

RADIOBIOLOGIA (AA 2010-2011)

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
Facoltà di Medicina e Chirurgia
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN FISICA MEDICA**

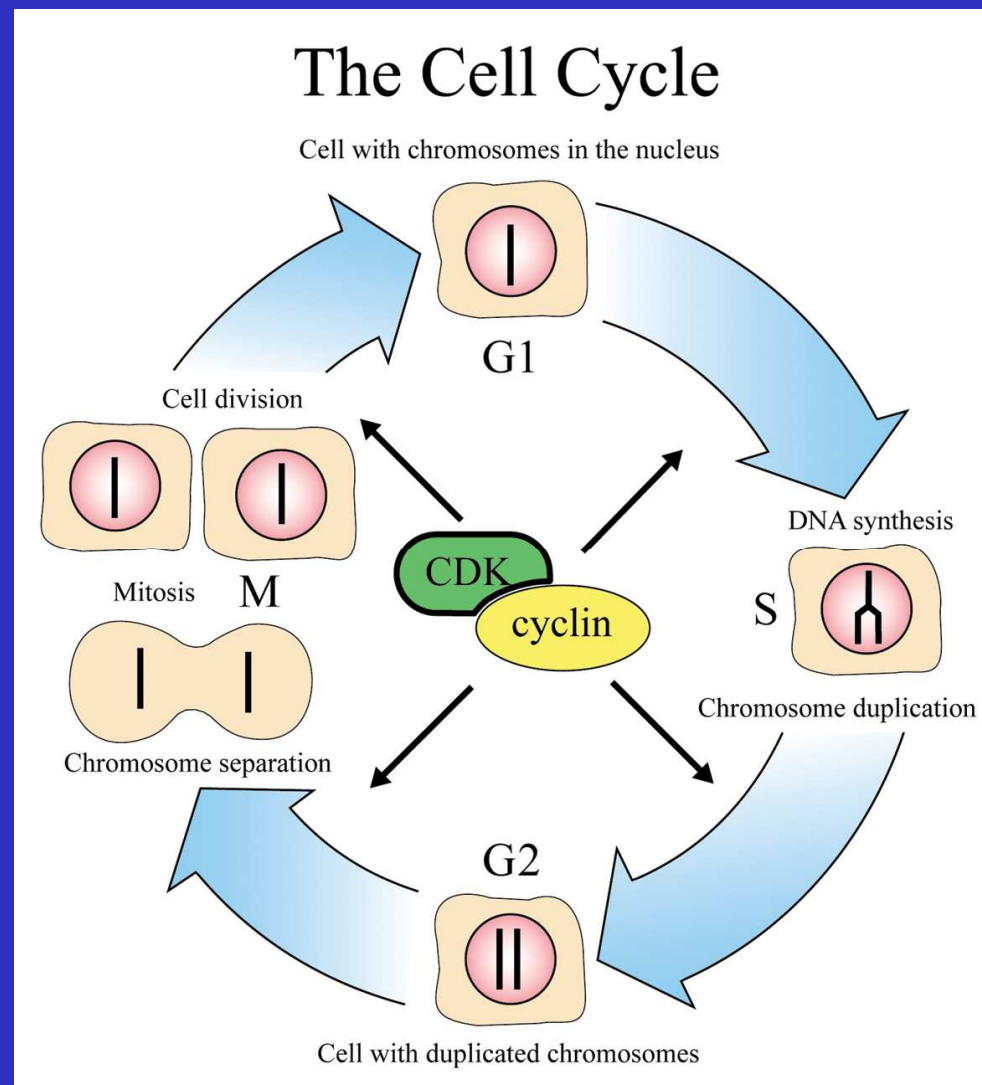
Prof. Mauro Belli

mauro.belli@iss.it mauro.belli@iss.infn.it

mau.belli1@gmail.com

**Parte 8.
Aberrazioni cromosomiche**

Il ciclo cellulare



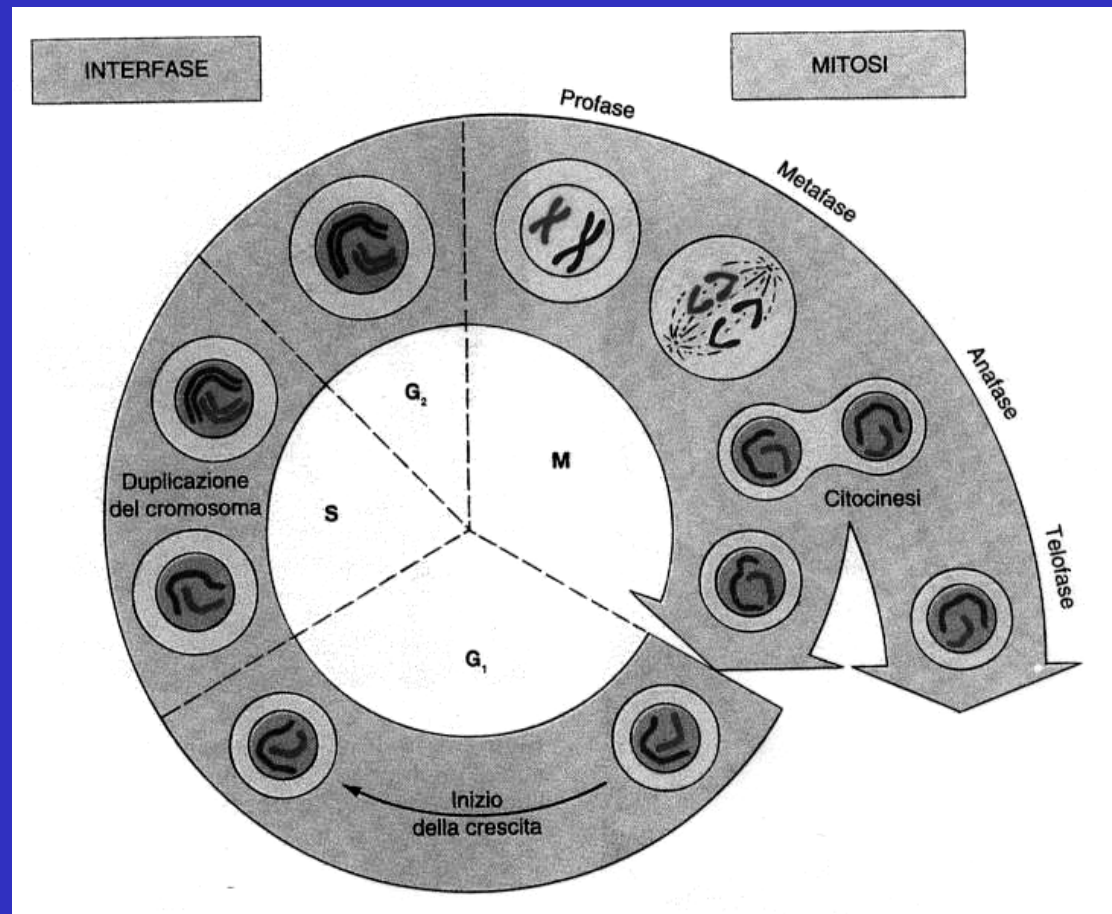
Il ciclo cellulare

La replicazione del DNA avviene in un ben definito momento o fase del ciclo di divisione cellulare (fase S)

Durante la replicazione (copia) le due catene di DNA si separano e si formano due nuove catene che sono complementari alle due catene originali, a formare due nuove molecole di DNA. Le due molecole si dividono poi nella mitosi (fase M) consentendo così la trasmissione dell' identica informazione genetica alle due cellule figlie.

La fase che precede la fase S si chiama G_1 e quella che la segue G_2 . Nella fase G_1 la cellula predispone l'apparato biochimico al fine di formare una copia del DNA.

Nella fase G_2 il DNA è sottoposto a un processo di condensazione che dà luogo alla formazione dei **cromosomi**.



