



DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA
EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA
XXVI Ciclo**

**VALUTAZIONE DEL RISCHIO DA ESPOSIZIONE A
RADIAZIONI IONIZZANTI: STUDIO DELLA
TRASMISSIONE EREDITARIA DI AUMENTATA
SUSCETTIBILITA' AL CANCRO IN UN MODELLO MURINO
SENSIBILE**

(BIO/18)

Dottoranda: Lorena Paris

Tutor ENEA: Dott.ssa Francesca Pacchierotti

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi

Tutor Tuscia: Dott.ssa Roberta Meschini

16/05/2014

INDICE

ABSTRACT	4
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	8
1.1 Effetti genetici delle radiazioni ionizzanti nel sistema germinale maschile	8
1.1.1 La spermatogenesi	8
1.1.2 Effetti genetici delle radiazioni	11
1.1.3 Le stime di rischio genetico	13
1.2 Effetti indiretti delle radiazioni ionizzanti	14
1.2.1 Effetto bystander	15
1.2.2 Risposta adattativa	18
1.2.3 Instabilità genomica	20
1.3 Eccezioni all'ereditarietà Mendeliana: meccanismi epigenetici di ereditarietà	23
1.4 Influenze ambientali sull'ereditarietà epigenetica	28
1.5 Cancerogenesi transgenerazionale	34
1.5.1 Studi sperimentali	34
1.5.2 Osservazioni epidemiologiche	35
1.6 Ruolo del gene <i>Patched1</i> nella modulazione della suscettibilità allo sviluppo tumorale spontanea e radio-indotta: i topi <i>Ptch</i> ^{+/-} come modello per studi di cancerogenesi sperimentale	37
CAPITOLO 2 SCOPO DEL LAVORO	43
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI	46
3.1 Disegno sperimentale	46
3.2 Animali	47
3.3 Genotipizzazione	47
3.4 Trattamenti con i raggi X	50
3.5 Studio dell'insorgenza tumorale	50
3.6 Studio delle lesioni preneoplastiche	51
3.7 Immunomarcatura delle sezioni di cervelletto	52
3.8 Analisi istologica del differenziamento dello strato granulare esterno del cervelletto	53

3.9	Analisi della LOH al locus <i>Ptch1</i>	53
3.10	Test della cometa per la valutazione del danno negli spermatozoi dei topi P e nelle cellule del cervelletto, del midollo osseo e della milza della generazione F1	55
3.11	Test del micronucleo nel midollo osseo di topi F1 adulti	56
3.12	Analisi statistica	57
	CAPITOLO 4 RISULTATI	58
4.1	Cancerogenesi transgenerazionale	58
4.1.1	Studio di cancerogenesi transgenerazionale	58
4.1.2	Meccanismi (epi)genetici di inattivazione dell'allele <i>Ptch1</i> selvatico	59
4.1.3	Analisi di induzione e riparazione del danno al DNA in cellule di cervelletto dei topi F1	60
4.1.4	Formazione e progressione delle lesioni preneoplastiche (PNLs)	61
4.1.5	Analisi immunoistochimica delle piccole PNLs	63
4.1.6	Spessore dello strato granulare esterno (EGL)	64
4.2	Effetti delle radiazioni nelle cellule germinali dei topi P irraggiati	65
4.3	Instabilità genomica in tessuti non suscettibili ai tumori dei topi F1	66
	CAPITOLO 5 DISCUSSIONE	69
	RINGRAZIAMENTI	76
	BIBLIOGRAFIA	77
	PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE E PRESENTAZIONI A CONGRESSI	88

ABSTRACT

Risk assessment of ionising radiation exposure: a study on transgenerational enhancement of cancer susceptibility in a sensitive mouse model

Recently, new evidence has been obtained on untargeted and delayed effects of ionising radiation. They include genomic instability in the daughters of irradiated cells and changes in non-irradiated cells as a result of signals from irradiated cells. These results have given impulse to reconsider the hypothesis of radiation-induced transgenerational carcinogenesis. According to this hypothesis, the offspring of irradiated parents (particularly fathers) could have an increased cancer susceptibility. So far, conflicting results on this issue have been collected by experiments in rodents and human epidemiological studies. When a phenotype of cancer susceptibility was shown, the frequency of affected offspring was not compatible with radiation-induced mutation rates, but alternative mechanisms were not demonstrated. With advances in therapy, a high percentage of young adults diagnosed with cancer can expect to be long term survivors and ask for genetic counselling. Because of the limited statistical power of human epidemiological studies, experiments with well characterised, highly sensitive mouse models are necessary to obtain the data to assess cancer risk in the progeny of irradiated fathers.

Here we report a study aimed at rigorously testing the hypothesis of transgenerational carcinogenesis in *Ptch1* heterozygous knockout mice, characterised by high radiation sensitivity and tumour predisposition, particularly in the brain, skin and soft tissues. To test the hypothesis of transgenerational carcinogenesis induced by irradiation of differentiating spermatogonia, *Ptch1* wild type mice were irradiated with 1 Gy X-rays and mated 42 days later with unirradiated *Ptch1*^{+/-} females. Their *Ptch1*^{+/-} progeny was tested for the spontaneous incidence of medulloblastoma and for the incidence of tumors induced by irradiation (1 Gy) at postnatal day 2, a well-characterized window of cerebellum radiation sensitivity.

In addition to the transgenerational carcinogenicity study, radiation effects in the sperm of P irradiated mice were assessed by the application of comet assay. No difference was shown on the sperm DNA damage level between irradiated and unirradiated mice, showing that sperm descendant from irradiated spermatogonia did not transmit unstable DNA lesions to the next generation.

In comparison to the spontaneous and radiation-induced tumour incidence in control groups of mice born from unirradiated fathers, we showed a borderline significant increase of tumours induced by neonatal irradiation in the progeny of irradiated fathers, whereas the spontaneous tumour incidence was unaffected by paternal irradiation. By comet test we excluded that cerebellar cells of the offspring of irradiated fathers suffered more radiation-induced DNA damage or were impaired in DNA repair. Similarly, no evidence of spontaneous or radiation induced transgenerational genomic instability was shown by comet and micronucleus tests in bone marrow and spleen cells of the adult F1 progeny of irradiated mice.

By LOH analysis of all tumours, we ruled out epigenetic inactivation of the *Ptch1* wild type allele as a driver of the increased tumour incidence in the progeny of irradiated fathers.

Finally, we demonstrated a switch between proliferating/differentiating pathways in the preneoplastic lesions of the offspring of irradiated fathers. This suggested that the paternal irradiation legacy consisted in an epigenetically modulated shift of gene expression promoting proliferation of the external granular layer of neonatal cerebellum, which could make it more sensitive to radiation-induced carcinogenicity. Studies are in progress to characterize the molecular messenger of epigenetic inheritance in sperm of irradiated fathers.

Valutazione del rischio da esposizione a radiazioni ionizzanti: studio della trasmissione ereditaria di aumentata suscettibilità al cancro in un modello murino sensibile

Recentemente, sono state ottenute nuove dimostrazioni a favore degli effetti non-target e a lungo termine delle radiazioni ionizzanti; tali effetti includono l'instabilità genomica nelle cellule discendenti da cellule irraggiate, come anche cambiamenti in cellule non irraggiate in seguito ad una segnalazione da parte di cellule irraggiate. Queste osservazioni hanno permesso di riconsiderare l'ipotesi della cancerogenesi transgenerazionale radio-indotta. Secondo tale ipotesi, la progenie di genitori irraggiati (in particolare i padri) potrebbe avere un'aumentata suscettibilità al cancro. Finora, in tale ambito, sono disponibili dati contrastanti provenienti da esperimenti con animali e da studi epidemiologici umani. Quando si manifesta un'aumentata suscettibilità allo sviluppo tumorale la frequenza di progenie affetta non è confrontabile con i tassi di mutazione radio-indotti, ma dei meccanismi alternativi per spiegare tale fenomeno non sono ancora stati chiariti. Con il progresso nelle terapie anti-cancro, un'alta percentuale di individui può avere aspettative di vita maggiori e chiedere una

consulenza genetica. A causa del limitato potere statistico degli studi epidemiologici umani, si rendono necessari esperimenti con modelli murini altamente sensibili e ben caratterizzati al fine di ottenere dati che possano contribuire ad una stima di rischio nella progenie di padri irraggiati.

In questo progetto di dottorato è stato condotto uno studio mirato a validare l'ipotesi di cancerogenesi transgenerazionale in topi mutanti per il gene *Ptch1*, caratterizzati da un'elevata radio-sensibilità e da una predisposizione allo sviluppo tumorale (in particolare nel cervelletto, nella pelle e nel muscolo scheletrico). Al fine di verificare l'ipotesi che la cancerogenesi transgenerazionale possa essere indotta dall'irraggiamento degli spermatogoni in differenziamento, topi maschi wild type sono stati irraggiati con 1 Gy di raggi X, 42 giorni prima dell'accoppiamento con femmine *Ptch1*^{+/-} non irraggiate. La loro progenie *Ptch1*^{+/-} è stata oggetto di studio ai fini della valutazione dell'incidenza spontanea e radio-indotta (1 Gy di raggi X) di medulloblastoma. L'irraggiamento della progenie è stato effettuato a 2 giorni di vita, poiché tale periodo rappresenta una ben caratterizzata finestra temporale di radio-sensibilità nel cervelletto. Oltre allo studio di cancerogenesi transgenerazionale, sono stati valutati, con il test della cometa, gli effetti delle radiazioni negli spermatozoi dei topi parentali (P) irraggiati. Non sono state rilevate differenze nei livelli di danno al DNA tra topi P irraggiati e non irraggiati, suggerendo che gli spermatozoi discendenti dagli spermatogoni irraggiati non trasmettono danni al DNA alle generazioni successive.

L'incidenza tumorale è stata confrontata con le incidenze spontanee e radio-indotte nella progenie di padri non irraggiati. E' stato osservato un significativo aumento (borderline) dell'incidenza di medulloblastoma indotto dall'irraggiamento neonatale nella progenie di padri irraggiati, mentre l'incidenza tumorale spontanea non è influenzata dall'irraggiamento paterno. L'analisi effettuata con il test della cometa ha dimostrato che le cellule di cervelletto della progenie di padri irraggiati non manifestano un danno al DNA maggiore o una minore efficienza dei sistemi di riparazione rispetto alla progenie di padri non irraggiati. Analogamente, effettuando test della cometa e del micronucleo, non sono stati riscontrati eventi di instabilità genomica transgenerazionale spontanea o radio-indotta in cellule di midollo osseo e milza della progenie F1 adulta.

Inoltre, mediante l'analisi LOH di tutti i tumori, è stato possibile escludere un meccanismo epigenetico di inattivazione dell'allele *Ptch1* wild type come causa dell'aumentata incidenza tumorale nella progenie di padri irraggiati. Infine, è stata dimostrata un'alterazione nell'equilibrio del pathway di proliferazione/differenziamento nelle lesioni preneoplastiche della progenie di padri irraggiati. Tale evidenza suggerisce che l'eredità dell'irraggiamento

paterno potrebbe consistere in una variazione, modulata epigeneticamente, dell'espressione di geni che promuovono la proliferazione dello strato granulare esterno del cervelletto neonatale rendendolo più sensibile alla cancerogenesi radio-indotta.

Sono stati programmati studi volti a caratterizzare i messaggeri molecolari dell'ereditarietà epigenetica negli spermatozoi dei padri irraggiati.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 EFFETTI GENETICI DELLE RADIAZIONI IONIZZANTI NEL SISTEMA GERMINALE MASCHILE

1.1.1 La spermatogenesi

Le cellule germinali sono presenti nei tubuli seminiferi compresi all'interno del testicolo nei diversi stadi del loro processo differenziativo, dallo spermatogonio allo spermatoide maturo. La spermatogenesi nei mammiferi dura molte settimane e si completa con un'ultima fase di differenziamento all'interno dell'epididimo. L'intero processo può essere suddiviso in tre fasi: la fase mitotica, che comprende la moltiplicazione per mitosi e la maturazione degli spermatogoni; la fase meiotica, che interessa gli spermatociti primari e secondari e comprende le due divisioni meiotiche che terminano con la produzione degli spermatidi aploidi; la spermiogenesi, che riguarda la trasformazione degli spermatidi in spermatozoi e si svolge in parte all'interno dei tubuli seminiferi ed in parte nell'epididimo (Figura 1). Le cellule germinali sono distribuite dalla periferia al centro del tubulo: alla periferia sono presenti gli spermatogoni che poggiano sulla membrana basale; seguono, verso il centro, una o due generazioni di spermatociti e una o due generazioni di spermatidi (Adamo et al., 2002). Gli spermatogoni staminali sono sempre presenti; nel topo, la fase di proliferazione mitotica e differenziamento compresa tra gli spermatogoni staminali e gli spermatociti dura circa 17 giorni; la profase meiotica dura circa 14 giorni; il differenziamento degli spermatidi in spermatozoi avviene in circa 14 giorni nei tubuli del testicolo ed ulteriori 7 giorni nell'epididimo. La durata totale del processo di spermatogenesi (compresa la maturazione finale nell'epididimo) corrisponde a 52 giorni nel topo (e 72-81 giorni nell'uomo) (Adler, 1996). Il ciclo dell'epitelio seminifero consiste in una completa serie di cambiamenti nelle associazioni cellulari che si susseguono lungo l'asse maggiore di ogni tubulo seminifero. Col progredire del differenziamento le cellule germinali sono sospinte verso il lume del tubulo e contemporaneamente progrediscono lungo l'asse longitudinale. Questo processo determina una serie di caratteristiche associazioni cellulari riconoscibili nelle sezioni istologiche trasversali dei tubuli seminiferi. I singoli tipi cellulari sono riconoscibili in base alle

dimensioni e alla morfologia nucleare. Ciascuna associazione è stata numerata in base allo stadio differenziativo degli spermatidi in esso riconoscibile, da 1 a 16 nel topo. Alterazioni nei pattern di associazioni cellulari codificate sono utilizzate per valutare la tossicità riproduttiva di un trattamento sperimentale in relazione all'intervallo di tempo intercorso tra esposizione ed osservazione.

Mouse spermatogenesis

Stage			Days
SPERMATOGONIA	Stem Cells	A0	52
			51
			50
			49
			48
		A-pair	47
			46
	Differentiated	A-chains	45
			44
			43
		A1	42
		A2	41
		A3	40
SPERMATOCYTES	Preleptotene Leptotene Zigotene		39
			38
			37
			36
			35
			34
			33
	Pachytene		32
			31
			30
			29
			28
			27
			26
SPERMATIDES	Diplotene Diakinesis		25
			24
			23
			22
			21
			20
			19
	I II III IV V VI VII VIII IX X XI XII XIII XIV XV XVI		18
			17
			16
			15
			14
			13
			12
SPERM	In Epididymis		11
			10
			9
			8
			7
			6
			5
			4
			3
			2
			1

Figura 1: Fasi successive del differenziamento che avvengono durante la spermatogenesi. La colonna di destra indica il numero di giorni che intercorre tra un determinato stadio e la maturazione completa dello spermatozoo.

Spermatogoni staminali: sono attaccati alla membrana basale del tubulo.

Spermatogoni differenziati: A1; hanno nucleo denso, omogeneo e allungato; spesso è presente il nucleolo A2; hanno le stesse dimensioni di quello di cui sopra ma hanno un nucleo più chiaro, granulato con presenza di nucleolo

Intermedi; possono essere più larghi degli spermatogoni di tipo A con nucleo di forma ovale o circolare
B; hanno nucleo ovale o circolare e cromatina molto densa

Spermatociti:

Leptotene; segna l'inizio della profase della I divisione meiotica; nel nucleo si possono osservare masse discrete di cromatina

Zigotene; il nucleo diventa più largo, ma non si apprezzano variazioni strutturali rilevanti rispetto allo stadio precedente

Pachitene; il nucleo diventa ancora più largo. All'inizio del pachitene, la dispersione dei cromosomi facilita la distinzione di questo stadio rispetto ai precedenti; verso la fine di questo stadio il nucleo raggiunge le sue massime dimensioni. E' talvolta possibile distinguere singoli bivalenti

Diploiene; non si verificano cambiamenti nella dimensione del nucleo e molto spesso è difficile una distinzione con il tardo pachitene

Diacinesi; anche questo stadio è difficilmente distinguibile dal tardo pachitene e dal diplotene

Metafase I; i cromosomi si muovono verso il piano equatoriale e formano dei densi aggregati; il nucleo mantiene approssimativamente la sua forma

Anafase, telofase, intercinesi e profase II; sono stadi di breve durata che non possono essere separati a partire dai preparati citogenetici

Metafase II; simile alla metafase I in cui i cromosomi sono localizzati sul piano equatoriale all'interno di un nucleo chiaro e vescicolare

Anafase e telofase; questi stadi non possono essere visualizzati a causa della loro breve durata

Spermatidi; possono essere distinte quattro fasi dello sviluppo degli spermatidi seguendo i cambiamenti nel nucleo: fase Golgi, fase di incappucciamento, fase di formazione dell'acrosoma, fase di maturazione.

Spermatozoi; immediatamente rilasciati nel lume del tubulo e trasportati nell'epididimo dove completano la maturazione

1.1.2 Effetti genetici delle radiazioni

Per effetti genetici delle radiazioni ionizzanti si intendono quelle modificazioni genetiche indotte nelle cellule germinali di un individuo, che vengono trasmesse alle generazioni successive.

Dopo la Seconda Guerra Mondiale la Commissione per l'Energia Atomica si pose il problema di quale fosse il rischio genetico per i mammiferi esposti a radiazioni ionizzanti. A tale scopo furono intrapresi studi sperimentali, dove come organismo modello venne scelto il topo ed il progetto fu denominato "Megamouse Project" poiché prevedeva l'impiego di un'ingente quantità di animali. L'obiettivo della ricerca era quello di studiare, in differenti condizioni di irraggiamento, la frequenza di mutazioni locus specifiche per sette loci; i risultati ottenuti sono ancora oggi la base scientifica per la valutazione del rischio genetico. I dati più significativi sono i seguenti:

- la radiosensibilità dei geni rispetto a una mutazione è estremamente variabile e pertanto è più corretto parlare di incremento medio di mutazione;
- la frequenza di mutazione varia a seconda dell'intensità della dose somministrata;
- si manifesta una differente radiosensibilità a seconda delle diverse fasi della spermatogenesi; gli spermatidi, ad esempio, risultano da 3 a 10 volte più sensibili degli spermatogoni, anche perché durante il differenziamento post-meiotico si riduce progressivamente la capacità di riparazione delle lesioni al DNA;
- molte delle mutazioni geniche osservate sono in realtà dovute all'induzione di delezioni, talvolta anche estese oltre il gene di interesse; la percentuale di mutazioni dovute a delezione varia a seconda dello stadio esposto: negli stadi post-meiotici può arrivare ad oltre il 60%.

Uno dei più studiati effetti genetici delle radiazioni ionizzanti è l'induzione di aberrazioni cromosomiche, in particolare di traslocazioni; questo tipo di alterazione strutturale cromosomica può essere associato a difetti nello sviluppo fisico o mentale e ad una mortalità elevata durante lo sviluppo embrionale. Gli studi di radiobiologia sull'induzione di traslocazioni nelle cellule germinali hanno utilizzato come organismi modello la *Drosophila* e il topo. In entrambi gli organismi lo stadio che risulta essere maggiormente sensibile all'induzione di traslocazioni ereditabili è quello degli spermatidi; tuttavia, traslocazioni bilanciate sono state osservate anche negli spermatociti primari discendenti da spermatogoni irraggiati, compresi quelli appartenenti al compartimento staminale, di estrema rilevanza dal punto di vista radioprotezionistico poiché responsabili della produzione di gameti durante tutta la vita fertile. La relazione dose-effetto per radiazioni a basso LET è del tipo lineare-quadratico e di tipo lineare per radiazioni ad alto LET, con un rapporto di efficacia biologica relativa che varia in funzione della dose.

Per valori di dose superiori a 7 Gy di raggi X o 1 Gy di neutroni la relazione dose-effetto per l'induzione di traslocazioni negli spermatogoni di topo si inverte a causa della contemporanea induzione di letalità nelle cellule irraggiate. Esperimenti nel topo hanno dimostrato variazioni di radiosensibilità durante il ciclo cellulare degli spermatogoni; anche i diversi stadi della profase meiotica, dal leptotene al diplotene, sono sensibili all'induzione di riarrangiamenti cromosomici da parte delle radiazioni ionizzanti con variazioni di radiosensibilità tra l'uno e l'altro.

Per quanto riguarda l'induzione di aneuploidie da parte delle radiazioni ionizzanti, i primi studi furono condotti in *Drosophila*. Fu dimostrata una relazione dose-effetto positiva per la

produzione di gameti monosomici o trisomici dopo irraggiamento di vari stadi del processo di maturazione delle cellule germinali; sembra che il fenomeno rappresenti una conseguenza di un evento iniziale di rottura e scambio cromatidico di cromosomi non omologhi e che pertanto sia riconducibile ad un effetto clastogeno primario delle radiazioni ionizzanti.

Un altro effetto mutageno causato dalle radiazioni ionizzanti riguarda l'instabilità meiotica delle sequenze di DNA minisatellite, le quali consistono di sequenze di 6-24 coppie di basi ripetute migliaia di volte e localizzate in loci specifici del genoma umano e di altri mammiferi. Variazioni ereditarie del numero di ripetizioni ad uno specifico locus sono state osservate nel topo con una frequenza circa 1000 volte superiore alla frequenza spontanea di mutazione nei geni codificanti per le proteine. Il meccanismo di mutazione sembra essere legato a fenomeni meiotici di crossing-over ineguale e di conversione genica a livello di sequenze vicine al DNA satellite, che costituiscono degli *hot spot* di ricombinazione, cioè siti in cui la ricombinazione meiotica è frequente. Studi condotti nel topo hanno dimostrato che effettivamente la frequenza di mutazione del DNA minisatellite è aumentata in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti; tale effetto si manifesta quando si irradiano cellule germinali allo stadio di spermatogonio, anche se non si può escludere che la mutazione possa insorgere durante la successiva fase di ricombinazione meiotica.

Nell'uomo si è osservato un raddoppiamento della frequenza di mutazione in vari loci di DNA minisatellite nei figli di coppie esposte a contaminazione interna da radionuclidi in seguito all'incidente della centrale nucleare di Chernobyl e questo rappresenta l'unico dato che evidenzia un effetto genetico radio-indotto in popolazioni umane (Migliore, 2004).

1.1.3 Le stime di rischio genetico

I dati ottenuti sulla frequenza di mutazione pervenuti dal "Megamouse Project" sono stati presi in considerazione per stimare il rischio genetico, con il quale si intende l'aumento della frequenza di mutazioni nella linea germinale rispetto alla frequenza spontanea per locus per generazione. Uno dei parametri usati per questa stima è la dose di raddoppio, che consiste nella dose di radiazione necessaria per avere una frequenza di mutazione doppia rispetto a quella spontanea; per l'uomo questo valore è stato stimato con un ampio margine di incertezza tra 0,2-2 Gy.

Le popolazioni umane più studiate sono quelle dei sopravvissuti all'esplosione della bomba atomica e sono stati considerati i seguenti parametri: aborti e malformazioni congenite, morte nei primi anni di vita, anomalie dei cromosomi sessuali, varianti elettroforetiche di proteine.

L'analisi della prima generazione non ha mostrato differenze significative tra il gruppo di controllo e quello degli esposti, ma bisogna considerare il fatto che le mutazioni recessive si manifestano anche dopo molte generazioni (Migliore, 2004).

Nel 1990 la Commissione Internazionale di Radioprotezione (ICRP) ha stabilito una stima di rischio pari a 10^{-2} Sv^{-1} per tutte le generazioni.

Nonostante non ci siano dati consistenti sull'uomo non vi è motivo di credere che i risultati ottenuti per il topo non siano validi anche per l'uomo.

1.2 EFFETTI INDIRETTI DELLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Il paradigma centrale della radiogenetica classica si basa sull'induzione di modificazioni delle basi e rotture a singolo o doppio filamento a seguito della ionizzazione di atomi delle molecole d'acqua o del DNA contenuto nel nucleo direttamente attraversato dalla radiazione. Tale modello prevede che il danno primario radio-indotto nel DNA sia distribuito in maniera casuale e porti, nell'arco di un breve intervallo di tempo a partire dall'esposizione, alla riparazione delle lesioni o alla loro trasformazione in mutazioni geniche o aberrazioni cromosomiche. Inoltre, secondo tale modello, esiste una dipendenza lineare della frequenza di mutazioni dalla dose di radiazione somministrata. Nel 1992 tale paradigma centrale della radiobiologia fu contestato a seguito della scoperta di un effetto indiretto della radiazione ionizzante, consistente nell'induzione di cambiamenti genetici in cellule il cui nucleo non era stato effettivamente attraversato dalle tracce di ionizzazione emesse da particelle α (Nagasawa and Little, 1992). La scoperta di tali effetti, anche definiti "non-targeted", ha portato ad ipotizzare un nuovo modello di interazione tra le radiazioni ionizzanti e le cellule esposte. In base a tale modello, le radiazioni ionizzanti possono indurre eventi mutazionali anche in cellule di tessuti o organi distanti da quelli direttamente esposti tramite sistemi di comunicazione cellulare (effetto bystander). Inoltre, le cellule irraggiate possono mantenere una memoria di un iniziale irraggiamento a basse dosi e rispondere in modo più efficace ad una dose successiva potenzialmente letale, instaurando un sistema di radioprotezione, definito risposta adattativa. Infine, una memoria dell'irraggiamento può essere mantenuta nella progenie di cellule irraggiate sotto forma di un aumento del tasso spontaneo di "instabilità genomica", a livello genico e cromosomico. Un caso particolare di instabilità genomica radio-indotta può essere considerato quello eventualmente manifestato dalla progenie di soggetti irraggiati, non riconciliabile con la trasmissione mendeliana di mutazioni germinali (effetto

transgenerazionale). Le manifestazioni di tali effetti non-targeted sono state ampiamente descritte, anche se i meccanismi molecolari alla base di tali fenomeni non sono ben chiari. Negli ultimi anni, forti evidenze sono a favore del coinvolgimento di meccanismi basati su modificazioni ereditabili di espressione genica non dovute a variazioni della struttura primaria, cioè della sequenza del DNA, ma a cambiamenti nella metilazione delle basi, nell'espressione di RNA non codificanti o nella struttura della cromatina (meccanismi epigenetici) (Ilnytsky and Kovalchuk, 2011).

Un'esposizione esaustiva delle evidenze in merito agli effetti indiretti delle radiazioni ionizzanti va oltre gli scopi e i limiti della presente tesi. Tuttavia, a titolo esplicativo, nel seguito di questo capitolo saranno esposti alcuni esempi salienti per i diversi fenomeni sopra citati.

