

IT 8500345

RT/PAS/84/16

C. CATENA, A. MATTONI

RIPARAZIONE DEL DNA IN LINFOCITI UMANI PHA STIMOLATI

ENEA-RT/PAS/84/16

C. Catena (ENEA-Dipartimento Protezione Ambientale e Salute dell'Uomo, Casaccia), **A. Mattoni** (Istituto di Patologia Generale-Università La Sapienza, Roma)

RIPARAZIONE DEL DNA IN LINFOCITI UMANI PHA STIMOLATI

Riassunto — La misura del danno al DNA, prodotto da raggi X, e della sua evoluzione biologica è eseguita con lisi alcalina e cromatografia su idrossiapatite. In linfociti umani PHA stimolati la riparazione è completa nei primi 50 minuti, susseguentemente compare di nuovo il danno. In colture sincronizzate si è messo in evidenza l'aumento della cinetica riparativa durante la fase S. Si suggerisce l'esistenza di una correlazione tra ricomparsa del danno e aberrazioni cromatidiche. La riparazione del DNA, in colture sincronizzate permette di valutare la capacità riparativa individuale; essa può contribuire sulla evidenziazione di individui che, senza manifestazioni cliniche apparenti, sono portatori di anomalie nell'attività riparativa. Esistendo una evidente correlazione tra capacità riparativa del DNA e carcinogenesi, viene descritta la possibilità di valutare, in cellule neoplastiche, la relazione esistente tra riparazione e sopravvivenza.

ENEA-RT/PAS/84/16

C. Catena (ENEA-Dipartimento Protezione Ambientale e Salute dell'Uomo, Casaccia), **A. Mattoni** (Istituto di Patologia Generale-Università La Sapienza, Roma)

DNA REPAIR IN PHA STIMULATED HUMAN LYMPHOCYTES

Summary — *Damage and repair of radiation induced DNA strand breaks were measured by alkaline lysis and hydroxyapatite chromatography. PHA stimulated human lymphocytes show that the rejoining process is complete within the first 50 min., afterwards secondary DNA damage begins to appear. Human lymphocytes, in synchronized culture, show increased repair activity during S phase. It is suggested that a correlation exists between secondary DNA damage and chromatid aberration. DNA repair, in synchronized culture, allows to evaluate individual repair capacity and this in turn can contribute to the discovery of individual who, although they do not demonstrate apparent clinical signs, are carriers of DNA repair deficiency. Being evident that a correlation exists between DNA repair capacity and carcinogenesis, the possibility of evaluating the existent relationship between DNA repair and survival in tumour cells comes therefore into discussion.*



COMITATO NAZIONALE PER LA RICERCA E PER LO SVILUPPO
DELL'ENERGIA NUCLEARE E DELLE ENERGIE ALTERNATIVE

C. CATENA, A. MATTONI

RIPARAZIONE DEL DNA IN LINFOCITI UMANI PHA STIMOLATI

RT/PAS/84/16

Testo pervenuto in ottobre 1984

INDICE

Introduzione.....	1
Cenni di radiobiologia del linfocita	3
Danno molecolare radioindotto al DNA.....	5
Danno radioindotto alla membrana cellulare.....	12
Denaturazione del DNA.....	16
Rotture radioindotte al DNA.....	19
Riparazione del DNA.....	27
Discussione.....	39
Metodiche e tecniche.....	42
Bibliografia.....	51

RIPARAZIONE DEL DNA IN LINFOCITI UMANI PHA STIMOLATI

C. Catena, A. Mattoni^{*}

INTRODUZIONE

L'integrità della molecola del DNA è un requisito essenziale per l'espressione genica, la perdita di tale integrità comporta una modificazione della sua funzionalità. In questo contesto per "danno al DNA" si intende la comparsa di alterazioni chimiche e fisiche indotte sulla molecola del DNA, mentre per "riparazione del DNA" si intende l'effetto di quei meccanismi biologici che modificano il danno indotto.

I primi studi sull'argomento risalgono al 1930 per opera di Hollander, Curtis, Duggan ed altri, ma solo più recentemente, dal 1950 in poi, la ricerca sul danno al DNA (DNA damage) e la sua riparazione (DNA repair) prende impeto, sviluppandosi in due vie parallele: DNA isolato (DNA in soluzione) e DNA "vivente" presente in organismi procariotici ed eucariotici. La prima via tenta di chiarire la natura molecolare delle alterazioni prodotte, mentre la seconda via tenta di chiarire la risposta biologica al danno indotto.

I meccanismi molecolari ed enzimatici coinvolti nella riparazione del danno al DNA, capaci di restituire l'integrità necessaria ad una cor-

Dip. PAS, Div. FIBI, Lab. di Dosimetria e Biofisica, CRE-Casaccia; ENEA.

^{*} Istituto di Patologia Generale, Univ. "La Sapienza", Roma.

retta espressione genica, acquistano una funzione fondamentale nella sopravvivenza e nel mantenimento della continuità genetica. Tali meccanismi sono: prevalentemente sotto il controllo genetico, di carattere enzimatico, in genere costitutivi ma talvolta anche inducibili. Si presume che questi sistemi enzimatici si siano sviluppati nella cellula come meccanismo di risposta alle modificazioni, spontanee o provocate da agenti ambientali, della molecola del DNA. Come modificazioni spontanee si possono citare i seguenti: 1) rilascio spontaneo di una base purinica con produzione di un sito apurinicico, evento con frequenza di $1/10^7$ basi per ora a 37°C; 2) errori replicativi prodotti durante la sintesi semiconservativa del DNA, intesi come inserimento di basi non omologhe; 3) modificazioni chimiche delle basi come alchilazioni, formazioni di addotti, ecc.