L'interfase o fase G2

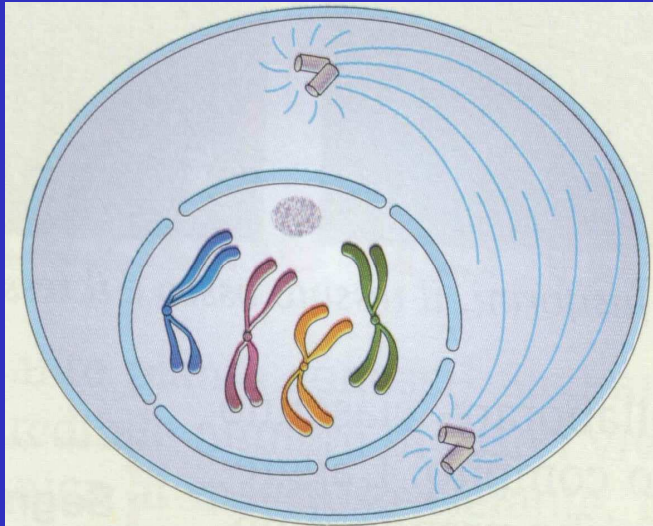
In interfase ciascun cromosoma si è duplicato e la cellula possiede una quantità doppia di DNA

La mitosi o fase M

La divisione cellulare o mitosi avviene in quattro fasi.

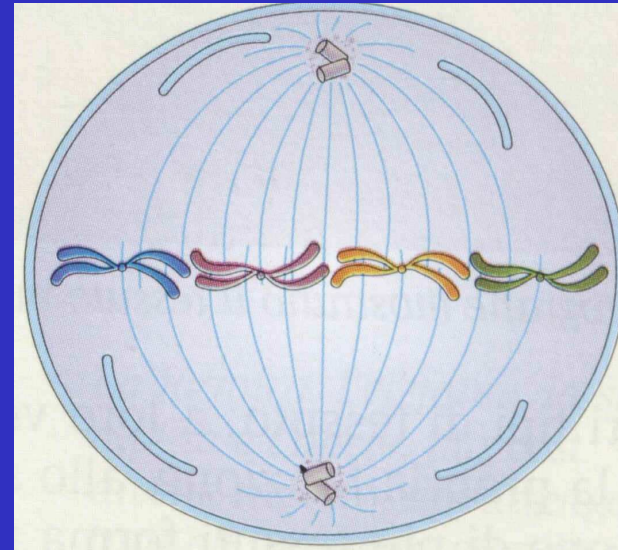
**PROFASE;
METAFASE;
ANAFASE;
TELOFASE;**

Profase e metafase



PROFASE

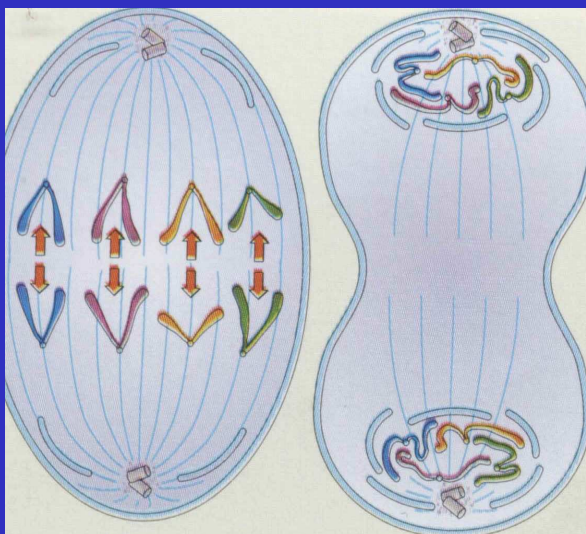
La membrana nucleare inizia a disfarsi e i cromosomi spiralizzano.



METAFASE

I cromosomi si dispongono al centro della cellula su un piano orizzontale .

Anafase e telofase



ANAFASE

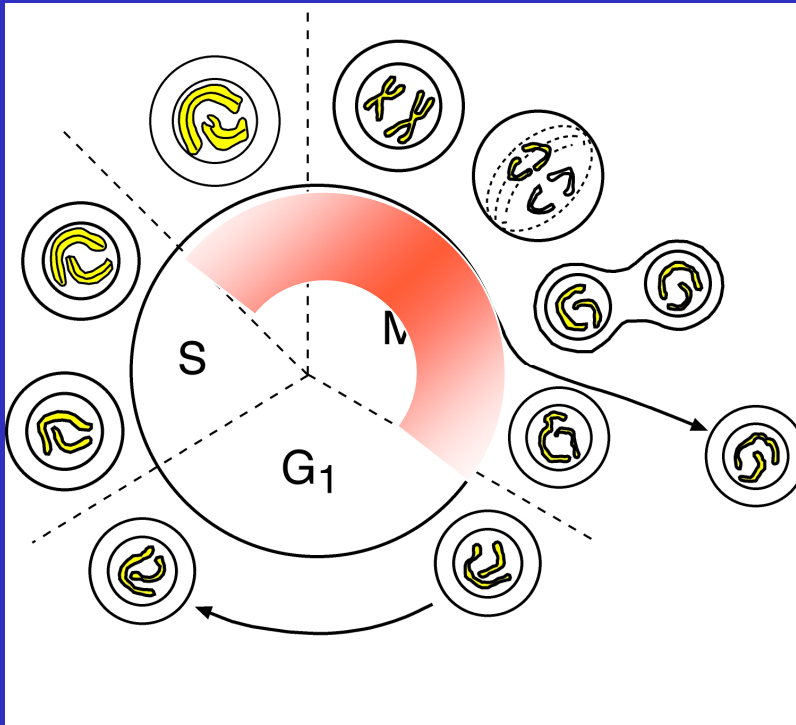
La cellula si allunga, i cromosomi si separano e si portano agli estremi della cellula dove incominciano a riformarsi i due nuclei; la cellula inizia a strozzarsi nella parte centrale.



TELOFASE

Intorno ad ogni nucleo si forma la membrana, il citoplasma si suddivide attorno ai due nuclei e la cellula si divide completamente in due cellule figlie attorno alle quali si completa la membrana cellulare

Radiosensibilità nelle fasi del ciclo cellulare



In generale, la maggior parte delle cellule sono più sensibili in tarda G₂ e M (quindi intorno alla mitosi), e più resistenti in tarda S.

Ciò vale per le radiazioni sparsamente ionizzanti, mentre per le radiazioni densamente ionizzanti le variazioni di sensibilità sono meno pronunciate.

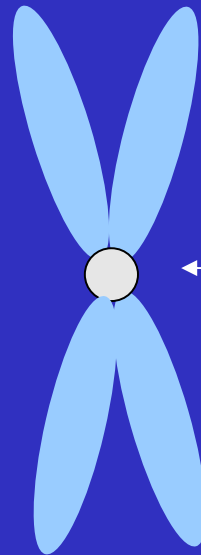
La manifestazione di resistenza o di sensibilità tende a correlare con la concentrazione di composti sulfidrilici (radioprotettori) presenti nella cellula nelle diverse fasi del ciclo.

Cromosomi e cromatidi

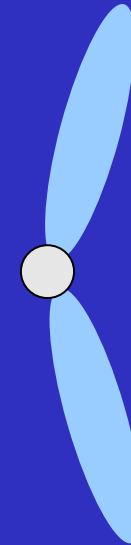
Cromosoma
in fase G1
prima della duplicazione
(fase S)



Cromosoma
in fase G2 o
in metafase

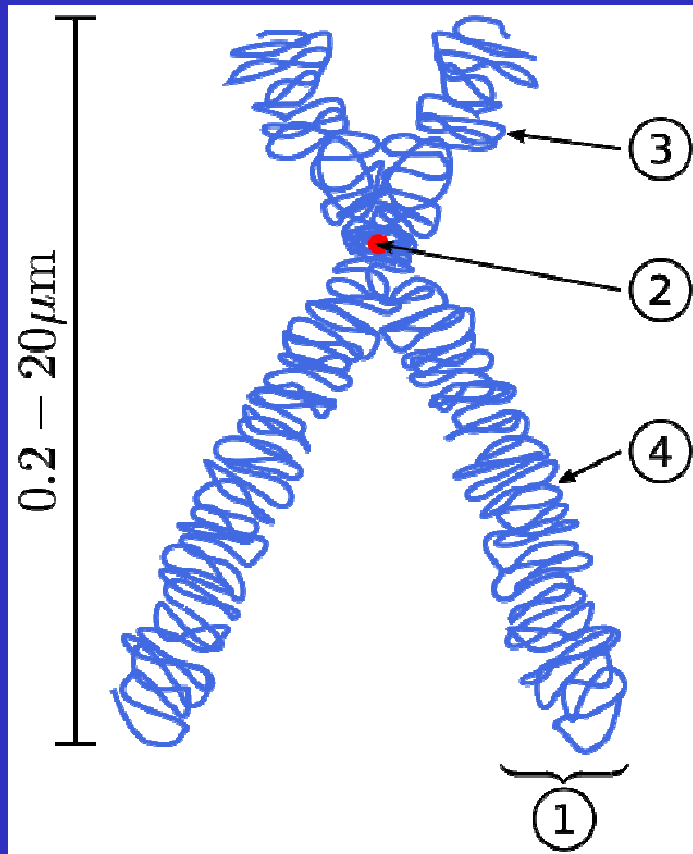


Cromosoma
in anafase



← centromero →

Il cromosoma eucariotico



Rappresentazione schematica di un cromosoma eucariotico replicato e condensato in metafase.