1.2.1 Effetto bystander

Il dogma centrale della radiobiologia secondo il quale gli effetti genetici delle radiazioni siano ristretti solo alle cellule direttamente irraggiate, come conseguenza diretta di un danno al DNA, è stato contestato da evidenze in cui cambiamenti genetici/epigenetici si verificano in cellule non direttamente esposte all'irraggiamento. Questi effetti sono definiti collettivamente come “effetti bystander radio-indotti” e si verificano tramite comunicazione cellulare o rilascio di fattori solubili da parte delle cellule direttamente esposte (Mancuso et al., 2008) (Figura 2).

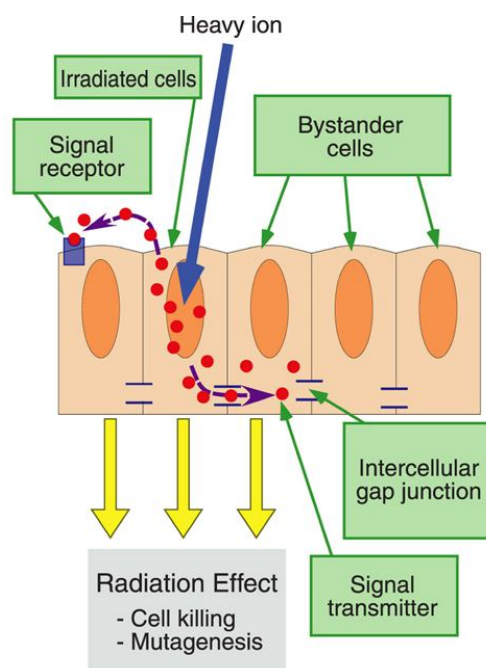


Figura 2: Effetto bystander. Le cellule irradiate comunicano con le cellule circostanti non irradiate attraverso una sostanza segnale, che induce effetti radio-indotti anche nelle cellule non esposte (tratta da: http://jolisfukyu.tokai-sc.jaea.go.jp/fukyu/mirai-en/2009/4_11.html).

L'effetto bystander può manifestarsi tramite due meccanismi distinti e separati che permettono il passaggio di informazione del danno da parte delle cellule irradiate (Lorimore et al., 2003). Un meccanismo sembra essere dipendente dalla comunicazione tramite giunzioni-gap intercellulari, che stimola il pathway di segnalazione del danno mediato dal prodotto del gene soppressore tumorale p53 (Azzam et al., 1998; 2001). Altri studi, invece, implicano un secondo meccanismo in cui le cellule irradiate secernono delle citochine (come TGF- β o IL-8) o altri fattori che favoriscono l'aumento dei livelli intercellulari di specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) nelle cellule non irradiate (Lehnert and Goodwin, 1997a, b; Narayanan et al., 1997; Iyer and Lehnert, 2000).

Uno dei primi studi sugli effetti bystander risale al 1992. In tale lavoro, una linea stabilizzata di cellule ovariche di criceto fu esposta a radiazione α in condizioni tali da garantire che meno dell'1% delle cellule fosse attraversato da particelle. I risultati sperimentali misero invece in evidenza l'induzione di scambi tra cromatidi fratelli in oltre il 30% delle cellule in coltura (Nagasawa and Little, 1992). Risultati simili sono stati riscontrati in studi riguardanti colture primarie di fibroblasti polmonari umani (Deshpande et al., 1996). Negli ultimi venti anni sono stati riportati lavori sugli effetti delle radiazioni in cellule non irradiate vicine o cresciute in co-coltura con cellule esposte (Mancuso et al, 2008). Gli effetti bystander, inoltre, sono stati

dimostrati in sistemi cellulari e in complessi modelli tridimensionali di tessuti umani (Sedelnikova et al., 2007) per endpoints come scambi tra cromatidi fratelli (Nagasawa and Little, 1992), mutazioni (Wu et al., 1999), aberrazioni cromosomiche (Prise et al., 1998) e trasformazione cellulare (Sokolov et al., 2007). Gli effetti bystander indotti dalle radiazioni sono stati osservati anche in vivo, come, ad esempio, in un esperimento nel quale i topi erano irradiati solo a livello del cranio ed un aumento di danni al DNA era rilevato nelle cellule della milza (Koturbash et al, 2008). Un interessante lavoro sugli effetti bystander in vivo è stato condotto da Mancuso e collaboratori utilizzando topi mutanti *Ptch1*, che sviluppano tumori del cervelletto molto simili al medulloblastoma umano e tumori in altri tessuti come la pelle (Pazzaglia et al., 2006). L'irraggiamento neonatale intensifica lo sviluppo di medulloblastoma e promuove la progressione delle lesioni precursori del carcinoma a cellule basali (BCC) allo stadio tumorale conclamato (Mancuso et al., 2004). Al fine di prevenire la precoce mortalità dovuta al medulloblastoma e permettere la caratterizzazione dei tumori della pelle nei topi *Ptch1*^{+/-}, furono condotti esperimenti utilizzando specifici scudi protettivi per schermare la testa (Figura 3).

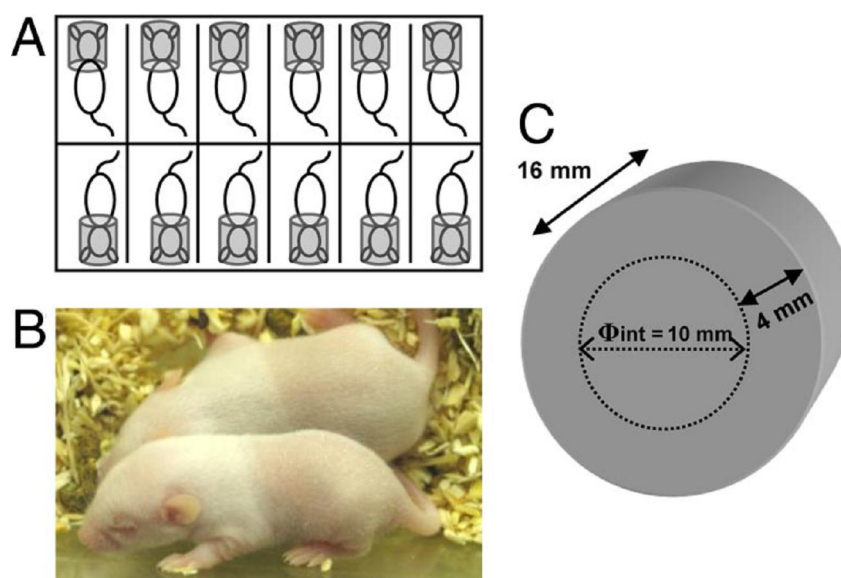


Figura 3: Schema di irraggiamento schermato. (A) Topi neonati *Ptch1*^{+/-} e *Ptch1*^{+/+} posizionati in scatole di polistirene, irradiati con testa e parte superiore del corpo schermati da cilindri di piombo individuali su misura. (B) Demarcazione tra regioni del corpo esposte e schermate, a P10 (post-natal day 10) si nota un ritardo della crescita del pelo nella zona irradiata. (C) Caratteristiche dei cilindri di piombo (tratta da: Mancuso et al., 2008).

Nonostante questi accorgimenti, fu osservato un marcato aumento di incidenza di medulloblastoma in topi irradiati con testa schermata. Nei cervelletti “schermati” fu inoltre

messa in evidenza, tramite comparsa di foci γ -H2AX in situ, l'induzione di rotture a doppia elica oltre ad un aumento della frazione di cellule apoptotiche. Questi risultati dimostrarono, per la prima volta, l'induzione con modalità bystander di un effetto cancerogeno delle radiazioni, mediato da alterazioni genetiche, nei precursori neuronali radiosensibili *Ptch1*^{+/-}. La modulazione di tale effetto a seguito del trattamento con 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), un potente attivatore della proteina chinasi C ed inibitore della comunicazione cellulare (Husøy et al., 2001), dimostrava l'implicazione delle giunzioni-gap intercellulari nel meccanismo di trasmissione dell'informazione tra cellule direttamente esposte e non (Mancuso et al., 2008).

Un interessante lavoro di Tamminga e collaboratori mise in luce come, nei ratti, l'irraggiamento localizzato del cranio potesse comportare un significativo accumulo di danni e variazioni nel livello di metilazione del DNA nelle cellule spermatiche, e come questi effetti avessero una ricaduta sulla progenie dei soggetti trattati concepita una settimana dopo l'esposizione paterna alle radiazioni. Infatti, nel timo, nella milza e nel midollo osseo della progenie furono osservate variazioni nella metilazione del DNA e nell'attività delle DNA metiltransferasi che mostravano come gli effetti prodotti con un meccanismo bystander nella linea germinale fossero persino ereditabili. L'esatta natura del segnale trasmesso dal cranio al sistema germinale non è ancora chiara, ma un'ipotesi potrebbe essere che tali informazioni possano viaggiare attraverso il sistema circolatorio sotto forma di fattori solubili rilasciati dalle cellule del sangue apoptotiche o necrotiche in sede cerebrale, capaci di attraversare la barriera emato-testicolare (Tamminga et al., 2008).

1.2.2 Risposta adattativa

Tra i vari agenti genotossici chimici o fisici, la luce solare ultravioletta e le radiazioni ionizzanti sono considerati agenti naturali che influenzano gli organismi. Altri agenti rilasciati nell'ambiente, come risultato dell'attività umana, sono gli inquinanti ambientali. Gli organismi hanno sviluppato dei meccanismi di difesa in grado di ridurre il danno genotossico, uno di questi è definito radio-resistenza o risposta adattativa (Figura 4).

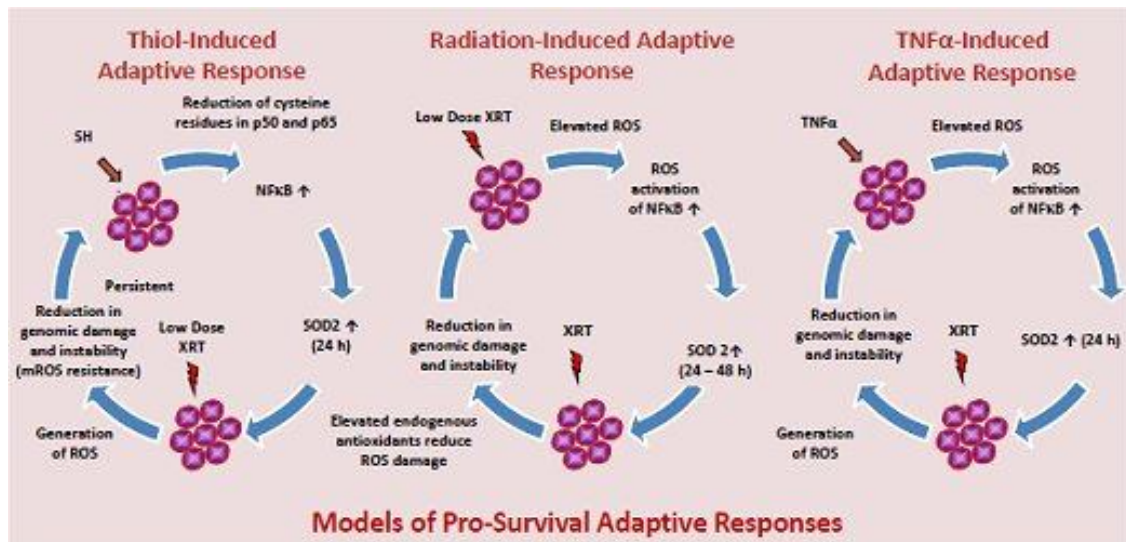


Figura 4: Esempio di modelli di risposta adattativa (tratta da: <http://lowdose.energy.gov/rta.aspx>).

La risposta adattativa si manifesta quando cellule sono esposte a basse dosi di agenti che inducono danno al DNA e ciò aumenta la loro resistenza, rendendole meno sensibili ad un successivo trattamento con dosi più elevate dell'agente chimico/fisico utilizzato in precedenza. La risposta adattativa è stata studiata in diversi organismi come batteri, lieviti, piante, cellule di insetto, cellule di mammifero, cellule umane in vitro, ed in modelli animali in vivo. La risposta radio-adattativa mostra una riduzione dell'effetto genotossico di esposizioni successive ad una prima effettuata con dosi molto basse (dell'ordine di pochi cGy). E' stato dimostrato che il range di dose ottimale per un'efficace risposta adattativa alle radiazioni ionizzanti corrisponde a 0.5-20 cGy per i raggi X (Shadley et al., 1987), a 1-10 cGy per l'³H-TdR (Ikushima, 1989) e 1-20 cGy per il Co60 (Bay and Chen, 1993). Recentemente, dopo aver dimostrato una risposta adattativa per l'induzione di micronuclei in una linea di cellule umane linfoblastoidi, è stato dimostrato che l'iniziale irraggiamento con la dose bassa di condizionamento aveva indotto un aumento del livello di metilazione globale del DNA e del livello di espressione del gene della DNA metiltransferasi1. Queste modificazioni si associano presuntivamente a fenomeni di eterocromatizzazione che possono, in effetti, rendere il materiale genetico più resistente alle radiazioni, suggerendo che, almeno in questo caso, la risposta adattativa fosse mediata da un meccanismo epigenetico di modificazione della struttura della cromatina. L'osservazione era rafforzata da un esperimento di conferma basato sul trattamento della coltura cellulare con 5-azacitidina, un agente inibitore delle DNA metiltransferasi, che effettivamente sopprimeva la risposta adattativa (Ye et al., 2013).

1.2.3 Instabilità genomica

Oltre agli effetti stocastici e deterministici delle radiazioni ionizzanti a breve termine, gli effetti radio-indotti a lungo termine sono di grande rilevanza per la salute umana. Tra questi effetti ben caratterizzata è l'induzione di tumori, nota per essere un processo a più tappe progressive, segnate dall'accumulo di mutazioni in oncogeni e geni oncosoppressori.

Recentemente, molti esperimenti in vitro hanno evidenziato che il tasso di mutazione nella progenie di cellule irraggiate risultava elevato anche in molte generazioni cellulari successive a quella inizialmente esposta. Il fenomeno è stato definito "instabilità genomica" (Morgan, 2003) (Figura 5).

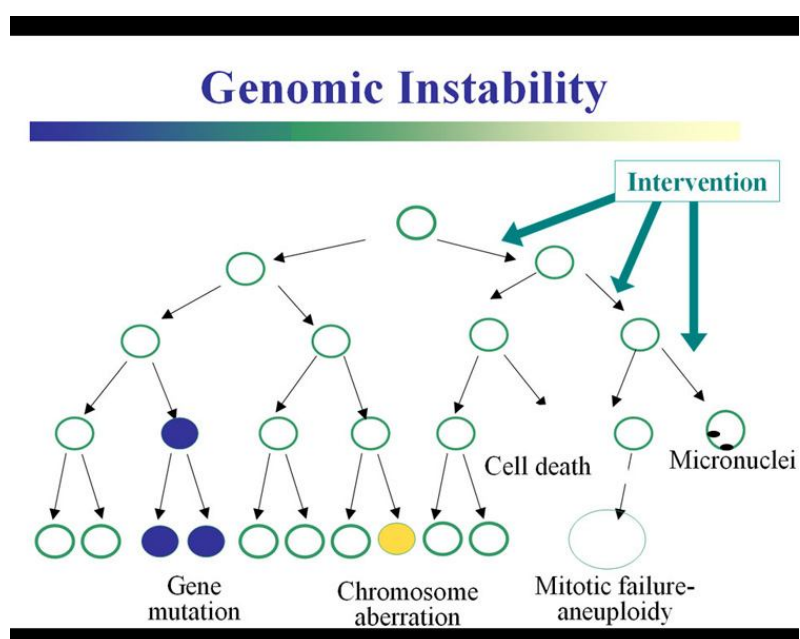


Figura 5: Instabilità genomica (tratta da: <http://lowdose.energy.gov/imagegallery.aspx>).

Mediante analisi clonali e valutazioni statistiche è stato possibile escludere che tale fenomeno fosse riconducibile all'induzione e alla trasmissione di mutazioni in geni responsabili della stabilità del DNA. Numerosi studi hanno dimostrato simili eventi di instabilità genomica radio-indotta in vivo (Morgan, 2003) che potrebbero contribuire ai processi di cancerogenesi radio-indotta attraverso un aumento della probabilità di accumulo di variazioni genetiche all'interno della cellula (Little, 2000).

Come accennato prima, un fenomeno particolare di instabilità genomica è quello manifestato dalla progenie di soggetti irraggiati, altrimenti noto come effetto transgenerazionale. Diverse

ricerche hanno descritto effetti transgenerazionali in roditori di laboratorio a seguito dell'irraggiamento di cellule della linea germinale maschile, in vari stadi di differenziamento. Queste ricerche saranno esposte più in dettaglio nei paragrafi successivi. Qui, a titolo di esempio, e a completamento del quadro sugli effetti indiretti delle radiazioni, sono illustrati solo due studi.

Barber e collaboratori hanno analizzato i cambiamenti transgenerazionali nel tasso di mutazione e di danno al DNA nella linea germinale e nei tessuti somatici della progenie non esposta di topi maschi BALB/c e CBA/Ca irraggiati rispettivamente con 1 e 2 Gy di raggi X. Le frequenze di mutanti ad un locus di DNA ripetitivo (*Expanded Simple Tandem Repeat*, ESTR) si sono rivelate significativamente elevate sia nella linea germinale che nelle cellule del midollo osseo e della milza della progenie di genitori irraggiati. Inoltre, anche la frequenza di mutanti nel gene codificante *hprt* risultava significativamente elevata negli splenociti della progenie di soggetti irraggiati (Figura 6).

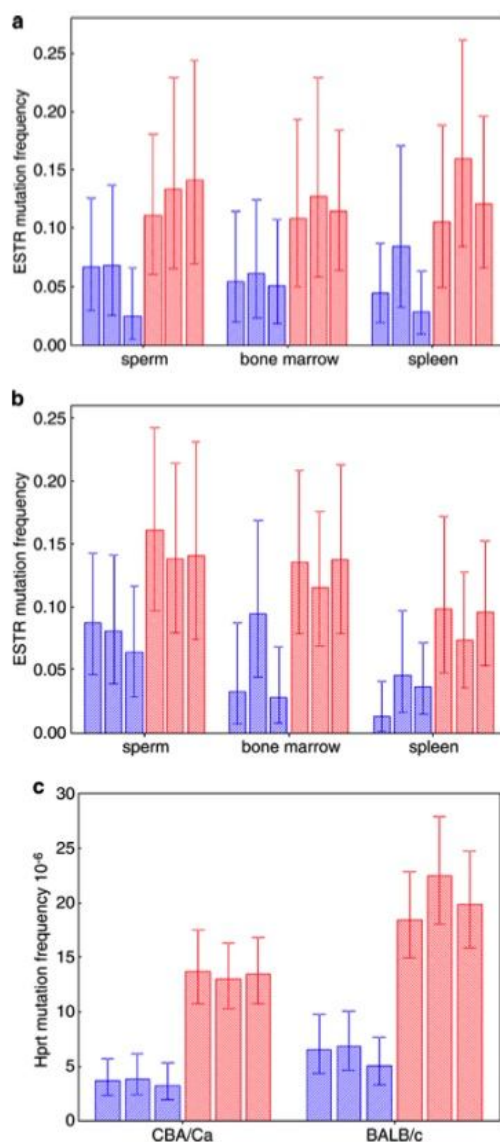


Figura 6: Effetti epigenetici transgenerazionali delle radiazioni. Frequenza di mutazioni in sequenze di DNA ripetitivo (*Expanded Simple Tandem Repeat*, ESTR) e nel gene *hprt* in topi di controllo (colonne blu) e nella progenie F1 dei maschi irraggiati (colonne rosse). Ogni colonna rappresenta la frequenza di mutazioni misurata in uno specifico esemplare. (a) Frequenza di mutazioni ESTR in spermatozoi, cellule di midollo osseo e linfociti splenici nel ceppo CBA/Ca. (b) Frequenza di mutazioni ESTR in spermatozoi, cellule di midollo osseo e linfociti splenici nel ceppo BALB/c. (c) Frequenza di mutazioni nel gene *hprt* in linfociti splenici (tratta da: Barber et al., 2006).

Infine, una generalizzata destabilizzazione del DNA era confermata dall'aumento delle rotture a singolo filamento in cellule di midollo osseo evidenziate mediante test della cometa e di rotture a doppio filamento evidenziate dalla comparsa di foci γ -H2AX in cellule di milza (Barber et al., 2006).

Vance e collaboratori, hanno riportato i risultati di esperimenti volti a testare l'ipotesi di una riprogrammazione cellulare nella terza generazione di topi F0 irraggiati. Sono stati considerati gruppi sperimentali di progenie F3, irraggiati e non, provenienti da F0 che avevano subito un irraggiamento degli spermatogoni di tipo B con 1 Gy di raggi gamma e da F0 non irraggiati. L'organo scelto in questo studio, per la valutazione di eventuali effetti biologici, è stato il rene. Gli effetti dell'irraggiamento sono stati valutati a 2 ore ed a 3 settimane dall'irraggiamento, monitorando l'attività della proteina chinasi C (PKC), della proteina chinasi attivata da mitogeni (MAPK), della glutatione S-transferasi nel citosol ed i livelli di p53 nel nucleo. Inoltre, i livelli spontanei e radio-indotti di danni al DNA sono stati valutati mediante test della cometa. Da tale studio è emerso che le cellule renali di topi F3 derivanti da F0 irraggiati mostravano alterazioni a livello biochimico ed una ridotta induzione di rotture al DNA rispetto a topi F3 derivanti da F0 non irraggiati (Vance et al., 2002).

1.3 ECCEZIONI ALL'EREDITARIETA' MENDELIANA: MECCANISMI EPIGENETICI DI EREDITARIETA'

Negli ultimi anni, alcuni studi hanno messo in evidenza, in modelli murini, fenomeni di ereditarietà apparentemente in contrasto con quanto atteso in base alla trasmissione mendeliana di varianti alleliche. Questi studi hanno portato all'ipotesi che esistano altri mediatori molecolari, oltre alla sequenza del DNA, dell'informazione trasmessa dai gameti della generazione parentale alla progenie (Daxinger and Whitelaw, 2012). Nel seguito di questo paragrafo saranno brevemente descritti alcuni di questi studi.

L'allele mutante A^{vy} al locus *agouti* nel topo conferisce una colorazione giallastra della pelliccia. Questo allele mostra espressività variabile, cioè a parità di genotipo A^{vy}/a la pelliccia ha una colorazione gialla più o meno marcata. Questo effetto è causato dalla modulazione della sua trascrizione dovuta a variabilità del livello di metilazione di un retrotrasposone che si inserì spontaneamente a monte del promotore. L'osservazione più interessante è che nei topi A^{vy}/a , prodotti dall'incrocio di femmine A^{vy}/a con maschi a/a , il FENOTIPO materno, cioè il grado di colorazione gialla della pelliccia, influenza il fenotipo della progenie: più sono gialle le madri, più è probabile che gli individui della progenie abbiano la pelliccia gialla. Trattandosi di un ceppo inbred, madri e progenie hanno lo stesso genotipo e condividono lo stesso identico allele A^{vy} . Esperimenti di trasferimento degli embrioni permisero di escludere che si trattasse di un effetto materno non mediato dai gameti, ma dall'ambiente intrauterino o

dall'allattamento. Questo studio dimostrò che un'informazione di tipo epigenetico, come la metilazione del DNA, in grado di influenzare l'espressione genica fosse trasmissibile da una generazione all'altra (Morgan et. al, 1999). Alleli come A^{vy} vennero definiti epialleli metastabili (Figura 7).

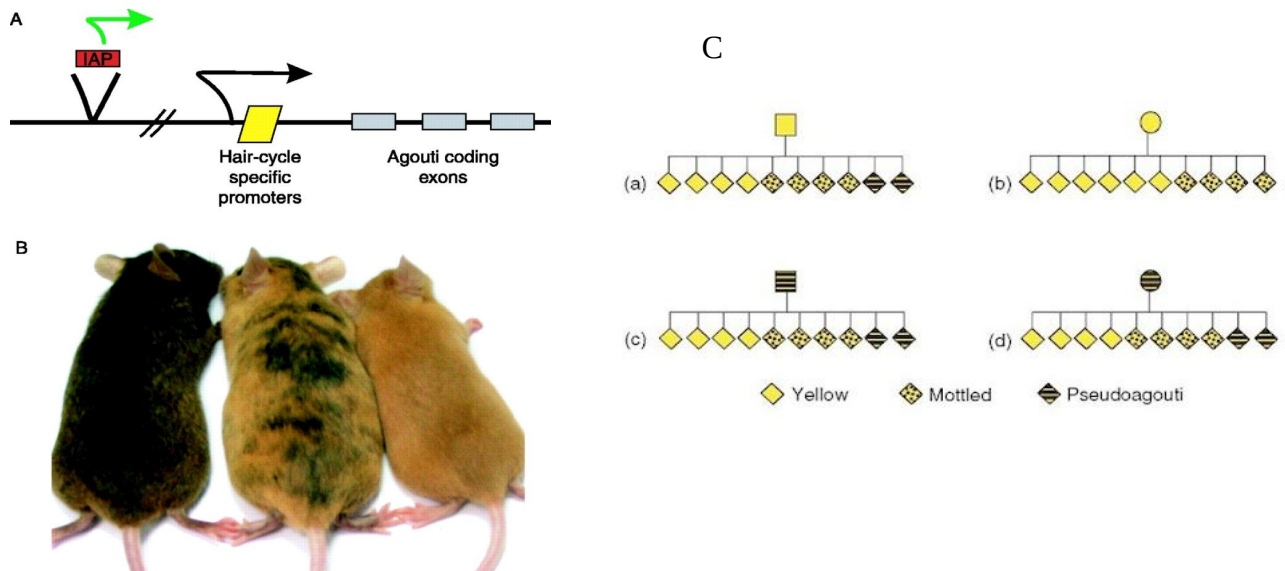


Figura 7: Meccanismo molecolare del fenotipo associato alla mutazione A^{vy} e schema dell'ereditarietà epigenetica di origine materna. (a) Mappa dell'allele A^{vy} . A^{vy} ha un retrotrasposone (IAP, *Intracisternal A Particle*) (box rosso) inserito a monte del gene *Agouti*. La trascrizione origina da un promotore (freccia verde) nel LTR di IAP e permette una espressione costitutiva di A^{vy} , che conferisce la colorazione giallastra del pelo. Quando il promotore è silenziato da alti livelli di metilazione del DNA, l'espressione di A^{vy} si manifesta sotto il controllo di promotori specifici che conferiscono il colore marrone al pelo. (b) Fenotipi osservabili nei topi A^{vy} isogenici. I topi con pelo giallastro mostrano l'espressione agouti tramite IAP. I topi a chiazze mostrano una variegazione, alcune cellule mostrano l'espressione tramite IAP e alcune l'espressione mediata dal promotore specifico, a seconda del livello di metilazione del DNA di IAP in ciascuna. I topi con pelo marrone, hanno A^{vy} regolato dal promotore specifico. (c) Schema dell'ereditarietà epigenetica materna del fenotipo A^{vy} . Topolini maschi (quadrati) hanno una uguale proporzione di fenotipi nella progenie indipendentemente dal proprio fenotipo, a dimostrazione che il livello di metilazione di IAP e quindi il livello di espressione di A^{vy} viene resettato dopo il passaggio dell'allele nella linea germinale paterna; topoline femmine (cerchi) hanno una proporzione di fenotipi nella progenie sbilanciata verso il fenotipo materno, a dimostrazione che il livello di metilazione di IAP nella linea germinale femminile, corrispondente al livello materno di espressione di A^{vy} , non viene completamente resettato nell'embrione.

