



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
nello studio dell'instabilità dei siti fragili**

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

Co-Tutor: Dott.ssa Elena Tosoni
Dipartimento di Biologia
Università degli Studi di Padova

Laureanda: Cristina Sartori

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

1. <u>Abstract</u>	5
2. <u>Introduzione</u>	7
2.1 I siti fragili e la loro instabilità	7
2.2 Cenni su <i>FRA3B</i> e <i>FRA6E</i>	8
2.3 La replicazione tardiva dei siti fragili	8
2.4 Tecniche di citogenetica molecolare	9
3. <u>Materiali e Metodi</u>	11
3.1 Controllo BAC per marcature	11
3.2 Marcatura per <i>nick translation</i>	11
3.2.1 Controllo della marcatura per <i>nick translation</i>	11
3.3 Marcatura per <i>random priming</i>	12
3.3.1 Controllo della marcatura per <i>random priming</i>	12
3.4 FISH su nuclei interfascici	12
3.4.1 Precipitazione delle sonde	13
3.4.2 Denaturazione delle sonde	13
3.4.3 Trattamento dei vetrini	13
3.4.4 Denaturazione dei preparati	13
3.4.5 Ibridazione	14
3.4.6 Lavaggi di stringenza	14
3.4.7 Rilevazione del segnale per immunofluorescenza	14
3.4.8 Controcolorazione e analisi microscopica	15
3.5 FISH su DNA elongato	15
3.5.1 Scioglimento delle <i>plug</i> di agarosio	15
3.5.2 Elongazione del DNA tramite <i>molecular combing</i>	15
3.5.3 Denaturazione delle sonde	15
3.5.4 Denaturazione dei preparati	16
3.5.5 Ibridazione	16
3.5.6 Lavaggi di stringenza	16
3.5.7 Rilevazione del segnale per immunofluorescenza	16
3.5.8 Analisi microscopica	16
4. <u>Risultati e Discussione</u>	17
4.1 Controllo cloni BAC	17
4.2 Controllo della marcatura per <i>random priming</i>	18
4.3 Controllo della marcatura per <i>nick translation</i>	19
4.4 FISH su nuclei interfascici e su DNA elongato: differenze	20
4.5 FISH su nuclei interfascici	21
4.5.1 <i>Stripping</i> dei vetrini	21
4.5.2 Analisi dei vetrini	21
4.6 FISH su DNA elongato	24
4.6.1 Analisi strutturale di <i>FRA3B</i>	24
5. <u>Bibliografia</u>	27

1. ABSTRACT

I siti fragili rappresentano regioni del genoma particolarmente sensibili allo stress indotto da agenti che ritardano o inibiscono parzialmente la sintesi di DNA. In condizioni in cui il processo replicativo risulta perturbato, essi vanno incontro a interruzioni (*gap*) o delezioni osservabili sui cromosomi in metafase.

Questi siti si estendono su vaste regioni, sono associati a geni, possono completare lentamente la replicazione e contengono brevi tratti di DNA ad alta flessibilità, ma non sono identificabili in sequenza.

Il meccanismo molecolare che sta alla base della instabilità dei siti fragili coinvolge il malfunzionamento dei sistemi di controllo che segnalano i danni al DNA.

Tecniche basate sull'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) rappresentano un valido strumento nella caratterizzazione delle aberrazioni cromosomiche e quindi permettono di eseguire studi approfonditi sui siti fragili. Scopo di questa tesi è stato quello di aumentare l'affidabilità di alcuni dati già disponibili in laboratorio per fornire ulteriori evidenze della correlazione tra le alterazioni della replicazione e l'espressione dei siti fragili. Sono state applicate tecniche di FISH convenzionale e di FISH su DNA elongato per capire se i siti fragili sono a replicazione tardiva ed effettuare analisi strutturali e funzionali ad alta risoluzione.

2. INTRODUZIONE

2.1 I siti fragili e la loro instabilità

La corretta duplicazione del materiale genetico è essenziale per la sopravvivenza della cellula e dell'intero organismo. Non è sorprendente perciò che il processo replicativo sia soggetto a disfunzioni, rivelate da riarrangiamenti cromosomici che comportano la perdita o l'acquisizione di materiale genetico, specialmente quando la cellula è in condizioni di stress.

I siti fragili sono specifiche regioni cromosomiche che vanno incontro a *gap* o rotture individuabili citogeneticamente in cellule esposte a condizioni colturali che portano a parziale inibizione della sintesi di DNA (Arlt *et al.*, 2003).

In base al livello di espressione nella popolazione umana, i siti fragili sono catalogabili in due classi principali. I siti fragili "rari" (RFS) sono presenti in una piccola porzione di individui, sono associati a ripetizioni CGG o AT e vengono ereditati con modalità Mendeliana. I siti fragili "comuni" (CFS), invece, sono relativamente ricchi in AT e sono riscontrabili in tutti gli individui, perciò rappresentano una componente normale della struttura cromosomica (Arlt *et al.*, 2003; Glover, 2006).

Nei primi, le corte ripetizioni in tandem non codificanti possono espandersi nella successiva generazione e diventare instabili: questo meccanismo è alla base della patogenicità delle mutazioni dinamiche, di cui la sindrome dell'X fragile è una manifestazione esemplare (Strachan e Read, 2004).

Nei secondi, le forme alleliche identificano sequenze costitutive del genoma che sono normalmente stabili in cellule umane in coltura. La loro instabilità si manifesta dopo l'esposizione *in vitro* a specifici agenti in grado di indurre stress replicativo, come ad esempio l'afidicolina, un inibitore della DNA polimerasi. Come menzionato in precedenza, il meccanismo per l'induzione di tutti i siti fragili sembra coinvolgere interruzioni nella normale sintesi di DNA (Arlt *et al.*, 2003).

Ad oggi, più di 80 siti fragili comuni sono elencati in Genome Database (GDB), ma non tutti sono espressi con la stessa frequenza. Molti si vedono raramente e si può affermare che solo 20 siti fragili sono responsabili di più dell'80% di tutte le lesioni osservate in cellule trattate a basse concentrazioni di afidicolina (Glover, 2006). Il più attivo di questi nel genoma umano è *FRA3B*, localizzato sul cromosoma 3p14.2. Altri siti fragili altamente espressi includono: *FRA6E* (6q26), *FRA16D* (16q23), *FRA7H* (7q32.3) e *FRAXB* (Xp22.3) (Glover, 2006).

Dati provenienti da numerosi laboratori hanno dimostrato che i CFS costituiscono punti caldi di scambi cromatidici, mostrano un elevato tasso di traslocazioni e delezioni in cellule somatiche ibride e sono siti preferenziali per l'integrazione del DNA plasmidico transfettato, oltre a giocare un ruolo in alcuni eventi di amplificazione genica. I riarrangiamenti del DNA sono associati all'induzione dei siti fragili sia come avvenimento principale, che subordinato (Arlt *et al.*, 2003).

È stato, inoltre, evidenziato che nelle cellule tumorali i siti fragili comuni contengono frequentemente delezioni intra-locus o traslocazioni e mostrano la loro instabilità con la bizzarria dei cariotipi. Analisi statistiche di confronto tra i punti di rottura cromosomica osservati nei tumori, e la localizzazione dei siti fragili mediante bandeggio, hanno condotto all'ipotesi che l'instabilità di queste specifiche localizzazioni cromosomiche potesse portare a delezioni *in vivo*, proprio come accade *in vitro*. Questa correlazione implica che l'instabilità

genomica è un processo che modifica continuamente il genoma delle cellule tumorali nel corso del tempo (Artl *et al.*, 2003; Caubert *et al.*, 2002).

Le numerose anomalie cromosomiche riscontrabili, infatti, nelle cellule cancerose sono accidentali prodotti dell'evoluzione di un tumore, ma allo stesso tempo forniscono la condizione per la successiva selezione di varianti a crescita più rapida (Strachan e Read, 2004).

2.2 Cenni su *FRA3B* e *FRA6E*

Il clonaggio di alcuni siti fragili comuni è stato essenziale per studiarne la natura e il comportamento. L'analisi molecolare ha rivelato che gli eventi di rottura/decondensazione indotti al loro interno da afidicolina riguardano vaste regioni genomiche che si estendono da 200 Kb fino a 10 Mb (Glover, 2006).

