

ALTERNANZA SCUOLA·LAVORO IN ISS

12-15 e 21-23 marzo 2018



Percorso formativo:

BC.23 Dall'esposizione alla malattia: il sole è anche un nemico

Studenti/Liceo:

A. C.

C. P.

E. C.

Tutor (ISS-dip.DAMSA):

Mariarosaria d'Errico

Paola Fortini

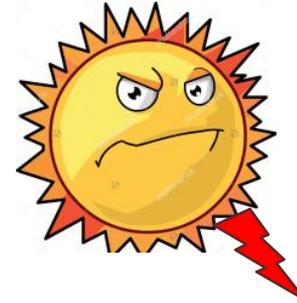
Eleonora Parlanti

Valeria Simonelli

Ettore Meccia

Barbara Pascucci

L'attività che abbiamo svolto



Dalla teoria...

L'esposizione a fattori ambientali porta allo sviluppo di diverse malattie: cancro e malattie neurodegenerative... quali sono i meccanismi responsabili?



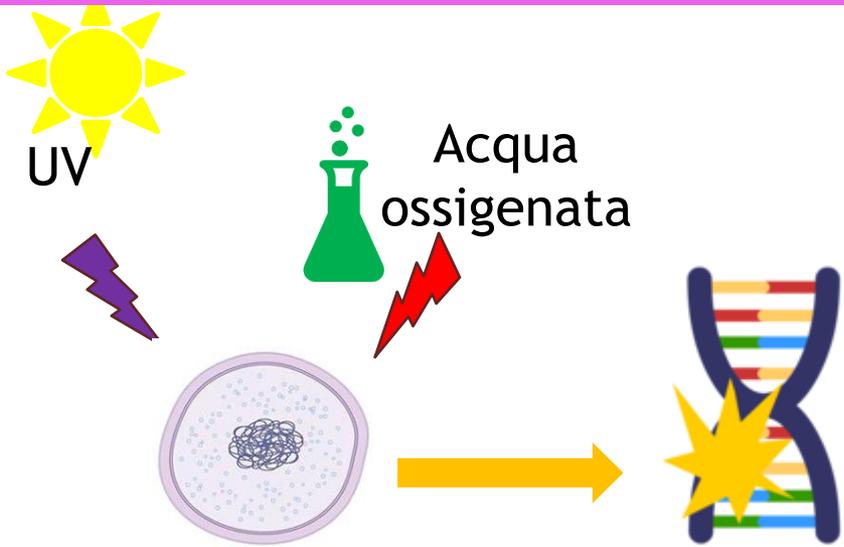
alla pratica...

Cellule umane sono state trattate con agenti genotossici di natura sia fisica che chimica.



BC23· Dall'esposizione alla malattia: il sole è anche un nemico

Cosa succede nella cellula esposta ad agenti ambientali?



IL DNA VIENE DANNEGGIATO (COMET, ISTONE H2AX)

RIPARA IL DANNO (COMET, FOSFORILAZIONE ISTONE H2AX)

MUORE (CLONI)

MUTA (PCR) (SEQUENZA)

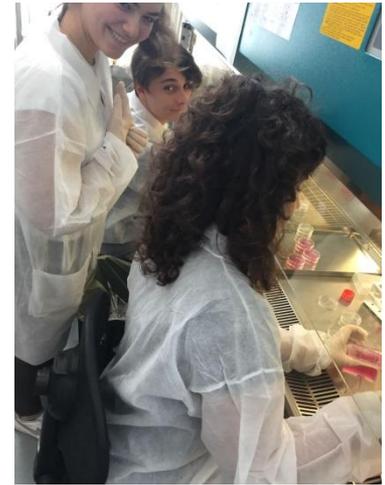
```
tagttggagctgggtggcgtaggcaag
-----|-----
atcaacctcgaccaccgcatccgttc
          10      15
Val Gly Ala Gly Val Gly Lys
KRAS
          |
          Mutazione
```

