

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

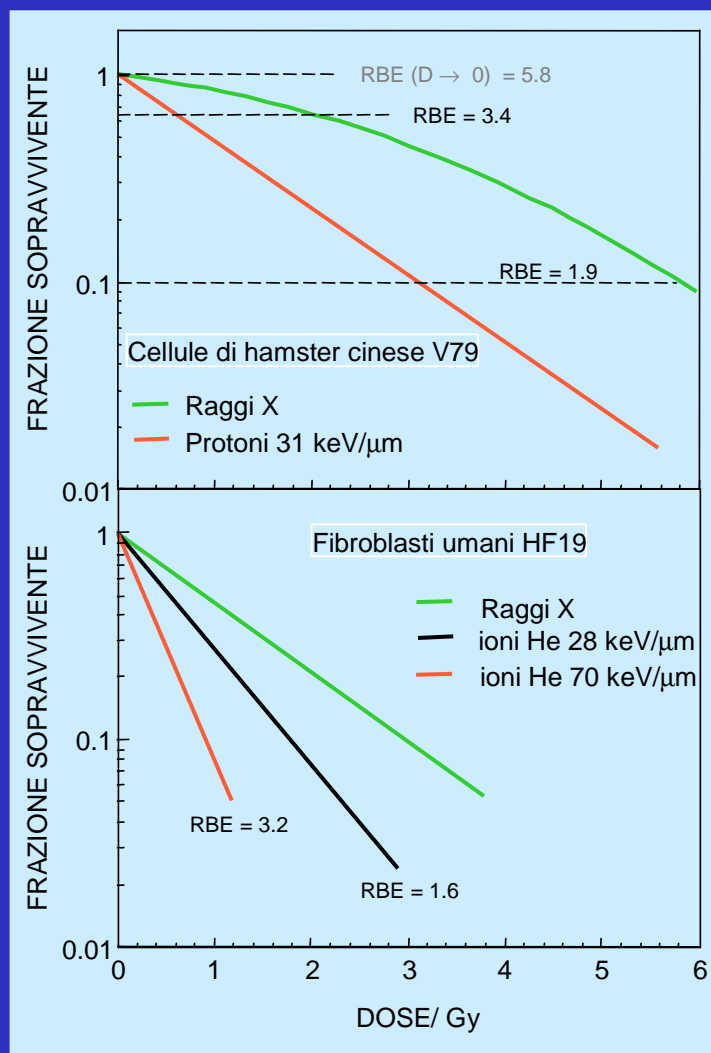
**Parte 9.
Effetti cellulari**

Effetti cellulari

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

- Inattivazione o morte riproduttiva (necrosi, apoptosi)
- Induzioni di mutazioni geniche
- Trasformazione neoplastica (oncogenica) “in vitro”

Qualità della radiazione e curve di sopravvivenza



Curve di sopravvivenza per diverse radiazioni

(Figure adattate da: Belli et al *Int. J. Radiat. Res.* 1989 per cellule V79 e Cox et al. *Int. J. Radiat. Res.* 1979 per cellule HF19)

All'aumentare del LET (densità di ionizzazione):

- riduzione della spalla e/o
- aumento della pendenza

Efficacia biologica relativa

(RBE, Relative Biological Effectiveness) di una radiazione rispetto ad un'altra di riferimento (raggi X o gamma)

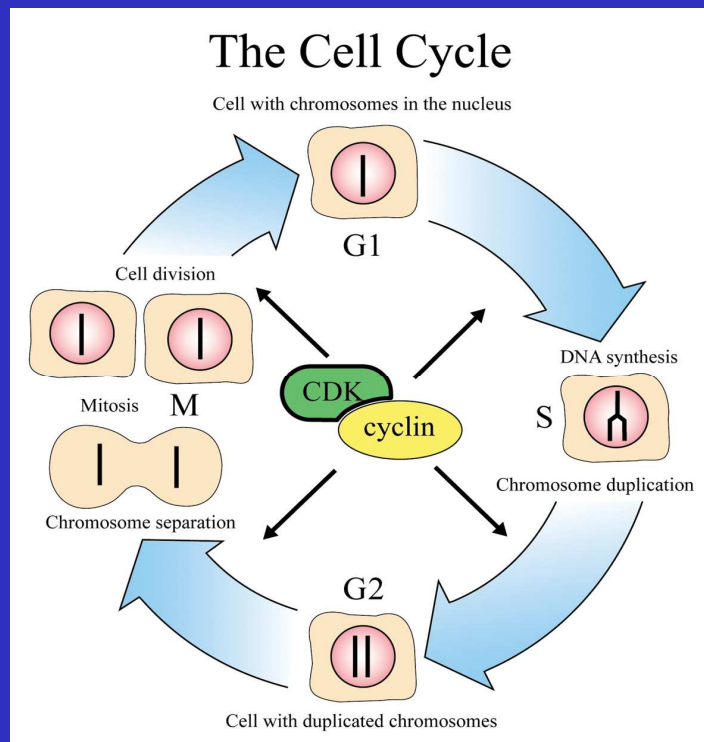
$$\text{RBE} = \frac{\text{dose radiaz. di riferimento}}{\text{dose radiaz. considerata}} \quad \text{a parità di effetto}$$

Per risposte ai raggi X o gamma con spalla iniziale, l'efficacia biologica relativa (RBE) dipende dal livello di effetto (dose)

Il ciclo cellulare e i checkpoints

Le cicline sono proteine essenziali per la progressione della cellula attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare

La transizione da una fase all'altra avviene solo in presenza dell'attività enzimatica di una determinata cdk che attiva la ciclina specifica necessaria per la transizione



I punti di arresto (checkpoint) rappresentano una sorta di controlli di qualità !

G1

Ci sono sufficienti sostanze nutritive ?

Il volume cellulare è adeguato ?

Sì >>> inizia il ciclo

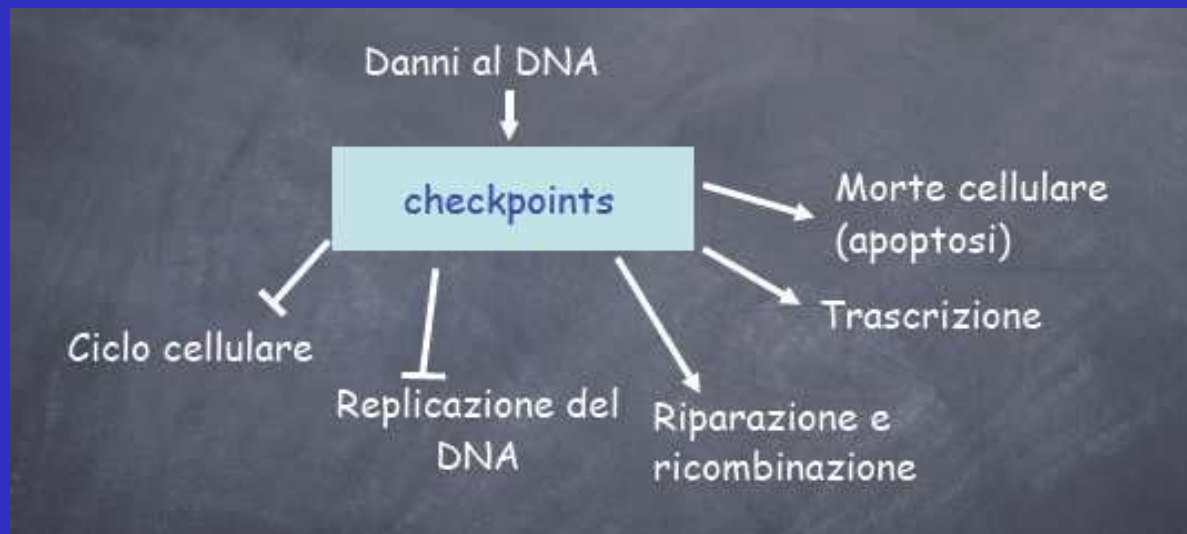
G2

Il DNA è integro ?

La replicazione è completa ?

Sì >>> Inizia la mitosi

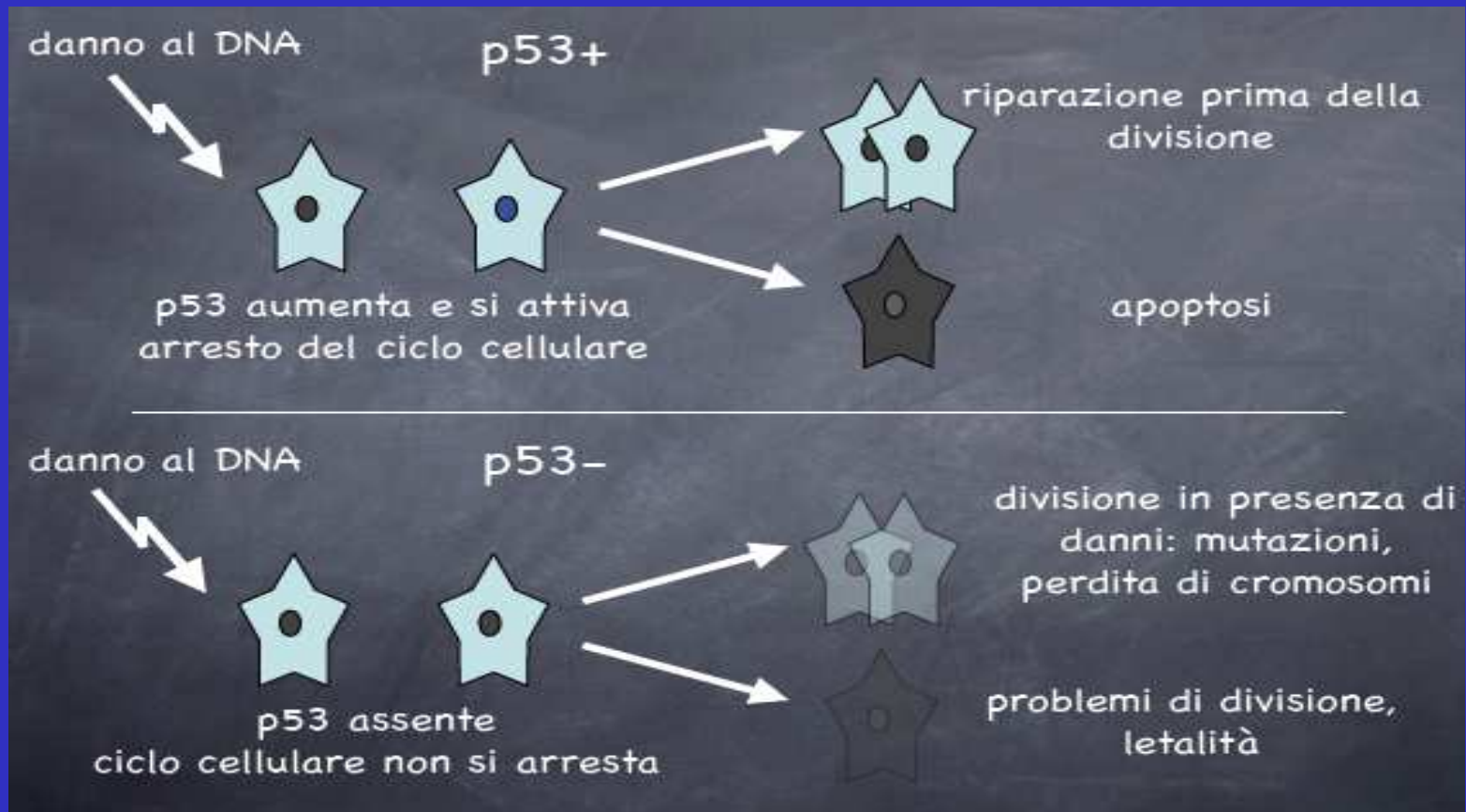
Il ciclo cellulare e i checkpoints



**I sistemi cellulari coinvolti nei checkpoints
reagiscono alla presenza di lesioni al DNA
coordinando diversi processi**

Il ciclo cellulare e i checkpoints

p53 è attivato dai checkpoints

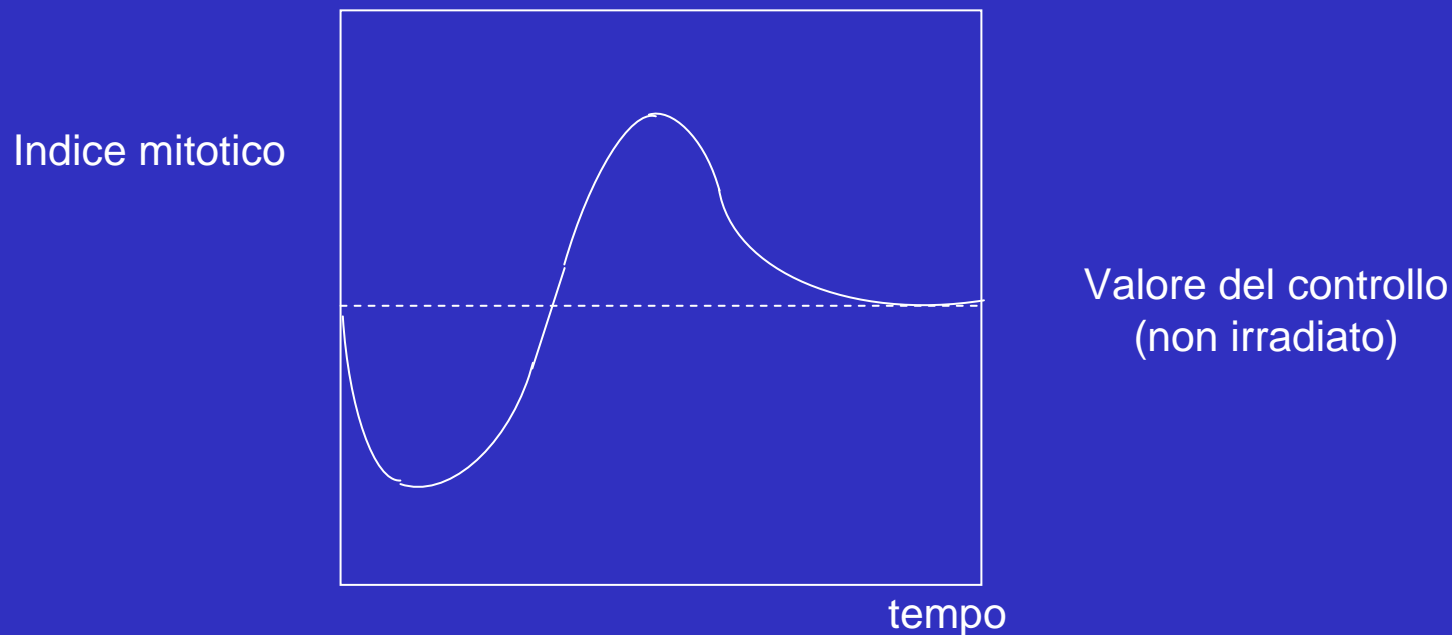


Il ritardo mitotico

Quando una cellula è irradiata prima della mitosi (profase) si osserva in genere un ritardo nella divisione (ritardo mitotico).

È stato osservato per la prima volta in una coltura di tessuto (Spear, 1953)

Misurando l'indice mitotico (frazione di cellule in mitosi) si osserva che subito dopo l'irradiazione esso tende a scendere, per poi risalire e ritornare al valore normale. Talvolta la risalita ha un picco anche oltre il valore normale.