Considerate le vaste dimensioni, non sorprende che molti di questi CFS contengano al loro interno diversi geni.

FRA3B, che si estende su un'ampia regione di 4Mb, contiene tra gli altri il gene *FHIT*, che si espande approssimativamente per 1,5 Mb ma include due lunghe sequenze introniche e codifica un piccolo trascritto di 1,1 Kb. E' stato inoltre mappato nella regione di fragilità di *FRA3B* il sito di integrazione del virus del papilloma umano di tipo 16 (HPV-16), a testimonianza del diretto rapporto tra l'instabilità dei siti fragili e il cancro.

Altro gene di interesse associato ai siti fragili è *PARK2*, situato nella regione cromosomica 6q26 nel sito fragile *FRA6E*, il terzo più comunemente coinvolto in processi di alterazione genomica. *PARK2* ha un'organizzazione molto simile a quella di *FHIT* e copre circa 500 Kb (Becker *et al.*; Glover, 2006).

È chiaro da numerosi studi che nei siti fragili comuni si identificano spesso vaste delezioni intra-locus o traslocazioni che inattivano i geni ad essi associati in una varietà di cellule tumorali.

La perdita di omozigosi di *FHIT* è stata riscontrata in diverse trasformazioni neoplastiche, incluse quelle della mammella, del fegato, del polmone e del tratto gastrointestinale. I riarrangiamenti riguardano tipicamente delezioni singole o multiple di lunghezza variabile dalle decine alle centinaia di Kb, ma sono state riportate anche alcune traslocazioni. Anche basandosi su queste perdite alleliche, è stato suggerito per *FHIT* il ruolo di gene oncosoppressore (Artl *et al.*, 2003), poi definitivamente dimostrato (Pekarsky *et al.*, 2002).

2.3 La replicazione tardiva dei siti fragili

Diversi studi basati sull'induzione dei siti fragili da agenti che ritardano o inibiscono la replicazione del DNA supportano un modello in cui queste specifiche localizzazioni cromosomiche sono particolarmente lente nel completare la replicazione e se la cellula entra in G₂ con del DNA non replicato si possono osservare *gap* e rotture nelle cellule in metafase (Glover, 2006).

I siti fragili comuni, che si estendono per oltre centinaia di migliaia di coppie di basi di DNA, si rompono e rivelano imperfezioni su tutta la loro lunghezza. Come si è detto, essi sono relativamente ricchi in AT, ma non presentano una sequenza consenso che possa spiegare le ragioni della loro innata instabilità, come nel caso delle ripetizioni dinucleotidiche e trinucleotidiche dei siti fragili rari (Glover, 2006).

Analisi dettagliate hanno, tuttavia, messo in luce un'inusuale composizione in sequenza di queste regioni, caratterizzata da un elevato numero di cosiddetti

“picchi di flessibilità”: brevi tratti di alcune centinaia di nucleotidi capaci di formare strutture secondarie che possono inibire la progressione delle forche replicative. Il fatto che i siti fragili replichino tardivamente e siano significativamente più sensibili agli arresti delle forche è da imputare probabilmente alla composizione in sequenza di queste regioni, ma non è preclusa la coesistenza di altri meccanismi.

In generale, lo stallo delle forche replicative viene riconosciuto dai checkpoint nella fase S e/o G2/M del ciclo cellulare, in cui *ATR* e *BRCA1* giocano un ruolo chiave. Si tratta di una scoperta significativa poiché è la prima evidenza di un *pathway* molecolare che regola la stabilità genomica. Tuttavia è possibile che a livello dei siti fragili una porzione di queste lesioni riesca a sfuggire ai controlli di checkpoint, come evidenziato dalla comparsa delle rotture cromosomiche in metafase: i riarrangiamenti che li riguardano possono essere il risultato di accidentali rotture a doppio filamento o ricombinazione illegittima.

Conseguentemente, le delezioni riscontrabili nelle cellule tumorali a livello dei siti fragili sono state associate ad una difettosa riparazione ricombinazionale oppure a mutazioni o perturbazioni nel pathway dei checkpoint della fase S e/o G2/M del ciclo cellulare che rispondono allo stallo delle forche replicative (Artl *et al.*, 2003). Il malfunzionamento del sistema che segnala i danni al DNA correlato alla comparsa di anomalie cromosomiche nelle cellule cancerose è solo uno dei meccanismi che intaccano la stabilità dell'intero genoma, sia a livello di DNA sia a livello cromosomico, facendo aumentare il tasso di mutazione complessivo. In questo ambito, i siti fragili rappresenterebbero delle regioni di maggiore suscettibilità in quanto soggetti a un controllo meno stringente da parte dei checkpoint.

2.4 Tecniche di citogenetica molecolare

L'Ibridazione In Situ Fluorescente (FISH) è una sofisticata tecnica di citogenetica molecolare che permette di eseguire studi approfonditi, in quanto consente la localizzazione di specifiche sequenze di acido nucleico su preparati morfologicamente preservati di cromosomi, cellule e tessuti (Stedum and King, 2002). Questa metodica si basa su esperimenti di ibridazione *in situ* e immunofluorescenza e sfrutta la proprietà del DNA di denaturarsi in modo reversibile. Un frammento di DNA specifico per la regione di interesse e marcato con specifici nucleotidi modificati, talvolta direttamente fluorescenti (sonda) si lega alla sequenza di DNA complementare del preparato che è stato fissato e montato su un vetrino portaoggetti. Grazie all'amplificazione dei segnali con diversi strati di specifici anticorpi coniugati a fluorofori, la regione cromosomica di interesse risulta facilmente individuabile ad un microscopio a fluorescenza.

Obiettivo di questa esperienza di tirocinio è stato quello di acquisire familiarità con la suddetta metodica che costituisce uno strumento valido nella caratterizzazione delle aberrazioni cromosomiche. In particolare mi sono inserita nell'indagine sull'instabilità di alcuni siti fragili comuni (*FRA3B* e *FRA6E*), per cercare di aumentare l'attendibilità delle analisi statistiche e far luce sui meccanismi molecolari che la correlano alla regolazione del ciclo cellulare e il processo di replicazione.

Il vantaggio della FISH per l'analisi cromosomica è rappresentato dalla possibilità di ampliare le applicazioni di citogenetica classica, che ha come oggetto di studio l'analisi delle anomalie strutturali dei cromosomi metafasici, con i dati forniti da

sonde molecolari marcate, che possono avere come bersaglio il DNA nei cromosomi metafasici o interfasici nonché le singole molecole di acido nucleico. La FISH su nuclei interfasici è effettuabile perciò anche su cellule che non sono in attiva divisione, e permette di identificare alterazioni di dimensioni comprese tra 5 e 100 Kb, inferiori a quelle dei preparati cromosomici (1-5 Mb). Ancora più elevato è il potere di risoluzione della FISH su DNA elongato che va da 1 a 3 Kb. La FISH su nuclei interfasici è un approccio importante per comprendere quali sono le regioni del genoma a replicazione tardiva. I nuclei nei quali le sequenze di DNA riconosciute dalla sonda non hanno ancora replicato mostrano due segnali di ibridazione singoli corrispondenti alla coppia di cromosomi omologhi, mentre quelli in cui la replicazione è già avvenuta presentano una coppia di segnali duplicati. Nelle popolazioni cellulari asincrone, si osserva frequentemente nello stesso nucleo un allele già replicato (segnale doppio) ed uno che non ha ancora completato la replicazione (segnale singolo). Maggiore è la percentuale di nuclei con segnali doppi, più precoce è la replicazione delle sequenze (Le Beau *et al.*, 1998).