Un altro interessante caso che sfida le attese basate sull'ereditarietà di tipo mendeliano è quello dei topi di genotipo $Kit^{tm1Alf/+}$. I topolini portatori dell'allele mutante Kit^{tm1Alf} hanno la

punta della coda e delle zampe bianca. In un incrocio tra maschi $Kit^{tm1Alf/+}$ e femmine di genotipo selvatico la frequenza dei figli che esprimono il fenotipo mutante è significativamente superiore al 50% atteso, benché le proporzioni dei genotipi siano invece pari alle attese. Infatti, alcuni soggetti di genotipo selvatico sono fenotipicamente mutanti. Fu dimostrato che gli spermatozoi dei maschi $Kit^{tm1Alf/+}$, e non dei maschi di genotipo selvatico, contenevano sequenze di RNA complementari al DNA del locus *Kit* e fu ipotizzato che esse potessero agire durante lo sviluppo embrionale inibendo la trascrizione dell'allele selvatico (Rassoulzadegan et al., 2006). Anche in questo caso quindi si tratterebbe di una forma di ereditarietà epigenetica trasmessa, nel caso specifico, dai gameti paterni (Figura 8).

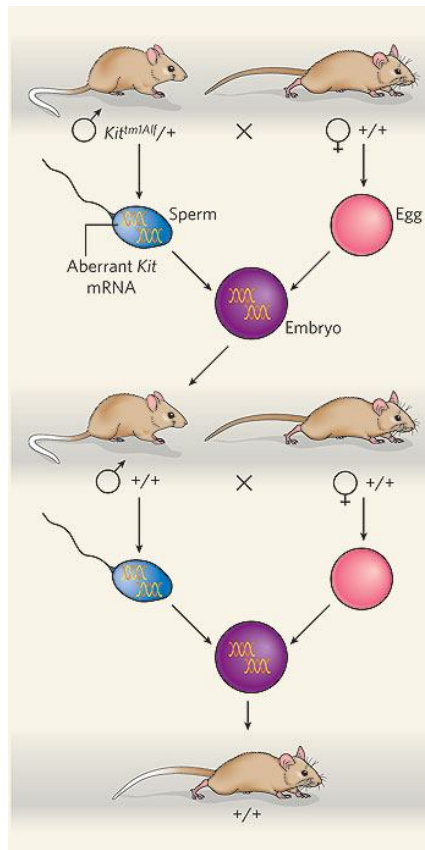


Figura 8: I topi eterozigoti per l'allele mutante Kit^{tm1Alf} hanno la punta della coda e le zampe bianche. Il fenotipo della progenie derivante da un incrocio tra maschi $Kit^{tm1Alf/+}$ e femmine di genotipo selvatico non segue le proporzioni Mendeliane, perché il numero di mutanti è maggiore rispetto a quello atteso. I genotipi rispettano le proporzioni Mendeliane e, infatti, molti dei topolini $+/+$ mostrano un fenotipo mutato. Negli spermatozoi dei topi fenotipicamente mutanti, ma non in quelli dei topi wild-type, è stato riscontrato l'mRNA di *Kit*. Gli zigoti wild type, in cui è stato iniettato miRNA contro il locus *Kit*, manifestano fenotipo mutante. Questi esperimenti

dimostrano una correlazione tra una molecola e l'ereditarietà epigenetica transgenerazionale mediata dai gameti (Rassoulzadegan et al., 2006).

Alla ricerca di altri loci per i quali un genotipo mutante potesse influenzare il fenotipo della progenie senza trasmissione ereditaria della sequenza genetica, furono valutati gli effetti transgenerazionali di alcune mutazioni note per influenzare l'espressione genica a livello epigenetico. In questo studio furono effettivamente identificati due geni, *Smarca5* e *Dnmt1*, codificanti rispettivamente per un fattore di rimodellamento della cromatina e una DNA metiltransferasi, per i quali si manifestavano fenomeni di ereditarietà epigenetica attraverso i gameti paterni (Chong et al., 2007).

Un ulteriore studio a supporto di un effetto del genotipo paterno sul fenotipo della progenie, in assenza della trasmissione delle corrispondenti sequenze genetiche, è quello in cui fu analizzato il fenotipo per caratteri comportamentali complessi di topoline generate da maschi di genotipo identico, fatta eccezione per il cromosoma Y, ottenuti mediante trasferimento cromosomico. Le topoline, che evidentemente non avevano ricevuto l'informazione genetica codificata dalla sequenza di DNA del cromosoma Y, mostravano tuttavia importanti differenze nei tratti analizzati (Nelson et al., 2010).

In una rassegna (Nadeau, 2009), è stata avanzata l'ipotesi che meccanismi di ereditarietà epigenetica possano, almeno in parte, spiegare quelle situazioni nelle quali alcune complesse patologie umane mostrano una elevata familiarità senza che sia ancora stato possibile associarvi una particolare variante genetica. E per testare questa ipotesi si propone di condurre studi di associazione a livello genomico (*Genome Wide Association Studies*, GWAS) basati sull'analisi del genoma dei genitori anziché su quello dei pazienti. La stessa rassegna riporta un caso interessante di epistasi transgenerazionale, che, ancora una volta, dimostra l'effetto del genotipo parentale sul fenotipo della progenie senza la trasmissione di varianti alleliche. Il fenotipo in questione è quello della suscettibilità allo sviluppo tumorale nelle cellule testicolari (TGCTs) in topi di laboratorio (Lam et al, 2007). Nonostante la forte ereditarietà, nell'uomo le varianti genetiche responsabili di questa suscettibilità tumorale non sono ben definite. E' stato riscontrato che sei modificatori genetici TGCT (m), interagiscono transgenerazionalmente con una mutazione *Ter* nel gene *Deadend1* (*Dnd1*). *Dnd1* controlla l'accesso di specifici microRNA agli mRNA bersaglio, molti dei quali svolgono un ruolo chiave nelle cellule germinali primordiali (cellule staminali TGCT) (Kedde et al., 2007). I soggetti portatori della mutazione *Dnd1^{Ter}* mostrano una maggiore predisposizione allo

sviluppo di tumori testicolari, ma solo se uno dei due parentali è portatore di una particolare variante allelica ad uno dei loci mutatori. E l'effetto di epistasi transgenerazionale è dimostrato dal fatto che il fenotipo si manifesta a prescindere dall'effettiva trasmissione ereditaria della mutazione al locus m. Questo esempio, inoltre, mette in evidenza un possibile ruolo della regolazione della trascrizione tramite miRNA negli effetti transgenerazionali che riguardano il differenziamento delle cellule germinali (Figura 9).

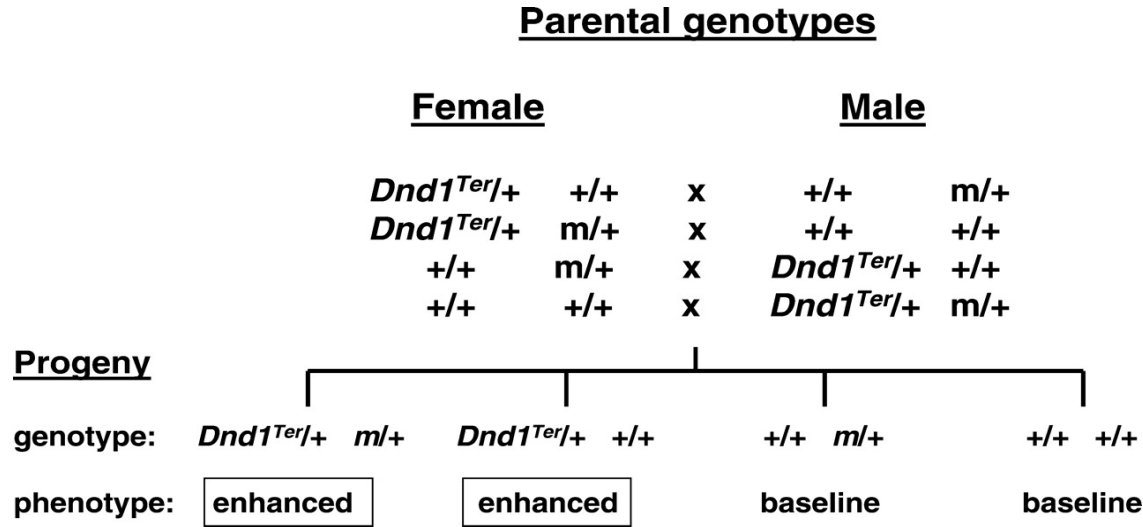


Figura 9: Epistasi transgenerazionale nel topo per la predisposizione allo sviluppo di tumori testicolari tra il mutante di *Deadend1*, *Dnd1^{Ter}*, ed i geni (m) che interagiscono con esso. Ciascuno dei quattro incroci genera gli stessi quattro genotipi. Solamente la progenie portatrice della mutazione *Dnd1^{Ter}* mostra un aumento dell'insorgenza tumorale indipendentemente dall'eredità dei modificatori genetici. Tuttavia, affinché la F1 esprima il fenotipo, l'allele m deve essere necessariamente presente nel genotipo di uno dei parentali, come dimostrato dal fatto che la progenie di genotipo *Dnd1^{Ter/+} +/+* nata dall'incrocio *Dnd1^{Ter/+} +/+* x *+/+ +/+* risulta avere una incidenza tumorale NON aumentata. Si nota che i geni modificatori agiscono sulla generazione parentale, mentre *Dnd1^{Ter}* agisce nella progenie (tratta da: Nadeau, 2009).

1.4 INFLUENZE AMBIENTALI SULL'EREDITARIETA' EPIGENETICA

Nel paragrafo precedente abbiamo esaminato alcuni modelli genetici con i quali è stato possibile dimostrare una forma di ereditarietà non Mendeliana, o ereditarietà di tipo epigenetico. In questo paragrafo, vedremo come anche l'ereditarietà di tipo epigenetico (come quella basata sulla sequenza del DNA) possa essere modificata da fattori ambientali.

Il primo esempio riguarda i topi portatori della mutazione A^{vy} al locus *agouti* già descritti precedentemente. Come si era visto, il fenotipo dipende dal livello di metilazione della sequenza trasponibile inseritasi a monte del promotore: l'esposizione materna prima e durante la gravidanza a composti che intervengono nel metabolismo come donatori di gruppi metilici, quali l'acido folico, influenzano il fenotipo della prole provocando uno shift verso una colorazione meno gialla, associata ad un minor livello di espressione genica (Jirtle and Skinner, 2007). Una volta diventate adulte le femmine di questa F1, esposte alla dieta supplementata solo in fase prenatale ma non più successivamente né tantomeno durante la loro stessa gravidanza, sono in grado di trasmettere alla generazione successiva il cambiamento fenotipico ereditato, a dimostrazione che l'effetto ambientale è in grado di modificare in modo stabile anche il pattern epigenetico della linea germinale (Cropley et al., 2006) (Figura 10).

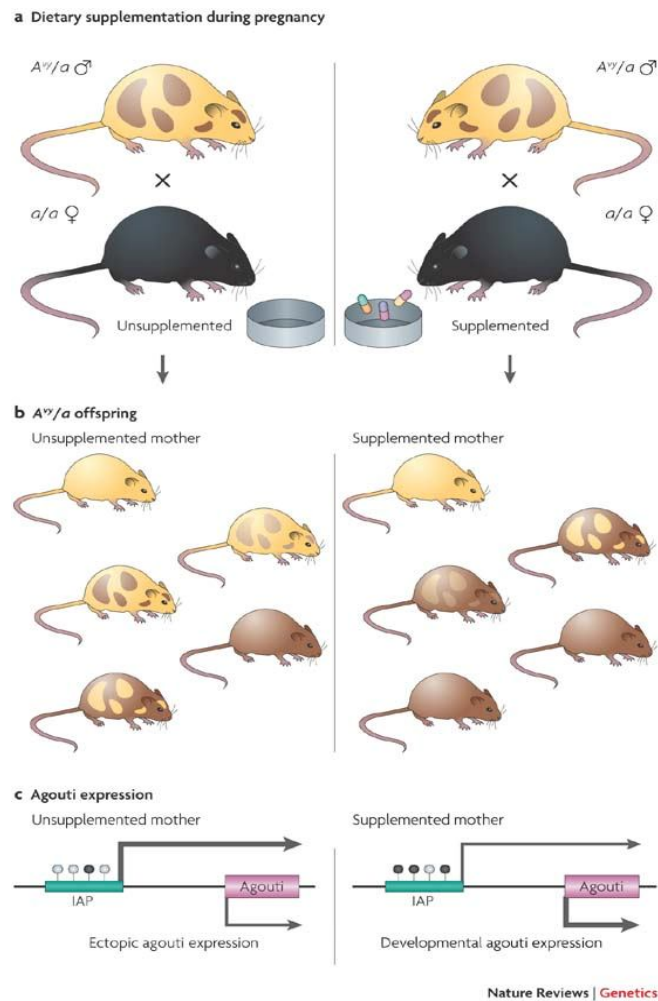


Figura 10: La percentuale di piccoli con il pelo giallo diminuisce in seguito all'esposizione delle madri ad una dieta ricca di gruppi metilici, derivanti, ad esempio dall'acido folico.

Un approccio con il quale diversi laboratori hanno valutato la possibilità che agenti chimici o fisici inducano alterazioni di meccanismi epigenetici dell'ereditarietà si è basato sull'analisi del tasso di instabilità genomica a livello di DNA, di geni o di cromosomi nei tessuti somatici o germinali della progenie di animali trattati. Si tratta cioè di un approccio analogo a quello con il quale è stata messa in evidenza l'induzione di instabilità genomica nelle generazioni cellulari discendenti da cellule somatiche irraggiate in vitro o in vivo, fatta salva la trasmissione di instabilità tra generazioni di individui anziché di cellule. Un esempio di queste ricerche è il lavoro di Barber e collaboratori (Barber et al., 2006) già trattato nel paragrafo sugli Effetti indiretti delle radiazioni ionizzanti. Un altro esempio è quello del lavoro di Luke e collaboratori (Luke et al., 1997) in cui si dimostra un aumento statisticamente significativo della frequenza spontanea di mutanti nel locus transgenico *Lacz* in cellule del midollo di topi,

dopo esposizione paterna, negli stadi germinali post-meiotici, a 4 Gy di raggi X. L'induzione di instabilità genomica transgenerazionale è stata documentata anche dall'aumento del tasso di instabilità in sequenze di DNA ripetitivo (ESTR) in cellule somatiche e germinali dei discendenti di prima generazione di topi maschi trattati con N-etil-N-nitrosourea (ENU) (Dubrova et al., 2008) o con farmaci chemioterapici quali ciclofosfamide, mitomicina-C e procarbazine (Glen and Dubrova, 2012) (Figura 11).

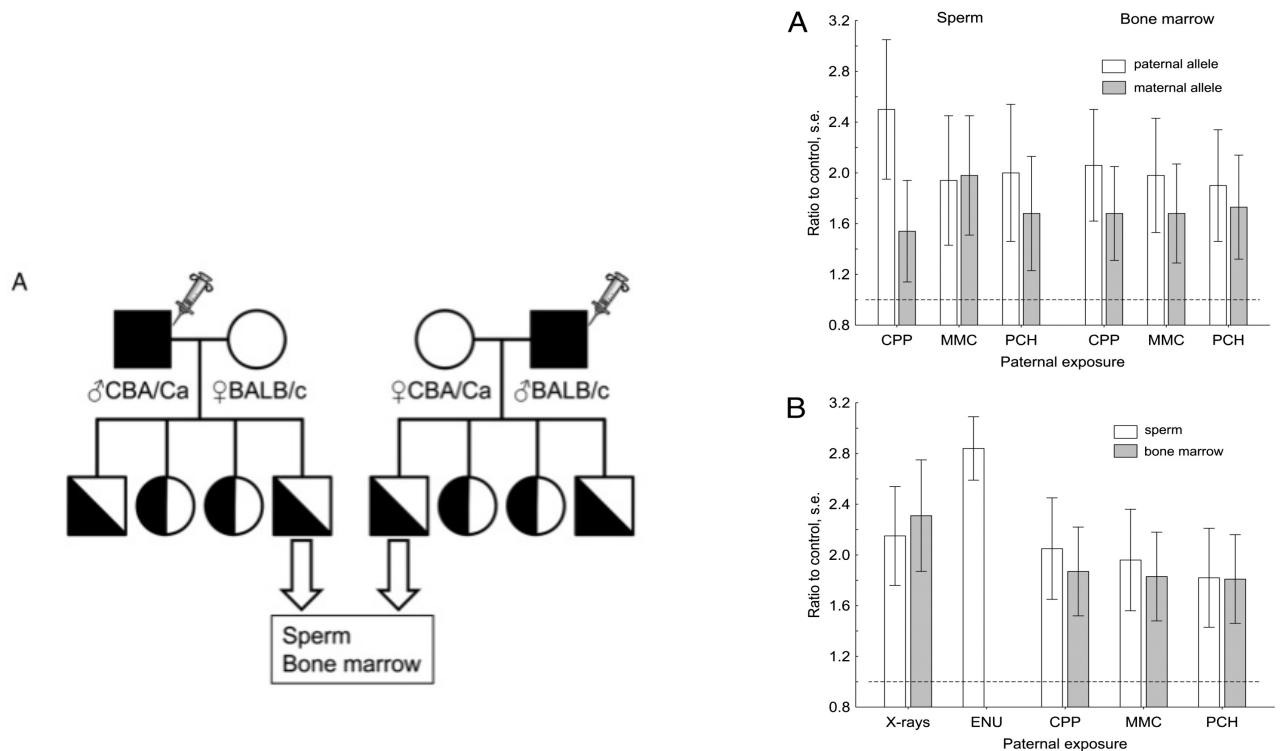


Figura 11: Effetti dell'esposizione paterna sulle frequenze di mutazione di ESTR in tessuti somatici e germinali della progenie. A sinistra: disegno sperimentale dello studio transgenerazionale. A destra: (a) La frequenza di mutazione ESTR agli alleli derivanti da padri esposti e madri non esposte (b) Instabilità transgenerazionale nella progenie di topi maschi esposti a radiazioni ionizzanti, etil-nitrosourea, ciclofosfamide (CPP), mitomicina-c (MMC) e procarbazine (PCH) (+SE). La frequenza di mutazioni spontanee è elevata nella progenie di topi maschi irraggiati (Glen and Dubrova, 2012).

Nel caso dell'ENU l'effetto è indotto sia dall'esposizione di spermatogoni che di spermatidi; nel caso dei chemioterapici lo studio ha riguardato solo il trattamento di cellule germinali paterne allo stadio di spermatogoni. E' interessante notare come in questi lavori l'instabilità genomica sia rilevata anche nell'allele di origine materna non esposto, a conferma di un meccanismo indiretto e transgenerazionale alla base del fenomeno.

Non tutti gli esperimenti condotti per valutare l'azione di agenti mutageni sull'induzione di effetti transgenerazionali, ed in particolare di instabilità genomica, hanno dato esito positivo. O'Brien e collaboratori, hanno indagato se l'esposizione di MutaTMMouse maschi a singole dosi di 75 mg/kg di ENU potesse incrementare la frequenza spontanea di mutazioni geniche o danno ai cromosomi nella progenie. I maschi trattati sono stati accoppiati con femmine non trattate 3 giorni, 6 settimane o 10 settimane dopo il trattamento. La progenie, in questo modo, era stata concepita da spermatozoi maturi, spermatogoni in differenziamento o cellule staminali spermatogoniali esposte ad ENU. Da questa progenie F1, è stata generata una progenie di maschi F2 tramite l'ulteriore accoppiamento con femmine non trattate. Sono stati osservati i seguenti parametri: mutazioni nel transgene lacZ nel midollo osseo e frequenza di micronuclei negli eritrociti per F0, F1 e F2. La frequenza di mutanti lacZ è stata determinata anche negli spermatozoi di tutti i topi esposti e dei loro discendenti. Nei maschi F0, la frequenza di mutanti lacZ nel midollo si dimostrava significativamente elevata di almeno 10 volte a tutti gli intervalli di tempo dopo il trattamento. Negli spermatozoi, la frequenza dei mutanti lacZ risultava significativamente elevata (7-11 volte) dopo trattamento degli spermatogoni e delle cellule staminali, ma non degli stadi post-meiotici (come atteso in base alla loro condizione post-replicativa). La frequenza dei micronuclei negli eritrociti dei topi F0 due giorni dopo il trattamento con ENU era 5 volte maggiore rispetto ai valori di controllo. Nonostante la consistente risposta mutagenica nei maschi F0, l'esposizione ad ENU pre- e post-meiotica non comportava alcun aumento dei mutanti lacZ o della frequenza di micronuclei nella progenie F1 o F2 (O'Brien et al., 2013).

Alla ricerca dei pathways molecolari dell'instabilità genomica transgenerazionale, 4 generazioni di topi CD1, discendenti da topi le cui cellule germinale erano state esposte allo stadio di spermatogoni di tipo B (1.0 Gy, 137Cs raggi γ), sono state monitorate per possibili variazioni, nel fegato, dell'attività della proteina chinasi C e della proteina chinasi attivata da mitogeni, e dei livelli delle proteine Trp53 e p21waf1. Le proteine studiate sono infatti tra quelle coinvolte nella proliferazione cellulare, nella risposta alle radiazioni e nell'instabilità genomica. E' emerso che due o più endpoints erano significativamente alterati in tutte le 4 generazioni filiali provenienti da padri irraggiati. Per testare l'ipotesi che tali effetti biochimici ereditabili fossero di natura stocastica, ogni endpoint è stato considerato anche in termini di indice di variabilità. Da tale, ulteriore analisi, è emerso che la direzione e la magnitudine delle deviazioni osservate non erano prevedibili tra le varie generazioni ed all'interno di una generazione, pur ricorrendo un fenotipo caratterizzato da alterazioni rispetto ad individui che non avevano un progenitore irraggiato. Gli autori suggeriscono che le

alterazioni biochimiche osservate possano essere dovute a meccanismi epigenetici in grado di modulare stabilmente l'espressione genica, come cambiamenti nei livelli di metilazione del DNA. Questi risultati indicano che gli spermatogoni irraggiati possiedono la capacità di trasmettere un'instabilità (epi)genomica ereditabile per ben 4 generazioni (Baulch and Raabe, 2005).

Anche Koturbash e collaboratori ipotizzarono che alterazioni di tipo epigenetico potessero avere un ruolo importante nell'eziologia molecolare dell'instabilità genomica transgenerazionale. Nel loro studio sono stati analizzati i livelli di metilazione del DNA in cellule di timo, milza, fegato e midollo osseo di progenie non esposta, ma discendente da madre, padre o entrambi i genitori esposti a radiazioni ionizzanti. E' stata osservata una significativa riduzione dei livelli di metilazione globale del DNA nel timo accompagnata da una marcata diminuzione delle metiltransferasi DNMT1, DNMT3a, DNMT3b e della proteina MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein*). Inoltre, nello stesso organo, è stato riscontrato un notevole accumulo di rotture al DNA evidenziato dalla comparsa di foci γ -H2AX, a conferma di un fenotipo di instabilità genomica. In sintesi, i risultati di tale lavoro suggeriscono un profondo rimodellamento di tipo epigenetico nella progenie che, a sua volta, potrebbe portare ad una destabilizzazione del genoma e favorire la cancerogenesi transgenerazionale (Koturbash et al., 2006).

Esistono esempi di ereditarietà epigenetica anche in organismi diversi dal topo. I mutanti w^{m4} di *Drosophila* hanno una colorazione variegata dell'occhio con macchie bianche su fondo rosso dovute a silenziamento genico causato da una mutazione con effetto di posizione (eterocromatizzazione del locus). Negli embrioni di *Drosophila* l'esposizione al calore induce cambiamenti conformazionali della cromatina e riattivazione di zone eterocromatiche. L'incrocio di maschi esposti al calore con femmine w^{m4} non esposte produce nei maschi della F1 uno shift del colore dell'occhio verso il fenotipo selvatico. Poiché la mutazione w^{m4} è localizzata sul cromosoma X, e i maschi hanno ereditato la mutazione dalle madri non esposte, si tratta evidentemente di un caso di ereditarietà epigenetica modulato da fattori ambientali: il cromosoma X materno subisce in trans l'effetto di un'esposizione paterna al calore trasmesso dalla linea germinale maschile mediante un mediatore molecolare non identificato (Daxinger and Whitelaw, 2012). Questo studio suggerisce un meccanismo secondo il quale gli effetti dello stress sono ereditati epigeneticamente tramite la regolazione della struttura della cromatina (Seong et al., 2011) (Figura 12).

