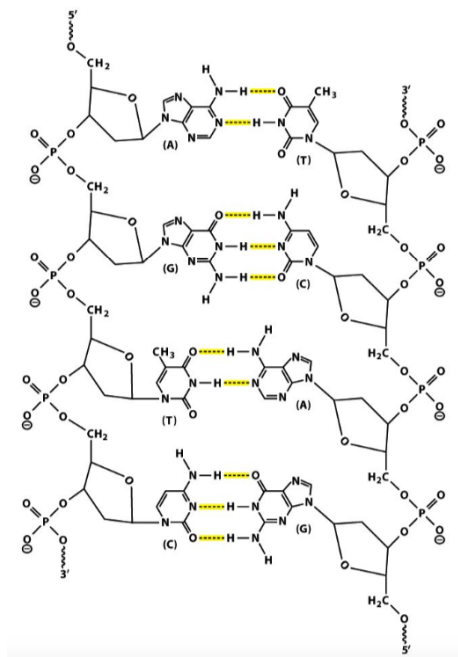


Test aberracji chromosomowych - protokół do ćwiczeń laboratoryjnych

1 Wprowadzenie

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) jest dużą cząsteczką o dobrze znanej podwójnej helikalnej strukturze. Składa się z dwóch nici utrzymywanych razem przez wiązania wodorowe między zasadami azotowymi. Szkielet każdej nici składa się z naprzemiennych grup cukrowych i fosforanów. Cukrem tym jest dezoksyryboza. Do tego szkieletu dołączone są cztery zasady, których sekwencja określa kod genetyczny. Dwie zasady to zasady z pojedynczym pierścieniem (pirymidyny) - tymina i cytozyna. Dwie pozostałe to zasady z podwójnym pierścieniem (puryny) - adenina i guanina. Zasady na przeciwnych niciach muszą się uzupełniać, adenina łączy się z tyminą, a guanina z cytozyną. Schemat budowy nici DNA został przedstawiony na Rysunku 1.



Rysunek 1: Fragment struktury podwójnej nici DNA [1].

Promieniowanie jonizujące indukuje dużą liczbę zmian w strukturze DNA, z których większość jest z powodzeniem naprawiana przez komórkę. Dawka promieniowania, która indukuje średnio jedno śmiertelne zdarzenie na komórkę pozostawiając 37% wciąż żywotnych, nazywana jest D_0 . W przypadku komórek ssaków D_0 pochodząca od promieniowania X zwykle wynosi od 1 do 2 Gy. Liczba zmian DNA na komórkę wykrytych natychmiast po takiej dawce wynosi w przybliżeniu [2]:

uszkodzenie zasady, >1000

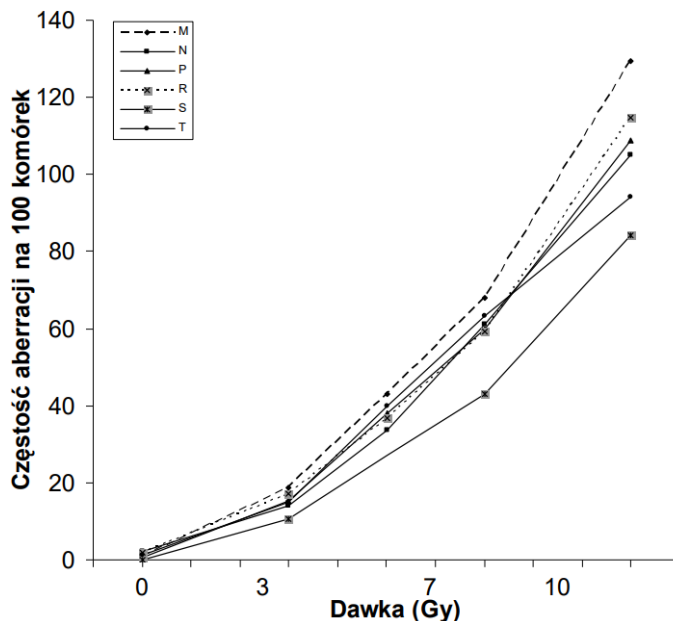
jednociowe przerwanie struktury DNA (ang. single-strand break, SSB), 1000

dwuniciowe przerwanie struktury DNA (ang. double-strand break, DSB), 40

Jeśli komórki zostaną napromienione niską dawką promieniowania rentgenowskiego, nastąpi wiele pojedynczoniowych uszkodzeń. Można je obserwować i oceniać jako funkcję dawki, jeśli DNA zostanie zdenaturowane, a struktura nośna zostanie usunięta. Jednak w nienaruszonym DNA SSB mają niewielki wpływ biologiczny na zabijanie komórek, ponieważ są one łatwo naprawiane na podstawie drugiej nici, która nie została uszkodzona. Jeśli naprawa jest niepoprawna (błędna naprawa), może to spowodować mutację. Jeśli obie nici DNA są zerwane, ale odstęp między nimi są duże, naprawa również następuje łatwo, ponieważ dwie przerwy są naprawiane osobno.