Più recentemente, parallelamente allo studio del danno prodotto da agenti fisici, si è sviluppata un'ampia ricerca sul danno prodotto da agenti chimici, sia organici che inorganici, che possono interagire con la molecola del DNA.

Mutanti procariotici hanno fornito valide indicazioni sulle vie metaboliche utilizzate nei processi riparativi, essi hanno messo in luce la caratteristica genetica di tali processi, il che comporta in individui con alterata codificazione una variabile risposta riparativa. Difetti riparativi, sia qualitativi che quantitativi, possono accumulare lesioni o mutazioni che a livello fisiologico si possono esprimere sotto varie forme: variazioni fenotipiche, mutazioni, morte cellulare. Nell'uomo questi difetti sono associati a: trasformazione neoplastica, difetti alla nascita, arteriosclerosi, diminuzione della durata della vita, disfunzioni neurologiche, ecc.. Varie sindromi cliniche come lo Xeroderma pigmentosum (XP), ataxia telangiectasia (AT), anemia di Fanconi (FA), progeria, cheratosi attinica (AK), Cockayne (CS), Nijmegen (NBS), Down (DS), retinoblastoma ereditario, presentano alterazioni di almeno uno dei meccanismi necessari alla riparazione del DNA. Data la molteplicità delle vie metaboliche riparative, la presenza di indi-

vidui con marcati difetti riparativi, ricondotti prevalentemente ad una mutazione genica (omozigoti recessivi) suggerisce la concomitante presenza di individui, senza apparente sindrome clinica (eterozigoti) portatori di un'ampia variabilità riparativa sia qualitativa che quantitativa. Per cui lo studio della riparazione del DNA, oltre a destare un interesse di ricerca di base, diventa determinante, come ricerca applicata, nella patologia umana.

L'uso di inibitori specifici e condizioni di crescita particolari (modificazione del mezzo di coltura, temperatura, ecc.) sono i mezzi che ci possono aiutare nello studio dei processi metabolici legati alla riparazione; mentre l'uso di linfociti umani PHA stimolati in colture a breve termine (cellule con corredo cromosomico umano non alterato nella sua espressione genica data la brevità della coltura) ci fornisce utili indicazioni sulla valutazione della riparazione del DNA in cellule umane.

Il rapporto descrive l'indagine sperimentale, condotta su linfociti umani PHA stimolati prelevati dal sangue circolante, tendente a chiarire la risposta biologica al danno radioindotto sulla membrana cellulare come inibizione del trasporto attivo e sulla molecola del DNA come produzione di siti alcali sensibili.

CENNI DI RADIOBIOLOGIA DEL LINFOCITA

Il linfocita umano del sangue circolante è stato oggetto di interesse scientifico, negli ultimi 20 anni, nel campo della radiobiologia cellulare. La risposta biologica al danno radioindotto di linfociti umani varia sensibilmente se si trattano le cellule con mitogeni (blast cells) o non (resting cells). Ciò deriva probabilmente dalle diverse condizioni metaboliche cellulari: il linfocita non stimolato (fase G_0) presenta un metabolismo estremamente ridotto, mentre il trattamento mitogeno stimola l'aumento del metabolismo cellulare fino a condurre la cellula in ciclo.

Considerando il linfocita umano come una cellula facilmente prelevabile dall'individuo, una cellula primaria in coltura in vitro ed avente la caratteristica di entrare in ciclo cellulare dopo PHA stimolazione; essa diventa un substrato biologico idoneo allo studio della radiobiologia cellulare umana. Basse dosi di raggi X, inferiori ad 1 Gy, provocano su linfociti di ratto e di coniglio coltivati in vitro un incremento del numero di cellule in picnosi nucleare in funzione lineare con la dose, tale fenomeno è evidenziabile, anche se in misura minore, in linfociti umani (1-2-3). Linfociti umani irraggiati a basse dosi, posti in coltura per 6 giorni, vanno incontro ad autolisi mostrando rispettivamente una sopravvivenza del 10% alla dose di 0,75 Gy e del 5% alla dose di 1,5 Gy (4); inoltre colture linfocitarie in vitro dopo 4 giorni dal trattamento radiogeno vanno incontro ad una morte cellulare dose-dipendente (5). Una dose di 5 Gy produce una riduzione della sopravvivenza, dopo 40 ore dal trattamento di oltre il 95%; gli autori la definiscono "morte in interfase" (6-7). In realtà i linfociti del sangue circolante sono una popolazione mista, così come è diversa la loro radiosensibilità; infatti la popolazione T appare più radioresistente di quella B, ed in seno alla popolazione T si possono distinguere almeno tre sottopopolazioni con diversa radiosensibilità: due diverse radiosensibilità nella sottopopolazione definita T_e ed una sola radiosensibilità nella sottopopolazione definita T_1 (2-8-9-10). Recentemente per la frazione di linfociti più radiosensibili si è ottenuta una curva dose-effetto con un $D_0 = 0,72$ Gy, mentre per la frazione più radioresistente un $D_0 = 2,5$ Gy (11). Il quadro della radiosensibilità del linfocita cambia in modo molto evidente dopo trattamento mitogeno. Si possono identificare due condizioni sperimentali: trattamento radiogeno prima e dopo la stimolazione con PHA. Nella prima condizione la misura dell'incapacità del linfocita a blastizzare (entrare in ciclo cellulare) per mezzo dell'attivazione del mitogeno è funzione dose-dipendente (12), inoltre tale capacità è protetta da irraggiamento in condizioni anossiche (13). Una dose di 1 Gy prima della stimolazione con PHA non interferisce con la sintesi replicativa del DNA, mentre all'aumentare

