

Aneta Koceva-Chyla

WPLYW SUBLETALNYCH DAWEK PROMIENIOWANIA GAMMA NA SUPERHELIKALNOŚĆ DNA ORAZ PRZEŻYWALNOŚĆ FIBROBLASTÓW LUDZKICH

W pracy badano wpływ subletalnych dawek promieniowania gamma na organizację i strukturę DNA oraz przeżywalność fibroblastów ludzkich (linia T₇₄).

Przeżywalność oznaczano metodą wzrostu klonalnego komórek w hodowli monowarstwowej *in vitro*, zmiany strukturalne DNA – na podstawie stopnia relaksacji nukleoidu, metodą wirowania lizowanych Tritonem X-100 komórek w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy. Do oznaczenia zawartości DNA we frakcjach gradientu stężeń sacharozy stosowano fluorochrom 33258 Hoechst. Superhelikalność DNA określano na podstawie interkalacji bromku etydyny.

Stwierdzono znaczne zmiany w organizacji i strukturze DNA w zakresie dawek promieniowania stosowanych do oznaczenia przeżywalności komórek – 30% utratę ujemnej superspiralizacji DNA po dawce 2 Gy i dalsze 2–3% zmiany w superhelikalności po dawkach większych (6–10 Gy). Wyniki te wskazują na znaczną relaksację nukleoidu komórek napromieniowanych dawkami promieniowania gamma większymi od 4 Gy. Po dawkach tych zaobserwowano również bardzo niski procent przeżywalności (1–3%). Znaczna utrata ujemnej superhelikalności DNA i relaksacja nukleoidu, spowodowana rozwinięciem superstruktur domen DNA (wyciągnięciem pętli DNA) po dawkach promieniowania gamma, po których również znacznie obniżał się procent przeżywalności komórek wskazuje, że indukowane przez promieniowanie zmiany w trzecio- i czwartorzędowej strukturze DNA uniemożliwiają właściwe funkcjonowanie i replikację genomu, co w konsekwencji prowadzi do reprodukcyjnej śmierci komórki.

1. WSTĘP

Jednym z istotnych czynników mutagennych, z którymi człowiek spotyka się na co dzień, jest promieniowanie jonizujące, a w szczególności małe jego dawki, akumulowane w organizmie w wyniku naturalnego promieniowania środowiska oraz stosowania promieniowania do celów diagnostycznych i terapeutycznych. Napromieniowanie komórki powoduje uszkodzenie jej struktury

i zakłócenie pełnionych przez nią funkcji biologicznych. Końcowy efekt promieniowania zależy m. in. od takich czynników, jak dawka promieniowania, wrażliwość komórki na promieniowanie, skuteczność mechanizmów reperacyjnych DNA. Wpływ promieniowania na przeżywalność komórki stanowi sumaryczny efekt wszystkich tych procesów.

Dotychczasowe badania nad wpływem promieniowania jonizującego na organizmy żywe wykazały, że jednymi z najpoważniejszych uszkodzeń w genomie eukariotycznym są indukowane przez czynniki mutagenne pojedyncze i podwójne pęknięcia DNA [14].

Pojedyncze pęknięcia (SSB) powstają w wyniku rozerwania jednego z łańcuchów heliksu DNA. Są to uszkodzenia występujące najczęściej, indukowane niewielkimi dawkami promieniowania i prowadzące do różnego rodzaju mutacji w organizmie. W większości komórek pojedyncze pęknięcia są naprawiane za pomocą różnych mechanizmów reperacyjnych, przy udziale enzymów [18].

Rzadziej występującym uszkodzeniem są podwójne pęknięcia DNA (DSB), będące wynikiem rozerwania obu łańcuchów heliksu w tych samych lub sąsiadujących ze sobą o kilka par zasad miejscach. Są one szczególnie groźne dla organizmu, gdyż niszczą natywną strukturę DNA, a większość z nich nie jest naprawiana przez komórkę [35].

Pojedyncze i podwójne pęknięcia mogą powstawać również w wyniku działania mutagenów chemicznych [34].

Z uwagi na ciągle narażenie organizmu ludzkiego na działanie niskich poziomów czynników uszkadzających, wzrasta zainteresowanie opracowaniem czułych i niedrogich metod, umożliwiających wykrycie i analizę określonej mutacji oraz testowanie efektów genotoksycznych mutagenów środowiskowych [16]. Wiele z wysiłków w tej dziedzinie skierowanych jest na opracowanie metod, pozwalających na wykrycie i monitorowanie mutacji w pojedynczej komórce.

Praca przedstawia nieskomplikowaną i szybką metodę umożliwiającą ocenę wpływu subletalnych dawek promieniowania, gamma na organizację i strukturę materiału genetycznego komórki ludzkiej w połączeniu z oceną zdolności komórki do przeżycia indukowanych uszkodzeń.

2. MATERIAŁ

2.1. Komórki

Materiałem do badań były fibroblasty ludzkie linii T₇₄, dostarczone przez Bank Komórek Centrum Zdrowia w Warszawie.

3. METODY

3.1. Hodowla fibroblastów

Hodowlę komórek prowadzono w medium Eagla (MEM) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej oraz gentamycyny (50 µg/ml), w atmosferze 5% CO₂, temp. 37°C i 100% wilgotności. Medium wzrostowe zmieniano raz tygodniowo.

3.2. Napromieniowanie fibroblastów

Komórki napromieniowywano w monowarstwie, w temp. od 0° do 4°C, dawkami od 0 do 10 Gy promieniowania gamma (źródło ⁶⁰Co, wydajność źródła 530 Gy/godz., mierzona za pomocą dozymetru Fricke'go). Próbę kontrolną (dawka 0 Gy) przygotowywano analogicznie i na czas napromieniowania przechowywano w temp. od 0 do 4°C.

3.3. Oznaczenie przeżywalności fibroblastów na podstawie wzrostu klonalnego komórek *in vitro*

Napromieniowane i kontrolne komórki przemywano dwukrotnie zimnym (od 0° do 4°C) PBS, dodawano medium i hodowano przez okres 3 tygodni. Medium zmieniano raz tygodniowo. Napromieniowane fibroblasty do momentu ponownego umieszczenia w inkubatorze przechowywano w lodzie, w temp. od 0° do -4°C. Po upływie 3 tygodni barwiono komórki 0,05% roztworem fioletu krystalicznego w 10% formaldehydzie i pod mikroskopem liczono kolonie składające się z co najmniej 50 komórek.

3.4. Fluorymetryczne oznaczenie DNA fluorochromem 33258 Hoechst

Do identyfikacji DNA we frakcjach gradientu stężeń sacharozy stosowano fluorochrom 33258 Hoechst w stężeniu 1 µg/ml. Oznaczenia fluorescencji przeprowadzano przy $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 490$ nm (szczeliny 10 nm) na spektrofluorymetry Jobin-Yvon (Francja).

3.5. Wirowanie nukleoidu w obojętnym gradiencie gęstości sacharozy

Uwolnione z lizowanych komórek nukleoidy wirowano w obojętnym gradiencie gęstości sacharozy (15–30% sacharoza w 2 M NaCl, 0,01 M EDTA

i 0,01 M Tris o pH 7,5 oraz 1 $\mu\text{g/ml}$ 33258 Hoechst). Gradienty stężeń sacharozy formowano przy użyciu automatycznego urządzenia Gradient Former, firmy ISCO, USA. Bezpośrednio przed wirowaniem fibroblasty lizowano na powierzchni sacharozy w ciągu 1 godz., w ciemności, w temperaturze pokojowej, płynem lizującym o składzie 1% Triton X-100, 0,2 M EDTA, 0,01 M Tris pH 8,0 i 2 M NaCl. Próby wirowano w rotorze wychylnym SW-60 w ultrawirówce Beckman L5-65, w temp. 15°C i 15 000 obr./min, po czym frakcjonowano na 30 frakcji przez podwarstwienie 50% sacharozą, na urządzeniu Gradient Fractionator, firmy ISCO, USA. Zawartość DNA w poszczególnych frakcjach oznaczano na podstawie pomiaru natężenia fluorescencji w warunkach opisanych w p. 3.4.

