. Si aggiunge al cocktail del DNA di salmone (10 mg/ml), che derivando da un'altra specie non correlata satura sequenze altamente ripetute, e glicogeno (1 µl). Infine si aggiunge NaAc 3M, etanolo assoluto e H₂O. Si incuba a -80°C per almeno 20 min oppure a -20°C anche fino al giorno successivo. Questa incubazione permette al DNA di precipitare. Si centrifuga 30 minuti a 14000 rpm a 4°C, si elimina il surnatante e si lava il pellet con etanolo 70%. Si centrifuga 10-15 min a 14000 rpm a 4°C, si elimina la fase acquosa quindi si risospende in un buffer di ibridazione (detto H3) contenente formamide 50%, SSC 2X, SDS 0.5%, N-Lauroylsarcosine 1X, NaCl 10 mM e Block Aid (Molecular Probes) 1X, calcolando 20 µl per vetrino da ibridare.

3.4.3 Denaturazione delle molecole estese di DNA e delle sonde

Bisogna denaturare il DNA e le sonde affinché possa essere favorita la successiva ibridazione.

Un metodo usato per la denaturazione della doppia elica è l'innalzamento della temperatura, utilizzato per le sonde. Un modo chimico per favorire la denaturazione, utilizzato invece per i preparati, consiste nell'innalzamento del pH dell'ambiente in cui il DNA è presente. Un pH elevato prevede la presenza di numerosi anioni idrossido OH⁻ che destabilizzano i legami idrogeno tra le basi appaiate.

3.4.3.1 Denaturazione preparati

Si incubano i vetrini in soluzione denaturante, contenente NaOH(0.05 M), NaCl (1 M) e H₂O, per 15 min al buio, in agitazione e poi si effettua un breve risciacquo con Tris-HCl 0.01 M pH 7.6 freddo per riequilibrare il pH. Successivamente si fanno tre lavaggi seriali da 3 min ciascuno con etanolo 70%, 90%, 100%, per disidratare il preparato. I vetrini vengono asciugati con un getto d'aria tiepida per completare l'evaporazione dell'etanolo.

3.4.3.2 Denaturazione sonde

Si incuba il mix di sonde in un bagnetto a 80°C per 10 min e poi si lascia in ghiaccio per almeno 5 min prima di ibridare.

3.4.4 Ibridazione

Si aliquotano 20 µl per vetrino di mix di ibridazione. Viene utilizzato infatti un volume ridotto per favorire la reazione. Si chiude il vetrino con il silicone per evitare che ci sia evaporazione della soluzione e si incuba *overnight* a +37°C in camera umidificata, un contenitore ermetico nel quale è riprodotto un ambiente umido grazie alla presenza di un foglio di carta assorbente imbevuto di ddH₂O.

3.4.5 Lavaggi di stringenza

Si rimuove la colla sigillante, con un colpo secco il coprioggetto e si iniziano i lavaggi di stringenza: 3 lavaggi da 5 min con soluzioni formamide 50%, SSC 2X e 3 lavaggi da 5 min con SSC 2X. Questi lavaggi vengono effettuati per eliminare l'eccesso di sonda non legata o che si è legata in modo aspecifico.

3.4.6 Rilevazione del segnale

I due sistemi usati in questi esperimenti di marcatura indiretta sono il sistema biotina-streptavidina che utilizza l'affinità estremamente elevata di due ligandi: la biotina (una vitamina presente in natura) e la proteina batterica streptavidina (SAV) che è la molecola di affinità. L'altro sistema utilizzato è la digossigenina, uno steroide vegetale (ottenuto dalle piante di *Digitalis*) contro il quale è stato prodotto un anticorpo specifico che permette di individuare le molecole che hanno incorporato nucleotidi contenenti il gruppo indicatore. Per un'amplificazione del

segnale da rilevare vengono usate molecole con più biotine legate (ad es. α -SAV-BIOT) che riconoscono i relativi anticorpi e l'aggiunta successiva di streptavidina coniugata a fluorofori permette un segnale fluorescente maggiore e più evidente. Questa fase prevede un lavaggio da 5 min con PBS pH 7.4 e nel frattempo si prepara la reazione per il primo strato per poi incubare ciascun vetrino con 30 μ l di mix di reazione, sotto coprioggetto 22X22, per 30 min a 37°C in camera umidificata. Successivamente si effettuano altri 3 lavaggi da 5 min in PBS pH 7.4 e nel frattempo si prepara la reazione per il secondo strato e si ripetono i passaggi di incubazione e lavaggio sopra già spiegati. I vari mix di reazione (vedi tabella 1) contengono anche la soluzione Block Aid 1X, che satura tutti i siti aspecifici per facilitare i legami affini tra le molecole. Al termine di questa fase si pone sul vetrino con una goccia di "Vectashield" (Vector), montante che preserva il segnale e si sigilla con smalto i bordi di un coprioggetto.

