

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.  
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

## *Elaborato di Laurea*

PROTEINE COINVOLTE NELLA RIPARAZIONE DI  
DANNI AL DNA INDOTTI DA RADIAZIONI GAMMA:  
ANALISI TRAMITE IMMUNOFLUORESCENZA.

**Tutor:** Prof. Lucia Celotti  
Dipartimento di Biologia

**Co-tutor:** Dott. Sonia Fabris  
Dipartimento di Biologia

**LAUREANDO: FULVIO BORDIN**

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

## INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Le cellule possono subire danni da un gran numero di agenti diversi: fisici, chimici o biologici. Le radiazioni, e in particolare quelle ionizzanti, sono tra i fattori di danno cellulare più significativi: la radiazione che attraversa le cellule ionizza ed eccita gli atomi e le molecole della struttura cellulare, alterandoli e generando specie chimicamente instabili come ioni o radicali. Questi ultimi, a loro volta, possono interagire con altre molecole dando luogo a nuove alterazioni, in particolare al DNA.

Le doppie rotture (Double Strand Breaks, DSBs) sono considerate le lesioni più critiche del DNA indotte da radiazioni ionizzanti. La presenza di DSBs porta a una complessa risposta da parte della cellula, che consiste in una cascata di eventi che coinvolgono la percezione del danno, trasduzione del segnale a effettori cellulari, arresto del ciclo cellulare e talvolta morte cellulare per apoptosi.

Un primo segnale del danno si crea con la rapida fosforilazione dell'istone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) e il riconoscimento di questo da parte di molte proteine che vengono reclutate nel sito di rottura, formando dei foci (IRIF, Ionising Radiation Induced Foci), per promuovere la riparazione del DNA <sup>(3)</sup>. Una proteina chiave nel coordinare la riparazione del DNA con la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi è p53, un fattore di trascrizione che funge da soppressore tumorale. p53 interagisce con molte proteine tra le quali p53-binding protein 1 (53BP1), una proteina nucleare che si lega al DNA-binding domain di p53 e favorisce l'attivazione trascrizionale mediata da p53. <sup>(2)</sup> In caso di danno al DNA, 53BP1 viene iperfosforilata dalla chinasi ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) e forma dei foci nucleari che colocalizzano con  $\gamma$ -H2AX, indicando i siti DSB <sup>(4)</sup>.

Utilizzando specifici anticorpi che riconoscono 53BP1, possiamo osservare la comparsa ed evoluzione dei foci nucleari, in seguito all'esposizione a radiazioni ionizzanti e valutarne la progressione nel tempo.

Al fine di verificare gli effetti delle radiazioni ionizzanti sulle cellule e individuare gli elementi cellulari coinvolti nella segnalazione e successiva riparazione del danno al DNA, sono state utilizzate tecniche di coltura cellulare *in vitro* e analisi mediante immunofluorescenza a tempi diversi dopo l'irradiamento.

# MATERIALI E METODI USATI DURANTE IL TIROCINIO

## 1. COLTURE CELLULARI

L'uso delle colture cellulari si è esteso in questi ultimi decenni a molti campi della ricerca, contribuendo notevolmente allo sviluppo della biologia molecolare, della medicina e delle biotecnologie.

Le colture cellulari sono uno straordinario modello biologico e, in quanto sistemi semplificati rispetto all'organismo *in toto*, hanno favorito l'approfondimento delle conoscenze dei meccanismi molecolari che stanno alla base del metabolismo cellulare.

Dal momento che il passaggio dalla situazione *in vivo* a quella *in vitro* comporta notevoli variazioni a livello di organizzazione del tessuto, relazioni intercellulari, controllo ambientale, si sono evolute, accanto alle metodologie di base, numerose tecniche applicabili di volta in volta alle diverse esigenze sperimentali.

Innanzitutto, la scelta del terreno di coltura viene fatta tenendo conto della linea cellulare utilizzata al fine di fornire tutti i composti necessari alle cellule (zuccheri, amminoacidi, vitamine, minerali e ioni) e mantenere il pH e l'osmolarità entro i limiti fisiologici. Inoltre, per stimolare la crescita cellulare si aggiunge al terreno una percentuale (5-10%) di siero, che contiene proteine e fattori di crescita importanti per la crescita della coltura, protegge le membrane cellulari, favorisce l'interazione cellula-substrato e ha un'azione tamponante verso metaboliti e composti tossici.