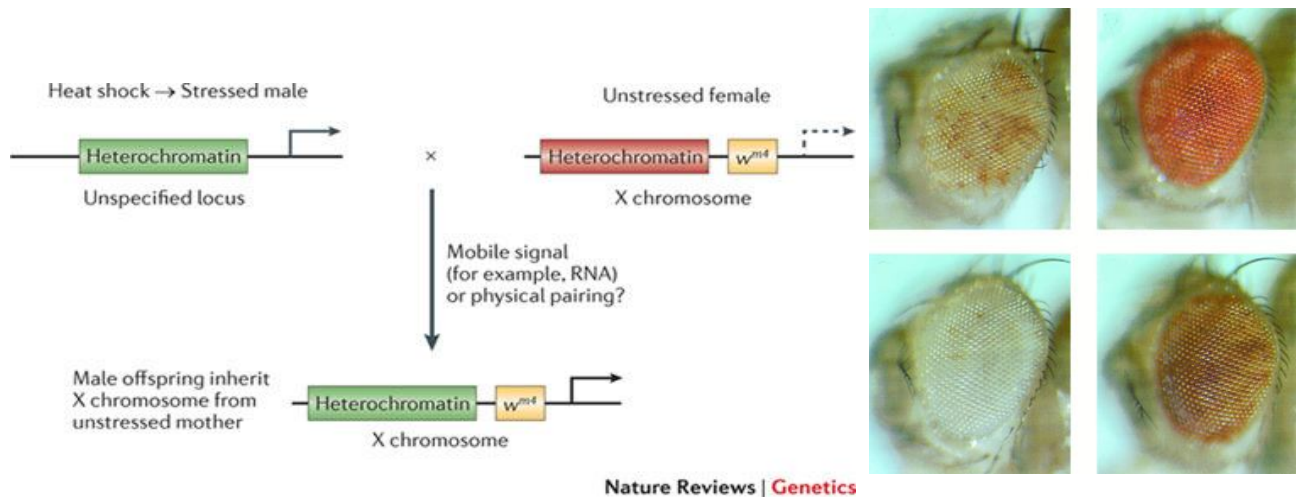


Figura 12: Ereditarietà epigenetica transgenerazionale in *Drosophila*. *Drosophile* di genotipo selvatico hanno occhi rossi come manifestazione dell'espressione del gene *White*. Quando una mutazione porta il gene in prossimità della eterocromatina pericentrica del cromosoma X, la variante allelica w^{m4} comporta il silenziamento genico e l'espressione di macchie bianche nell'occhio (variegazione per effetto di posizione). Gli embrioni maschi w^{m4}/Y esposti a shock termico manifestano un numero ridotto di macchie bianche. La progenie maschile dell'incrocio tra tali maschi e femmine non stressate, che ha ereditato il cromosoma X dalle madri non esposte allo shock termico, eredita il fenotipo paterno a causa di un effetto in trans indotto da molecole trasmesse dagli spermatozoi (Tratta da: Daxinger and Whitelaw, 2012).

Infine è interessante notare come oggi il campo dei possibili effetti transgenerazionali non mediati dalla trasmissione di sequenze genetiche si stia grandemente espandendo. A titolo di esempio citiamo un recente lavoro riguardante l'ereditarietà di un'esposizione parentale associata al dolore. Topi maschi F0 sono stati sottoposti ad uno stimolo odoroso (acetofenone) accoppiato ad una sensazione dolorosa provocata da una leggera scossa elettrica, prima dell'accoppiamento, ed è stato dimostrato che le generazioni F1 ed F2 sono estremamente sensibili all'acetofenone, utilizzato per condizionare i topi F0, ma non ad altri odori. Usando un topo transgenico in cui i neuroni sensoriali olfattivi esprimevano uno specifico recettore (*Olf151*) facilmente visualizzabile, è stato messo in evidenza che la sensibilità che si manifestava alla percezione dell'odore era correlata con un'alterata neuroanatomia di tale pathway. Infine, tramite fecondazione *in vitro*, è stato dimostrato che questi effetti transgenerazionali sono trasmessi tramite i gameti e non sono mediati da meccanismi di interazione maschio/femmina. Questo lavoro quindi dimostra come un'esperienza parentale possa influenzare la struttura e la funzione del sistema nervoso centrale della progenie (Dias and Ressler, 2014).

1.5 CANCEROGENESI TRANSGENERAZIONALE

1.5.1 Studi sperimentali

I primi esperimenti che dimostrarono un aumento di tumori nella progenie di topi irraggiati furono condotti in Giappone negli anni '80 (Nomura, 1982). Fu osservato un aumento dei tumori dipendente dalla dose nella progenie F1 di topi ICR maschi e femmine esposti a dosi acute di raggi X (0.36-5.04 Gy). Gli stadi post-meiotici risultarono doppiamente sensibili rispetto agli stadi spermatogoniali. Gli oociti si rivelarono resistenti fino ad una dose di circa 1 Gy, ma molto sensibili a dosi più elevate. Il frazionamento della dose (0.36 Gy ad intervalli di 2 ore) riduceva significativamente gli effetti tumorigenici delle radiazioni nella progenie quando venivano esposti gli spermatogoni o gli oociti maturi (Nomura, 1978; 1982), ma non quando il bersaglio dell'irraggiamento erano gli spermatidi. L'analisi della generazione F2 ottenuta dalla progenie F1 dei topolini irraggiati, mostrava che l'aumento di suscettibilità allo sviluppo di tumori (prevalentemente, ma non solo, polmonari) era un carattere ereditario, con una penetranza di circa il 40%.

Successivamente a questi studi, altri esperimenti vennero condotti su diversi ceppi di topi e con radiazioni di diversa qualità (Nomura, 2003). Un'alta incidenza di tumori al fegato fu osservata nella progenie F1 di topi maschi C3H, esposti a 0.5 Gy di ^{252}Cf , accoppiati con femmine C57BL/6 (Watanabe et al, 1996). Nella progenie di topi maschi N5 irraggiati con 5 Gy di raggi X o trattati con acqua triziata fu documentata una maggiore incidenza di leucemie (Daher et al., 1998). Un altro lavoro riportò una tendenza verso una maggiore incidenza di tumori del sistema ematopoietico e di adenocarcinomi bronco-alveolari nella progenie di topi maschi CBA/JNCrj esposti a raggi X una settimana prima dell'accoppiamento (stadio di spermatozoi), e, al contrario, l'assenza di effetti a seguito dell'irraggiamento di spermatogoni (Mohr et al., 1999).

Diverse ricerche documentarono infine un aumento dell'effetto cancerogeno delle radiazioni o di sostanze chimiche come ad esempio l'uretano (Nomura, 1983), o la metilnitrosourea (Lord and Hoyes, 1999) nella progenie dei topi irraggiati.

Dall'insieme di questi studi emerge un quadro complesso, nel quale ceppi murini diversi sembravano mostrare un incremento di suscettibilità per diversi tipi di tumore. Nomura suggerì quindi che l'irraggiamento parentale avesse l'effetto di esaltare la specifica pre-esistente predisposizione genetica caratteristica di ogni ceppo murino (Nomura, 2003). Inoltre Nomura sottolineò l'importanza di tenere rigorosamente sotto controllo le procedure

sperimentali per minimizzare il peso dei fattori ambientali che nelle fasi post-natali possono modificare l'effetto dei fattori ereditari di suscettibilità.

Il consenso della comunità scientifica su una tale conclusione non fu tuttavia unanime anche perché esperimenti indipendenti condotti nelle medesime condizioni degli studi iniziali di Nomura, con l'obiettivo esplicito di verificarne la riproducibilità, non replicarono l'evidenza di effetti transgenerazionali sull'incidenza tumorale (Cattanach et al., 1995; 1998). Cattanach e collaboratori attribuirono a variazioni stagionali di incidenza tumorale l'apparente effetto transgenerazionale osservato da Nomura. Un recente lavoro di Selby e collaboratori (Selby et al., 2005) ha messo in luce un possibile fattore di confondimento negli studi di cancerogenesi transgenerazionale. Gli autori hanno esaminato i numerosi dati di controllo provenienti dall'Oak Ridge National Laboratory e riscontrato una correlazione negativa tra peso corporeo e numero di piccoli, probabilmente riconducibile alla maggiore disponibilità di latte materno. Pertanto, ogni trattamento parentale che comporti una letalità dominante e quindi un ridotto numero di piccoli, come l'esposizione alle dosi di radiazioni applicate negli studi di Nomura, potrebbe comportare un aumento di peso corporeo della progenie sopravvissuta che, a sua volta, potrebbe tradursi in un'accelerazione di un processo di cancerogenesi spontanea (come suggerito da esperimenti sull'effetto protettivo della restrizione calorica), del tutto indipendente dall'irraggiamento parentale.

1.5.2 Osservazioni epidemiologiche

Quando nel 1990 venne segnalato un aumento dei casi di leucemia e linfomi infantili nelle vicinanze dell'impianto di processamento del combustibile nucleare di Sellafield, corrispondente ad un incremento del rischio di circa 6-8 volte, fu ipotizzato potesse trattarsi di un effetto transgenerazionale dovuto all'esposizione occupazionale paterna (dose stimata 10-100 mSv) in un periodo antecedente il concepimento (Gardner et al., 1990).

Una tale ipotesi tuttavia non venne facilmente accreditata soprattutto perché in contrasto con i dati di incidenza tumorale nella progenie dei sopravvissuti alle esplosioni atomiche di Hiroshima e Nagasaki. In uno studio di Izumi e collaboratori (Izumi et al., 2003), fu valutata una coorte di nati tra il 1 maggio 1946 ed il 31 dicembre 1984 (concepiti, pertanto, in un intervallo di tempo che va da un mese fino a 38 anni dopo l'esplosione atomica), dei quali almeno uno dei genitori si trovava ad Hiroshima o Nagasaki al momento dell'esplosione. Fu valutata l'incidenza di cancro tra il 1958 ed il 1997, tenendo in considerazione, oltre alla stima di dose assorbita dai genitori, parametri come la città, il sesso, l'anno di nascita e la

migrazione. Furono registrati 575 casi di tumori solidi e 68 di tumori ematopoietici. L'incidenza di cancro nella progenie di individui esposti non si è rivelata più alta rispetto a quella osservata nella progenie di individui non esposti; inoltre non è stato riscontrato un aumento del tasso tumorale con l'aumentare della dose di radiazione.

Uno studio di monitoraggio citogenetico dei livelli di instabilità cromosomica è stato condotto nei figli degli addetti alle operazioni di messa in sicurezza dell'impianto dopo l'incidente alla Centrale Nucleare di Chernobyl (Aghajanyan et al., 2011). Sono state analizzate le frequenze di cellule aberranti, di aberrazioni cromosomiche e di rotture cromatidiche nei linfociti dei padri, delle madri (non esposte) e dei figli. La frequenza di aberrazioni risultò essere simile tra padri e figli e più elevata rispetto a quella delle madri, indipendentemente dall'arco di tempo tra l'esposizione paterna ed il concepimento (da un mese a 18 anni), suggerendo che le cellule della linea germinale maschile esposte a basse dosi di radiazioni possano trasmettere fenomeni di instabilità genomica transgenerazionale.

Studi epidemiologici pianificati per valutare un possibile aumento di tumori in associazione ad una esposizione occupazionale paterna alle radiazioni hanno prodotto risultati inconcludenti (Roman et al., 1999; McKinney et al., 2003) anche per ragioni statistiche. Anche studi precedenti, che avevano esaminato la progenie di padri esposti a basse dosi di radiazioni a scopo diagnostico, avevano suggerito un incremento del tasso di insorgenza di leucemia, ma non avevano potuto raggiungere una conclusione solida (Graham et al., 1966; Shiono et al., 1980; Shu et al., 1988).

Nell'uomo i trattamenti di radioterapia si sono rivelati molto efficaci nella cura del cancro, ma i rischi correlati a tali trattamenti stanno diventando un importante problema clinico. Tali rischi comportano la possibilità di sviluppare un cancro secondario o di trasmettere alle generazioni successive possibili effetti negativi riconducibili all'esposizione parentale alle radiazioni ionizzanti (Merrifield and Kovalchuk, 2013). Non sono ancora disponibili studi sul rischio tumorale nei figli di pazienti curati con radioterapia, ma uno studio basato sull'analisi citogenetica dei linfociti non ha mostrato un aumento di instabilità cromosomica correlabile al trattamento parentale (Tawn et al., 2005). Tuttavia, non essendo i pazienti stati stratificati per età o sesso, fattori che potrebbero fortemente influenzare la probabilità di trasmissione ereditaria di instabilità genomica, le conclusioni di questo studio devono ritenersi non definitive.

Diverse argomentazioni sono state proposte per spiegare le discrepanze osservate negli studi epidemiologici, nonché tra studi epidemiologici e sperimentali.

- 1) Negli studi con animali vengono utilizzate dosi molto più alte (0.36-5 Gy) rispetto a quelle ricorrenti negli studi epidemiologici
- 2) Le popolazioni umane sono state esposte alle radiazioni per lo più negli stadi spermatogoniali, i quali sembrano essere meno radiosensibili rispetto agli stadi postmeiotici del differenziamento germinale maschile
- 3) Esistono differenze nella predisposizione genetica tra l'uomo e i vari ceppi murini
- 4) L'esposizione post-natale ad un ambiente contaminato da radiazioni e/o agenti chimici potrebbe rappresentare un fattore di confondimento rispetto agli effetti ereditari, come suggerito anche dagli esperimenti nei topi
- 5) Gli studi epidemiologici si focalizzano su tumori infantili e leucemie che si sviluppano in età molto giovane (al di sotto dei 20 anni), mentre gli studi sperimentali suggeriscono un incremento anche di tumori con un più lungo periodo di latenza (Nomura, 2000) e di tumori solidi.

Concludendo, la dichiarazione del 7^{mo} rapporto del Committee On Medical Aspects of Radiation in the Environment (COMARE) (2002) secondo la quale “l’induzione del cancro nella progenie di padri irraggiati, è considerata possibile in linea di principio” appare, al momento, come la migliore sintesi delle evidenze sperimentali ed epidemiologiche disponibili.

1.6 RUOLO DEL GENE *PATCHED1* NELLA MODULAZIONE DELLA SUSCETTIBILITA' ALLO SVILUPPO TUMORALE SPONTANEA E RADIO-INDOTTA: I TOPI *PTCH1*^{+/-} COME MODELLO PER STUDI DI CANCEROGENESI SPERIMENTALE.

I modelli animali rappresentano un importante strumento per la comprensione delle funzioni geniche e per lo studio dei meccanismi coinvolti nella cancerogenesi. Tra le varie specie *Mus musculus* rappresenta l'organismo modello di elezione nella ricerca biologica grazie alle sue piccole dimensioni, all'alto tasso riproduttivo, ai bassi costi di mantenimento, alla facilità con la quale il suo genoma può essere manipolato ed analizzato e, in particolare, alla sua similarità fisiologica e genetica con l'uomo. Attualmente sono disponibili numerosi modelli murini geneticamente predisposti all'insorgenza di particolari tumori. Questi modelli sono stati ottenuti sfruttando le metodologie di manipolazione genetica volte ad alterare la funzione o a silenziare l'espressione di specifiche proteine. I modelli murini più promettenti che,

accuratamente, ricapitolano le origini del tumore nell'uomo, sono stati generati attraverso alterazioni nei geni coinvolti nel pathway di Sonic Hedgehog (Shh) (Piedimonte et al., 2005). Il pathway di Shh è il principale regolatore dello sviluppo del cervelletto; la segnalazione di Shh si verifica tramite l'interazione del ligando Shh con il suo recettore Patched (Ptch1), che permette l'inattivazione della repressione di Smoothened (Smo) e la trascrizione di geni targets (Pazzaglia et al., 2006a) (Figura 13).

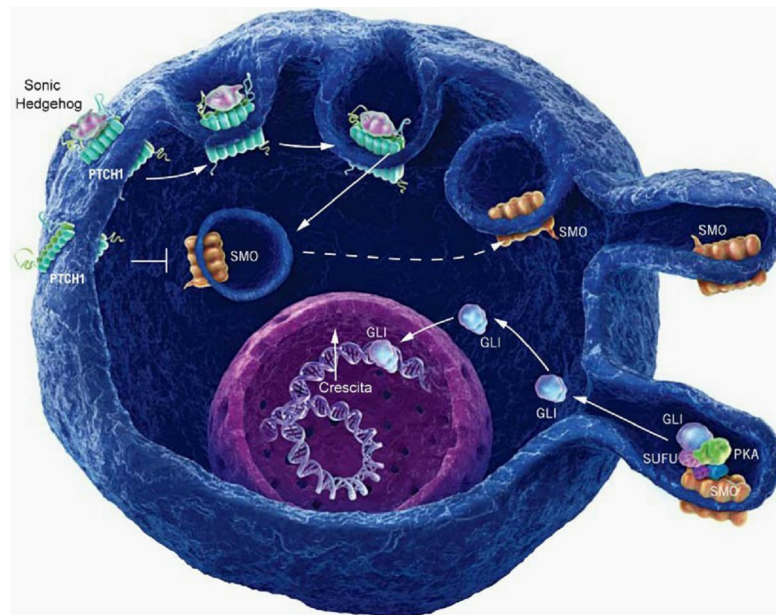


Figura 13: Il pathway di Sonic Hedgehog. Abbreviazioni: PTCH1 – Patched1; SMO – Smoothened; SUFU – Suppressor of Fused; PKA – proteina chinasi A; GLI – fattori di trascrizione omologhi all'oncogene glioma-associato. (Modificata da: <http://www.bioncology.com/bioonc/research/hedgehog/index.m>).

In questo studio è stato utilizzato il modello murino knockout *Ptch1*^{neo6-7/+} (*Ptch1*^{+/-}), ottenuto mediante inattivazione nella linea germinale di una copia del gene tramite la sostituzione degli esoni 6 e 7 con una cassetta di resistenza alla neomicina (Hahn et al., 1998) (Figura 14).

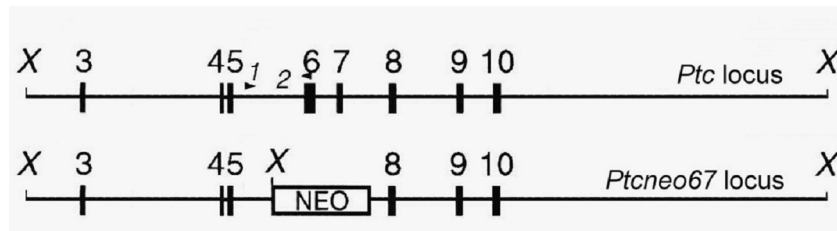


Figura 14: Costrutto genico utilizzato per l'ottenimento di topi knock-out *Ptch1*^{neo6-7/+} (tratta da: Hahn et al., 1998).

L'inattivazione in omozigosi del gene *Ptch1* risulta incompatibile con la vita, poiché causa difetti nello sviluppo dei sistemi nervoso e cardiovascolare e gli animali muoiono al 9°-10° giorno di gestazione. I topi eterozigoti *Ptch1*, invece, sono vitali e rappresentano una perfetta fenocopia della sindrome di Gorlin. Sono, infatti, caratterizzati da un'aumentata dimensione corporea, dalla presenza di cisti e malformazioni scheletriche e, soprattutto, dalla tipica suscettibilità allo sviluppo tumorale spontaneo o in seguito ad esposizione alle radiazioni ionizzanti. I principali tessuti bersaglio dello sviluppo tumorale sono: pelle (carcinoma a cellule basali), muscolo scheletrico (rabdomiosarcoma) e cervelletto (medulloblastoma) (Pazzaglia, 2006).

Il carcinoma a cellule basali si presenta come una papula di dimensioni molto variabili e di aspetto irregolare con margini mal delimitati, spesso con presenza di aree emorragiche e necrotiche (Figura 15A). Il basalioma può insorgere in qualsiasi distretto cutaneo, si accresce molto rapidamente e diffonde radialmente nel tessuto epidermico. Possiede una ridotta capacità invasiva, si insinua nei tessuti circostanti ma rimane circoscritto nel derma ed evolve in metastasi solamente in casi eccezionali (Figura 15B). Istologicamente questo tumore è costituito da cellule con scarso citoplasma e nuclei molto evidenti, organizzate in cordoni ramificati di cellule fortemente adese tra loro, che mostrano una caratteristica disposizione a palizzata (Figura 15C).

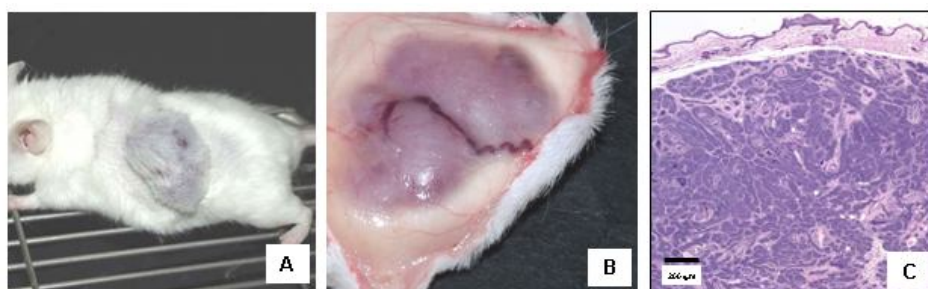


Figura 15: Il basalioma si presenta macroscopicamente come una papula di dimensioni variabili (A) e completamente inglobata nel tessuto cutaneo (B). Sezione istologica di basalioma colorata con ematossilina/eosina(C) (tratta da: Archivio fotografico ENEA).

Il rabdomiosarcoma è un sarcoma dei tessuti molli che si manifesta negli animali eterozigoti sotto forma di masse associate agli arti superiori ed inferiori, alla cavità addominale e toracica (Figura 16A). Al fine di effettuare una precisa diagnosi e stabilire con certezza l'origine muscolare, è necessario effettuare una colorazione specifica che prevede l'utilizzo di una miscela di ematossilina ed acido fosfotungstico (soluzione PTAH) che mette in risalto al microscopio ottico la tipica striatura trasversale del tessuto muscolare (Figura 16B).

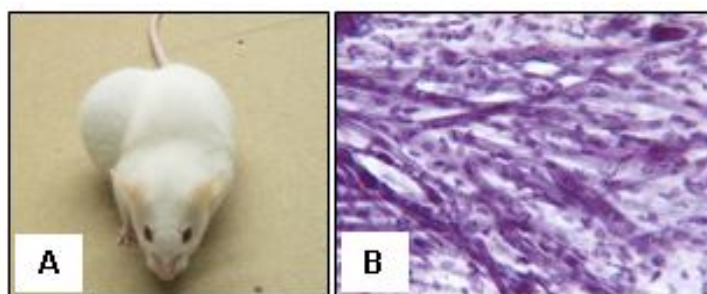


Figura 16: Rabdomiosarcoma in un animale *Ptch*^{+/-} (A). Sezione istologica del tumore colorata con soluzione PTAH (B) (Tratta da: Archivio fotografico ENEA).

Il medulloblastoma è un tumore maligno del Sistema Nervoso Centrale che si sviluppa nella fossa posteriore del cervelletto e in breve tempo determina la morte dell'animale. L'osservazione giornaliera degli animali in esperimento permette di riconoscere tempestivamente i sintomi indotti dallo sviluppo di questa neoplasia (rigonfiamento della

scatola cranica, torsione del capo e paralisi delle zampe posteriori) e quindi l'accurato prelievo del cervello per la valutazione istopatologia (Figura 17).

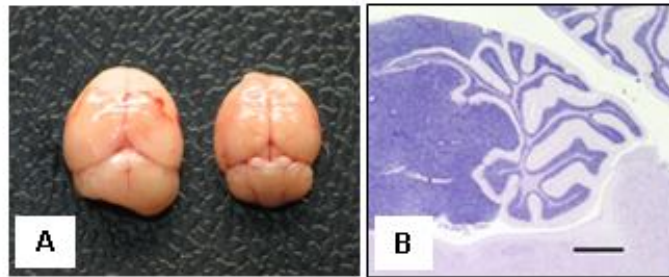


Figura 17: Cervello con medulloblastoma (A, sx) confrontato con un cervello normale (A, dx). E' possibile riconoscere il rigonfiamento della fossa posteriore. Sezione istologica colorata con ematossilina/eosina (B) (tratta da: Archivio fotografico ENEA).

Questo modello animale è risultato estremamente utile sia per identificare gli stadi precoci nello sviluppo del carcinoma a cellule basali e del medulloblastoma, sia per approfondire le conoscenze degli eventi molecolari responsabili dell'insorgenza di questi tumori, che sono in entrambi i casi correlati alla perdita di eterozigosi del gene *Ptch1* (Mancuso et al., 2004; Pazzaglia et al., 2006b).

Per quanto riguarda il medulloblastoma l'inattivazione di uno dei due alleli del gene *Ptch1*, in questo modello murino, agisce sinergicamente con l'esposizione a radiazioni ionizzanti nell'induzione tumorale. Nei topi *Ptch1*^{+/-} l'incidenza spontanea di insorgenza tumorale è pari al 7%. L'esposizione a radiazioni ionizzanti durante la prima settimana post-natale aumenta significativamente l'incidenza tumorale. I primi giorni di vita rappresentano un periodo di estrema suscettibilità allo sviluppo del medulloblastoma radio-indotto, tale finestra di radiosensibilità probabilmente riflette il periodo di attività proliferativa delle cellule precursori dei granuli neuronali (*Cerebellar Granule Neuron Precursors* CGNPs), da cui origina il tumore (Pazzaglia et al., 2006b).

Una caratteristica peculiare di questo modello animale è la comparsa precoce, nel cervelletto, di lesioni preneoplastiche. Tali lesioni possono essere di dimensioni variabili e vanno da aree di iper-proliferazione fino a lesioni nodulari più grandi caratterizzate dalla presenza di un'alta percentuale di cellule atipiche. Le microlesioni sono osservabili sia nel caso di tumori spontanei che nel caso di tumori radio-indotti con livelli di incidenza estremamente diversi. L'analisi molecolare effettuata dopo microdissezione ha evidenziato che la perdita di eterozigosi (*Loss of Heterozygosity*, LOH) di *Ptch1* rappresenta l'evento scatenante che

favorisce la progressione tumorale dallo stadio preneoplastico fino alla fase di medulloblastoma conclamato (Pazzaglia et al., 2006a).

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO

L'induzione di mutazioni in cellule direttamente esposte è considerata la maggior componente di rischio genetico causato dalle radiazioni ionizzanti. Tuttavia, dati recenti sull'incremento del tasso di mutazione nella progenie di genitori irraggiati mettono in evidenza come tale rischio genetico possa essere maggiore rispetto a quanto precedentemente stabilito (Barber et al., 2006). Questa instabilità genomica ereditaria potrebbe avere importanti implicazioni nella suscettibilità al cancro nella progenie di individui irraggiati. Le evidenze sperimentali a questo proposito sono contrastanti e anche le indagini epidemiologiche in coorti di persone esposte a radiazioni ionizzanti per ragioni diagnostiche o occupazionali non hanno tuttora risolto la questione (Gardner et al., 1990; Izumi et al., 2003; Nomura, 2003; Aghajanyan et al., 2011). Attualmente manca un'interpretazione riguardo ai meccanismi inerenti gli effetti transgenerazionali radio-indotti osservati in questi studi. Tali effetti, però, non sembrano seguire i tassi di mutazione indotti generalmente dalle radiazioni, né un'ereditarietà di tipo Mendeliano. Recentemente il paradigma classico della radiobiologia, secondo cui l'energia trasferita nelle cellule colpite da radiazioni sia il meccanismo alla base dell'induzione di mutazione e danno al DNA, è stato messo in discussione dalla dimostrazione dell'esistenza dei cosiddetti "effetti non-target". Tali effetti si manifestano in cellule non esposte direttamente alle radiazioni ionizzanti e che sono separate nello spazio (bystander) o nel tempo (discendenti) da quelle irraggiate (Illytsky and Kovalchuk, 2011). La mutagenesi non-target transgenerazionale radio-indotta, che si può manifestare alcune generazioni cellulari dopo la prima divisione, è stata elegantemente dimostrata attraverso l'induzione di mutazione nell'allele materno della progenie di topi maschi irraggiati (Niwa, 2006). Al momento, si sta verificando l'ipotesi che l'instabilità genomica transgenerazionale possa essere di natura epigenetica e mediata tramite cambiamenti nei livelli di metilazione del DNA (Tamminga and Kovalchuk, 2011) o da alterazioni del microRNAoma (Koturbash et al., 2006). Sono state ottenute alcune informazioni in questa direzione, ma finora non è stato ancora delineato un quadro abbastanza chiaro. Con il progresso nelle terapie, un'alta percentuale di individui malati di cancro può avere aspettative di vita maggiori, vivere una vita normale e avere dei figli; pertanto sono necessari ulteriori studi sul rischio di

cancerogenesi transgenerazionale. Gli studi epidemiologici umani hanno un limitato potere statistico poiché si basano su un esiguo numero di pazienti e si presentano difficoltà quali la ricostruzione della dose a cui sono stati sottoposti o il monitoraggio a lungo termine. Alla luce di queste evidenze, si rendono necessari studi con modelli animali ben caratterizzati, altamente sensibili per poter stimare il rischio transgenerazionale in relazione alla dose somministrata e al tempo di concepimento post-trattamento al fine di poter sviluppare nuovi modelli di rischio che includano anche la problematica degli effetti transgenerazionali.