La FISH su DNA elongato tramite *molecular combing* prevede la distensione di singole molecole di DNA in maniera uniforme ed irreversibile su un vetrino silanizzato, cioè carico positivamente. Questa tecnologia innovativa permette di esplorare l'intero genoma in una singola analisi ad alta risoluzione, aumentando considerevolmente le possibilità di indagine strutturale e funzionale (Caburet e Bensimon, 2002). Le molecole di DNA in soluzione si attaccano alla superficie del vetrino, che viene meccanicamente estratto dalla soluzione ad una velocità costante di 300 $\mu\text{m/s}$. La forza esercitata dal menisco estende ed allinea le molecole di DNA permettendo di ottenere la relazione 1 μm =2 Kb e di effettuare così delle misurazioni molto accurate. Il *combing* di elevate concentrazioni di DNA genomico produce un'elevata densità di molecole di DNA in serie, che hanno lunghezza compresa tra 200 e 600 Kb (Lebofsky e Bensimon, 2002).

Le applicazioni del *molecular combing* spaziano dall'analisi strutturale del DNA all'osservazione di processi che si verificano a livello dello stesso, come la replicazione. Il monitoraggio dell'instabilità genomica su singole molecole di DNA si serve di successivi saggi di ibridazione fluorescente per identificare cloni minimamente sovrapposti e per generare mappe fisiche ad alta risoluzione. Questa strategia è particolarmente adatta per l'indagine di sottili cambiamenti genomici e riarrangiamenti su piccola scala, che non possono essere caratterizzati con altri metodi. I meccanismi coinvolti nell'avvio e nella regolazione della replicazione del DNA possono essere compresi identificando le origini di replicazione su singole molecole di DNA marcate tramite l'incorporazione di analoghi di nucleotidi nel filamento di acido nucleico di nuova sintesi. Alle cellule in coltura viene somministrata per brevi periodi prima la iodio-deossiuridina (IdU) e poi la cloro-deossiuridina (CldU): tramite immunofluorescenza successivamente si rileva la IdU in verde e la CldU in rosso. In base allo schema di segnali ottenuto è possibile valutare il pattern di replicazione e la presenza di eventi deregolativi (arresto di forca, forche asincrone, forche unidirezionali). Solo le forche bidirezionali complete consentono lo studio delle dinamiche di replicazione del DNA, come la velocità di forca. Lo stesso approccio può essere focalizzato su un singolo locus genico utilizzando sonde marcate con una terza fluorescenza (Caburet e Bensimon, 2002).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Controllo BAC per marcature

I BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sono piccole molecole di DNA che fungono da vettori per l'amplificazione selettiva di determinate sequenze genomiche. Essi, in seguito alla trasformazione in cellule batteriche e alla replicazione delle stesse, forniscono un gran numero di copie identiche (cloni) del frammento di DNA di interesse. Le sonde locus-specifiche utilizzate negli esperimenti di FISH sono state ottenute dalla purificazione di BAC prima del mio arrivo in laboratorio. Per capire se queste sono effettivamente presenti in forma integra, si effettua una corsa elettroforetica del campione, insieme al marcatore di peso molecolare λ DNA/Hind III. Il supporto utilizzato è un gel di agarosio allo 0,8% in TAE 1X, la cui preparazione prevede anche l'aggiunta di SYBR *safe* diluito 1:10000, un agente intercalante che si inserisce nel DNA e lo rende visibile se esaminato al transilluminatore con luce UV. Al DNA di interesse viene aggiunto 1 μ l di Loading Buffer, un colorante che funge da tracciante ed evidenzia la migrazione lungo il gel. Applicando un voltaggio di 100 mV, le molecole di DNA, in virtù della loro carica negativa, saranno indotte a migrare verso l'anodo alla sommità del gel. La porosità di quest'ultimo è tale da garantire un'adeguata separazione dei frammenti in base alla lunghezza: quelli più grandi incontreranno più difficoltà e si muoveranno più lentamente, mentre quelli più piccoli attraverseranno più velocemente i pori e percorreranno più strada.

Se al termine della corsa si rileva una banda nitida significa che il DNA è intatto e che il passaggio di estrazione è avvenuto con successo, se invece si osserva uno *smear*, siamo in presenza di un DNA in parte degradato o danneggiato.

Confrontando la banda ottenuta con il marcatore di peso molecolare, inoltre, è possibile ottenere un'indicazione della massa del DNA di interesse e quindi stimarne la concentrazione.

3.2 Marcatura per Nick Translation

A questo punto è necessario operare la marcatura del DNA, ovvero creare sonde che potranno essere utilizzate nell'ibridazione *in situ* fluorescente.

Il metodo della Nick Translation prevede l'aggiunta al DNA (1 μ g) di un pool di deossinucleosidi trifosfati (dNTP) marcati con biotina o digossigenina e del mix di reazione che contiene gli enzimi DNAsi I e DNA polimerasi I. Una temperatura di 16°C per 90 min è la condizione richiesta perché avvenga la reazione.

In una prima fase, la DNAsi I, un'endonucleasi, crea rotture (*nick*) nel DNA stampo a doppia elica, tagliando a livello dei legami 3'-5' fosfodiesterici. La DNA polimerasi I a questo punto innesca la reazione di sintesi e incorpora nucleotidi marcati all'estremità 3'-OH; simultaneamente, grazie all'attività esonucleasica 5'->3', elimina piccoli gruppi di nucleotidi all'estremità 5' del taglio.

3.2.1 Controllo della marcatura per Nick Translation

Per controllare la riuscita della reazione di marcatura, si sfrutta l'elettroforesi su gel di agarosio 1,0% in TAE1X, a cui viene aggiunto SYBR Safe come agente intercalante. Il campione, previa denaturazione per 3 min a 95°C e incubazione in ghiaccio per 3 min, viene colorato aggiungendo 1 μ l di Loading Buffer, che funge da tracciante. Il caricamento del DNA marcato avviene contemporaneamente a quello del marcatore di peso molecolare di λ /Hind III, ma in pozzetti diversi; il

campo elettrico applicato è di 100 mV. Il risultato della reazione di marcatura per Nick Translation si evince dal tipo di banda ottenuta: uno *smear* contenente frammenti di dimensioni comprese tra 200 e 500 bp è indice del fatto che la reazione ha avuto esito positivo. In tal caso, al DNA marcato viene addizionato 1 µl di EDTA 0,5 M pH 8, un agente chelante che sequestra ioni bivalenti e blocca la reazione. Infine il campione viene incubato a 65°C per 10 min.

3.3 Marcatura per Random Priming

Il Random Priming è un altro metodo utilizzato per marcare DNA. La miscela di reazione contenente il DNA stampo (250 ng) insieme ai Random Primer viene portata alla temperatura di ebollizione per 8 min e successivamente posta in ghiaccio per 5 min. Dopodiché si aggiungono dNTP marcati con biotina o digossigenina e 1 µl di Klenow, subunità della DNA Polimerasi I di *E. coli* e si incuba a 37°C *overnight*.

Questa tecnica si serve di oligonucleotidi esameri casuali che, appaiandosi al DNA denaturato, fungono da innesco per l'attività polimerasica 5'→3' del frammento Klenow. Poiché nella miscela di oligonucleotidi sono presenti tutte le possibili combinazioni di esameri, il DNA risulterà marcato in modo uniforme.

La differenza tra le due reazioni di marcatura sta nella lunghezza dei frammenti ottenuti, compresa tra 200 e 400 bp per la Nick Translation e tra 100 e 1000 bp per il Random Priming. La seconda tecnica garantisce inoltre una migliore efficienza di marcatura. Posto che l'efficienza della FISH si basa sulla specificità del riconoscimento sonda-sequenza target, piccoli frammenti sono più adatti per la FISH su nuclei interfascici o su cromosomi, ossia su cromatina più o meno condensata, mentre l'uso dei più lunghi frammenti marcati per random priming viene limitato a ibridazione su filtro (per esempio Southern blot) o anche per le FISH su DNA elongato, in cui le singole molecole di DNA risultano ben distese e non associate a proteine.

3.3.1 Controllo della marcatura per Random Priming

Prima di procedere all'utilizzo delle sonde marcate nell'ibridazione *in situ* su DNA, è importante controllarne le caratteristiche qualitative. La tecnica è la stessa utilizzata nel caso dei frammenti marcati per Nick Translation: si fanno correre le sonde in gel di agarosio all'1% in TAE 1X, a cui viene aggiunto SYBR *safe* (Molecular Probes, Invitrogen, Italia). Il campione, preparato mescolando 1/10 del volume di marcatura e 1 µl di Loading Buffer, e il marcatore di peso molecolare λ/Hind III vengono caricati in pozzetti separati e fatti correre nel suddetto supporto applicando una differenza di potenziale di 100 mV.