	Reagenti	Diluizioni
I° strato	Extra-avidina-cy3 Anti-DIG (mouse) Block Aid 1X	1:200 1:25
II° strato	Anti-avidina-BIOT (rabbit) Anti-mouse IgG -488 Block Aid 1X	1:50 1:50
III° strato	Extra-avidina-cy3	1:200

Tabella 1. In tabella sono riportati i reagenti con le relative diluizioni usati nella fase di rilevazione del segnale. Le sonde possono essere marcate sia con biotina che digossigenina, ma anche usate separatamente.

3.5 Analisi dei vetrini

Il microscopio a fluorescenza usato è il modello Axioskop (Zeiss); le fluorescenze sono rilevate con filtri Green BP 450-490 e Red TBP 400-495-570 e l'obiettivo utilizzato è 40X ad immersione con elevata apertura numerica (1.30). La scansione del vetrino per la ricerca di segnali delle sonde viene effettuata riga per riga utilizzando come riferimento le coordinate presenti sul tavolino portaoggetti. Ogni segnale trovato viene acquisito in immagine digitale grazie alla telecamera Cool Snap HQ2 (Photometrics) ed analizzato con il *software* Metavue che permette di misurare le sonde e la loro distanza reciproca. Nel caso di un'analisi di FISH a più sonde bisogna effettuare acquisizioni di immagini in serie, in quanto in un solo campo ottico non è possibile visualizzare tutti i segnali. In questo caso utilizzando il *software* Adobe Photo Shop si possono montare le immagini prese in successione prima di effettuare le varie misurazioni.

4. Risultati e Discussione

4.1 Analisi bioinformatica: ricerca di cloni genomici

La ricerca di cloni genomici utili per le analisi di FISH ad alta risoluzione è stata effettuata nella regione di *FRA6E*, in particolare nelle sottoregioni comprendenti i geni *TULP4* (158.6 Mb) e *PARK2* (161-163 Mb) e, nella regione di *FRA3B*, un sito fragile presente nel cromosoma 3 (3p14.2) tra i più caratterizzati in quanto è quello più frequentemente espresso e contiene il noto gene oncosoppressore *FHIT* (Arlt *et al.*, 2003), e nella regione di *HPRT* (Xq26), utilizzata come regione di controllo per lo studio della replicazione in quanto si tratta di una sequenza che replica precocemente in fase S (Cohen *et al.*, 2003). Le regioni da studiare sono di vasta lunghezza e sono state quindi suddivise in sottoregioni più ridotte, analizzabili attraverso la combinazione di cloni adiacenti in triplette come descritto in materiali e metodi. Per ciascuna delle regioni è stata disegnata almeno una combinazione di sonde, o più combinazioni alternative da valutare poi direttamente per FISH. In totale ho individuato 19 cloni ripartiti in 6 combinazioni complessivamente per le regioni di interesse.

Tra i cloni ordinati, mi sono poi occupata personalmente della combinazione RP3-473J16, RP11-421L10, RP1-119H20 che copre la regione che si estende dalla posizione prossimale 161.45 Mb alla posizione distale 162.09 Mb e illustrata nella Figura 5.

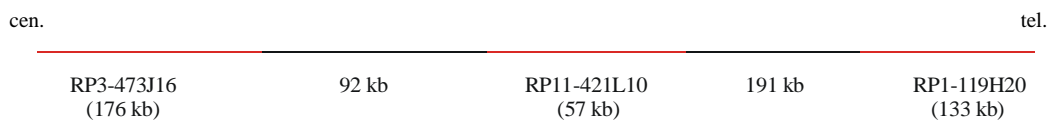


Figura 5. Schema della combinazione di cloni genomici RP3-473J16, RP11-421L10, RP1-119H20 con relative dimensioni e distanze tra esse secondo le informazioni fornite dal sito Ensembl.