Cellule coltivate *in vitro*

Cellule coltivate in terreno liquido capaci di aderire su un supporto (ad es. plastica) in forma di monostrato.



piastre o capsule (plates or dishes)



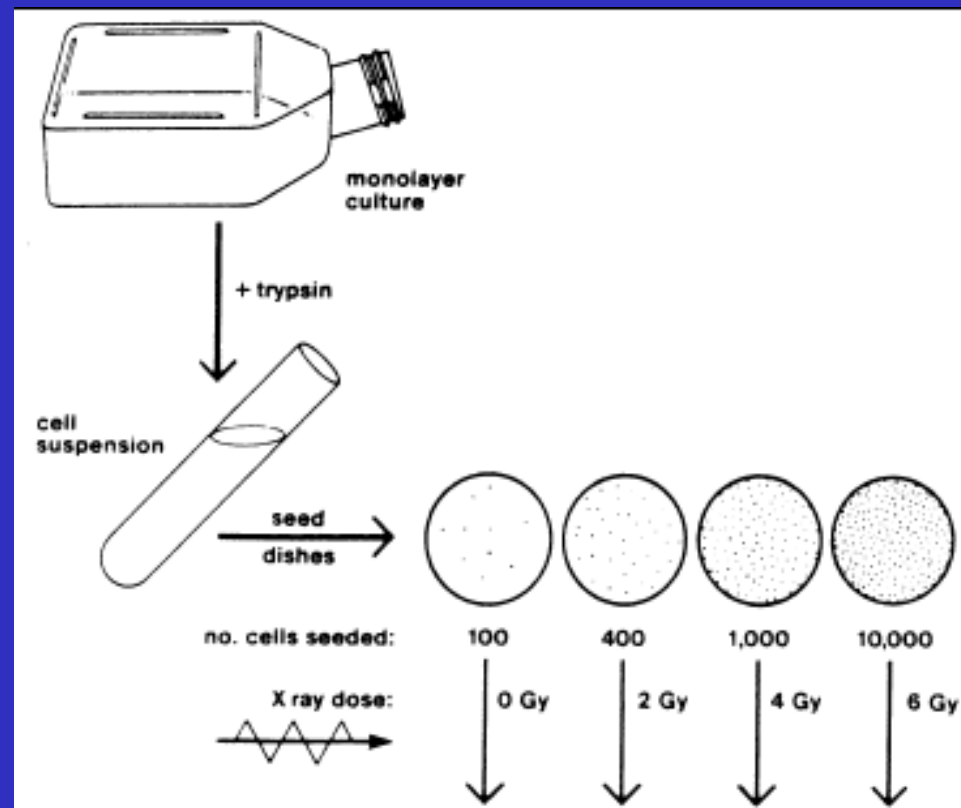
fiasche (flasks)

Diversi tipi di contenitori

Morte riproduttiva (inattivazione)

In genere si cerca di avere all'incirca lo stesso numero di colonie nelle capsule irradiate e in quelle di controllo, grande abbastanza per tenere bassi gli errori statistici ma non troppo elevato, così da avere bassa probabilità di errori per colonie sovrapposte. In tal modo l'errore relativo statistico è all'incirca lo stesso per tutti i punti di dose impiegati. Perciò il numero di cellule seminate tiene conto della diminuzione attesa della clonogenicità.

Esempio:



Irradiazione con raggi gamma

Esperimenti di esposizione a raggi gamma di cellule coltivate *in vitro*. I contenitori di coltura sono posti all'interno di appositi irradiator con una o più sorgenti gamma.



Gamma Rays



Cs-137 irradiator

Unit Dimensions: height 1496 mm; width 924 mm; depth 1229 mm

Canister Dimensions (internal): height 105 mm; diameter 312 mm; volume 8.0 l

Dose rate of **0.84 Gy/min** (15/2/11)

Typical dose uniformity is $\pm 7\%$ over a 260 mm diameter and a 100 mm height

Attenuators – A set of 3 attenuators can reduce the central dose rate by approximately 33% (**0.56 Gy/min**), 60% (**0.34 Gy/min**) or 80% (**0.17 Gy/min**) respectively



~ 77 mm (A = 80%)

~ 90 mm (A = 60%)

~ 90 mm (A = 33%)

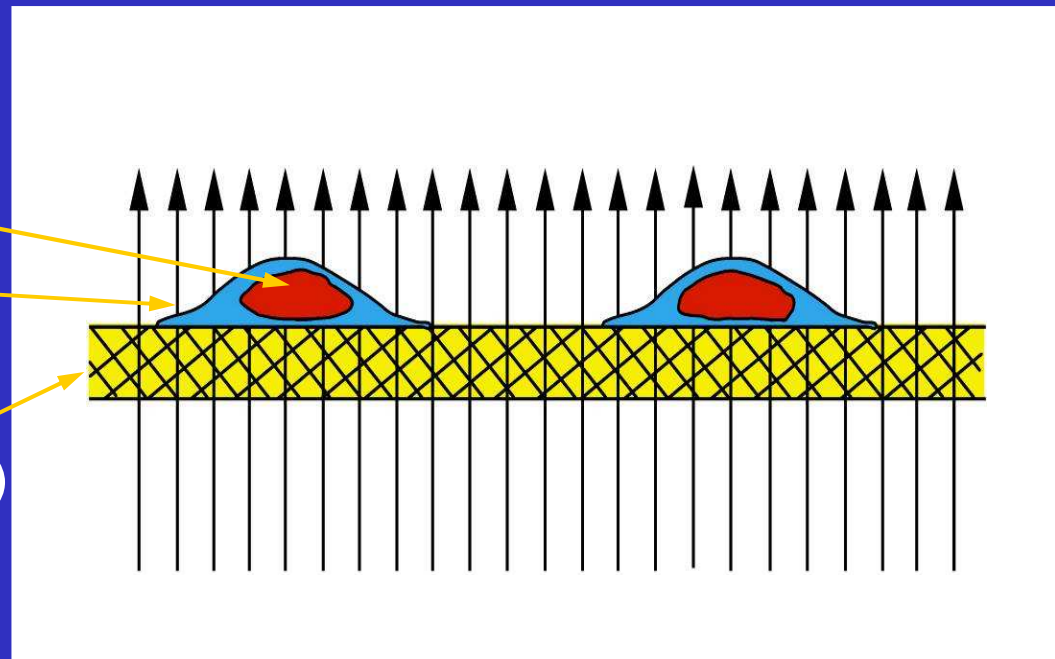
Irradiazione con particelle cariche

Esperimenti con cellule coltivate capaci di aderire su un supporto in forma di monostrato.

nucleo cellulare

cellule adese

supporto (mylar o altro)



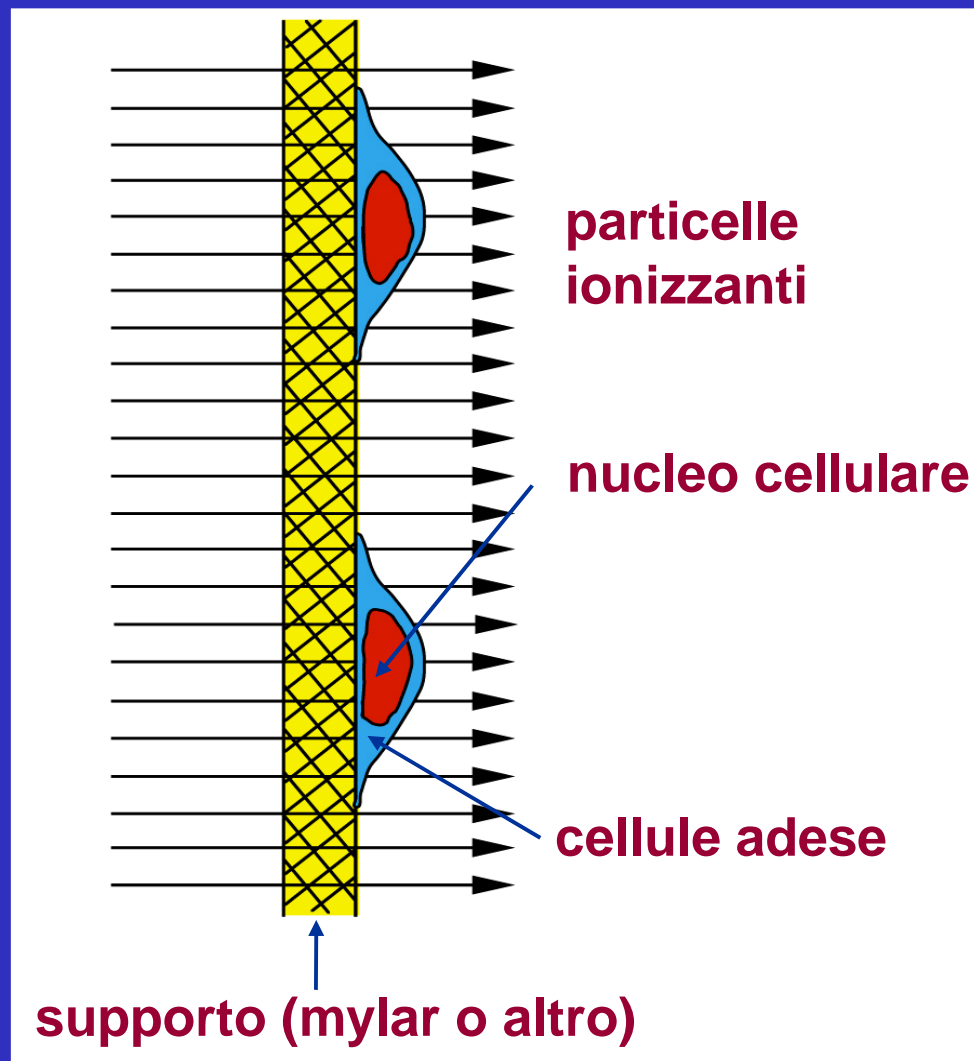
particelle ionizzanti da
acceleratore o sorgente

Irradiazione con particelle cariche

Esperimenti con cellule coltivate capaci di aderire su un supporto in forma di monostrato.

Vantaggi:

- Impiego con radiazioni di basso range (particelle cariche di bassa energia) in condizioni di track-segment experiment ($L = -dE/dx \approx \text{cost}$)
- Possibilità di utilizzare cellule quiescenti (G_0) per inibizione da contatto



Morte riproduttiva (inattivazione)

La quantità che si misura è la frazione di cellule sopravvivenenti $S(D)$ ad una dose D .

L'andamento di $S(D)$ si definisce curva di sopravvivenza

Si inocula ciascun campione con N cellule e si misura il numero di colonie che si sviluppano nel controllo (N_{Cn}) e nell'irradiato alla dose D (N_D):

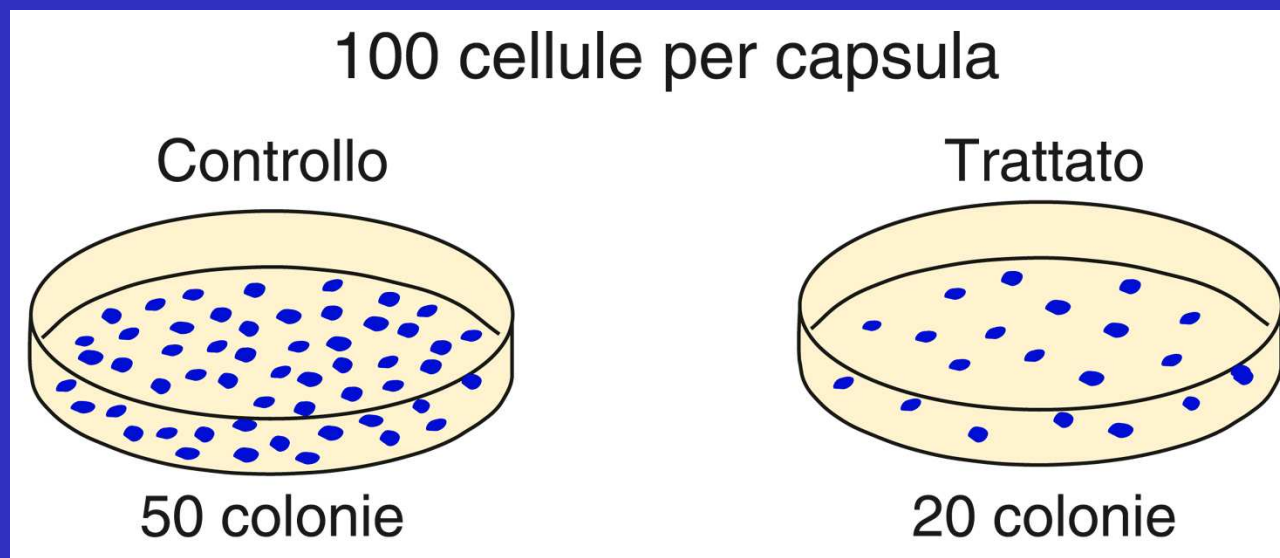
Efficienza di clonaggio

$$E.C. = N_{Cn}/N$$

Frazione di cellule sopravvivenenti

$$S(D) = N_D / N_{Cn} = N_D / (N \cdot E.C.)$$

Esempio:

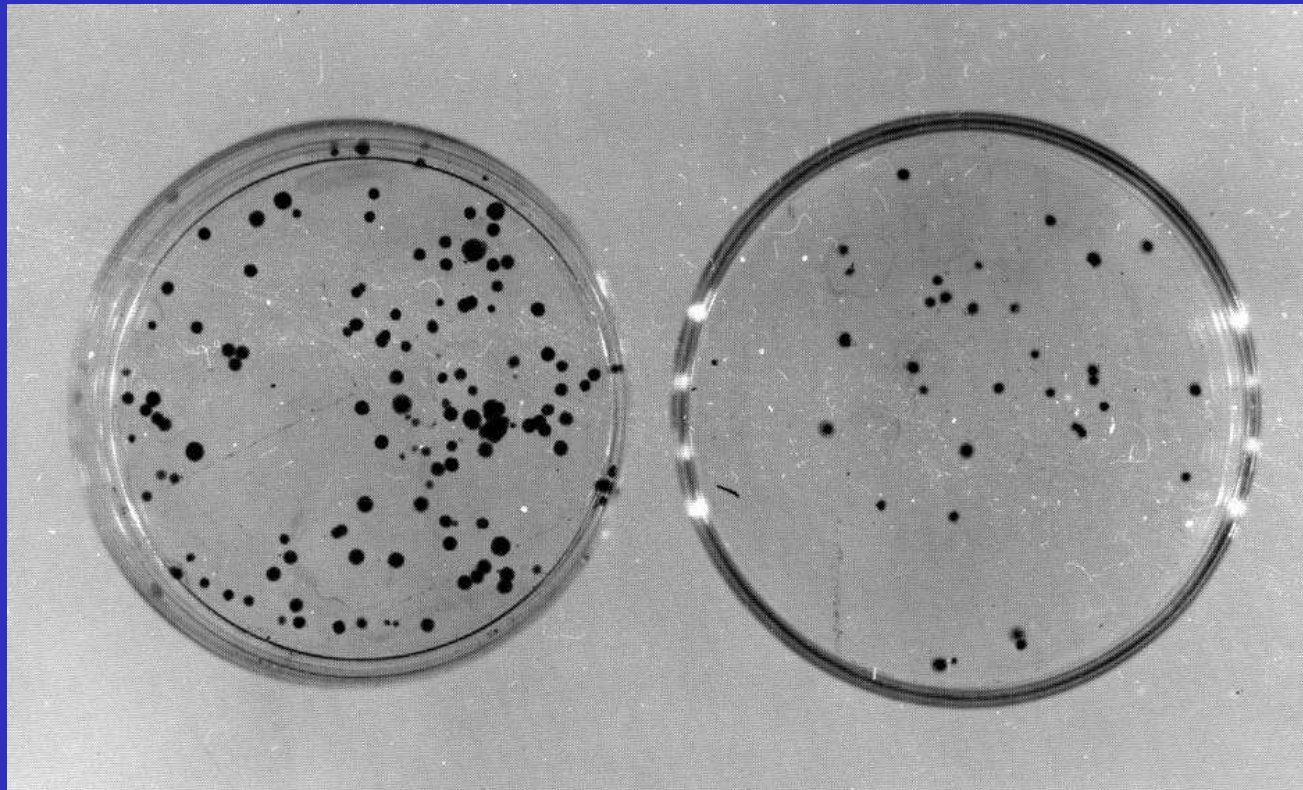


$$E.C. = 50/100 = 0.50 \text{ (50\%)}$$

$$S(D) = 20/(0.5 \cdot 100) = 0.40$$

Morte riproduttiva: sviluppo delle colonie cellulari

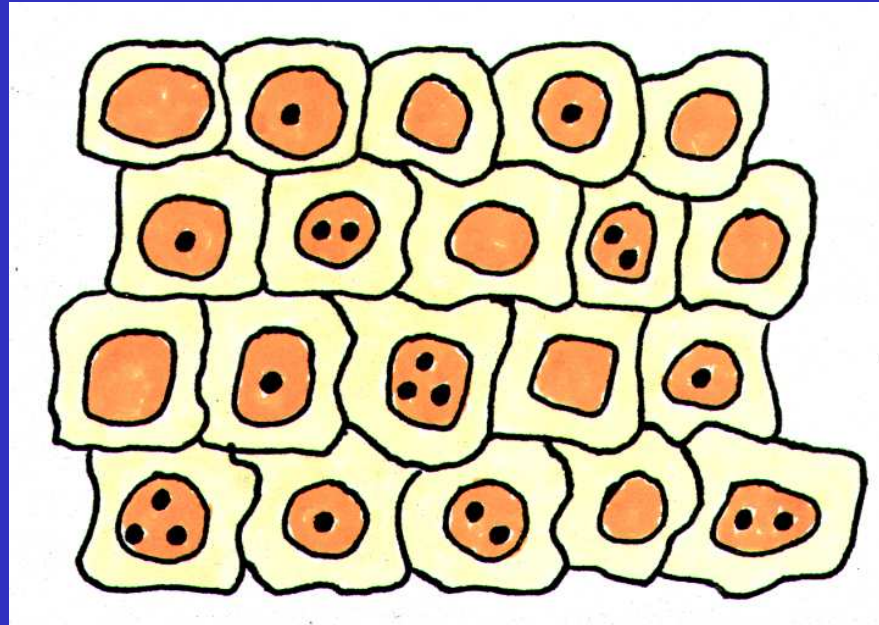
Colonie sviluppate da cellule di hamster cinese V79 seminate in capsule di Petri contenenti terreno nutritivo dopo 8 giorni d'incubazione a 37° in presenza di CO₂



Non irradiate

Irradiate con 5.5 Gy di raggi X

Eventi letali e sopravvivenza



n = n. di eventi letali

$\langle n \rangle$ = n. medio di eventi letali per nucleo cellulare (identificato come bersaglio)

Se n è distribuito secondo Poisson: $P(n, \langle n \rangle) = e^{-\langle n \rangle} \cdot \langle n \rangle^n / n!$

Perché una cellula muoia basta che $n \geq 1 \Rightarrow$ morte cellulare

probabilità di sopravvivenza: $P(0, \langle n \rangle) = e^{-\langle n \rangle} = e^{-w \cdot D} = e^{-D/D_0}$

D_0 = dose letale media

La curva di sopravvivenza (1)

La frazione di cellule sopravvivenenti $S(D)$ ad una dose D è legata al numero medio $\langle n(D) \rangle$ di eventi letali per cellula dalla relazione (Poisson):

$$S(D) = \exp(- \langle n(D) \rangle)$$

La curva di sopravvivenza (2)

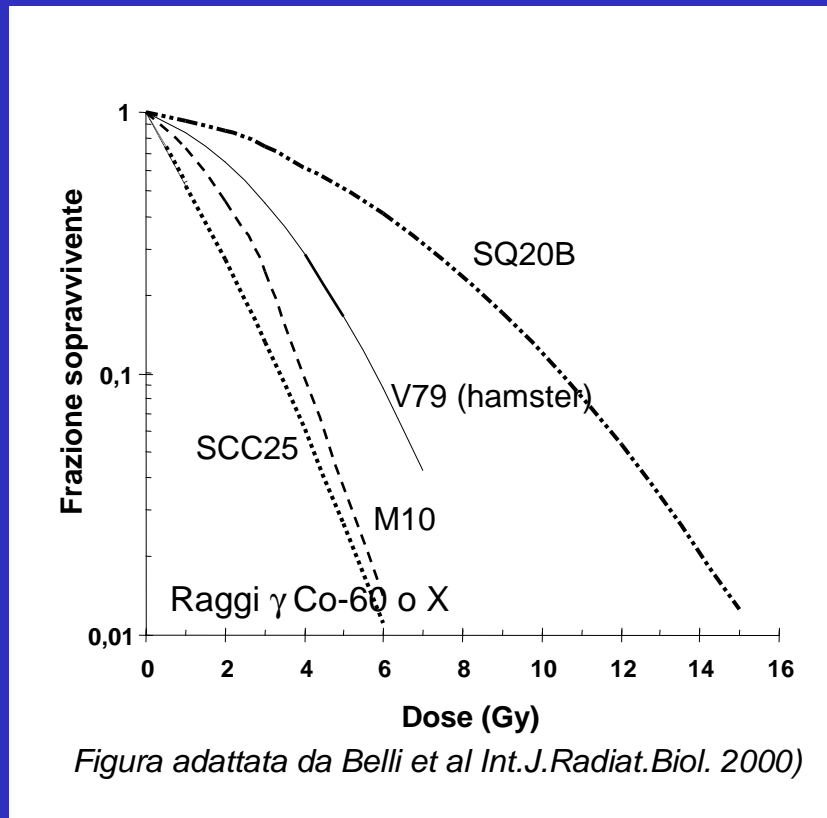
Sono state proposte varie funzioni matematiche per descrivere l'andamento sperimentale di $S(D)$ o, equivalentemente, di $\langle n(D) \rangle$, basate su altrettanti modelli, quali la teoria dell'urto e del bersaglio, la teoria della doppia azione, quella della riparazione saturabile, quella molecolare.

In passato si è molto discusso sulla scelta delle diverse funzioni. Poiché nessuno dei modelli è completamente soddisfacente, attualmente si tende ad usare in maniera fenomenologica la cosiddetta relazione lineare-quadratica:

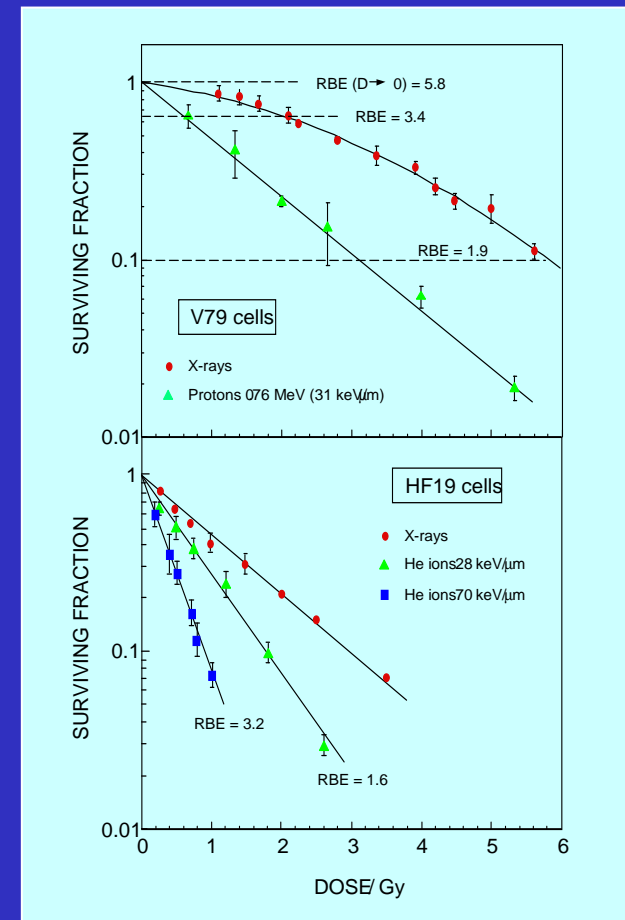
$$S(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad \text{ovvero} \quad \langle n(D) \rangle = \alpha D + \beta D^2 = -\ln S$$

(che esprime comunque i primi due termini di un'espansione in serie di una funzione crescente con la dose D).

Curve di sopravvivenza



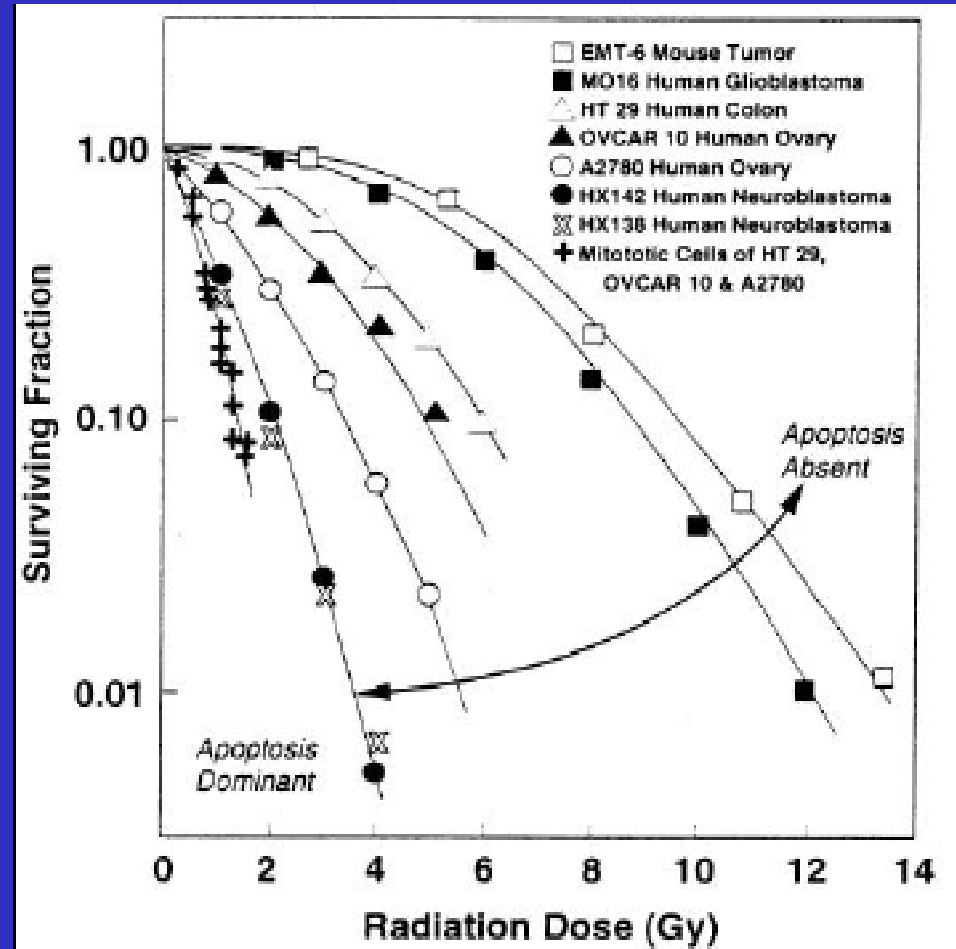
La forma delle curve di sopravvivenza può essere diversa a seconda del tipo di cellule, del tipo di radiazione e di altri fattori



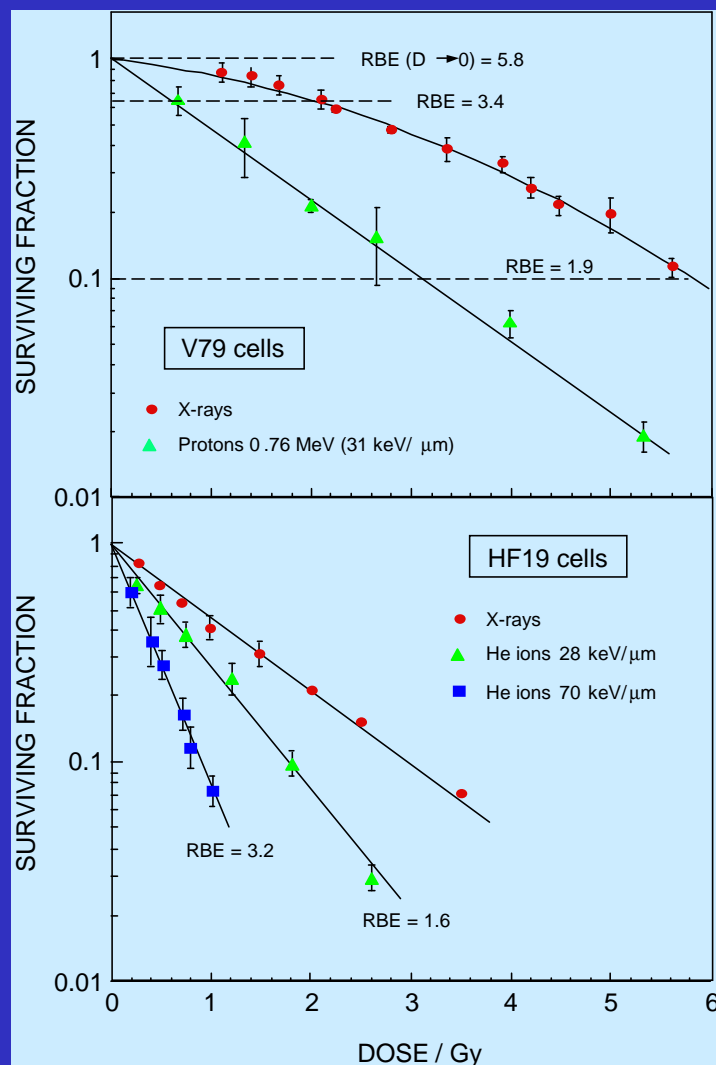
Curve di sopravvivenza

Le cellule non hanno tutte la stessa radiosensibilità. Cellule diverse possono mostrare valori di radiosensibilità assai diversi.

