



Società Italiana di  
Gerontologia e  
Geriatrics

ARTICOLO ORIGINALE  
ORIGINAL ARTICLE

## Uso "inappropriato" del *Comet assay* per lo studio del processo di senescenza cellulare

The "unconventional" use of the *Comet assay* to study the process of cellular senescence

A. MOCALI, L. GIOVANNELLI, P. DOLARA\*, V.A. MITIDIERI COSTANZA\*, A. BAVAZZANO\*, F. PAOLETTI

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, Università di Firenze;

\*Dipartimento di Farmacologia, Università di Firenze; \*Azienda Ospedaliera di Prato, Asl 4, Prato

**Objective:** This work is aimed at disclosing some of the mechanisms involved during cellular senescence *in vitro* by using the *Comet assay* as the "conventional and unconventional" procedure.

**Methods:** Fetal lung fibroblasts from human MRC5 (NIA Aging Cell Repository) were propagated in DMEM plus 10% FCS and analyzed at low (PDL < 30) and high (PDL > 60) population doubling levels. Double/single DNA breaks were measured by the "alkaline *Comet assay*" employed also following lysis with ENDO-III, and expressed as % DNA in the Comet.

**Results:** The use of unconventional *Comet assay* has allowed to evaluate DNA damages (basal, total and oxidative) but also nuclear morphology and dimensions. Young and senescent MRC5 cultures exhibited similar levels of basal damage while the DNA oxidation level was clearly increased during senescence. This difference was not due to an increase of DNA damage in all the population; rather, there was an increased percentage of severely damaged nuclei. Senescent nuclei appeared more heterogeneous than young cells owing to the presence of large nuclei having less intense and more diffuse fluorescence. The separate analysis of either large or small nuclei showed a net correlation between DNA damage, essentially of oxidative type, and nuclear shape.

**Conclusions:** The contemporary analysis by *Comet assay* of different parameters can "fix" biologically heterogeneous cultures and could provide information also on their evolution toward senescence irrespectively of their PDL.

**Key words:** Cellular senescence • Comet assay • DNA damage

### Introduzione

I fibroblasti normali mantenuti in coltura proliferano per un numero limitato di duplicazioni, dopo il quale entrano in una fase irreversibile detta senescenza replicativa<sup>1</sup>. I fibroblasti fetali umani MRC5, modello sperimentale di senescenza *in vitro*, possono effettuare teoricamente circa 60 duplicazioni (*population doubling level* - PDL), dopo di che si arrestano in G1, pur rimanendo metabolicamente attivi per

lungo tempo. Esiste un alto grado di eterogeneità nella popolazione pre-senescente, ossia ad alto PDL, in quanto i cambiamenti morfo-funzionali<sup>2,4</sup> indotti dall'invecchiamento in coltura non sembrano intervenire in tutte le cellule allo stesso momento<sup>5</sup>. Anche per quanto riguarda le cause della senescenza replicativa, vengono descritti molti meccanismi che conducono al blocco della crescita cellulare *in vitro*<sup>6</sup>, tra cui un ruolo importante viene attribuito allo stress ossidativo ed in particolare al danno ossidativo al DNA<sup>7</sup>, che sembra sia direttamente implicato anche nell'accorciamento dei telomeri<sup>8</sup>.

Lo scopo di questo lavoro è descrivere la transizione tra il fenotipo pre-senescente e il senescente dei fibroblasti polmonari fetali umani MRC5. La tecnica impiegata per lo studio è quella del *Comet assay*<sup>9</sup>, utilizzata in modo convenzionale per misurare il danno al DNA a livello di singola cellula, ed in modo non convenzionale o "improprio" per identificare nelle colture cellulari sub-popolazioni raggruppabili per il diverso tipo ed entità di danno al DNA o per la diversa dimensione e/o forma dei nuclei. Inoltre l'organizzazione discontinua dei risultati del comet ci permette di descrivere meglio la coltura senescente, e fornisce maggiori informazioni sullo stadio reale di invecchiamento di una popolazione eterogenea, indipendentemente dal numero di duplicazioni effettuate in coltura.

