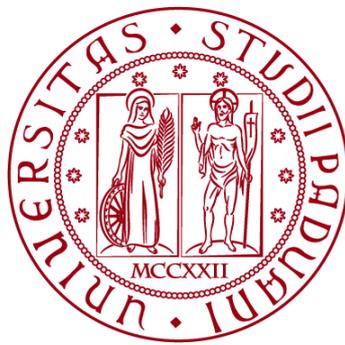


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Utilizzo della tecnica Quantitative Real-time PCR per valutare
l'effetto dello stress ossidativo sul genoma mitocondriale**

Tutor: Dott.ssa Mara Doimo
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

Laureanda: Ilaria De Gobbi

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Abstract	2
2. Introduzione	3
DNA mitocondriale	3
Stress ossidativo	5
Quantitative Real Time PCR.....	7
Metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$	11
3. Materiali e metodi	12
Mantenimento delle colture cellulari	12
Trattamento cellule con perossido di idrogeno.....	13
Estrazione DNA e quantificazione	15
Quantitative Real Time PCR.....	17
4. Risultati e Discussione	20
5. Conclusioni	22
6. Bibliografia	23

Abstract

La tecnica della Quantitative Real Time PCR (qPCR) è un metodo di amplificazione del DNA che permette di misurare in tempo reale i livelli di DNA presenti nel campione biologico di interesse. L'amplificazione è monitorata mediante l'utilizzo di sonde o intercalanti fluorescenti del DNA, quali il *SYBR Green*. Questa tecnica può essere utilizzata per valutare il genoma mitocondriale (mtDNA), che, nella cellula eucariote, è presente in copie multiple. In questo studio, la qPCR è stata utilizzata per osservare e quantificare come varia il livello di DNA mitocondriale (mtDNA) in cellule *Human Embryonic Kidney* (HEK 293) nella quali è stato indotto uno stress ossidativo mediante trattamento con perossido di idrogeno (H_2O_2). I dati ottenuti sono stati normalizzati rispetto alla quantità di DNA nucleare e analizzati per capire come varia il livello di mtDNA in queste condizioni. Si è osservato che il trattamento con H_2O_2 induce un aumento del DNA mitocondriale nelle cellule trattate per 10 e 30 minuti, mentre i risultati suggeriscono una diminuzione di mtDNA nel campione trattato per 3 ore. I risultati ottenuti sono stati discussi sulla base dei dati presenti in letteratura.

Introduzione

DNA mitocondriale

I mitocondri possiedono un proprio genoma all'interno della loro matrice, associato alla membrana interna mitocondriale, che si distingue da quello nucleare. Il genoma mitocondriale (mtDNA) umano è costituito da un insieme di molecole circolari a doppio filamento di 16,5 Kilobasi, superavvolte, che contengono 37 geni, di cui 13 codificano per subunità strutturali fondamentali dei complessi della catena respiratoria, coinvolti nella fosforilazione ossidativa (I, III, IV, V), e gli altri sono regolatori (22 RNA transfer tRNA e 2 RNA ribosomiali rRNA 12S e 16S). Le restanti proteine mitocondriali, fra cui quelle necessarie alla replicazione e al mantenimento del mtDNA, sono codificate dal genoma nucleare (nDNA) e poi importate all'interno del mitocondrio. ^[1,8] Difetti in questi geni possono causare patologie denominate *MDMD (mtDNA maintenance defects)*.

In ciascuna molecola di mtDNA si distinguono il filamento pesante (H, *heavy chain*), contenente la maggior parte dei geni, ricco in guanina, e quello leggero (L, *light chain*), ricco in citosina. ^[1,8] Il codice genetico mitocondriale presenta alcune eccezioni rispetto a quello nucleare, ad esempio vi sono quattro codoni di stop. ^[8]

La sequenza del mtDNA umano è per il 90% codificante, priva di introni e le sequenze di alcuni geni risultano sovrapposte tra loro. L'unica eccezione è a livello della regione regolatoria D-loop (*Displacement Loop*), che contiene i promotori per i due filamenti e l'origine di replicazione del filamento pesante (oriH). L'origine di replicazione del filamento leggero (oriL) si trova invece a 2/3 della molecola circolare (fig. 1). Sono stati proposti diversi modelli di replicazione del mtDNA. Il modello più supportato dalle evidenze sperimentali è il "*strand displacement model*" (spostamento asincrono del filamento). Secondo tale modello, la replicazione non inizia contemporaneamente per i due filamenti, ma comincia prima dall'oriH del filamento pesante. Successivamente, quando la regione oriL si trova a singolo filamento, inizia a replicarsi anche il filamento leggero in direzione opposta (fig. 2). ^[8,9]

La trascrizione dei due filamenti di mtDNA inizia a partire dai due promotori, entrambi localizzati nella regione regolatoria e porta alla formazione di due RNA policistronici che coprono l'intera lunghezza della molecola di DNA, contenenti i vari geni, che poi subiscono maturazione. ^[8]

Le molecole di mtDNA sono organizzate in complessi nucleo-proteici definiti nucleoidi. Il componente proteico maggiore di queste strutture è la proteina TFAM, responsabile dell'impacchettamento delle molecole di mtDNA. Sono poi presenti altre proteine, tra cui quelle responsabili per la replicazione del mtDNA e la proteina ATAD3. Recentemente, evidenze sperimentali hanno dimostrato che la regione D-loop può legarsi alla proteina ATAD3 della membrana mitocondriale interna, contribuendo alla localizzazione e all'organizzazione dei nucleoidi. ^[1]

A differenza del DNA nucleare, il DNA mitocondriale (mtDNA) è presente in copie multiple (poliplasmia). Ogni mitocondrio può contenere più molecole di mtDNA (2-10) e ciascuna cellula contiene numerosi mitocondri. Per questo motivo, il numero di molecole di mtDNA è altamente variabile sia tra cellule e tessuti diversi nello stesso individuo che tra individui della stessa specie. Inoltre cambiamenti fisiologici o patologici della cellula possono portare ad una variazione delle copie di mtDNA. [2,4]

Il genoma mitocondriale presenta caratteristiche peculiari nella sua ereditarietà, che lo differenziano dal nDNA. Esso è infatti ereditato esclusivamente per via materna, senza ricombinazione, e segue un meccanismo di segregazione casuale nelle due cellule figlie durante la mitosi. Il genoma mitocondriale può trovarsi in una situazione di omoplasma o di eteroplasma, in cui sono presenti almeno due copie diverse di mtDNA, nella stessa cellula, tessuto o individuo; quest'ultima influisce nella trasmissione delle eventuali mutazioni patogeniche e contribuisce a creare l'effetto soglia nelle manifestazioni fenotipiche delle patologie mitocondriali. [1]