Vi è spesso una stretta relazione tra radiosensibilità cellulare e apoptosi (morte cellulare programmata)



Qualità della radiazione e curve di sopravvivenza



**Curve dose-risposta
per diverse radiazioni**
(Belli et al *Int. J. Radiat. Res.*, 1989
Cox et al, *Int. J. Radiat. Res.*, 1979)

All'aumentare del LET (densità di ionizzazione):

- riduzione della spalla
- aumento della pendenza

Per risposte ai raggi X o gamma con spalla
iniziale, l'efficacia biologica relativa (RBE)
dipende dal livello di effetto (dose)

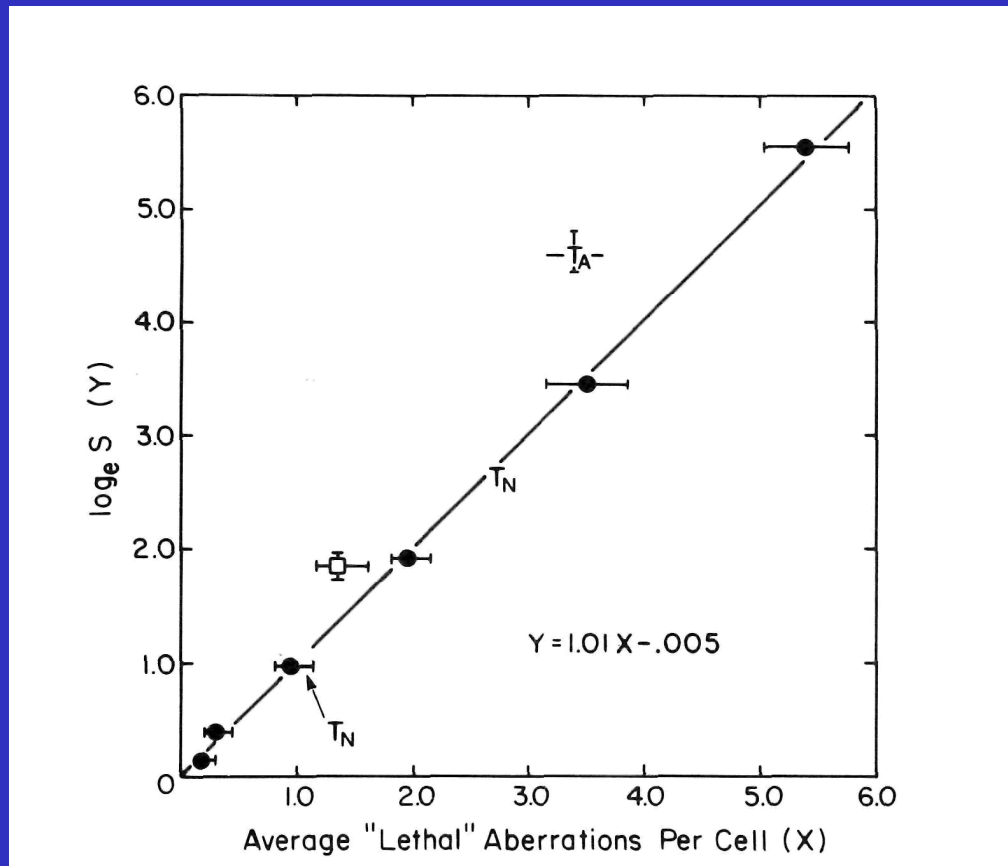
$$RBE = \frac{\text{dose radiaz. di riferimento}}{\text{dose radiaz. considerata}} \quad \text{a parità di effetto}$$

Danno subletale e danno potenzialmente letale

Il danno da radiazioni è tradizionalmente classificato in:

1. **Danno letale, LD** (irreversibile, irreparabile; corrisponde alla componente alfa della curva di risposta)
2. **Danno potenzialmente letale , PLD** (componente del danno che può essere riparata modificando le condizioni post-irradiazione; in condizioni normali)
3. **Danno subletale, SLD** (danno che può essere riparato e che non si trasforma in LD o PLD se non interagisce con altro SLD; corrisponde alla componente beta della curva di risposta)

Relazione tra letalità e aberrazioni cromosomiche



fibroblasti umani AG01522

Relazione tra il numero di lesioni letali (misurato dal valore $-\ln S$) e il numero di aberrazioni "letali" per cellula (scambi asimmetrici = dicentrici e anelli) in fibroblasti umani AG01522 in coltura (Cornforth and Bedford Radiat. Res. 111:385-405, 1987)

RELAZIONE $\approx 1:1$

Relazione tra letalità e induzione di DSB

Evidenze che le DSB sono le lesioni critiche per la morte cellulare.

(Frankenberg et al Radiat.Res. 1981,)

Uso di cellule di lievito difettive per la riparazione delle DSB (mutanti rad 52)

1. Sia i valori dell'RBE che dell'OER per l'induzione di DSB in varie condizioni d'irradiazione sono simili ai corrispondenti valori per la morte cellulare.

2. Occorrono tra 1 e 2 DSB per cellula per osservare un evento letale indipendentemente dalla qualità della radiazione utilizzata e dalle condizioni ossigenate o anossiche.

Relazione tra letalità e induzione di DSB

Conclusioni dagli studi sui lieviti

(Frankenberg-Schwager et al, Radiat Prot Dosimetry 1985)

- Sono le DSB **non riparate** che possono portare alla morte cellulare.
- La forma delle curve di sopravvivenza è determinata dalla proporzione di DSB che le cellule riescono a riparare dopo l'irradiazione.
- La riparazione delle DSB influisce sia sull'estensione della spalla che sulla pendenza delle curve di sopravvivenza.
- Le DSB possono portare alla morte cellulare attraverso due meccanismi:
a) Una DSB è letale direttamente; b) almeno due DSB devono interagire per formare una lesione letale.
- In generale i fenomeni biologici descritti come “danno potenzialmente letale” e danno “subletale” possono essere interpretati in termini della stessa lesione molecolare, la DSB, e corrispondono alle due possibilità a) e b) rispettivamente.

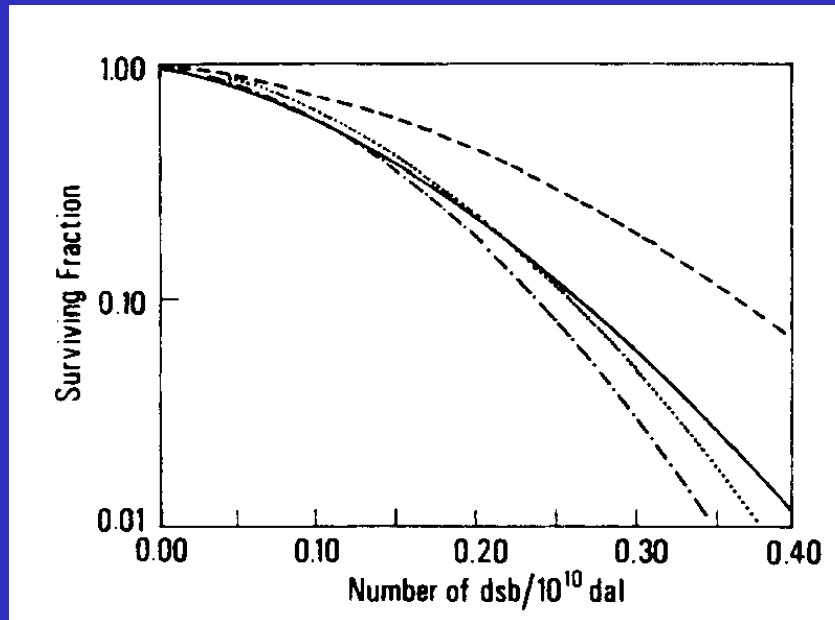
Relazione tra letalità e induzione di DSB

Cellule di mammifero

Varie evidenze indicano nelle DSB le lesioni “critiche” responsabili degli effetti cellulari “tardivi” che si manifestano a seguito d’irradiazione, quali la morte clonogenica, l’induzione di mutazioni e la trasformazione “in vitro”.

Tuttavia in cellule di mammifero in generale non vi è una buona correlazione tra numero di DSB indotte dalla radiazione nel DNA cellulare (numero iniziale di DSB) ed effetti cellulari “tardivi”.

Relazione tra letalità e induzione di DSB



Cellule di hamster cinese V79
(fibroblasti polmonari)

Sapora et al, Int. J. Radiat. Biol., 1991

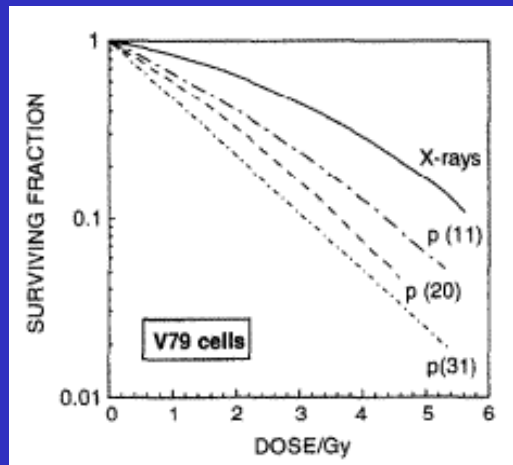
Figure 2. Correlations between pairs of endpoints. Air: —, PBSS; ----, PBSS + 2 mol dm⁻³ DMSO. Anoxia: ····, PBSS; -·-·-, PBSS + 2 mol dm⁻³ DMSO. *F*-tests showed that there is a sufficiently high probability ($p \geq 0.05$) that a common function can be used for the relationships between pairs of endpoints in the following cases: cell killing vs. dsb in all conditions except in the presence of DMSO in air; mutation induction vs. dsb in the absence of DMSO; cell killing vs. mutation induction in the absence of DMSO.

Relazione tra letalità e induzione di DSB

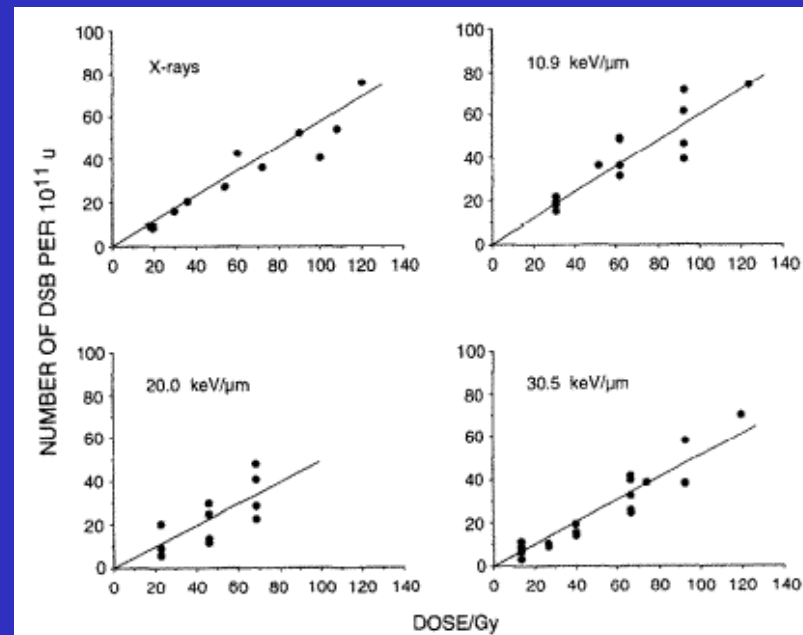
L'induzione di DSB è lineare con la dose e dipende poco dalla qualità della radiazione

Belli et al., Adv. Space Res. 1995

Cellule di hamster cinese V79
(fibroblasti polmonari)



Dose-response curves for cell survival in V79 cells irradiated with X-rays and proton beams of various LET (11, 20 and 31 keV/μm).



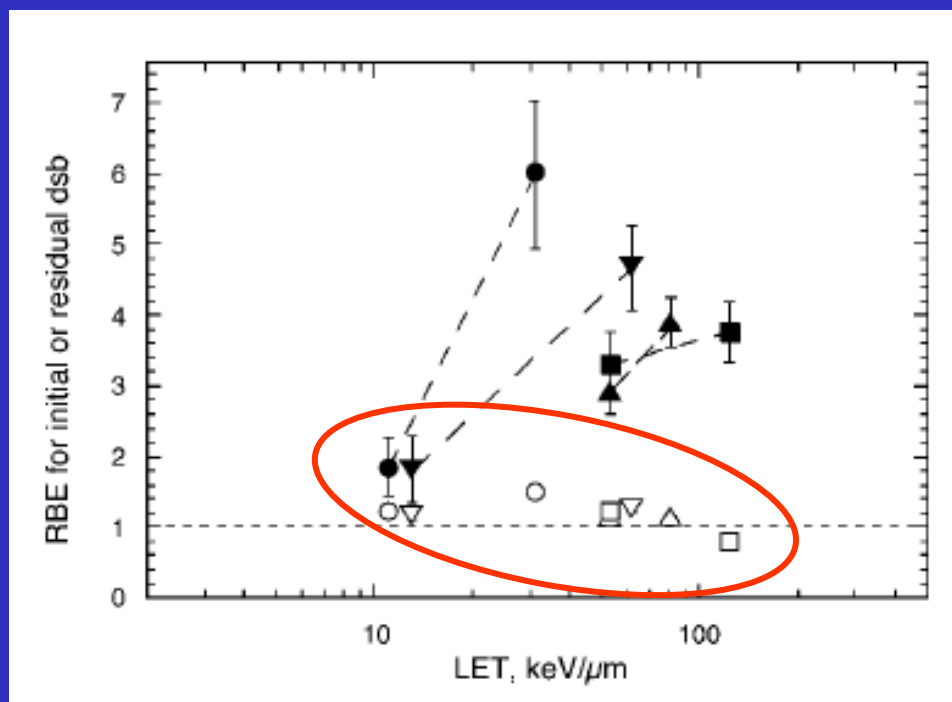
Dose-response curves for the initial number of dsb (as measured by the sedimentation assay) in V79 cells irradiated with X-rays and protons of various LET. Dsb values are expressed per 10¹¹ u of DNA mass.

Relazione tra letalità e induzione di DSB

Induzione e ricongiungimento delle DSB

DNA DSB induction and rejoining in V79 cells irradiated with light ions: a CFGE study.
Belli et al., IJRB 76 (8) 2000

RBE per DSB indotte e per DSB residue per diverse qualità di radiazione:



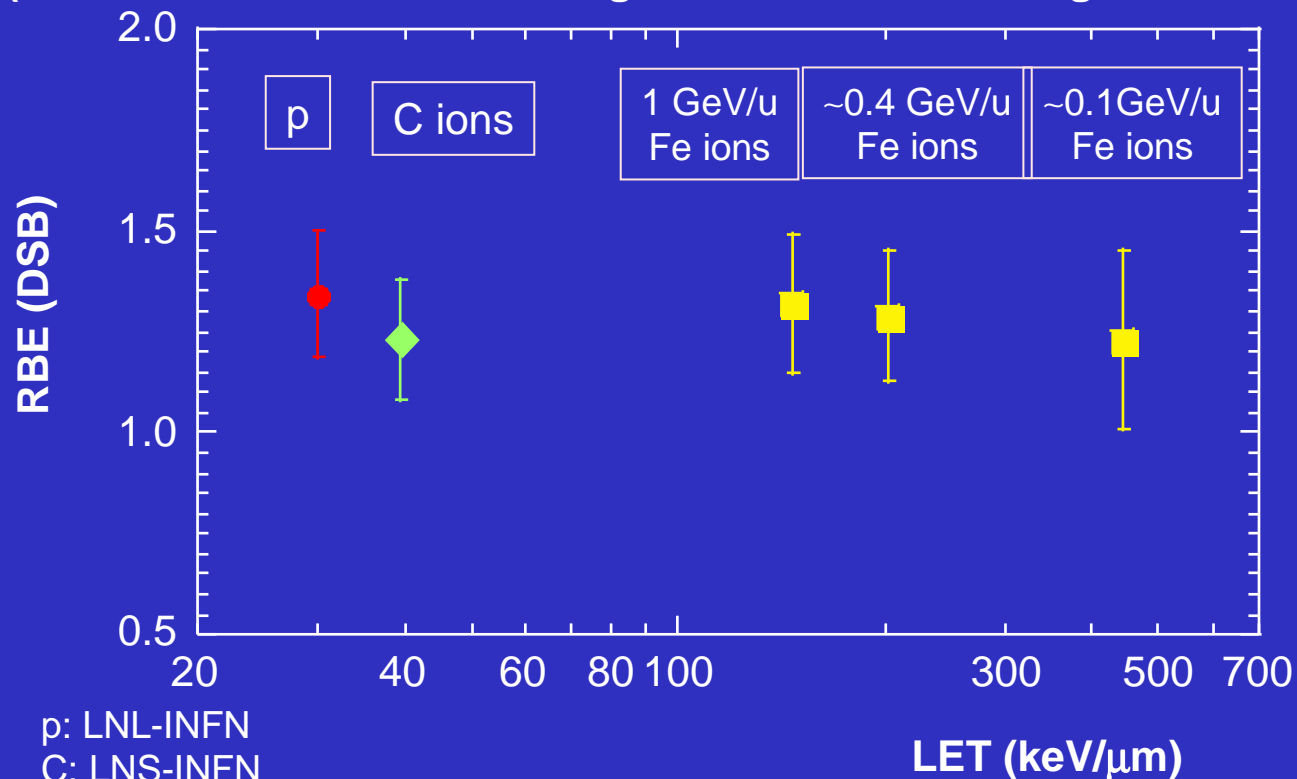
Cellule di hamster cinese V79
(fibroblasti polmonari)

