

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

3882/82

16/8-82

P19-82-379

Х.Абель, Г.Эригребер, К.Лангрок

ПОВРЕЖДЕНИЕ γ -ЛУЧАМИ
И ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ
СУПЕРСПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР ЯДЕРНОЙ ДНК

Направлено в журнал "Радиобиология"

1982

Бауер и Виноград^{/1/}, Кук и Бразель^{/2,3/}, Кампелл^{/4/}, Гарт-виг^{/5/} в своих работах обосновали гипотезу о суперспирализации ядерной ДНК как об общем явлении для всех высших организмов.

Компактные структурные единицы, содержащие суперспиральную ДНК, освобождались с помощью лизиса клеток и исследовались путем центрифугирования в нейтральном градиенте сахаразы. Исследовалось также действие на суперспиральные структуры ДНК интеркалирующих красителей и ионизирующего излучения, так как индуцированные облучением одностебельные разрывы ДНК нарушают суперспирализацию. Предполагается, что суперспиральные структурные единицы ДНК связаны с мембраной.

Регель, Гюнтер и Кампф^{/6/} определили, что средний диаметр этих единиц равен 0,3 мкм, и назвали их MASSU (membrane attached superstructure unit).

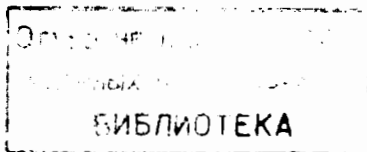
Анализ изменения скорости седиментации MASSU с увеличением числа индуцированных облучением одностебельных разрывов ДНК показал, что в MASSU содержится около 10^9 дальтонов ДНК^{/2/}. Кампф и Регель^{/7/} изучали зависимость доли индуцированных двустебельных разрывов ДНК от дозы облучения и нашли, что максимальная величина участков ДНК в клеточном ядре, не содержащих разрывов, также равна примерно 10^9 дальтонов.

С целью дальнейшего изучения принципа организации ДНК в компактные структурные единицы в данной работе было проведено исследование этих структур в клетках млекопитающих разных линий при использовании γ -лучей и тяжелых ионов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки. В экспериментах использовались лимфоциты крови человека, фибробласты легких китайского хомяка V79-4 и клетки асцитного рака Эрлиха линии ELD.

Лимфоциты. К свежезятой донорской крови добавляли 0,9% раствор NaCl в отношении 1:1 и суспензию наслаивали в центрифужных пробирках на поверхность смеси 5,6% раствора Ficoll и Visotrast /17:3/ с плотностью $1,077 \pm 0,001$ г/мл. После центрифугирования в течение 30 мин. при 20 °C и 4000 м/с² лимфоциты отделялись от других компонентов крови в виде белого кольца. Их отмывали в холодном растворе



PBS -глюкозы путем двукратного центрифугирования /10 мин., 1000 м/с², 20 °С/. После этого клетки ресуспендировали в среде Eagle MEM с 20% сыворотки крови человека и выдерживали в плотно закрытых пробирках в 5% CO₂.

Такие короткоживущие культуры лимфоцитов, содержащие 10⁶ лимфоцитов/мл с примесью менее 3% эритроцитов, в течение 7 дней обладают высокой жизнеспособностью.

Клетки V79-4. Клетки культивировали в монослое в среде Eagle MEM с добавлением 15% сыворотки и антибиотиков. Перед облучением из клеток, находящихся в экспоненциальной фазе роста, готовили суспензию концентрацией 10⁶ кл/мл. Чтобы ослабить возможное повреждение вследствие трипсинизации, клеточную суспензию инкубировали в течение 45 мин. при 37 °С, а затем до облучения выдерживали при 0° -4 °С.

Асцитные клетки. Клетки асцитного рака Эрлиха извлекали из брюшной полости мышей F₁ (СВА × С 57 В1), которым за 3 дня до эксперимента вводили интраперитонеально 10⁷ опухолевых клеток. В среде Eagle-199 готовили суспензию, содержащую 10⁶ кл/мл.

Облучение. γ-облучение осуществлялось с помощью цезиевого источника мощностью дозы 4,66 Гр/мин. /установка "Свет"/; облучение тяжелыми ионами ⁴He и ¹²C /ЛПЭ 22 кэВ/мкм и 360 кэВ/мкм соответственно/ проводили на ускорителе У-200 в ЛЯР ОИЯИ. Клетки облучали при 0-4 °С и выдерживали при этой температуре до проведения лизиса.