4.2 Estrazione di DNA

Per tutti i cloni forniti da CHORI si è proceduto con l'estrazione del DNA. I batteri trasformati sono stati piastrati e lasciati crescere fino ad ottenere delle chiare colonie singole. In alcuni casi è stato utile procedere preventivamente con inoculi in terreno liquido per favorire la crescita della popolazione batterica. Dopo avere acquisito la necessaria autonomia con una serie di estrazioni eseguite in modo assistito, ho provveduto personalmente alla fase di estrazione del DNA dai cloni RP3-473J16 e RP11-421L10. Successivamente ho controllato il DNA su gel di agarosio; le bande di peso molecolare noto del marker sono usate come riferimento per assicurarsi che sia stato estratto il DNA di interesse. Il risultato è visibile in figura 6.

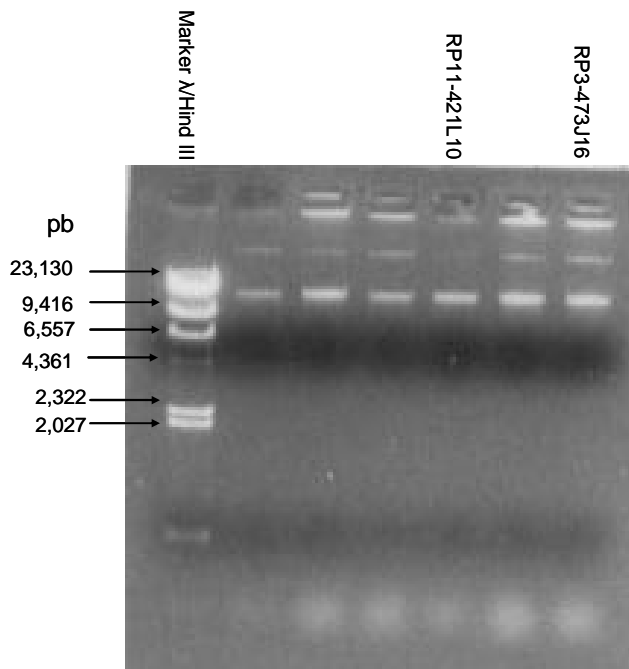


Figura 6. Foto controllo dell'estrazione dei BAC RP11-421L10, RP3-473J16.

L'estrazione ha dato buoni risultati: le bande sono definite, non vi è la presenza di uno *smear* e questo è indice di integrità del DNA, la nuvola di RNA è molto debole, ciò sta a significare che l'RNA è stato in buona parte degradato attraverso il trattamento con RNAsi. Confrontando l'intensità della banda con quella del marker, di cui è nota la concentrazione, si può ottenere una stima della quantità di DNA estratto. Per quanto riguarda RP3-473J16 la banda è leggermente più intensa rispetto alla seconda del marker; quindi ho definito come valore di concentrazione 120 ng su 2 μ l caricati (concentrazione finale: 60 ng/ μ l). Il secondo clone isolato, RP11-421L10, è anche paragonabile alla seconda banda, ma presenta comunque un'intensità minore rispetto alla banda del clone precedente, per cui la concentrazione stimata è 100 ng su 2 μ l caricati (concentrazione finale: 50 ng/ μ l).

4.3 Preparazione dei gliceroli

Dalle piastre relative a tutti i batteri trasformati sono state prelevate colonie singole per la preparazione dei gliceroli. Sono state eseguite preparazioni in doppio per poter conservare a lungo termine (-80°C) tutti gli stock relativi a ciascun clone genomico.

4.4 Marcatura dei cloni genomici

Il DNA estratto dai cloni genomici viene marcato per essere usato poi come sonda in esperimenti di FISH su molecole elongate di DNA. I cloni RP3-473J16, RP11-421L10 e RP1-119H20 già disponibile in laboratorio, sono stati marcati con biotina. Il clone RP11-421L10 è stato inoltre marcato anche con digossigenina. Per controllare se la marcatura è avvenuta ho corso un'aliquota su gel.