La bontà delle sonde viene validata in base al tipo di *smear* ottenuto: se quest'ultimo copre un *range* di dimensioni in bp abbastanza ampio, allora si può ammettere che la reazione di marcatura è avvenuta con successo.

3.4 FISH su nuclei interfascici

Nella FISH su nuclei interfascici le sonde ibridano sulle cellule immobilizzate su vetrini da microscopio (*in situ*) e i segnali fluorescenti nei nuclei cellulari risultano puntiformi.

3.4.1 Precipitazione delle sonde

Le sonde marcate, prima di essere utilizzate nel processo di ibridazione, devono essere forzate a precipitare dalla soluzione, in condizioni di stringenza opportune. Innanzitutto, trattandosi di lunghi frammenti di DNA genomico, è necessario aggiungere alle sonde marcate DNA *Cot-1* umano (50X), allo scopo di saturare le sequenze ripetitive del genoma umano, 10 µg di DNA di sperma di salmone, che ha funzione bloccante. Alla soluzione contenente il DNA si aggiunge 1/10 del volume di NaAc 3 M, 2 volte e mezzo il volume di EtOH 100% e 20 µg di glicogeno che si lega al DNA rendendo visibile il pellet. Dopo aver mescolato per inversione e incubato a -80°C per 40 min, si procede alla centrifugazione a 13000 rpm per 30 min a 4°C. L'EtOH viene rimosso, il pellet viene lavato con EtOH 70% e centrifugato nuovamente a 13000 rpm per 10 min a 4°C. Il surnatante viene eliminato e il DNA può essere risospeso nel mix di ibridazione (formamide 50%, SSC 2X pH 7,0 e destrano solfato 10%), preriscaldato a 40°C. Il volume di ibridazione calcolato per ciascun vetrino è di 10 µl.

3.4.2 Denaturazione delle sonde

La soluzione contenente le sonde viene riscaldata alla temperatura di 70°C per 10 min in modo tale che i doppi filamenti si separino. Il programma di denaturazione prevede poi l'abbassamento della temperatura a 37°C per 3 ore (*pre-annealing*).

3.4.3 Trattamento dei vetrini

I vetrini, dove è stato allestito il campione che si vuole studiare, vengono solitamente sottoposti a lavaggio in SSC 2X pH 7,0 e pretrattati con RNasi. Poiché i preparati al momento del mio arrivo in laboratorio erano già stati utilizzati in esperimenti di FISH, i suddetti passaggi sono stati saltati. Sono state invece sperimentate delle modifiche al protocollo standard allo scopo di mettere a punto un protocollo che permettesse di rimuovere le sonde dai preparati già ibridati con il cosiddetto *stripping* dei vetrini:

Variazione 1

- lavaggio in PBS 1X pH 7,4 per 5 min.
- lavaggio in SSC 2X pH 7,0 per 5 min.
- lavaggi seriali in EtOH 70%, 90%, 100% per 5 min ciascuno.

Variazione 2

- due lavaggi in PBS pH7,4 per 5 min.
- tre lavaggi in SSC 0,1X pH 7,0 per 5 min.
- lavaggio in SSC 2X pH 7,0 per 5 min.
- lavaggi seriali in EtOH 70%, 90%, 100% per 5 min ciascuno.

Variazione 3

- tre lavaggi in PBS pH 7,4 per 3 min.
- tre lavaggi in SSC 2X pH 7,0 a 42°C per 5 min.
- tre lavaggi in formamide 50% SSC 2X pH 7 a 42°C per 10 min.
- due lavaggi in SSC 2X pH 7,0 Tween 0,2% per 10 min.
- lavaggio in SSC 2X pH 7,0 per 5 min.
- lavaggio in PBS 1X pH 7,4 per 5 min.

3.4.4 Denaturazione dei preparati

Le condizioni per la denaturazione dei preparati sui vetrini si raggiungono immergendo i preparati a 70°C in formamide 70% SSC 2X pH 7 per 4 min. Nel

corso di questo passaggio, la temperatura è molto importante e deve essere accuratamente monitorata con l'utilizzo di un termometro: se è troppo bassa può favorire la formazione di legami non specifici della sonda, se eccede può portare alla perdita del segnale. I vetrini vengono poi disidratati mediante una serie di passaggi in etanoli freddi a gradazione crescente e della durata di 5 min ciascuno. Si parte con due lavaggi in EtOH 70%, per poi passare all'EtOH 90% e giungere all'EtOH assoluto. L'alcool in eccesso viene rimosso con un getto d'aria diretto sulla parte inferiore. Le sonde e i preparati vengono denaturati simultaneamente in modo tale che siano pronti nello stesso momento per la fase di ibridazione.

3.4.5 Ibridazione

Dopo essersi accertati che la sonda sia sciolta in modo uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza, si caricano 10 µl di mix di ibridazione (100 ng di sonda marcata) per ciascun vetrino, si copre immediatamente con un coprioggetto 22X22 permettendo che la miscela si espanda uniformemente e prevenendo la formazione di bolle. Infine, si sigillano i bordi del coprioggetto con colla per materiale plastico, si posizionano i vetrini in una cameretta umidificata non permeabile alla luce, ottenuta deponendo sul fondo della carta assorbente imbevuta di H₂O deionizzata e si incuba a 37°C *overnight*.

3.4.6 Lavaggi di stringenza

Al termine della reazione di ibridazione, per eliminare la sonda che non si è legata al bersaglio o che ha formato legami aspecifici, è necessario effettuare alcuni lavaggi di stringenza.

Si rimuovono i coprioggetti e tutte le tracce di colla e si lavano i vetrini in formamide 50% SSC 2X pH 7 per 5 min a 42°C tre volte consecutive. Dopodiché si effettuano tre lavaggi in SSC 2X pH 7 per 5 min a temperatura ambiente. Segue un lavaggio in PBS 1X pH 7,4 per 5 min a temperatura ambiente. Questi tempi devono essere rispettati con massima precisione per acquisire il grado di specificità desiderato.

3.4.7 Rilevazione del segnale per immunofluorescenza

Si aliquotano 80 µl per vetrino di Blocking Solution per diminuire il rumore di fondo, si copre con coprioggetto 24X32 e si incuba in camera umida a 37°C per 30 min. Le sonde, che hanno incorporato nucleotidi modificati contenenti un gruppo indicatore, vengono rilevate attraverso l'utilizzo di molecole di affinità coniugate a fluorocromi. Le sonde utilizzate in questi esperimenti di FISH sono marcate con biotina e vengono rilevate mediante il legame forte e specifico biotina-streptavidina: la SAV 594 (1:100) porta legato un fluoroforo in grado di emettere fluorescenza rossa, la SAV 488 porta legato un fluoroforo che emette fluorescenza verde. Al fine di amplificare l'intensità del segnale, si pratica una seconda incubazione con l'anticorpo anti-SAV biotinilato (sviluppato in coniglio, 1:100) che permette di individuare le molecole che hanno incorporato la biotina come reporter.

La terza incubazione prevede la coniugazione della SAV 594 o 488 con il relativo anticorpo (1:75).

Le miscele di reazione per ciascuno strato vengono preparate calcolando 30 µl di mix per ciascun vetrino e contengono anche Blocking Solution 1X per saturare i siti aspecifici e quindi aumentare la percentuale di legame tra molecole affini.

Al termine di ogni incubazione della durata di 45 min a 37°C in camera umidificata, vengono effettuati tre lavaggi da 5 min in PBST, preparato con detergente Tween-20 (Sigma-Aldrich, Italia) allo 0,1% in PBS, per rimuovere eventuali legami aspecifici.