Лизис клеток, градиент сахарозы, центрифугирование. Для лизиса клеток использовался следующий раствор: 1% SDS, 0,2% Na - деоксихолат, цитрат натрия 0,05 М, 0,05М EDTA, pH 7-7,5.

Градиент сахарозы: 4,6 мл 5-20% сахарозы в 1М хлорида натрия, 0,01М Трис-HCL, 0,01М EDTA, бромистый этидий 6 мкг/мл, pH 7-7,5.

Поверх градиентов сахарозы наслаивали 0,2 мл раствора для лизиса клеток, затем 0,1 мл суспензии, содержащей 10⁵ клеток. Время лизиса - 1 час. Время центрифугирования - 1 час при 30000 об./мин. в роторе "swing-out" ультрацентрифуги АС 602.

Измерение положения MASSU. Бромистый этидий, содержащийся в градиенте сахарозы, помещают между щелочами ДНК. MASSU седиментируют в виде сетчатого агрегата. ДНК MASSU обогащается бромистым этидием. Вследствие этого положение MASSU можно определить флуоресцентным методом /возбуждающий свет 360 нм, эмиссионный свет 590 нм/.

На рис.1 показан полученный таким образом профиль флуоресценции ДНК после центрифугирования пробирки.

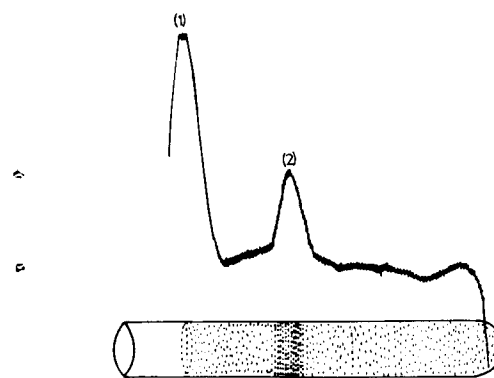


Рис.1. Профиль флуоресценции ДНК в градиенте сахарозы. 1 - отражение положения мениска, 2 - положение ДНК-комплекса MASSU после центрифугирования в течение 1 часа при 30000 об./мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис.2 представлены профили седиментации для MASSU лимфоцитов человека, клеток китайского хомяка и асцитных клеток мышей, полученные в идентичных условиях. Различные положения профилей седиментации для MASSU трех видов клеток свидетельствуют об их различиях по содержанию, либо по степени суперспирализации ДНК.

На рис.3 показана зависимость относительной скорости седиментации (rS) /ОСС/MASSU лимфоцитов человека, клеток китайского хомяка и асцитных клеток от дозы облучения γ-лучами и тяжелыми ионами. ОСС определяется как отношение скоростей седиментации MASSU облученных и необлученных клеток.

После γ-облучения ОСС быстро уменьшается до предельного значения, не меняющегося при увеличении дозы. После облучения лимфоцитов ионами ¹²C и опухолевых клеток ⁴He ОСС изменяется мало. Если же лимфоциты после воздействия ионами ¹²C в дозе 7 Гр дополнительно облучить γ-лучами в дозе 2 Гр,

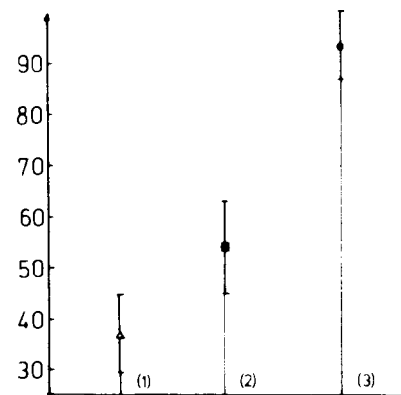


Рис.2. Расстояния седиментации MASSU агрегатов. 1 - асцитные клетки, 2 - клетки китайского хомяка V79-4, 3 - лимфоциты человека.