W przeciwieństwie do tego, jeśli pęknięcia dwóch nici są naprzeciw siebie lub oddzielone tylko kilkoma parami zasad, może to prowadzić do powstawania DSB, powodując rozszczepienie chromatyny na dwie części. Uważa się, że DSB są najpoważniejszymi zmianami powstającymi w chromosomach, które indukuje promieniowanie. Oddziaływanie dwóch DSB może powodować śmierć komórek, powstawanie nowotworów lub mutacje. Istnieje wiele rodzajów DSB, różniących się odległością między zerwaniami dwóch nici DNA a rodzajem tworzonych grup końcowych. Ich wydajność w napromieniowanych komórkach jest około 0,04 razy większa niż SSB i są one indukowane liniowo z dawką, co wskazuje, że są one tworzone przez pojedyncze ścieżki promieniowania jonizującego.

Jednym z rodzajów mutacji są aberracje chromosomowe, czyli zmiany w strukturze chromosomów spowodowanych pęknięciami chromatyd i łączeniem się odcinków w innych układach niż pierwotne ze względu na interakcje między wolnymi końcami podwójnociowych pęknięć DNA indukowanych promieniowaniem.



Rysunek 2: Zależność dawka-efekt dla całkowitej liczby aberracji chromosomowych. Dane dla limfocytów krwi obwodowej od sześciu dawców po napromienieniu *in vitro* 0, 3, 5, 7 i 10 Gy promieniowania γ [3].

Aberracje chromosomowe w limfocytach krwi obwodowej człowieka są szeroko stosowane jako biomarkery ekspozycji na promieniowanie. W próbkach krwi uzyskanych do oceny cytogenetycznej w ciągu od kilku dni do kilku tygodni po napromienowaniu całego ciała częstotliwość aberracji asymetrycznych

(dicentrycznych i pierścieniowych) w limfocytach odzwierciedla otrzymaną dawkę. Limfocyty w próbce krwi są stymulowane do podziału za pomocą mitogenu, takiego jak fitohemagglutynina i są zatrzymywane w metafazie, a częstość występowania pierścieni i dicentrycznych jest oceniana. Dawkę można oszacować przez porównanie z hodowlami *in vitro* narażonymi na znane dawki. Rysunek 2 pokazuje krzywą dawka-odpowiedź dla aberracji w ludzkich limfocytach wytwarzanych przez promienie. Dane są dopasowane liniowo-kwadratową zależnością, zgodnie z oczekiwaniami, ponieważ pierścienie i dicentryczne wynikają z interakcji dwóch pęknięć chromosomów, jak opisano wcześniej. Składnik liniowy jest konsekwencją dwóch zerwań wynikających z pojedynczej naładowanej cząstki. Jeżeli te dwa pęknięcia wynikają z różnych naładowanych cząstek, prawdopodobieństwo interakcji jest kwadratową funkcją dawki. Ilustruje to również tworzenie dicentryczne na Rysunku 2.

W ramach niniejszego ćwiczenia zostanie wykonany test aberracji chromosomowych dla komórek PC3 (linia komórkowa raka gruczołu krokowego).

2 Medium i odczynniki

2.1 DMEM - F12

Jest to syntetyczna pożywka do hodowli komórek, która jest używana do utrzymywania komórek w hodowli tkankowej. Stanowi ona podstawowe środowisko wzrostu zastępujące środowisko naturalnego występowania komórek. Jest źródłem substancji odżywczych, w tym cukrów, aminokwasów, witamin, minerałów, ale także, poprzez właściwy skład, odpowiada za zachowanie pożądanego pH i osmolalności.

2.2 RPMI - 1640

Pożywka RPMI jest zaliczana do podstawowych pożywek wzrostowych do hodowli komórek. Tradycyjnie była stosowana do wzrostu ludzkich limfocytów. To medium zawiera dużo fosforanów i jest przeznaczone do stosowania w atmosferze zawierającej 5% CO₂. RPMI 1640 wykorzystuje dwuwęglanowy układ buforowy i różni się od większości pożywek pH, które jest nieco bardziej zasadowe (pH = 8).

2.3 Fetal Bovine Serum (FBS)

Serum jest wykorzystywane jako pożywka dla komórek macierzystych w hodowli *in vitro*. Głównym składnikiem surowicy bydlęcej jest białko globularne, albumina surowicy bydlęcej (BSA). Bogata różnorodność białek w surowicy utrzymuje komórki hodowane w pożywce, w której mogą przetrwać, rosnąć i dzielić.