della dose (da 2 a 8 Gy) si ha un decremento dose-dipendente della sintesi con un $D_0 = 3,4$ Gy (14). Il trattamento radiogeno dopo le prime 2-3 ore dalla PHA stimolazione non altera la formazione di blasti per dosi inferiori a 3 Gy, una dose di 20 Gy riduce questa capacità del 40%; inoltre le cellule che entrano nella loro prima fase S diminuiscono in funzione dose-dipendente, dove 20 Gy ne abbassano il livello al 36% (7). Il trattamento con PHA protegge anche la mobilità elettroforetica (EPM) di linfociti irraggiati, questo effetto deriva probabilmente dalle modificazioni della membrana cellulare indotte dal mitogeno (15-16).

Si può pertanto affermare che la cellula linfocitaria allo stato di riposo (fase G_0) ha un'alta radiosensibilità e dopo trattamento radiogeno degenera in forme picnotiche (morte in interfase), che l'aumento della radioresistenza dovuto alla PHA stimolazione è da ricondursi al nuovo stato fisiologico cellulare e che nella popolazione dei linfociti stimolati esistono delle sottopopolazioni con diversa radiosensibilità.

DANNO MOLECOLARE RADIOINDOTTO AL DNA

Le radiazioni ionizzanti agiscono sul materiale biologico attraversandone le strutture molecolari con produzione di ioni e inducendo la formazione di radicali liberi. Tale azione è nettamente aspecifica, in contrasto con l'effetto delle radiazioni visibili ed U.V. le quali sono assorbite selettivamente solo da alcuni tipi molecolari.

Per convenienza, anche se arbitrario, si può dividere il tempo di azione in tre stadi: fisico chimico e biologico. Lo stadio fisico comincia con il passaggio di un elettrone veloce o un fotone ad alta energia che provoca il trasferimento di energia ad atomi o molecole nel mezzo assorbente. L'energia dell'elettrone incidente o fotone in eccesso, rispetto alla energia normale di legame implicata nella struttura molecolare, produce l'espul-

sione di elettroni con energie considerevolmente più grandi delle energie di legame. Processi di eccitazione elettronica avvengono nell'ordine di tempo di 10^{-16} - 10^{-15} secondi. Cambiamenti nella configurazione molecolare, causati da eccitazioni vibrazionali, sono molto lenti e limitati dall'inerzia degli atomi e delle forze di legame. Gli elettroni interagiscono con i dipoli acquosi causando il riorientamento delle molecole di acqua; in pochi picosecondi si ha la formazione di elettroni idratati (uno delle più importanti specie di radicali liberi), agenti riducenti che si formano in acqua irraggiata (80%) insieme all'atomo di idrogeno (20%). Questi elettroni idratati hanno un tempo di vita molto breve (micro o milli secondi). Durante la radiolisi dell'acqua si formano specie ossidanti, una delle quali è il radicale OH° .

Nello stadio chimico i radicali liberi prodotti dalla radiolisi della acqua (e_{aq}^- , H° , OH°) che non sono omogeneamente distribuiti nel mezzo si formano vicino alle "tracce" di particelle ionizzanti e poi diffondono nella maggior parte della soluzione, la distribuzione omogenea si raggiunge approssimativamente con 10^{-8} - 10^{-7} secondi dopo l'iniziale evento ionizzante. Durante la diffusione in soluzione avvengono una serie di reazioni tra radicali che danno luogo ai così chiamati "prodotti molecolari" della chimica delle radiazioni (H_2 e H_2O_2). Lo stadio chimico continua con le reazioni dei radicali liberi con altri costituenti del mezzo.

A livello biologico l'ordine di tempo può variare da un'ora per sistemi batterici a molte ore per cellule di mammifero. Nei tessuti organizzati le risposte al danno da radiazione coprono un vasto arco di tempo. Alcuni effetti possono apparire immediatamente, ad esempio il danno al sistema nervoso centrale e al tratto gastrointestinale che usualmente appaiono pochi giorni dopo l'irraggiamento, altri appaiono in ritardo come il danno al tessuto emopoietico (circa un mese) e il danno sul polmone e sulla funzione renale (molti mesi). Molti effetti come cambiamenti genetici o induzione cancerogena non diventano evidenti che dopo molti anni.

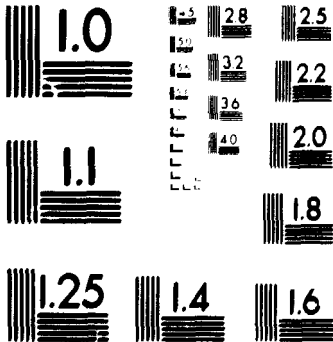
Lo studio dell'inattivazione di virus e batteri provocata dalle radiazioni ionizzanti porta a sostenere la teoria del "bersaglio". Secondo questa teoria, il danno provocato dalle radiazioni ionizzanti, su molecole o strutture cellulari che nei sistemi biologici viventi possono essere rimpiazzate facilmente (rapido turnover), non è molto significativo come risposta biologica. Solo quelle molecole e quelle strutture cellulari, che non possono essere rimpiazzate e che nello stesso momento sono vitali per la cellula, possono essere considerate un bersaglio biologico significativo delle radiazioni ionizzanti. Il danno subito da queste strutture influenzerà la capacità di funzionamento e si rifletterà, se non riparato, in una alterazione cellulare.