initial	residual	
○	●	protons
▽	▼	deuterons
△	▲	helium-3
□	■	helium-4

Frazione di DSB residue misurate dopo 2 h d'incubazione

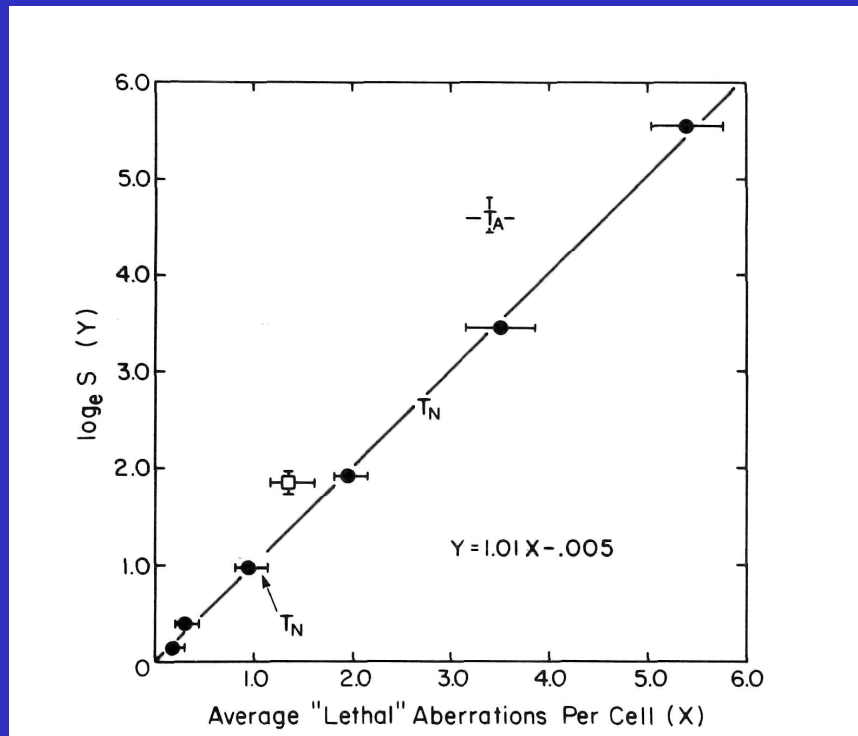
RBE for DSB induction in human fibroblasts is close to unity and does not mirror the LET dependence of cell killing

AG1522 human fibroblasts
(DSB calculated from DNA fragments in the size range 0.023 - 5.7 Mbp)



Relazione tra letalità e aberrazioni cromosomiche

D'altra parte vi è una buona correlazione tra determinati tipi di aberrazioni cromosomiche e morte clonogenica.



fibroblasti umani AG01522

RELAZIONE $\approx 1:1$

Relazione tra il numero di lesioni letali (misurato dal valore $-\ln S$) e il numero di aberrazioni "letali" per cellula (scambi asimmetrici = dicentrici e anelli) in fibroblasti umani AG01522 in coltura (Cornforth and Bedford Radiat. Res. 111:385-405, 1987)

Ciò indica che il "processamento" delle lesioni iniziali sul DNA è il legame tra tali lesioni e i riarrangiamenti, stabili od instabili, del genoma.

Relazione tra letalità e DSB residue

Confronto tra DSB iniziali e DSB residue

(Blocher, Int J Radiat Biol. 1988)

Irradiazione con raggi X da 140 kVp e particelle alfa da sorgente di ^{241}Am (3.4 MeV)

Cellule tumourali EATC (asciti di Ehrlich)

Metodo di misura delle DSB: sedimentazione in gradiente di saccarosio neutro a bassa velocità di centrifugazione.

L'induzione di DSB risulta lineare con la dose sia per i raggi x che per le particelle alfa.

Dal rapporto tra le pendenze si ricava: RBE delle particelle alfa per induzione di DSB = 1.6 ± 0.4

Al contrario dopo 24 h di tempo di riparazione il numero di DSB residue è una funzione lineare-quadratica della dose. In queste condizioni L'RBE delle particelle alfa per DSB (residue) aumenta a valori compresi tra 2.7 ± 0.4 (a 100 Gy di particelle alfa) e 3.8 ± 1.2 (a 10 Gy di particelle alfa).

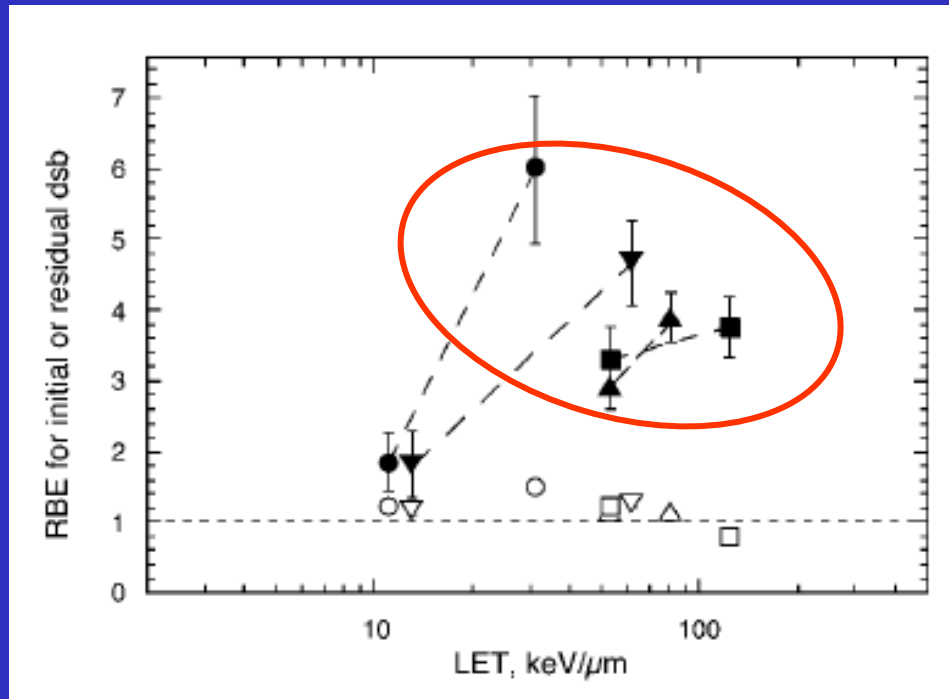
Gli autori concludono che le **DSB residue** sono la causa principale della perdita di capacità riproduttiva delle cellule EATC a seguito d'irradiazione con raggi X e con particelle alfa.

Relazione tra letalità e DSB residue

Induzione e ricongiungimento delle DSB

DNA DSB induction and rejoining in V79 cells irradiated with light ions: a CFGE study.
Belli et al., IJRB 76 (8) 2000

RBE per DSB indotte e **per DSB residue** per diverse qualità di radiazione:



Cellule di hamster cinese V79
(fibroblasti polmonari)

initial	residual	
○	●	protons
▽	▼	deuterons
△	▲	helium-3
□	■	helium-4

Frazione di DSB residue misurate dopo 2 h d'incubazione

Mutazioni genetiche

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.

Mutazioni genetiche

Per mutazione genetica si intende ogni modificazione stabile ed ereditabile nella sequenza nucleotidica di un genoma o più generalmente di materiale genetico non dovuta alla ricombinazione genetica.

Una mutazione genetica modifica il genotipo di un individuo e può eventualmente modificarne il fenotipo.

Se le mutazioni avvengono in una cellula somatica esse saranno presenti in tutte le cellule da essa derivate per mitosi; alcune di queste mutazioni possono rendere le cellule maligne e provocare tumori e sono responsabili di alcune malformazioni congenite.

Se le mutazioni avvengono nelle cellule delle linee germinali sono ereditate dalle generazioni successive e possono eventualmente provocare malattie genetiche ereditarie.

Mutazioni genetiche

Mutazioni geniche

Alterazioni di un singolo gene; non sono in generale visibili attraverso analisi al microscopio

Mutazioni cromosomiche o anomalie o aberrazioni cromosomiche
alterazione della struttura di uno o più cromosomi

Mutazione genomiche o anomalie cariotipiche

Presenza di un numero di cromosomi maggiore o minore rispetto al normale.

Mutazioni geniche

Mutazioni puntiformi

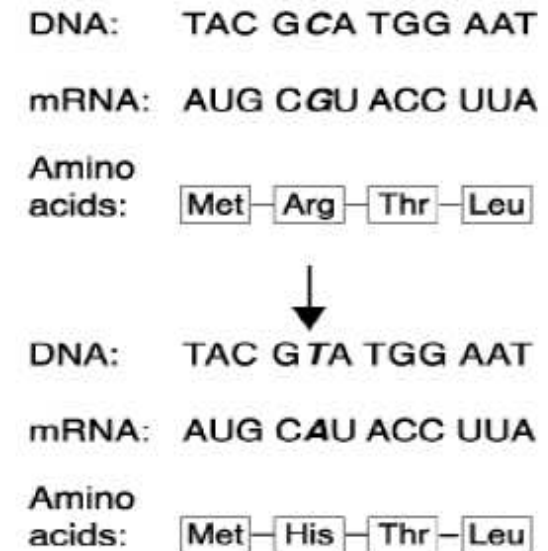
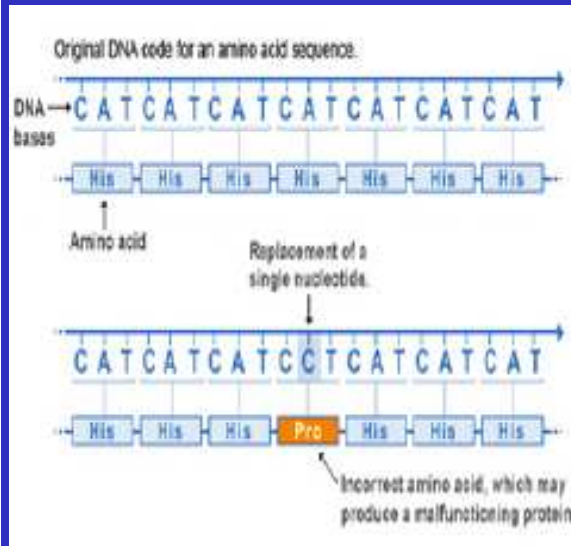
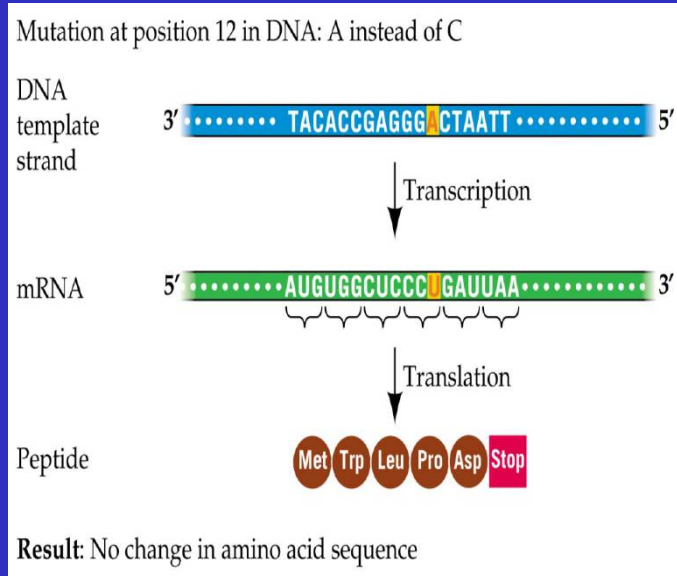
sono causate da *sostituzioni di basi* o da *inserzioni o delezioni di coppie di basi*

- sostituzioni di basi:
 - Transizioni: scambio di una purina con altra purina ($A \leftrightarrow G$) o di una pirimidina con un'altra pirimidina ($C \leftrightarrow T$);
 - Trasversioni: scambio di una purina con una pirimidina o viceversa ($A \leftrightarrow C$ oppure $T \leftrightarrow G$).
- inserzioni o delezioni di coppie di basi
Mutazioni frameshift, causate dall'aggiunta (inserzione) o l'eliminazione (delezione) di uno o pochi nucleotidi (in numero non multiplo di tre) con alterazione dell'ordine di lettura di tutti i codoni successivi al punto d'inserimento o di delezione

Mutazioni per sequenze ripetute

mutazioni causate sempre da inserzioni o delezioni ma di sequenze di basi ripetute

Mutazioni geniche: sostituzione



*Sostituzione A→C
silente*

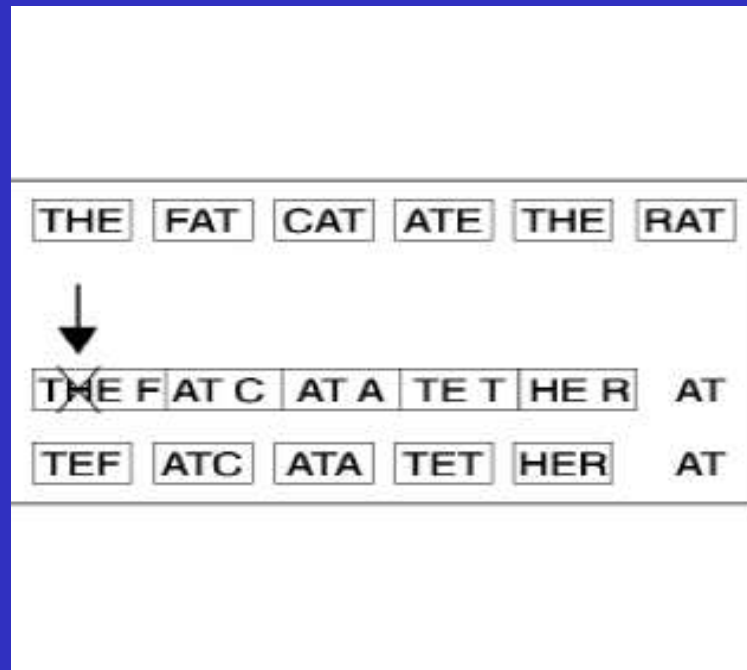
*Sostituzione A→C
Senso errato*

*Sostituzione C→T
Senso errato*

- **mutazioni sinonime o silenti:** la mutazione determina un codone diverso ma che codifica lo stesso amminoacido
- **mutazioni di senso errato:** la mutazione determina un codone che codifica un altro amminoacido..
- **mutazioni non senso:** la mutazione determina la formazione di un codone di stop all'interno della sequenza.