2.4 Penicylina/Streptomycyna

Mieszanina antybiotyków Penicyliny (5000 IU) oraz Streptomycyny (5000 g/ml) w 50-krotnym stężeniu. Penicylina blokuje aktywności enzymów bakteryjnych – transpeptydaz (PBP) biorących udział w ostatnim etapie syntezy peptydoglikanu ściany komórki bakteryjnej, zaś streptomycyna jest naturalnym antybiotykiem aminoglikozydowym (zakłóca syntezę białek bakteryjnych). Zalecane stężenie mieszanki antybiotyków stosowane w pożywce do hodowli komórkowej to 20 ml/L.

2.5 DPBS

Jest to roztwór soli na bazie wody zawierający wodorofosforan sodu, chlorek sodu i diwodorofosforan potasu. Bufor pomaga utrzymać stałe pH. Osmolarność i stężenia jonów w roztworach odpowiadają stężeniom w organizmie człowieka. PBS ma wiele zastosowań, ponieważ jest izotoniczny i nietoksyczny dla większości komórek. Zastosowania te obejmują rozcieńczanie substancji i płukanie pojemnika z komórkami.

2.6 Trypsyna

Trypsyna to enzym trawiący białka. W laboratorium hodowli tkankowej trypsyna jest stosowana do ponownego zawieszania komórek przylegających do ściany naczynia do hodowli komórkowej podczas procesu pobierania komórek. Niektóre typy komórek przylegają do boków i dna szalki podczas hodowli in vitro. Trypsyna służy do rozszczepiania białek utrzymujących hodowane komórki na szalce, dzięki czemu komórki można usunąć z płytek.

2.7 Trypan Blue

Trypan Blue jest powszechnie stosowany w mikroskopii jako barwnik niezbędny do selektywnego zabarwienia martwych tkanek lub komórek.

2.8 Izopropanol

70% wodny roztwór izopropanolu stosowany jest jako płyn antyseptyczny. Należy używać go do odkażania powierzchni, na których wykonywany jest eksperyment, a także do przemywania drobnego sprzętu laboratoryjnego.

3 Hodowla komórek PC3 w laboratorium radiobiologicznym

Hodowlę komórek in vivo należy przeprowadzać w warunkach sterylnych (zastosowanie komory z laminarnym przepływem powietrza), środowisku o stałej optymalnej temperaturze (dla większości kmórek pochodzenia ludzkiego temperatura ta wynosi 37°C), i wilgotności utrzymanej na poziomie 95%, stałym stężeniu CO₂ (inkubatory przeznaczone do hodowli komórek, 5-10%). Należy również zapewnić komórkom niezbędnych do życia oraz proliferacji składników odżywczych (pożywki hodowlane).

Wszystkie przybory laboratoryjne należy zdezynfekować przed ich umieszczeniem w komorze laminarnej. Czynności związane z prowadzeniem hodowli komórkowej należy wykonywać szybko i sprawnie.

Pasażowanie komórek PC3

3.1 Przygotowanie pożywki dla komórek

Należy przygotować roztwór DMEM zawierający 10% FBS oraz 0,6% antybiotyku. Pożywka, która jest wykorzystywana podczas napromieniania komórek może zawierać 2% FBS oraz 1% antybiotyku.

3.2 Pasażowanie komórek przed napromienianiem

Wszystkie objętości odczynników są podane dla butelki o pojemności 75 ml. W sytuacji zmiany objętości butelki do hodowli komórkowej należy odpowiednio przeskalować objętości podanych odczynników.

1. Usunąć z kolby medium. Dodaj 10 ml PBS, lekko poruszaj kolbą (wykonuj ruchy po 8, aby jak najlepiej przepłukać komórki) Usunąć PBS.
2. Dodaj 1 ml trypsyny.
3. Inkubuj komórki przez 10 min w temperaturze 37°C, aby komórki oderwały się od ściany kolby. Podczas ostatnich 2 min obserwuj komórki pod mikroskopem.

4. Po oderwaniu komórek od ścianki dodaj 9 ml pożywki i ponownie zawieś komórki, płuczac powierzchnię i pipetując w górę i w dół 5-10 razy.
5. Pobierz małą próbkę zawieszonych komórek (<0,5 ml) w próbówce Eppendorfa i zlicz komórki zgodnie z protokołem zliczania.
6. Zachowaj 1 ml komórek w oryginalnej kolbie (aby podzielić je w proporcji 1:10). Dodaj pożywkę, aby uzyskać całkowitą objętość 10 ml.