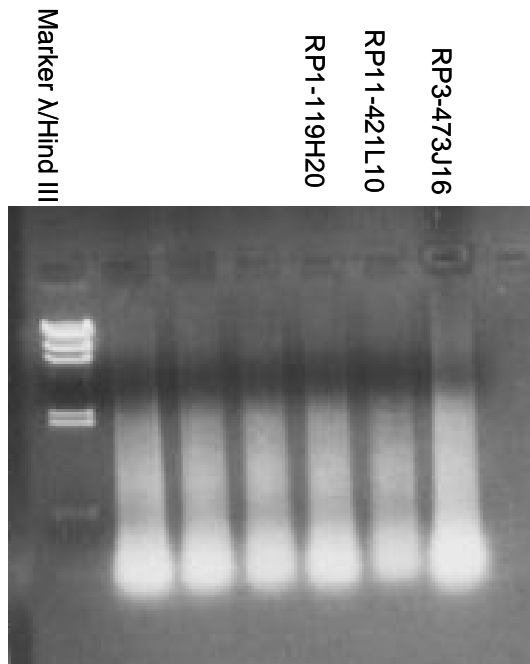


Figura 7. Gel di controllo delle marcature con biotina di RP1-119H20, RP11-421L10, RP3-473J16.

Le reazioni sono avvenute con successo, perchè è possibile notare come l'intensità delle bande sia elevata e come sia presente lo *smear* atteso (il processo di marcatura attraverso *random priming* porta all'amplificazione di frammenti casuali da 100-1000 pb). Per quanto riguarda invece la marcatura con digossigenina i risultati sono stati meno efficienti.



Figura 8. Gel di controllo della marcatura con digossigenina di RP11-421L10.

Infatti, l'intensità dello *smear* non è paragonabile con quella delle marcature con biotina. E' stata ricontrollata perciò la qualità del DNA stampo (Fig. 9), ed è stata confermata la sua integrità.

Data la minore efficienza della marcatura, abbiamo deciso in questo caso di precipitare una quantità maggiore di sonda rispetto alle consuete quantità (cioè 10 μ l).



Figura 9. Controllo su gel dell'integrità del DNA del clone RP11-421L10.

4.5 FISH

4.5.1 FISH a singola sonda

Tutte le FISH sono state condotte su preparati di DNA elongato derivante da linfociti primari umani. Per ogni sonda bisogna inizialmente determinare la lunghezza effettiva (quelle indicate sul sito Ensembl sono sempre inferiori perché coincidono con la sola regione effettivamente sequenziata) e testare l'efficienza di ibridazione che può variare in funzione della natura della sequenza della stessa sonda, quindi ho preparato due vetrini in parallelo per ciascuna sonda (421L10 e 473J16), sui quali ho poi condotto la FISH ed ho infine analizzato i segnali fluorescenti effettuando una scansione dell'intera area. I vetrini che ho allestito presentavano segnali brillanti e un background ridotto. Per quanto riguarda invece la sonda 119H20, già presente in laboratorio, alcuni test preliminari erano già stati effettuati in precedenza da cui risultava una dimensione effettiva di almeno 133 kb. In Tab. 2 sono riportate tutte le misurazioni effettuate dal vetrino sul quale è stata ibridata la sonda 421L10. In figura 10 sono riportate le stesse misurazioni per poter visualizzare direttamente l'andamento dei valori.

Numero sequenziale segnali 421L10	Dimensioni (kb)
1	208.78
2	200.28
3	88.44
4	227.94
5	184.40
6	33.58
7	54.14
8	45.49

Tabella 2. Misurazioni della sonda 421L10.

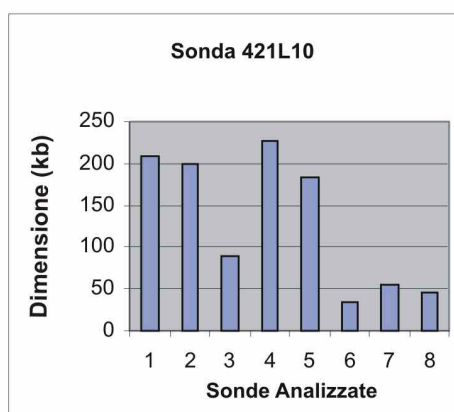


Figura 10. Il grafico riporta l'andamento delle lunghezze delle sonde misurate.

Come si può vedere dal grafico, i dati sperimentali della sonda 421L10 presentano valori molto eterogenei, e 5 volte su 8 le dimensioni risultano maggiori di quanto dichiarato sul sito Ensembl (57 kb). In particolare, 4 misurazioni si aggirano sul valore di 200 kb che può dunque essere considerata la dimensione effettiva di riferimento. Non siamo rimasti sorpresi del risultato, perché BAC e PAC contengono frammenti molto lunghi. In tabella 3 sono invece riportate le misurazioni effettuate dalla scansione dei vetrini sui quali ho ibridato la sonda 473J16. I dati sono stati riportati anche in figura 11 per poter visualizzare direttamente l'andamento dei valori a disposizione.