Il saggio della cometa

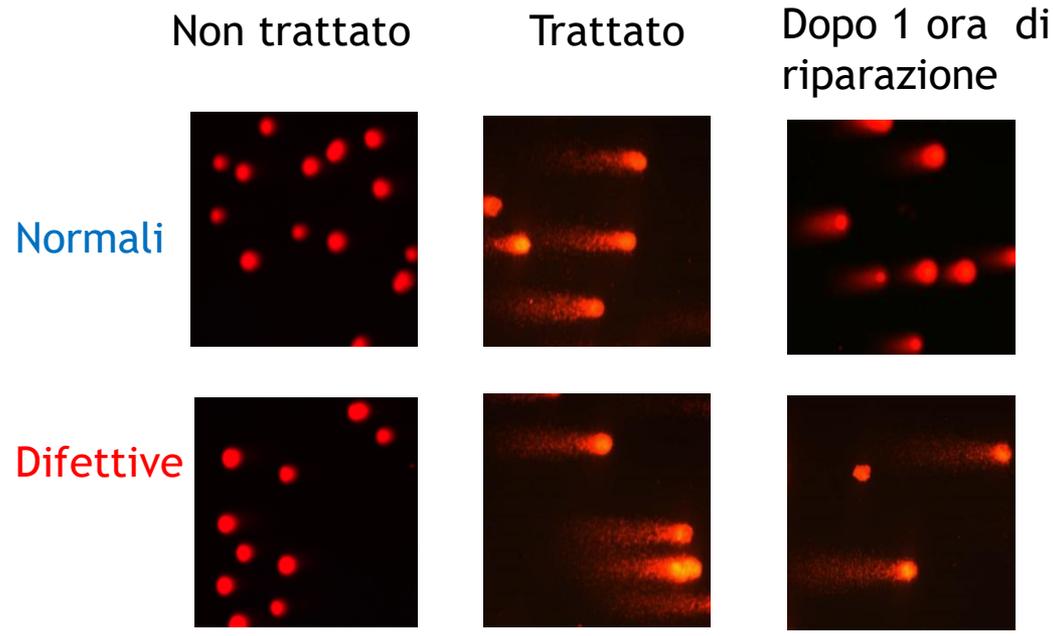
Il danno può essere riparato...come osservarlo?

Abbiamo:

- trattato le cellule con acqua ossigenata
- inglobato le cellule nel gel di agarosio
- lisato le cellule
- effettuato l'elettroforesi
- colorato il DNA con un intercalante
- analizzato i vetrini al microscopio a fluorescenza



Il saggio della cometa

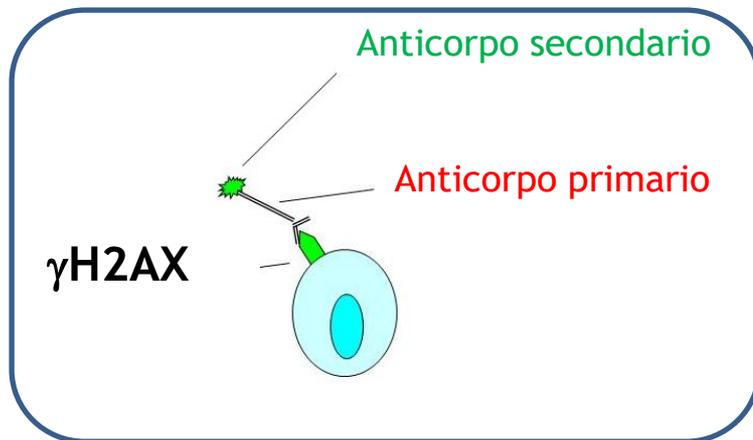


Proprio come una cometa la cellula danneggiata lascia una scia, la quale è più lunga tanto più grave è il danno subito.