3.6. Oznaczenie superhelikalności DNA

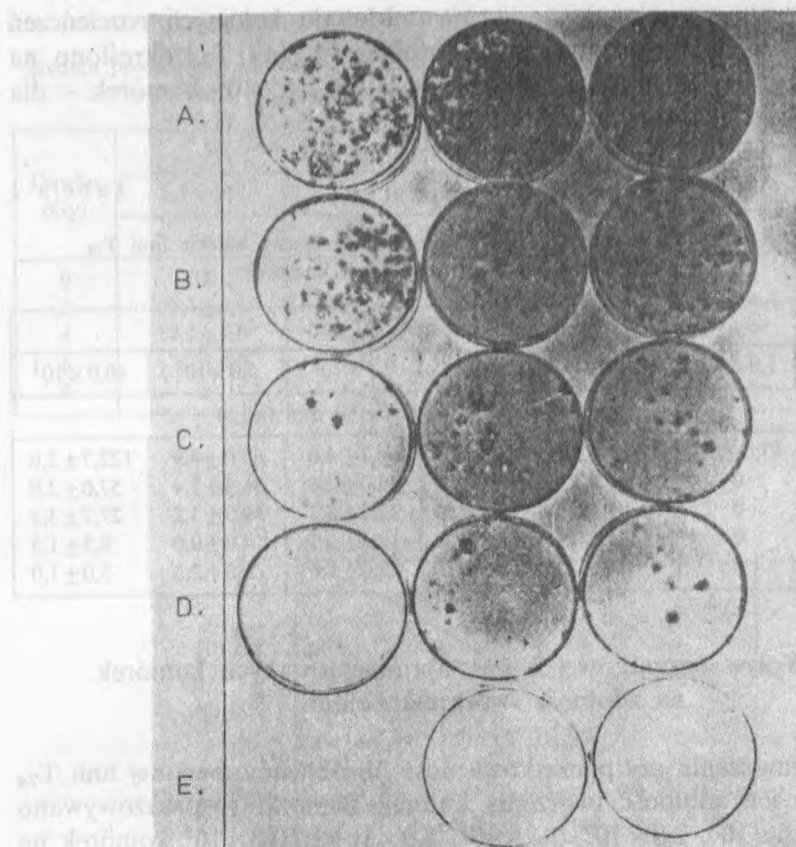
Superhelikalność DNA oznaczano na podstawie relaksacji nukleoidu w obecności bromku etydyny (EB). Nukleoidy wirowano w obecności różnych stężeń EB w warunkach identycznych do opisanych w p. 3.5. Stosowano stężenia w zakresie 1–20 μg EB/ml sacharozy. Natężenie fluorescencji, po interkalacji EB do DNA, mierzono na spektrofotometry Jobin-Yvon (Francja) przy $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ (szczeliny 10 nm).

4. WYNIKI

4.1. Wpływ promieniowania na przeżywalność fibroblastów

Subletalne, oraz zbliżone do nich, dawki promieniowania mogą powodować interfazową lub reprodukcyjną śmierć komórki [6]. W przypadku pierwszym komórka ginie natychmiast lub wkrótce po napromieniowaniu, w drugim zaś funkcjonuje nadal, lecz nie jest zdolna do reprodukcji. Komórki, które przeżyły określoną dawkę promieniowania i odzyskały w pełni zdolność reprodukcyjną, podejmują normalny cykl życiowy i w wyniku kolejnych podziałów mitotycznych tworzą kolonie identycznych komórek. Każda z kolonii powstaje z podziału i wzrostu klonalnego pojedynczej komórki.

Przykład szalek z koloniami pokazano na fot. 1, gdzie szereg A zawiera kolonie, utworzone przez fibroblasty nienapromieniowane, szeregi B, C, D i E – kolonie, utworzone przez fibroblasty napromieniowane dawkami od 2 do 8 Gy promieniowania gamma.



Fot. 1. Kolonie utworzone przez napromieniowane i nienapromieniowane fibroblasty ludzkie linii T₇₄. Ilość komórek/szalkę 60 mm przed napromieniowaniem $\sim 5,0 \times 10^3$; A – 0 Gy (kontrola), B – 2 Gy, C – 4 Gy, D – 6 Gy, E – 8 Gy

4.1.1. Określenie minimalnej ilości komórek, przy której fibroblasty ludzkie linii T₇₄ zdolne są do wzrostu klonalnego *in vitro*

W warunkach *in vitro* poszczególne rodzaje komórek zdolne są do wzrostu klonalnego przy różnej początkowej ilości komórek. Jest ona inna dla komórek poszczególnych linii tego samego rodzaju, w znacznym stopniu zależy także od warunków prowadzenia hodowli. W związku z tym konieczne jest każdorazowe wyznaczenie minimalnej ilości komórek, przy której w danych warunkach hodowli (wielkość naczyń, rodzaj surowicy i płynów hodowlanych, częstotliwość zmiany medium wzrostowego itp.), komórki danej linii

zdolne są do wzrostu klonalnego *in vitro*. Metodą kolejnych rozcieńczeń wartość tę dla nienapromieniowanych fibroblastów linii T₇₄ określono na $1,0 \times 10^3$ komórek/szalkę o średnicy 60 mm i na $1,5 \times 10^3$ komórek – dla fibroblastów napromieniowanych (tab. 1).

Tabela 1

Ilość kolonii utworzonych przez napromieniowane fibroblasty ludzkie linii T₇₄ przy różnych początkowych stężeniach komórek

Dawka (Gy)	Ilość komórek/szalkę 60 mm						
	$0,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$10,0 \times 10^3$
	Ilość komórek/szalkę o średnicy 60 mm ($\bar{x} \pm s$)						
0	0	$13,6 \pm 0,3$	$36,6 \pm 1,5$	$49,3 \pm 4,0$	$64,3 \pm 4,0$	$65,0 \pm 4,9$	$122,7 \pm 2,0$
2	0	0	$14,5 \pm 1,7$	$16,3 \pm 1,5$	$36,0 \pm 2,6$	$36,3 \pm 3,4$	$57,0 \pm 2,0$
4	0	0	$10,0 \pm 1,0$	$5,6 \pm 0,5$	$22,3 \pm 3,2$	$19,3 \pm 3,2$	$27,7 \pm 3,2$
6	0	0	$1,0 \pm 0,0$	$3,6 \pm 0,5$	$10,3 \pm 2,9$	$4,0 \pm 0,0$	$8,3 \pm 1,5$
8	0	0	0	$0,7 \pm 1,1$	$2,0 \pm 1,0$	$2,3 \pm 2,3$	$3,0 \pm 1,0$

4.1.2. Wpływ początkowej ilości napromieniowanych komórek na zdolność tworzenia kolonii

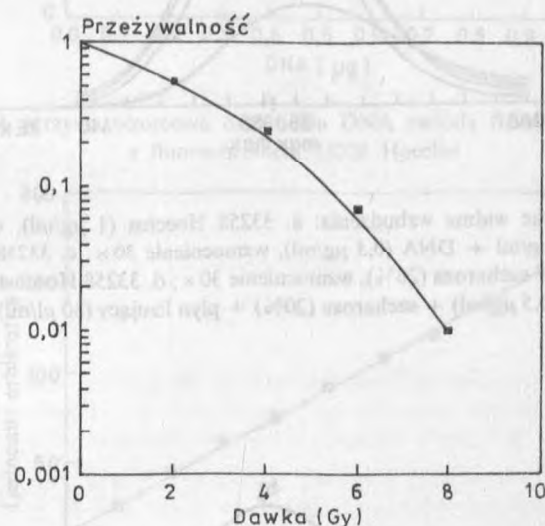
W celu sprawdzenia czy początkowa ilość fibroblastów badanej linii T₇₄ ma wpływ na ich zdolność tworzenia kolonii, komórki rozpaszowywano w ilościach: $1,5 \times 10^3$, $2,0 \times 10^3$, $2,5 \times 10^3$, $5,0 \times 10^3$ i $10,0 \times 10^3$ komórek na szalkę o średnicy 60 mm. Fibroblasty napromieniowywano dawkami 2, 4, 6 i 8 Gy promieniowania gamma, po czym hodowano przez okres 3 tygodni.

W badanym zakresie stężeń nie stwierdzono istotnego wpływu początkowej ilości fibroblastów na średnią procentową zdolność tworzenia kolonii – wraz ze wzrostem dawki promieniowania procent zdolnych do reprodukcji komórek zmniejszał się w sposób podobny (tab. 2, rys. 1). Porównanie testem F Snedecora, metodą analizy wariancji ANAWA II [33] współczynników regresji dla nachylenia prostych przedstawiających zależność ilości utworzonych kolonii od dawki promieniowania, nie wykazało statystycznie istotnych różnic w porównywalnych parametrach przy poziomie istotności $\alpha = 0,95$. Niezależnie od stosowanego stężenia początkowego następował znaczny spadek przeżywalności komórek po dawkach większych od 4 Gy i znikomy procent przeżywalności po dawkach 6 i 8 Gy (tab. 2, rys. 1). Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku stężeń większych ($5,0 \times 10^3$ i $10,0 \times 10^3$), znaczna liczba utworzonych kolonii stwarzała pewne trudności z dokładnym ich policzeniem, w związku z czym za optymalne dla tej linii komórkowej uznano stężenia $2,0 \times 10^3$ – $2,5 \times 10^3$ komórek/szalkę o średnicy 60 mm.