Numero sequenziale segnali 473J16	Dimensioni (kb)
1	77.66
2	304.70
3	188.42
4	260.93
5	93.55
6	78.77

Tabella 3. Misurazioni della sonda 473J16.

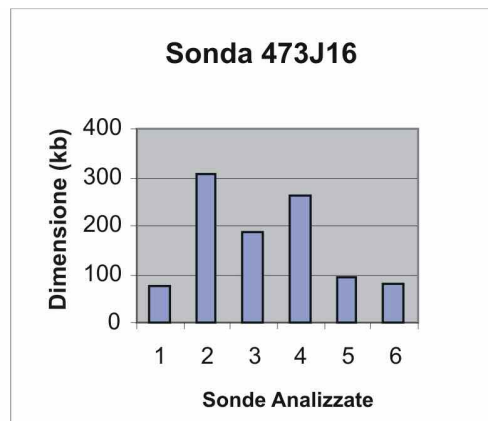


Figura 11. Il grafico riporta l'andamento delle lunghezze delle sonde misurate.

Le analisi sulla sonda 473J16 (la cui dimensione riportata nel sito Ensembl è di 176 kb) presentano tre misure su 6 di valore nettamente inferiore, che potrebbero far pensare ad una possibile rottura delle molecole elongate di DNA, mentre altre tre misure superano la dimensione riferita fino ad un valore massimo di 304.70 kb. Va comunque considerato che la quantità di dati fin qui collezionata è ridotta, quindi è difficile condurre delle conclusioni sul valore effettivo della lunghezza delle singole sonde: tenendo conto infatti che segnali di dimensione inferiore sono comunque attesi in caso di rottura della molecola di DNA o bassa efficienza di ibridazione, il valore massimo dovrebbe dare luogo ad un *trend*, a seguito di un numero adeguato di segnali acquisiti.

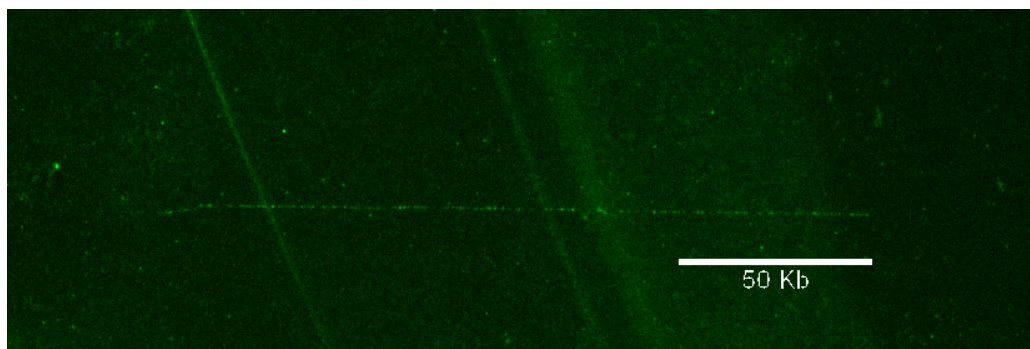


Figura 12. Esempio di segnale rilevato della sonda 421L10 (molecola N° 5 in Tab. 2). La barra di calibrazione corrisponde a 50 kb. La lunghezza della sonda è di 184.40 kb.

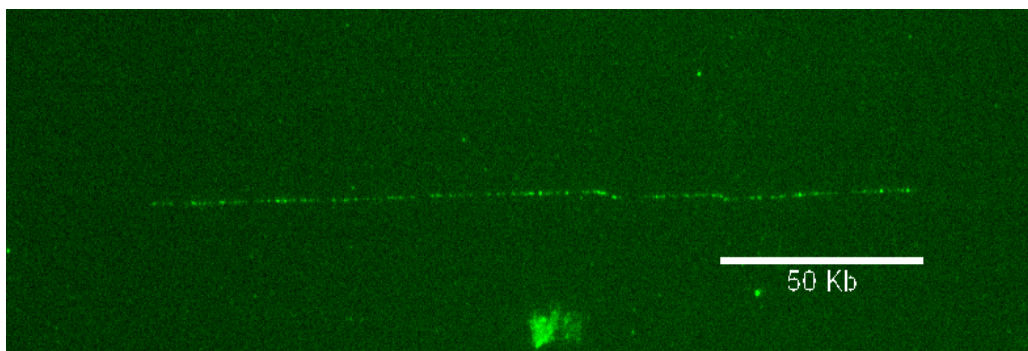


Figura 13. Esempio di segnale rilevato della sonda 473J16 (molecola N° 3 in Tab. 3). La barra di calibrazione corrisponde a 50 kb. La lunghezza della sonda è di 188.42 kb.