Saggio di fosforilazione del γ H2Ax

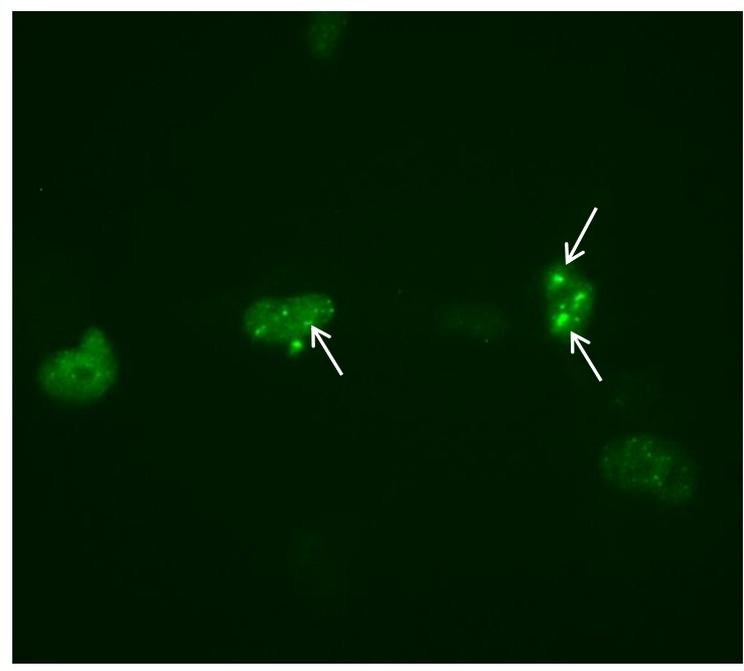
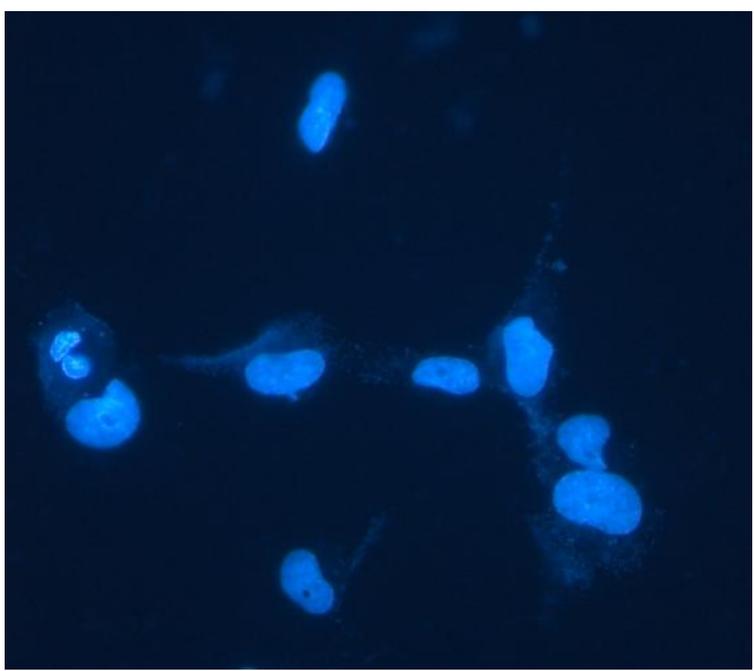
Le cellule sono state sottoposte ad un trattamento analogo a quello utilizzato per il saggio della cometa.

Dopo averle fissate, le abbiamo incubate con un anticorpo che riconosce specificamente l'istone γ H2Ax (**anticorpo primario**). Successivamente, abbiamo fatto un'incubazione con un **anticorpo secondario** fluorescente che riconosce l'anticorpo primario



Saggio di fosforilazione del γ H2Ax

Dopo l'incubazione con gli anticorpi, abbiamo osservato le cellule al microscopio a fluorescenza



Le cellule difettive hanno più danno (più foci)