3.4.8 Controcolorazione e analisi microscopica

Si applicano 15 µl di DAPI (2 µg/ml) diluito in Vectashield *Mounting medium* (Vector, USA) una soluzione *antifade* che previene cioè il decadimento della fluorescenza; si copre con un coprioggetto 22X22. Si capovolge il vetrino e si preme dolcemente alle estremità dello stesso per far fuoriuscire il Vectashield in eccesso. Infine si sigillano i bordi del coprioggetto con dello smalto trasparente e si fa asciugare al riparo dalla luce. Si procede con l'analisi al microscopio a fluorescenza motorizzato (Zeiss) corredato di una CCD camera, di un software di analisi d'immagine specifico e di un set di filtri specifici per i diversi fluorocromi.

3.5 FISH su DNA elongato

La FISH su DNA elongato tramite la tecnica del Molecular Combing permette di ottenere singole molecole di DNA estese in modo controllato e uniforme su superfici silanizzate, cioè cariche positivamente, preparate in laboratorio rivestendo dei coprioggetto 22X22 con 7-octeniltriclorosilano (Sigma-Aldrich, Italia). Si tratta di un metodo ad elevata risoluzione, capace di analizzare numerosi segnali da un'elevata densità di molecole estese in un singolo esperimento.

3.5.1 Scioglimento delle *plug* di agarosio

Il materiale genetico utilizzato in questi esperimenti di FISH si trova incluso in blocchetti di agarosio. Il primo passaggio per lo scioglimento di queste *plug* è l'eliminazione dell'EDTA, la soluzione che li conserva. A questo scopo si effettuano tre lavaggi da 1 ora in TE 1X pH 8 a temperatura ambiente. Dopodiché si aggiungono 2 ml di MES 0,1 M pH 6,5 e si porta la soluzione alla temperatura di 72°C per 30 min. L'agarosio viene completamente digerito per mezzo dell'aggiunta di 3 µl di β-agarasi I (3U), un enzima termosensibile che agisce alla temperatura di 42°C. La reazione procede *overnight*. Per disattivare l'enzima si alza la temperatura a 50°C per 4 h.

Il DNA purificato viene conservato in eppendorf a temperatura ambiente per una settimana e poi versato in *reservoir*, una vaschetta dotata di un pozzetto delle dimensioni esatte di un vetrino coprioggetto 22X22 e costituita di un materiale inerte, il teflon, che preserva l'integrità del DNA.

3.5.2 Elongazione del DNA tramite Molecular Combing

Le molecole di DNA presenti in soluzione aderiscono spontaneamente e irreversibilmente a vetrini silanizzati, quando gli stessi vengono immersi in *reservoir*.

3.5.3 Denaturazione delle sonde

La precipitazione delle sonde in EtOH 100% e in presenza di NaAc, come sopra descritto, è indispensabile per concentrare la soluzione di DNA. Segue un lavaggio del pellet con EtOH 70% e la sua risospensione in buffer di ibridazione H3 (formamide 50%, SSC 2X, SDS 0,5%, N-Lauroylsarcosine 1%, NaCl 10 mM e Block Aid 1X), precedentemente riscaldato a 37°C. Il volume di ibridazione

calcolato per ciascun vetrino è di 20 µl. Le sonde vengono denaturate con il calore ad una temperatura di 80°C per 10 min e incubate in ghiaccio per 5 min.

3.5.4 Denaturazione dei preparati

Per quanto riguarda i preparati, la denaturazione viene effettuata chimicamente. Si estraggono i vetrini dal congelatore a -20°C e, una volta scongelati, si immergono in una soluzione denaturante, contenente NaOH 0,05 M, NaCl 1 M e H₂O, per 15 min in agitatore. Segue un breve lavaggio in Tris HCl 0,01 M pH 7,6 per stabilizzare il pH e la disidratazione con lavaggi seriali in etanolo 70%, 90%, 100% da 3 min ciascuno.

3.5.5 Ibridazione

Il DNA delle sonde e del target denaturati simultaneamente sono pronti per l'*annealing*. Si aliquotano 20 µl di soluzione contenente la marcatura (250-300 ng di ogni sonda marcata) per ciascun vetrino e si chiude con coprioggetto 22X22, sigillandone i bordi con della colla per materiale plastico per evitare l'evaporazione. I vetrini montati vengono disposti in camera umida chiusa ermeticamente a 37°C *overnight*.

3.5.6 Lavaggi di stringenza

I lavaggi post-ibridazione vengono effettuati in condizioni di stringenza adattate al tipo di sonda utilizzata. Dopo aver estratto i vetrini dall'incubatore ed aver rimosso la colla, si fanno scivolare lateralmente i coprioggetto e si effettuano i primi tre lavaggi in formamide 50%, SSC 2X pH 7,0 da 5 min ciascuno a temperatura ambiente. Seguono tre lavaggi in SSC 2X pH 7,0 da 5 min e infine un lavaggio in PBS 1X pH 7,4 per 5 min.

3.5.7 Rilevazione del segnale per immunofluorescenza

Le sonde, marcate con biotina e digossigenina, vengono rivelate attraverso l'utilizzo di molecole coniugate a fluorocromi.

Le sonde marcate con biotina possono essere rilevate mediante il legame con la molecola di affinità SAV (594 o 488, 1:100). Le sonde marcate con digossigenina, invece, vengono rilevate da anticorpi primari anti-digossigenina (sviluppati in topo, 1:25). Al fine di amplificare l'intensità del segnale, si pratica una seconda incubazione con anticorpi: l'anti-SAV biotinilato (sviluppato in coniglio, 1:50) e l'anticorpo secondario contro le IgG murine (1:50), coniugato con il fluoroforo 488. L'ultima incubazione si effettua con la SAV 594 o 488 (1:75) per la coniugazione con il relativo anticorpo. Per ciascuno strato vengono preparati 30 µl di mix per ciascun vetrino che contengono anche la soluzione Block Aid 1X (Molecular Probes, Invitrogen, Italia) che comparata con la Blocking Solution precedente contiene proteine e componenti più efficaci nell'aumentare il rapporto tra i legami specifici e il background. Al termine di ogni incubazione a 37°C per 30 min in camera umidificata, vengono effettuati tre lavaggi da 5 min in PBS.

3.5.8 Analisi microscopica

Sui vetrini viene posta una goccia di Vectashield *Mounting medium* (Vector, USA) sotto vetrino coprioggetto 22X22 per preservare il segnale. Di seguito, l'ibridazione della sonda viene analizzata con un microscopio a fluorescenza. In questo caso il DNA non viene controcolorato.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Controllo cloni BAC

I siti fragili comuni oggetto di studio in questa esperienza di tirocinio sono stati *FRA3B* e *FRA6E*, due tra i più frequentemente espressi.

Nel primo caso, i cloni genomici selezionati per l'ibridazione *in situ* fluorescente sono stati RP11-48E21 e RP11-354I3, che mappano all'interno del *core* di fragilità della regione.

Nel secondo caso, ho utilizzato il clone RP3-473J16 (gene *PARK2*). Il clone RP11-148G19 è stato scelto per studiare un gene di controllo (*LAMIN B2* sul cromosoma 19).

Il DNA di interesse è stato estratto da colture batteriche prima del mio arrivo in laboratorio: per poter procedere con i successivi passaggi è stato necessario ricontrollare la qualità del DNA mediante elettroforesi in gel di agarosio, che ha permesso di visualizzare gli acidi nucleici migrati come mostrato in Figura 1.

1 2 3

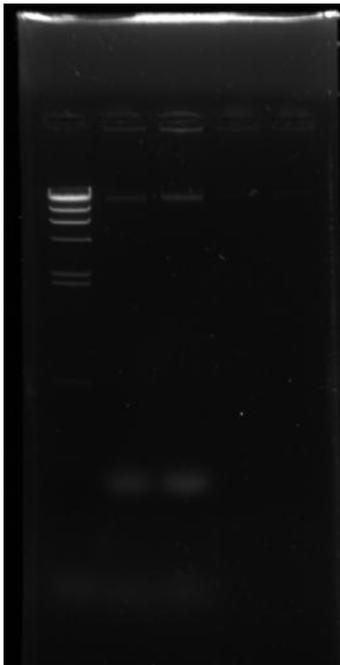


Figura 1. gel di controllo dell'estrazione dei cloni BAC RP11-354I3 (2) e RP11-48E21 (3). Nella corsia 1 è stato caricato il *marker* di peso molecolare λ /Hind III.