La teoria del "bersaglio" non tiene conto della natura del danno provocato nè i processi chimici che prendono posto dopo l'azione di questo. Dopo vent'anni di sviluppo della biologia molecolare, si può assumere che il DNA è il "bersaglio" cellulare significativo delle radiazioni ionizzanti. La dimostrazione di ciò deriva dalle indicazioni di una relazione tra radiosensibilità e quantità di DNA contenuto negli organismi a differenti livelli di organizzazione. Il rapporto tra volume di DNA bersaglio e DNA totale diminuisce con l'aumentare della complessità del DNA presente negli organismi; tale rapporto presenta il valore di 1 per virus a singola catena fino a raggiungere un valore intorno a 0,0033 per cellule di mammifero. Altra conseguenza del danno sul DNA è un irreversibile blocco della normale divisione cellulare; questo probabilmente è dovuto a difetti strutturali indotti dalle radiazioni sulla molecola del DNA.

Le radiazioni ionizzanti producono danni strutturali al DNA attraverso due meccanismi: effetto diretto ed indiretto. Nel primo caso l'energia della radiazione incidente è direttamente trasferita alla molecola bersaglio, inizialmente l'elettrone liberato per effetto fotoelettrico o Compton interagisce con le molecole e cede la sua energia cinetica provocando una serie di eccitazioni e ionizzazioni; queste molecole eccitate

e ionizzate sono altamente instabili e riarrangiano la loro energia in eccesso distribuendola o tra di loro o a molecole stabili. L'effetto indiretto è determinato dalla reazione tra i prodotti di radiolisi dell'acqua (prodotti dall'azione diretta) e le molecole presenti nel mezzo. Poiché il trasferimento di energia è casuale, in un sistema cellulare sottoposto alla azione delle radiazioni ionizzanti la maggior parte dell'energia viene assorbita dalle molecole di acqua che eccitate e ionizzate producono dei gruppi altamente reattivi, prodotti primari della radiolisi dell'acqua.

Dal punto di vista quantitativo il rapporto tra effetto diretto ed indiretto non è ben conosciuto, ma con ragionevole certezza si può ritenere che in sistemi acquosi i danni da radiazione sono essenzialmente dovuti all'azione indiretta; nelle cellule con un'alta concentrazione di DNA la inattivazione biologica è probabilmente dovuta ad una combinazione dei due effetti. Specie reattive primarie, soprattutto i radicali H° e OH° , provocano cambiamenti chimici nella macromolecola del DNA come deaminazione, deidrossilazione, scissione del legame glicosidico tra pentoso e base purinica o pirimidinica, ossidazione del pentoso, rottura della catena nucleotidica e rilascio dei gruppi fosfato. Inoltre va notato l'importante effetto di rottura dei legami idrogeno e quindi la depolimerizzazione della macromolecola con diminuzione della viscosità e della birifrangenza. I radicali liberi formati nella molecola del DNA allo stato secco possono essere analizzati quantitativamente e qualitativamente con ESR; l'analisi fornisce delle informazioni sulla natura paramagnetica del processo. Gli spettri ottenuti presentano segnali caratteristici simili per le quattro basi eccetto che per la timina e forniscono per derivazione il numero di radicali presenti nel campione. È stato appurato che il numero dei radicali aumenta secondo l'ordine: base - nucleoside - nucleotide; che tutte le basi radicali sono formate dall'aggiunta di atomi di idrogeno: nelle pirimidine prevalentemente nel doppio legame 5-6, nelle purine in posizione 2 o 8. Il deossiribosio invece forma un radicale mediante la perdita di un atomo



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
 NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
 STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
 (ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

di idrogeno e l'apertura dell'anello, la più alta produzione di radicali nei nucleotidi è dovuta all'attacco addizionale dell'atomo di idrogeno staccatosi dal pentoso. Gli esperimenti atti ad individuare le alterazioni chimiche delle basi irraggiate in soluzioni acquose (determinate dalla diminuzione dell'assorbimento ottico nella regione dell'ultravioletto, o dall'uso di cromatografia su carta o da reazioni chimiche specifiche) mostrano che le pirimidine sono due volte più sensibili delle purine (17). Nelle pirimidine i radicali OH^\bullet attaccano prevalentemente il doppio legame 5,6 provocando, in presenza di ossigeno, la formazione di pirimidine idrossi-idroperossidi, una alterazione definita monofunzionale, cioè causante una leggera distorsione dell'elica; successivamente si ha l'apertura dell'anello pirimidinico con rilascio di piruvamide, anidride carbonica e formazione di gruppi formamide che rimangono legati allo zucchero della catena polinucleotidica (fig. 1). Le purine non sono state studiate così dettagliatamente, l'attacco del radicale OH^\bullet al C-8 provoca la distruzione dell'anello imidazolico con formazione di formamido-pirimidina o l'ossidazione del C-8; queste alterazioni creano un indebolimento del legame N-glicosidico con probabilità di perdita della purina alterata. In presenza di ossigeno avviene una perossidazione del doppio legame 4,5, non sono stati isolati però idrossi-idroperossidi forse perché instabili, sono stati trovati invece ciclonucleotidi (18) che possono giocare un ruolo nel processo di cross-linking. La presenza di ossigeno durante l'irraggiamento aumenta la distruzione delle basi di un fattore 2,5. La timina è la base distrutta più rapidamente, la radiosensibilità delle basi diminuisce nell'ordine: timina > citosina > adenina > guanina; la distruzione dipende comunque da vari fattori come la concentrazione del soluto, il pH della soluzione, la presenza di sali e la natura delle radiazioni. Le radiazioni densamente ionizzanti (^{210}Po , particelle alfa) sono meno efficienti dei raggi X o gamma (19). La distruzione delle basi, che diminuisce nel seguente modo: base libera > nucleoside > nucleotide difosfato (20), è un evento che avviene circa quattro volte più frequentemente della perdita di