## Materiali e Metodi

### COLTURE CELLULARI

I fibroblasti polmonari fetali umani MRC5 provengono dal NIA *Aging Cell Repository* (Camden, NJ), e sono stati mantenuti in condizioni standard di coltura, con DMEM più 10% di siero di vitello fetale (FCS, Euroclone, Celbio). Il livello di duplicazioni (PDL) delle colture è stato calcolato mediante l'equazione:  $PDL = 3,32 \times \log N/N_0$  (dove N e  $N_0$  indicano rispettivamente il numero delle cellule raccolte e delle seminate). Le colture cellulari si considerano giovani quando sono a  $PDL < 30$ , e senescenti a  $PDL > 60$  o comunque quando non hanno effettuato nemmeno una duplicazione dopo tre settimane dalla semina. Gli esperimenti su colture non senescenti sono stati effettuati in assenza di attività proliferativa, ossia alla confluenza.

### COMET ASSAY

La metodica del *Comet assay* permette la misurazione della quantità di rotture al DNA (singole e

doppie) della singola cellula mediante il calcolo della percentuale di fluorescenza che migra a distanza dal nucleo (nella coda della cometa) dopo elettroforesi su agarosio dei nuclei isolati<sup>9</sup>. La stessa tecnica viene impiegata per misurare il danno ossidativo al DNA<sup>10</sup>, che corrisponde alla quantità di basi ossidate sul DNA come schematizzato nella Figura 1, dalla differenza tra le rotture al DNA misurate dopo l'incubazione con l'enzima endonucleasi-III (ENDO-III), che taglia a livello delle basi pirimidiniche ossidate (danno totale), e le rotture misurate nei vetrini non trattati (danno basale). Sono stati analizzati campioni di circa 40.000 cellule, che sono risospese in agarosio (*low-melting agarose* - LMA, Fisher Scientific) lasciato solidificare a 4 °C su vetrini che vengono successivamente preparati secondo la metodica standard per ottenere lo srotolamento del DNA. Dopo elettroforesi per 20 min at a 0.8 V/cm and 300 mA a pH alcalino in una camera raffreddata (GNA-200, Pharmacia), i vetrini vengono lavati con un tampone neutralizzante (40 mM Tris-HCl, pH 7.4), colorati con bromuro di etidio e osservati al microscopio a fluorescenza il giorno successivo. Le immagini di 100 nuclei per campione sono state rilevate e analizzate con un software dedicato e accoppiato a una telecamera CCD (modello C5985, Hamamatsu). La quantità di DNA danneggiato migrato nella coda è stata espressa come percentuale della fluorescenza totale per ogni nucleo (% DNA nella coda). In alcuni esperimenti su cellule di colture senescenti, il danno al DNA è stato rilevato separatamente su nuclei di dimensioni piccole o grandi, in base all'osservazione soggettiva da parte dell'operatore.

### STATISTICA

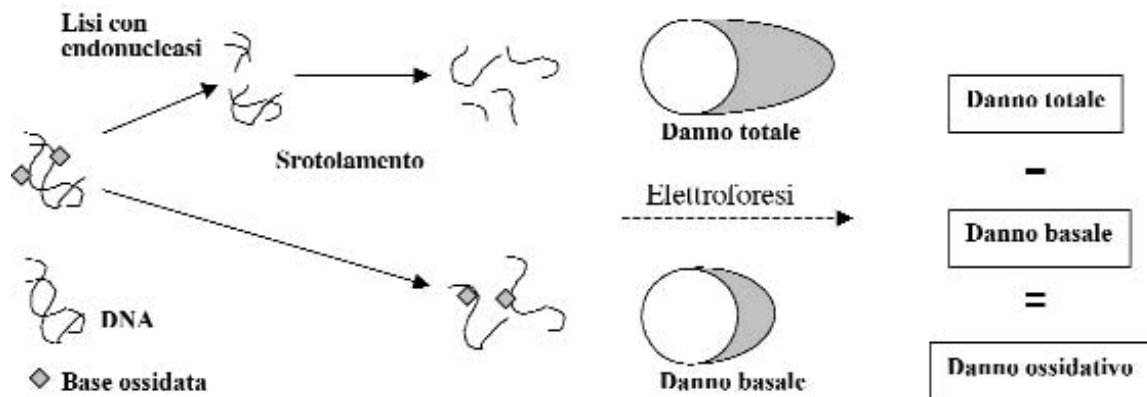
I risultati sono stati espressi come medie  $\pm$  S.E. Le differenze fra i gruppi sono state valutate mediante il test di t-Student; il livello di significatività è stato stabilito a  $P < 0,05$ .