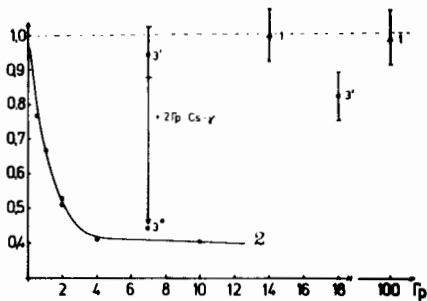


Рис.3. Зависимость относительной скорости седиментации MASSU от дозы облучения. 1 - асцитные клетки после облучения ^4He , 2 - лимфоциты после облучения γ -лучами, 3* - лимфоциты после облучения ^{12}C , 3* - лимфоциты, облученные γ -лучами в дозе 2 Гр после облучения ^{12}C . По оси абсцисс: доза, Гр; по оси ординат: относительная скорость седиментации (rS).

то OCC имеет примерно такое же значение, как после облучения только γ -лучами в дозе 2 Гр. Этот факт подтверждает представление о существовании дискретных MASSU с суперспиральной ДНК, схематически изображенных на рис.4.

Можно предположить, что суперспирализованная ДНК в MASSU вследствие одонитевых разрывов раскручивается, в результате чего скорость седиментации агрегатов MASSU уменьшается тем быстрее, чем больше возникает таких разрывов. После γ -облучения распределение одонитевых разрывов в хорошем приближении соответствует распределению Пуассона, т.е. в каждой MASSU одонитевые разрывы ДНК возникают с одинаковой вероятностью. При прохождении тяжелой заряженной частицы, обладающей высокой ЛПЭ, одонитевые разрывы возникают только в тех MASSU, в которых произошло "событие попадания". Таким образом, при одинаковых /небольших/ дозах количество MASSU, в которых произошло попадание, а следовательно, и раскручивание ДНК, после облучения тяжелыми ионами должно быть меньше, чем после γ -облучения.

На рис.5 представлена полученная экспериментально зависимость между OCC MASSU и дозой γ -лучей для лимфоцитов, клеток китайского хомяка и асцитных клеток. Кривые различаются по начальному наклону при малых дозах облучения и предельному значению $(rS)_e$ при больших дозах в соответствии с представлениями Кука и Бразеля^{/2/}.

Из полученных кривых можно сделать некоторые заключения о внутренней структуре MASSU. Очевидно, что достижение предельного значения $(rS)_e$ MASSU можно интерпретировать как полное раскручивание суперспиральной ДНК MASSU. Пусть вероятность раскручивания равна