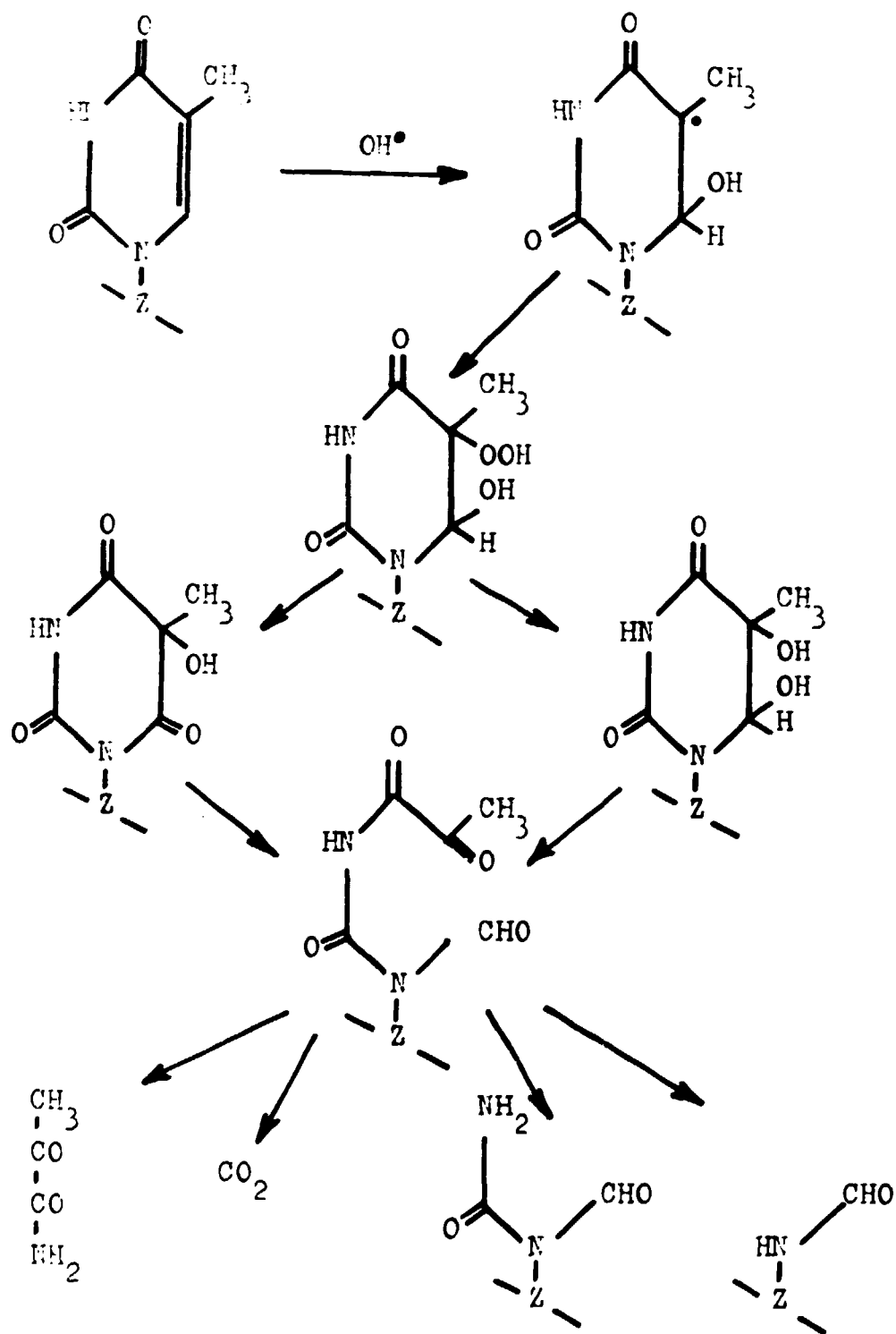


Fig. 1 Alcune possibili modificazioni di una base pirimidinica dopo attacco del radicale OH^\bullet .