- (1) Cromatide (una delle due parti identiche del cromosoma dopo la fase S);
- (2) Centromero (la zona di unione dei due cromatidi e dove si attaccano i microtubuli)
- (3) Braccio corto
- (4) Braccio lungo

Il genoma umano: cromosomi e geni

Chromosome	Genes	Total bases		Chromosome	Genes	Total bases
1	4,220	247,199,719		13	924	114,127,980
2	1,491	242,751,149		14	1,347	106,360,585
3	1,550	199,446,827		15	921	100,338,915
4	446	191,263,063		16	909	88,822,254
5	609	180,837,866		17	1,672	78,654,742
6	2,281	170,896,993		18	519	76,117,153
7	2,135	158,821,424		19	1,555	63,806,651
8	1,106	146,274,826		20	1,008	62,435,965
9	1,920	140,442,298		21	578	46,944,323
10	1,793	135,374,737		22	1,092	49,528,953
11	379	134,452,384		X (sex chromosome)	1,846	154,913,754
12	1,430	132,289,534		Y (sex chromosome)	454	57,741,652
Note: Male genome				Total	32,185	3,079,843,747

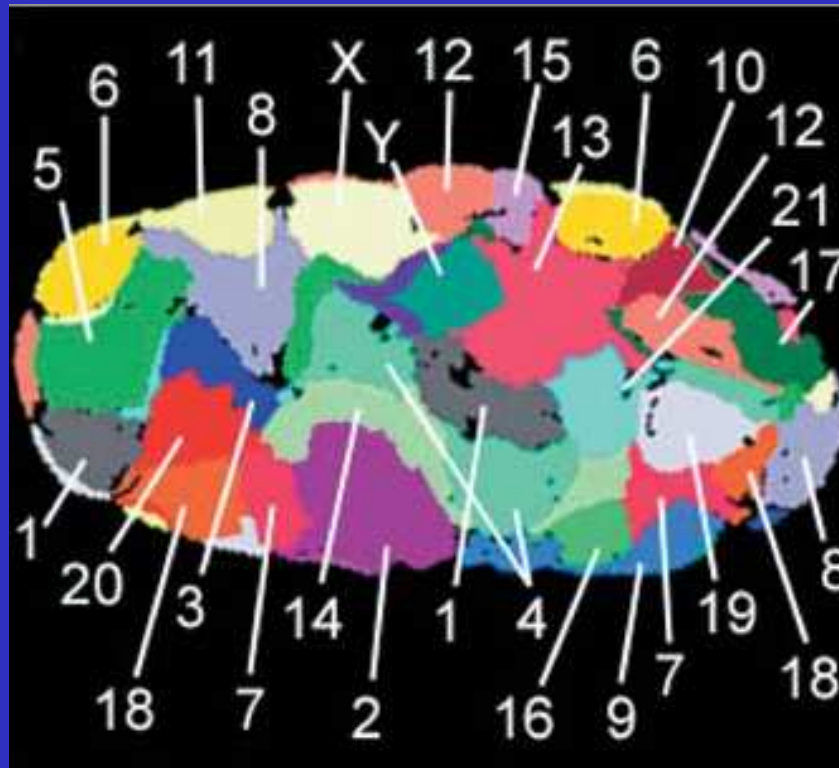
number of base pairs = mass in pg $\times 0.978 \times 10^9$

DNA mass in a human diploid cell (male): $2 \times 3080 \text{ Mbp} = 6160 \text{ Mbp} \gg 6.30 \text{ pg}$

The DNA from a single (diploid) human cell if the 46 chromosomes were connected end-to-end and traightened, would have a length of ~2 m and a width of ~2.4 nanometers.

I cromosomi occupano specifici territori del nucleo nella prometafase

I territori dei 23 cromosomi durante la prometafase in fibroblasti umani



Bolzer et al, PLOS 2005

Le radiazioni ionizzanti inducono aberrazioni nei cromosomi delle cellule come conseguenza delle DSB

L'induzione di DSB da parte della radiazione in cellule in **fase G1**, seguita da ricongiungimento non corretto, produce aberrazioni **cromosomiche**. Lesioni non riparate prima della replicazione producono danni ad entrambi i cromatidi.

L'induzione di DSB da parte della radiazione in cellule in **fase S o G2**, seguita da ricongiungimento non corretto, produce aberrazioni **cromatidiche**. Lesioni prodotte dopo la fase S interessano il solo cromatide danneggiato.

Nei linfociti del sangue circolante, irradiati in fase G0, sono prodotte aberrazioni cromosomiche

Conseguenze delle aberrazioni cromosomiche/cromatidiche

Le aberrazioni cromosomiche/cromatidiche sono eventi relativamente precoci associati ad effetti “tardivi” come **morte cellulare, induzione di mutazioni, trasformazione oncogenica.**

Principali aberrazioni cromosomiche e cromatidiche

Dicentrici (ab. cromosomiche)

Anelli (ab. cromosomiche)

Traslocazioni

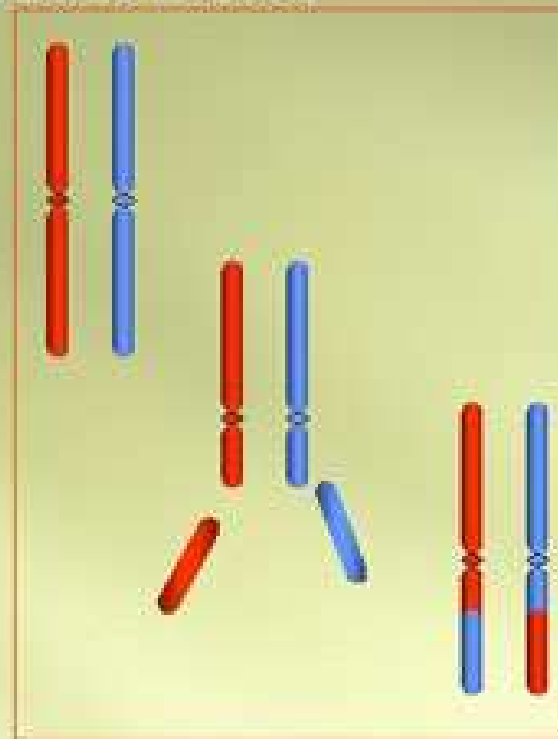
Delezioni

Aberrazioni cromosomiche (traslocazioni)