La presenza di bande abbastanza nitide e chiaramente visibili indica l'esistenza di un DNA integro, non degradato. La nuvola visibile alla sommità del gel identifica la presenza dell'RNA.

È possibile, inoltre ottenere un valore approssimativo delle reali concentrazioni dei campioni confrontando le intensità delle bande relativamente a quelle note del marcatore di peso molecolare. Le bande dei cloni RP11-354I3 ed RP11-48E21 hanno intensità circa dimezzata se confrontate con quella della quarta banda del marker: è stata perciò stimata per entrambi una concentrazione di 20 ng/μl.

4.2 Controllo della marcatura per Random Priming

Il DNA controllato dal punto di vista qualitativo e quantitativo, può a questo punto essere sottoposto alla reazione di marcatura per la formazione di frammenti di acido nucleico da utilizzare come sonde identificabili in seguito alla loro ibridazione con la sequenza bersaglio.

La corretta digestione enzimatica dei cloni RP11-48E21 e RP11-354I3 viene verificata facendo correre un'aliquota della miscela di Random Priming in gel di agarosio. Il risultato dell'elettroforesi è visibile in figura 2.

1 2 3

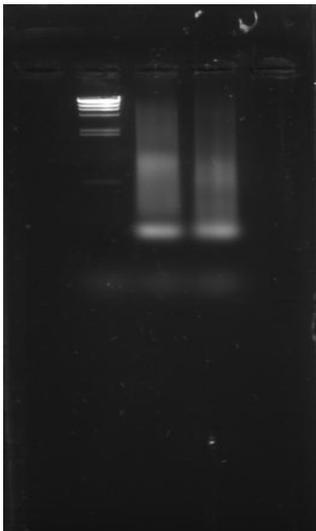


Figura 2. gel di controllo della marcatura mediante *random priming* dei cloni RP11-48E21 (2) ed RP11-354I3 (3). Nella corsia 1 è stato caricato il marcatore di peso molecolare λ /Hind III.

Il gel irradiato al transilluminatore con luce UV mette in evidenza i frammenti di acido nucleico grazie all'emissione di fluorescenza del SYBR Safe, un colorante che si intercala tra le basi. Lo striscio di bande ottenuto (*smear*) indica che le dimensioni dei frammenti separati coprono un intervallo compreso tra 100 e 1000 bp: ciò è indice del successo della reazione e della funzionalità del DNA del campione. La bontà della marcatura non si verifica invece a questo stadio, ma direttamente tramite gli esperimenti *in situ*.

4.3 Controllo della marcatura per Nick Translation

Un altro tipo di reazione sfruttata per la visualizzazione delle sonde è la Nick Translation. Quest'ultima è stata impiegata nella marcatura dei cloni RP11-148G19 e RP3-473J16. Diversamente dal caso precedente, la separazione elettroforetica (Figura 3) rivela un *range* di dimensioni dei frammenti compreso tra 200 e 400 bp.

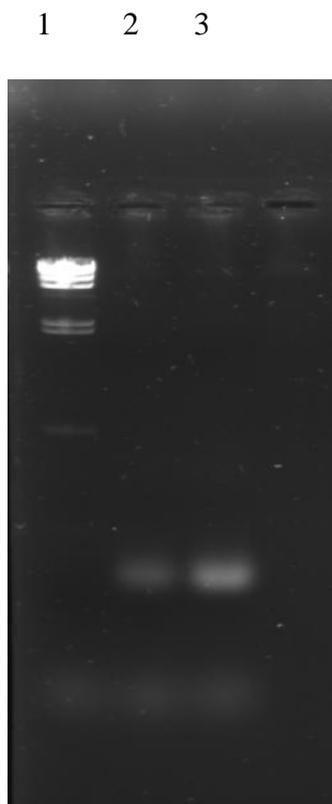


Figura 3. gel di controllo per la marcatura tramite *nick translation* dei cloni RP11-148G19 (1) ed RP3 473J16 (2). Nella corsia 1 è stato caricato il marcatore di peso molecolare λ /Hind III.

Si nota, però, che lo *smear* che identifica il campione 148G19 è un po' meno evidente rispetto a quello del 473J16, a significare che la reazione è probabilmente avvenuta con minore efficienza.

Il risultato è comunque coerente con le aspettative e consente di ritenere che la reazione di marcatura abbia avuto esito positivo.

4.4 FISH su nuclei interfascici e su DNA elongato: differenze

Le tecniche di FISH su nuclei interfascici e di FISH su DNA elongato, di cui ho acquisito padronanza nel corso di questa esperienza di tirocinio, si differenziano per la diversa forma del DNA immobilizzato sul supporto solido e, infatti, mirano a ottenere risultati diversi, come menzionato in Introduzione.

Trattandosi di diversi stati biofisici in cui si trova il DNA *in vitro*, si sono rese necessarie condizioni diverse per la separazione e lo svolgimento dei filamenti nei due casi.

La denaturazione, che consente la successiva ibridazione con le sonde marcate, non è un processo irreversibile perché i legami covalenti dello scheletro zuccherofosfato non vengono intaccati, al contrario delle interazioni non covalenti come i legami idrogeno tra le basi complementari e le altre forze stabilizzanti il DNA. Ciò rende possibile manipolare il DNA *in vitro*.

La denaturazione del DNA viene indotta da un incremento del calore, capace di rompere i legami idrogeno tra le basi complementari e le basi adiacenti di uno stesso filamento. Il limite di denaturazione del DNA dipende dalla temperatura di *melting*, definita come il punto a cui il 50% del DNA si trova sotto forma di singola elica. Questo parametro dipende dalle basi che compongono il DNA di interesse: per un DNA con tenore in GC elevato, il punto di *melting* è più alto rispetto ad un DNA ricco in AT, dato che le basi A e T si appaiano con due legami idrogeno, mentre le basi G e C si appaiano con tre legami idrogeno e quindi necessitano di una maggiore energia termica per separarsi.

Nella FISH si deve però garantire l'integrità del preparato cellulare o cromosomico. L'utilizzo della formamide come agente denaturante contribuisce a ridurre le interazioni idrofobiche tra le basi su filamenti opposti, abbassando la temperatura di *melting* dell'acido nucleico. Inoltre, una bassa concentrazione salina aumenta la repulsione elettrostatica dei gruppi fosfato, che contrastano tutte le interazioni deboli tra le basi complementari dei due filamenti, lasciando appaiate solo le interazioni più forti.

Tenuto conto di ciò, nel corso degli esperimenti di FISH interfascica i preparati sono stati denaturati in una soluzione contenente formamide 70% SSC 2X pH 7 a 70°C, temperatura che consente di mantenere la struttura morfologica dei preparati.

Per quanto concerne invece la FISH su DNA elongato, la doppia elica del DNA viene separata in due filamenti semplici grazie all'intervento di agenti chimici che modificano radicalmente il pH. Nello specifico, è stata impiegata una soluzione alcalina (NaOH 0,05 M, NaCl 1M) che aumentando il numero di anioni idrossido OH⁻ dell'ambiente in cui il DNA è presente, ha permesso di destabilizzare i legami idrogeno tra le basi.

La scelta della metodologia di denaturazione è diversa nei due casi proprio perché sono diversi gli intenti: generalmente, comunque, la temperatura è quella più adatta poiché non inquina la soluzione, è pienamente reversibile e non danneggia la morfologia del DNA se non si superano valori critici.

4.5 FISH su nuclei interfascici

4.5.1 Stripping dei vetrini

I campioni utilizzati negli esperimenti di FISH su nuclei interfascici erano già stati impiegati nella rilevazione di sonde locus-specifiche prima del mio arrivo in laboratorio.

Solitamente, i preparati oggetto di analisi vengono pretrattati allo scopo di minimizzare il background autofluorescente intrinseco alle cellule e ai tessuti. I vetrini fissati con le cellule in interfase vengono prima immersi in una soluzione di SSC 2X pH 7,0 per stabilizzare la morfologia nucleare e successivamente incubati in una soluzione contenente RNAsi per ridurre la presenza del citoplasma.