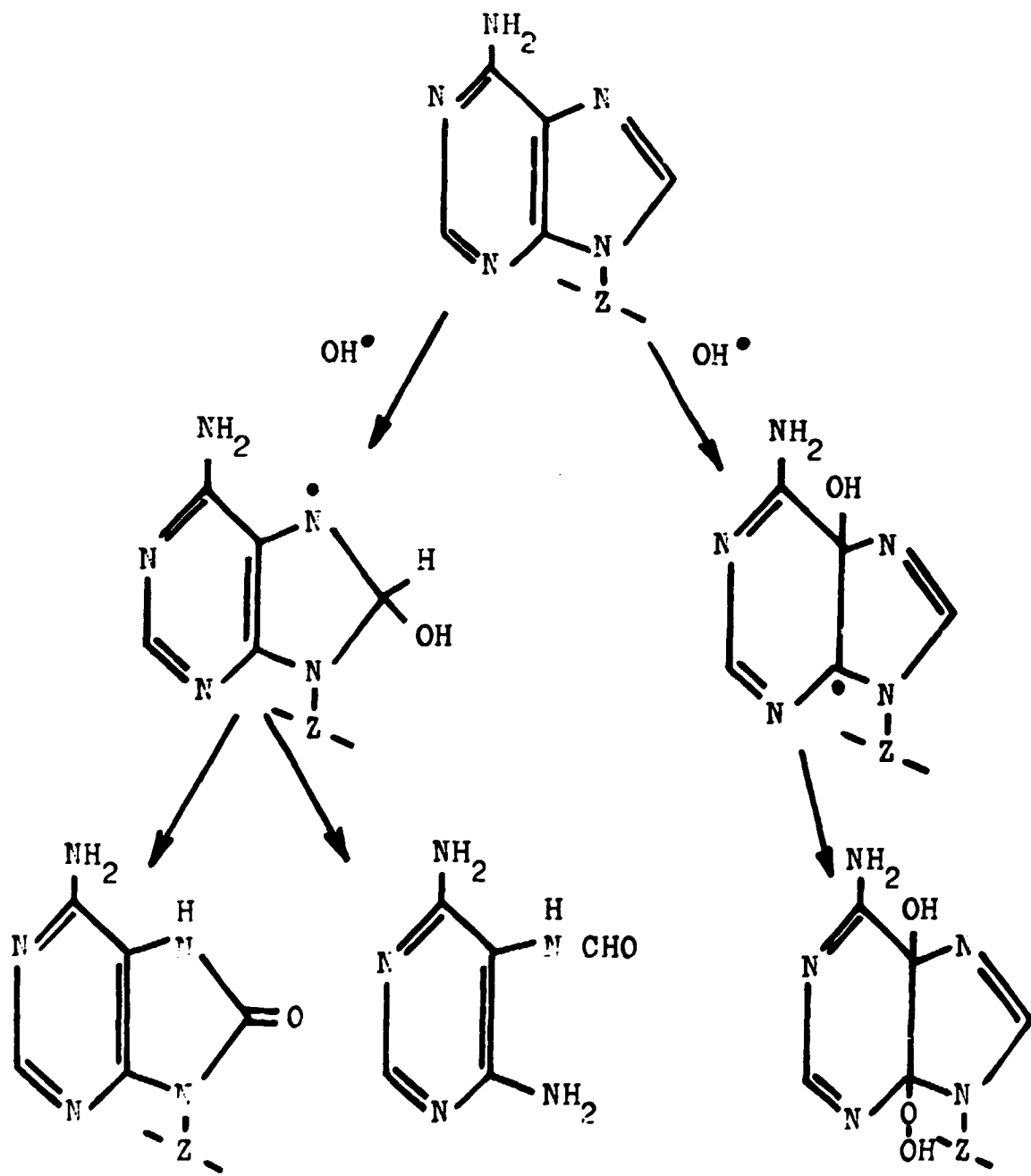


Fig. 2 Alcune possibili modificazioni di una base purinica dopo attacco del radicale OH^\bullet .

una base dal DNA danneggiato e questo effetto non è influenzato dalla presenza di ossigeno (21). Le alterazioni che le radiazioni provocano sul pentoso determinano generalmente rotture alla catena del DNA, ciò può avvenire sia per idrolisi del legame fosfodiesterico (in presenza o in assenza di ossigeno) sia per l'apertura del legame C3-C4 che avviene solo in presenza di ossigeno. Nel primo caso sono i radicali acquosi riducenti, specialmente OH^\bullet , che reagiscono con il pentoso, pur avendo maggior affinità per i doppi legami delle basi (17) e determinano la rimozione di basi non danneggiate e il rilascio di gruppi monofosfato 3' e 5' terminali. Nel secondo caso (22-23-24-25) si è riscontrata la formazione di aldeide malonica e rilascio della base dopo irraggiamento del DNA dovuto all'apertura del legame tra il C3 e il C4 del deossiribosio, il fosfato viene probabilmente rilasciato per l'effetto destabilizzante che l'ossidazione del C3 provoca sul gruppo 5-fosfato (fig. 3). Un altro effetto prodotto dalle radiazioni ionizzanti in una soluzione acquosa di DNA è la formazione di legami (cross link) tra molecole di DNA o tra molecole di DNA e proteine. Alcuni esperimenti mostrano che la formazione di cross link nel DNA irraggiato è in relazione con i radicali liberi che possono reagire con l'ossigeno per formare perossiradicali. Il rate di formazione di cross link è influenzato da numerosi parametri: macromolecolari (dimensione, conformazione, concentrazione), del solvente (forza ionica ed effetto polare), ecc.

DANNO RADIOINDOTTO ALLA MEMBRANA CELLULARE

Lo studio del comportamento delle membrane verso un danno radioindotto acquista una doppia importanza nell'analisi del danno al DNA: in primo luogo la membrana nucleare è in stretta correlazione con la funzionalità del DNA (in particolar modo nella sintesi semiconservativa); in secondo luogo la membrana cellulare funziona da mediatore di tutti i precursori necessari alla vitalità cellulare (trasporto di precursori metabolici).