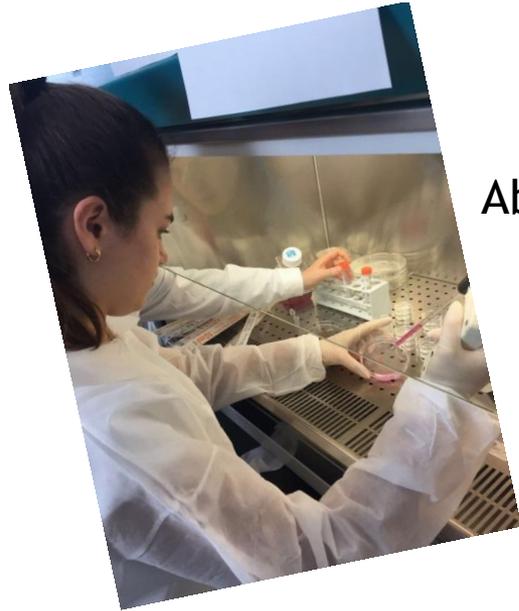
Test di citotossicità



Abbiamo effettuato il piastramento delle cellule

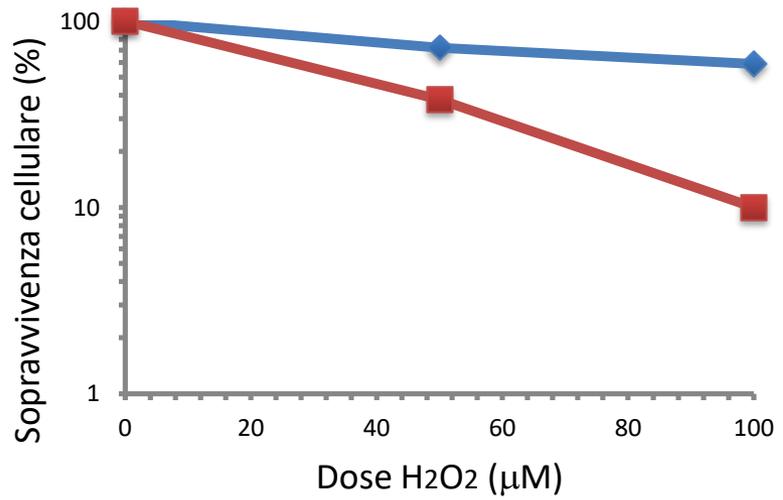
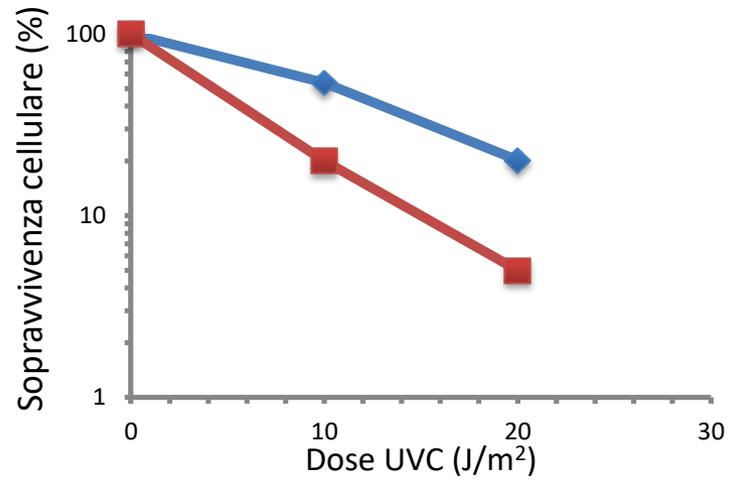
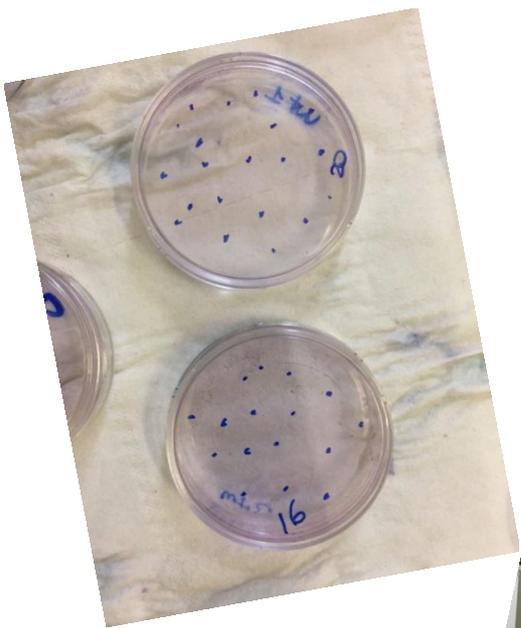
Poi, abbiamo trattato le cellule con i raggi UVC e l'acqua ossigenata (H₂O₂)...

...e le abbiamo incubate per 7 giorni per permettere ad ogni singola cellula di formare dei cloni.



Test di citotossicità:

Dopo l'incubazione abbiamo colorato i cloni per la conta e abbiamo così calcolato la percentuale di sopravvivenza



Analisi delle mutazioni:

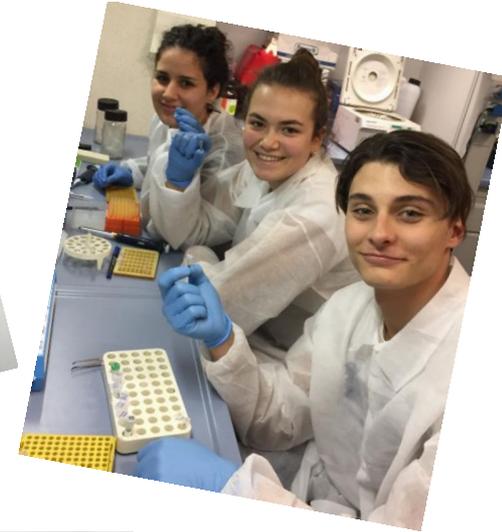
Se il danno non viene riparato, viene fissato in mutazione genetica, ovvero una modifica stabile ed ereditabile nella sequenza nucleotidica di un genoma, dovuta ad un'esposizione ambientale. → Come si analizzano le mutazioni?