## Risultati e discussione

### LO STATO DEL DNA IN COLTURE DI MRC5 GIOVANI E SENESCENTI

Mediante il *Comet assay* abbiamo misurato il danno al DNA in cellule MRC5 raccolte da colture giovani ( $PDL < 30$ ) o senescenti ( $PDL > 60$ ) (Tab. I), espresso come percentuale di DNA migrato nella coda della cometa. È stato determinato il danno totale, il danno basale ed il danno ossidativo come descritto nei metodi e schematizzato in Figura 1.

**Fig. 1.** Rappresentazione schematica della metodica del *Comet assay*, modificata per la determinazione del danno ossidativo al DNA.



Le determinazioni sono state eseguite prima (danno basale) e dopo l'incubazione dei nuclei con ENDO III (danno totale). Il danno ossidativo, ossia la quantità di basi ossidate, è stato infine calcolato dalla differenza tra il danno totale e basale. Come previsto, i nuclei dei fibroblasti senescenti hanno livelli mediamente più alti di danno totale al DNA, e la differenza significativa proviene dall'incremento nella quantità di danno ossidativo, che è circa il doppio dei nuclei della coltura giovane. Durante l'acquisizione dei risultati del comet riportati nella Tabella I abbiamo osservato che esiste una grande variabilità per quanto riguarda le percentuali di danno fra i nuclei appartenenti alla stessa coltura cellulare; il DNA può risultare molto danneggiato o quasi integro indipendentemente dal numero di duplicazioni effettuate. Quindi per ottenere una valutazione più accurata dei risultati del *Comet assay* abbiamo raccolto i dati del danno totale in 5 classi corrispondenti a percentuali di DNA danneggiato crescenti (classe 1: 0-5%; classe 2: 5,1-

17%; classe 3: 17,1-35%; classe 4: 35,1-60%; classe 5: 60,1-100%) come indicato da Giovannelli et al <sup>11</sup>. Infine abbiamo comparato la distribuzione dei nuclei di cellule provenienti da colture giovani e senescenti nelle diverse classi di danno (Fig. 2). In entrambi i casi ci sono circa il 20% di nuclei in classe 1, mentre nelle colture senescenti diminuiscono le classi di danno intermedio e aumentano di circa tre volte i nuclei in classe 4 e 5, quindi gravemente danneggiati. Questi ultimi sembrano quindi determinare il livello mediamente più alto di danno delle colture senescenti mostrato nella Tabella I. Questo modo "non convenzionale" di rappresentare il danno al DNA, sia a basso che ad elevato PDL, risulta essere molto utile per una corretta valutazione dello stato effettivo del DNA in colture cellulari. Infatti, possono essere identificati e quantificati nella stessa popolazione percentuali distinte di nuclei con livelli molto diversi di danno, e l'aumentare delle classi più danneggiate permette di monitorare l'invecchiamento effettivo di una popolazione eterogenea, indipendentemente dall'età misurata dal PDL.

**Tab. I.** Risultati del *Comet assay* eseguito su colture giovani (PDL < 30) e senescenti (PDL > 60).

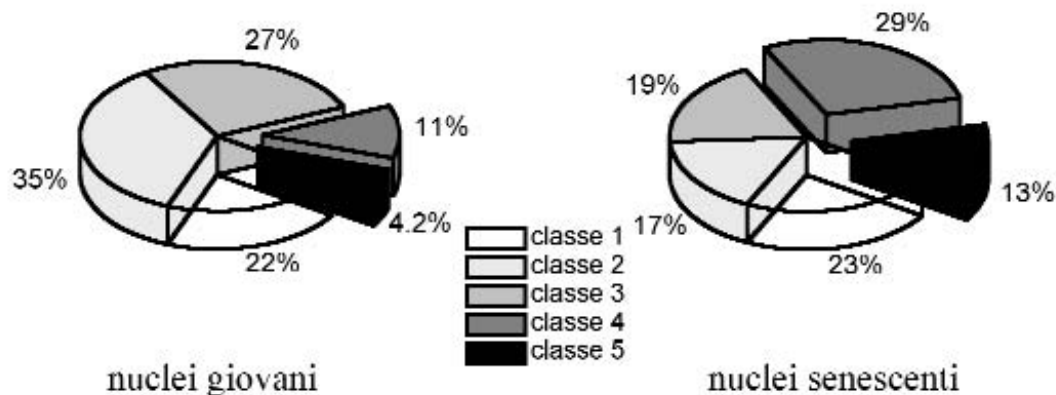
	Coltura giovane	Coltura senescente
Danno totale	20* ± 6,5%	29 ± 10%
Danno basale	7,5 ± 2,3%	7,8 ± 3%
Danno ossidativo	11,8 ± 2%	20,5** ± 2,5%

\* = I valori sono espressi come % di DNA migrato nella coda della cometa e riportati come media ± S.E. di 4 esperimenti; \*\* = P < 0,05 rispetto alla coltura giovane.