Cromosomi in G1

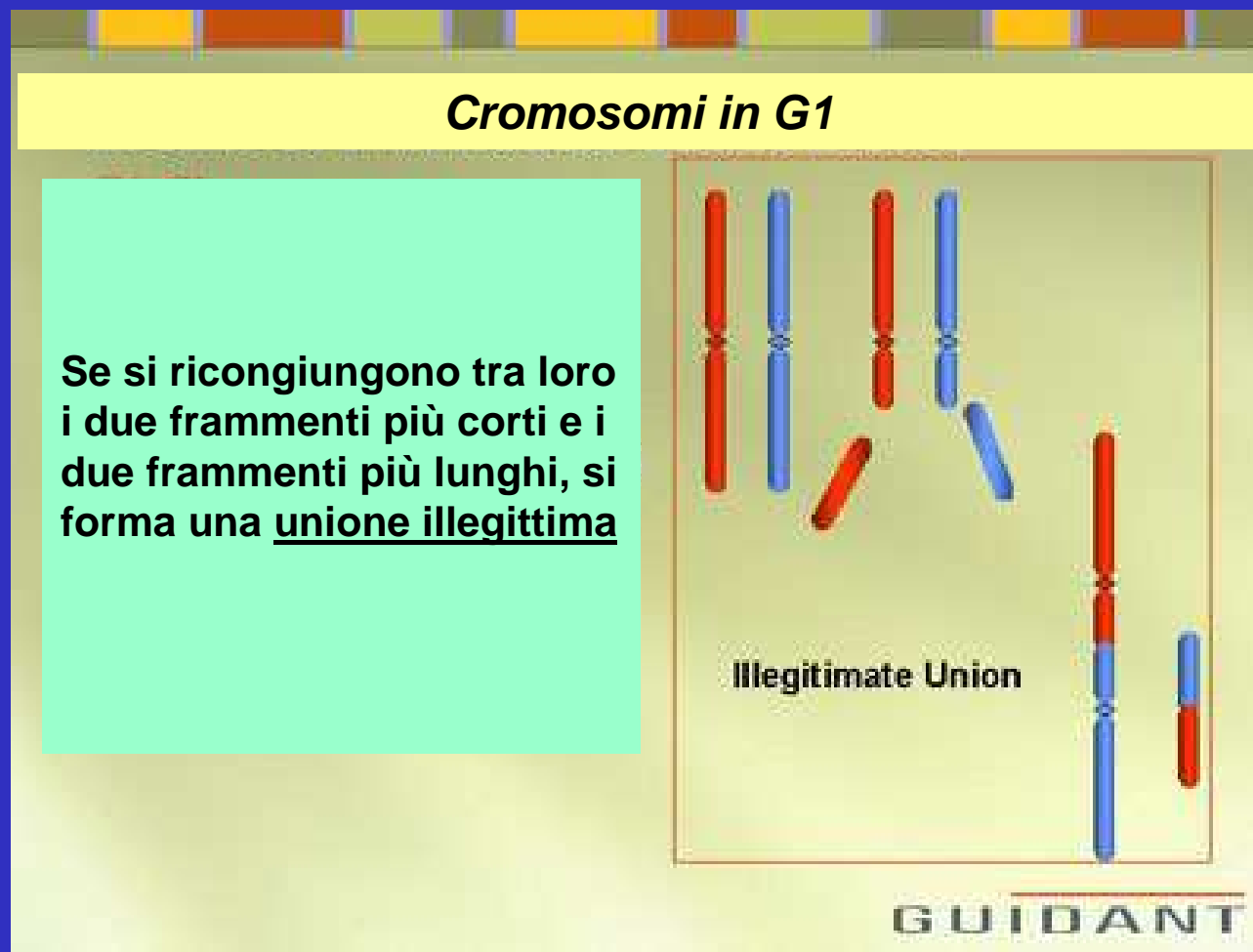
Se due cromosomi sono rotti prima della replicazione, i frammenti possono scambiarsi e ricongiungersi

Si forma così una traslocazione che dà luogo a cellule alterate dopo la replicazione

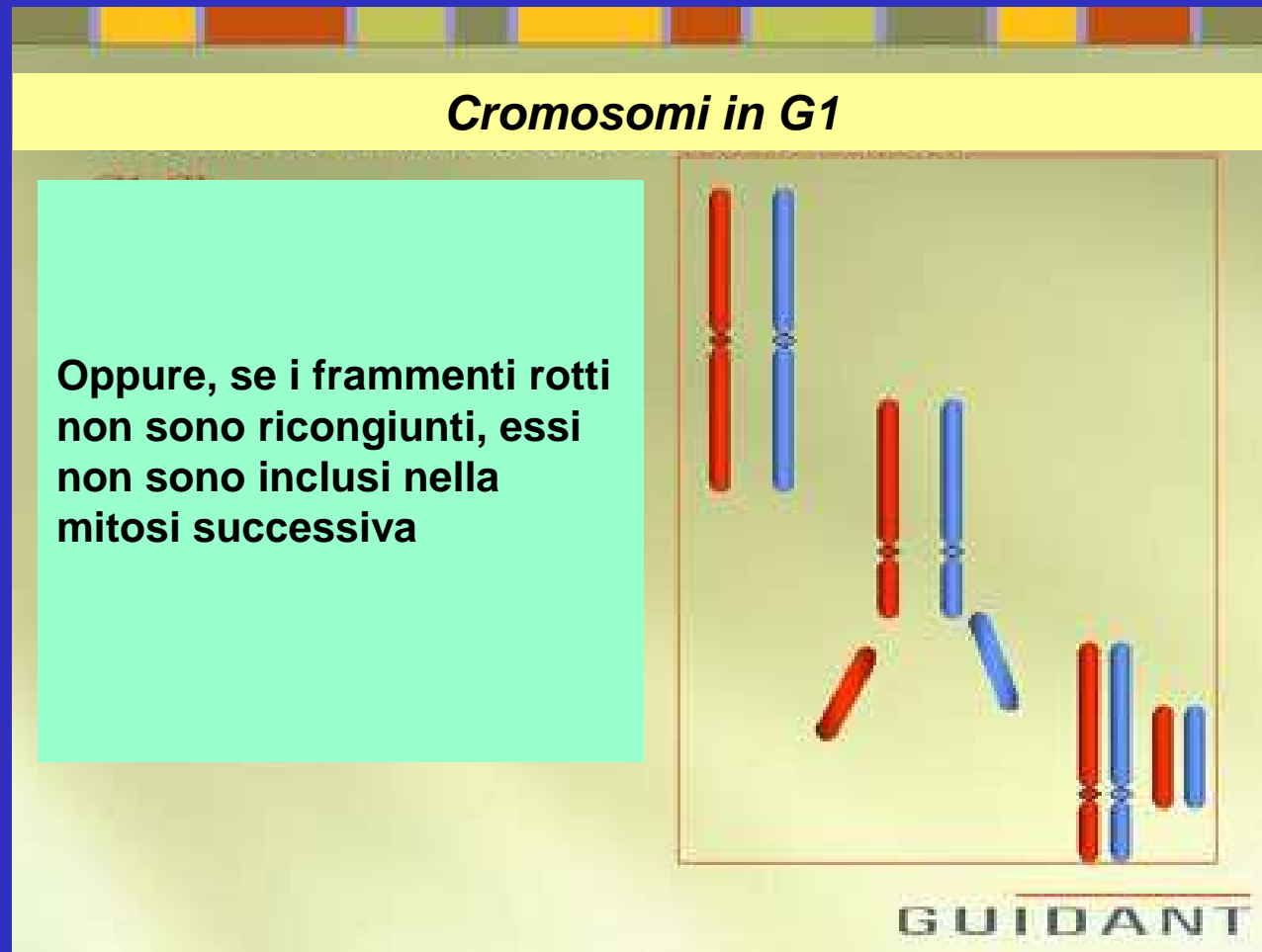


GUIDANT

Aberrazioni cromosomiche (unioni illegittime)



Aberrazioni cromosomiche (unioni illegittime)

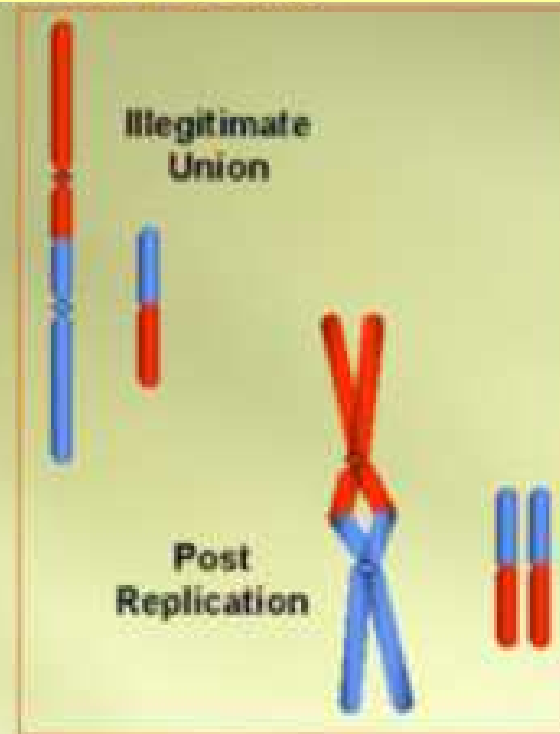


Aberrazioni cromosomiche (dicentrici)

Cromosomi in G1

L' unione illegittima, dopo la replicazione, dà luogo ad un cromosoma dicentrico (dotato di due centromeri) e ad un frammento acentrico (privo di centromero).