Tabela 2

Średnia procentowa zdolność tworzenia kolonii przez napromieniowane fibroblasty ludzkie linii T₇₄ przy różnych początkowych stężeniach komórek

Dawka (Gy)	Ilość komórek/szalkę 60 mm				
	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$10,0 \times 10^3$
	Ilość kolonii/szalkę 60 mm (w %)				
0	100	100	100	100	100
2	$39,2 \pm 4,3$	$33,1 \pm 3,0$	$56,0 \pm 4,1$	$55,4 \pm 5,1$	$46,5 \pm 2,0$
4	$27,3 \pm 3,0$	$11,5 \pm 1,1$	$34,7 \pm 4,9$	$29,8 \pm 4,9$	$22,5 \pm 2,6$
6	$2,7 \pm 0,0$	$7,4 \pm 1,3$	$16,1 \pm 3,8$	$6,2 \pm 0,0$	$6,8 \pm 1,1$
8	0	$1,4 \pm 2,3$	$3,1 \pm 1,3$	$3,6 \pm 3,5$	$2,4 \pm 0,8$



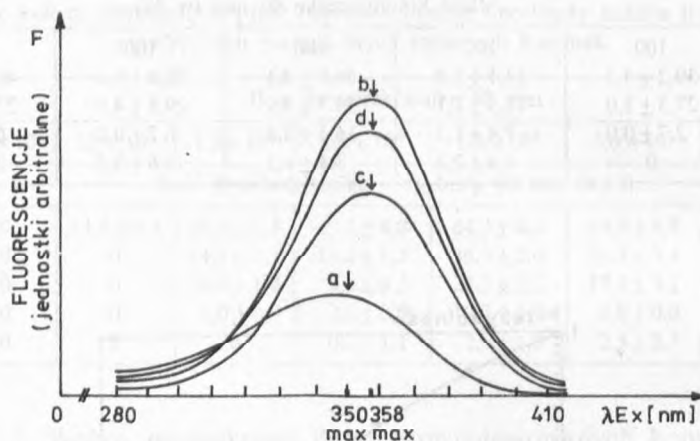
Rys. 1. Przeżywalność napromieniowanych fibroblastów ludzkich linii T₇₄ (na osi y – frakcja komórek, które przeżyły daną dawkę promieniowania)

4.2. Fluorymetryczne oznaczenie DNA przy użyciu fluorochromu 33258 Hoechst

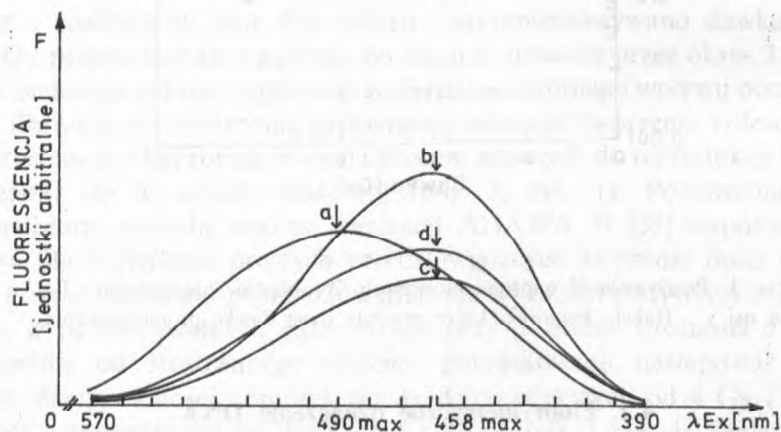
Ilość DNA w poszczególnych frakcjach gradientu gęstości sacharozy oznaczano na podstawie natężenia fluorescencji po przyłączeniu fluorochromu

33258 Hoechst. Reaguje on z obszarami DNA bogatymi w A-T [5], mechanizm reakcji dotychczas nie został dokładnie poznany.

Przyłączenie DNA powoduje przesunięcie maksimum fluorescencji czystego fluorochromu z 350 do 358 nm w widmie wzbudzenia i z 490 do 458 nm – w widmie emisji oraz znaczny wzrost natężenia fluorescencji (30-krotny

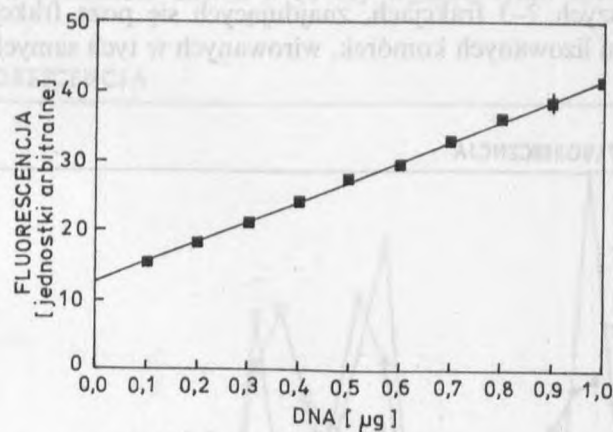


Rys. 2. Fluorescencyjne widma wzbudzenia: a. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$), wzmocnienie 300 $\times$; b. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$), wzmocnienie 30 $\times$; c. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) + sacharoza (20%), wzmocnienie 30 $\times$; d. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) + sacharoza (20%) + płyn lizujący (30 $\mu\text{l/ml}$), wzmocnienie 30 $\times$

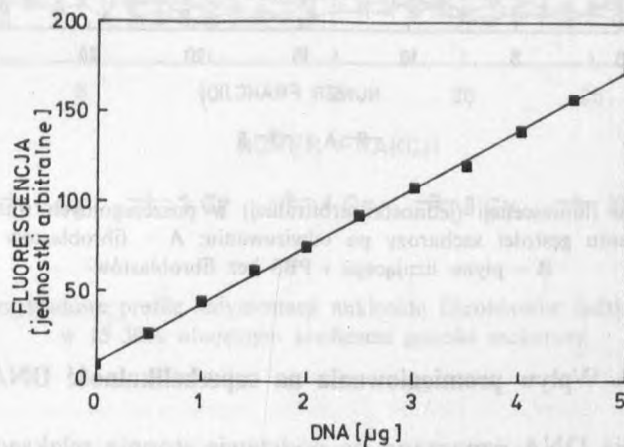


Rys. 3. Fluorescencyjne widma emisji: a. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$), wzmocnienie 300 $\times$; b. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$), wzmocnienie 30 $\times$; c. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) + sacharoza (20%), wzmocnienie 30 $\times$; d. 33258 Hoechst (1 $\mu\text{g/ml}$ + DNA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) + sacharoza (20%) + płyn lizujący (30 $\mu\text{g/ml}$), wzmocnienie 30 $\times$

w przypadku widma wzbudzenia i 15-krotny w przypadku widma emisji (rys. 2, 3). Ilościowe oznaczenie reakcji na podstawie krzywych wzorcowych wykazało liniową zależność wiązania DNA do fluorochromu w zakresie stężeń nanogramowych i mikrogramowych, o dużym nachyleniu prostych (rys. 4, 5).