#### CORRELAZIONE TRA LA MORFOLOGIA DEI NUCLEI ED IL DANNO AL DNA

Durante la raccolta delle immagini del danno basale al DNA mediante il microscopio a fluorescenza, abbiamo notato la presenza di nuclei di dimensioni variabili; questi aumentano in quantità andando da colture di MRC5 giovani a senescenti. Infatti, si passa da nuclei relativamente piccoli e di forma regolare, che rappresentano la quasi totalità delle colture giovani, alla presenza di nuclei molto gran-

**Fig. 2.** Valutazione del danno al DNA mediante la distribuzione dei nuclei in 5 classi di danno totale, stabilite come segue: classe 1: 0-5%; classe 2: 5.1-17%; classe 3: 17.1-35%; classe 4: 35.1-60%; classe 5: 60.1-100% di DNA migrato nella coda della cometa. Nel grafico sono riportate le percentuali di nuclei presenti in ogni classe di danno in un tipico esperimento.



di con la cromatina meno addensata e distribuita disomogeneamente, che sono assai più frequenti nelle colture senescenti (Fig. 3A). Questo aspetto dei nuclei delle cellule senescenti è già stato descritto in passato da altri<sup>12</sup> e messo in relazione ad una minore capacità replicativa<sup>13 14</sup>, così come è noto che il DNA delle cellule senescenti è più danneggiato rispetto a quello delle giovani, soprattutto per quanto riguarda i livelli di danno ossidativo<sup>7</sup>. Come sviluppo di questa ricerca abbiamo invece pensato di analizzare la possibile correlazione tra la morfologia dei nuclei ed il danno al DNA nelle colture senescenti.

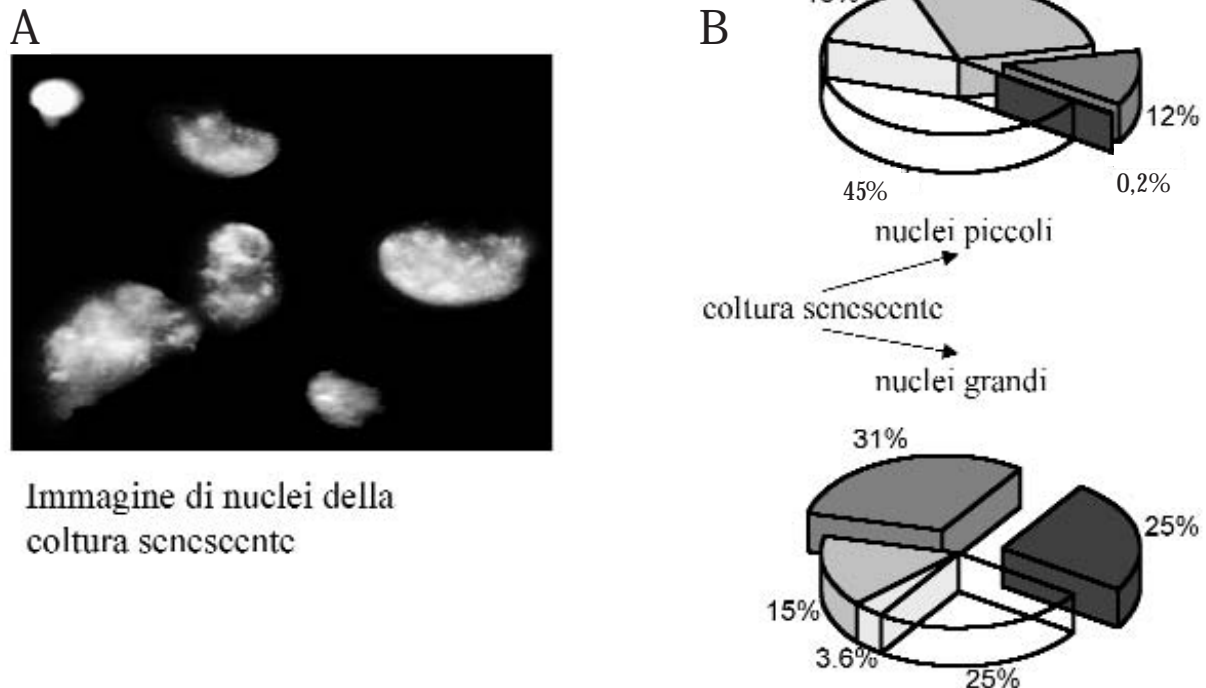
Partendo da colture senescenti, analizzate dopo tre settimane dalla semina quando poteva essere esclusa ogni attività replicativa, abbiamo raccolto i dati dei nuclei di piccole dimensioni e quelli dei grandi in due gruppi separati, sulla base dell'osservazione al microscopio da parte dell'operatore. I 100 nuclei osservati per ogni gruppo non tenevano conto della quantità relativa all'interno della popolazione senescente, formata per la maggior parte da nuclei di grandi dimensioni. In questo modo volevamo verificare se la dimensione nucleare e il danno al DNA fossero due caratteristiche correlate della cellula senescente. Dalla comparazione del danno misurato nei nuclei grandi e piccoli delle colture senescenti abbiamo rilevato mediamente livelli di danno molto superiori nel gruppo dei nuclei grandi, soprattutto per quanto riguarda la presenza di basi ossidate (5:1 circa rispetto ai nuclei piccoli, dato non mostrato). Dall'analisi del danno totale diviso in classi (Fig. 3B), abbiamo visto che questi due gruppi di cellule senescenti si compor-