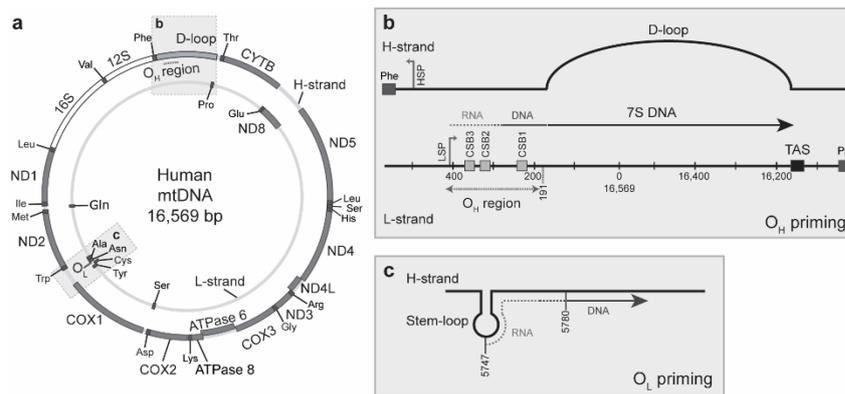


Figura 1 Genoma mitocondriale [fonte Doimo et al, Book Chapter]

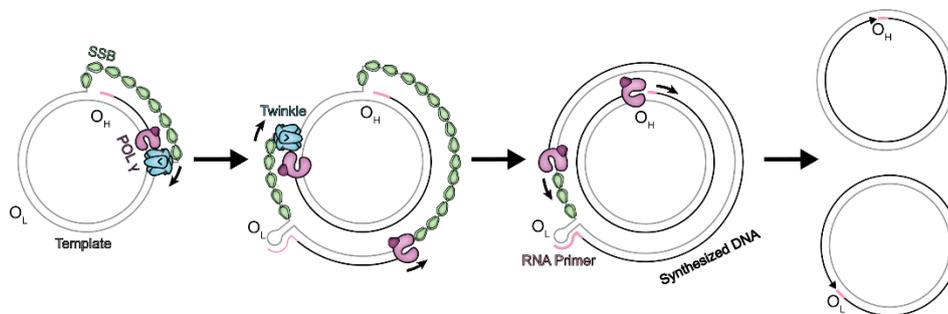


Figura 2 Modello di replicazione del mtDNA [fonte Doimo et al, Book Chapter]

Stress ossidativo

Lo stress ossidativo è una condizione che si instaura in seguito ad uno squilibrio tra le specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species, ROS*) e le molecole antiossidanti presenti nell'organismo, deputate alla loro neutralizzazione. I principali ROS sono l'anione superossido ($O_2^- \cdot$), il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossilico ($OH^- \cdot$), che si formano mediante reazioni a catena di dismutazione e ossidoriduzione. Fra di essi il perossido di idrogeno, potente ossidante, risulta il più stabile, ha un'emivita maggiore e può diffondere attraverso le membrane biologiche, anche a distanze elevate.

I ROS vengono generati fisiologicamente durante la fosforilazione ossidativa per produrre energia e dall'enzima monoaminossidasi mitocondriale, i mitocondri costituiscono quindi la maggiore fonte di specie reattive dell'ossigeno intracellulare. ^[1,5] Numerose condizioni patologiche sono inoltre in grado di incrementare la produzione di questi radicali nelle cellule. ^[2,4]

Le cellule possiedono vari meccanismi per neutralizzare le quantità fisiologiche di ROS prodotti, come gli enzimi antiossidanti superossido dismutasi (*SOD*), catalasi, perossiredossine e glutazione perossidasi, oltre alla molecola glutazione e altre sostanze antiossidanti.

Quando le specie reattive dell'ossigeno sono presenti in quantità elevate nella cellula, esse danneggiano le principali macromolecole biologiche, causando perossidazione lipidica, danno alle proteine e lesioni al DNA. In particolare il DNA può subire rotture a singolo o a doppio filamento, modificazione, ossidazione o degradazione delle basi azotate, e può accumulare mutazioni. Il mtDNA, data la sua localizzazione in prossimità dei complessi della catena respiratoria, ed essendo privo di istoni, è particolarmente soggetto a questo tipo di danni. ^[1,5]

Vari studi hanno infatti rilevato che i ROS nei mitocondri provocano danni al mtDNA attraverso l'ossidazione di alcune basi, principalmente la guanina. È stato osservato un aumento di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxoG) nel mtDNA di cellule sottoposte a stress ossidativo. ^[2,3,4,5] I mitocondri con il DNA alterato, che risultano disfunzionali, possono venire eliminati per mitofagia. ^[1] Lo stress ossidativo mitocondriale è inoltre correlato alla neurodegenerazione e al processo di invecchiamento, dovuti all'accumulo di queste mutazioni. ^[1,5]

In contrapposizione, però, secondo altre analisi un modesto livello di molecole ROS potrebbe stimolare la replicazione del mtDNA, favorendo un possibile adattamento allo stress.

In uno studio è stato infatti dimostrato che la generazione di un O_2 singoletto mediante incubazione con acido 5-amminolevulinico (*ALA*) e irradiazione laser stimolava la replicazione del mtDNA in cellule *HeLa*, in seguito a modifiche specifiche nella regione di controllo D-Loop, e grazie all'azione di proteine quali il fattore di trascrizione mitocondriale A (*TFAM*) e la Polimerasi Gamma. ^[2]

Inoltre in un secondo articolo è stato riscontrato che inducendo uno stress ossidativo nei mitocondri in cellule di lievito, mediante trattamento con diverse concentrazioni di H_2O_2 , si osservava un aumento di basi ossidate e rotture a doppio filamento (*double strand breaks, DSB*) nell'origine di replicazione (*ori5*) nel mtDNA. Ciò portava ad un conseguente stimolo per la riparazione e replicazione della molecola, e quindi a un aumento del numero di copie del mtDNA. L'aumento del mtDNA si verificava anche in assenza di trattamento, ma con un tasso molto inferiore, e probabilmente a causa dell'aumento fisiologico dei ROS generati dall'attività dei complessi della catena respiratoria.^[3]

In entrambi gli studi è stato evidenziato un aumento di 8-oxoG nel mtDNA, in particolare nella regione D-Loop di controllo nelle cellule umane e nella corrispondente *ori5* nelle cellule di lievito, in seguito all'aumentato stress ossidativo. Questa lesione mirata potrebbe favorire la replicazione e il successivo aumento del numero di copie del mtDNA, ma i meccanismi specifici coinvolti non sono ancora chiari.

In questo studio è stato generato uno stress ossidativo mediante trattamento delle cellule Human Embryonic Kidney (HEK293) con perossido di idrogeno (H_2O_2) 0,5 mM, eseguito secondo tre tempistiche differenti di 10 minuti, 30 minuti e 3 ore.

Successivamente, tramite la Quantitative Real Time PCR (qPCR), che rappresenta la tecnica di elezione per valutare la variazione del numero di copie del mtDNA (*copy number variation-CNV*), sono stati monitorati i livelli di mtDNA e la loro variazione in condizione di stress ossidativo.