4.5.2 FISH a tre sonde marcate con biotina (singola fluorescenza)

L'analisi della FISH a tre sonde (473J16-421L10-119H20), eseguita con DNA marcato con biotina e dunque rilevato con una singola fluorescenza, ha rilevato risultati inaspettati. Sono state acquisite diverse immagini con due sonde consecutive, ma non sono mai state osservate combinazioni delle tre sonde ibridate. Inoltre le coppie di sonde osservate presentavano valori molto diversi tra loro sia per quanto riguarda la distanza relativa, sia la dimensione delle due sonde. In tabella 4 vengono riportate le misure effettuate.

Numero sequenziale di coppie di sonde	Dimensione (kb) I° sonda	Distanza (kb) tra le sonde	Dimensione (kb) II° sonda
1	146.84	367.10	24.56
2	194.10	368.62	43.99
3	289.31	34.56	103.17
4	124.88	332.04	182.04
5	56.79	432.46	70.02
6	93.86	245.21	157.05
7	202.55	306.12	80.75
8	178.47	284.37	156.50
9	117.67	367.52	25.19
10	202.21	380.93	143.95
11	191.11	373.81	141.03

Tabella 4. In tabella vengono riportate le misurazioni effettuate delle due sonde consecutive rilevate.

Va notato anzitutto che non è possibile comprendere immediatamente quale sonda corrisponda a ciascun segnale, trattandosi di una FISH a singola fluorescenza. Ciò può essere dedotto a posteriori proprio dalla misurazione dei segnali e dello loro distanze in confronto con il pattern atteso (Fig. 5).

I risultati illustrati in Tab. 4 indicano anzitutto una certa eterogeneità. Quella relativa alle dimensioni dei segnali di ibridazione non deve stupire perché le molecole potrebbero non essere integre alle loro estremità. La distanza tra sonde

dovrebbe essere invece preservata, salvo artefatti dovuti all'interruzione della molecola elongata che però generalmente possono essere identificati dalla perdita dell'allineamento dei segnali fluorescenti. Dalla Tab. 4 risulta che esiste una combinazione frequente in cui due sonde distano tra loro intorno a 367-368 kb (molecole 1, 2, 9; in Fig. 14 viene riportata la molecola 1). Questo pattern può essere spiegato ipotizzando che la sonda centrale RP11-421L10 non abbia ibridato oppure che ibridi sovrapposta alla sonda 473J16, a differenza di quanto atteso (Fig. 5), ma va ricordato che comunque nelle prime analisi a sonda singola questa aveva ibridato correttamente. Il caso in cui la distanza tra le sonde è di 432.46 kb potrebbe rappresentare un artefatto: le due sonde ibridano sullo stesso filamento che presenta molto probabilmente una rottura, come mostrato in Fig. 18 (molecola 5 in Tab. 4 visibile in Fig. 16). Per quanto riguarda invece le situazioni in cui le distanze misurano valori di 250 kb si potrebbe trattare di sonde che ibridano su una molecola elongata di DNA che si è in parte sovrapposta (molecola 6 in Tab. 4 visibile in Fig. 17). Il caso in cui la distanza misurata è di 34.56 kb potrebbe far pensare ad un'ibridazione della 421L10 affiancata al segnale della 473J16, ma un solo dato è ovviamente troppo poco per porre delle conclusioni (Tab. 4; molecola 3 visibile in Fig. 15). Abbiamo quindi deciso di effettuare una FISH a due colori per poter capire come ibrida la sonda centrale rispetto a quelle esterne, ed in particolare se risulti fiancheggiare o sovrapporsi alla 473J16.