$$(1 - (rS))/(1 - (rS)_e) = (rS)^*, \quad /1/$$

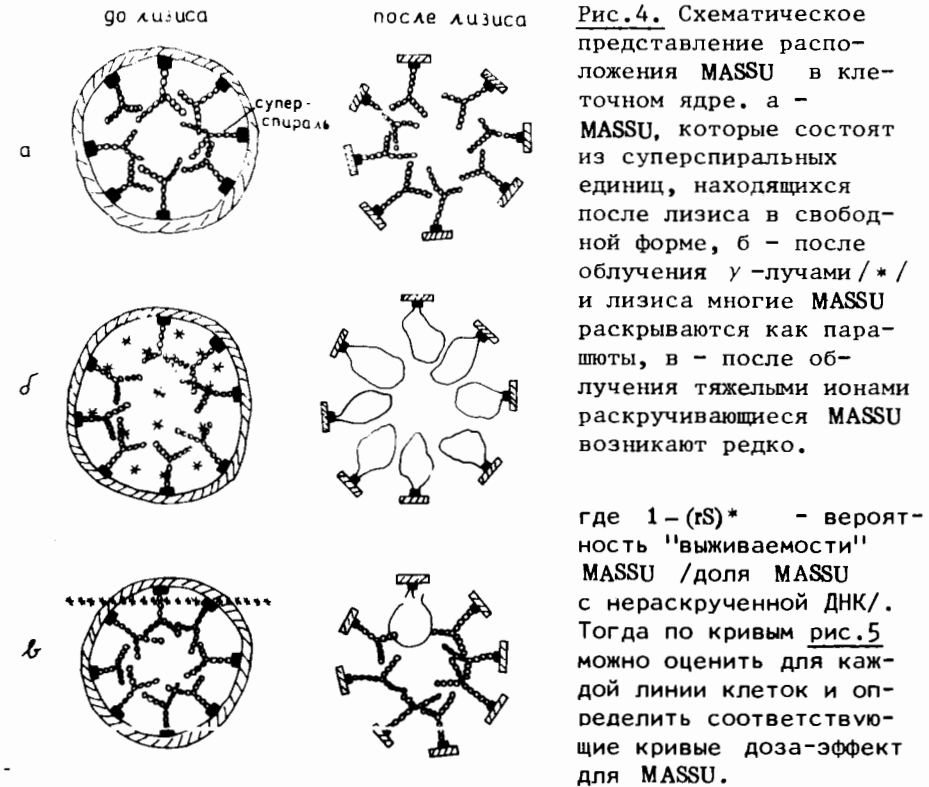


Рис.4. Схематическое представление расположения MASSU в клеточном ядре. а - MASSU, которые состоят из суперспиральных единиц, находящихся в свободной форме, б - после облучения γ -лучами /*/ и лизиса многие MASSU раскручиваются как парашюты, в - после облучения тяжелыми ионами раскручивающиеся MASSU возникают редко.

где $1 - (rS)^*$ - вероятность "выживаемости" MASSU /доля MASSU с нераскрученной ДНК/. Тогда по кривым рис.5 можно оценить для каждой линии клеток и определить соответствующие кривые доза-эффект для MASSU.

На рис.6 представлены рассчитанные таким образом кривые. Эти данные позволяют предположить, что ДНК в MASSU организована в виде кластеров, которые могут "раскручиваться" независимо друг от друга вследствие отдельных одонитевых разрывов. В таком случае начальный наклон кривых доза-эффект должен коррелировать с содержанием ДНК в одном суперспиральном участке M_g .

Рассчитать M_g и M_e можно следующим образом: В диапазоне начального наклона вероятность "выживания" MASSU равна:

$$1 - (rS)^* = e^{-M_g \cdot D \cdot \lambda}, \quad /2/$$

а в диапазоне конечного наклона -

$$1 - (rS)^* = e^{-M_e \cdot D \cdot \lambda}, \quad /3/$$

где D - доза, λ - среднее число одонитевых разрывов на единицу молекулярного веса ДНК и на единицу дозы / $\lambda = 2,7 \cdot 10^{-10}$ дальтонов⁻¹ Гр⁻¹ /^{8/} /.

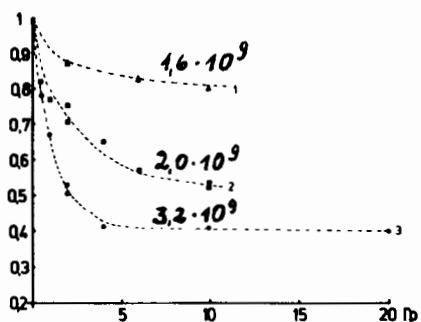


Рис.5. Зависимость скорости седиментации (rS) MASSU от дозы облучения γ -лучами. По оси абсцисс: доза облучения, Гр. По оси ординат: $(rS) / (rS)_0$ / отношение между скоростью седиментации облученных и необлученных клеток/. 1 - асцитные клетки, 2 - клетки китайского хомяка V79-4, 3 - лимфоциты человека.

Если выбрать такие значения D , которые уменьшают $(1 - (rS))^*$ до e^{-1} в соответствующем диапазоне наклона, то можно рассчитать M_g и M_e . Так как $1/\lambda$ - величина энергии, необходимая для одного однонитового разрыва, то отношение $D_{97} : 1/\lambda$ можно интерпретировать как элемент, в котором возникает в среднем один однонитовый разрыв. Это позволяет оценить нижнюю границу для объема MASSU.

Из-за относительно больших ошибок экспериментальных данных можно лишь грубо оценить значения M_g /см. рис.5/. Видно, что содержание ДНК в MASSU наибольшее у лимфоцитов и наименьшее у асцитных клеток, что согласуется с различием в седиментации агрегатов MASSU обоих объектов /см. рис.2/ и может рассматриваться как одна из возможных причин высокой радиочувствительности лимфоцитов. Полученное для лимфоцитов значение $M_e = 1,1 \cdot 10^8$ дальтонов в какой-то мере может быть связано с размером расстояния между соседними репликациями, равного 15-120 мкм^{9/}. Это расстояние соответствует молекулярному весу $3,3 \cdot 10^7 - 2,4 \cdot 10^8$ дальтонов. Можно предположить, что такой суперспирализованный независимо раскручивающийся участок ДНК представляет собой отдельную функциональную единицу. Из кривых рис.6 можно также сделать вывод о том, что число независимо раскручивающихся участков ДНК в MASSU, т.е. функционально самостоятельных единиц, различно для разных объектов. На основании результатов, приведенных на рис.5, можно высказать предположение о том, что в лимфоцитах человека содержится больше MASSU, чем в асцитных клетках мышей.