Quantitative Real Time PCR

La Quantitative Real Time PCR (qPCR) è una variante della standard *Polymerase Chain Reaction* (PCR), metodo di amplificazione esponenziale in vitro di sequenze bersaglio. Permette di effettuare una quantificazione che può essere assoluta o relativa, e può essere applicata in studi di espressione genica, per rilevare e identificare agenti patogeni in diagnosi, o per stimare il numero di copie presenti in un campione. Può essere applicata al DNA genomico, ad esempio per quantificare un allele, permettendo di identificare e distinguere anche un allele mutato o deletato presente in eterozigosi. La Real Time PCR può essere impiegata inoltre per misurare l'RNA, per studiare i livelli di espressione genica. In questo caso si chiama *reverse transcription* PCR e, a differenza della normale qPCR, nel primo passaggio prevede l'utilizzo di una trascrittasi inversa per retrotrascrivere l'RNA in cDNA, in modo da eliminare gli introni dall'amplificato; i successivi passaggi sono invece gli stessi.

Nella Quantitative Real Time PCR è possibile analizzare la generazione dei prodotti di amplificazione in real time durante l'intera reazione. Ciò avviene mediante l'utilizzo di sonde o intercalanti fluorescenti del DNA che permettono di monitorare la sintesi degli amplificati a partire dall'acido nucleico nel campione biologico di interesse, ottenendo un segnale direttamente proporzionale alla quantità di materiale presente. Il segnale emesso dai fluorofori eccitati viene rilevato da un sensore per il rilevamento della fluorescenza interno allo strumento.

Essendo la quantità di amplificato di PCR prodotto in ogni ciclo proporzionale al numero di molecole di DNA presenti nella miscela all'inizio, tramite la Quantitative Real Time PCR è possibile stimare la concentrazione di DNA presente nel campione biologico di partenza. La qPCR è una tecnica rapida e ad elevata sensibilità analitica, consente perciò la quantificazione in un ampio intervallo di concentrazioni di acido nucleico, anche molto basse. Questo metodo permette una stima più corretta rispetto ai sistemi di quantificazione tramite gel elettroforesi dopo la classica PCR end-point. Presenta inoltre una ridotta variabilità intra-saggio e inter-saggio, soprattutto nelle fasi iniziali della reazione, in cui si ha una maggiore omogeneità di segnale e una proporzionalità diretta fra la quantità di ampliconi prodotti e il DNA di partenza.

La stima della quantità del DNA di partenza si ottiene confrontando a quale ciclo l'intensità di fluorescenza derivata dal campione di interesse supera un valore soglia determinato (*threshold*). Questo viene denominato ciclo soglia *Ct*, alla quale il segnale della fluorescenza dell'amplificato diventa statisticamente significativo, superando il segnale di fondo (*background*).

Ogni pozzetto in cui avviene la reazione di amplificazione avrà un proprio *Ct*, che servirà per calcolare la concentrazione di DNA nel campione di partenza. Il *Ct* è infatti inversamente proporzionale al logaritmo della quantità di DNA presente all'inizio, perciò minore è il valore del ciclo soglia, cioè più rapidamente il segnale raggiunge la *threshold*, maggiore è la quantità di molecole di DNA presenti nel campione iniziale di partenza, e viceversa.

Sistemi di rilevamento nella qPCR

Per il rilevamento dei prodotti in una qPCR sono stati sviluppati vari sistemi fluorescenti, che possono essere aspecifici o specifici.

Il metodo più semplice, impiegato anche in questo studio, consiste nell'utilizzare un intercalante aspecifico che emette una fluorescenza rilevabile quando lega il DNA a doppio filamento. Il più utilizzato è il *SYBR Green*, che si intercala nel solco minore, in modo indipendente dalla sequenza. Il suo segnale viene registrato dal sensore per il rilevamento della fluorescenza durante la fase di estensione di ogni ciclo nella reazione, quando il fluoroforo viene eccitato. L'aumento progressivo e graduale del segnale fluorescente è proporzionale alla velocità con cui vengono sintetizzati gli amplificati, e permette di misurare in tempo reale la quantità del DNA target ad ogni ciclo. Il limite dell'utilizzo di questa molecola è il fatto che si possa intercalare in qualsiasi DNA a doppio filamento presente nella miscela di reazione, quindi anche nei dimeri di primer che potrebbero formarsi durante il procedimento o nei prodotti aspecifici, portando a sovrastimare la quantità dell'amplificato di interesse nella provetta.

I metodi specifici invece utilizzano delle sonde oligonucleotidiche con una sequenza complementare ad una regione del DNA bersaglio interna ai due primers, che emettono fluorescenza solo dopo l'ibridazione specifica al prodotto di PCR. Le sonde contengono alle estremità due diverse molecole: un marcatore fluorescente (o *reporter*) e una molecola *quencher*. Nel sistema ad ibridazione, finché la sonda è in soluzione, il *quencher* blocca l'emissione della fluorescenza da parte del *reporter*, secondo il meccanismo di trasferimento dell'energia di risonanza di Förster (*Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*), quando invece la sonda si ibrida al target, i due gruppi vengono allontanati tra di loro e si registra il segnale fluorescente del *reporter*, proporzionale alla quantità di amplificato. L'utilizzo di sonde in grado di ibridarsi esclusivamente agli amplificati permette di evitare il problema di quantificazione legato alla presenza dei dimeri di primer o di amplificati non specifici e fornisce un ulteriore livello di specificità e affidabilità della reazione. Inoltre è possibile utilizzare fluorofori differenti associati alle sonde che consentono di amplificare più prodotti nella stessa reazione (PCR Multiplex).

Curva di melting

Per verificare la specificità della reazione, ovvero che il segnale di fluorescenza rappresenti effettivamente la quantità dell'amplificato di interesse, si effettua una valutazione mediante l'analisi delle curve di dissociazione (o curve di *melting*). Questo tipo di analisi viene effettuata alla fine del ciclo di amplificazione riscaldando gradualmente il prodotto di PCR fino alla temperatura di denaturazione e registrando la diminuzione dell'intensità dell'intercalante fluorescente, man a mano che il DNA si denatura a singolo filamento. Nel grafico si analizza la derivata della curva in funzione della temperatura. La temperatura di fusione di una qualsiasi sequenza, alla quale il 50% delle molecole è dissociato, è influenzata dalla sua lunghezza e dalla sua composizione in percentuale di coppie di basi G+C ed è perciò specifica per ogni molecola di DNA. In una reazione ottimale di PCR, nella curva di *melting* si osserva un solo picco specifico, corrispondente all'amplificato di interesse. Se invece sono presenti dimeri di primer, di lunghezza inferiore rispetto all'amplificato target, o prodotti aspecifici, nella curva compaiono ulteriori picchi di fusione.