Mutazioni geniche: delezione

Gran parte delle mutazioni radioindotte sono delezioni



- Una o più basi sono eliminate dal codice, causando un frame shift nella lettura
- Normalmente produce una mutazione di senso errato o non senso

Il codice genetico

		Second base					
		U	C	A	G		
First base (5' end)	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G	Third base (3' end)
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } Ileu AUC } AUA } AUG } Met (start)	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Ala	GCU, GCC, GCA, GCG	Leu	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Arg	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Lys	AAA, AAG
Asn	AAU, AAC	Met	AUG
Asp	GAU, GAC	Phe	UUU, UUC
Cys	UGU, UGC	Pro	CCU, CCC, CCA, CCG
Gln	CAA, CAG	Ser	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Glu	GAA, GAG	Thr	ACU, ACC, ACA, ACG
Gly	GGU, GGC, GGA, GGG	Trp	UGG
His	CAU, CAC	Tyr	UAU, UAC
Ile	AUU, AUC, AUA	Val	GUU, GUC, GUA, GUG
start	AUG, GUG	stop	UAG, UGA, UAA

Amminoacidi:

Ala=Alanina

Gly= Glicina

Met= Metionina

Ser= Serina

Cys= Cisteina

His= Istidina

Asn= Asparagina

Thr= Treonina

Asp= Ac. aspartico

Ile = Isoleucina

Pro= Prolina

Val= Valina

Glu= Ac. glutammico

Lys= Lisina

Gln= Glutamina

Trp= Triptofano

Phe= Fenilalanina

Leu= Leucina

Arg= Arginina

Tyr= Tirosina

Prima evidenza del potere mutageno delle radiazioni ionizzanti

Alla fine del 1926 il genetista americano Hermann Muller ottenne l'evidenza della produzione di mutazioni geniche e aberrazioni cromosomiche indotte dai raggi X nel moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*). Egli misurò anche la relazione tra dose dei raggi X e frequenza di mutazioni letali nel moscerino. Il lavoro fu pubblicato nel 1927 (Muller, H. J. Artificial transmutation of the gene. *Science* 46, 84-87 (1927)).



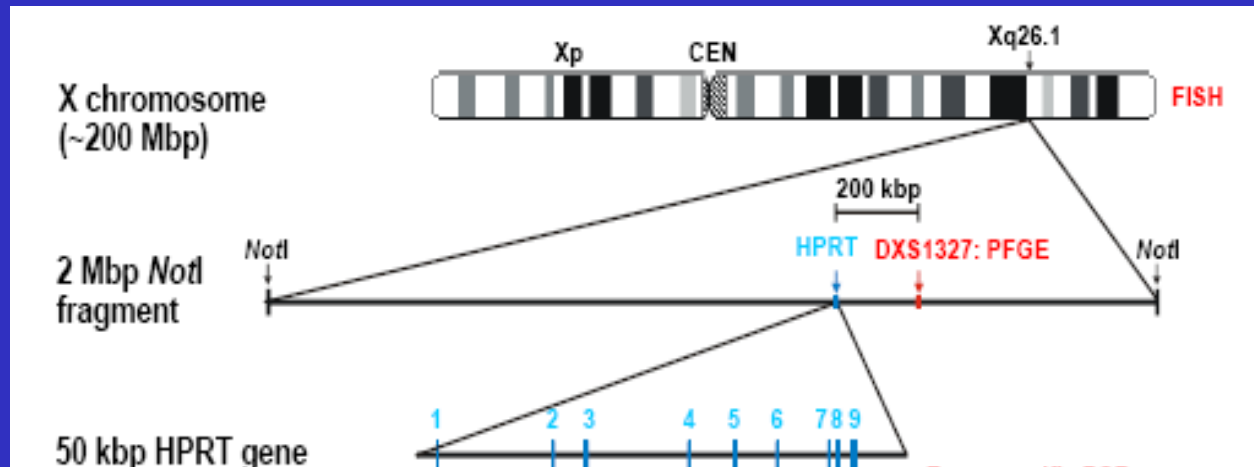
Effetti delle mutazioni

Il tipo di mutazione indotta dai vari agenti mutageni può spesso essere previsto in quanto essi hanno una certa *specificità mutazionale*. Non potrà però essere determinato a priori dove queste mutazioni avverranno nel genoma e quindi quali conseguenze porteranno all'organismo.

Gli effetti possono essere notevolmente diversi a seconda del tipo di mutazione e della posizione in cui questa si verifica.

Se la mutazione interessa le sequenze codificanti, ovvero i geni, si ha una variazione nel tipo o nella quantità del corrispondente prodotto genico (proteina o RNA funzionale). Una mutazione può non portare ad alcuna conseguenza quando interessa DNA che non codifica.

Mutazioni HPRT

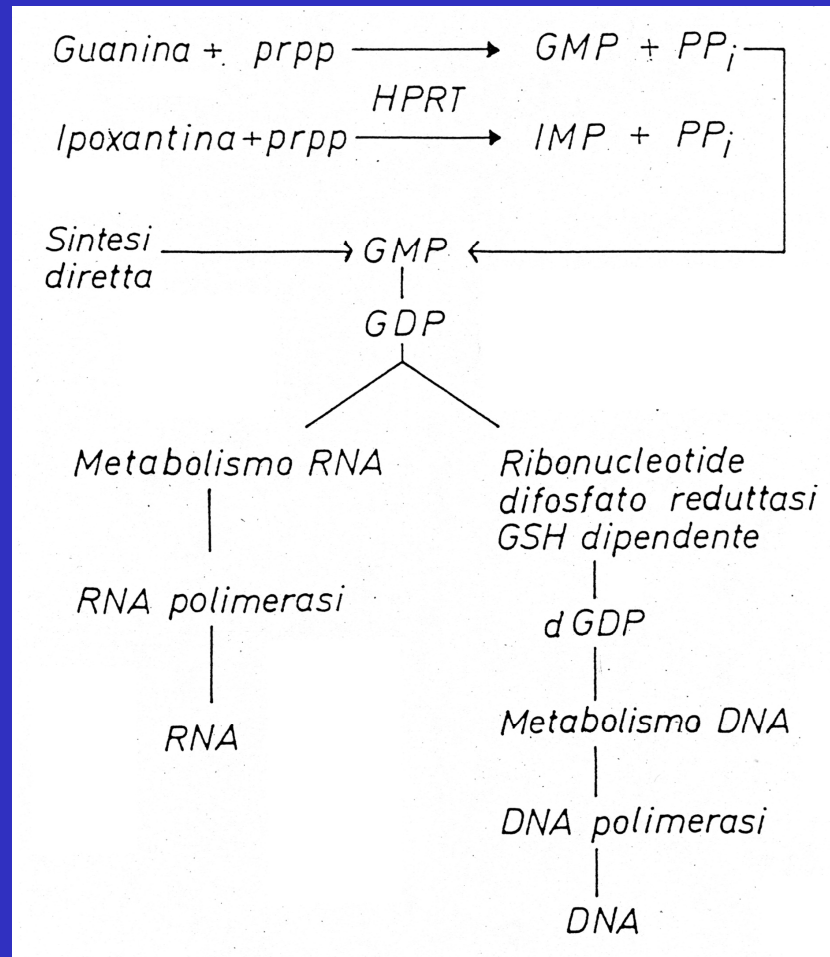


Il gene (locus) *hprt* è un gene non essenziale, localizzato sul cromosoma X (gene legato al sesso).

Il gene *hprt* codifica per l'enzima HPRT (ipoxantina fosforibosiltrasferasi) che consente il recupero delle purine, catalizzando la reazione del 5-fosforibosil, 1-pirofosfato con la guanina (G) o l'ipoxantina (I), formando precursori che sono utilizzati nella sintesi del DNA.

Le mutazioni *hprt* non modificano in condizioni normali le funzioni cellulari.

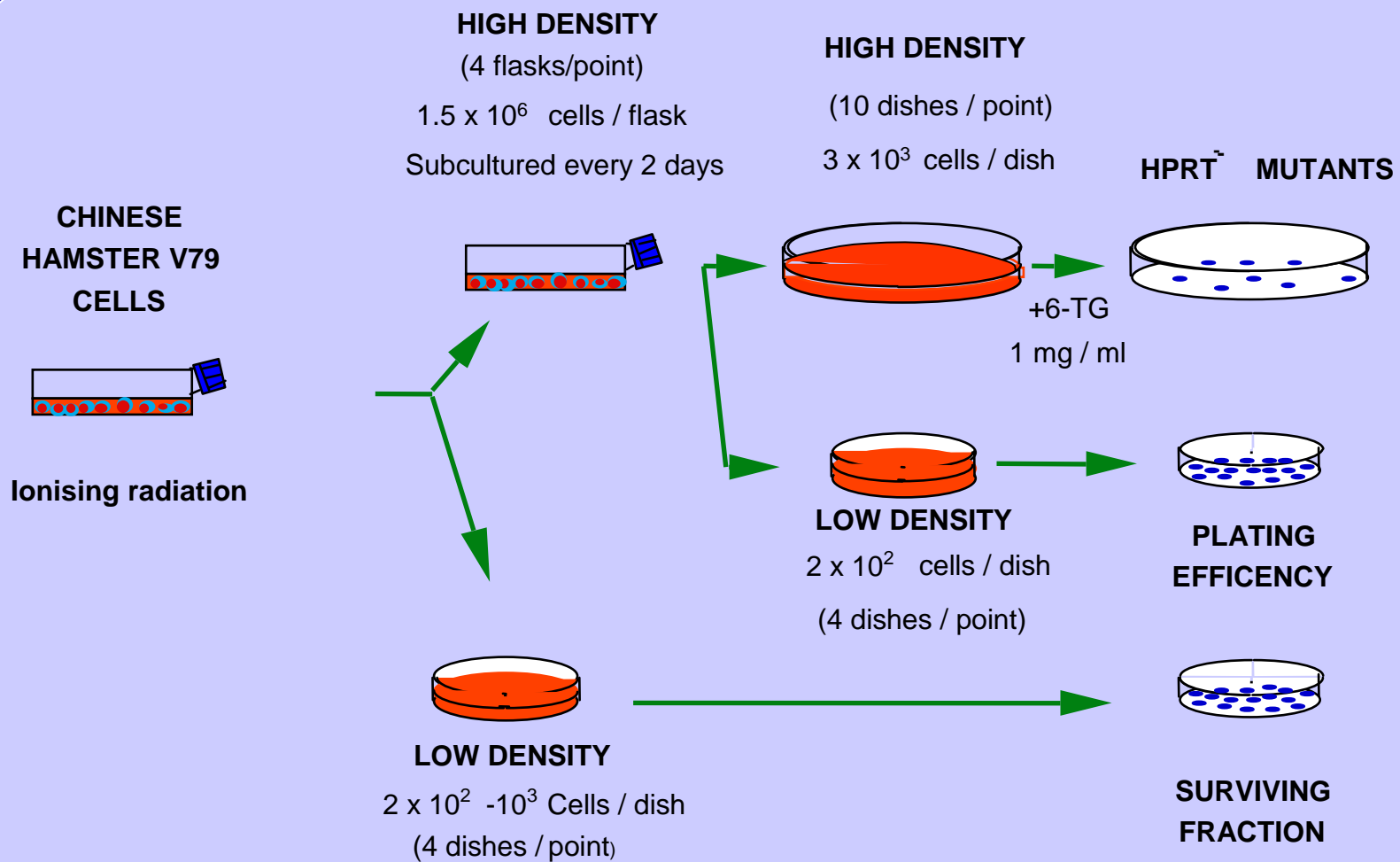
Mutazioni HPRT



La via di reazione tramite hprt è utilizzata estensivamente nell'analisi della mutagenesi, in quanto:

- Il gene ha dimensioni ragionevoli (34 kbp in cellule di hamster)
- i mutanti possono essere facilmente selezionati (le cellule non mutate sono uccise quando esse sono trattate con 6-TG, base analoga alla G e I).
- La struttura del gene (introni/esoni) è ben nota

HPRT mutation test

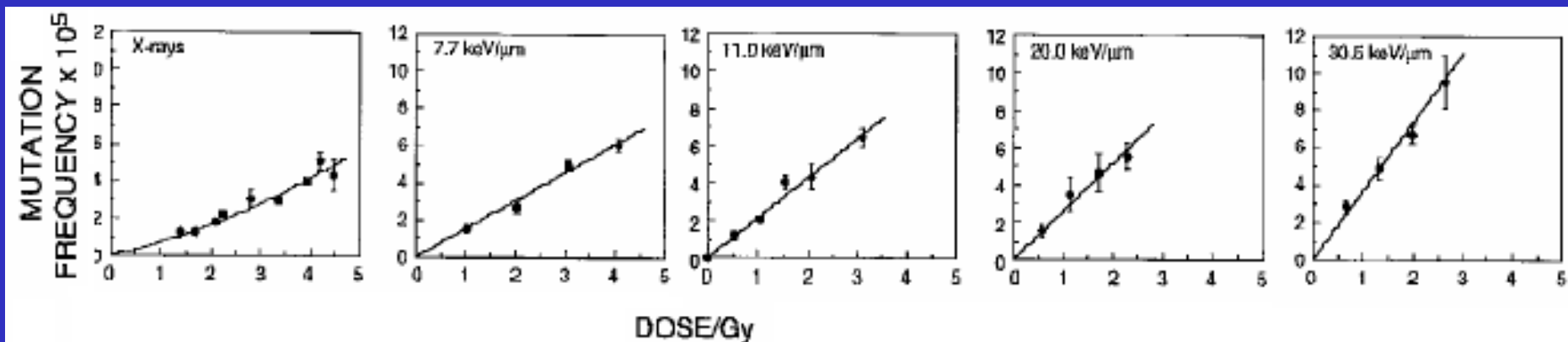


Curve di mutazione (protoni vs raggi X)

$M(D) = n.\text{mutanti}/n.\text{sopravvissuti alla dose } D$

$M_0(D) = n.\text{mutanti}/n.\text{sopravvissuti nel controllo}$

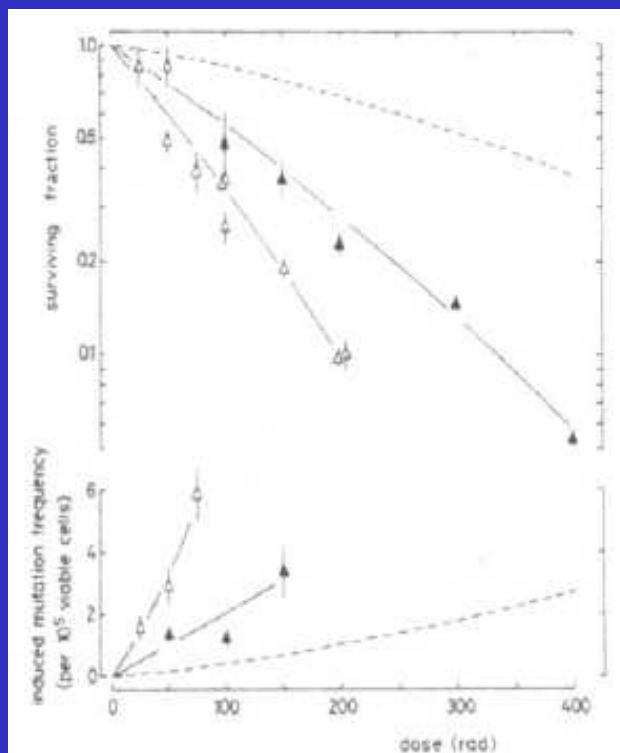
Frequenza di mutazione = $M - M_0$



Curve dose-risposta per l'induzione di mutazioni *hprt* in cellule di hamster cinese V79 irradiate con raggi X e con protoni di vario LET.