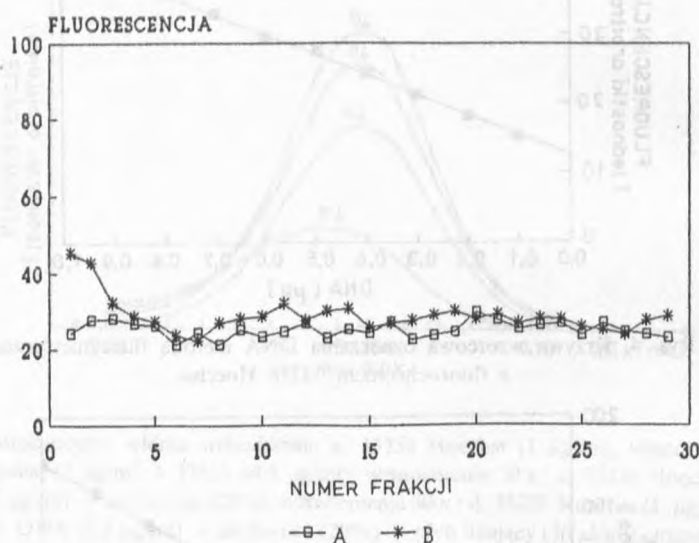
Rys. 4. Krzywa wzorcowa oznaczenia DNA metodą fluorymetryczną z fluorochromem 33258 Hoechst



Rys. 5. Krzywa wzorcowa oznaczenia DNA metodą fluorymetryczną z fluorochromem 33258 Hoechst

W celu ustalenia optymalnych warunków oznaczenia DNA wykonano widma wzbudzenia i emisji fluorochromu w obecności składników gradientu gęstości sacharozy. Stwierdzono, że sacharoza w stosowanych stężeniach (15–30%) powoduje nieznaczne wygaszenie fluorescencji w obu widmach, płyn lizujący natomiast – nieznaczny jej wzrost (rys. 2, rys. 3). Pozostałe składniki

(EDTA, Tris-HCl, NaCl) nie miały wpływu na wielkość fluorescencji. Wirowania kontrolne, w których wirowano fibroblasty zawieszone w PBS, bez płynu lizującego lub PBS i płyn lizujący bez fibroblastów, wykazały, że w przypadku nielizowanych komórek w żadnej z frakcji nie występuje przyrost natężenia fluorescencji; w przypadku drugim zaś – natężenie fluorescencji było większe tylko w pierwszych 2–3 frakcjach, znajdujących się poza frakcjami szczytu DNA nukleoidu lizowanych komórek, wirowanych w tych samych warunkach (rys. 6).



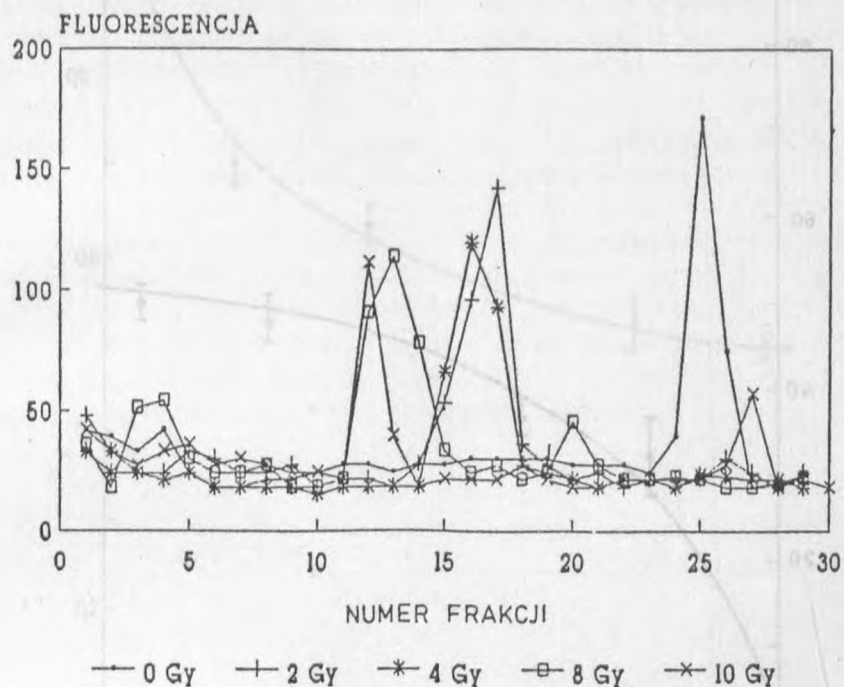
Rys. 6. Natężenie fluorescencji (jednostki arbitralnej) w poszczególnych frakcjach 15–30% obojętnego gradientu gęstości sacharozy po odwirowaniu: A – fibroblastów nielizowanych, B – płynu lizującego i PBS bez fibroblastów

4.3. Wpływ promieniowania na superhelikalność DNA

Uszkodzenia DNA oznaczano na podstawie stopnia relaksacji nukleoidu napromieniowanych fibroblastów oraz zmian w superhelikalności DNA.

W zastosowanym 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy, DNA nukleoidu sedymentuje w postaci ostrego szczytu, obejmującego 2–3 frakcje w przypadku fibroblastów nienapromieniowanych i 3–4 frakcje w przypadku fibroblastów napromieniowanych. Szybkość migracji DNA w gradiencie gęstości sacharozy, ulegała zmniejszeniu wraz z wzrostem dawki promieniowania (rys. 7), co spowodowane było stopniową utratą ujemnej superhelikalności DNA wewnątrz jądra komórki i przejściem cząsteczki ze struktury zwartej

w strukturę bardziej otwartą i zrelaksowaną. Maksymalny efekt zaobserwowano po dawce 2 Gy, po której następowała 30% utrata ujemnej superspiralizacji heliksu w stosunku do kontroli (rys. 8). Przy dawkach większych zmiany były mniejsze – względny spadek szybkości sedimentacji nukleoidów w przedziale dawek 8–10 Gy wynosił tylko 2,4% (tab. 3).

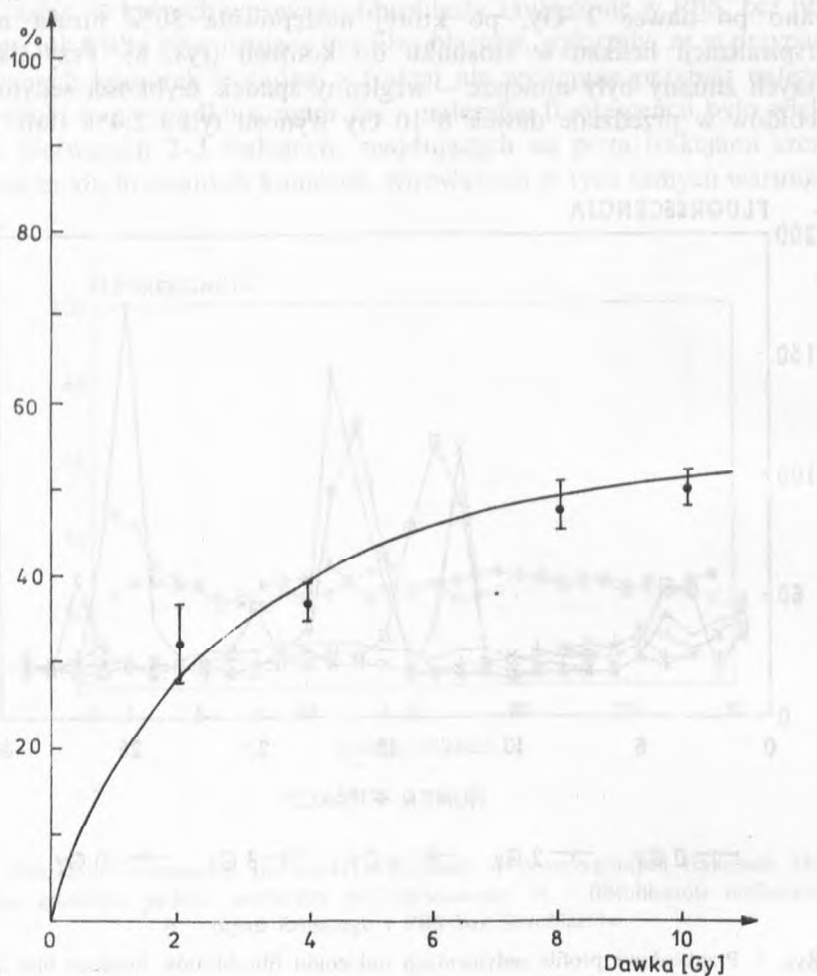


Rys. 7. Przykładowe profile sedimentacji nukleoidu fibroblastów ludzkich linii T₇₄ w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy

Tabela 3

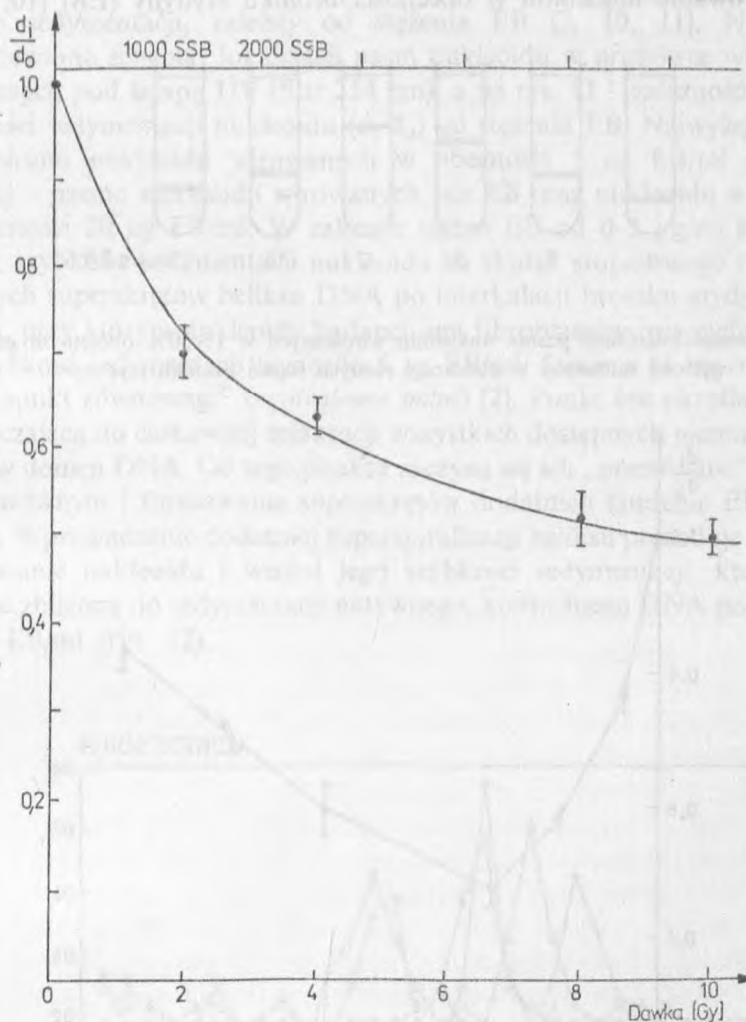
Procentowa utrata ujemnej superspiralizacji DNA i ilość indukowanych pojedynczych pęknięć w funkcji dawki promieniowania

Dawka (Gy)	0	2	4	8	10
$d_i/d_0 \times 100$	100	$69,4 \pm 3,5$	$63,2 \pm 2,4$	$51,8 \pm 2,8$	$49,6 \pm 2,3$
SSB/genom	—	900	1700	3500	4300



Rys. 8. Procent utraty ujemnej superspiralizacji DNA napromieniowanych fibroblastów ludzkich w stosunku do kontroli (fibroblasty nienapromieniowane)

Względą drogę sedymentacji nukleoidu w funkcji dawki promieniowania przedstawiono na rys. 9. Liniową część krzywej wykorzystano do oszacowania ilości indukowanych pojedynczych pęknięć DNA, ekwiwalentnych dla danej dawki promieniowania [17]. Uzyskane wartości dla dawek w zakresie 2–10 Gy wynoszą odpowiednio 900–4300 pojedynczych pęknięć DNA/genom komórki (tab. 3).

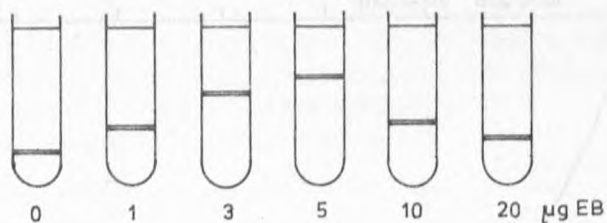


Rys. 9. Względna odległość sedimentacji nukleoidu w 15-30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy: d_i – odległości sedimentacji nukleoidu fibroblastów napromieniowanych; d_0 – odległość sedimentacji nukleoidu fibroblastów nienapromieniowanych (kontrola)

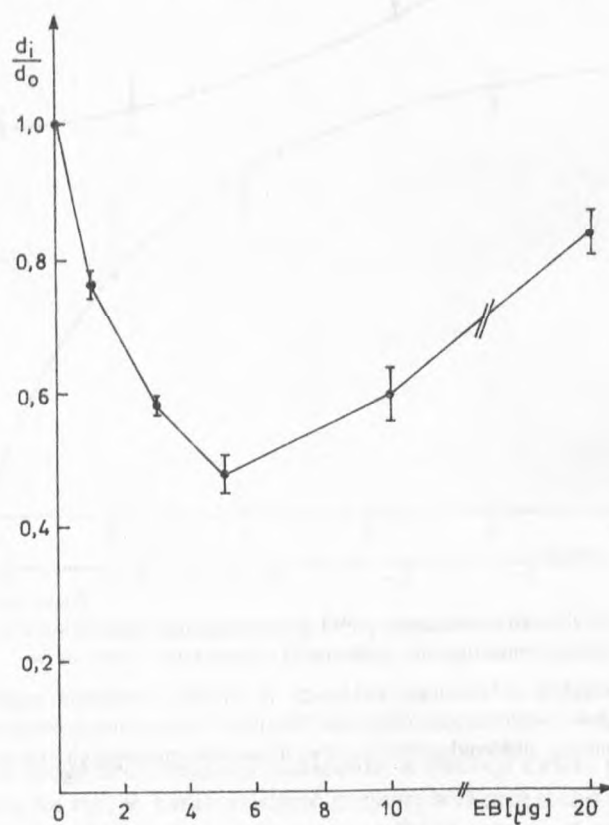
4.4. Oznaczenie superhelikalności DNA

W celu stwierdzenia czy w zastosowanych warunkach lizy i wirowania komórek sedimentacja nukleoidu uwarunkowana jest strukturą DNA wewnątrz jądra, a zmiany w szybkości sedimentacji są wynikiem zmian

konformacyjnych zachodzących w superstrukturach DNA *in vivo*, przeprowadzono wirowanie nukleoidu w obecności bromku etydyny (EB) [10, 11].

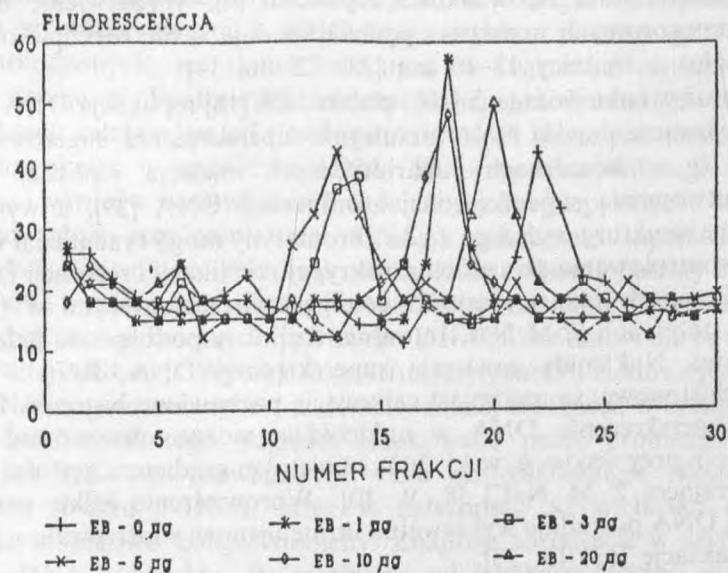


Rys. 10. Schemat lokalizacji pasma nukleoidu wirowanych w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy w obecności różnych stężeń bromku etydyny



Rys. 11. Sedymencja nukleoidu w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy w obecności różnych stężeń bromku etydyny (EB): d_i – odległość sedimentacji nukleoidu w obecności EB; d_o – odległość sedimentacji nukleoidu bez EB (kontrola)

Stwierdzono charakterystyczny dla superhelikalnego DNA dwufazowy sposób sedimentacji, zależny od stężenia EB [2, 10, 11]. Na rys. 10 przedstawiono schemat lokalizacji pasm nukleoidu w próbówce wirowniczej, widocznych pod lampą UV (filtr 254 nm), a na rys. 11 – zależność względnej szybkości sedimentacji nukleoidu (d_i/d_0) od stężenia EB. Najwyżej położone było pasmo nukleoidu wirowanych w obecności 5 μg EB/ml sacharozy, najniżej – pasmo nukleoidu wirowanych bez EB oraz nukleoidu wirowanych w obecności 20 μg EB/ml. W zakresie stężeń EB od 0–5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ następował spadek szybkości sedimentacji nukleoidu na skutek stopniowego rozwinięcia ujemnych superskrętów heliksu DNA po interkalacji bromku etydyny. Stężenie EB, przy którym nukleoidy badanej linii fibroblastów osiągnęły najmniejszą szybkość sedimentacji wynosiło 5 μg EB/ml. Stężenie to można określić jako „punkt równowagi” (*equivalence point*) [2]. Punkt ten określa ilość EB, wystarczającą do całkowitej relaksacji wszystkich dostępnych ujemnych superskrętów domen DNA. Od tego punktu zaczyna się ich „przewijanie” w kierunku przeciwnym i formowanie superskrętów dodatnich (stężenie EB od 5–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Wprowadzenie dodatkowej superspiralizacji heliksu powoduje stopniowe upakowanie nukleoidu i wzrost jego szybkości sedimentacji, która osiąga wartość zbliżoną do sedimentacji natywnego, kontrolnego DNA przy stężeniu 20 μg EB/ml (rys. 12).