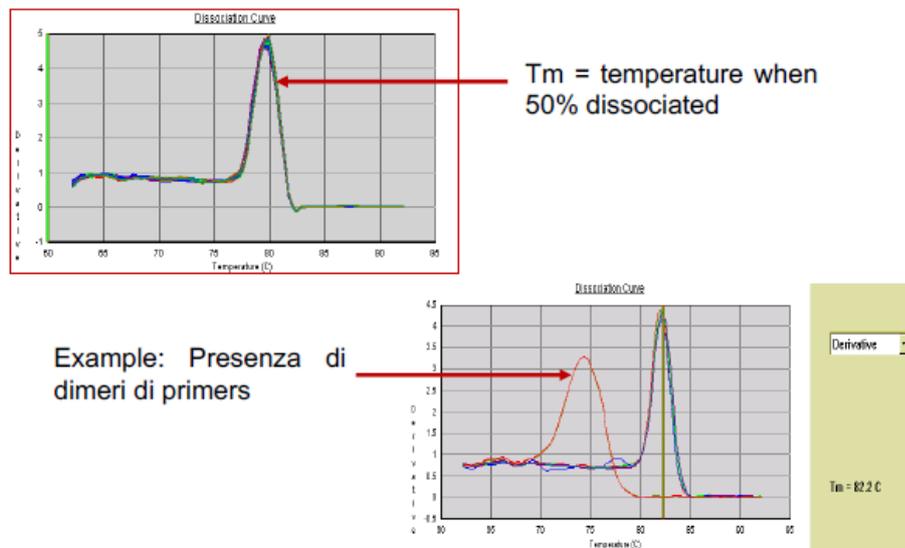


Figura 3 Curve di melting (in alto con un solo amplificato, in basso in presenza di dimeri di primer)

Reagenti e cicli della reazione

La Quantitative Real Time PCR è una reazione enzimatica, di carattere ciclico, che prevede l'utilizzo di una Taq DNA polimerasi termostabile (derivata da *T. aquaticus*), una coppia di primer specifici e i quattro deossiribonucleotidi, oltre al DNA target da amplificare e al buffer di reazione, che contiene anche la molecola fluorescente. Esistono vari tipi di DNA polimerasi impiegabili nella reazione, che si differenziano per la processività e la fedeltà della polimerizzazione.

La scelta dei primer richiede particolare attenzione in quanto influisce ampiamente sull'efficacia della reazione. Per avere una temperatura di melting T_m simile, i primer Forward e Reverse dovrebbero avere una lunghezza paragonabile, un contenuto di G+C pressoché uguale (range 40-60%), e non dovrebbero presentare ripetizioni o sequenze che potrebbero formare strutture secondarie. I 2 primer non dovrebbero inoltre avere regioni complementari tra loro, che causerebbero la formazione di dimeri.

L'esecuzione della qPCR avviene in uno strumento dedicato formato da un termociclatore, deputato all'amplificazione del DNA e da un sistema di rilevamento della fluorescenza.

L'amplificazione del DNA prevede un procedimento in 2 step:

1. denaturazione, in cui la miscela di reazione viene riscaldata in genere attorno ai 95°C, per permettere la rottura dei legami idrogeno che uniscono i due filamenti e l'apertura della doppia elica;
2. annealing dei primer al DNA bersaglio ed estensione, abbassando la temperatura a circa 65°C; in questa fase i primer si appaiano nelle regioni fiancheggianti la sequenza da amplificare e avviene la sintesi del nuovo filamento di DNA complementare da parte della Taq polimerasi, partendo dall'innesco 3'-OH fornito dai primer. La temperatura da impostare in questo step, che deve essere stringente per aumentare l'efficienza ed evitare la formazione di amplificati aspecifici, viene calcolata considerando la temperatura di melting T_m dei primer e la lunghezza dell'amplicone.
Equazione T melting: $T_m = 4^{\circ}\text{C}(\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C}(\text{A} + \text{T})$

Una reazione di PCR viene condotta generalmente per circa 30-40 cicli, dove in ogni ciclo i prodotti sintetizzati agiscono come stampo nei cicli successivi; l'amplificato poi si accumula in maniera esponenziale. Al termine della reazione lo strumento restituisce un grafico con la curva di amplificazione e il relativo C_t per ogni campione analizzato.

Sono disponibili più modelli matematici per l'analisi relativa dei dati. I valori dei C_t ottenuti in questo studio verranno analizzati secondo il metodo di quantificazione relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$

In questo studio, per quantificare come varia il livello di mtDNA in conseguenza dello stress ossidativo causato con il perossido di idrogeno H_2O_2 , è stato impiegato il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Questo metodo consente di analizzare l'espressione di un gene target in relazione ad un gene di riferimento, o *housekeeping*, costitutivo, che deve restare costante durante il trattamento considerato. Come presupposto le efficienze di amplificazione dei due geni devono essere paragonabili.

Per applicare questo calcolo, l'amplificazione mediante la Quantitative Real Time PCR è stata eseguita utilizzando due coppie di primer, una per DNA nucleare e una che amplifica il DNA mitocondriale, per confrontare i dati quantitativi ottenuti e rilevare il Copy Number Variation (CNV) del mtDNA.

I primer utilizzati sono:

1. mtDNA 12S che amplifica il DNA mitocondriale (gene target);
2. Actin che amplifica il DNA nucleare (gene di riferimento).

Questo metodo consente di normalizzare il dato ottenuto relativo al DNA mitocondriale rispetto al gene nucleare amplificato, permettendo un'analisi sulla variazione della quantità di DNA mitocondriale in queste condizioni.

Dopo aver ottenuto i grafici per ciascuna coppia di primer, con le curve di amplificazione, si considerano i valori Ct per eseguire i seguenti calcoli per ogni campione analizzato in triplicato.

$$\Delta Ct = Ct_{gene\ mitocondriale} - Ct_{gene\ nucleare} \qquad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{controllo}$$

Dove

$Ct_{gene\ mitocondriale}$ = media dei Ct del gene mitocondriale amplificato dai primer mtDNA 12S

$Ct_{gene\ nucleare}$ = media dei Ct del gene nucleare amplificato dai primer Actin

$\Delta Ct_{controllo}$ corrisponde al valore ΔCt calcolato nel campione in cui non è stato effettuato il trattamento

Successivamente si calcola il valore $2^{-\Delta\Delta Ct}$, per effettuare un'analisi relativa di ciascun campione rispetto a quello scelto come controllo.

Lo scopo di questa valutazione quantitativa è vedere se la quantità del gene mitocondriale, e quindi di tutto il DNA mitocondriale, cambia rispetto a quella del gene nucleare, in relazione ai trattamenti di diversa durata con il perossido di idrogeno e rispetto alle cellule non trattate.

Materiali e metodi

Mantenimento delle colture cellulari

Per questo esperimento è stata utilizzata la linea cellulare immortalizzata HEK293 (*Human Embryonic Kidney*). Le cellule sono state coltivate in condizione standard in incubatore a 37°C e 5% CO_2 . Le cellule sono state maneggiate in condizione di sterilità sotto cappa a flusso laminare.