Durante l'attività di tirocinio, questi passaggi non si sono resi necessari, in quanto ho utilizzato vetrini già ibridati una prima volta: invece, sono state valutate diverse tecniche per la messa a punto di un protocollo per lo *stripping* dei vetrini già ibridati in precedenza. Era infatti necessario effettuare nuove analisi ed aumentare l'affidabilità di una serie di dati già disponibili in laboratorio relativi all'analisi di replicazione basata sulla determinazione di segnali di ibridazione singoli o sdoppiati (Introduzione, pag. 10).

Lo *stripping* è una metodica che consente di rimuovere anticorpi primari e secondari oltre alle stesse sonde di DNA. È utile quando si vuole indagare più di una sonda e, invece di utilizzare più preparati cromosomici come target, si effettua la reibridazione di un singolo preparato con il vantaggio di conservare campioni (magari anche preziosi) e di guadagnare tempo e materiali.

La chiave dello *stripping* è quella di usare condizioni denaturanti a bassa stringenza che rilascino gli anticorpi e, separando i singoli filamenti di DNA, anche la sonda. Partendo da questo presupposto, sono stati sviluppati diversi protocolli comprendenti combinazioni di detergenti, alte temperature e basse concentrazioni saline.

4.5.2 Analisi dei vetrini

La prima fase di questi esperimenti si è concentrata sulla scelta dei vetrini da utilizzare per la reibridazione con le sonde di *FRA6E* e del gene di controllo *LAMIN B2*. Si è infatti posta particolare attenzione nell'evitare che le sonde della prima ibridazione e quelle della seconda ibridazione mappassero sullo stesso cromosoma, dato che l'analisi si svolge in interfase.

Come già descritto in Materiali e Metodi, la prima variazione al protocollo standard prevedeva un iniziale lavaggio in PBS 1X pH 7,4 per rimuovere lo smalto che sigilla i vetrini coprioggetto e staccare gli stessi, seguito da un lavaggio in SSC 2X pH 7,0 a temperatura ambiente. Basse concentrazioni di cationi monovalenti destabilizzano la doppia elica di DNA e aumentano la repulsione dei gruppi fosfato carichi negativamente.

L'analisi dei vetrini ha rivelato la presenza sia sui nuclei in interfase che sui cromosomi in metafase di segnali di fluorescenza rossa relativi alla seconda ibridazione e di segnali di fluorescenza verde relativi alla prima ibridazione. Il fatto che questi ultimi fossero visibili ha sorpreso in quanto significa che non solo la sonda, ma nemmeno gli anticorpi della prima ibridazione si erano staccati in modo efficiente.

Comparando protocolli reperiti in letteratura, si è deciso di intensificare le condizioni di *stripping* riducendo la concentrazione del “buffer di strippaggio”.

Si è sviluppata una modifica del protocollo precedente che prevede l’aggiunta di tre lavaggi in SSC 0,1X pH 7,0: una concentrazione salina così bassa favorisce la repulsione elettrostatica tra le cariche negative dello scheletro zucchero-fosfato e i legami a idrogeno che si formano tra le basi complementari dei due filamenti, inducendo il distacco delle due singole catene.

In questa seconda variazione, due vetrini sono stati utilizzati come controllo del protocollo senza essere ibridati ma solo incubati con gli strati di anticorpi per verificare il distacco della sonda che era stata marcata con biotina e rilevata con fluorescenza rossa. In seguito allo *stripping* e alla rilevazione della stessa biotina con fluorescenza verde sono stati ancora una volta osservati segnali rossi sovrapposti a segnali verdi, a testimonianza del fatto che il protocollo non aveva funzionato.

Altri vetrini, su cui erano state ibridate sonde marcate con digossigenina rilevate in verde, sono stati reibridati con sonde marcate con biotina e rilevate con fluorescenza rossa. Il segnale della sonda della prima ibridazione non era in questo caso visibile, ma non avendo rilevato con anticorpi anti-digossigenina non è possibile affermare con certezza il distacco della sonda.

La terza ed ultima variazione si propone di effettuare un percorso ancora diverso, innalzando la temperatura e quindi somministrando maggiore energia per la separazione dei due filamenti. Vengono effettuati tre lavaggi in SSC 2X pH 7,0 alla temperatura di 42°C fatti seguire da altri tre lavaggi in formamide 50% SSC 2X pH 7,0 sempre a 42°C. Questi lavaggi dovrebbero eliminare le interazioni di tipo idrofobico tra basi su filamenti opposti.

L’utilizzo di una temperatura sostanzialmente più alta rispetto a quella di *melting* (ma che non superi un determinato valore di criticità) abbassa la stringenza della denaturazione (un cambiamento di 1° C cambia la stringenza dell’1%).

Seguono dei risciacqui in SSC 2X pH 7,0 Tween 0,2% a temperatura ambiente. Si effettuano due lavaggi finali: uno in SSC 2X pH 7,0 ed uno in PBS 2X pH 7,4.

Quest’ultima prova è stata effettuata con lo scopo di verificare esclusivamente il distacco delle sonde ibridate in precedenza (marcate con digossigenina e rilevate in verde o marcate con biotina e rilevate in rosso), osservando direttamente i preparati al termine di questi passaggi.

I risultati ottenuti (segnali visibili nei nuclei in interfase e sui cromosomi in metafase, Figure 4 e 5) non sono stati però coerenti con le aspettative, in quanto nemmeno con questo protocollo le sonde e gli anticorpi preesistenti sono stati rimossi.

In generale, tutti i nuclei non presentavano segnali brillanti e distinti né tantomeno facilmente distinguibili a causa del rumore di fondo. Il background non era ben sgombro da particelle fluorescenti.

Per spiegare i risultati osservati sono state avanzate alcune ipotesi. È stato proposto che gli anticorpi non si staccino a causa della presenza di più strati costituiti da aggregati molecolari degli anticorpi stessi uniti anche con legami crociati simili a quelli di un reticolo. A ciò può essere unita l’aumentata sensibilità della camera digitale CCD, in grado di misurare variazioni molto piccole del segnale che forse nei protocolli di *stripping* pubblicati in passato non erano state adeguatamente considerate.

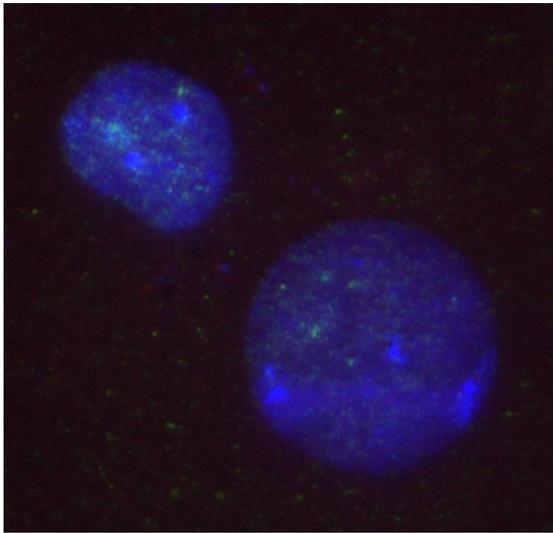


Figura 4. nuclei interfasicci con segnali di ibridazione.

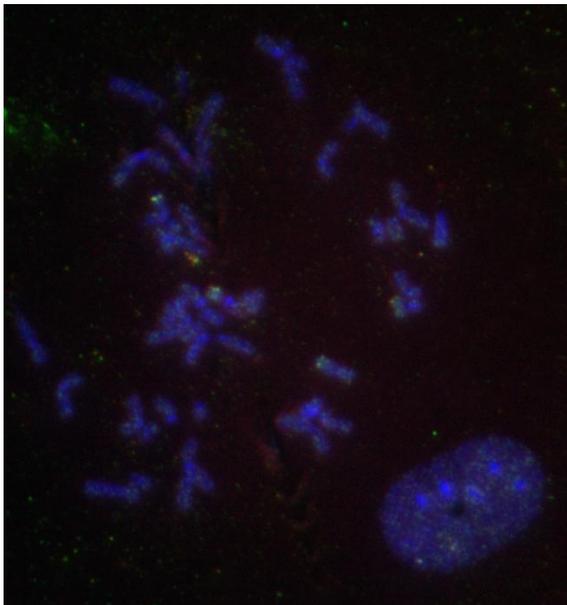


Figura 5. segnali di fluorescenza su piastra metafasica

4.6 FISH su DNA elongato

4.6.1 Analisi strutturale di *FRA3B*

La tecnologia del *molecular combing* ha permesso di ottenere accurate e precise informazioni su microcambiamenti come delezioni, amplificazioni e riarrangiamenti nell'ordine delle Kb a livello del sito fragile *FRA3B*, che come si è detto (vedi Introduzione) mostra alterazioni e perdita di eterozigosi in una grande varietà di tumori.