Rys. 12. Przykładowe profile sedimentacji nukleoidu fibroblastów ludzkich linii T₇₄ w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy w obecności różnych stężeń bromku etydyny

5. DYSKUSJA

Hydrodynamiczne badania interfazowego genomu komórek eukariotycznych wykazały, że włókna chromatynowe zawierają mocno upakowane struktury solenoidalne, zorganizowane w duże supersolenoidalne pętle DNA, utrzymujące swoją strukturę za pomocą wiązania do białek niehistonowych [2, 10, 11, 26, 28]. Istnienie superhelikalnych domen DNA, podobnych do wielkich pętli, wychodzących ze wspólnego szkieletu stwierdzono na zdjęciach z mikroskopu elektronowego preparatów jądrowego DNA, otrzymanych przez łagodną lizę jąder komórek, po oddysocjowaniu histonów i większości białek niehistonowych [11]. Integralność pętli zostaje zapewniona przez ich zakotwiczenie w matriks jądrowej [1, 27, 28], skąd można je uwolnić działaniem detergentów jonowych lub roztworów 2 M NaCl i 5 M mocznika [25, 30, 40]. Powodują one degradację struktury matriks, co sugeruje, że istotną rolę w zakotwiczeniu pętli DNA odgrywają wiązania wodorowe i jonowe.

Obecnie przyjmuje się, że domeny DNA są podstawową jednostką organizacji superstruktur DNA wyższego rzędu w komórce eukariotycznej. Są one obecne tak w jądrze interfazowym, jak i w chromosomach metafazowych [11, 28, 41].

Szereg danych przemawia za tym, że miejsca zakotwiczenia pętli DNA w matriks nie są przypadkowe i znajdują się w pobliżu fragmentów DNA bogatych w A-T [27], a długość pętli DNA między dwoma miejscami zakotwiczenia równa się wielkości replikonu [4]. Wybarwienie bromkiem etyldyny umocowanych w matriks pętli DNA daje w mikroskopie obraz tzw. aureol (halo) o średnicy 13–15 μm [28, 32, 36, 39].

Ponieważ w bakteriofagach [20] i plazmidach [15] replikacja DNA nie może być zainicjowana, dopóki DNA nie ulegnie superskręceniu, sugerowano przez analogię, że w komórkach eukariotycznych inicjacja replikacji wymaga również utworzenia superskręconej konfiguracji DNA [29], a wysoce zorganizowane struktury wyższego rzędu chromatyny mogą brać udział w mechanizmach kontrolowania procesów transkrypcji, replikacji i reperfacji DNA [21].

Liza komórek eukariotycznych detergentami niejonowymi w obecności wysokich stężeń soli (2 M NaCl) uwalnia struktury podobne do jąder, zwane nukleoidami. Nukleoidy zawierają superskręcony DNA, RNA i niektóre białka niehistonowe, są natomiast całkowicie pozbawione histonów i lipidów. Stopień superskręcenia DNA w nukleoidzie można obserwować podczas sedimentacji przy niskim g , w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy, zawierającej 2 M NaCl [8, 9, 10]. Wprowadzenie kilku pęknięć do cząsteczki DNA powoduje wykrywalną utratę ujemnej superspiralizacji heliksu i jego relaksację [13, 19, 23].

Relaksacja superskręconego DNA (generowanie wolniej sedimentujących nukleoidów) jest pierwszym etapem obserwowanym podczas reperfacji DNA

w komórkach ludzkich, na które działano promieniowaniem UV [10, 22, 42] lub MNNG [22, 23].

W pracy badano wpływ subletalnych dawek promieniowania gamma na organizację i strukturę DNA w jądrze fibroblastów ludzkich w powiązaniu ze zdolnością napromieniowanych komórek do reprodukcji i przeżycia indukowanych uszkodzeń.

Do napromieniowania stosowano dawki od 0 do 10 Gy promieniowania gamma, obejmujące zakres dawek biologicznych, które komórka może przeżyć. Hodowle komórek napromieniowywano w monowarstwie, w temp. od 0° do -4°C, w lodzie, w którym komórki były przechowywane do momentu rozpoczęcia hodowli poradiacyjnej lub lizy. Stosowanie niskiej temperatury w trakcie i po napromieniowaniu jest niezwykle istotne ze względu na zahamowanie procesów reperacyjnych DNA [14].

Niezależnie od stosowanego stężenia początkowego napromieniowanych fibroblastów stwierdzono znaczny spadek przeżywalności komórek po dawkach 6 i 8 Gy (tab. 2, rys. 1). Wyniki te są zgodne z rezultatami innych badań, w których stwierdzano bardzo niski procent przeżywalności komórek eukariotycznych po dawkach większych od 4 Gy [6].

Uszkodzenia DNA w zakresie dawek stosowanych do przeżywalności komórek oznaczano metodą sedymentacji nukleoidu w 15–30% obojętnym gradiencie gęstości sacharozy. Technika ta uważana jest za jedną z najbardziej czułych metod oznaczenia uszkodzenia i naprawy DNA w komórce [8, 19, 31].

DNA komórek nieuszkodzonych znajduje się w konfiguracji superskręconej, posiada strukturę zwartą i sedymentuje szybko, podczas gdy DNA komórek uszkodzonych, na skutek obecnych w cząsteczce pojedynczych pęknięć, występuje w konfiguracji zrelaksowanej i sedymentuje wolniej. Stopień relaksacji zależy od ilości indukowanych przez promieniowanie pojedynczych pęknięć w cząsteczce DNA. W przypadku kołowego DNA prokariotów i wirusów wprowadzenie chociażby jednego pęknięcia do jego cząsteczki powoduje rozplecenie nici DNA i zniszczenie superstruktury heliksu. Indukcja podwójnego pęknięcia prowadzi do całkowitej utraty kołowej struktury DNA i przejścia w strukturę liniową. W odróżnieniu, wprowadzenie jednego pojedynczego pęknięcia do jądrowego DNA eukariotów nie powoduje jego całkowitej relaksacji. Wynika to ze struktury genomu eukariotycznego, w którym DNA zorganizowany jest w domeny różnej wielkości, w kompleksie z białkami i RNA. Z tego względu indukowane przez promieniowanie pojedyncze pęknięcia nie prowadzą od razu do całkowitego zniszczenia superhelikalnej struktury DNA, gdyż w zależności od wielkości dawki uszkodzane są stopniowo kolejne domeny. Znajduje to odbicie w szybkości sedymentacji DNA nukleoidu. W zależności od wielkości domen te same dawki promieniowania relaksują cząsteczkę DNA w różnym stopniu i powodują odmienne zmiany w szybkości jego sedymentacji. Pozwala to, przy

zastosowaniu odpowiednich równań, obliczyć ilość pojedynczych pęknięć, koniecznych do osiągnięcia stanu całkowitej relaksacji DNA genomu badanej komórki, a stąd wielkość domen [19].

Podczas gdy DNA w zasadowym gradiencie gęstości sacharozy składa się z sedymentujących niezależnie pojedynczych nici [7], nukleoid zbudowany jest z dużej ilości superhelikalnych pętli DNA, które zachowują się podobnie do cząsteczek kolistego DNA – obecność jednego pojedynczego pęknięcia w pętli powoduje całkowitą utratę jej superspiralizacji i rozciągnięcie. Powstają bardziej zrelaksowane, luźniejsze struktury, które w gradiencie gęstości sacharozy sedymentują wolniej. Pozwala to śledzić obecność pojedynczych pęknięć DNA w genomie komórki na podstawie szybkości sedymentacji nukleoidu [10, 13]. Obecność kilku pojedynczych pęknięć w genomie powoduje wykrywalną utratę ujemnej superspiralizacji DNA nukleoidu. Metodę można stosować do wykrywania bardzo niskich poziomów uszkodzeń DNA – ok. $1 \text{ SSB}/2 \times 10^{10} \text{D}$ masy DNA [3, 19], podczas gdy maksymalna ilość pojedynczych pęknięć DNA wykrywalnych metodą wirowania w zasadowym gradiencie gęstości sacharozy wynosi $0,1\text{--}1 \text{ SSB}/10^8 \text{D}$ masy DNA [7, 19].