Per la crescita delle cellule HEK293 è stato preparato un apposito terreno di coltura, i cui componenti e le rispettive concentrazioni da ottenere sono:

Elemento	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high glucose with L-glutamine no Pyruvate (4195-047)		
L-glutammina	200 mM	2 mM
Piruvato	100 mM	1 mM
Uridina	50 mg/ml	50 µg/ml
FBS siero fetale bovino		10%
Antibiotici penicillina e streptomicina P/S		1%

Il terreno è stato filtrato sotto cappa cellule con filtro 0,22 µm e conservato in condizioni di sterilità.

Le cellule sono state mantenute in coltura in piastre per colture cellulari del diametro di 10 cm e diluite 1/10 in una nuova piastra a raggiungimento della confluenza (ogni 3-4 giorni circa). Brevemente, dalla piastra confluenta viene rimosso il terreno ed eseguito un lavaggio con PBS 1X (soluzione salina tamponata con fosfato). Le cellule sono successivamente distaccate dal fondo mediante una soluzione contenente tripsina (Tripsina EDTA 0,05%), un enzima che digerisce le proteine, e incubate a 37°C per 2 minuti.

Una volta staccate, le cellule sono risospese nel terreno di coltura che contiene FBS ed è in grado di inibire la tripsina. Successivamente le cellule sono centrifugate per ottenere il pellet cellulare e il terreno viene rimosso. Il pellet è poi risospeso in 10 mL di terreno nuovo. 1 mL di questa sospensione viene poi seminato su una nuova piastra con 8 mL di terreno nuovo.

Trattamento cellule con perossido di idrogeno

Il giorno prima del trattamento, 300.000 cellule/pozzetto sono state seminate in due piastre contenenti 6 pozzetti dal diametro di 3,5 cm. Brevemente, una piastra di HEK293 a confluenza è stata raccolta come descritto in precedenza. Il numero di cellule per ml è stato determinato attraverso il conteggio delle cellule utilizzando la camera di Burker (fig. 4), 10 μL di sospensione cellulare sono mescolati con 10 μL di Trypan blu, un colorante che penetra solo nelle cellule morte, permettendo di escluderle dal conteggio. I 20 μL ottenuti sono poi seminati nella cameretta di Burker. Si passa poi al conteggio delle cellule al microscopio con ingrandimento 10X. Vengono contate le cellule di tre quadrati grandi lungo una diagonale (fig. 4) e si calcola la media.

Questo valore va moltiplicato per 10^4 (fattore di diluizione della cameretta) e per il fattore di diluizione della sospensione di cellule in Trypan blu (2) in modo da ottenere il numero di cellule per ml.

Viene poi calcolato il numero di cellule necessario per 8 pozzetti ($300.000 \cdot 8 = 2.400.000$) e portato ad un volume di 16 mL. 2 mL di questa sospensione sono poi seminati in ciascun pozzetto e lasciate crescere *overnight* in incubatore.

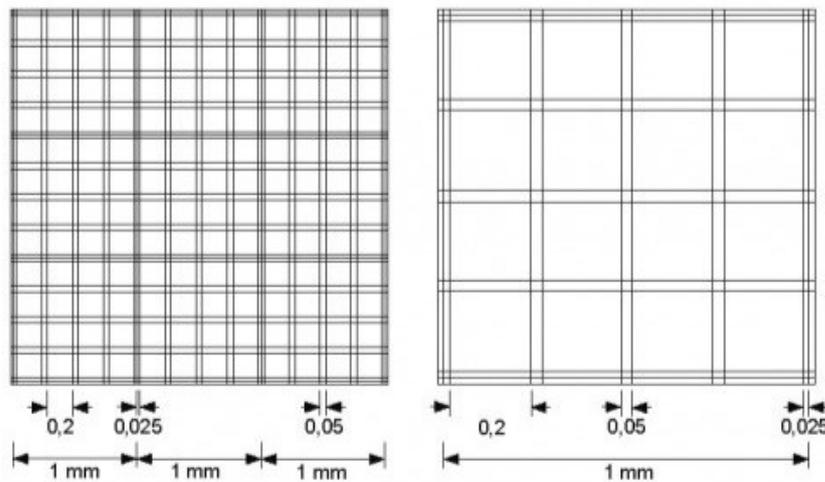


Figura 4 Schema della camera di Burker

Il giorno seguente, le cellule HEK293 sono state trattate con una soluzione 0,5 mM di H_2O_2 per 10 minuti, 30 minuti e 3 ore per osservare l'effetto sulla quantità di mtDNA, ovvero la variazione del Copy Number a livello mitocondriale causata dallo stress ossidativo dal perossido di idrogeno.

È stata preparata una soluzione di H_2O_2 alla concentrazione 1M, mettendo 10,23 μL della soluzione madre di perossido di idrogeno al 30% (9,77 M) in 89,77 μL di H_2O deionizzata.

1 μL / pozzetto di H_2O_2 1M (2000X) è stato aggiunto secondo lo schema riportato sotto in modo da ottenere una concentrazione finale nel terreno di coltura di 0,5 mM.

Le piastre sono state incubate a 37°C per la durata del trattamento.

L'aggiunta di perossido di idrogeno è stata effettuata nei diversi pozzetti in modo da finire allo stesso momento, considerando le 3 diverse tempistiche di 3 ore, 30 minuti e 10 minuti.

Schema del trattamento

Piastra 1			Piastra 2		
H2O2 10 min	H2O2 30 min	H2O2 3h	CTRL-1 Non trattato		
H2O2 10 min	H2O2 30 min	H2O2 3h	CTRL-2 Non trattato		

Come osservato nella figura 5, il trattamento ha modificato lo stato delle cellule: mentre nel controllo le cellule rimangono più adese alla piastra, nei pozzetti in cui è stato eseguito il trattamento con H_2O_2 le cellule sembrano più sospese nel medium, staccate dal fondo.

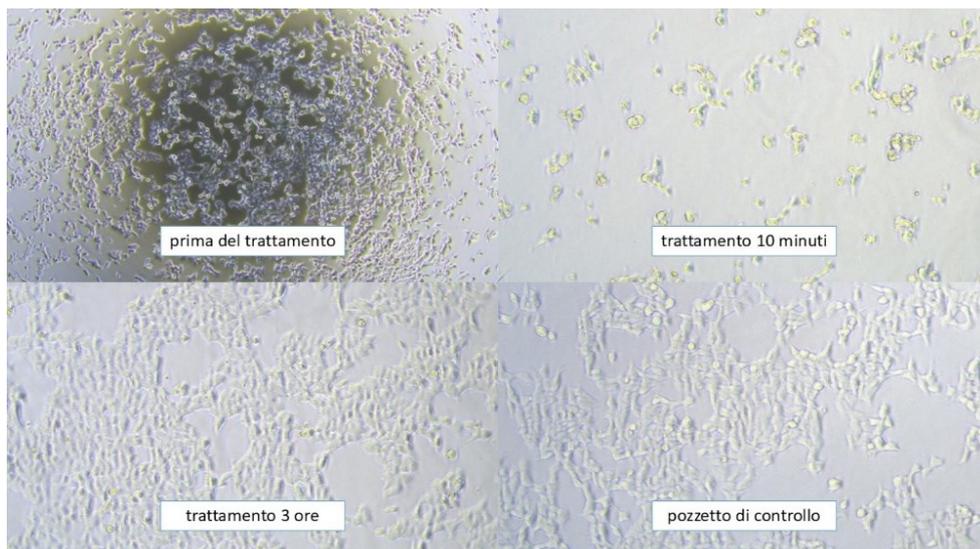


Figura 5 Cellule in coltura nei vari pozzetti

Per bloccare il trattamento con il perossido di idrogeno sono stati rimossi i 2 mL di terreno da ogni pozzetto. Le cellule sono poi staccate con tripsina e raccolte come descritto in precedenza.