Le aberrazioni con cromosomi dicentrici sono letali per la cellula.



GUIDANT

Aberrazioni cromosomiche (anelli)

Cromosomi in G1

Due rotture, una su ciascun braccio di un cromosoma, può portare alla formazione di un anello

Le aberrazioni cromosomiche ad anello sono letali per la cellula

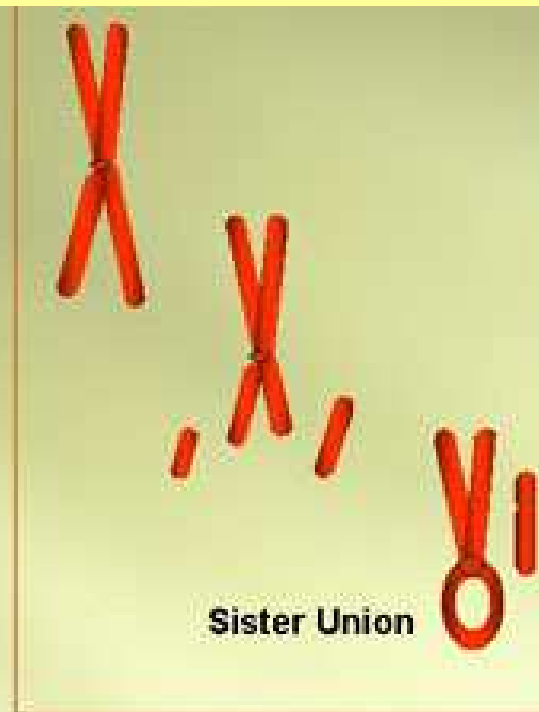


GUIDANT

Aberrazioni cromosomiche (cromatidiche)

Cromosomi in G2

Se avvengono due rotture, ciascuna su un cromatide fratello dello stesso cromosoma dopo la replicazione, le due estremità di esso possono ricongiungersi e formare una unione tra cromatidi fratelli



GUIDANT

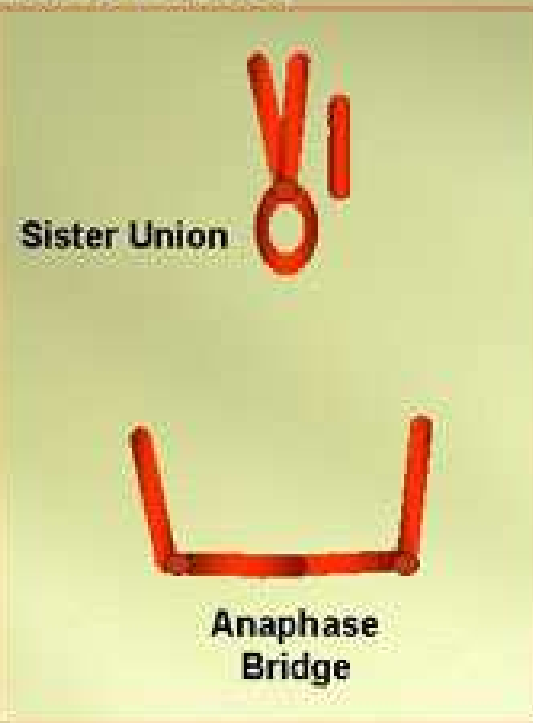
Aberrazioni cromosomiche (cromatidiche)

Cromosomi in G2

L'unione tra cromatidi fratelli può causare un ponte anafasico in metafase

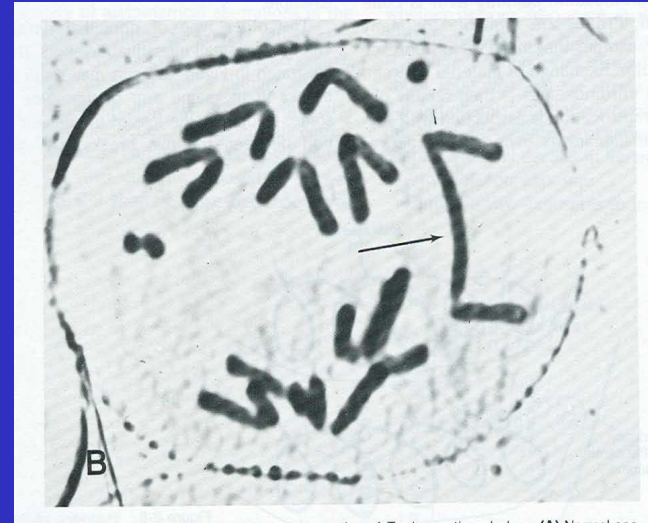
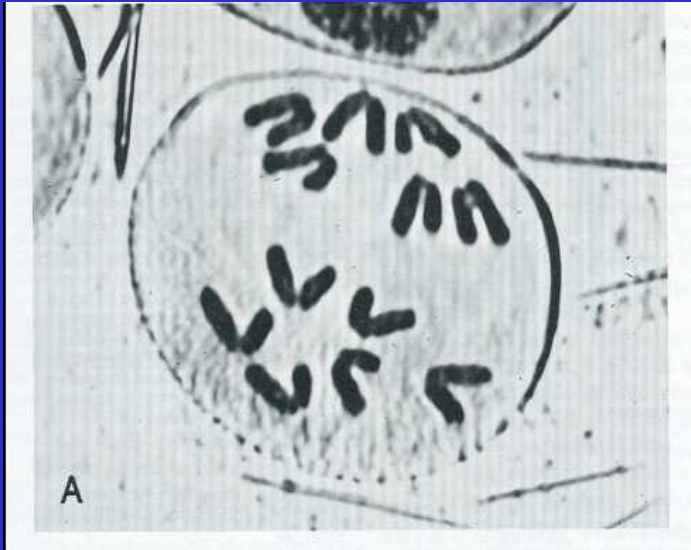
Il cromatide si allunga tra i due poli

Le due cellule figlie non riescono a dividersi e si ha la morte riproduttiva della cellula



GUIDANT

Il ponte anafasico impedisce la mitosi



Cromosomi di *Tradescantia paludosa*

A: anafase normale

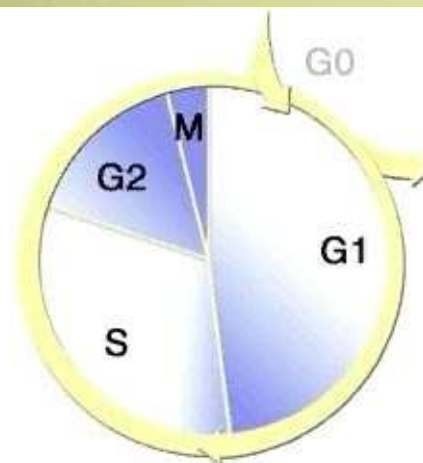
B: anafase dopo irradiazione con produzione di ponte anafasico

Aberrazioni cromosomiche e morte riproduttiva

Morte riproduttiva della cellula

**Le cellule sono
maggiormente radiosensibili
nelle fasi G2 e M**

**La morte riproduttiva può
avvenire a seguito di danno
a cromosomi sia in G1 che
in G2**



GUIDANT

Metodi di rivelazione delle Aberrazioni Cromosomiche

Metodi di osservazione

- Cromosomi in mitosi (metafase)
- Cromosomi indotti a condensarsi (Premature chromosome Condensation, PCC)
- Micronuclei