tano come sub-popolazioni diverse, almeno a livello nucleare. Infatti, i nuclei piccoli sono meno danneggiati addirittura a livelli più bassi di quelli delle colture giovani (Fig. 2), con oltre il 55% dei nuclei nelle classi 1 e 2 che corrispondono ad una percentuale di DNA danneggiato inferiore al 20%. Per quanto riguarda il gruppo dei nuclei grandi senescenti, questi si spostano verso le classi più danneggiate, pur mantenendo oltre il 25% di nuclei nelle prime due classi. Queste osservazioni, che provengono da un altro modo "inappropriato" di guardare e rappresentare i risultati del *Comet assay*, confermano la nostra ipotesi sull'esistenza di una correlazione tra le dimensioni del nucleo dei fibroblasti fetali MRC5 ed il danno al DNA, essenzialmente di tipo ossidativo. Infine, abbiamo individuato nella coltura senescente nuclei senza un danno evidente al DNA, sia di aspetto "giovane" sia di aspetto "senescente", ma che comunque non hanno mantenuto l'attività proliferativa. Questo potrebbe dipendere dall'accorciamento dei telomeri, da cause epigenetiche (es. livelli di acetilazione degli istoni e di metilazione del DNA) o dall'incremento del volume cellulare.

## Conclusioni

Le colture di fibroblasti fetali umani MRC5 nella transizione verso il fenotipo senescente appaiono come una popolazione eterogenea. Con il progredire del ciclo vitale il numero delle cellule senescenti aumenta in modo graduale e queste sono identificate sia per le dimensioni del nucleo, sia

**Fig. 3.** Correlazione tra la morfologia dei nuclei e il danno totale al DNA nelle colture senescenti. (A) Immagine di nuclei di una coltura senescente ottenuta al microscopio a fluorescenza (Labophot-2, eccitazione: 546 nm; barriera: 580 nm) a 40X, durante le misurazioni del danno basale con il *Comet assay*. (B) Distribuzione dei nuclei in 5 classi di danno totale al DNA come descritto nella legenda alla Figura 2. I dati sono stati raccolti separatamente per nuclei piccoli o grandi della stessa coltura senescente, e rappresentati come indicato per la Figura 2.



per la quantità di danno accumulato nel DNA. La nostra proposta di interpretare i risultati del *Comet assay* in maniera discontinua può essere utile perché quantificando il grado di progressione dei nuclei verso il fenotipo "cosiddetto senescente" si forniscono maggiori informazioni sul livello reale di invecchiamento di una popolazione eterogenea, indipendentemente dal grado di PDL raggiunto. I nuclei delle cellule senescenti tendono ad aumentare di dimensioni, e questo incremento correla con una diversa conformazione della cromatina, meno addensata. Il danno al DNA, che si è visto

essere essenzialmente di tipo ossidativo, sembra collegato in gran parte a questi cambiamenti morfologici del nucleo. Le dimensioni nucleari potrebbero essere una causa favorente l'ossidazione delle basi del DNA per una minore "protezione" derivata dal rilassamento della cromatina. Inoltre, data la presenza di una parte di nuclei senescenti, grandi e non danneggiati, possiamo ipotizzare che questa correlazione valga in un solo senso, cioè che la minore condensazione della cromatina sia la causa e non la conseguenza del danno al DNA.