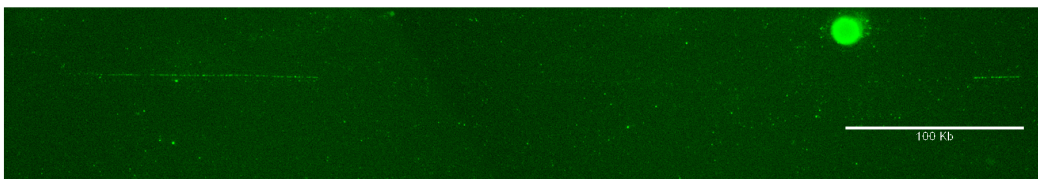


Figura 14. Molecola 1 (in Tab. 4) raffigurante le due sonde che distano 367.10 kb.

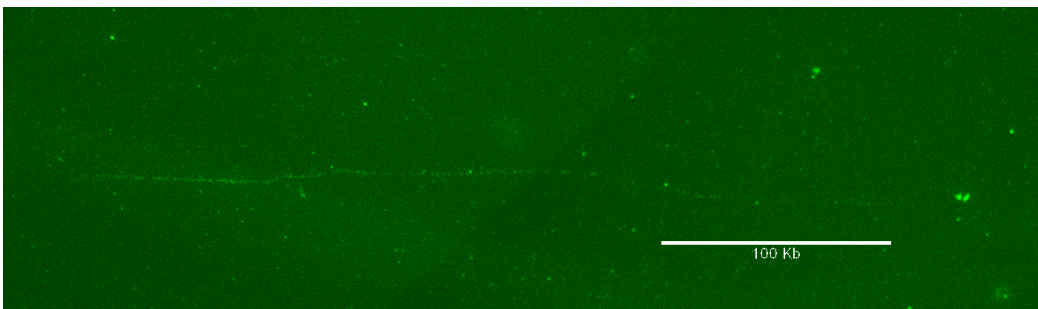


Figura 15. Molecola 3 (in Tab. 4) raffigurante le due sonde che distano 34.56 kb.

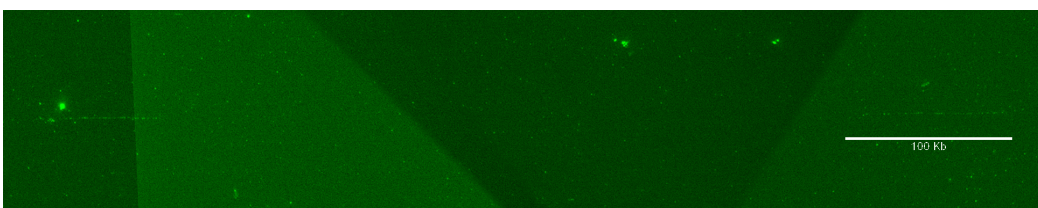


Figura 16. Molecola 5 (in Tab. 4) raffigurante le due sonde che distano 432.46 kb.

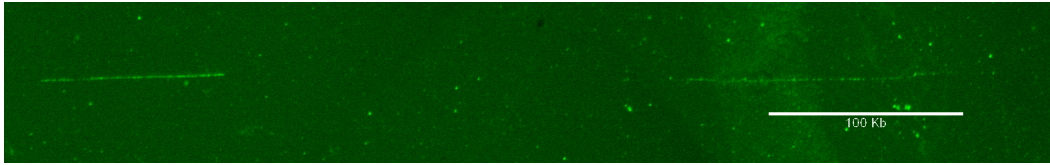


Figura 17. Molecola 6 (in Tab. 4) raffigurante le due sonde che distano 245.21 kb.

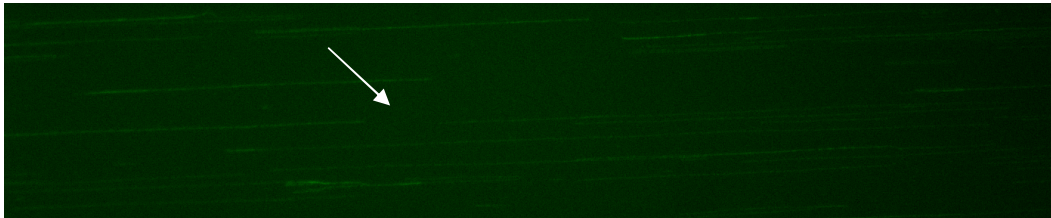


Figura 18. Esempio di molecola di DNA interrotta durante l'elongazione.