**Il genoma umano:
46 cromosomi (23 “coppie”), 6,5 miliardi di nucleotidi da replicare e
segregare**

Metodi di rivelazione delle Aberrazioni Cromosomiche

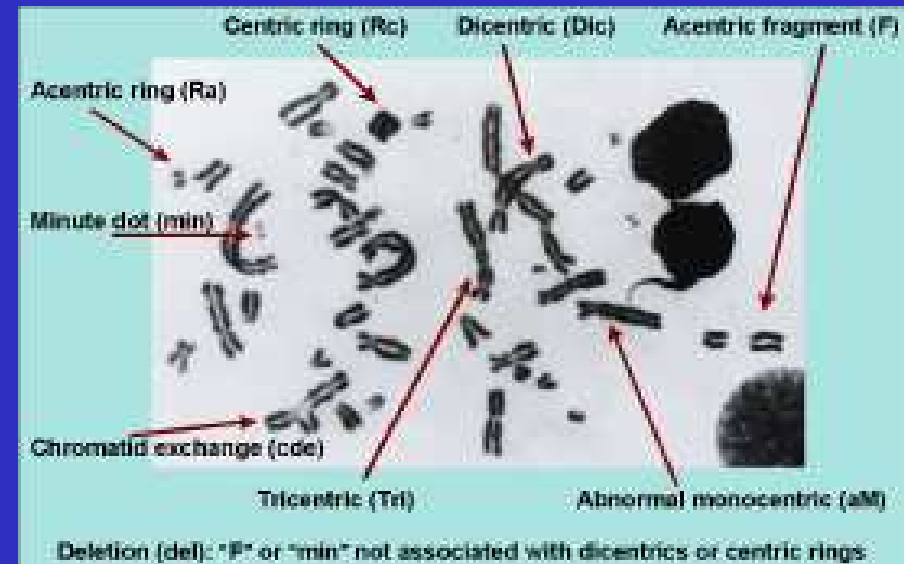
Tecniche di visualizzazione

- “colorazione standard” (solid staining, GEMSA)
- Banding (G-banding, Q-banding, m-banding)
- Fluorescence in situ hybridization (FISH) : probes per interi cromosomi, probes speciali (centromero, telomeri)
- Multicolor fluorescence in situ hybridisation (M-FISH)

Analisi mitotica con tecnica di “colorazione standard”

Questo metodo classico di colorazione fa apparire i cromosomi come piccoli segmenti colorati uniformemente

Questi possono essere classificati in accordo con la loro dimensione e dalla posizione del centromero



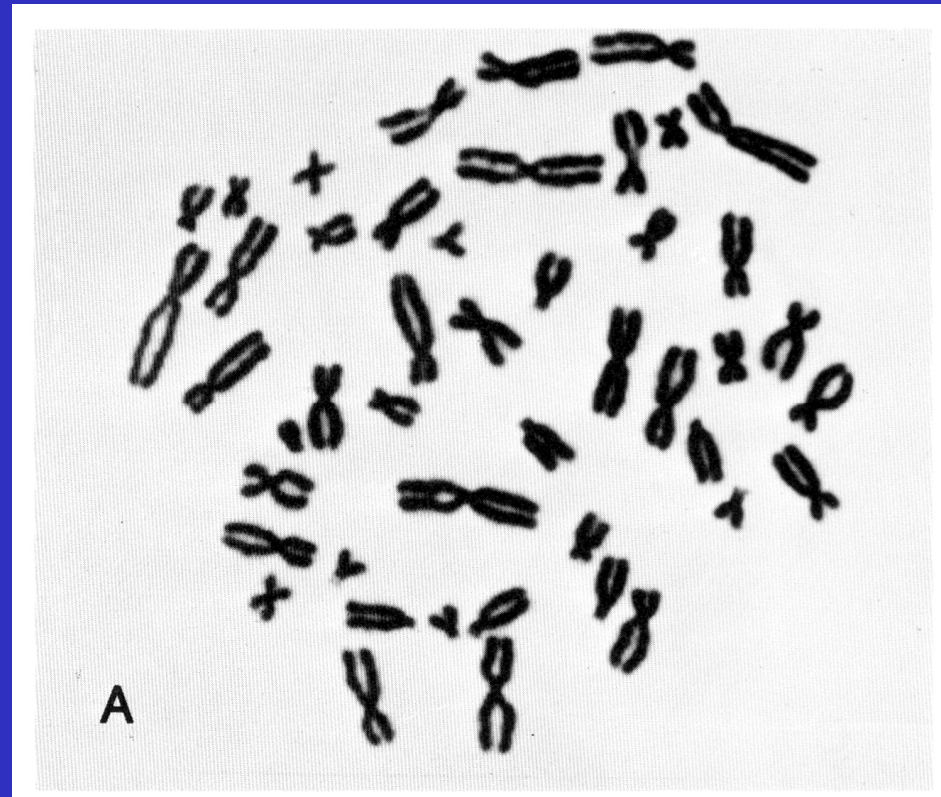
Tecniche di visualizzazione (banding)



Cariotipo di una cellula umana normale

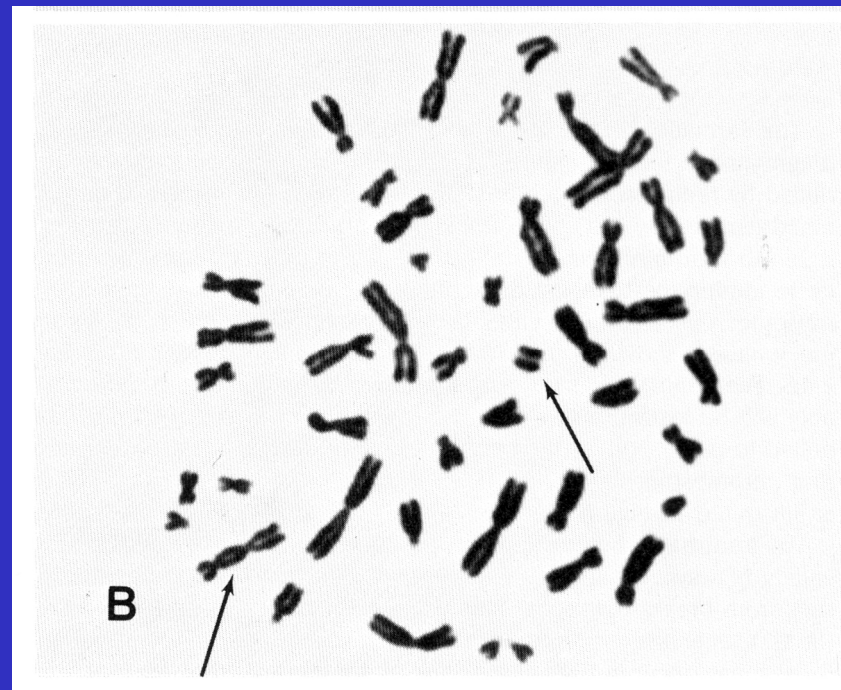
Aberrazioni cromosomiche (1)

Aberrazioni cromosomiche
radioindotte in leucociti umani
visualizzati in metafase:
metafasi di controllo (normali).



Aberrazioni cromosomiche (2)

Aberrazioni cromosomiche
radioindotte in leucociti umani
visualizzati in metafase.
Le frecce indicano dicentrici e
frammenti.



Aberrazioni cromosomiche (3)

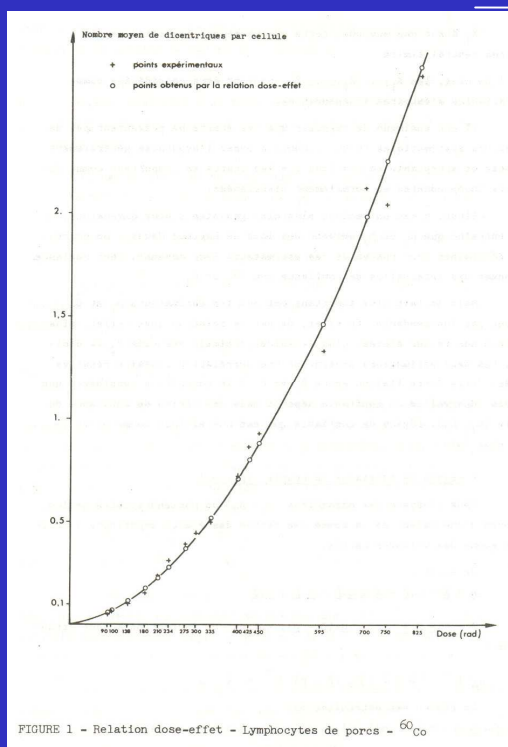
**Aberrazioni cromosomiche
radioindotte in leucociti umani
visualizzati in metafase: le frecce
indicano un anello.**



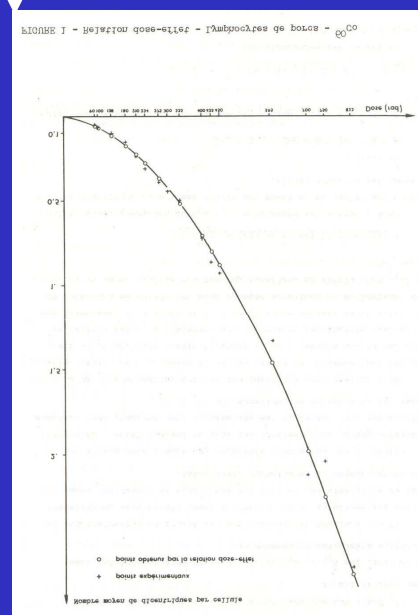
Dose-risposta per aberrazioni cromosomiche (basso LET)

L'incidenza della maggior parte delle aberrazioni cromosomiche è una funzione L-Q della dose per radiazioni di basso LET ed è correlato alla morte cellulare.