Le cellule sono state successivamente centrifugate per 5 minuti per ottenere il pellet, risospese in 1 mL di PBS e trasferite in provette da 2 mL.

Sono stati eseguiti altri due lavaggi con il PBS 1X, seguiti da centrifugazione per 5 minuti a 4 °C a 2,2g

Infine è stato rimosso il PBS 1X, e le cellule sono state conservate a -20°C per la successiva estrazione del DNA.

Il trattamento appena descritto è stato effettuato in duplicato.

Estrazione DNA e quantificazione

Dalle cellule HEK293 trattate con H₂O₂ è stato estratto il DNA totale mediante il kit a colonnine DNeasy (QIAGEN), utilizzando il protocollo indicato dal produttore per l'estrazione di DNA totale da cellule di mammifero (*Purification of Total DNA from Cells Spin-Column Protocol*).

Brevemente, questo kit utilizza delle colonnine contenenti una membrana con particelle di silice; il DNA viene quindi estratto e purificato mediante cromatografia di affinità.

Il protocollo sperimentale si suddivide in 3 passaggi:

1. Binding: il DNA si lega alla matrice cromatografica di silice, grazie ai suoi gruppi fosfato carichi negativamente, e in presenza di sali di guanidinio;
2. Washing: vengono effettuati alcuni lavaggi per rimuovere le sostanze contaminanti, che hanno bassa affinità per la matrice;
3. Elution: il DNA viene staccato dalla colonna mediante il tampone di eluizione, che indebolisce il legame con le particelle di silice, rimuovendo i sali.

I campioni di cellule conservati a -20°C sono stati scongelati e centrifugati. Il pellet è stato poi risospeso in 200 µL di PBS 1X, a cui poi sono stati aggiunti 20 µL di Proteinasi K. Si aggiunge poi il Buffer AL (200 µL), che contiene sali di guanidinio (agenti caotropici) e cationi in elevata concentrazione, che permettono l'interazione del DNA con le particelle di silicio della matrice. Si mescola utilizzando il vortex per ottenere una soluzione omogenea e si incuba a 56°C per 10 minuti. Si aggiungono poi 200 µL di etanolo (100%) in ogni campione, e si mescola di nuovo con il vortex. La soluzione appena ottenuta viene pipettata in una colonnina DNeasy Mini spin column, posta dentro ad una provetta da 2 mL (*collection tube*), e centrifugata. Il DNA si lega e viene trattenuto dalla matrice della colonna mentre la maggior parte delle componenti cellulari passa attraverso la colonna ed è raccolta nella provetta da 2 mL e viene eliminata (flow-through).

Sono poi effettuati vari lavaggi con i Buffer AW1 e AW2, nelle quantità e modalità indicate dal protocollo, centrifugando ed eliminando il flow-through ad ogni passaggio. I lavaggi permettono di eliminare le molecole contaminanti come RNA e proteine, per ottenere un DNA purificato. Dopo l'ultimo lavaggio la colonnina viene posta in una provetta nuova pulita da 1,5 mL o 2 mL. Il DNA è eluito dalla colonna con 50 µL di Buffer di eluizione AE, che agisce rimuovendo i sali e destabilizzando l'interazione DNA-silice. Si incuba a temperatura ambiente per 1 minuto, e poi si centrifuga a $\geq 6000g$ per eluire il DNA. Questo passaggio è stato ripetuto due volte, eluendo il DNA nella stessa provetta, per aumentare la resa dell'estrazione.

Il DNA totale estratto è stato quantificato al Nanodrop, uno spettrofotometro che misura l'assorbanza della soluzione in luce ultravioletta UV (a 260 nm) e, in base alla legge di Lambert-Beer, calcola la concentrazione di DNA presente.

Dopo aver misurato l'assorbanza del buffer di eluizione (blank) per eliminare il segnale di background, si caricano poi 2 µL dell'estratto per determinare la concentrazione di DNA in ogni campione.

Il Nanodrop fornisce inoltre dei rapporti di assorbanza a diverse lunghezze d'onda, che permettono di controllare la purezza della preparazione di DNA e indicano l'eventuale presenza di contaminanti, in particolare:

- il rapporto 260/230, serve per identificare la presenza di contaminanti chimici nell'estratto, come ad esempio i carboidrati che assorbono alla lunghezza di 230 nm. Un buon rapporto si aggira intorno a 2.
- il rapporto 260/280, indica un'eventuale presenza di proteine, RNA e fenoli nella soluzione, conferma o meno la purezza del DNA estratto e dovrebbe essere compreso tra 1.7-1.8.

I campioni analizzati hanno restituito i seguenti valori:

CAMPIONE	Estrazione 1° trattamento			Estrazione 2° trattamento		
	[DNA]	260/280	260/230	[DNA]	260/280	260/230
	ng/µL			ng/µL		
HEK CTRL-1	142,5	1,99	2,52	25,0	1,71	2,74
HEK CTRL-2	259,0	2,06	2,33	16,4	1,72	2,78
HEK 10' 1	185,7	2,01	2,38	15,6	1,73	2,19
HEK 10' 2	74,0	2,03	1,81	16,1	1,74	1,34
HEK 30' 1	89,5	2,02	1,72	18,4	1,65	1,86
HEK 30' 2	200,7	2,05	2,18	24,2	1,62	1,13
HEK 3H 1	73,3	1,94	2,66	18,5	1,67	2,07
HEK 3H 2	107,6	2,01	2,16	20,2	1,54	1,38

Quantitative Real Time PCR

L'amplificazione del DNA è stata eseguita con l'utilizzo della miscela di reazione "SensiFAST SYBR No-ROX" secondo le indicazioni del produttore.

I primer e la concentrazione di DNA ottimale sono stati precedentemente messi appunto ed ottimizzati in laboratorio (dati non riportati in questo elaborato).

Il DNA da ciascun campione è stato diluito per ottenere una soluzione di DNA a concentrazione $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Per il campione HEK CTRL-1 sono state fatte 3 diluizioni seriali 1:10, in modo da ottenere una curva standard a concentrazioni di DNA note ($2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $0,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $0,02 \text{ ng}/\mu\text{L}$). La curva ottenuta permette di controllare che il segnale degli amplificati rimanga all'interno del range di amplificazione lineare del DNA.