3.3 Protokół zliczania komórek

1. Dodaj 30 μ l trypan blue i 30 μ l zawiesiny komórek w próbówce Eppendorfa. Pobierz 10 μ l na studzienkę i policz w liczniku komórek. Pamiętaj, aby użyć właściwego protokołu.
2. Włóż plastikowy slajd, powiększ, aby sprawdzić ostrość. Włóż następną próbkę i ponownie policz komórki.
3. Zapisz liczbę żywych komórek i żywotność w %.
4. Powtórz procedurę 3 razy i wyznacz średnią z otrzymanych wyników.

4 Zbieranie komórek PC3 do analizy aberracji chromosomowych

Po 24 godzinach hodowli do próbek dodawać kolcemid (Sigma) do stężenia końcowego 1 g/ml. W 70 godzinie hodowli dodawać kalikulinę A (50 nM) w celu indukcji PCC. Po 72 godzinach hodowli odwirować i utrwalić, a następnie wybarwić preparaty. sposób.

4.1 Protokół dla komórek po napromienianiu

1. Wiruj 10 min z prędkością 1000 r/min.
2. Odciągnij supernatant, pozostaw około 0,5 ml osadu.
3. Powoli dodawaj (mieszać przez wirowanie) 5-7 ml ciepłego (37°C) hipotonicznego roztworu - 0,075 M KCl
4. Umieść w łaźni wodnej lub w inkubatorze (37°C) na 15 minut.
5. Wiruj 15 min z prędkością 1000 r/min.
6. Odciągnij supernatant, pozostaw około 0,5 ml granulatu.
7. Powoli dodaj (wymieszaj przez wirowanie) 5-7 ml lodowatego (0°C) utrwalacza.
8. Pozostaw na noc w lodówce lub przejdź do następnego kroku.
9. Wiruj 10 min z prędkością 1000 r/min.
10. Wykonaj 2-3 płukania utrwalaczem - supernatant musi być czysty.
11. Odciągnij supernatant opuszczający osad w 0,1 - 0,5 ml utrwalacza.
12. Nanieś 2-3 krople granulatu na odtłuszczone, zimne (chłodzone) preparaty. Sprawdź zanieczyszczenie cytoplazmy. W przypadku zanieczyszczenia dodaj kilka kropli kwasu octowego do osadu, wymieszaj, spróbuj ponownie. Spróbuj zastosować na mokrych slajdów. Wykonaj 2-4 szkiełka na granulkę.

13. Susz preparaty przez noc.
14. Włóż szkiełka do 5-10% roztworu Giemsy w celu zabarwienia komórek na 5–10 minut. Następnie przepłucz szkiełka wodą destylowaną.
15. Susz w powietrzu (lekko potrząsając w dłoniach szkiełkiem).

4.2 Odczynniki chemiczne potrzebne do aberracji chromosomowych

0,075 M KCl

2,8 g KCl / 500 ml wody destylowanej

Przechowywać w 4°C

Utrwalające:

Metanol 3

Kwas octowy 1

BrdU (5'-bromo-2'-deoksyurydina), Sigma B9285

Rozwiązanie STOCK

Rozpuścić 0,0031 g BrdU w 10 ml PBS / RPMI 1640

Sterylizować przez filtrację (filtr 0,22 mm)

Przechowywać w lodówce (w temperaturze 4°C) w folii aluminiowej.

Bisbenzamid (Hoechst 33258), Sigma B28283 - TRUCIZNA!

ZBIORY:

Rozpuścić 0,05 g w 100 ml A. dest.

Przechowywać w folii aluminiowej w temperaturze 4°C

Roztwór roboczy: wymieszać 0,5 ml z 50 ml wody destylowanej

Calyculin A (Sigma C5552) - 10 µg

Rozpuścić zawartość w 1 ml etanolu (bez wody) lub DMSO

Podwiokrotność 25 µl w małych probówkach Eppendorfa, przechowywać w temperaturze –20°C

Dodać 25 µl na 5 ml pożywki. Stężenie końcowe: 50 nM.

Kwas okadaikowy

Literatura

- [1] R.A. Horton, L.A. Moran, G. Scrimgeour, M. Perry, D. Rawn, *Principles of Biochemistry*, Pearson, 2006
- [2] E.J. Hall, A.J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*, Lippincott Williams Wilkins, 2012
- [3] S. Sommer, I. Buraczewska, A. Wójcik, J. Kacprzak, T. Kuszewski, A. Lankoff, H. Lisowska, W.U. Müller, *Dozymetria biologiczna w zakresie wysokich dawek promieniowania jonizującego*, Raporty IChTJ. SERIA B nr 1/2007