Ho partecipato a degli esperimenti di FISH a due colori su DNA di linfociti primari umani ottenuti da sangue di donatori sani. Queste cellule, stimolate a proliferare con PHA, sono state analizzate per la regione del *core* di fragilità di *FRA3B* impiegando le sonde locus-specifiche RP11-48E21 ed RP11-354I3.

Da analisi condotte prima del mio arrivo in laboratorio, erano stati sorprendentemente riscontrati, oltre al normale pattern di ibridazione delle sonde separate dalla distanza attesa anche dei casi anomali di sovrapposizione dei segnali di fluorescenza verde e rossa (Figura 6).

Questi profili inusuali indicano che è avvenuta una serie di riarrangiamenti di piccoli tratti che il potere di risoluzione della FISH (1-3 Kb) non è in grado di distinguere. Viene, invece, misurata la lunghezza del tratto sovrapposto nel suo complesso, ovvero le porzioni delle due sonde che sono andate incontro a riarrangiamenti strutturali.

Si tratta di un'osservazione importante perché finora i dati di letteratura riportano delezioni e riarrangiamenti del gene oncosoppressore *FHIT* solo in cellule tumorali o indotte a stress replicativo da trattamento con afidicolina.

Nelle stesse cellule primarie l'analisi della dinamica di replicazione di *FRA3B* evidenzia inoltre una frequenza particolarmente elevata di arresti di forca proprio a livello della sequenza del sito fragile che risulta riarrangiata.

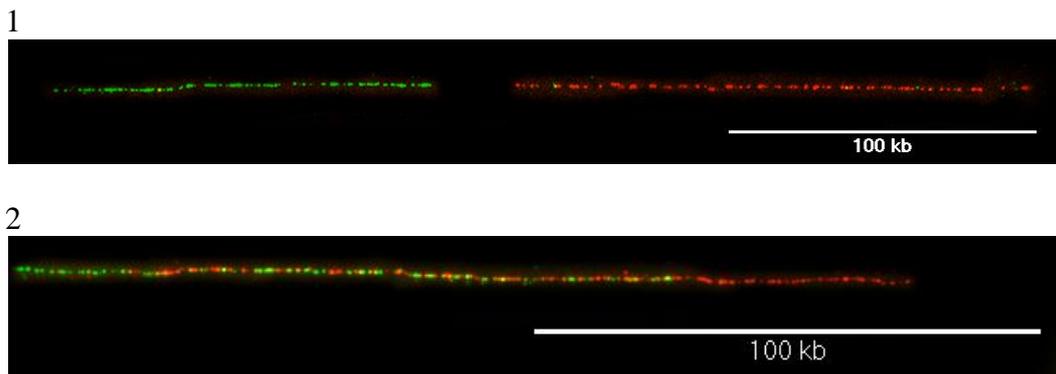


Figura 6. pattern di ibridazione delle sonde RP11-48E21 marcata con biotina e rilevata con fluorescenza rossa ed RP11-354I3 marcata con digossigenina e rilevata con fluorescenza verde. 1) le sonde con la distanza; 2) le sonde con la sovrapposizione

Per poter affermare con certezza la correlazione tra i riarrangiamenti strutturali nella regione del sito fragile *FRA3B* e gli eventi di deregolazione della replicazione e altresì escludere il coinvolgimento della stimolazione linfocitaria nell'indurre questi eventi, nel corso della mia attività di tirocinio sono state condotte altre analisi su:

- Linfociti primari umani non stimolati, in fase G0
- Linfociti primari umani stimolati con PHA

Ho ottenuto delle misurazioni di distanza tra le sonde in questi campioni (Tabella 1). Per trarre delle conclusioni sulle informazioni contenute nei campioni osservati fino ad oggi è stato eseguito un test statistico, il G test, che permette di verificare se la differenza nella frequenza di sovrapposizione osservata in linfociti in fase G0 e linfociti stimolati con PHA è significativa.

	LINFOCITI IN G0	LINFOCITI stimolati
Dimensione massima (Kb) 48E21	191,8	193,8
Dimensione massima (Kb) 354I3	193,8	212,3
Distanza media (Kb)	18,5	18,6
N con distanza	129	196
N sovrapposizioni	11	25
N totali	140	221
% di sovrapposizioni	7,9	11,3

Tabella 1. valori relativi alla distanza tra le sonde RP11-48E21 ed RP11-354I3 in linfociti primari umani in fase G0 e in linfociti umani primari stimolati con PHA.

Il valore di probabilità scelto, noto come livello di significatività del test di ipotesi è 0,05. Ciò implica che rifiutiamo erroneamente il 5% delle volte in cui l'ipotesi è vera. Il valore P del test viene confrontato con il livello predeterminato di significatività per decidere se l'ipotesi deve essere accettata o rifiutata.

Poiché nel nostro caso $P=0,28$ si conclude che non c'è sufficiente evidenza per mettere in dubbio la validità dell'ipotesi: questo evento può essere dovuto al fatto che il campione selezionato è troppo piccolo.

Sarà quindi utile proseguire con gli esperimenti di FISH su linfociti per aumentare il campione e l'attendibilità dei dati, oltre che impiegare il DNA di altri tipi cellulari normalmente proliferanti. Lo sviluppo di queste osservazioni è di utilizzare dei fibroblasti primari, in modo da meglio comprendere l'eventuale ruolo della stimolazione proliferativa negli effetti osservati.

5. BIBLIOGRAFIA

S. Caburet, C. Conti and A. Bensimon (2002). Combing the genome for genomic instability. *TRENDS in Biotechnology* **20** (8), 334-350.

R. Lebofsky and A. Bensimon (2002). Single DNA molecule analysis: Applications of molecular combing. *BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS* **1** (4), 385-396.

M. M. Le Beau, F. V. Rassos, M. E. Neilly, R. Espinosa III, T. W. Glover, D. I. Smith and T. W. McKeithan (1998). Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. *Human Molecular Genetics* **7** (4), 755-761.

N. A. Becker, E. C. Thorland, S. R. Denison, L. A. Phillips and D. I. Smith (2002). Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases. *Oncogene* **21**, 8713-8722.

Y. Pekarsky, N. Zanesi, A. Palamarchuk, K. Huebner, C. M. Croce (2002). FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *THE LANCET Oncology* **3**, 748-754.

S. V. Stedum and W. King (2002). Basic FISH Techniques and Troubleshooting. In: *Methods in molecular Biology*, vol. 204: Molecular cytogenetics: protocol and Applications, Yao-Shan Fan (Ed), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 51-63.

T. Strachan and A. P. Read (2004). Patologia molecolare e Genetica dei tumori. *Genetica umana molecolare*, Terza edizione, Edizione italiana a cura di G. A. Danieli, UTET SCIENZE MEDICHE, 439-481.

M. F. Arlt, A. M. Casper and T. W. Glover (2003). Common fragile sites. *Cytogenetic and Genome Research* **100**, 92-100.

T. W. Glover (2006). Common fragile sites. *Cancer letters* **232**, 4-12.

Ringrazio la Prof.ssa Russo per avermi accolto nel suo laboratorio

Ringrazio Elena per la pazienza e il supporto morale

Ringrazio Elisa per la disponibilità

Un pensiero e un ringraziamento particolare va a Mamma e Papà

Grazie ad Eleonora e Giada

Grazie agli zii e alle nonne

Grazie a Giulia, Francesca, Claudia e Matteo

Grazie a tutti gli amici di Padova che mi sono stati vicini