Stosowana w pracy metoda sedymentacji nukleoidu stanowi własne opracowanie podobnych metod z piśmiennictwa [10, 24, 37]. Szybkość sedymentacji nukleoidu była niezależna od stężenia komórek poniżej 1×10^6 . Przy wyższych stężeniach komórki, w obecności płynu lizującego, wykazywały tendencję do agregacji, co powodowało nieprawidłową sedymentację nukleoidu. Optymalna ilość komórek stosowanych do wirowania wynosiła 50–100 tys. Do pełnej lizy fibroblastów najbardziej odpowiednie okazało się 1% stężenie Tritonu X-100. W literaturze opisywane jest stosowanie mniejszych stężeń Tritonu X-100 (0,1–0,5%) [8, 9, 10, 13, 21, 23, 31]. Okazały się one niewystarczające dla całkowitej lizy fibroblastów – przy tych stężeniach stwierdzano pod mikroskopem niekompletną lizę komórek.

Technikę sedymentacji nukleoidu stosowano w badaniach dotyczących identyfikacji i naprawy pojedynczych pęknięć DNA, indukowanych przez promieniowanie gamma, promieniowanie UV oraz mitomycyny C w komórkach HeLa [10], w leukocytach i fibroblastach osób zdrowych oraz osób chorych na *Xeroderma pigmentosum* [7, 10], w badaniach nad wpływem inhibitorów syntezy ADP-rybozy na przebieg reperacji DNA w mysich komórkach leukemicznych L₁₂₁₀ [13, 24], jak również do identyfikacji pojedynczych pęknięć i ich naprawy w komórkach śledziony i grasicy szczura [37]. Metodę stosowano również do wykrywania uszkodzeń DNA wątroby szczura *in vivo* po działaniu kancerogenów z grupy aflatoksyn [19], związków alkilujących MNU i MNNG [12, 31], 4NOQ [31], w badaniach, dotyczących wpływu inhibitorów reperacji DNA w napromieniowanych promieniowaniem UV fibroblastach ludzkich [7, 23] oraz wpływu inhibitorów topoizomerazy lub polimerazy DNA na reperację uszkodzeń DNA w napromieniowanych komór-

kach nowotworowych [21]. Technika okazała się szczególnie przydatna do identyfikacji adduktów kancerogenów, których działanie wpływa na destabilizację trzecio- i czwartorzędowej struktury DNA i utratę jego ujemnej superhelikalności [12]. Czulość metody sedymentacji nukleoidu przewyższa 20–30 razy czulość tradycyjnej metody oznaczenia pojedynczych pęknięć DNA w zasadowym gradiencie gęstości sacharozy [3, 13]. Jest również bardziej czuła od elucji zasadowej: metodą sedymentacji nukleoidu można wykryć obecność ok. 200–300 SSB/genom komórki, podczas gdy za pomocą elucji zasadowej – ok. 500 SSB/genom [13, 14]. Lipetz i wsp. [19] określili próg wykrywalności uszkodzeń DNA na 0,3 Gy promieniowania X w przypadku sedymentacji nukleoidu i 10 razy więcej (3 Gy) w przypadku elucji zasadowej. Yew i Johnson [42] zastosowali własny wariant techniki sedymentacji nukleoidu do oznaczenia ilości pojedynczych pęknięć DNA, powstałych w wyniku działania endonukleaz nacinających nici DNA w procesie naprawy DNA i udowodnili, że równoległe zastosowanie do tego samego celu metody elucji zasadowej wymaga zastosowania dawek promieniowania UV o rząd wielkości większych od stosowanych w sedymentacji nukleoidu. Durkacz i wsp. [13] określają czulość metody na 1–5 Gy promieniowania gamma w zależności od badanego materiału.

W przedstawionej pracy najniższą stosowaną dawką były 2 Gy promieniowania gamma. Znaczny stopień utraty ujemnej superhelikalności DNA po tej dawce (ok. 30%) sugeruje, że możliwe jest również oznaczenie uszkodzeń DNA nukleoidu fibroblastów po dawkach mniejszych. Ze względu na dużą wydajność źródła stosowanego do napromieniowania komórek nie było w tych warunkach możliwe stosowanie mniejszych dawek.

Dużą zaletą metody są jej warunki – fizjologiczne pH i łagodna liza komórek bezpośrednio na powierzchni gradientu gęstości sacharozy, które pozwalają wyeliminować dodatkowe uszkodzenia, jak np. indukowane w labilnych miejscach apurynowych pojedyncze pęknięcia DNA w warunkach wysokich (> 12,5) wartości pH oraz umożliwiają zachowanie natywnej struktury trzecio- i czwartorzędowej DNA wewnątrz jądra.

Czulość i przydatność metody zostają znacznie podniesione przez wprowadzenie technik fluorescencyjnych do identyfikacji DNA we frakcjach gradientu gęstości sacharozy [5, 19]. Techniki fluorescencyjne poszerzają zakres stosowania metody o badania populacji komórek nie dzielących się lub słabo dzielących się, których wyznakowanie jest bardzo utrudnione lub wręcz niemożliwe. Wymagają również niewielkich ilości materiału do badań. Umożliwia to zastosowanie metody do badań niejednorodnej populacji komórek o różnej długości cyklu komórkowego, co w przypadku ich znakowania radioizotopami może prowadzić do mylnej interpretacji wyników. Połączenie obu technik jest szczególnie przydatne do oznaczenia niskich poziomów pojedynczych pęknięć DNA, akumulowanych w populacjach starzejących się

komórek *in vivo* jako jeden z efektów naturalnego procesu starzenia się [19]. Pęknięcia te są trudne do wykrycia innymi metodami.

W pracy do identyfikacji DNA używano fluorochromu 33258 Hoechst stosowanego powszechnie w cytologicznych badaniach chromosomów [5, 11]. Stwierdzono dużą czułość i specyficzność reakcji fluorochromu z DNA oraz jego przydatność do identyfikacji DNA we frakcjach gradientu gęstości sacharozy. Metoda jest niezwykle prosta i szybka, gdyż nie wymaga dodatkowego przygotowania i inkubacji próbek przed oznaczeniem. Czyni ją to konkurencyjną nie tylko dla metod radioizotopowych, ale i w stosunku do innych metod fluorymetrycznych, stosowanych do oznaczenia DNA we frakcjach gradientów gęstości sacharozy.

Superhelikalność DNA fibroblastów oznaczano na podstawie wzorca sedymentacji nukleoidu w obecności wzrastających stężeń bromku etydyny. Natywny DNA komórki eukariotycznej znajduje się w konformacji superskręconej, która powoduje, że podczas wirowania w obojętnym gradiencie gęstości sacharozy nukleoid uwolniony w wyniku łagodnej lizy komórek sedymentuje szybko. Wirowanie nukleoidu w obecności wzrastających stężeń EB wywołuje, na skutek interkalacji bromku do cząsteczki DNA, rozluźnienie superskrętów pętli domen DNA i wolniejszą sedymentację nukleoidu. Jest ona wynikiem stopniowej utraty ujemnej superspiralizacji heliksu i trwa do momentu osiągnięcia minimalnej wartości stałej sedymentacji, charakterystycznej dla całkowicie rozwiniętego DNA. Przy tej wartości cząsteczka nie zawiera skrętów superhelikalnych i znajduje się w postaci zrelaksowanej. Przy dalszym zwiększeniu stężenia EB szybkość sedymentacji zaczyna wzrastać – jest to początek zmiany superspiralizacji cząsteczki z ujemnej na dodatnią. Wraz z dalszym wzrostem stężenia EB postępuje dodatnia superspiralizacja DNA, w wyniku czego staje się on bardziej zwarty i sedymentuje szybciej. W ten charakterystyczny sposób sedymentuje tylko natywny, superhelikalny DNA. Im bardziej struktura DNA jest gęsta, o wysokim stopniu superhelikalności, tym więcej ujemnych superskrętów obecnych jest w superheliksie i do całkowitego ich usunięcia i rozwinięcia struktury DNA wymagane są wyższe stężenia EB [11, 41]. Sedymentacja nukleoidu komórek napromieniowanych i nienapromieniowanych w obecności różnych stężeń EB pozwala oznaczyć stopień superhelikalności DNA *in vivo*, uzyskać informacje o przestrzennej organizacji DNA w komórce, oznaczyć ilościowo indukowane przez czynniki uszkodzające zmiany w trzecio- i czwartorzędowej strukturze DNA oraz określić wielkość domen DNA.

Stwierdzono charakterystyczny dla superhelikalnego DNA dwufazowy sposób sedymentacji, zależny od stężenia EB (rys. 10, 11). Sugeruje to, że w zastosowanych warunkach metody, bromek etydyny zmienia stopień superspiralizacji DNA *in situ*, a sposób sedymentacji nukleoidu odzwierciedla różne poziomy organizacji superstruktur DNA w genomie komórki.