4.5.3 FISH a tre sonde marcate con biotina e digossigenina (doppia fluorescenza)

In questo esperimento di FISH le sonde 473J16 e la 119H20 sono state marcate con biotina e nell'analisi al microscopio saranno rilevate dalla fluorescenza rossa, mentre la sonda 421L10 è stata marcata con digossigenina e sarà rilevata nella fluorescenza verde. Il segnale rosso è risultato abbastanza buono, mentre il segnale verde non è risultato rilevabile; è risultata presente tuttavia una patina sullo sfondo che può far pensare ad un'autofluorescenza diffusa del preparato, la quale può avere interferito con la capacità di rilevare il segnale. D'altra parte, va ricordato che la marcatura con digossigenina della sonda 421L10 non aveva presentato ottimi risultati. Purtroppo, in questi preparati ho comunque rilevato solo segnali singoli. Non è stato quindi possibile analizzare e misurare dettagliatamente i segnali. Sarà quindi utile effettuare delle altre FISH sia a singola che doppia fluorescenza per cercare di capire la posizione di ibridazione della sonda 421L10 rispetto alla 473J16. Se queste sonde ibridano una adiacente all'altra, senza sovrapporsi, allora sarà possibile studiare la replicazione di questa sottoregione di *PARK2*. Applicando esperimenti di FISH a tre colori (verde, rosso e blu) si è infatti in grado di identificare le forche replicative bidirezionali, in quanto la fluorescenza verde permette di riconoscere le sonde, mentre i segnali rosso e blu permettono di visualizzare le forche replicative. Per lo studio della replicazione vengono analizzate le forche replicative bidirezionali che si osservano nella regione delimitata dalle sonde, in modo da mappare le origini di replicazione e calcolarne la velocità replicativa. Se invece le due sonde risulteranno sovrapposte, sarà necessario ricorrere ad ulteriori combinazioni. Infatti due soli segnali di ibridazione non sono sufficienti a delimitare la regione e, in particolare, a riconoscere l'orientamento centromero-telomero o telomero-centromero in presenza di marcatura dei segnali di ibridazione con una sola fluorescenza.

5. Bibliografia

- E. El Achkar, M. Gerbault-Seureau, M. Muleris, B. Dutrillaux and M. Debatisse (2005). Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites. *PNAS* **102**, 18069-18074.
- M.F. Arlt, A.M. Camper and T.W. Glover (2003). Common fragile sites. *Cytogenetic and Genome Research* **100**, 92-100.
- S. Caburet, C. Conti and A. Bensimon (2002). Combing the genome for genomic instability. *TRENDS in Biotechnology* **20**, 344-350.
- S.M. Cohen, B. P. Brylawski, M. Cordiero-Stone and D.G. Kaufman (2003). Same Origins of DNA Replication Function on the Active and Inactive Human X Chromosomes. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**, 923-931.
- S. R. Denison, G. Callahan, N. A. Becker, L. A. Philips and D. I. Smith (2003). Characterization of FRA6E and Its Potential Role in Autosomal Recessive Juvenile Parkinsonism and Ovarian Cancer. *Gene, Chromosomes & Cancer* **38**, 40-52.
- Melvin L. DePamphilis (1997). The Search for Origins of DNA Replication. *A Companion to Methods in Enzymology* **13**, 211-219.
- R. Lebofsky and A. Bensimon (2003). Single DNA molecule analysis: Applications of molecular combing. *Briefings in functional Genomics and Proteomics* **4**, 385-396.
- R. Lebofsky and A. Bensimon (2006). Fluorescent Visualization of Genomic Structure and DNA Replication at the Single Molecule Level.
- N. C. Popescu (2003). Genetic alterations in cancer as a result of breakage at fragile sites. *Cancer Letters* **192**, 1-17.
- D. I Smith, Yu Zhu, S. McAvoy, R. Kuhn (2005). Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Letters* **232**, 48-57.

GRAZIE A TUTTI!!

Grazie a tutti gli amici che mi hanno sopportata nei periodi più difficili, di intenso studio...

Grazie a tutti gli amici che mi hanno regalato un sorriso in momenti di sconforto...

Grazie, grazie!

Grazie, siete tutti nel mio cuore!

e grazie a tutti voi sono arrivata fin qui,
adesso bisogna andare oltre...

Nella vita bisogna saper rischiare,
puntare in alto!!

Grazie a Mamma e Papà

Grazie a Luca

Grazie ai miei cugini Lorenzo ed Ilaria

Grazie alla nonna

Grazie agli zii

Grazie alla Prof Antonella Russo

Grazie a Laura ed Elisa