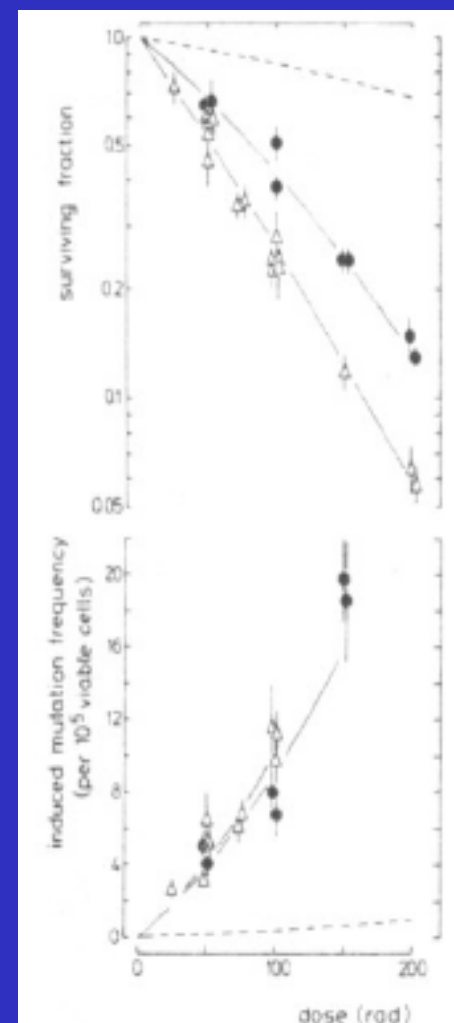
M. Belli et al. Int. J. Radiat. Biol 1998, vol. 74, no. 4, 501,509

Curve di mutazione (ioni vs raggi γ)



Curve dose-risposta per l'induzione di mutazioni *hprt* in cellule di hamster cinese V79 irradiate con raggi γ e ioni elio di 28 e 70 keV/μm (sopra) e ioni elio di 90 keV/μm e ioni boro di 110 keV/μm (a destra).

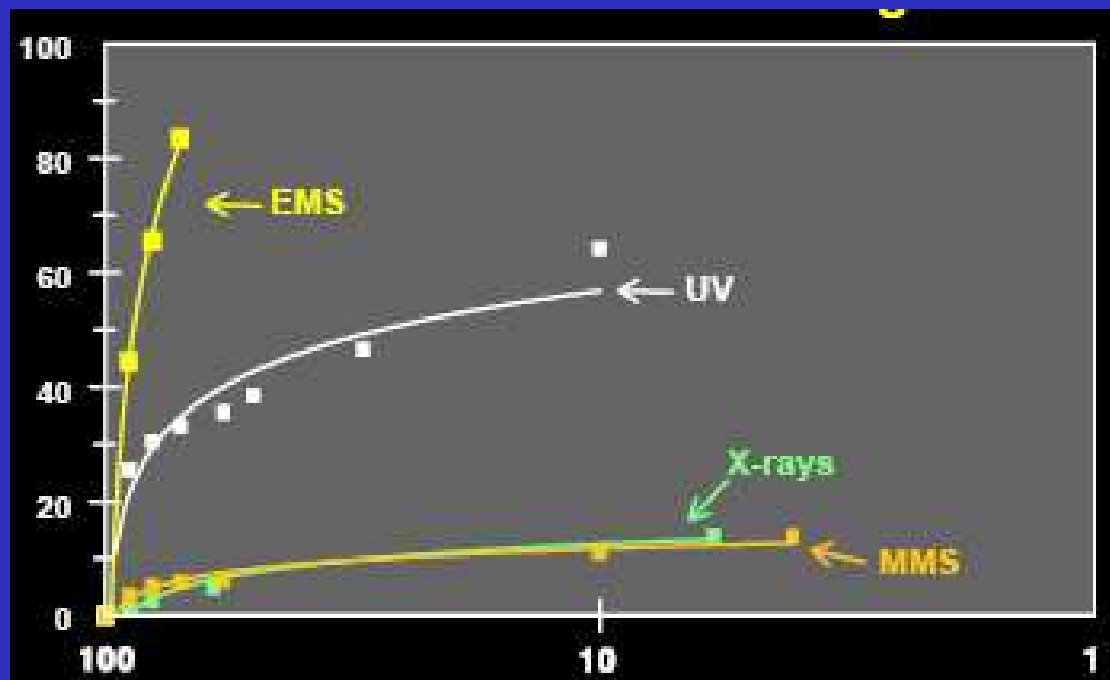
Thacker et al. Int. J. Radiat. Biol 1979



Letalità e mutagenicità

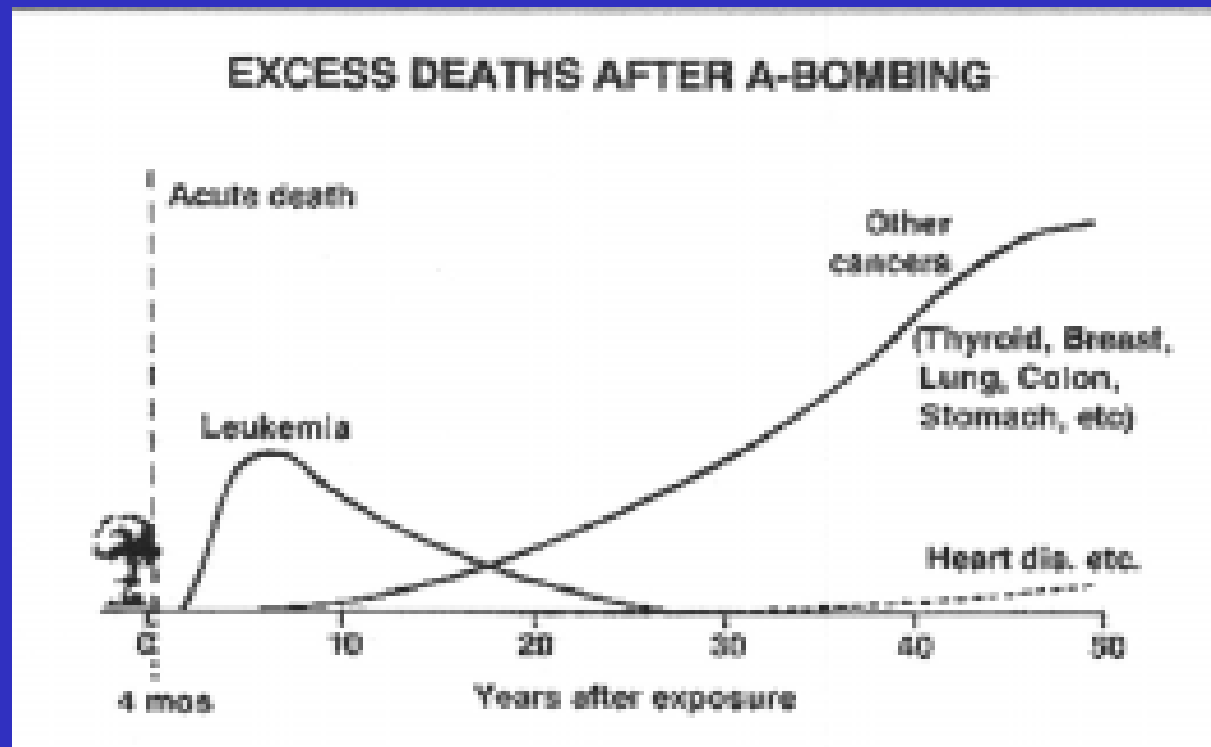
Le radiazioni ionizzante sono un agente meno mutageno delle radiazioni UV (a parità di letalità)

Frequenza di mutazione x 10^6 (in 10^6 cellule)



Percentuale di cellule sopravvissute

Evidenze di cancerogenesi da radiazioni



- H-N survivors
- Ankilosing Spondilites patients
- Thorium injections
- Radium dial painters
- Uranium miners
- Chernobyl accident (thyroid)

La cancerogenesi da RI

E' ampiamente accettata l'idea che i tumori radioindotti (sia quelli solidi che del sistema linfo-emopoietico) siano originati da eventi **mutageni** che avvengono in una **sola cellula** nel tessuto di appartenenza.

Si ritiene che i cloni della cellula iniziata si sviluppino poi con un processo costituito da **vari stadi**, quasi sempre con l'insorgenza di altre mutazioni geniche o cromosomiche, o più raramente con il silenziamento (non conseguente a mutazioni) di geni chiave. In tal modo il tumore aumenta il suo potenziale maligno in termini di capacità proliferativa e soppressione dei normali processi di senescenza cellulari.

Vi sono buone evidenze che l'**interazione** tra cellule tumorogeniche e cellule normali costituisca un elemento critico nello sviluppo dei tumori. Tra questi fenomeni rientra anche l'induzione di disponibilità nutritive del sangue (angiogenesi).

La comunicazione cellulare nella cancerogenesi da RI

In un organismo multicellulare vi sono tre principali processi di comunicazione:

- **Intracellulare** (attraverso secondi messengeri quali calcio, diacilglicerolo, ceramide, NO, c-AMP, ROS, etc.)
- **Intercellulare** (mediata dalle gap junctions)
- **Extracellulare** (attraverso ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori, citochine, etc.)

Alterazioni di tali processi possono causare alterazioni nell'**omeostasi**, con distruzione dei delicati equilibri tra proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi, adattamento. Si ritiene che l'alterazione dell'omeostasi sia alla base della cancerogenesi (*Trosko and Ruch, Frontiers in Bioscience, 1998*).

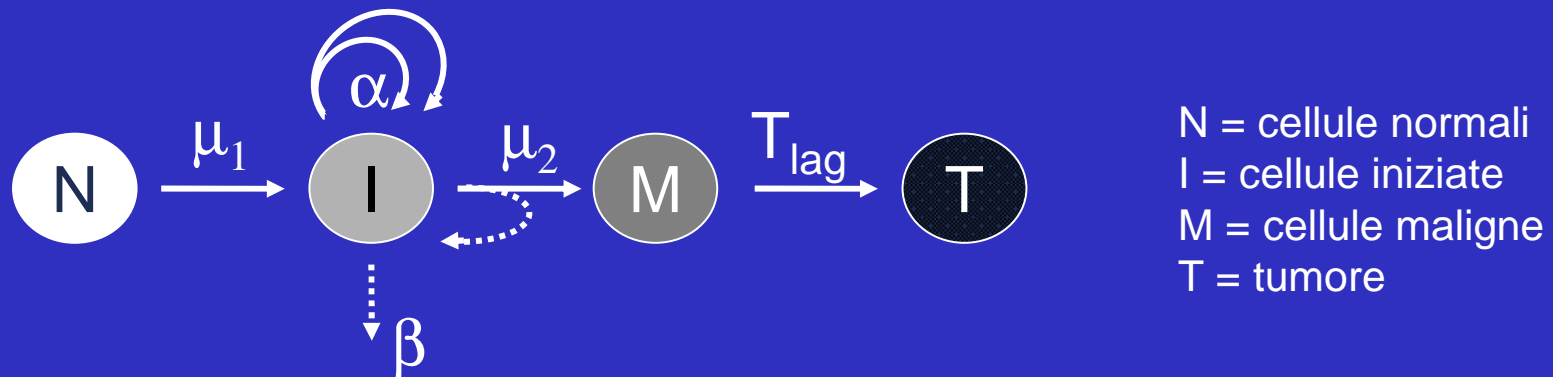
Cancerogenesi da radiazione

Cancerogenesi

Per cancerogenesi s'intende in generale l'insorgenza di neoplasie maligne.

La cancerogenesi è un processo a più stadi. Ciascuno stadio è conseguenza di mutazioni, delezioni o modificazioni genetiche dei regolatori della crescita.

Tali modificazioni possono avvenire spontaneamente oppure per effetto dell'esposizione ad agenti come radiazioni o mutageni chimici.



Modello a due stadi con espansione clonale
(Molgavkar and Venzon, *Math.Biosci.* 1979)

La trasformazione neoplastica *in vitro*

La comprensione della cancerogenesi da radiazione costituisce uno dei problemi centrali della radiobiologia in relazione alla valutazione dei rischi stocastici, ma riveste anche un interesse generale per la possibilità di chiarire i meccanismi fondamentali della cancerogenesi.

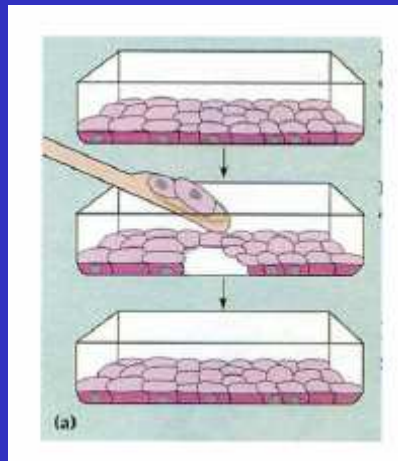
Lo sviluppo di metodi atti a studiare la trasformazione neoplastica in colture cellulari è considerato un importante avanzamento della ricerca, che si affianca agli studi su sistemi più complessi, come gli animali, in genere dispendiosi in termini sia di tempo che di risorse e spesso di difficile interpretazione.

Per questo scopo però non possono essere utilizzate le usuali linee cellulari stabilizzate perchè esse sono già trasformate. Si ricorre allora a cellule ottenute da tessuti espianati di fresco, oppure a speciali linee non trasformate che sono capaci di crescere in coltura. Tra queste ultime la linea che ha ricevuto il maggior consenso è quella denominata C3H10T1/2, derivate da cellule embrionali di hamster e “immortalizzate”, ma non trasformate, in modo da poter crescere per lungo tempo in coltura mostrando inibizione da contatto.

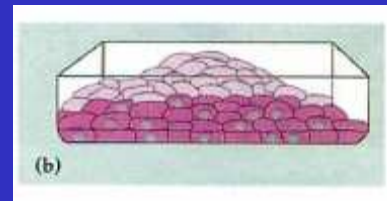
La trasformazione neoplastica *in vitro*

La **trasformazione neoplastica *in vitro*** possiede le caratteristiche salienti della prima fase della **cancerogenesi *in vivo***

La trasformazione consiste essenzialmente nella perdita dell'inibizione da contatto. Le cellule trasformate sono in grado di crescere l'una sull'altra senza limite. Queste cellule formano tumori se iniettate nel topo.