W podobnych badaniach z piśmiennictwa można spotkać wartości od 2 do 5 μg EB/ml jako odpowiadające punktowi równowagi [9, 10, 19, 21, 31], różnice te mogą wynikać z wielkości domen DNA w poszczególnych rodzajach komórek bądź z różnic w stosowanych technikach wirowania i lizy komórek.

Wykazano znaczne zmiany w superhelikalnej strukturze DNA w zakresie dawek promieniowania stosowanych do oznaczenia przeżywalności. Największe zmiany zaobserwowano w przedziale 0–2 Gy (30% utrata ujemnej superspiralizacji DNA). Znaczna utrata ujemnej superhelikalności DNA po dawkach 2 i 4 Gy, kiedy to również znacznie obniżał się procent przeżywalności komórek wskazuje, że zmiany w trzecio- i czwartorzędowej strukturze heliksu DNA (wyciągnięcie pętli DNA pod wpływem promieniowania) uniemożliwiają właściwe funkcjonowanie i replikację genomu, co w konsekwencji prowadzi do reprodukcyjnej śmierci komórki.

Duża wrażliwość superhelikalnych struktur DNA na obecność pojedynczych pęknięć stanowi również podstawę do opracowania czułych metod wykrywania niskich poziomów uszkodzeń DNA i testowania mutagennego wpływu różnych czynników środowiskowych (promieniowanie, mutageny chemiczne) na DNA komórki eukariotycznej.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Barrack E. R., Coffey D. S., (1982), *Recent. Prog. Horm. Res.*, **38**, 133.
- [2] Benyajati C., Worcel A. (1976), *Cell*, **9**, 393.
- [3] Brash D. E., Hart R. W. (1978), *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **2**, 79.
- [4] Buongiorno-Nardelli M., Michali G., Carri M. T., Marilley M. (1982), „*Nature*”, **298**, 100.
- [5] Cesarone C. F., Bolognesi C., Santi L. (1979), *Analyt. Biochem.*, **100**, 188.
- [6] Chadwick K. H., Leenhouts H. P. (1973), *Phys. Med. Biol.*, **18**, 78.
- [7] Charles W. C., Cleaver J. E. (1982), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 250.
- [8] Cook P. R., Brazell J. A. (1975), *J. Cell Sci.*, **19**, 261.
- [9] Cook P. R., Brazell J. A. (1976), *Exp. Cell Res.*, **103**, 341.
- [10] Cook P. R., Brazell J. A. (1976), „*Nature*”, **263**, 679.
- [11] Darnell J., Lodish H., Baltimore D. (1986), *Molecular Cell Biology*, (Sci. Am. Inc.).
- [12] Drinkwater N. R., Miller J. A., Miller E. C., Yang N. C. (1978), *Cancer Res.*, **38**, 3247.
- [13] Durkacz B., Irwin J., Shall S. (1981), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 65.
- [14] Freidberg E. A., Hanawalt P. E. (1983), *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*, M. Dekker, (red.), New York, 60–65.
- [15] Gellert M., O'Dea M. H., Itoh T., Tomizawa J. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4474.
- [16] Jensen H. R., Leary J. F. (1990), *Flow Cytometry and Sorting*, (Wiley-Liss, Inc) New York, 553.
- [17] Lehman A. R., Ormerod M. G. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 128.
- [18] Lindahl T. (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 61.

- [19] Lipetz P. D., Brash D. E., Joseph L. B., Jewett H. D., Lisle D. R., Lantry L. E., Hart R. W., Stephens R. E. (1982), *Analyt. Biochem.*, **121**, 339.
- [20] Lovett M. A., Sparks R. B., Helinski D. R. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2905.
- [21] Mattern M. R., Painter R. B. (1979), *Biochim. Biophys. Acta.*, **563**, 293.
- [22] Mattern M. R., Scudiero D. A. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **653**, 248.
- [23] Mattern M. R., Paone R. F., Day R. S. (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 6.
- [24] Mattern M. R., Zwelling L. A., Kerrigan D., Kohn K. W. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 1077.
- [25] Mullenders L. H. F., van Kestern A. C., Bussman C. J. M., van Zeeland A. A., Natarajan A. T. (1984), *Mutat. Res.*, **141**, 75.
- [26] Nakane N., Ide T., Ahzai K., Ohara S., Andoh T. (1978), *J. Biochem. [Tokyo]*, **84**, 145.
- [27] Nelson W. G., Pienta K. J., Barrack E. R., Coffey D. S. (1986), *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **15**, 457.
- [28] Pienta K. J., Coffey D. S. (1984), *J. Cell Sci., Suppl.*, **1**, 123.
- [29] Povirk L. F., Painter R. B. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **432**, 267.
- [30] Razin S. V., Chernokhvostov V. V., Yarovaya O. V., Georgiev G. P. (1985), *Progress in Nonhistone Protein Research*, J. Bekhor (red.), CRC Press Inc., Boca Raton, New York, vol. II, 92.
- [31] Romagna F., Kulkarni S. M., Anderson M. W. (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 56.
- [32] Roti Roti J. L., Wright W. D. (1987), *„Cytometry”*, **8**, 461.
- [33] Sawicki F. (1982), *Elementy statystyki dla lekarzy*, Warszawa, 126.
- [34] Singer B., Kusmierk J. T. (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 655.
- [35] Szostak J., Orr-Weaver T. L., Rothstein R. J., Stahl F. W. (1983), *Cell*, **33**, 25.
- [36] Taylor Y. C., Duncan P. G., Zhang X., Wright W. D. (1991), *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**, 359.
- [37] Tempel K. (1985), *Zbl. Vet. Med.*, **32**, 123.
- [38] Van der Velden H. M. W., Wanka F. (1981), *Mol. Biol. Rep.*, **12**, 69.
- [39] Vogelstein B., Pardoll D. M., Coffey D. S. (1980), *Cell*, **22**, 79.
- [40] Wanka F., Pieck A. C. M., Bekers A. G. M., Mullenders L. H. F. (1982), *The Nuclear Envelope and The Nuclear Matrix*, G. G. Maul (red.), Alan R., Liss Inc., New York, 199.
- [41] Watson J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A., Weiner A. M. (1987), *Molecular Biology of gene*, J. R. Gillen (red.), Benjamin/Commings Publ. Comp. Inc., Menlo Park, California, 254-255.
- [42] Yew E. F. H., Johnson R. T. (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **262**, 240.

Wpłynęło do Redakcji
„Folia biochimica et biophysica”
24.07.1991

Katedra Biofizyki
Uniwersytetu Łódzkiego

Aneta Koceva-Chyla

EFFECT OF SUBLETHAL DOSES OF GAMMA RADIATION ON DNA SUPERHELICITY AND SURVIVAL OF HUMAN FIBROBLASTS

Effect of sublethal doses of gamma radiation on cell survival and DNA superhelicity in human fibroblasts was studied.

Cell survival was estimated on the basis of clonal growth of irradiated fibroblasts in monolayer culture *in vitro*.

The nucleoid sedimentation technique was used to study ionizing radiation-induced DNA damage *in vivo* as well as to examine DNA superhelicity.

Increased concentrations of ethidium bromide (EB) were used to titrate the DNA supercoiling response in non-irradiated cells. This response consisted of a relaxation phase (1–5 $\mu\text{g/ml}$ EB) and rewinding phase (5–20 $\mu\text{g/ml}$ EB). Observed biphasic dependence of sedimentation distance of nucleoid on the concentration of EB suggests that the dye altered the amount of DNA supercoiling *in situ*.

The degree of DNA supercoiling and thus the sedimentation rate of nucleoid in absence of EB was very sensitive to strand breaks induced in DNA by the doses of gamma radiation employed in the cell survival assay. Doses of 2–8 Gy of gamma radiation induced a dose – dependent reduction in the sedimentation of nucleoid. Loss of negative DNA supercoiling was initially rapid (about 30% after the dose of 2 Gy) and then proceeded at a slower rate (about 35% and 48% after the doses of 4 Gy and 8 Gy respectively), indicating a significant relaxation of nucleoid structure at the doses of gamma radiation greater than 4 Gy, at which also a significant decrease in fibroblasts survival occurred.

Significant loss of negative DNA supercoiling within the range of doses of gamma radiation resulting in significant decrease of cell survival suggests that destabilizing effect of radiation on DNA tertiary- and quaternary structures (extensive DNA breaks and relaxation of nucleoid superhelicity) disturb normal functions and replications of genomic DNA, in consequence leading to a reproductive death of cells.

Considering the sensitivity and simplicity of the method, the nucleoid sedimentation technique might be also a useful tool in the monitoring of DNA lesions induced by environmental mutagens in a variety tissues and cell types.