Lo scopo di questo progetto di dottorato è stato quello di testare l'ipotesi che l'esposizione a radiazioni potesse influenzare la suscettibilità allo sviluppo di tumori nella progenie di padri irraggiati. Per verificare questa ipotesi è stato utilizzato un modello murino ben caratterizzato, altamente suscettibile allo sviluppo tumorale. Tale modello sperimentale è costituito da topi eterozigoti per il gene *Patched1* (*Ptch1*^{+/-}), caratterizzati da un'alterazione del pathway di segnalazione di Sonic Hedgehog (Shh) che controlla la proliferazione cellulare, il differenziamento e il modellamento dei tessuti durante l'embriogenesi. La cascata di segnalazione di Shh è, inoltre, coinvolta nella crescita tumorale specialmente a livello del sistema nervoso centrale, della pelle e del tessuto muscolare (Barakat et al., 2010). Grazie alla particolare suscettibilità alla cancerogenesi radio-indotta, l'uso di questo modello murino si è rivelato particolarmente efficace per dimostrare, per la prima volta *in vivo*, che gli effetti non-target delle radiazioni potenziano la cancerogenesi in tessuti bystander (Mancuso et al., 2008). Al fine di generare una F1 oggetto dello studio di cancerogenesi transgenerazionale e delle analisi di instabilità genomica, topi maschi (P) CD1 irraggiati con 1 Gy di raggi X a 3 mesi di età, sono stati accoppiati con femmine *Ptch1*^{+/-} non irraggiate. Gli animali sono stati accoppiati 6 settimane dopo l'irraggiamento per verificare l'ipotesi, suggerita da dati di letteratura, che gli effetti transgenerazionali siano mediati dall'esposizione delle cellule germinali allo stadio di spermatogoni in differenziamento (Barber et al. 2006).

La ricerca sperimentale di questa tesi di dottorato si è articolata seguendo tre obiettivi principali: lo studio di cancerogenesi transgenerazionale; lo studio dell'instabilità genomica in tessuti suscettibili (cervelletto) e non (midollo osseo e milza) ai tumori nei topi F1; lo studio degli effetti delle radiazioni nelle cellule germinali dei topi P.

Nella progenie *Ptch1*^{+/-} l'incidenza e il tempo di latenza di tumori del cervelletto (medulloblastoma) sono stati confrontati con quelli di soggetti provenienti da genitori non irraggiati. Lo scopo principale dello studio di cancerogenesi era quello di verificare se l'irraggiamento di cellule germinali maschili di topo allo stadio di spermatogoni in proliferazione potesse indurre nella progenie un aumento dell'incidenza spontanea di

medulloblastoma o incrementare la suscettibilità dello strato granulare esterno del cervelletto neonatale all'effetto cancerogeno di una singola dose acuta di radiazioni.

I medulloblastomi radio-indotti nei topi *Ptch1*^{+/-} sono caratterizzati dalla perdita di eterozigosità (LOH) per inattivazione dell'allele selvatico a causa di una delezione interstiziale sul cromosoma 13. Abbiamo quindi voluto verificare l'ipotesi che l'eventuale aumento dei casi di medulloblastoma nella progenie dei padri irraggiati potesse essere dovuto ad una quota addizionale di tumori insorti a seguito di un diverso meccanismo di inattivazione dell'allele selvatico. A tale scopo è stata condotta l'analisi dei microsatelliti marcatori della regione genomica di interesse.

Nei topi *Ptch1*^{+/-} i tumori si sviluppano nel cervelletto a partire da lesioni preneoplastiche la cui evoluzione è ben caratterizzata. L'incidenza e la dimensione delle lesioni preneoplastiche sono state confrontate, a 4 e 8 settimane dopo la nascita, nella progenie irraggiata a 2 giorni di età concepita da padri esposti o non esposti alle radiazioni per valutare se l'eventuale aumento di incidenza tumorale nella progenie dei padri irraggiati fosse riconducibile a modificazioni nella fase di progressione delle lesioni preneoplastiche a tumore conclamato. Per investigare il destino delle lesioni preneoplastiche è stata condotta un'analisi immunoistochimica usando anticorpi contro marcatori di proliferazione cellulare (PCNA) e di differenziamento neuronale (NeuN). Infine, per completare lo studio della cancerogenesi transgenerazionale è stata effettuata un'analisi istomorfometrica dello strato granulare esterno del cervelletto in topi di 14 giorni, non irraggiati, provenienti da padri irraggiati e non, per chiarire se le eventuali differenze osservate nelle lesioni preneoplastiche fossero riconducibili ad una modificazione intrinseca (cioè indipendente dall'irraggiamento) del differenziamento neonatale delle cellule bersaglio correlata all'esposizione paterna.

Inoltre, un gruppo di topi *Ptch1*^{+/-} della generazione F1 è stato irraggiato a 2 giorni di età per valutare un possibile aumento del livello spontaneo o radioindotto di danno al DNA nelle cellule del cervelletto e l'efficienza dei meccanismi di riparazione di tale danno. Il test della cometa, usato per valutare le lesioni del DNA nelle cellule di cervelletto, è stato inoltre applicato per stabilire se l'irraggiamento paterno potesse indurre fenomeni di instabilità genomica in cellule del sistema ematopoietico nella progenie adulta.

Infine, oggetto di studio sono stati gli spermatozoi paterni, quale anello di congiunzione e veicolo di informazioni tra una generazione e l'altra.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO SPERIMENTALE

Topi maschi CD1 irraggiati con 1 Gy di raggi X a 3 mesi di età, sono stati accoppiati con femmine *Ptch1*^{+/-} non irraggiate. Gli animali sono stati accoppiati 6 settimane dopo l'irraggiamento per verificare l'ipotesi, suggerita da dati di letteratura, che gli effetti transgenerazionali siano mediati dall'esposizione di cellule germinali allo stadio di spermatogoni in differenziamento (Barber et al., 2006). Nella progenie *Ptch1*^{+/-} sono stati valutati l'incidenza e il tempo di latenza di tumori del cervelletto (medulloblastoma) confrontandoli con i dati ottenuti su un gruppo di soggetti provenienti da genitori non irraggiati. Parallelamente, un altro gruppo di topi *Ptch1*^{+/-} della generazione F1 è stato irraggiato con una dose di 1 Gy di raggi X a 2 giorni di età per valutare un eventuale aumento della radiosensibilità all'insorgenza tumorale in una fase di sviluppo già caratterizzata sotto questo aspetto; anche in questo caso i dati sono stati confrontati con quelli ottenuti in soggetti provenienti da genitori non irraggiati. In tali gruppi sperimentali sono stati analizzati, inoltre, la LOH al locus *Ptch1* nelle cellule tumorali e la progressione delle lesioni preneoplastiche. Un gruppo di animali della F1 è stato irraggiato a 2 giorni di età con 1 Gy di raggi X per valutare il danno al DNA e la capacità di riparazione di tale danno nelle cellule del cervelletto. Un ulteriore gruppo di animali della F1 è stato sacrificato a 3 mesi di età per valutare un'eventuale instabilità genomica spontanea e radio-indotta (trattando gli animali con 0.1 Gy di raggi X) in tessuti non bersaglio, quali il midollo osseo e la milza. Inoltre, nei topi maschi CD1 (padri) è stato valutato l'effetto tossico dell'irraggiamento sulle cellule germinali analizzando la variazione nel numero di spermatozoi epididimali ed il danno al DNA mediante il test della cometa, sei settimane dopo l'irraggiamento (Figura 18).

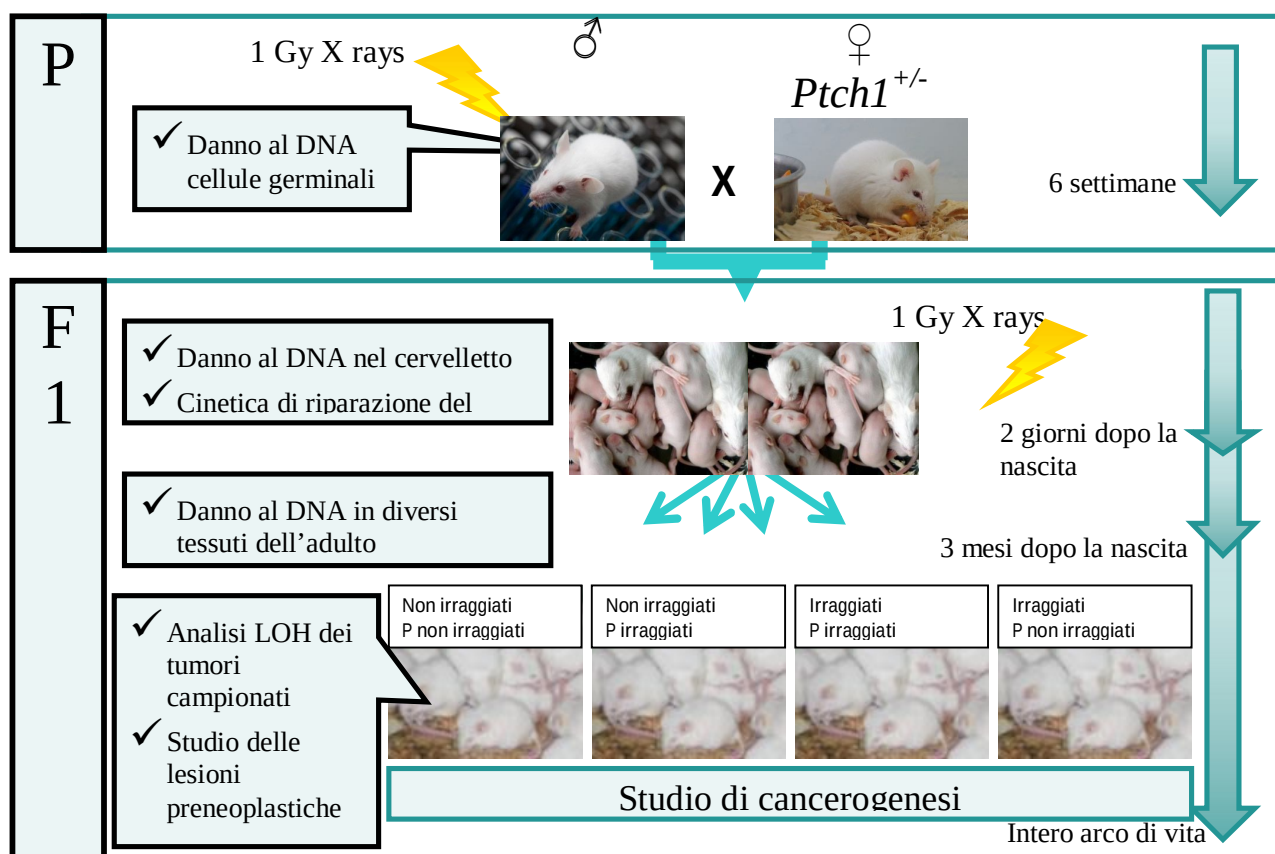


Figura 18: Disegno sperimentale.

3.2 ANIMALI

Per la realizzazione di questo progetto sono stati utilizzati 269 topi trattati secondo le linee guida per la sperimentazione animale dell'ENEA, approvate dal Ministero della Sanità. Gli animali sono stati alloggiati in apposite gabbie Tecniplast (massimo 5 per gabbia) dotate di contenitori per acqua e cibo, somministrati *ad libitum*, separati in base al sesso ed opportunamente numerati per consentirne una rapida identificazione. La stabulazione è stata effettuata ad una temperatura costante di 20°C, ad un tasso di umidità pari al 55% e con un ciclo giornaliero di 12 ore di luce/buio.

3.3 GENOTIPIZZAZIONE

La colonia murina, oggetto dello studio, è stata ottenuta incrociando maschi CD1 $Ptch1^{+/+}$ con femmine $Ptch1^{+/-}$. In questo studio è stata impiegata sia la progenie di genotipo selvatico che eterozigote per il gene $Ptch1$. Dal momento che gli animali eterozigoti sono

fenotipicamente indistinguibili dalla controparte selvatica è stato necessario procedere con l'analisi genotipica di ogni animale. Tale analisi prevede due fasi: l'estrazione del DNA genomico e la sua successiva caratterizzazione mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR).

Estrazione del DNA genomico

Al momento dello svezzamento da ciascun animale è stata prelevata l'estremità della coda e conservata a -20°C per la successiva estrazione del DNA, effettuata con il Genomic DNA from tissue, Nucleospin 96 Tissue Core Kit (Macherey-Nagel). Il processo di estrazione impiegato è stato il seguente:

- Sono stati posizionati fino a due frammenti di coda di 0.5 cm (20 mg) nelle piastre da 96 pozzetti ed incubati in una soluzione di lisi contenente proteinasi K a 56°C per almeno 6 ore
- Per favorire il legame del DNA alla membrana di silice, è stata aggiunta una soluzione contenente etanolo 96-100% e le piastre sono state agitate vigorosamente; i campioni lisati sono stati quindi trasferiti in una nuova piastra (Nucleospin Tissue Binding Plates) per consentire il legame del DNA alla membrana di silice
- Per permettere il legame del DNA alla membrana è stato applicato il vuoto fino a quando tutti i lisati sono passati attraverso i pozzetti (-0.2 bar; 5 minuti). Quindi è stato rilasciato il vuoto
- Per rimuovere completamente i sali sono stati effettuati tre lavaggi con tamponi forniti dal kit utilizzando il vuoto. La membrana è stata, quindi essiccata, applicando il massimo vuoto (almeno -0.6 bar) per 10 minuti.
- Il DNA è stato eluito utilizzando tampone BE pre-riscaldato ed applicando il vuoto (-0.4 bar; 2 minuti)

Analisi genotipica mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

La tecnica della PCR permette l'amplificazione di una sequenza di DNA d'interesse di cui siano note le sequenze fiancheggianti tale regione. La reazione di PCR prevede tre fasi: una fase di denaturazione, in cui vengono separati i filamenti di DNA; una fase di appaiamento, in cui i singoli filamenti si appaiano con i primers specifici; una fase di allungamento, in cui avviene la sintesi della nuova catena di DNA da parte della Taq DNA polimerasi.

Allo scopo di distinguere i topi *Ptch1*^{+/-} dai topi *Ptch1*^{+/+} nella miscela di reazione sono stati impiegati contemporaneamente primers specifici per l'allele mutato, contenente l'inserto NEO (pst e neoL), e per l'allele wild type (pst e mptc) (Figura 19).

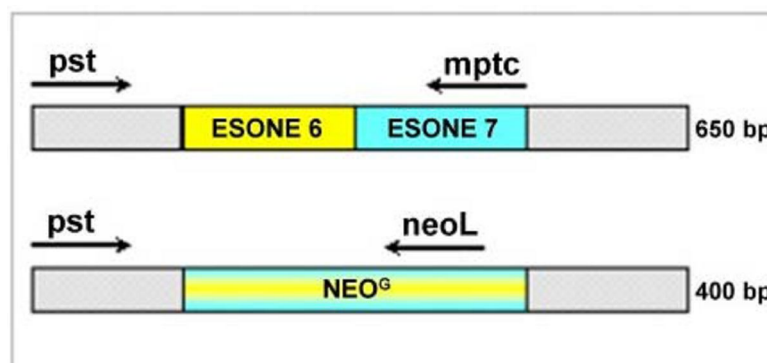


Figura 19: Schema del frammento amplificato e del posizionamento dei primers.

Le sequenze dei primers utilizzati per amplificare le regioni corrispondenti ai due alleli (wild type e mutato) sono le seguenti:

- pst 5' – GGG AGG GGA TTT CAG CAG AAT GTT – 3'
- neoL 5' – AGT GCC AGC GGG GCT GCT AAA – 3'
- mptc 5' – CTG CCT GTT ATG TGG TTC AAA CCG – 3'

Il DNA genomico (0.1 µg) è stato amplificato in un volume di reazione finale di 50 µL.

Tabella Reazione di PCR:

Miscela di reazione: 50 µL	Programma di PCR			
	Processo	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
0.1µg di DNA	Hot start	95°C	4 minuti	1 ciclo
Buffer 1X	Denaturation	95°C	45 secondi	
1 mM di primer pst	Annealing	58°C	2 minuti	40 cicli
0.5 µM di primer mptc				
0.5 µM di primer neoL	Elongation	72°C	3 minuti	
200 µM di Dntp				
0.2 U di Taq DNA Polimerasi		72°C	10 minuti	1 ciclo
H ₂ O				

Le bande attese hanno una lunghezza di circa 650 bp per l'allele wild type e 400 bp per l'allele mutato. I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi in gel d'agarosio (Gibco) a basso punto di fusione ad una concentrazione dell'1.8% in TBE 1X (Tris base 89mM, acido borico 89mM ed EDTA 2mM, pH 8.3) e visualizzati al transilluminatore tramite colorazione con bromuro di etidio 10 mg/ml). La corsa elettroforetica è stata condotta per circa 1 ora e 30 minuti in tampone TBE 1X a 80 V.

3.4 TRATTAMENTI CON RAGGI X

Topi maschi P (padri) sono stati irradiati sei settimane prima dell'accoppiamento con 1 Gy di raggi X. Parte della loro progenie F1 è stata irradiata a due giorni di vita post-natale con 1 o 2 Gy di raggi X per l'analisi dell'induzione e riparazione di danni al DNA, dell'induzione di lesioni preneoplastiche e tumori nel cervelletto. Altri animali della generazione F1 sono stati irradiati con 0.1 Gy di raggi X a 3 mesi di età per lo studio dell'instabilità genomica radio-indotta nelle cellule di midollo osseo. Per ogni gruppo sperimentale, è stato considerato anche un gruppo equivalente non irradiato (controllo). Per l'esposizione ai raggi X è stata utilizzata una macchina radiogena Gilardoni modello CHF 320G (Gilardoni S.p.A., Mandello del Lario, Lecco, Italia).

3.5 STUDIO DELL'INSORGENZA TUMORALE

Disegno sperimentale

Sono stati considerati quattro gruppi sperimentali: 59 animali F1 irradiati da P irradiati; 70 animali F1 non irradiati da P irradiati; 52 animali F1 irradiati da P non irradiati; 96 animali F1 non irradiati da P non irradiati.

Analisi

Gli animali sono stati osservati quotidianamente per verificarne le condizioni di salute. In presenza di un evidente stato di sofferenza, derivante dalla presenza del medulloblastoma, gli animali sono stati sacrificati e sottoposti ad esame autoptico. Gli interi cervelletti sono stati fissati in formaldeide al 4% in PBS 1X (pH 7.8) per 24 ore per l'analisi immunohistochimica. L'incidenza tumorale è stata espressa in termini di percentuale di animali con medulloblastoma presenti nel gruppo sperimentale considerato.

3.6 STUDIO DELLE LESIONI PRENEOPLASTICHE

Disegno sperimentale

Sono stati considerati i seguenti gruppi sperimentali: F1 irraggiati da P non irraggiati e F1 irraggiati da P irraggiati. Le lesioni preneoplastiche sono state osservate a 4 ed 8 settimane post-irraggiamento.

Tecnica

Dopo la fissazione il tessuto deve essere incluso in paraffina in modo da avere una rigidità sufficiente per permettere il successivo taglio delle sezioni. Prima dell'inclusione in paraffina è necessario eliminare i residui di fissativo ed acqua, disidratando il tessuto tramite una scala alcolica e chiarificando in xilolo. L'uso dello xilolo è necessario in quanto agenti deidratanti come gli alcoli sono immiscibili col mezzo d'inclusione.

Dopo 24 ore di incubazione in fissativo, i campioni sono stati sottoposti ai seguenti passaggi:

- da 3 a 24 ore in EtOH 50%
- 24 ore in EtOH 70%
- 1 ora in EtOH 95%
- 2 x 45 minuti in EtOH assoluto
- 30 minuti in EtOH assoluto/xilolo (1:1)
- 1 ora in xilolo
- 2 x 30 minuti in xilolo/paraffina (1:1)
- 3 x 30 minuti in paraffina

Dopo l'ultimo passaggio il campione è stato posto in vaschette di metallo ed opportunamente orientato per ottenere una sezione di taglio ideale; su di esso è stata quindi versata paraffina fusa sino al riempimento della vaschetta. Le inclusioni così preparate sono state conservate a +4°C.

Mediante l'uso di un microtomo sono state allestite su vetrino sezioni di 4 µm di tessuto incluso in paraffina; quindi i vetrini sono stati lasciati ad asciugare su piastra riscaldante a 42°C per tutta la notte.

I vetrini così preparati sono stati colorati con ematossilina/eosina per permettere l'identificazione delle strutture tissutali. L'ematossilina lega i componenti cellulari basici che si trovano prevalentemente nel nucleo conferendo una tipica colorazione blu, l'eosina lega i componenti carichi positivamente, come molte proteine cellulari, conferendo un tipica

colorazione rosa al citoplasma. Le sezioni, prima della colorazione, sono state deparaffinate ed idratate secondo i seguenti passaggi:

- 15 minuti in xilolo
- 5 minuti in EtOH assoluto, EtOH 95%, EtOH 70%, EtOH 50%, EtOH 30%
- 5 minuti in H₂O
- 15 minuti in ematossilina di Mayer (Bio-Optica, Milano, Italia)
- 10 minuti in H₂O corrente
- 10 secondi di differenziamento in tampone acido (HCl 1% in EtOH 70%)
- 10 minuti in H₂O corrente
- 10 minuti in eosina acquosa 1% (Bio-Optica, Milano, Italia)
- 10 minuti in H₂O corrente

Le sezioni sono state nuovamente deidratate, incubate in xilolo ed infine montate con un copri oggetto tramite Balsamo del Canada.

I vetrini sono stati osservati ad un microscopio ottico (Nikon Eclipse E800) ed analizzati tramite software per analisi di immagini (IAS, Delta Sistemi, Italia).

3.7 IMMUNOMARCATURA DELLE SEZIONI DI CERVELLETTO

L'immunomarcatura è stata effettuata su sezioni istologiche dello spessore di 4 µm, precedentemente deparaffinate ed idratate attraverso una scala alcolica analoga a quella utilizzata per la colorazione. Trattandosi di anticorpi monoclonali è stato usato il Kit Histo-MouseTM (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA) opportunamente sviluppato per utilizzare anticorpi monoclonali su sezioni di tessuto murino.

- Smascheramento antigenico: le sezioni sono state portate ad ebollizione nel microonde in tampone sodio citrato pH6 e mantenute in sub-ebollizione per 20 minuti. Questo passaggio permette di favorire il rilevamento dell'antigene ed il successivo legame con l'anticorpo
- Inibizione delle perossidasi endogene con 3% di H₂O₂ in MeOH per 10 minuti: questo passaggio è necessario per evitare la formazione di falsi positivi, ovvero del legame di perossidasi endogene al sistema enzimatico utilizzato per il riconoscimento antigenico
- Incubazione con BSA o siero normale al 5% per 20 minuti: questo passaggio permette di bloccare i siti aspecifici

- Incubazione per 1 ora a temperatura ambiente o tutta la notte a +4°C con l'anticorpo primario diluito in PBS 1X. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

Anti-PCNA (EMD4Biosciences, USA), monoclonale, diluito 1:100

Anti-NeuN (Millipore, USA), monoclonale, diluito 1:100

- Incubazione con l'anticorpo secondario per 30 minuti a temperatura ambiente
- Per la successiva rivelazione del segnale è stato impiegato come cromogeno il 3-ammino-9-etilcarbazolo (AEC) che, ossidandosi in presenza di ossidasi e H₂O₂ (incubazione 13 minuti), produce un precipitato rosso
- Controcolorazione dei vetrini in ematossilina e montaggio secondo il protocollo classico

3.8 ANALISI ISTOLOGICA DEL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO GRANULARE ESTERNO DEL CERVELLETTO

Disegno sperimentale

5 animali della generazione F1 non irraggiata provenienti da soggetti P, irraggiati e non irraggiati, sono stati sacrificati a 14 giorni di vita post-natale per l'analisi istologica dello strato granulare esterno del cervelletto dal quale origina il medulloblastoma.

Analisi

Per valutare un'eventuale differenza nel bilancio tra proliferazione e differenziamento delle cellule dello strato granulare esterno tra animali provenienti da padri irraggiati o meno, lo spessore di quest'ultimo è stato misurato mediante un programma di analisi dell'immagine.

3.9 ANALISI DELLA LOH AL LOCUS *PTCH1*

Disegno sperimentale

E' stata analizzata la LOH in 30 campioni di DNA tumorale, effettuando un confronto con 30 campioni di DNA non tumorale (estratto dalla milza), nel gruppo di animali F1 irraggiati da P irraggiati.

Estrazione del DNA

Ai primi segni di sofferenza, gli animali sono stati sacrificati e da ciascun animale sono stati prelevati un frammento di tumore (per l'analisi del DNA tumorale) e la milza (per l'analisi del DNA genomico). Tali campioni sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA, effettuata con il Nucleospin 96 Tissue Core Kit (Macherey-Nagel) seguendo la stessa procedura descritta precedentemente per la genotipizzazione. La concentrazione del DNA purificato ottenuto è stata determinata tramite lettura allo spettrofotometro a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento del DNA.