Altra condizione essenziale per la sopravvivenza della coltura cellulare è la sterilità: al fine di evitare la contaminazione di microrganismi inquinanti (batteri, funghi o micoplasmi), i recipienti e terreni di coltura vengono trattati con calore (stufe a secco e autoclavi), irraggiamento con lampade UV germicide e la manipolazione della coltura deve essere fatta in atmosfera sterile sotto cappe a flusso laminare<sup>(5)</sup>.

Di seguito verranno illustrati i metodi di proliferazione e mantenimento per due diverse linee cellulari: KYSE 510 e CCD-34-Lu.

### a) Linea cellulare KYSE 510

Le cellule KYSE 510 sono una linea di cellule epiteliali che crescono in monostrato e aderenti al substrato. Derivano da carcinoma squamoso esofageo (umano) e, in quanto trasformate, possono proliferare stabilmente nel tempo (linea cellulare continua o stabilizzata).

#### *Metodo di coltura*

È stata fornita una fiaschetta contenente cellule KYSE 510 in RPMI medium (Rosewell Park Memorial Institute medium) addizionato a siero al 10%.

- Osservare le cellule al microscopio ottico per valutarne la fitness.
- Sotto cappa sterile, dopo aver prelevato il terreno dalla fiaschetta, aggiungere circa 5 ml di PBS sterile, per lavare la superficie dove le cellule sono adese. Il PBS (Phosphate Buffered Saline) è un buffer salino isotonico, non tossico per le cellule, usato come soluzione di lavaggio.
- Prelevare quindi il PBS e aggiungerne altri 5 ml. Lasciare a incubare per circa 4 minuti a 37°C.
- Successivamente eliminare il PBS, versare nella fiaschetta 1 ml di Tripsina+EDTA, per staccare le cellule dal substrato, e incubare per 4-5 minuti a 37°C.
- Risospendere le cellule con 9 ml di terreno RPMI+siero10%: quest'ultimo funge da inibitore della tripsina.
- Per allestire la conta cellulare con la camera Burkner, prelevare circa 200 µl della sospensione cellulare e versarli in una eppendorf. Da questa, prelevarne poi 30 µl e aggiungerli a 30 µl di Trypan blue in un'altra eppendorf.
- Inserire una piccola quantità di soluzione cellulare + Trypan blue nella camera Burkner e contare le cellule presenti nei quadratini delle 4 diagonali delle 2 aree al microscopio ottico.
- Per calcolare il numero di cellule/ml della soluzione madre, applico la seguente formula:

$$\frac{\sum n^{\circ} \text{cellule/diagonale}}{4 \cdot 12} = n^{\circ} \text{cellule/quadrato}$$

$$\frac{n^{\circ} \text{cellule/quadrato}}{4} \cdot 2 \cdot 10^6 = n^{\circ} \text{cellule/ml}$$

- Allestire una diluizione 1:5 della soluzione madre e incubarla in una fiaschetta a 37°C per 48 ore.

## b) Linea cellulare CCD-34-Lu

La linea cellulare CCD-34-Lu deriva da un espianto di fibroblasti polmonari umani e cresce in monostrato adesa al substrato. È una linea cellulare "finita", ovvero dopo un certo numero di duplicazioni (circa 20), le cellule vanno incontro a senescenza.

### *Metodo di coltura*

È stata fornita una fiaschetta contenente fibroblasti CCD-34-Lu al 13° passaggio in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ricco di sali (NaCl, CaCl<sub>2</sub>), vitamine, amminoacidi non essenziali e glucosio (4,5 g/L), addizionato con amminoacidi essenziali, HEPES (molecola sintetica ad azione tamponante), siero al 10%, EDTA e antibiotici.

- Osservare le cellule al microscopio ottico per valutarne la fitness.
- Sotto cappa sterile, dopo aver prelevato il terreno dalla fiaschetta, aggiungere circa 6-7 ml di versene, soluzione composta da PBS e EDTA. L'EDTA è un chelante degli ioni bivalenti, importanti per l'adesione intracellulare e con il substrato, che favorisce l'azione della tripsina nel distacco delle cellule dalla fiaschetta.
- Prelevare quindi il versene e versare nella fiaschetta 600 µl di tripsina, incubando il tutto per 4-5 minuti a 37°C.
- Risospendere le cellule in 5,4 ml di terreno DMEM completo.
- Segue conta cellulare in camera Burker (vedi sopra).