Sono state preparate 2 mix totali, una per ciascuna coppia di primer (mtDNA 12S F+R, Actin F+R), considerando per ciascun pozzetto un mix di reazione di $20 \mu\text{L}$, con le seguenti concentrazioni:

Componenti della reazione	Concentrazione stock	Concentrazione finale	Volume
Mastermix SensiFAST SYBR No-ROX	2X	1X	$10 \mu\text{L}$
Primer F	$10 \mu\text{M}$	400 nM	$0,8 \mu\text{L}$
Primer R	$10 \mu\text{M}$	400 nM	$0,8 \mu\text{L}$
H ₂ O			$6,4 \mu\text{L}$
DNA			$2 \mu\text{L}$

Per ogni campione la qPCR è stata eseguita in triplicato e in parallelo con le 2 coppie di primer, e in base a questo è stata strutturata la griglia per il caricamento della piastra da 96. Per ogni coppia di primers sono stati aggiunti tre pozzetti privi di DNA, come controlli negativi della reazione.

Schema di caricamento della piastra

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>A</i>	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 2	HEK 3h 1	CTRL-	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 2	HEK 30' 2	CTRL-
<i>B</i>	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-2	HEK 10' 2	HEK 3h 1	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 2	HEK 3h 1	CTRL-
<i>C</i>	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-2	HEK 30' 1	HEK 3h 1	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-2	HEK 10' 2	HEK 3h 1	
<i>D</i>	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK CTRL-2	HEK 30' 1	HEK 3h 2	HEK CTRL-1 2 ng	HEK CTRL-2	HEK 30' 1	HEK 3h 1	
<i>E</i>	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 1	HEK 3h 2	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK CTRL-2	HEK 30' 1	HEK 3h 2	
<i>F</i>	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 2	HEK 3h 2	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 1	HEK 3h 2	
<i>G</i>	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 2	CTRL-	HEK CTRL-1 0,2 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 2	HEK 3h 2	
<i>H</i>	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 2	HEK 30' 2	CTRL-	HEK CTRL-1 0,02 ng	HEK 10' 1	HEK 30' 2	CTRL-	

Per la qPCR è stato usato lo strumento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher).

Sono stati impostati i seguenti parametri per il programma di amplificazione:

Cicli	Temperatura	Tempo	Descrizione
1	95°C	3 minuti	Attivazione polimerasi
40	95°C	5 secondi	Denaturazione
	64,9°C	30 secondi	Annealing/Estensione

Lo strumento rileva la fluorescenza emessa dall'intercalante SYBR Green in ogni pozzetto, che riflette la quantità di amplificato prodotto in ogni ciclo, e restituisce il grafico con la curva di amplificazione e il relativo Ct. Quest'ultima si divide in tre fasi: lineare, esponenziale o logaritmica e plateau. (fig. 6)

Per ogni coppia di primer è stato valutato il grafico di amplificazione della qPCR relativo e la curva di *melting*, per confermare la specificità della reazione.

Per ogni campione si valuta la riproducibilità dei triplicati, che devono avere una deviazione standard bassa, ottenuta dalla media dei tre Ct.

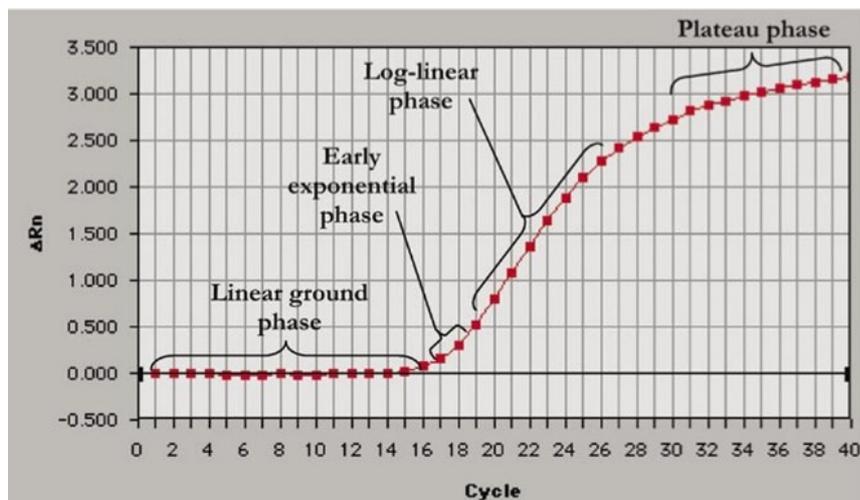


Figura 6 Curva di amplificazione [fonte <https://doi.org/10.2144/05391RV01>]

Risultati e Discussione

È stata effettuata una valutazione quantitativa mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizzando i dati del mtDNA ottenuti rispetto alla quantità di DNA nucleare.

Lo scopo è valutare se il livello di DNA mitocondriale subisce delle variazioni in relazione allo stress ossidativo causato dal trattamento con H_2O_2 , rispetto alla quota presente nelle cellule non trattate.

Per il calcolo sono stati considerati i valori dei *Ct* dei vari campioni, suddivisi nelle amplificazioni con le due coppie di primer mtDNA 12S e Actin.

Inizialmente è stato calcolato il valore medio dei *Ct* dei triplicati. Poi, per ciascun campione, sono stati eseguiti i calcoli sotto.

$$\Delta Ct = Ct_{gene\ mitocondriale} - Ct_{gene\ nucleare}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{controllo}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Dove

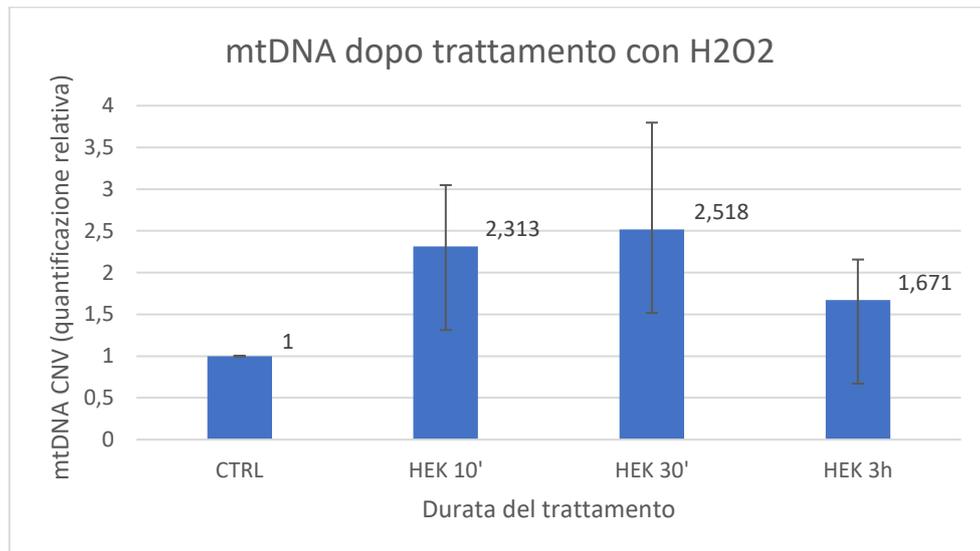
$Ct_{gene\ mitocondriale}$ = media dei *Ct* nell'amplificazione con mtDNA 12S (gene target)