Dicentrics
per cell

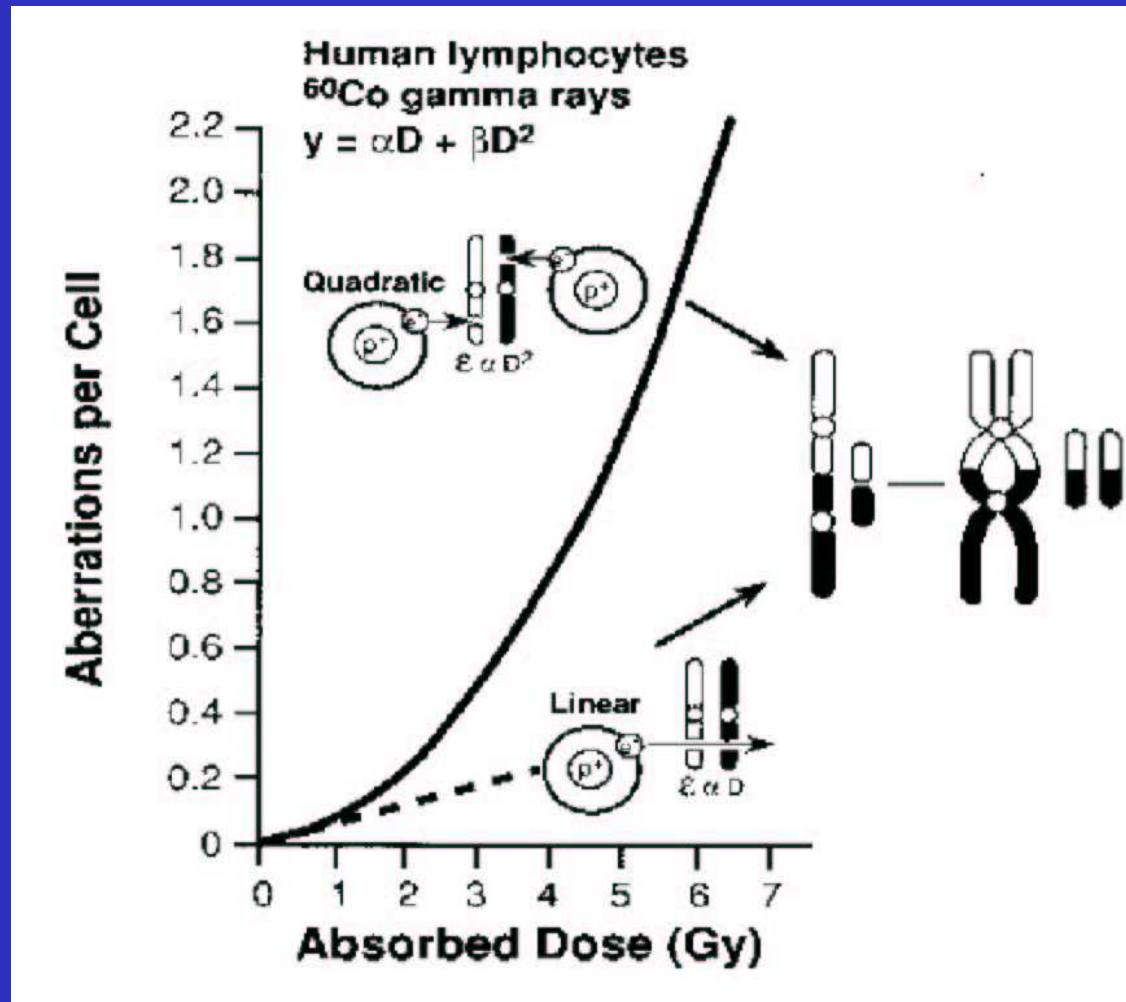


Flipped!

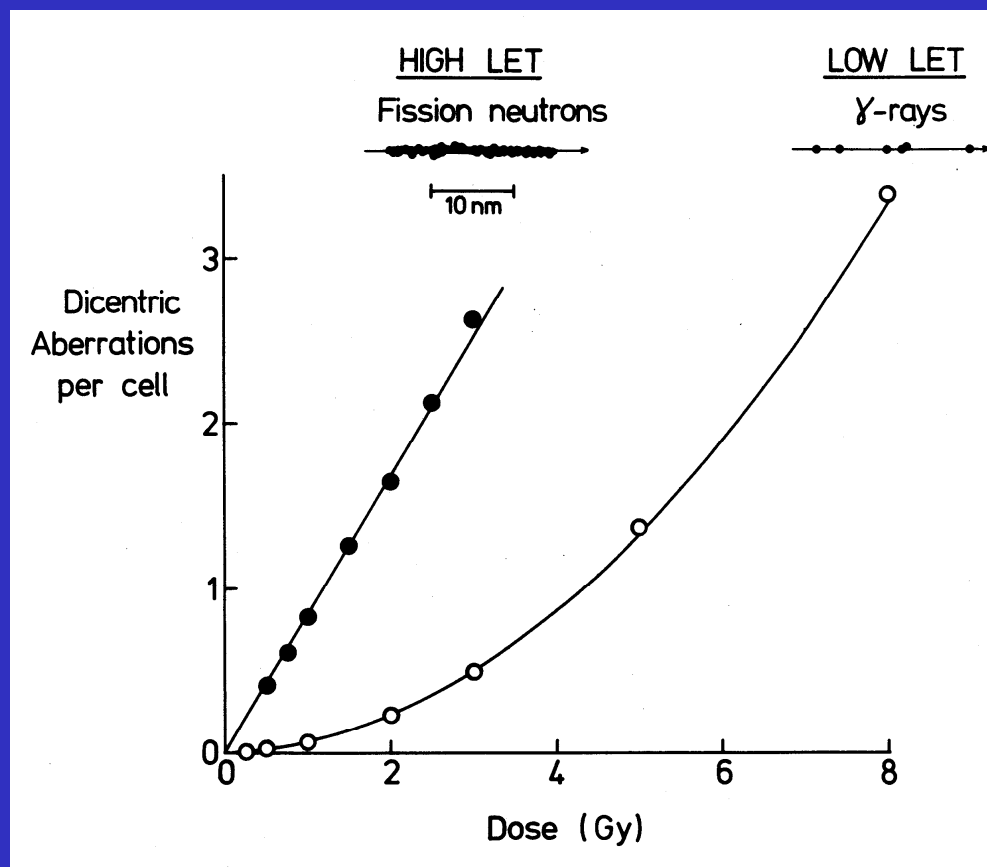


(Parmentier et al,
4th Microdosimetry
Symposium (1973))

Dose-risposta per aberrazioni cromosomiche (basso LET)