## 2. IRRADIAZIONE DI CELLULE CCD-34-LU CON RAGGI $\gamma$

### a) Preparazione dei vetrini da irradiare

Preparare 4 capsule contenenti i vetrini che verranno irradiati.

Considerando che verranno versati 4 ml di coltura per ogni capsula, preparare 20 ml di soluzione (terreno + cellule): i 4 ml in più servono per evitare una riduzione del volume da parte dell'eventuale formazione di schiuma.

Calcolare quindi il volume di sospensione cellulare da prelevare per avere in ogni capsula circa  $1,1 \cdot 10^6$  cellule (nel nostro caso il volume è di circa 6,2 ml). Portare quindi a volume con terreno DMEM completo.

Versare 4 ml di soluzione in ogni capsula e incubare le capsule a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> per circa 48 ore in modo da permettere alla coltura di raggiungere una densità ottimale e che le cellule possano aderire al vetrino.

### b) Irradiazione e fissaggio dei vetrini

Tre vetrini sono stati irradiati con 0,5 Gy di raggi  $\gamma$  derivanti dall'isotopo radioattivo <sup>137</sup>Cs, presso il Dipartimento di Scienze Oncologiche dell'Università di Padova. Un vetrino non è stato irradiato perché rappresenterà il controllo.

Al termine dell'irradiazione lavare i vetrini in PBS, cambiare il terreno di coltura e incubare una capsula per 30 minuti, una per 2 ore e una per 6 ore.

Finito il tempo di incubazione, fare 3 lavaggi per ogni capsula con 2 ml di PBS e trasferire i vetrini singolarmente in nuove capsule.

Fissare le cellule irradiate ai vetrini aggiungendo ad ogni capsula 2 ml di soluzione di PBS + paraformaldeide al 4% e incubare al buio a 37°C per 15 minuti. La paraformaldeide è un oligomero della formaldeide e un agente cross-linkante di proteine che mantiene le strutture cellulari e subcellulari in modo migliore rispetto i solventi organici. È tuttavia un forte irritante per occhi, vie respiratorie e altre mucose e a causa delle sua capacità di cross-linking può avere effetti cancerogeni. Per questo motivo il prodotto viene smaltito in modo specifico, rivolgendosi ad aziende autorizzate per lo smaltimento di rifiuti.

Togliere la soluzione di fissaggio e lavare per 3 volte le capsule con PBS, lasciando l'ultimo lavaggio nelle capsule. Conservare quindi le capsule a 4° C.

### 3. RILEVAZIONE DELLE DOPPIE ROTTURE MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è una delle tecniche più usate in biologia cellulare, immunologia, o nei laboratori biomedici, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni, utilizzando anticorpi legati a traccianti fluorescenti. Gli anticorpi sono in grado di legarsi alle strutture cellulari in modo molto specifico, consentendo la valutazione qualitativa e quantitativa delle strutture bersaglio attraverso un microscopio a fluorescenza. L'immunofluorescenza è una tecnica vantaggiosa poiché consente una buona sensibilità e specificità di reazione, semplicità e rapidità di esecuzione, facile riproducibilità e permette di indagare contemporaneamente la presenza di più anticorpi rivolti contro antigeni distinti.

Esistono due principali tipi di immunofluorescenza: diretta e indiretta.

Nell'immunofluorescenza diretta si incubava il substrato con un anticorpo primario marcato con un fluorocromo: l'anticorpo riconosce l'antigene e lo lega specificamente.

L'immunofluorescenza indiretta, invece, prevede due fasi: inizialmente un anticorpo non marcato (primario) viene incubato con il substrato e si lega all'antigene formando il complesso antigene-anticorpo. Successivamente viene aggiunto al sistema un anticorpo secondario, marcato con un fluorocromo, e specifico contro il primo anticorpo. Più anticorpi secondari si legano al complesso antigene-anticorpo primario, rivelando attraverso il fluorocromo coniugato la presenza dell'antigene e amplificando la fluorescenza.