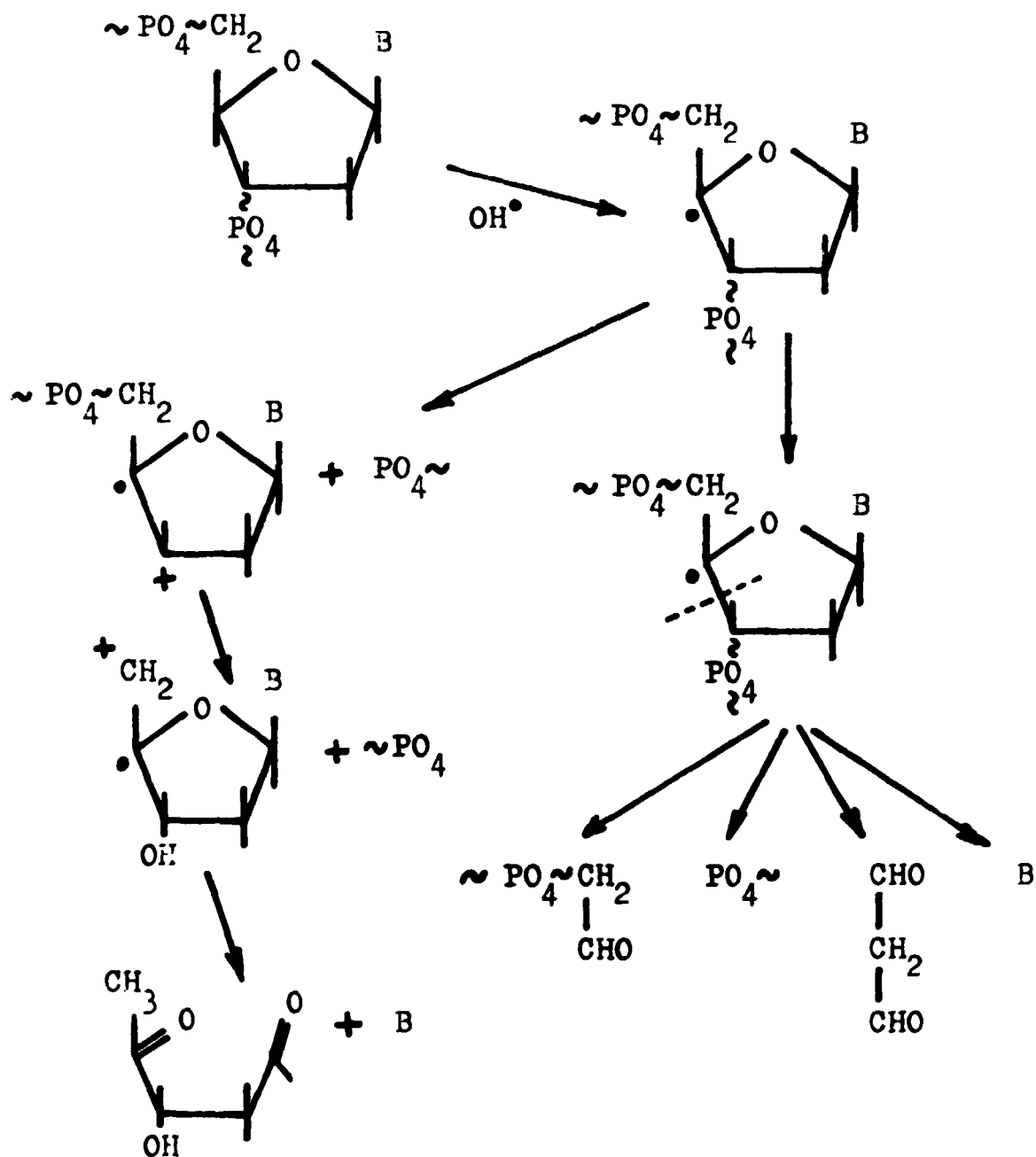


Fig. 3 Alcune possibili modificazioni del pentoso dopo attacco del radicale OH^\bullet .

Per esaminare un aspetto del comportamento della membrana cellulare verso un danno radioindotto abbiamo eseguito delle prove sperimentali sul trasporto intracellulare della timidina in linfociti umani PHA stimolati. Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo evidenziato che esiste un trasporto mediato a carattere enzimatico (active transport) presente nella membrana, funzionante con concentrazioni di timidina nel mezzo di coltura inferiori a 10^{-6} M; mentre per concentrazioni superiori a 10^{-6} M il trasporto passivo (simple diffusion) diventa influenzante nel trasporto totale (26). Per concentrazioni di timidina nel mezzo di coltura intorno a 3×10^{-7} M ci si attende un 94% di trasporto mediato ed il 6% di trasporto passivo, mentre per concentrazioni intorno a 4×10^{-6} M l'influenza del trasporto passivo sale intorno a valori di circa il 20% del totale.

Con trattamenti radiogeni fino a 100 Gy, abbiamo dimostrato come il trasporto mediato è più radiosensibile di quello passivo ed è dose-dipendente con andamento bifasico (fig. 4); inoltre il danno prodotto al trasporto mediato non è riparabile nell'arco delle prime due ore dopo il trattamento radiogeno, bensì il trattamento di incubazione amplifica tale danno (27). Il trasporto passivo è molto radioresistente, occorrono molte centinaia di Gy per ottenere un decremento di 3 volte della sua costante di permeabilità (28).