Авторы выражают благодарность академику Г.Н.Флерову за предоставление возможности проведения экспериментов на ускорителе У-200 в ЛЯР ОИЯИ. За техническую помощь благодарим А.Круг, М.Лаукнер и Б.Рихтер.

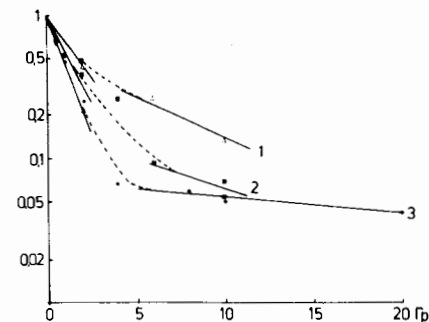


Рис.6. Зависимость "выживания" для MASSU от дозы облучения. По оси абсцисс: доза γ -облучения, Гр; по оси ординат: вероятность выживания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauer W., Vinograd J.J. Mol.Biol., 1970, 47, p. 419.
2. Cook P.R., Brazell J.A. Cell Biol., 1975, 19, p. 261.
3. Cook P.R., Brazell J.A. Nature, 1976, 263, p. 679.
4. Campbell A.M. TJBS, 1978.
5. Hartwig M. Acta Biol.Med.Germ., 1978, 37, p. 421.
6. Regel K., Günther K., Kampf G. Studia Biophysica, 1979, 76, p. 11.
7. Kampf G., Regel K. Studia Biophysica, 1978, 71, p. 207.
8. Kamf G., Regel K. Studia Biophysica, 1977, 61, p.53.
9. Huberman J.A. et al. Molec.Biol., 1968, 32, p. 327.

Рукопись поступила в издательский отдел
26 мая 1982 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D13-11182	Труды IX Международного симпозиума по ядерной электронике. Варна, 1977.	5 р. 00 к.
D17-11490	Труды Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1977.	6 р. 00 к.
D6-11574	Сборник аннотаций XV совещания по ядерной спектроскопии и теории ядра. Дубна, 1978.	2 р. 50 к.
D3-11787	Труды III Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1978.	3 р. 00 к.
D13-11807	Труды III Международного совещания по пропорциональным и дрейфовым камерам. Дубна, 1978.	6 р. 00 к.
	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
D1,2-12036	Труды V Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1978	5 р. 00 к.
D1,2-12450	Труды XII Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Приморско, НРБ, 1978.	3 р. 00 к.
	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц, Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
D11-80-13	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
D4-80-271	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
D4-80-385	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
D2-81-543	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
D10,11-81-622	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
D1,2-81-728	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
D17-81-758	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
D1,2-82-27	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
P18-82-117	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

Абель Х., Эрцгребер Г., Лангрок К. P19-82-379
Повреждение γ -лучами и тяжелыми ионами суперспиральных структур ядерной ДНК

Клетки китайского хомяка V79-4, лимфоциты человека и асцитные клетки мышей облучались γ -лучами и тяжелыми ионами (^4He , ^{12}C). После лизиса клеток путем центрифугирования в нейтральном градиенте сахарозы исследовался характер седиментации комплексов, содержащих ДНК. Полученные после облучения различия подтверждают представление о суперспиральной организации ДНК в дискретные и связанные с мембраной компактные единицы. Согласно сделанным оценкам, диаметр этих комплексов примерно равен 0,2 мкм, а содержание в них ДНК близко к $2 \cdot 10^9$ дальтонам.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982

Abel H., Ertzgraber G., Langrock K. P19-82-379
Lesions in Superstructure Units DNA Induced by γ -Irradiated and Heavy Ions

Chinese hamster cells V79-4, human lymphocytes and ascites cells were irradiated with $\text{Cs-}\gamma$ -rays and heavy ions (^4He , ^{12}C). After cell lysis the sedimentation behaviour of DNA-complexes was studied. In the case of γ -irradiation the sedimentation velocity of the DNA subunits was slower than in the case of heavy ion irradiation. This result reflects the existence of discrete and membrane-attached compact DNA-units. By applying target theory the DNA content and the diameter of the DNA subunits can be approximately determined. The values are different, depending on the cell type (average values: $2,4 \cdot 10^9$ Dalton, respectively 0,2 μm).

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982

Перевод О.С.Виноградовой.