Quando i preparati vengono osservati al microscopio a fluorescenza, vengono eccitati da una radiazione di appropriata lunghezza d'onda ed emettono fluorescenza. Il fascio luminoso prodotto dalla sorgente del microscopio passa attraverso un filtro di eccitazione, che ha la funzione di trasmettere la sola radiazione necessaria per l'eccitazione. La luce filtrata viene convogliata all'interno dell'obiettivo e va infine a colpire il preparato. La fluorescenza emessa da quest'ultimo, di lunghezza d'onda superiore rispetto a quella di eccitazione, attraversa di nuovo l'obiettivo e giunge ad un filtro che garantisce la completa trasmissione all'oculare della luce fluorescente emessa dal campione, trattenendo la radiazione di eccitazione della lampada <sup>(1)</sup>.

#### a) Permeabilizzazione

Preparare la soluzione di permeabilizzazione mettendo in una falcon 10 ml di PBS + Triton X-100 allo 0,2% e porla a scaldare in bagnetto termostatico a 37°C (essendo molto viscoso a temperatura ambiente, il Triton X è più facilmente utilizzabile dopo essere stato leggermente riscaldato). Il Triton X-100 è un detergente che serve a rendere permeabile la membrana delle cellule agli anticorpi che verranno aggiunti in seguito.

Eliminare il PBS presente nelle capsule, e una volta tolta la soluzione di permeabilizzazione dal bagnetto termostatico, aggiungerne 2 ml per capsula. Incubare a 37°C per 10 minuti.

## b) Bloccaggio dei siti aspecifici

Per bloccare eventuali siti aspecifici di legame degli anticorpi, preparare una soluzione di PBS + 10% siero di capra (le componenti del siero sono in grado di bloccare i siti che potrebbero interagire con l'anticorpo primario in un legame aspecifico) e metterla a scaldare per 2-3 minuti in bagnetto termostatico a 37 °C. Eliminare la soluzione di permeabilizzazione e aggiungere 2 ml di soluzione di bloccaggio per capsula. Incubare il tutto per almeno un'ora a temperatura ambiente.

## c) Aggiunta dell'anticorpo primario

La soluzione anticorpale è costituita da PBS + 0.2% Triton X-100, 10% siero di capra e anticorpo primario (diluizione 1:200). L'anticorpo primario è stato prodotto in coniglio (rabbit) ed è specifico per 53BP1.

Preparare 140 µl di soluzione anticorpale e aggiungerne 30 µl su ogni vetrino, coprendolo poi con un pezzetto di parafilm facendo attenzione a non fare bolle.

Incubare a temperatura ambiente per almeno un'ora, in cameretta umida.

Togliere il parafilm ed effettuare 3 lavaggi con PBS da 5 minuti ciascuno in agitazione.

## d) Aggiunta dell'anticorpo secondario

L'anticorpo secondario (diluizione 1:350) si prepara nello stesso buffer dell'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è *donkey anti-rabbit 594*: è stato prodotto in asino (donkey) iniettandovi l'anticorpo primario precedente, ed è coniugato ad un fluoroforo che viene eccitato a 594 nm (luce rossa).

Preparare 140 µl di soluzione e aggiungerne 30 µl su ogni vetrino, coprendolo con un pezzetto di parafilm facendo attenzione a non fare bolle.

Incubare per massimo un'ora a temperatura ambiente, in cameretta umida.

Ripetere i 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno come sopra.

Lasciare asciugare i vetrini su carta da bancone, rivolgendoli verso l'alto la superficie su cui sono state fissate le cellule.

Depositare quindi una goccia di montante, costituito da soluzione antifade (*Vectashield*), per prevenire il decadimento della fluorescenza, e DAPI (2µg/µl), su un vetrino porta oggetti e capovolgerci sopra il vetrino con le cellule rivolte verso il basso. Sigillare infine i lati del vetrino con smalto da unghie.

## e) Osservazione al microscopio a fluorescenza

I vetrini vengono osservati con un microscopio a epifluorescenza, eccitandoli con luce UV, per vedere il DAPI, e con luce rossa, per osservare la fluorescenza dell'anticorpo secondario.