PCR

Tabella reazione di PCR:

Miscela di reazione: 25 µL	Programma di PCR			
	Processo	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
6 µL di DNA (0.2µg/µL)	Hot start	95°C	4 minuti	1 ciclo
12.5 µL di Go Taq Hot Start Green Master mix, 2X	Denaturation	95°C	45 secondi	
1.25 µL di primer Forward	Annealing	55°C	2 minuti	34 cicli
1.25 µL di primer Reverse				
4 µL di H ₂ O	Elongation	72°C	3 minuti	
		72°C	10 minuti	1 ciclo

I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi in gel d'agarosio (Gibco) a basso punto di fusione ad una concentrazione del 3% in TBE 1X (Tris base 89mM, acido borico 89mM ed EDTA 2mM, pH 8.3) e visualizzati al transilluminatore tramite colorazione con bromuro di etidio 10 mg/ml). La corsa elettroforetica è stata condotta per circa 1 ora in tampone TBE 1X a 100 V.

3.10 TEST DELLA COMETA PER LA VALUTAZIONE DEL DANNO NEGLI SPERMATOZOI DEI TOPI P E NELLE CELLULE DEL CERVELLETTO, DEL MIDOLLO OSSEO E DELLA MILZA DELLA GENERAZIONE F1

Disegno sperimentale.

Per la valutazione del danno al DNA negli spermatozoi dei topi P sono stati utilizzati 16 animali, una parte dei quali è stata irraggiata con 1 Gy di raggi X. Tutti gli animali sono stati sacrificati alla fine del periodo di accoppiamento.

Per la valutazione del danno al DNA e riparazione nelle cellule del cervelletto di topi F1 sono stati utilizzati 70 animali, una parte dei quali è stata irraggiata a 2 giorni di età con 1 Gy di raggi X. Tutti gli animali sono stati sacrificati a 2 giorni di vita. Il test della cometa è stato condotto immediatamente ed 1 ora dopo l'irraggiamento per stimare il danno indotto e la successiva riparazione. E' stata, inoltre, effettuata un'analisi dopo una dose di 2 Gy di raggi X per ottenere una curva dose-risposta.

Per l'analisi dell'instabilità genomica spontanea nel midollo e nella milza di topi F1 adulti sono stati utilizzati 72 animali da P irraggiati e non irraggiati. Gli animali sono stati sacrificati a 3 mesi di età.

Preparazione campioni

- Spermatozoi: le sospensioni cellulari, ottenute dalla disgregazione della *cauda epididimi*, sono state centrifugate e risospese in PBS (circa 10^7 cellule/ml)
- Cervelletto: le sospensioni cellulari sono state ottenute tramite pestellamento di ciascun cervelletto in 300 μ L di PBS e flussaggio tramite pipetta Pasteur
- Midollo osseo: le sospensioni di cellule del midollo osseo, ottenute flussando i femori degli animali, sono state centrifugate e risospese in PBS (circa 10^7 cellule/ml)
- Milza: gli splenociti sono stati separati mediante stratificazione su Histopaque 1077 della sospensione cellulare ottenuta in seguito a disgregazione della milza. Le cellule sono state centrifugate e risospese in PBS (circa 10^7 cellule/ml)

Tecnica

Le cellule di cervelletto, midollo osseo e gli splenociti sono stati analizzati mediante il test della cometa di tipo alcalino. In breve, le sospensioni cellulari sono state miscelate con 65 μ l di gel di agarosio a basso punto di fusione 0.7% (w/v) (Bio-Rad, Hercules, CA) e deposte tra un sottile strato di gel di agarosio ad alto punto di fusione 1% (w/v) (Bio Rad) e un altro strato di gel d'agarosio a basso punto di fusione 0.7% (w/v) su vetrini da microscopia (Carlo Erba,

Milano, Italia). I vetrini sono stati immersi in una soluzione di lisi (2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris, pH 10; 10% DMSO, 1% Triton X-100) *overnight* a 4°C. Dopo completamento della lisi, i vetrini sono stati posti in un apparato elettroforetico orizzontale contenente tampone per elettroforesi alcalino fresco (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH=13) per 25 min a 4°C per mettere in evidenza i siti alcali-labili e convertirli in rotture a singola elica. L'elettroforesi è stata effettuata a 4°C per 25 min, 25 V (0.8V/cm) e 300 mA, usando un alimentatore Hoefer (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., S. Francisco, CA, USA). Dopo l'elettroforesi, i vetrini sono stati immersi in sodio acetato 0.3 M in etanolo per 30 min. I vetrini sono stati, quindi, deidratati in etanolo assoluto per 2 ore e immersi per 5 min in etanolo 70%; successivamente sono stati lasciati asciugare all'aria, a temperatura ambiente. Al momento dell'analisi, i vetrini sono stati colorati con 12 µg/ml di bromuro di etidio ed esaminati ad un ingrandimento 200X con un microscopio a fluorescenza Olympus. I vetrini sono stati analizzati con un sistema di analisi d'immagine automatizzato (IAS Delta Sistemi, Rome, Italy). L'intensità totale di fluorescenza di ogni cometa è stata considerata come una misura del contenuto di DNA. Per valutare la quantità di danno al DNA è stato utilizzato come parametro la frazione di DNA migrato nella cometa calcolato per ciascuna delle cellule analizzate. Sono state analizzate 100 cellule per ciascun topo provenienti da 2 diversi vetrini. Il test della cometa di tipo neutro è stato applicato per la valutazione delle doppie rotture della molecola di DNA degli spermatozoi. La procedura di preparazione dei vetrini e di lisi cellulare è la stessa del metodo alcalino. Dopo la lisi i vetrini sono stati incubati per 30 minuti a 4°C in una soluzione 10 mM Ditiotreitolo. I vetrini sono stati quindi posti nell'apparato elettroforetico contenente tampone TBE (2 mM Na₂EDTA, 90 mM Tris, 90 mM acido borico, pH 8.0). L'elettroforesi è stata effettuata per 5 minuti a 4°C, 25 V, 10 mA. Le condizioni di fissazione ed analisi sono state le stesse del metodo alcalino.

3.11 TEST DEL MICRONUCLEO NEL MIDOLLO OSSEO DI TOPI F1 ADULTI

Disegno sperimentale

L'analisi è stata condotta su un totale di 22 animali suddivisi in 4 gruppi sperimentali costituiti da topi F1 maschi non irraggiati o irraggiati con una dose di 0.1 Gy di raggi X discendenti da P irraggiati o non irraggiati. Gli animali sono stati sacrificati a tre mesi di età, per valutare eventi di instabilità cromosomica spontanea o radio-indotta.

Tecnica

Le sospensioni cellulari, ottenute mediante flussaggio dei femori con siero fetale bovino (FBS), sono state centrifugate e risospese. E' stata depositata una goccia di sospensione cellulare su un vetrino portaoggetto e quindi effettuato uno striscio. I vetrini sono stati lasciati asciugare all'aria per 30 minuti, quindi sono stati fissati in metanolo assoluto per 10 minuti e lasciati asciugare all'aria per almeno due ore.

La colorazione è stata effettuata immergendo i vetrini in una soluzione di Giemsa 5% in tampone fosfato, risciacquandoli e lasciandoli asciugare all'aria. L'osservazione è stata effettuata mediante un microscopio a luce diretta (Zeiss, West Germany) ad ingrandimento 1000X.

La frequenza dei micronuclei è stata valutata analizzando 2000 eritrociti policromatici (PCE) per ogni campione.

3.12 ANALISI STATISTICA

Per tutte le analisi effettuate ed in ogni condizione sperimentale, i dati individuali di ciascun topo sono stati considerati come unità sperimentale. Sono stati calcolati i valori medi e gli errori standard relativi ad ogni gruppo omogeneo. La curva di cinetica tumorale, in funzione dell'incidenza e del tempo di latenza, è stata ottenuta utilizzando il programma GraphPad Prism versione 4.02 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). E' stato applicato il test t di Student per valutare differenze statisticamente significative tra i vari gruppi sperimentali. Le differenze sono state considerate significative per valori di $P < 0.05$.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 CANCEROGENESI TRANSGENERAZIONALE

4.1.1 Studio di cancerogenesi transgenerazionale

La figura 20 mostra le curve di incidenza di medulloblastoma. Tutti gli animali oggetto dello studio di cancerogenesi sono di genotipo *Ptch1*^{+/-}. I dati sono stati ottenuti monitorando gli animali nel tempo; ai primi segni di sofferenza gli animali sono stati sacrificati e verificata la presenza del medulloblastoma. La figura è composta da 4 curve corrispondenti ai 4 gruppi sperimentali osservati:

- | | |
|---|------------------|
| 1. progenie irradiata da padre irradiato: | P-1Gy (F1-1Gy) |
| 2. progenie irradiata da padre non irradiato: | P-0 Gy (F1-1Gy) |
| 3. progenie non irradiata da padre irradiato: | P-1 Gy (F1-0 Gy) |
| 4. progenie non irradiata da padre non irradiato: | P-0 Gy (F1-0 Gy) |

Nei gruppi 3 e 4, generati rispettivamente da padri irradiati e non irradiati, sono stati confrontati l'incidenza spontanea ed il tempo di latenza di tumori del cervelletto (medulloblastoma). I gruppi 1 e 2, generati rispettivamente da padri irradiati e non irradiati, sono stati irradiati con una dose di 1 Gy di raggi X a 2 giorni di età per valutare se l'esposizione paterna potesse influenzare la radiosensibilità all'insorgenza tumorale in una fase di sviluppo già caratterizzata sotto questo aspetto (Pazzaglia et al., 2006). I dati mostrano che l'incidenza spontanea di medulloblastoma è relativamente bassa e simile nella progenie dei padri irradiati e non irradiati. Come atteso, l'irraggiamento a 2 giorni di età induce un aumento dell'incidenza di medulloblastoma. Le curve mostrano una maggiore incidenza di tumori radio-indotti nella progenie dei padri irradiati (62,71%) rispetto a quella dei non irradiati (44,23%) anche se la differenza è ai limiti della significatività statistica.

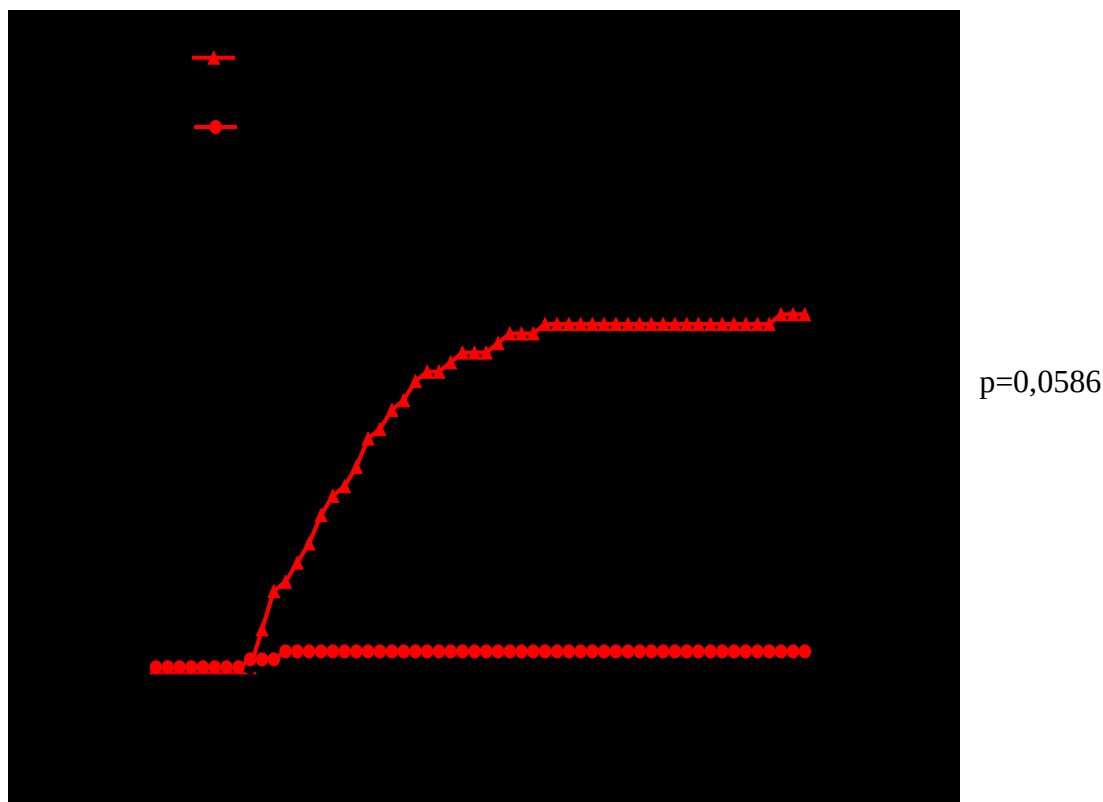


Figura 20: Curve di incidenza di medulloblastoma nei 4 gruppi sperimentali considerati: F1 irraggiati generati da P irraggiati [P-1Gy(F1-1Gy)], F1 irraggiati generati da P non irraggiati [P-0Gy(F1-1Gy)], F1 non irraggiati generati da P irraggiati [P-1Gy(F1-0Gy)], F1 non irraggiati generati da P non irraggiati [P-0Gy(F1-0Gy)].

4.1.2 Meccanismi (epi)genetici di inattivazione dell'allele *Ptch1* selvatico.

Studi precedenti hanno dimostrato la perdita per delezione di una regione specifica del cromosoma 13 nei medulloblastomi spontanei e radio-indotti nei topi *Ptch1*^{+/-} (Pazzaglia et al., 2006a). In questo studio si è voluto verificare se la maggiore incidenza di tumori radio-indotti osservata nella progenie di padri irraggiati potesse coinvolgere meccanismi diversi rispetto alla perdita per delezione dell'allele wild-type *Ptch1*. Con questo scopo, la perdita di eterozigotà (LOH) nei tumori radio-indotti nella progenie di padri irraggiati, è stata analizzata usando un numero minimo di 6 marcatori di microsatelliti informativi del cromosoma 13. L'analisi è stata condotta sul DNA tumorale e sul DNA di tessuto non tumorale (controllo) per un totale di 60 campioni (30tumori/30controlli) dopo amplificazione mediante PCR. In figura 21 è mostrato un esempio di analisi di microsatelliti su campioni di tessuto tumorale radio-indotto proveniente da tre animali generati da padri irraggiati e tre da padri non irraggiati.

In tutti i tumori analizzati (30/30), l'analisi dei microsatelliti ha dimostrato che la perdita di *Ptch1* si manifesta attraverso la perdita per delezione della stessa regione interstiziale (tra 22 e 24 cM), come già osservato nel caso dei tumori radio-indotti nella progenie di topi non irraggiati.

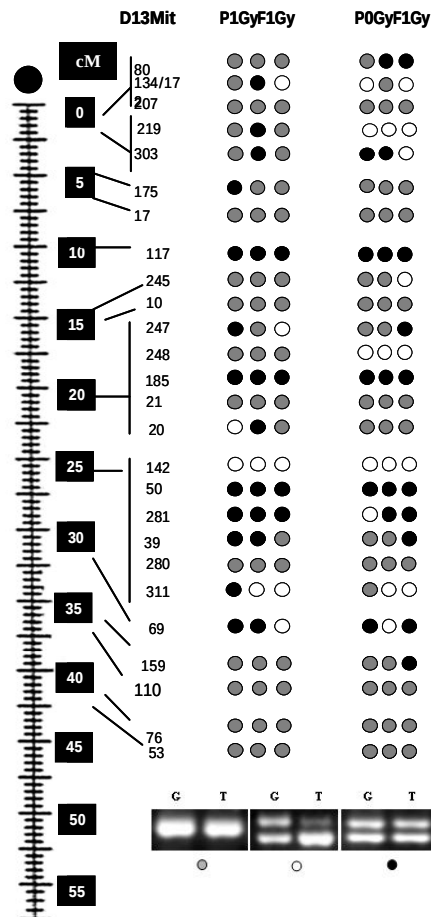


Figura 21: Esempio di analisi di microsatelliti nel medulloblastoma nella progenie di padri irraggiati (P-1Gy) e non irraggiati (P-0Gy). Ogni colonna di cerchi corrisponde al genoma di un tumore. I cerchi pieni indicano il mantenimento di entrambi gli alleli; i cerchi vuoti denotano la perdita di segnale da parte di un allele (LOH); i cerchi grigi indicano marcatori non informativi (NI).

4.1.3 Analisi di induzione e riparazione del danno al DNA in cellule di cervelletto dei topi F1

In figura 22a sono riportate le curve dose-risposta ottenute analizzando, con il test della cometa, cellule di cervelletto di topi di 2 giorni irraggiati con diverse dosi di raggi X. I risultati mostrano un livello basale di danno al DNA simile nelle cellule ottenute dalla

progenie di topi irraggiati e non irraggiati. Si osserva un aumento delle lesioni della molecola di DNA in funzione della dose di irraggiamento simile nei due gruppi sperimentali.

Per valutare se l'irraggiamento paterno potesse influenzare la capacità delle cellule di cervelletto di riparare le lesioni del DNA, il livello di danno è stato misurato con il test della cometa immediatamente ed 1 ora dopo l'irraggiamento con 1 Gy di raggi X. I risultati, riportati in figura 22b, mostrano che in entrambi i gruppi sperimentali 1 ora dopo l'irraggiamento, il danno evidenziabile con il test della cometa è stato riparato come indicato dal ritorno del parametro di danno ad un valore non differente dal controllo.

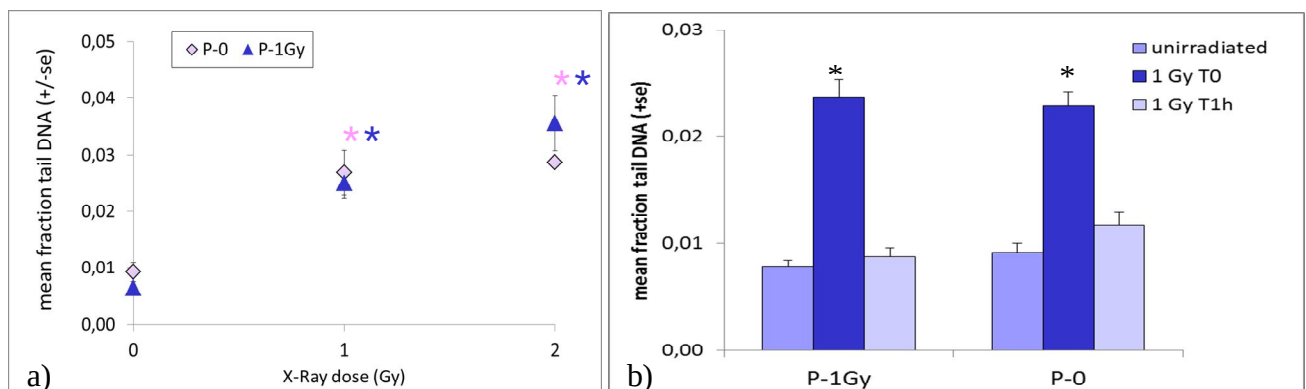


Figura 22: Test della cometa su cellule di cervelletto di topi di due giorni. a) Curve dose-risposta dopo irraggiamento con raggi X di gruppi di topi figli di padri irraggiati (P-1Gy) o non irraggiati (P-0Gy). *= differenze statisticamente significative ($p < 0.005$) rispetto ai controlli non irraggiati. b) danno al DNA rilevato immediatamente (T0) o 1 ora (T1) dopo l'irraggiamento con 1 Gy di raggi X in cellule di cervelletto di topi figli di padri irraggiati (P-1Gy) o non irraggiati (P-0Gy). *= differenza statisticamente significativa rispetto ai controlli non irraggiati ($p < 0.005$).

4.1.4 Formazione e progressione delle lesioni preneoplastiche (PNLs)

Lo sviluppo del medulloblastoma, in questo modello murino, è caratterizzato dalla comparsa precoce di lesioni preneoplastiche identificabili nelle sezioni istologiche di cervelletto. Per verificare se una diversa evoluzione delle lesioni preneoplastiche potesse essere alla base della maggiore incidenza di medulloblastoma radio-indotto nella progenie di padri irraggiati, la comparsa e la progressione di tali lesioni è stata monitorata a 4 ed 8 settimane dall'irraggiamento con 1 Gy di raggi X (Figure 23a e 23b). I risultati mostrano che 4 settimane dopo l'irraggiamento aree preneoplastiche sono presenti in circa l'80% degli animali e che l'incidenza di microlesioni non è diversa nei due gruppi sperimentali. Inoltre,

l'analisi dimensionale non evidenzia differenze nell'area delle microlesioni (Figura 23a). 8 settimane dopo l'irraggiamento, l'incidenza delle microlesioni rimane di circa l'80% nei due gruppi sperimentali; tuttavia, è stata rilevata una differenza nelle dimensioni delle microlesioni. Suddividendo le microlesioni in grandi e piccole, utilizzando un cut-off arbitrario di $5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, la percentuale di lesioni di grandi dimensioni osservate nel gruppo di topi generati da padre irraggiato è maggiore rispetto a quella osservata nel gruppo di animali generati da padre non irraggiato [73.9% (17/23) e 53.8% (7/13), rispettivamente]. Inoltre, l'area media delle lesioni grandi risultava minore in quest'ultimo gruppo sperimentale (Figura 23b). Questi risultati suggeriscono che, nel gruppo generato da padri irraggiati, l'induzione di microlesioni da parte dell'irraggiamento del cervelletto a due giorni di vita non sia differente rispetto al gruppo generato da padri non irraggiati; tuttavia, il riassorbimento appare meno frequente e una maggiore percentuale di queste lesioni progredisce a tumore conclamato.

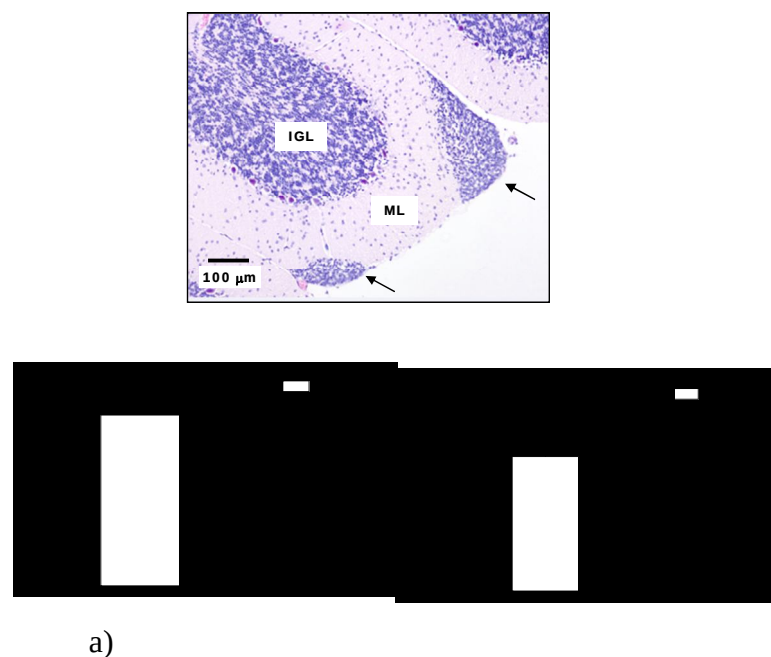
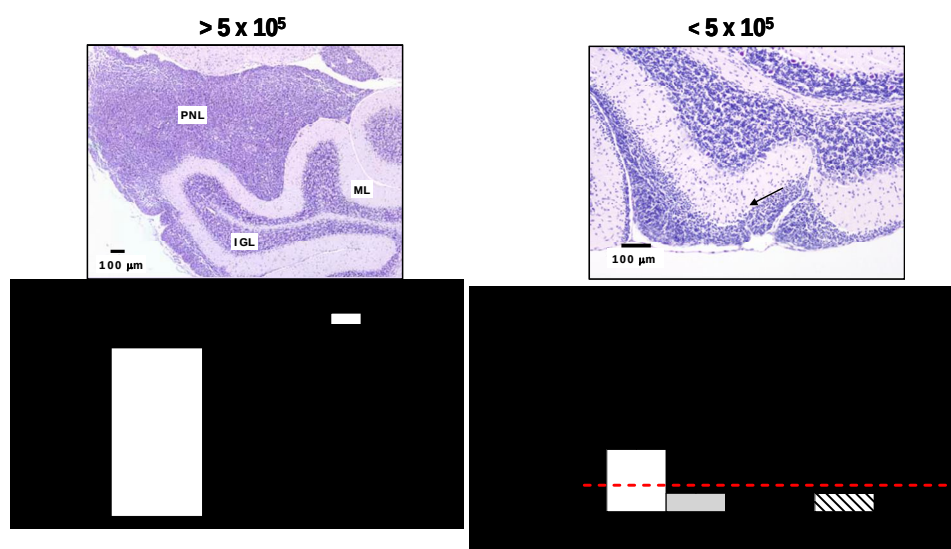


Figura 23: Analisi delle lesioni preneoplastiche. (PNLs). a) Analisi a 4 settimane dall'irraggiamento con 1 Gy a due giorni di vita. In alto è riportata una immagine rappresentativa di una sezione istologica di cervelletto in cui sono evidenziate delle microlesioni. Il grafico sulla sinistra riporta l'incidenza delle lesioni nella progenie di padre irraggiato [P1Gy(F1-1Gy)] o non irraggiato [P0Gy(F1-1Gy)]. Il grafico sulla destra riporta l'area media delle lesioni (+ES) nei due gruppi sperimentali.



b)

b) analisi a 8 settimane dall'irraggiamento. In alto sono riportate immagini rappresentative di sezioni istologiche di cervelletto che mostrano lesioni preneoplastiche di dimensioni grandi (sinistra) e piccole (destra). Il grafico sulla sinistra riporta l'incidenza delle lesioni nella progenie di padre irraggiato [P1Gy(F1-1Gy)] o non irraggiato [P0Gy(F1-1Gy)]. Il grafico sulla destra riporta l'area media delle lesioni (+ES) suddivise in grandi (colonne bianca e nera) e piccole (colonne grigia e tratteggiata) nei due gruppi sperimentali.

4.1.5 Analisi immunoistochimica delle piccole PNLs

Per investigare il destino delle lesioni preneoplastiche di piccola dimensione, osservate 8 settimane dopo l'irraggiamento, è stata condotta un'analisi immunoistochimica usando anticorpi contro marcatori di proliferazione cellulare (PCNA) e di differenziamento neuronale (NeuN) (Figura 24). I risultati mostrano che nelle piccole lesioni preneoplastiche dei cervelletti dei topi generati da padri irraggiati, la percentuale di cellule positive alla colorazione con anticorpo anti-PCNA è significativamente maggiore rispetto al gruppo generato da animali non irraggiati: 39,73% nei [P1Gy(F1-1Gy)]; 20,36% nei [P0Gy(F1-1Gy)]. Un andamento opposto si osserva dopo colorazione con anticorpo anti-NeuN: 0,74% nei [P1Gy(F1-1Gy)]; 6,3% nei [P0Gy(F1-1Gy)]. Questo diverso equilibrio dei due pathways (proliferativo e differenziativo) suggerisce un destino diverso per le piccole lesioni preneoplastiche nei due gruppi sperimentali. E' ipotizzabile che la maggiore proliferazione cellulare si rifletterà in un aumento delle dimensioni delle lesioni e ad una loro evoluzione a tumore conclamato; al contrario il differenziamento cellulare porterà al progressivo riassorbimento delle lesioni.