Abbiamo estratto il DNA genomico

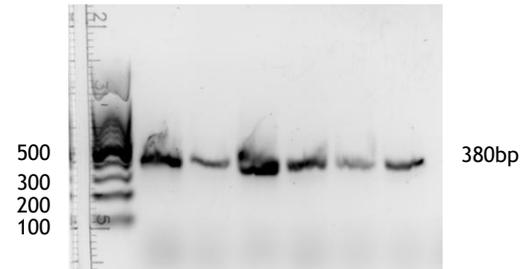


DNA genomico

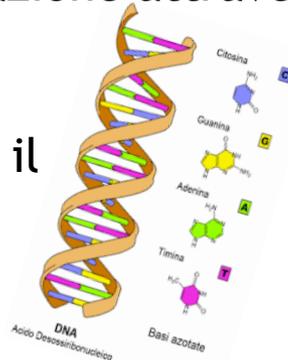
Abbiamo effettuato la lettura spettrofotometrica per determinare la quantità e la purezza del DNA estratto.



Abbiamo amplificato il DNA mediante PCR e abbiamo controllato l'amplificazione attraverso la corsa elettroforetica

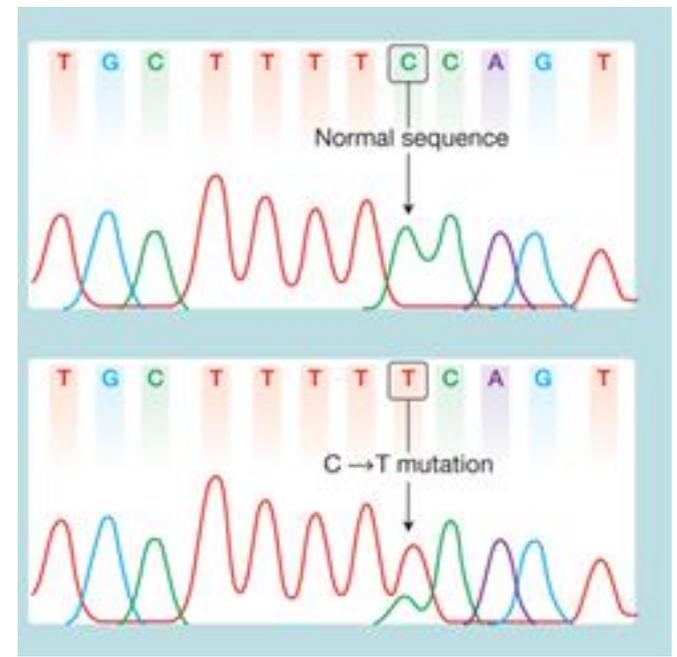
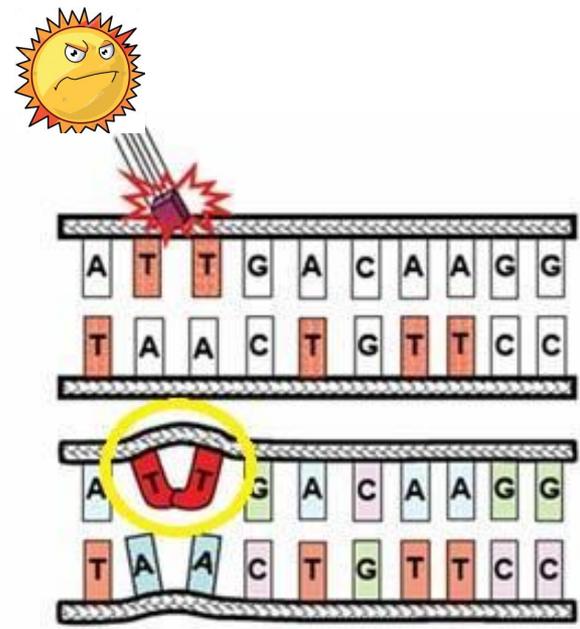


Abbiamo visto come si effettua il sequenziamento



La firma dell'UV

I raggi UV(solari) inducono un danno (**dimero di timina**), che se non riparato viene fissato in una mutazione specifica, che rappresenta la firma mutazionale (citosina → timina).



Se le mutazioni si accumulano nelle cellule della pelle



Tumore della pelle

Se le mutazioni si accumulano nelle cellule germinali



malattie genetiche ereditarie.

Grazie per l'attenzione!