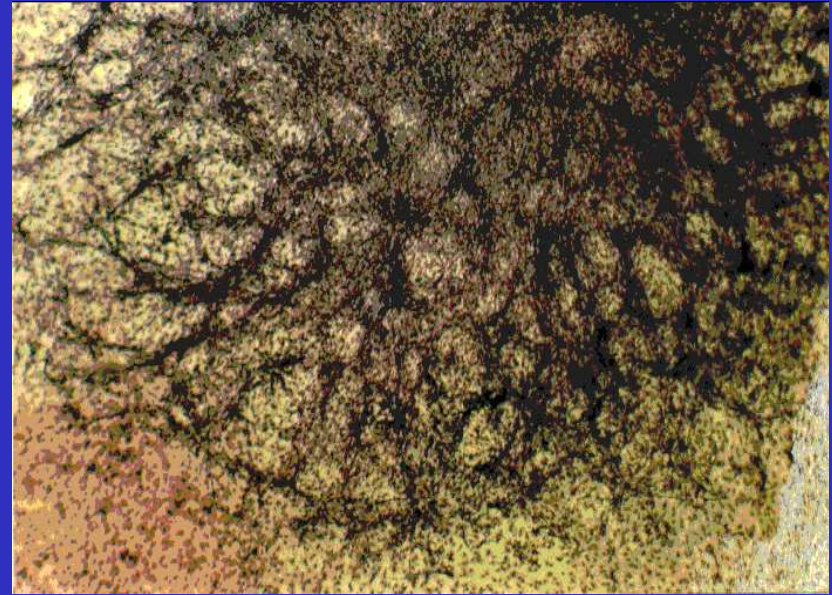
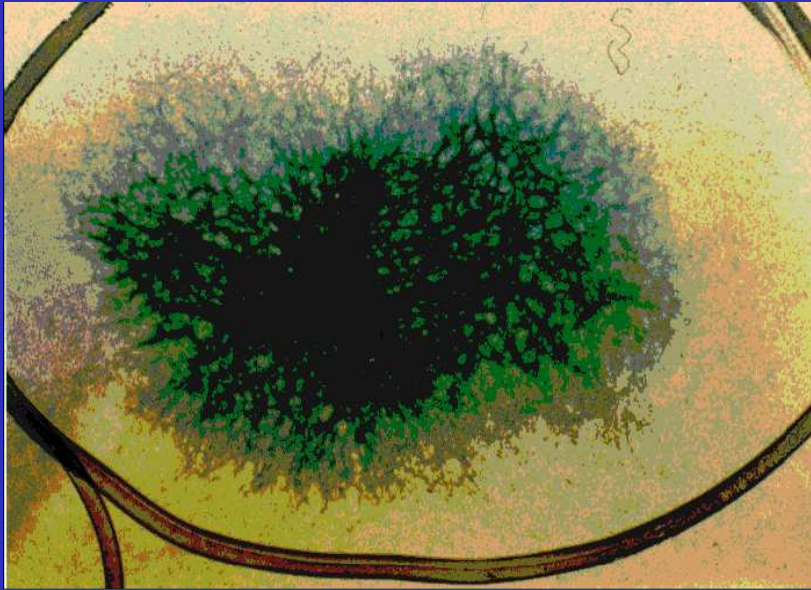
Le cellule normali mostrano
inibizione da contatto



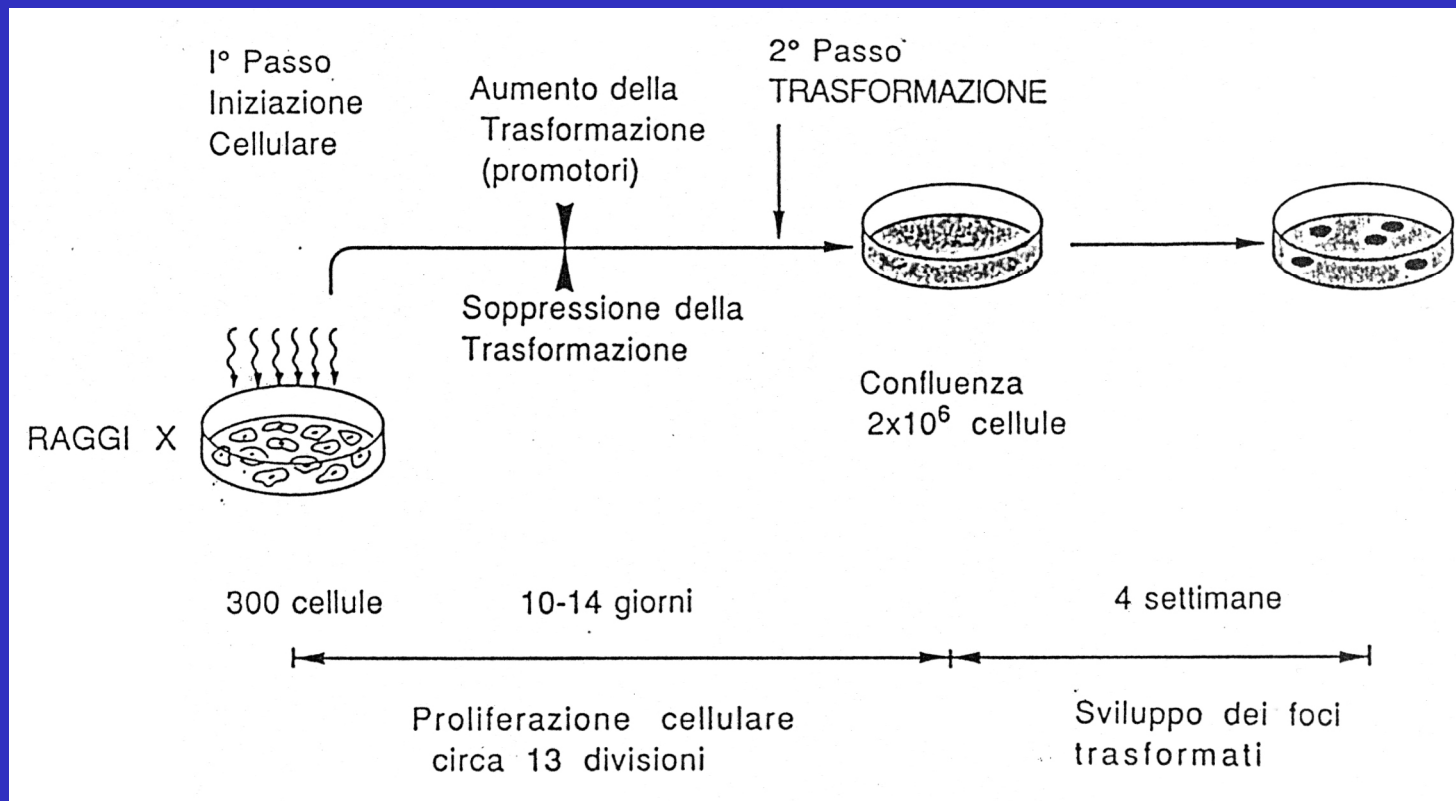
Le cellule trasformate crescono
senza inibizione

(Campbell 1997)

Foci di trasformazione

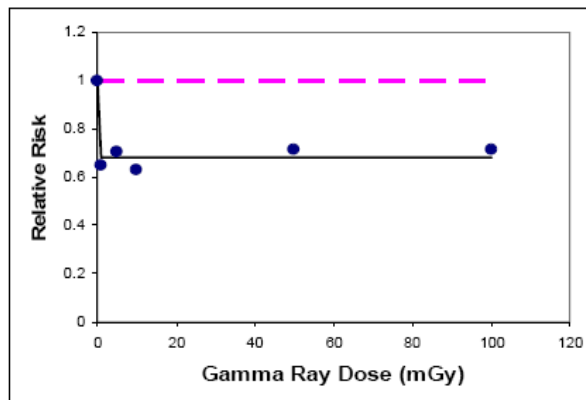


Test di trasformazione



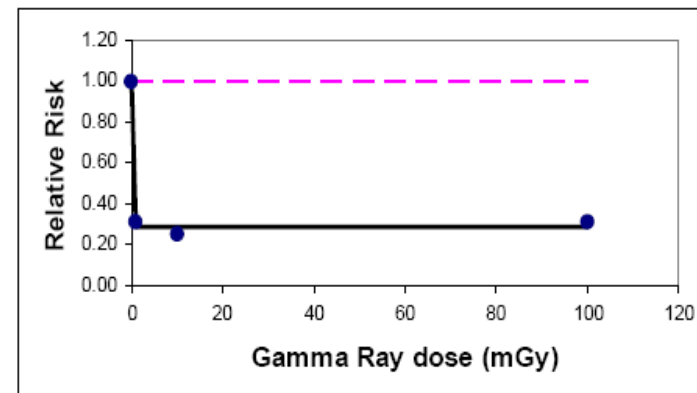
Trasformazione (1)

Neoplastic Transformation:
HeLa x Skin Fibroblast Human Hybrid Cells
(Redpath et al., 2001)



Note: strong evidence against LNT model.

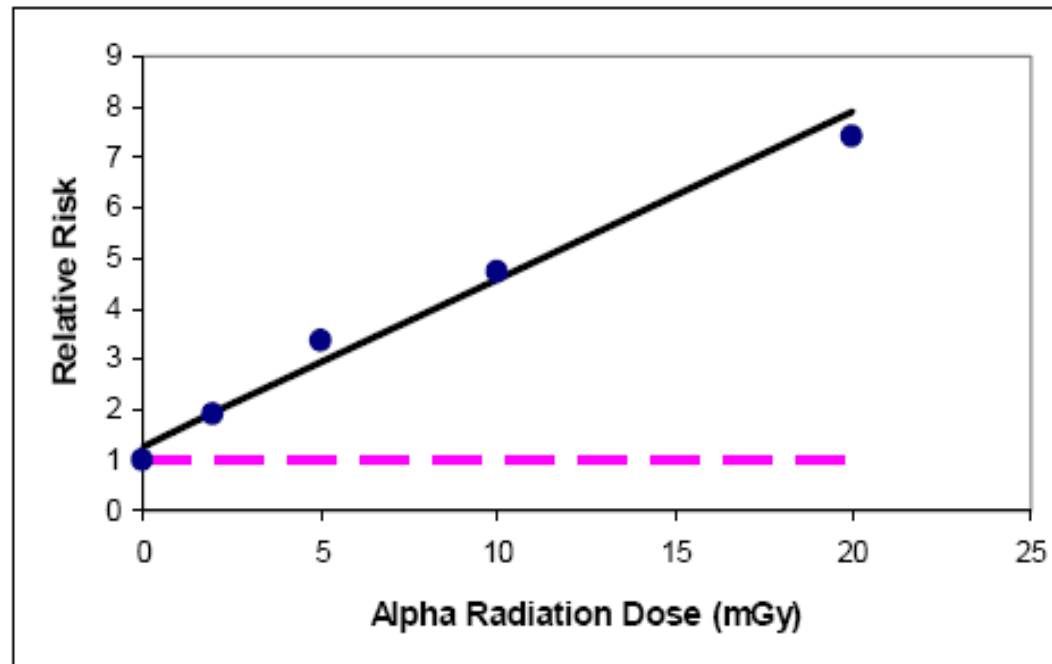
Neoplastic Transformation:
C3H 10T1/2 Cells (Azzam et al., 1996)



Note: strong evidence against LNT model.

Trasformazione (2)

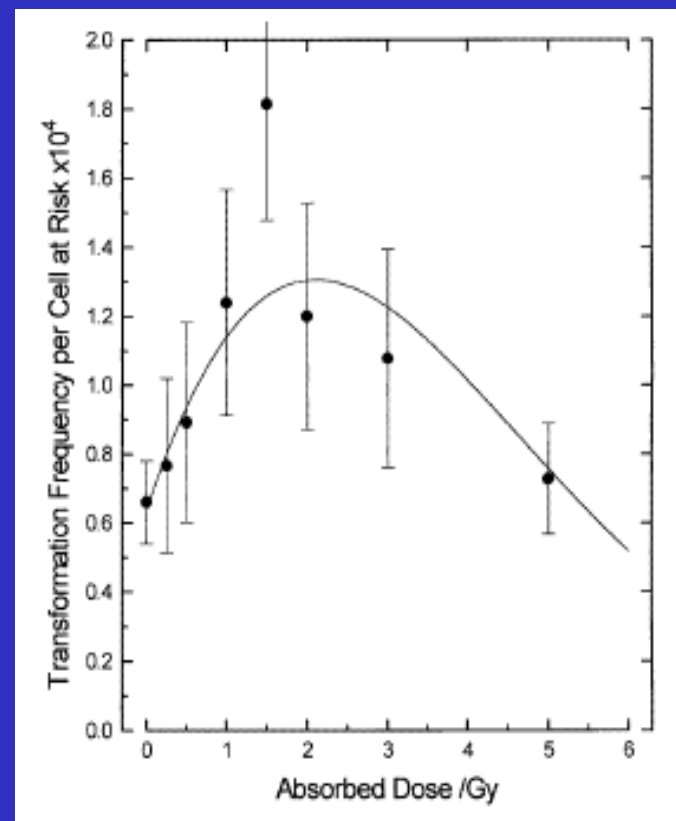
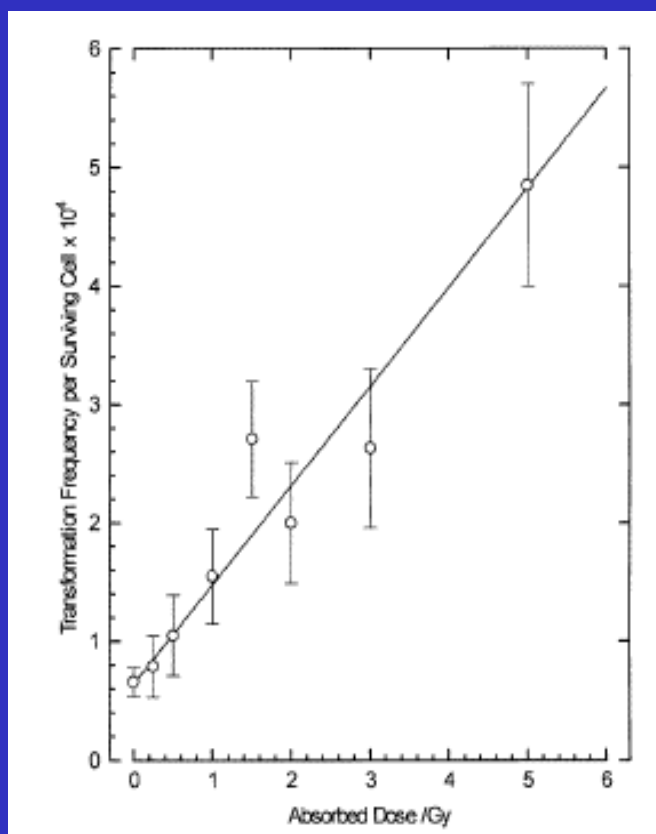
Neoplastic Transformation: C3H 10T1/2 Cells (Bettega et al., 1992)



Note: Only high-LET data consistent with LNT model for doses < 100 mGy.

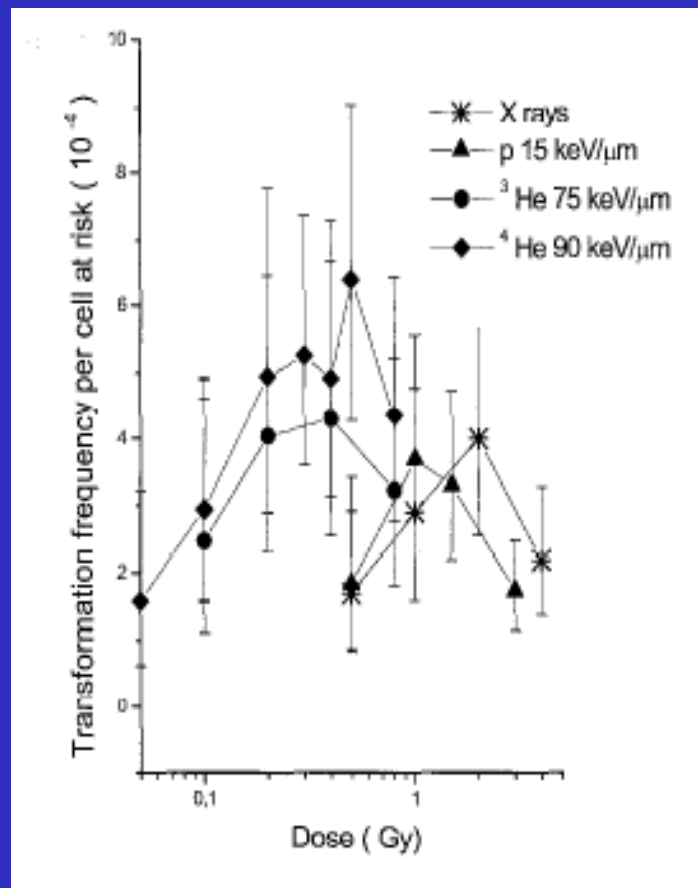
Trasformazione (3)

Transformation of C3H10T12 cells by low doses of ionising radiation: a collaborative study by six European laboratories strongly supporting a linear dose-response relationship
(*Mill et al J. Radiol. Prot. 1998*)



Trasformazione (4)

Transformation frequency per cell at risk vs dose for C3H 10T1/2 cells exposed to various radiations
(Bettega, Radioth. Oncol. 2004)



Rappresentatività dei test di trasformazione

- I test di trasformazione su sistemi cellulari in vitro sono stati ritenuti utili per la comprensione dei meccanismi di cancerogenesi da radiazione, soprattutto alle basse dosi dove i dati epidemiologici non sono conclusivi.
- Tuttavia la loro rappresentatività per l'organismo umano è fortemente discussa ed inoltre i test risultano fortemente variabili e laboratorio-dipendenti.