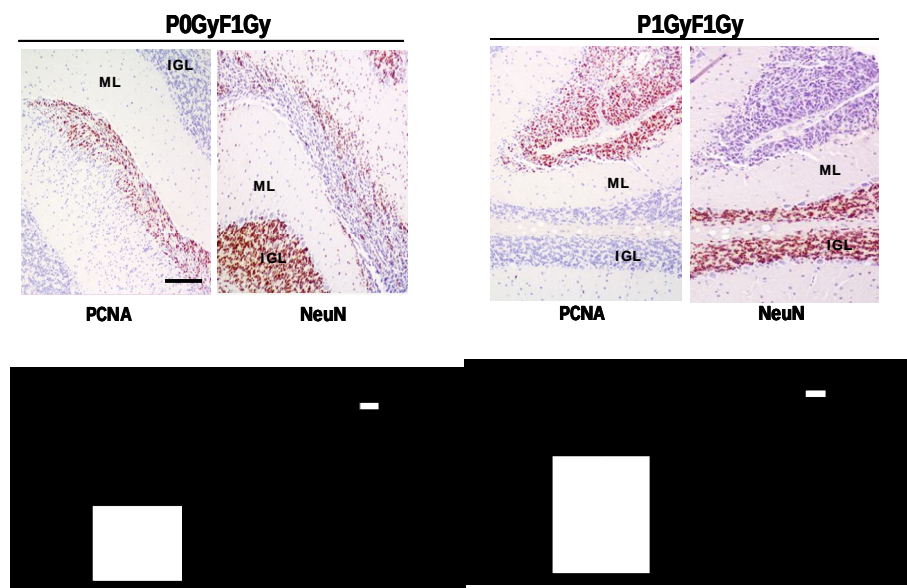


Figura 24: analisi immunistochimica delle piccole PNLs. In alto, immagini rappresentative delle microlesioni ottenute mediante analisi immunoistochimica con anti-PCNA e anti-NeuN. Gli istogrammi riportati in basso mostrano la percentuale di cellule positive alla marcatura con l'anti-PCNA (sinistra) ($p=0,0284$) o con l'anti-NeuN (destra) ($p=0,0243$).

4.1.6 Spessore dello strato granulare esterno (EGL)

L'equilibrio tra i pathways di proliferazione e differenziamento controlla lo sviluppo fisiologico del cervelletto nelle prime 3 settimane dopo la nascita. Alla luce dei risultati sulla progressione delle PNLs, è stata testata l'ipotesi che l'irraggiamento paterno possa modificare questo equilibrio. Con questo scopo, è stato confrontato lo spessore dello strato granulare esterno del cervelletto in due gruppi di topi di 14 giorni, progenie di padri irraggiati e non irraggiati. L'analisi istologica mostra che lo spessore dello strato esterno del cervelletto della progenie di padri non irraggiati è significativamente minore (17,33%) di quello della progenie dei padri irraggiati (27,42%) (Figura 25). Questo dato suggerisce che, in quest'ultimo gruppo sperimentale, la proliferazione cellulare sia stata maggiore nelle prime due settimane di vita. Considerando che il medulloblastoma origina dallo strato granulare esterno del cervelletto, e che il periodo neonatale costituisce una finestra estremamente sensibile per l'induzione del medulloblastoma radio-indotto nel modello murino utilizzato, è ipotizzabile che un'alterazione dei pathways di proliferazione/differenziamento che favorisce lo stadio

proliferativo di questo tessuto possa spiegare la maggiore sensibilità all'induzione di tumori radio-indotti.

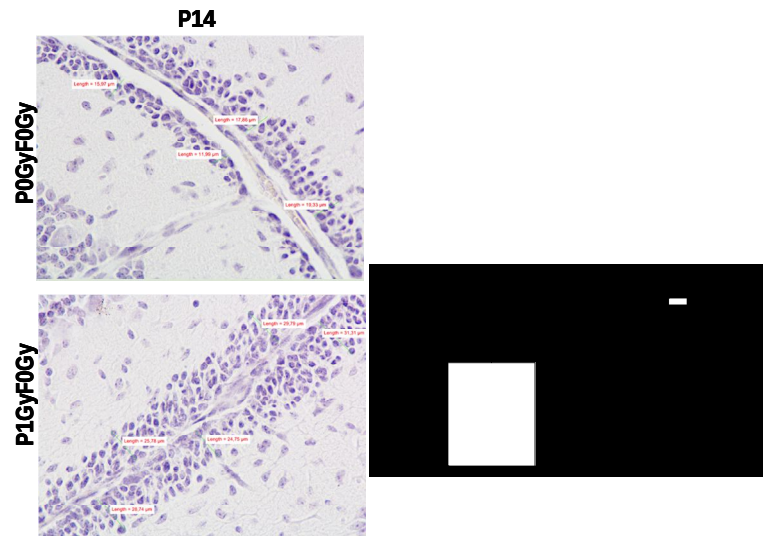


Figura 25: analisi dello spessore dello strato granulare esterno. A sinistra immagini rappresentative di sezioni istologiche di cervelletto di animali di 14 giorni in cui è visibile lo strato granulare esterno. Sull'istogramma è riportato lo spessore medio dello strato granulare esterno di cervelletti di topi figli di padri irraggiati o non irraggiati. *** $p < 0,001$.

4.2 EFFETTI DELLE RADIAZIONI NELLE CELLULE GERMINALI DEI TOPI P IRRAGGIATI

La generazione parentale (P), irraggiata e non irraggiata, che ha generato la F1 utilizzata in questo studio è stata sacrificata alla fine del periodo di accoppiamento (6 settimane dopo l'irraggiamento). Gli spermatozoi epididimali sono stati contati e analizzati con il test della cometa. L'istogramma, riportato nella figura 26a, mostra una riduzione del numero di spermatozoi di circa il 40% negli animali irraggiati. Tale riduzione riflette l'effetto citotossico delle radiazioni ionizzanti sul compartimento germinale immaturo del testicolo.

La comparsa, a tempi lunghi dall'irraggiamento, di lesioni nella cromatina in spermatozoi derivanti dal differenziamento di cellule germinali immature irraggiate allo stadio spermatogoniale è stata descritta in un precedente lavoro anche se i meccanismi di induzione del danno sono stati solamente ipotizzati (Cordelli et al., 2012). Contrariamente allo studio

precedente, in cui era stata somministrata una dose maggiore di raggi X (4Gy), i risultati ottenuti nel presente lavoro non mostrano differenze significative nella migrazione del DNA tra gli animali di controllo e gli animali trattati, 6 settimane dopo irraggiamento con 1 Gy di raggi X (Figura 26b).

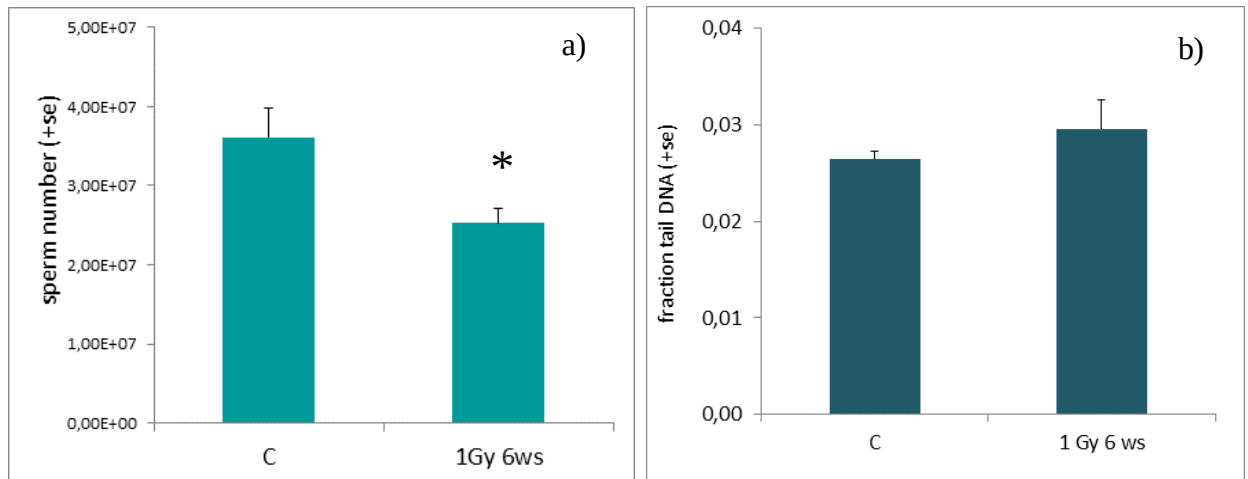


Figura 26: a) media del numero di spermatozoi epididimali in topi non irraggiati ed in topi irraggiati con 1 Gy di raggi X, 6 settimane dopo l'irraggiamento. *= differenza statisticamente significativa rispetto al controllo ($p < 0,005$). b) analisi del livello di danno al DNA, valutato mediante test della cometa, in topi di controllo e topi irraggiati con 1 Gy di raggi X, 6 settimane dopo l'irraggiamento.

4.3 INSTABILITA' GENOMICA IN TESSUTI NON SUSCETTIBILI AI TUMORI DEI TOPI F1

E' stata condotta un'analisi per valutare il livello spontaneo o radio-indotto di rotture al DNA in organi diversi dal cervelletto nella progenie F1 adulta generata da padri irraggiati o non irraggiati. Precedenti dati di letteratura infatti dimostravano un aumento di mutazioni spontanee in cellule del midollo e della milza nella progenie di maschi irraggiati (Barber et al., 2006). I livelli di danno spontaneo sono stati valutati mediante il test della cometa nel midollo osseo (Figura 27a) e nella milza (Figura 27b) di topi F1 non irraggiati, provenienti da padri irraggiati e non irraggiati. La progenie è stata analizzata in base al diverso genotipo, ovvero sono stati considerati gli animali F1 wild type e *Ptch*^{+/-}; l'analisi è stata condotta su topi di tre mesi di età. I risultati mostrano che non ci sono differenze nel livello di danno tra i diversi gruppi sperimentali e suggeriscono che l'irraggiamento paterno non influenzi il livello spontaneo di danno al DNA in tali tessuti.

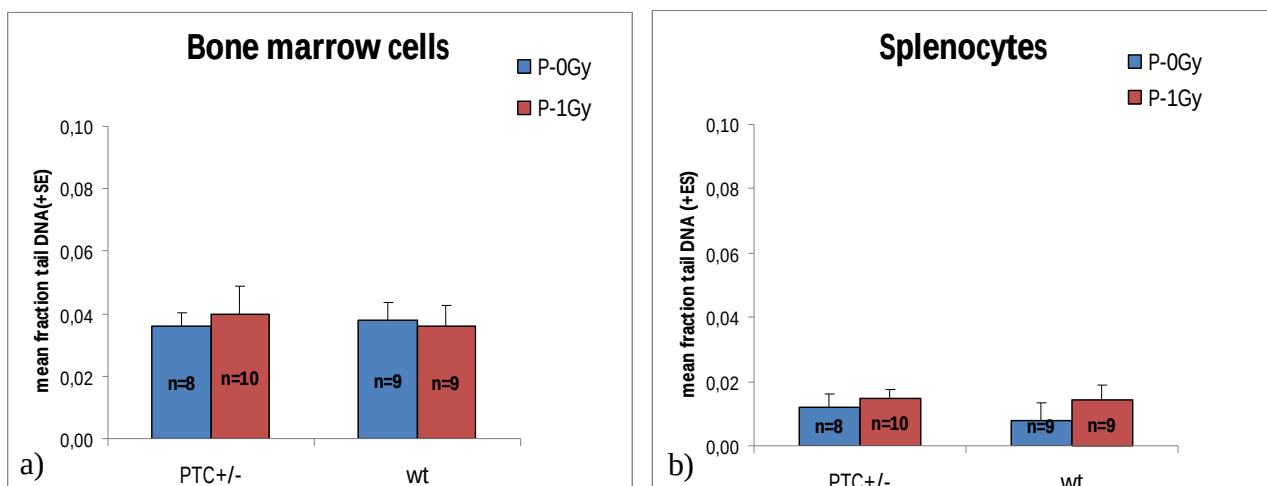


Figura 27: Test della cometa su cellule di midollo osseo (a) e splenociti (b) di animali non irradiati. Le colonne rappresentano la media della frazione di DNA nella coda in cellule di animali wild type e *Ptch*^{+/-}, generati da padri irradiati (P-1Gy) e non irradiati (P-0Gy).

Nelle cellule del midollo osseo della progenie F1 è stata effettuata anche un'analisi del danno cromosomico tramite test del micronucleo. Sono stati analizzati topi F1 maschi di genotipo *Ptch*^{+/-} provenienti da genitori irradiati e non irradiati. Il livello di danno è stato analizzato sia in condizioni spontanee che dopo irraggiamento con una dose di 0.1 Gy di raggi X. I risultati, mostrati in figura 28, indicano che l'irraggiamento paterno non induce variazioni nell'instabilità cromosomica spontanea o radio-indotta nelle cellule di midollo osseo della progenie.

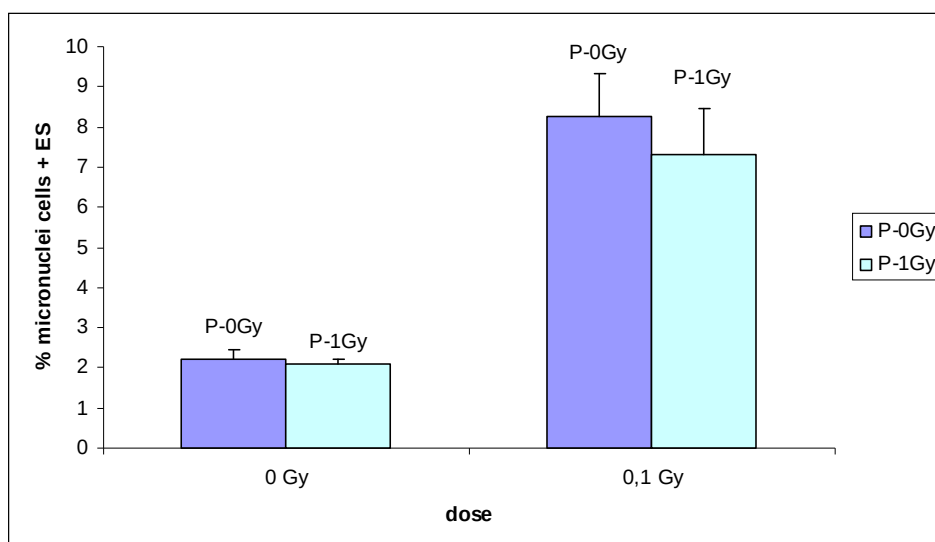


Figura 28: test del micronucleo in topi F1 maschi non irradiati e irradiati con la dose di 0.1 Gy di raggi X (dose minima sufficiente a indurre un danno, rilevabile con tale tecnica), progenie di padri irradiati e non irradiati. % di cellule con micronuclei: 2,20%; 2,10%; 8,25%; 7,33%.

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Gli effetti genetici delle radiazioni ionizzanti sono ben caratterizzati. A partire dagli anni '60 furono ottenute dettagliate relazioni dose-effetto per l'induzione di mutazioni a loci specifici, traslocazioni bilanciate, e alterazioni a livello cromosomico e genomico con effetti dominanti letali, nel topo, per i diversi stadi della spermatogenesi e per diverse condizioni espositive (Sankaranarayanan, 1982). In base a questi dati furono estrapolate stime di rischio genetico per l'uomo, che risultarono compatibili con le evidenze negative circa l'aumento di effetti genetici nella prima generazione dei sopravvissuti alle esplosioni nucleari di Hiroshima e Nagasaki. Nel corso degli anni, queste stime sono state periodicamente riconsiderate, e sostanzialmente confermate (Sankaranarayanan, 2001). Più recentemente, il quadro si è arricchito delle informazioni derivanti dal sequenziamento del genoma di *Mus musculus* e *Homo sapiens*, dalla scoperta di nuovi tipi di alterazioni del genoma associate a malattie genetiche nell'uomo (ad esempio quelle definite, in inglese, *Copy Number Variations* o *Segmental Duplications*), da nuove conoscenze in merito ai meccanismi di riparazione dei danni al DNA indotti da radiazioni (Sankaranarayanan et al., 2013). Questi elementi stanno contribuendo a definire nuovi scenari che potrebbero portare prossimamente a stime di rischio genetico più calzanti, anche alla luce della considerazione che le stime iniziali erano basate su alcuni loci non necessariamente rappresentativi dell'intero genoma, o su effetti fenotipici piuttosto che sull'analisi di alterazioni genetiche vere e proprie. La riduzione esponenziale dei costi di sequenziamento del genoma apre oggi la prospettiva di poter ottenere stime di rischio genetico basate sul rilevamento di ogni cambiamento di sequenza nella progenie rispetto ai genomi parentali (Kong et al., 2012), indipendentemente dall'effetto (nullo, recessivo o dominante) di tale cambiamento (Yauk et al., 2013).

Nello stesso periodo in cui si consolidavano le stime di rischio genetico comparvero i primi lavori sperimentali nel topo che sostenevano che l'irraggiamento paterno trasmettesse alla progenie un aumento della probabilità di sviluppare tumori spontaneamente o in risposta ad un trattamento cancerogeno (per una rassegna complessiva di quei dati si consulti la voce bibliografica Nomura, 2003). In base alla dose efficace nel produrre tale effetto, l'osservazione risultava poco compatibile con le stime consolidate dei tassi di alterazioni genetiche per unità di dose. Per questo, ed in assenza di dimostrazione di un meccanismo di

ereditarietà diverso da quello basato sulla trasmissione di mutazioni germinali, queste osservazioni furono accolte con scetticismo. Quando fu riportato un aumento inatteso dei casi di leucemie e linfomi infantili in prossimità dell'impianto nucleare di Sellafield in Gran Bretagna (Gardner et al., 1990), l'osservazione fu correlata da alcuni epidemiologi all'esposizione occupazionale paterna alle radiazioni e fu riproposta l'ipotesi della trasmissione transgenerazionale di un aumento di suscettibilità alla cancerogenesi. Questa ipotesi aprì un dibattito nella comunità scientifica che lasciò sostanzialmente ciascuno nella propria convinzione soprattutto, perché, ancora una volta, i sostenitori dell'ipotesi della cancerogenesi transgenerazionale non furono in grado di produrre evidenze circa il suo meccanismo molecolare (Tomatis, 1994). Come esposto nell'Introduzione, gli esperimenti su questa tematica proseguirono in diversi laboratori nel mondo senza ottenere però risultati conclusivi, e anche ulteriori indagini epidemiologiche in coorti di persone esposte a radiazioni ionizzanti per ragioni diagnostiche o occupazionali non riuscirono a risolvere la questione.

Nel frattempo, si andava affermando una visione più ampia degli effetti radiobiologici in base alla quale le radiazioni potevano indurre una risposta anche in cellule distanti nello spazio o nel tempo da quelle direttamente interessate dalle tracce di ionizzazione (vedi Introduzione). In particolare, emerse con evidenze sperimentali sempre più solide, il fenomeno della cosiddetta instabilità genomica radio-indotta, cioè un aumento del tasso di mutazioni e alterazioni cromosomiche nelle generazioni cellulari discendenti da una popolazione di cellule irraggiate. Queste osservazioni offrirono una nuova prospettiva e nuovi stimoli per condurre studi su possibili effetti transgenerazionali delle radiazioni ionizzanti, non riconducibili alla trasmissione di alterazioni genetiche attraverso la linea germinale paterna. Si trattava cioè semplicemente di estendere il paradigma dell'instabilità genomica dalle generazioni cellulari in colture clonali di cellule somatiche alle generazioni di individui.

L'approccio cambiò, pertanto, abbandonando momentaneamente l'obiettivo di dimostrare l'induzione transgenerazionale di un fenotipo complesso come il cancro e concentrandosi invece sull'induzione di instabilità genomica misurata con diversi marcatori. Nel già citato lavoro di Barber e collaboratori del 2006, si dimostrava ad esempio un aumento del tasso di mutazione spontanea al locus *Hprt*, un aumento di instabilità in sequenze di DNA ripetitivo, un aumento delle rotture a singolo e doppio filamento nel DNA di cellule di midollo osseo o milza dopo irraggiamento delle cellule germinali paterne allo stadio di spermatogoni in differenziamento con 1 o 2 Gy di raggi X. Ancora rimanevano degli interrogativi: in particolare, senza un modello del meccanismo molecolare di trasmissione di questi effetti, rimaneva difficilmente spiegabile il fatto che taluni lavori mostrassero l'induzione di un

fenotipo di instabilità transgenerazionale dopo esposizione di stadi pre-meiotici (Barber et al., 2006), altri solo di stadi post-meiotici (Luke et al., 1997), altri ancora di entrambi senza apprezzabili differenze (Dubrova et al., 2008). Il quadro appare ulteriormente complicato dall'osservazione che un particolare trattamento della linea germinale paterna, quale quello con N-etil-nitrosourea, sembrerebbe indurre instabilità in sequenze di DNA ripetitivo (Dubrova et al., 2008), ma non in un transgene come LacZ, stabilmente inserito nel genoma murino, o a livello cromosomico sotto forma di micronuclei (O'Brien et al., 2013).

Una nuova possibilità di interpretazione degli effetti transgenerazionali non riconducibili all'ereditarietà di mutazioni germinali emerge dalle molteplici evidenze, descritte nei capitoli introduttivi, di un meccanismo alternativo di ereditarietà definito di tipo epigenetico. Come abbiamo visto, è stato dimostrato, in diversi modelli sperimentali, un effetto del genotipo (e del corrispondente fenotipo) parentale sul fenotipo della progenie, senza l'effettiva trasmissione da parte dei gameti dell'informazione codificata nelle sequenze di DNA (Daxinger and Whitelaw, 2012). Abbiamo anche visto come questa forma di ereditarietà possa essere modificata da influenze ambientali (cfr. il paragrafo introduttivo "Influenze ambientali sull'ereditarietà epigenetica"). Da queste osservazioni all'ipotesi che l'induzione da parte delle radiazioni ionizzanti di cancerogenesi e instabilità genomica transgenerazionale siano dovute a una forma di ereditarietà epigenetica il salto è breve.

Le ricerche descritte in questa tesi hanno dimostrato come l'irraggiamento di cellule germinali maschili di topo allo stadio di spermatogoni in proliferazione induca nella progenie un aumento di suscettibilità dello strato granulare esterno del cervelletto neonatale all'effetto cancerogeno di una singola dose acuta di radiazioni. Abbiamo inoltre dimostrato che tale effetto non è riconducibile ad un aumento del livello spontaneo o radio-indotto di lesioni nel DNA delle cellule del cervelletto, né apparentemente ad una minore efficienza dei meccanismi di riparazione di tali lesioni, anche se questo non esclude un effetto sulla qualità della riparazione (ricongiungimento legittimo o illegittimo di rotture della doppia elica del DNA). Test della cometa e del micronucleo nella milza e nel midollo di esemplari adulti confermarono l'assenza di un fenotipo di instabilità genomica nella progenie, a differenza di quanto osservato nel lavoro, già citato, di Barber e collaboratori (Barber et al., 2006) condotto in condizioni di irraggiamento paterno comparabili, anche se su diversi ceppi murini.

Studi precedenti sull'induzione di medulloblastoma in topi portatori di una mutazione null nel gene *Patched1* (*Ptch1*) a seguito di un irraggiamento neonatale avevano dimostrato che in tutti i tumori indotti si verificava perdita di eterozigotà (LOH) per inattivazione dell'allele selvatico a causa di una delezione interstiziale sul cromosoma 13, una "firma" dell'effetto

radio-indotto, riconducibile all'induzione di due eventi di rottura a doppia elica, distinguibile dalla perdita della maggior parte della porzione distale del cromosoma 13 osservata nei casi spontanei di medulloblastoma (Pazzaglia et al., 2006a). Abbiamo quindi voluto verificare l'ipotesi che l'aumento dei casi di medulloblastoma nella progenie dei padri irraggiati rispetto all'incidenza tumorale nel gruppo di controllo potesse essere dovuta ad una quota addizionale di tumori insorti a seguito di un diverso meccanismo di inattivazione dell'allele selvatico, ad esempio un meccanismo di tipo epigenetico come suggerito da alcuni autori (Uhmann et al, 2005). L'analisi dei microsatelliti marcatori nella regione genomica di interesse ha dimostrato che anche in tutti i casi di tumore insorti nella progenie di padri irraggiati la perdita dell'allele *Ptch1* selvatico era avvenuta per delezione interstiziale, portando ad escludere l'ipotesi che una sua inattivazione epigenetica fosse il meccanismo effettore della cancerogenesi transgenerazionale.

Sulla base di questi risultati è stata avviata una nuova fase sperimentale per valutare se l'aumento di incidenza tumorale nella progenie dei padri irraggiati fosse riconducibile a modificazioni nella fase di progressione delle lesioni preneoplastiche a tumore conclamato. Nei topi *Ptch1*^{+/-}, infatti, i tumori si sviluppano nel cervelletto a partire da lesioni preneoplastiche la cui evoluzione è ben caratterizzata (Pazzaglia et al., 2006a). Anche in assenza di un trattamento neonatale con radiazioni, l'incidenza di queste lesioni è notevole a dimostrazione di un effetto di aploinsufficienza del gene. Nella maggior parte dei casi, però, se non si verifica la perdita dell'allele selvatico, la lesione regredisce ed il tumore non si sviluppa. L'incidenza e la dimensione delle lesioni preneoplastiche sono state confrontate, a 4 e 8 settimane dopo la nascita, nella progenie irraggiata a 2 giorni di età concepita da padri esposti o non esposti alle radiazioni. Mentre a 4 settimane il quadro è risultato sostanzialmente invariato, a 8 settimane, benché l'incidenza totale non fosse diversa, la percentuale di lesioni estese e la loro dimensione media risultavano maggiori nella progenie dei padri irraggiati, e le lesioni di piccole dimensioni mostravano una maggiore percentuale di cellule in proliferazione ed una minore percentuale di cellule positive per un marcatore di differenziamento neuronale. Queste osservazioni indicavano un maggior potenziale di proliferazione delle lesioni preneoplastiche presenti nella progenie dei padri irraggiati. Per chiarire se questa alterazione fosse riconducibile ad una modificazione intrinseca (cioè indipendente dall'irraggiamento) del differenziamento neonatale delle cellule bersaglio correlata all'esposizione paterna, abbiamo quindi confrontato l'analisi istomorfometrica dello strato granulare esterno del cervelletto di topini di 14 giorni, non irraggiati, provenienti da padri irraggiati e non. Il maggior spessore dello strato granulare esterno nei topini figli di

padri irraggiati indicava che l'irraggiamento paterno aveva effettivamente influito sull'equilibrio tra proliferazione e differenziamento che caratterizza lo sviluppo del cervelletto nei primi giorni di vita. Future analisi già pianificate sui livelli di espressione e sullo stato di metilazione dei promotori di geni implicati nello sviluppo neonatale del cervelletto contribuiranno a chiarire gli effettori molecolari di tale effetto transgenerazionale.