La frequenza di aberrazioni cromosomiche dipende dalla qualità della radiazione



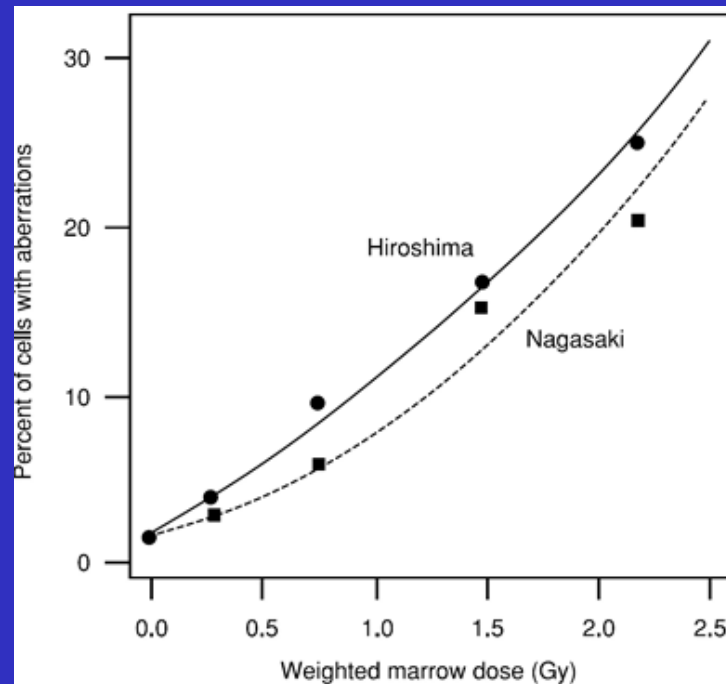
Aberrazioni cromosomiche e dosimetria biologica

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti umani tratti dal sangue periferico può essere usata come dosimetria biologica per esposizioni al corpo intero a radiazioni di basso LET con dosi non inferiori a 0.25 Gy.

La calibrazione è effettuata sulla base di curve dose-risposta ottenute da esperimenti d'irradiazione in vitro.

Alcuni tipi di aberrazioni cromosomiche, quali le traslocazioni, sono persistenti e sono rilevabili su persone anche dopo 40 anni dall'esposizione. La frequenza di dicentrici invece diminuisce fortemente già dopo pochi anni. Tuttavia la rivelazione delle traslocazioni è più difficile di quella dei dicentrici usando le normali tecniche di colorazione e per questo motivo si deve utilizzare la tecnica FISH.

Aberrazioni cromosomiche e dosimetria biologica



Relazione tra la frazione di cellule con aberrazioni cromosomiche (principalmente traslocazioni) e la dose ricevuta dai sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki

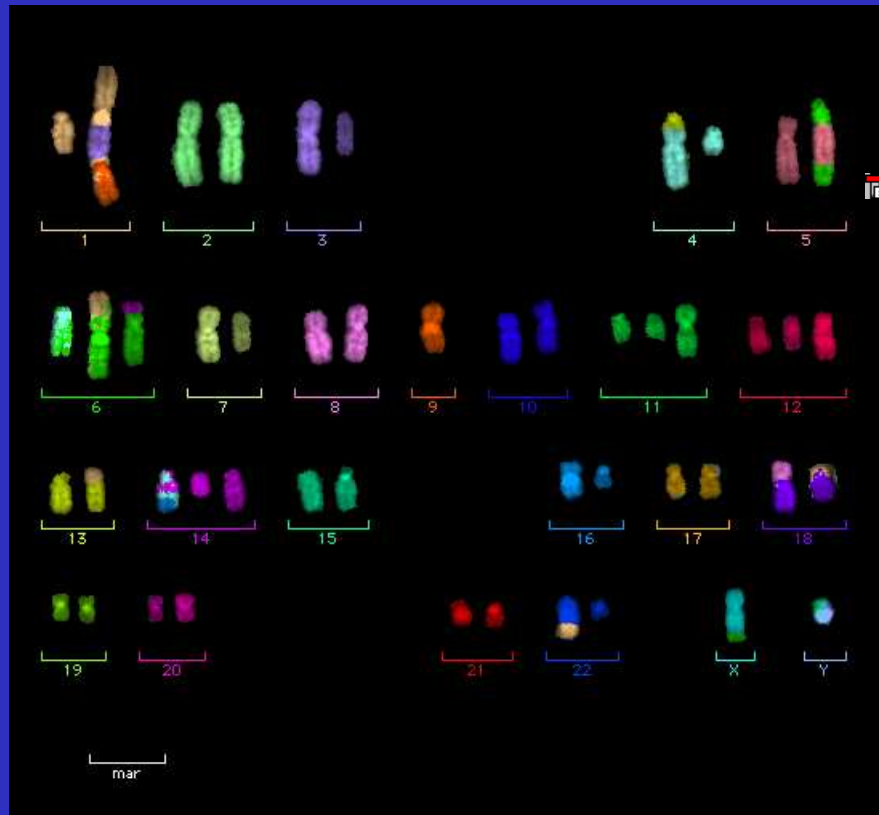
(Kodama Y, Pawel D, et al.: Stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors: Results from 25 years of investigation. Radiation Research 2001; 156:337-46).

Aberrazioni cromosomiche con M-FISH

Multicolor Fluorescence In Situ Hybridisation (M-FISH)

Con la tecnologia della M-FISH è possibile evidenziare aberrazioni cromosomiche complesse, cioè quelle che coinvolgono tre o più cromosomi.

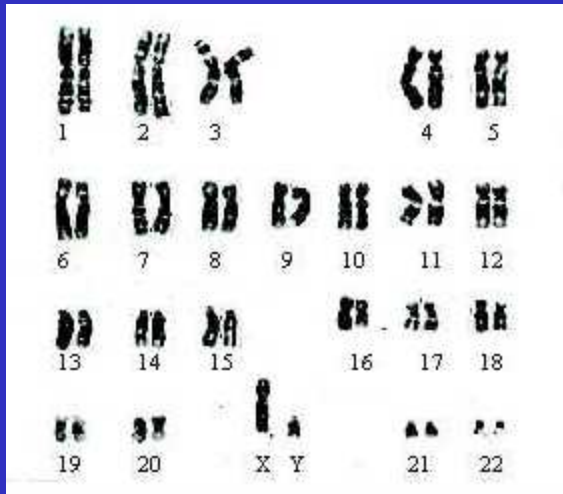
Esse sono prodotte più frequentemente dalle radiazioni densamente ionizzanti e si cerca attualmente di stabilire se esse possono costituire una “signature” del particolare tipo di radiazione.



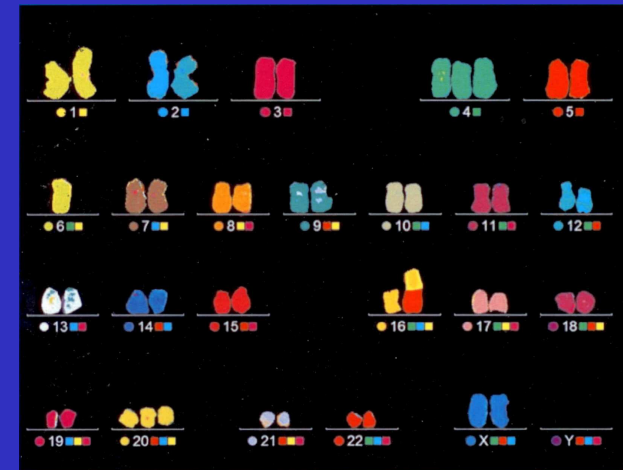
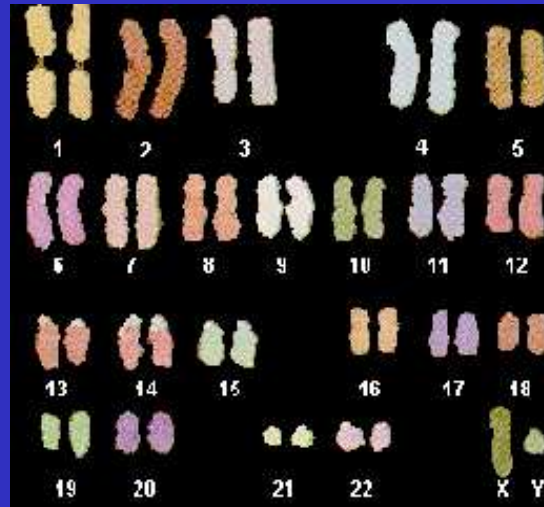
Originally, each chromosome pair is painted in one color. Chromosomes that are multicolored result from the interchange of parts of two or more different chromosomes.

Tecniche di visualizzazione

banding



M-FISH



Multicolor Fluorescence In Situ Hybridisation (M-FISH)

Originally, each chromosome pair is painted in one color. Chromosomes that are multicolored result from the interchange of parts of two or more different chromosomes.