I campioni fissati dopo i 30 minuti sono stati osservati con obiettivo 100X (obiettivo a immersione), per evidenziare al meglio i foci di rottura. Gli altri tre campioni (2 ore, 6 ore, controlli) sono stati osservati con obiettivo 63X, perché presentavano foci più visibili.

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Nuclei positivi			
Tempo dall'irradiamento	N° nuclei osservati	N° nuclei positivi	% nuclei positivi
30 minuti	141	140	99,3%
2 ore	140	133	95,0%
6 ore	171	135	78,9%
Controllo	149	57	38,3%

Tabella 1 - Nuclei positivi per la presenza di foci della proteina 53BP1

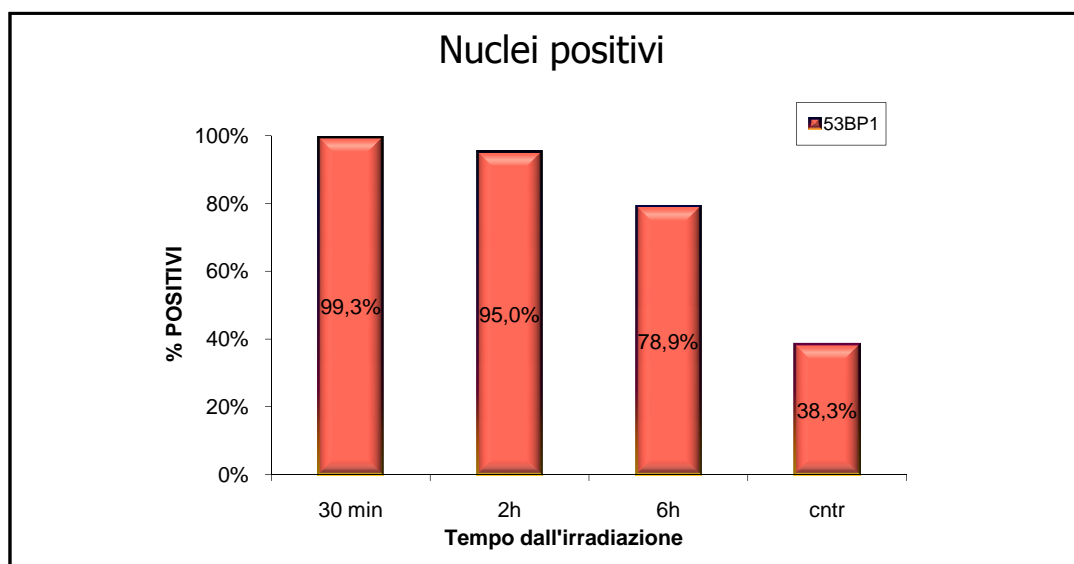


Figura 1 - Percentuale di nuclei positivi per i foci della proteina 53BP1

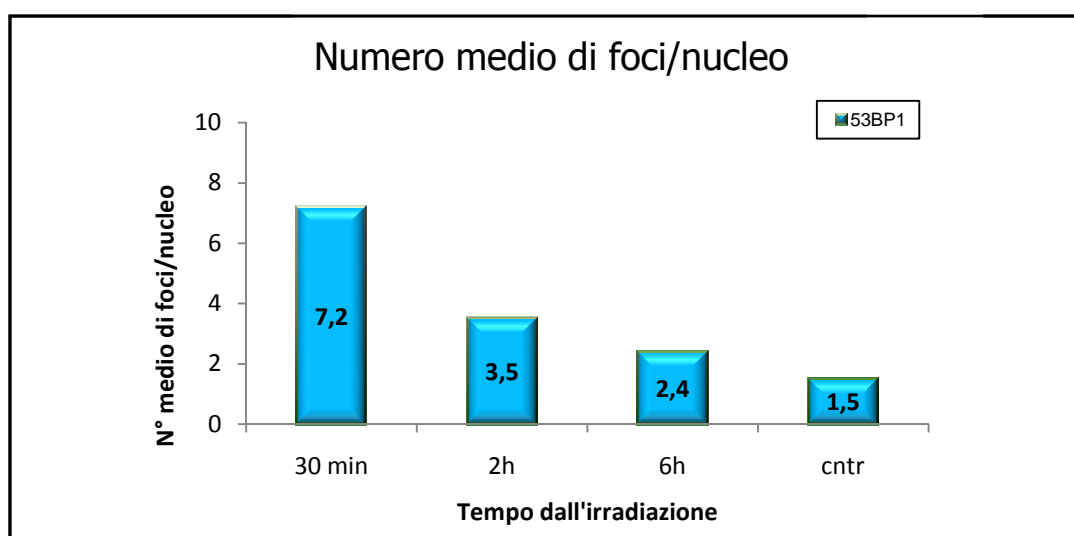
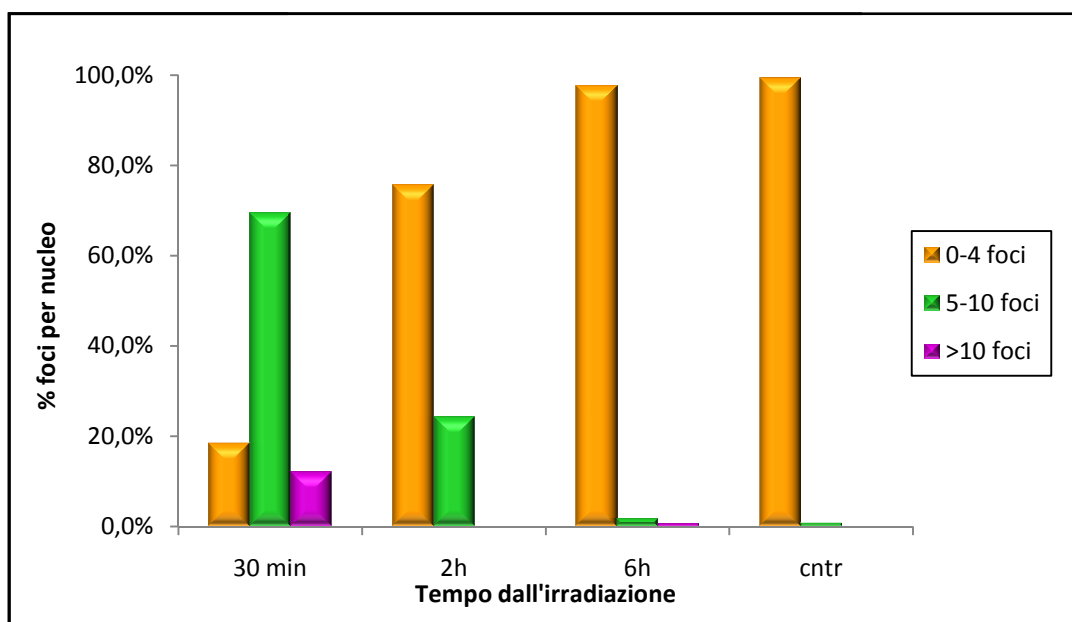


Figura 2 - Numero medio di foci della proteina 53BP1 per nucleo



N° di foci per nucleo				
N° foci/nucleo	% nuclei 30 minuti	% nuclei 2 ore	% nuclei 6 ore	% nuclei controllo
<b>0-4</b>	18,4%	75,7%	97,7%	99,3%
<b>5-10</b>	69,5%	24,3%	1,7%	0,7%
<b>&gt;10</b>	12,1%	0%	0,6%	0%

**Figura 3 - Numero di foci della proteina 53BP1 per nucleo**



**Figura 4 - Suddivisione della popolazione cellulare per numero di foci**

#### COMMENTO ALLE TABELLE E GRAFICI

Come si può osservare dalle tabelle e dai grafici, su un numero di circa 140-170 nuclei raccolti al microscopio per ciascun tempo (30 minuti, 2 ore, 6 ore), la percentuale di nuclei positivi, cioè i nuclei in cui sono presenti più di 4 foci di rottura (0-4 foci vengono definiti “fisiologici”, cioè presenti costitutivamente in una cellula, dovuti a possibili stalli della forza replicativa o all’azione di ROS), e il numero di foci medi per nucleo diminuiscono man mano che aumenta il tempo di incubazione delle cellule dopo l’irradiazione.