In sintesi, il quadro dei risultati finora descritto mostra che cellule germinali maschili di topi irraggiate con 1 Gy di raggi X allo stadio di spermatogoni trasmettono con la fecondazione un "messaggio transgenerazionale" che ha un effetto sul differenziamento neonatale di cellule del sistema nervoso centrale che a sua volta rende tali cellule più sensibili all'effetto cancerogeno di una singola dose acuta di raggi X.

In questa catena di eventi resta ancora da individuare un anello mancante: qual è il messaggio molecolare veicolato dagli spermatozoi da una generazione all'altra? Su questo aspetto abbiamo al momento alcune evidenze preliminari, oltre ad informazioni pubblicate molto recentemente in altri modelli sperimentali che aprono la strada a diverse ipotesi speculative. Abbiamo visto nel capitolo introduttivo come si sia recentemente affermato un nuovo quadro concettuale nel quale all'ereditarietà genetica trasmessa dai gameti tramite la sequenza del DNA si aggiunge una forma di ereditarietà epigenetica. Sappiamo che, nel caso degli spermatozoi, l'ereditarietà epigenetica si può esprimere almeno a 3 diversi livelli (Jenkins and Carrell, 2012; Kumar et al., 2013): la metilazione di specifiche sequenze di DNA; la conservazione non casuale degli istoni e della struttura nucleosomale in corrispondenza di loci particolari durante la fase di riorganizzazione strutturale della cromatina mediata dalla sostituzione generalizzata degli istoni con le protamine; il contenuto di RNA messaggeri e di piccoli RNA non codificanti. L'importanza relativa ed il ruolo di ciascuno di questi meccanismi di ereditarietà epigenetica oggi non sono ancora ben noti, tuttavia è verosimile che siano tutti e tre operativi. Alcune evidenze in letteratura stanno convergendo verso un ruolo preminente degli RNA non codificanti (Sendler et al., 2013), una classe di molecole recentemente scoperta, in grado di modulare l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Fabian et al., 2010). Recentemente, è stato dimostrato che gli spermatozoi, sia murini che umani, contengono un ampio repertorio di microRNA, alcuni dei quali sono trasmessi all'embrione esclusivamente per via paterna e risultano essenziali per il suo sviluppo precoce (Liu et al., 2012; Kiani and Rassoulzadegan 2013). Abbiamo già descritto il modello dei topi *Kit^{tm1Alf/+}* come un esempio di ereditarietà epigenetica (Rassoulzadegan et al., 2006). L'induzione del fenotipo mutante mediante microiniezione di sequenze di RNA complementari al gene *Kit* in zigoti di genotipo selvatico dimostrò che, in questo caso, il

messaggero molecolare dell'ereditarietà epigenetica consisteva in molecole di RNA. Più recentemente, è stato dimostrato che la trasmissione epigenetica dell'informazione richiede necessariamente l'attività dell'enzima DNMT2, una RNA-metiltransferasi (Kiani et al., 2013), il cui ruolo consisterebbe nella metilazione, e quindi nella protezione rispetto alla degradazione endonucleolitica, dell'RNA trasduttore del segnale epigenetico. Inoltre, ci sono almeno 2 esempi di un fenotipo determinato nei topi dall'eredità di specifici microRNA trasmessi dallo spermatozoo: un tipo di gigantismo mediato dalla trasmissione di miR-124 (Grandjean et al., 2009), e un tipo di ipertrofia cardiaca determinata dall'eredità di miR-1 (Wagner et al., 2008). Infine, è appena stata pubblicata l'evidenza che, nel topo, stress psicosociali nel periodo neonatale inducono variazioni dello spettro di RNA non codificanti dello spermatozoo e alterazioni metaboliche e comportamentali nella prole. Nello stesso lavoro si dimostra come l'iniezione di RNA estratto da spermatozoi di topi sottoposti a stress in oociti di animali non stressati riproduca, nella progenie così risultante, il fenotipo di alterazione metabolica e comportamentale a dimostrazione che il mediatore molecolare dell'ereditarietà epigenetica sia costituito, anche in questo caso, da molecole di RNA (Gapp et al., 2014). Questo lavoro riveste una particolare importanza per l'interpretazione dei nostri dati sperimentali anche perché mostra come fattori ambientali siano in grado di modificare le molecole che trasmettono l'ereditarietà epigenetica di origine paterna.

Sulla base di queste evidenze abbiamo pianificato di caratterizzare lo spettro di miRNA degli spermatozoi raccolti da topi irraggiati con 1 Gy di raggi X, 6 settimane prima dell'accoppiamento, e confrontarlo con quello di topi non irraggiati per saggiare l'ipotesi che anche il fenotipo di cancerogenesi transgenerazionale da noi osservato possa essere stato indotto dalla trasmissione paterna di un set alterato di miRNA. Al momento i risultati di queste analisi non sono ancora disponibili. Tuttavia un dato preliminare sembra incoraggiante: infatti, un esperimento condotto nel nostro laboratorio ha dimostrato, seppure in un diverso ceppo di topi, che le medesime condizioni di irraggiamento utilizzate nello studio di cancerogenesi transgenerazionale inducono una diminuzione statisticamente significativa del livello di miR-34b negli spermatozoi discendenti dagli spermatogoni esposti alle radiazioni 6 settimane prima (dati non pubblicati). E' interessante notare che miR-34b appartiene allo stesso cluster di miR-34c che è stato dimostrato essere indispensabile per le prime divisioni di segmentazione embrionale nel topo e di esclusiva origine paterna (Liu et al., 2012).

In conclusione, lo studio condotto nell'ambito di questa tesi ha dimostrato, in un modello murino, un effetto transgenerazionale indotto dall'irraggiamento della linea germinale paterna consistente in un'alterazione del programma di differenziamento del cervelletto tale da

rendere il suo strato granulare esterno più sensibile ad uno sviluppo tumorale radio-indotto. Questo risultato si inquadra in un modello di ereditarietà epigenetica trasmessa dai gameti che ha ricevuto recentemente numerose conferme in diversi modelli sperimentali. Ulteriori ricerche sono in corso per scoprire la natura molecolare del messaggio epigenetico contenuto negli spermatozoi ed il “pathway” effettore dello “switch” tra differenziamento e proliferazione nel cervelletto neonatale.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Dott.ssa Francesca Pacchierotti per avermi dato la possibilità di svolgere la mia tesi di Dottorato nei suoi laboratori, consentendomi di acquisire un'importante formazione scientifica e umana... sempre pronta ad incoraggiarmi e a sostenermi, anche nei momenti e nelle scelte più difficili. Grazie di cuore.

Ringrazio la Dott.ssa Eugenia Cordelli per il prezioso supporto umano, per avermi trasmesso le sue conoscenze e per la costante disponibilità.

Ringrazio le Dott.sse Anna Saran e Mariateresa Mancuso per avermi dato la possibilità di collaborare con loro, trasmettendomi il loro “bagaglio” scientifico. Grazie a voi e al vostro gruppo di ricerca, per la disponibilità ed accoglienza che ho sempre trovato nei vostri laboratori.

Ringrazio Clarice, Elisabetta e Mariella per avermi “accolto” nel loro ufficio, per la gentilezza, le risate e le parole di conforto...Grazie!

Ringrazio tutte le “ragazze” del T8 con cui ho condiviso questi bellissimi tre anni.

Ringrazio la Dott.ssa Roberta Meschini per avermi dato l'opportunità di compiere questo interessante lavoro, per la presenza e la disponibilità.

Ringrazio, in particolare, la mia famiglia per avermi supportato e “sopportato” in ogni momento di questo percorso.

E... un grazie a me stessa per aver tenuto sempre duro, non aver mai mollato ed essere riuscita a perseguire questo importante obiettivo della mia formazione.

BIBLIOGRAFIA

- Adamo S, Carinci P, Molinaro M, Siracusa G, Stefanini M, Ziparo E (2002). Istologia di V. Monesi. 5 edizione, Piccin, Padova.
- Adler ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. *Mut. Res.*, 352:169-172.
- Aghajanyan A, Kuzmina N, Sipyagyna A, Baleva L, Suskov I (2011). Analysis of genomic instability in the offspring of fathers exposed to low doses of ionizing radiation. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52:538-546.
- Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.*, 150:497-504.
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:473-478.
- Bai Y, Chen D (1993). Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 302:191-196.
- Barakat MT, Humke EW, Scott MP (2010). Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends Mol. Med.*, 16:337-348.
- Barber RC, Hickenbotham P, Hatch T, Kelly D, Topchiy N, Almeida GM, Jones GD, Johnson GE, Parry JM, Rothkamm K, Dubrova YE (2006). Radiation-induced transgenerational alterations in genome stability and DNA damage. *Oncogene*, 25:7336-7342.

- Baulch JE, Raabe OG (2005). Gamma irradiation of Type B spermatogonia leads to heritable genomic instability in four generations of mice. *Mutagenesis*, 20:337-343.
- Cattanach BM, Patrick G, Papworth D, Goodhead DT, Hacker T, Cobb L, Whitehill E (1995). Investigation of lung tumor induction in BALB/cJ mice following paternal X-irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 67:607-615.
- Cattanach BM, Papworth D, Patrick G, Goodhead DT, Hacker T, Cobb L, Whitehill E (1998). Investigation of lung tumor induction of C3H/HeH mice, with and without tumor promotion with urethane, following paternal X-irradiation. *Mutat. Res.*, 403:1-12.
- Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, Stopka T, Skoultchi A, Matthews J, Scott HS, de Kretser D, O'Bryan M, Blewitt M, Whitelaw E (2007). Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nature Genet.*, 39:614-622.
- Cordelli E, Eleuteri P, Grollino MG, Benassi B, Blandino G, Bartoleschi C, Pardini MC, Di Caprio EV, Spanò M, Pacchierotti F, Villani P (2012). Direct and delayed X-ray-induced DNA damage in male mouse germ cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 53:429-439.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006). Germ-line epigenetic modification of the murine A^{vy} allele by nutritional supplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:17308-17312.
- Daher A, Varin M, Lamontagne Y, Oth D (1998). Effect of preconceptional external or internal irradiation of N5 male mice and the risk of leukemia in their offspring. *Carcinogenesis*, 19:1553-1558.
- Daxinger L, Whitelaw E (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Rev. Genet.*, 13:153-162.

- Deshpande A, Goodwin EH, Bailey SM, Marrone BL, Lehnert BE (1996). Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.*, 145:260-267.
- Dias BG, Ressler KJ (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.*, 17:89-96.
- Dubrova YE, Hickenbotham P, Glen CD, Monger K, Wong HP, Barber RC (2008). Paternal exposure to ethylnitrosourea results in transgenerational genomic instability in mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49:308-311.
- Fabian MR, Sundermeier TR, Sonenberg N (2010). Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 50:1-20.
- Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.*, doi: 10.1038/nn.3695 [Epub ahead of print].
- Gardner MJ, Snee MP, Hall AJ, Powell CA, Downes S and Terrell JD (1990). Results of the case-control study of leukemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *Br. Med. J.*, 300:423-429.
- Glen CD, Dubrova YE (2012). Exposure to anticancer drugs can result in transgenerational genomic instability in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109:2984-2988.
- Graham S, Levin ML, Lilienfield AM, Schuman LM, Gibson R, Dowd JE, Hemplemann L (1966). Preconception, intrauterine, and postnatal irradiation as related to leukemia. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 19:347-371.
- Grandjean V, Gounon P, Wagner N, Martin L, Wagner KD, Bernex F, Cuzin F, Rassoulzadegan M (2009). The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development*, 136:3647-3655.

- Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat. Med.*, 4:619-622.
- Husøy T, Cruciani V, Sanner T, Mikalsen SO (2001). Phosphorylation of connexin43 and inhibition of gap junctional communication in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate exposed R6 fibroblasts: minor role of protein kinase C beta I and mu. *Carcinogenesis* 22:221-231.
- Ikushima T (1989). Radio-adaptive response: characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 227:241-246.
- Ilnytsky Y, Kovalchuk O (2011). Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat. Res.*, 714:113-125.
- Iyer R, Lehnert BE (2000). Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res.*, 60:1290-1298.
- Izumi S, Koyama K, Soda M, Suyama A (2003). Cancer incidence in children and young adults did not increase relative to parental exposure to atomic bombs. *Br. J. Cancer*, 89:1709-1713.
- Jenkins TG, Carrell DT (2012). The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction*, 143:727-734.
- Jirtle RL, Skinner MK (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.*, 8:253-262.
- Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Ørom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 131:1273-1286.

- Kiani J, Grandjean V, Liebers R, Tuorto F, Ghanbarian H, Lyko F, Cuzin F, Rassoulzadegan M (2013). RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet.*, 9(5):e1003498.
- Kiani J, Rassoulzadegan M (2013). A load of small RNAs in the sperm - how many bits of hereditary. *Cell Res.*, 23:18-9.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WS, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudbjartsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature*, 488:471-475.
- Koturbash I, Baker M, Loree J, Kutanzi K, Hudson D, Pogribny I, Sedelnikova O, Bonner W, Kovalchuk O (2006). Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 66:327-330.
- Koturbash I, Loree J, Kutanzi K, Koganow C, Pogribny I, Kovalchuk O (2008). *In vivo* bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 70:554-562.
- Kumar M, Kumar K, Jain S, Hassan T, Dada R (2013). Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. *CLINICS*, 68: 5-14.
- Lam M-YJ., Heaney JD, Youngren KK, Kawasoe JH, Nadeau JH (2007). Trans-generational epistasis between Dnd1Ter and other modifier genes controls susceptibility to testicular germ cell tumors. *Hum. Mol. Genet.*, 16:2233-2240.
- Lehnert BE, Goodwin EH (1997a). Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res.*, 57:2164-2171.

- Lehnert BE, Goodwin EH (1997b). A new mechanism for DNA alterations induced by alpha particles such as those emitted by radon and radon progeny. *Environ. Health Perspect.*, 105:1095-1101.
- Little JB (2000). Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21:397-404.
- Liu WM, Pang RT, Chiu PC, Wong BP, Lao K, Lee KF, Yeung WS (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109:490-494.
- Lord BI, Hoyes KP (1999). Hemopoietic damage and induction of leukemia in offspring due to preconception paternal irradiation from incorporated plutonium-239. *Radiat. Res.*, 152:S34-37.
- Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG (2003). Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene*, 22:7058-7069.
- Luke GA, Riches AC, Bryant PE (1997). Genomic instability in haematopoietic cells of F1 generation mice of irradiated male parents. *Mutagenesis*, 12:147-152.
- Mancuso M, Pazzaglia S, Tanori M, Hahn H, Merola P, Rebessi S, Atkinson MJ, Di Majo V, Covelli V, Saran A (2004). Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in Ptch1-deficient mice. *Cancer Res.*, 64:934-941.
- Mancuso M, Pasquali E, Leonardi S, Tanori M, Rebessi S, Di Majo V, Pazzaglia S, Toni MP, Pimpinella M, Covelli V, Saran A (2008). Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 105:12445-12450.
- McKinney PA, Fear NT, Stockton D (2003). Parental occupation at peri- conception: findings from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Occup. Environ. Med.*, 60:901-909.

- Merrifield M, Kovalchuk O (2013). Epigenetics in radiation biology: a new research frontier. *Front. Genet.*, 4:40.
- Migliore L (2004). Mutagenesi ambientale, Zanichelli, Bologna.
- Mohr U, Dasenbrock C, Tillmann T, Kohler M, Kamino K, Hagemann G, Morawietz G, Campo E, Cazorla M, Fernandez P, Hernandez L, Cardesa A, Tomatis L (1999). Possible carcinogenic effects of X-rays in a transgenerational study with CBA mice. *Carcinogenesis*, 20:325-332.
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genet.*, 23:314-318.
- Morgan WF (2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation. I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat. Res.* 159:567-580.
- Morgan WF (2003) Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation. II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* 159:581-596.
- Nadeau JH (2009). Transgenerational genetic effects on phenotypic variation and disease risk. *Hum. Mol. Genet.*, 18:R202-R210
- Nagasawa H, Little JB (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.*, 52:6394-6396.
- Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE (1997). Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.*, 57:3963-3971.
- Nelson V, Spiezio SH, Nadeau JH (2010). Transgenerational genetic effects of the paternal Y chromosome on daughters' phenotypes. *Epigenomics*, 2:513-521.
- Niwa O (2006). Radiation induced dynamic mutations and transgenerational effects. *J. Radiat. Res.*, 47:B25-30.

- Nomura T (1978). Changed urethan and radiation response of the mouse germ cell to tumor induction. *L. Severi (Ed.), Tumors of Early Life in Man and Animals, Perugia University Press*, pp. 873-891.
- Nomura T (1982). Parental exposure to X rays and chemicals induces heritable tumors and anomalies in mice. *Nature*, 296:575-577.
- Nomura T (1983). X-ray induced germ-line mutation leading to tumors: its manifestation in mice given urethane post-natally. *Mutat. Res.*, 121:59-65.
- Nomura T (2000). Transplacental and transgenerational late effects of radiation and chemicals. *Congenit. Anom.*, 40:S54-S67.
- Nomura T (2003). Transgenerational carcinogenesis: induction and transmission of genetic alterations and mechanisms of carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 544:425-432.
- O'Brien JM, Williams A, Gingerich J, Douglas GR, Marchetti F, Yauk CL (2013). No evidence for transgenerational genomic instability in the F1 or F2 descendants of MutaTMMouse males exposed to N-ethyl-N-nitrosourea. *Mutat. Res.*, 741-742:11-7.
- Pazzaglia S (2006). Ptc1 heterozygous knockout mice as a model of multi-organ tumorigenesis. *Cancer Letters*, 234: 124-134.
- Pazzaglia S, Tanori M, Mancuso M, Gessi M, Pasquali E, Leonardi S, Oliva MA, Rebessi S, Di Majo V, Covelli V, Giangaspero F, Saran A (2006a). Two-hit model for progression of medulloblastoma preneoplasia in Patched heterozygous mice. *Oncogene*, 25:5575-5580.
- Pazzaglia S, Tanori M, Mancuso M, Rebessi S, Leonardi S, Di Majo V, Covelli V, Atkinson MJ, Hahn H, Saran A (2006b). Linking DNA damage to medulloblastoma tumorigenesis in patched heterozygous knockout mice. *Oncogene*, 25:1665-1173.
- Piedimonte LR, Wailes IK and Weiner HL (2005). Medulloblastoma: mouse models and novel targeted therapies based on the Sonic Hedgehog pathway. *Neurosurg. Focus*, 19: E8.

- Prise KM, Belyakov OV, Folkard M, Michael BD (1998). Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* 74:793-798.
- Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon V, Vincent S, Gillot I, Cuzin F (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 441:469-474.
- Roman E, Doyle P, Maconochie N, Davies G, Smith PG, Beral V (1999). Cancer in children of nuclear industry employees: report on children aged under 25 years from nuclear industry family study. *B.M.J.*, 318:1443-1450.
- Sankaranarayanan K (1982). Genetic Effects of Ionizing Radiation in Multicellular Eukaryotes and the Assessment of Genetic Radiation Hazards in Man. *Elsevier Biomedical Press, Amsterdam*.
- Sankaranarayanan K (2001). Estimation of the hereditary risks of exposure to ionizing radiation: history, current status, and emerging perspectives. *Health. Phys.*, 80:363-369.
- Sankaranarayanan K, Taleei R, Rahmanian S, Nikjoo H (2013). Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand breaks and deletions in irradiated germ cells. *Mutat. Res.*, 753:114-130.
- Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA, Brenner DJ, Bonner WM (2007). DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res.*, 67:4295-4302.
- Selby PB, Earhart VS, Raymer GD (2005). The influence of dominant lethal mutations on litter size and body weight and the consequent impact on transgenerational carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 578:382-394.

- Sendler E, Johnson, Mao S, Goodrich RJ, Diamond MP, Hauser R, Krawetz SA (2013). Stability, delivery and functions of human sperm RNAs at fertilization. *Nucleic Acids Res.*, 41:4104-4117.
- Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R, Ishii S (2011). Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell.*, 145:1049-1061.
- Shadley JD, Wolff S (1987). Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*, 2:95-96.
- Shiono PH, Chang CS, Myrianthopoulos NC (1980). Preconception radiation, intrauterine diagnostic radiation, and childhood neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 65:681-686.
- Shu XO, Gao YT, Brinton LA, Linet MS, Tu JT, Zheng W, Fraumeni JF Jr. (1988). A population-based case-control study of childhood leukemia in Shanghai. *Cancer*, 62:635-644.
- Sokolov MV, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2007). gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle*, 6:2210-2212.
- Tamminga J, Koturbash I, Baker M, Kutanzi K, Kathiria P, Pogribny IP, Sutherland RJ, Kovalchuk O (2008). Paternal cranial irradiation induces distant bystander DNA damage in the germline and leads to epigenetic alterations in the offspring. *Cell Cycle*, 7:1238-1245.
- Tamminga J, Kovalchuk O (2011). Role of DNA damage and epigenetic DNA methylation changes in radiation-induced genomic instability and bystander effects in germline in vivo. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 4:115-125.
- Tawn EJ (2005). Radiation-induced transgenerational carcinogenesis. *J. Radiol. Prot.*, 25:501.

- Tomatis L (1994). Transgeneration carcinogenesis: a review of the experimental and epidemiological evidence. *Jpn J. Cancer Res.*, 85:443-454.
- Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arziman Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L, Hahn H (2005). A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing. *Int. J. Oncol.*, 27:1567-1575.
- Vance MM, Baulch JE, Raabe OG, Wiley LM, Overstreet JW (2002). Cellular reprogramming in the F3 mouse with paternal F0 radiation history. *Int. J. Radiat. Biol.*, 78:513-526.
- Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F, Rassoulzadegan M (2008). RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Dev. Cell.*, 14:962-969.
- Watanabe H, Takahashi T, Lee JL, Ohtaki M, Roy G, Ando Y, Yamada K, Gotoh T, Kurisy K, Fujimoto N, Satow Y, Ito A (1996). Influence of paternal ²⁵²Cf neutron exposure on abnormal sperm, embryonal lethality, and liver tumorigenesis in the F1 offspring of mice. *J. Cancer Res.*, 87:51-57.
- Wu LJ, Randers-Pehrson G, Xu A, Waldren CA, Geard CR, Yu Z, Hei TK (1999). Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4959-4964.
- Yauk CL, Lucas Argueso J, Auerbach SS, Awadalla P, Davis SR, Demarini DM, Douglas GR, Dubrova YE, Elespuru RK, Glover TW, Hales BF, Hurles ME, Klein CB, Lupski JR, Manchester DK, Marchetti F, Montpetit A, Mulvihill JJ, Robaire B, Robbins WA, Rouleau GA, Shaughnessy DT, Somers CM, Taylor JG 6th, Trasler J, Waters MD, Wilson TE, Witt KL, Bishop JB (2013). Harnessing genomics to identify environmental determinants of heritable disease. *Mutat. Res.*, 752:6-9.
- Ye S, Yuan D, Xie Y, Pan Y, Shao C (2013). Role of DNA methylation in long-term low-dose γ -rays induced adaptive response in human B lymphoblast cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 89:898-906

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE E PRESENTAZIONI A CONGRESSI

Pubblicazioni scientifiche:

Villani P, Freseigna AM, Ranaldi R, Eleuteri P, Paris L, Pacchierotti F, Cordelli E. X-ray induced DNA damage and repair in germ cells of PARP1(-/-) male mice (2013). *Int. J. Mol. Sci.*, 14:18078-18092.

Cordelli E, Paris L (2013). γ -H2AX detection in somatic and germ cells of mice. *Methods Mol Biol.*, 1044:293-310.

Paris L, Cordelli E, Eleuteri P, Grollino MG, Pasquali E, Ranaldi R, Meschini R, Pacchierotti F (2011). Kinetics of γ -H2AX induction and removal in bone marrow and testicular cells of mice after X-ray irradiation. *Mutagenesis*, 26:563-572.

Presentazioni a congressi:

Paris L, Cordelli C, Meschini R, Giardullo P, Leonardi S, Saran A, Mancuso M, Pacchierotti F. Radiation-induced transgenerational carcinogenesis in *Ptch1*^{+/-} mice. 11th International Conference on Environmental Mutagens, Foz do Iguassu (Brazil), November 3-8, 2013 (poster).

Paris L, Cordelli C, Meschini R, Giardullo P, Leonardi S, Saran A, Mancuso M, Pacchierotti F. Radiation-induced transgenerational genomic instability in mice. Chromosome Instability: Mechanism and Health Effects, Padova, July 3-4, 2013 (poster).

Paris L, Cordelli E, Pacchierotti F, Meschini R, Giardullo P, Leonardi S, Saran A, Mancuso M. Radiation-induced transgenerational carcinogenicity: a study with a tumour susceptible mouse model. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, October 15-19, 2012 (oral communication).

Stocchi V, Benassi B, Cordelli E, Consales C, Paris L, Eleuteri P, Meschini R, Spanò M and Pacchierotti F. Radiation-induced DNA damage and RNA changes in mouse sperm. Congresso FISV 2012, Rome, September 24-27, 2012 (poster).

Salvitti T, Cordelli E, Eleuteri P, Grollino MG, Paris L, Pacchierotti F.

Velocità e fedeltà della riparazione delle rotture a doppia elica indotte da radiazioni ionizzanti in cellule di midollo osseo e spermatociti primari di topi Rad 54/Rad 54B^{-/-}. XV Convegno Nazionale della Società Italiana per la Ricerca sulle Radiazioni, Roma, 27-29 ottobre, 2010 (poster).

PARTECIPAZIONE A CORSI E CONGRESSI

- Società Italiana di Mutagenesi Ambientale, Workshop “Chromosome Instability: Mechanism and Health Effects”. Padova, 3-4 luglio 2013.
- “Effetti non cancer delle radiazioni ionizzanti”. III Workshop interdisciplinare FIRR (14 novembre 2012)
- “La gestione delle emergenze radiologiche e nucleari: aspetti di radiobiologia”. ENEA, Ctr Casaccia, Roma (5-7 novembre 2012)
- “39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society”. Vietri sul Mare, 15-19 ottobre 2012.
- “12th FISV CONGRESS”. Roma, 24-27 settembre 2012.