$Ct_{gene\ nucleare}$ = media dei *Ct* nell'amplificazione con Actin (gene di riferimento)

$\Delta Ct_{controllo}$ corrisponde al valore ΔCt calcolato nel campione HEK CTRL- 1, in cui non è stato effettuato il trattamento

CAMPIONE	Risultati 1° trattamento			Risultati 2° trattamento		
	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
HEK CTRL- 1	-8,411	0	1,000	-10,186	0	1,000
HEK CTRL- 2	-8,130	0,280	0,823	-8,575	1,611	0,327
HEK 10' 1	-9,080	-0,670	1,591	-10,672	-0,486	1,400
HEK 10' 2	-10,306	-1,895	3,720	-10,009	0,177	0,885
HEK 30' 1	-10,434	-2,024	4,066	-10,151	0,035	0,976
HEK 30' 2	-9,424	-1,014	2,019	-10,428	-0,243	1,183
HEK 3H 1	-8,715	-0,304	1,235	-9,638	0,548	0,684
HEK 3H 2	-9,699	-1,289	2,443	-10,150	0,036	0,976

Successivamente è stata eseguita la media tra i campioni 1 e 2 di ogni trattamento, ed infine è stata calcolata la media tra i due esperimenti. Gli Absolute Error sono stati calcolati sottraendo il 2° esperimento dal 1°, non essendo possibile svolgere la deviazione standard con meno di 3 esperimenti.



Un valore $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$ indica che la quantità del genoma mitocondriale è significativamente aumentata nelle cellule in cui è stato effettuato il trattamento con H_2O_2 rispetto ai controlli (in cui $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$).

Nei nostri due esperimenti abbiamo riscontrato che il trattamento con il perossido di idrogeno induce un aumento del DNA mitocondriale nelle cellule trattate per 10 e 30 minuti, mentre i risultati suggeriscono una leggera successiva diminuzione nei campioni trattati per 3 ore. I dati ottenuti sono simili ad altri risultati già pubblicati in letteratura, in cui è stato rilevato che inducendo uno stress ossidativo limitato veniva stimolata la replicazione del DNA mitocondriale, favorendo un possibile adattamento allo stress, e si poteva quindi osservare un aumento transitorio del numero di copie del mtDNA. [2,3,4]

Il rallentamento nell'aumento del numero di copie è stato osservato anche in un altro studio, dopo un'ora di incubazione con H_2O_2 . [3] Per spiegare questa diminuzione è stato ipotizzato che il perossido di idrogeno possa subire una decomposizione durante il trattamento. È stato poi infatti dimostrato che l'aggiunta di ulteriore H_2O_2 portava ad un nuovo aumento del mtDNA, suggerendo che la lieve diminuzione riscontrata, nel nostro caso dopo 3 ore, sia dovuta al calo della concentrazione del perossido.

L'aumento del mtDNA che si verifica in seguito allo stress ossidativo indotto è correlabile alle modificazioni che la molecola subisce dalle specie reattive dell'ossigeno. In particolare, in diversi studi è stato evidenziato un aumento di guanina ossidata (8-Oxoguanina) nel mtDNA, dopo aver causato lo stress ossidativo, soprattutto nella regione D-Loop di controllo. Questa lesione mirata sembra favorire delle rotture a doppio filamento (*double strand breaks, DSB*) nella molecola, che provocano l'inesco della replicazione e il successivo aumento del numero di copie del mtDNA, ma i meccanismi specifici coinvolti in questo processo non sono ancora chiari. L'unico aspetto che è stato comprovato da più studi è il coinvolgimento della Polimerasi Gamma, deputata alla fisiologica replicazione della molecola. [2,3]

Conclusioni

La qPCR è una tecnica che permette di monitorare la sintesi dei prodotti di amplificazione durante il proseguimento della reazione e consente di effettuare una quantificazione assoluta o relativa del DNA target presente nel campione biologico di partenza. Ciò è reso possibile dalla proporzionalità tra l'intensità del segnale fluorescente registrato, la quantità di ampliconi prodotti ad ogni ciclo e la quantità di stampo iniziale. La sensibilità analitica, la rapidità e la possibilità di valutare con vari parametri la specificità della Quantitative Real Time PCR giustificano il suo ampio utilizzo in molteplici campi di studio, come la diagnosi, gli studi di espressione genica o per stimare il numero di copie presenti in un campione.

Nel nostro caso, l'utilizzo della qPCR ha permesso di analizzare efficacemente la variazione del Copy Number mitocondriale in seguito alla generazione di stress ossidativo mediante trattamento con il perossido di idrogeno H_2O_2 . I nostri risultati confermano quanto già visto in precedenza da altri gruppi, ovvero che l'induzione di stress ossidativo causa un aumento transitorio del numero di copie di genoma mitocondriale nelle cellule. In futuro ci proponiamo di studiare i meccanismi molecolari che portano all'aumento del Copy Number mitocondriale e il significato biologico di questo fenomeno.

Bibliografia

1. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, Mutations, and Elimination. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4):379. doi: 10.3390/cells8040379. PMID: 31027297; PMCID: PMC6523345.
2. Zhou X, Wang Y, Si J, Zhou R, Gan L, Di C, Xie Y, Zhang H. Laser controlled singlet oxygen generation in mitochondria to promote mitochondrial DNA replication in vitro. *Sci Rep*. 2015 Nov 18;5:16925. doi: 10.1038/srep16925. PMID: 26577055; PMCID: PMC4649627.
3. Hori A, Yoshida M, Shibata T, Ling F. Reactive oxygen species regulate DNA copy number in isolated yeast mitochondria by triggering recombination-mediated replication. *Nucleic Acids Res*. 2009 Feb;37(3):749-61. doi: 10.1093/nar/gkn993. Epub 2008 Dec 11. PMID: 19074198; PMCID: PMC2647299.
4. Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, Pang CY. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Apr;928:97-112. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05640.x. PMID: 11795533.
5. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):222-30. doi: 10.1016/s0891-5849(00)00317-8. PMID: 11035250.
6. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021 Sep;49(5):800-812. doi: 10.1002/bmb.21552. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34132460.
7. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85. doi: 10.2144/05391RV01. PMID: 16060372.
8. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981 Apr 9;290(5806):457-65. doi: 10.1038/290457a0. PMID: 7219534.
9. Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA. Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev*. 2005 Oct 15;19(20):2466-76. doi: 10.1101/gad.1352105. PMID: 16230534; PMCID: PMC1257401.