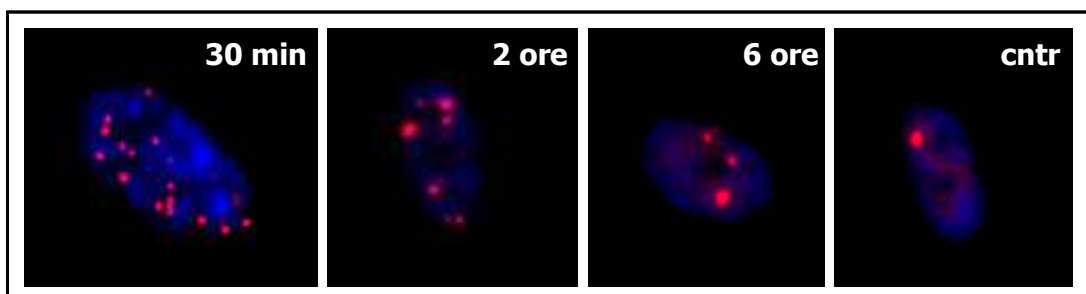
A 30 minuti tutti i nuclei presentano foci e circa il 70% di essi ne contiene 5-10, mentre solo una piccola percentuale ne presenta più di 10 per nucleo.

È da notare che il numero di foci che si osservano nei diversi nuclei è proporzionale alle dosi di radiazione che le cellule hanno subito: se normalmente a 1 Gy di radiazione si verificano, dopo 30 minuti, circa 20-40 doppie rotture in

un nucleo, è logico aspettarsi che a 0,5 Gy (intensità della radiazione utilizzata in questa esperienza) il numero di foci per nucleo sia circa compreso tra 10 e 20. Tuttavia, considerando che in ogni nucleo i foci sono distribuiti in tutto lo spessore, e che con un microscopio a epifluorescenza si riesce a osservare un solo piano focale, il numero di doppie rotture rilevate è perciò una sottostima dell'effettiva quantità di foci presenti nei nuclei osservati.

Passando alle 2 ore il numero di nuclei positivi diminuisce leggermente, ma il numero di foci per nucleo è notevolmente cambiato: se ai 30 minuti solo il 18,4% dei nuclei erano non positivi (0-4 foci), dopo 2 ore la percentuale è cresciuta al 75,7%. Se analizziamo il numero medio di foci, si evidenzia un dimezzamento rispetto ai 30 minuti: il motivo di ciò è forse da ricondurre nuovamente all'utilizzo del microscopio a epifluorescenza, dal momento che, confrontando i dati di altri studi rilevati con un microscopio confocale, non si osserva quasi mai una differenza così significativa di tale valore passando dai 30 minuti alle 2 ore.

Al tempo di 6 ore, infine, c'è stato un calo del 20% di nuclei positivi poiché le cellule tendono a riportarsi alla situazione del controllo.



**Figura 5 - Illustrazioni rappresentative di fibroblasti CCD-34-Lu ai diversi tempi dall'irradiazione con raggi- $\gamma$  a 0,5 Gy.**

In questa tesi è stato presentato uno studio degli effetti indotti da radiazioni ionizzanti  $\gamma$  su fibroblasti umani, allo scopo di verificare, attraverso analisi con immunofluorescenza indiretta, la presenza della proteina 53BP1 nel pathway di segnalazione e riparazione del danno al DNA.

Si è osservato che:

- in seguito a irradiazione, le cellule che sono state incubate più tempo presentano un minor numero di foci di DSBs, dal momento che hanno avuto più tempo per riparare i danni del DNA.
- confrontando studi simili, condotti con cellule diverse (ad esempio linfociti umani), la reazione al danno (senescenza o apoptosi) e i tempi di riparazione dipendono dalla linea cellulare utilizzata.

## BIBLIOGRAFIA

<sup>1</sup> Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2004. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli. 594-596.

<sup>2</sup> Hongxia Ma *et al.* 2006. Joint effects of single nucleotide polymorphisms in P53BP1 and p53 on breast cancer risk in a Chinese population. *Carcinogenesis*. **27**: 766–771

<sup>3</sup> Mognato M., Girardi C., Fabris S., Celotti L. 2009. DNA repair in modeled microgravity: Double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with  $\gamma$ -rays. *Mutation Research*. **663**: 32-39.

<sup>4</sup> Wang B., Matsuoka S., Carpenter P. B., Elledge S. J. 2002. 53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint. *Science*. **298**: 1435.

<sup>5</sup> Zucco F., Bianchi V. 1994. *Nozioni di Colture cellulari*, Lombardo Editore.