**Obiettivo:** Lo studio vuole descrivere alcuni dei meccanismi implicati nel processo di senescenza cellulare *in vitro* utilizzando una metodologia, il *Comet assay*, impiegata in maniera "convenzionale e non convenzionale".

**Metodi:** Fibroblasti polmonari fetali umani MRC5 (*NIA Aging Cell Repository*) erano propagati in

*vitro* in DMEM e 10% FCS e analizzati a basso numero di replicazioni cellulari (*population doubling level*, PDL < 30) e alla senescenza (PDL > 60). Rotture doppie/singole del DNA sono state misurate con metodo "*Alkaline Comet assay*" utilizzata anche dopo lisi con ENDO-III, espresse come % di DNA nella coda.

**Risultati:** l'impiego non convenzionale del *Comet assay* ci ha permesso di valutare i danni al DNA (basale, totale e ossidativo) ma anche aspetto e le dimensioni del nucleo. Colture di MRC5 giovani e senescenti hanno livelli simili di danno basale, mentre il grado di ossidazione del DNA è nettamente più alto nelle senescenti. Questa differenza non è dovuta ad un incremento del danno in tutta la popolazione senescente; piuttosto, aumenta la percentuale di nuclei molto danneggiati. Colture senescenti appaiono più eterogenee di quelle più giovani per la presenza di nuclei grandi con una fluorescenza meno intensa e più dif-

fusa. L'analisi separata dei nuclei grandi e piccoli ha evidenziato una correlazione tra il danno al DNA, essenzialmente di tipo ossidativo, e le dimensioni del nucleo.

**Conclusioni:** L'analisi contemporanea con *Comet assay* di parametri diversi "connota" biologicamente colture cellulari eterogenee e ne prevede l'evoluzione verso la senescenza indipendentemente dal PDL.

**Parole chiave:** Senescenza cellulare • *Comet assay* • Danno al DNA

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Hayflick L, Moorhead PS. *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res 1961;25:585-621.
- <sup>2</sup> Campisi J. *From cell to organisms: can we learn about aging from cell in culture?* Exp Gerontol 2001;36:607-18.
- <sup>3</sup> Cristofalo VJ, Pignolo RJ. *Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture*. Physiol Rev 1993;73:617-38.
- <sup>4</sup> Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH, Prothero J. *Cell enlargement: one possible mechanism underlying cellular senescence*. J Cell Physiol 1989;140:288-94.
- <sup>5</sup> Sozou PD, Kirkwood TB. *A stochastic model of cell replicative senescence based on telomere shortening, oxidative stress, and somatic mutations in nuclear and mitochondrial DNA*. Theor Biol 2001;213:573-86.
- <sup>6</sup> Serrano M, Blasco MA. *Putting the stress on senescence*. Curr Opin Cell Biol 2001;13:748-53.
- <sup>7</sup> Beckman KB, Ames BN. *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev 1998;78:547-81.
- <sup>8</sup> von Zglinicki T. *Oxidative stress shortens telomeres*. Trends Biochem Sci 2002;27:339-44.
- <sup>9</sup> Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Scheider EL. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res 1988;175:184-91.
- <sup>10</sup> Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL. *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA*. Carcinogenesis 1993;14:1733-5.
- <sup>11</sup> Giovannelli L, Cozzi A, Guarnieri I, Dolara P, Moroni F. *The Comet assay as a novel approach for studying DNA damage in focal cerebral ischemia: differential effects of NMDA receptor antagonists and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. J Cereb Blood Flow Metab 2002;22:697-704.
- <sup>12</sup> Macieira-Coelho A. *Chromatin reorganization during senescence of proliferating cells*. Mutat Res 1991;256:81-104.
- <sup>13</sup> Mitsui Y, Schneider EL. *Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures*. Exp Cell Res 1976;100:147-52.
- <sup>14</sup> Puvion-Dutilleul F, Azzarone B, Macieira-Coelho A. *Comparison between proliferative changes and nuclear events during ageing of human fibroblasts in vitro*. Mech Ageing Dev 1982;20:75-92.

## Ringraziamenti

Questo lavoro fa parte di un progetto di ricerca finalizzata finanziato dal Ministero della Salute tramite la Regione Toscana per il triennio 2001-2004, nell'ambito dei programmi speciali ex art. 12, comma 2, lett b.