Una dose di 5 Gy non altera la mobilità elettroforetica di linfociti umani PHA stimolati, mentre su cellule di melanoma B16 C2W la stessa dose porta una diminuzione del valore della mobilità nelle prime ore dopo l'irraggiamento per poi ritornare ai valori iniziali dopo circa 20 ore. La variazione di mobilità nelle cellule di melanoma è prevenuta se si aggiunge la PHA o la ConA subito dopo l'irraggiamento (15-29). Si è evidenziato, anche su cellule di linfoma NC 37, un effetto radioprotettivo della PHA con una funzione inversa al tempo intercorrente tra l'irraggiamento ed il trattamento mitogeno (16). E' probabile che la PHA provochi dei cambiamenti sulla condizione della membrana cellulare tali da proteggerla verso il danno radioindotto.

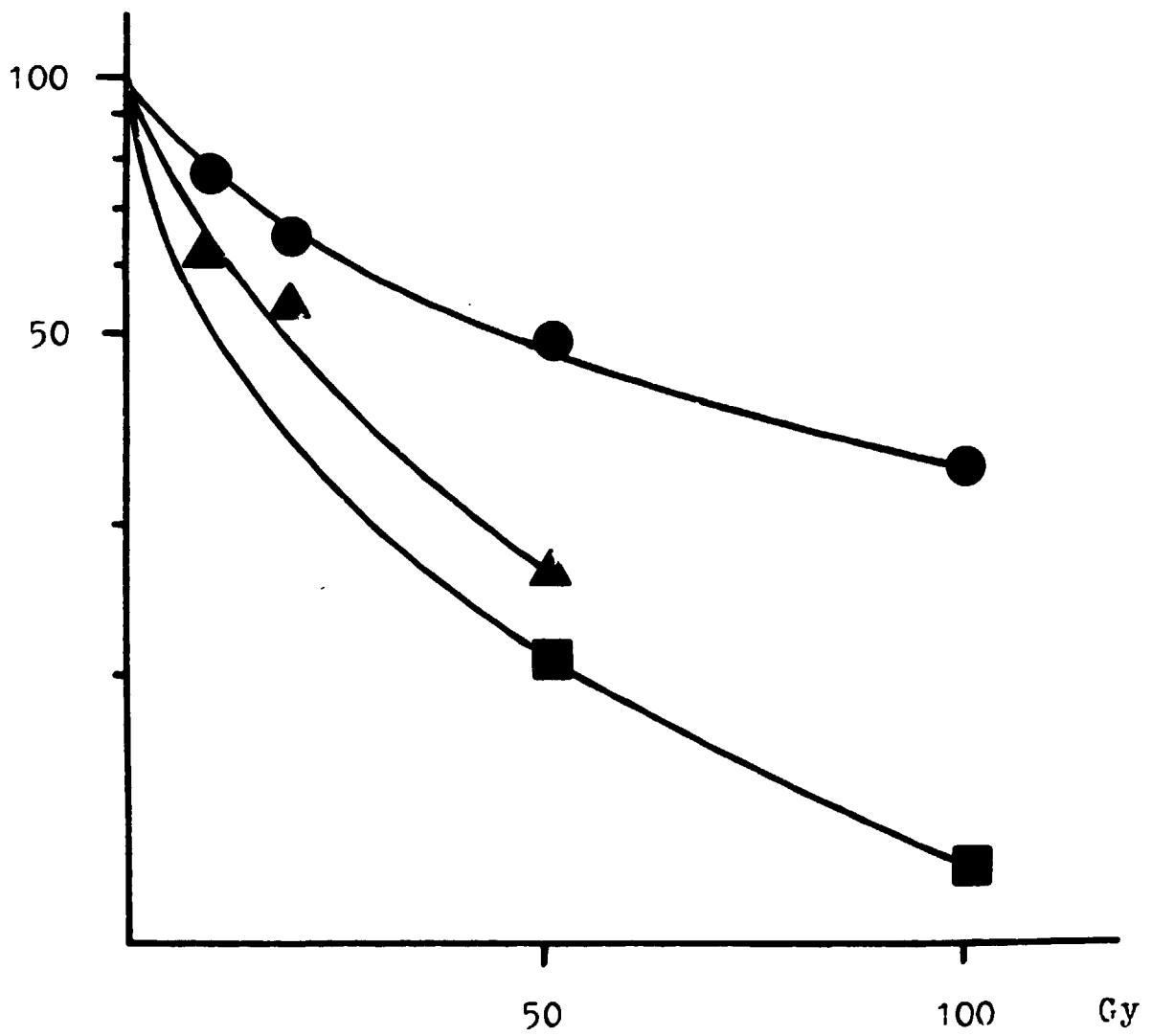


Fig. 4 Attività (%) del trasporto attivo della timidina dopo irraggiamento. Tempo di incubazione: ●, 0 min.; ▲, 60 min.; ■, 120 min.

Studi sulle variazioni della permeabilità cellulare, misurata con fluoresceina diacetato (FDA), condotti su cellule CHO trattate con raggi gamma e su cellule I-929 trattate con raggi X, suggeriscono l'esistenza di due target nella membrana cellulare aventi diversa radiosensibilità (30-31). Il trattamento radiogeno provoca una oscillazione del potenziale di membrana dimostrabile su cellule di mammifero e su altri sistemi biologici, una dose di 0,55 Gy fa perdurare l'oscillazione per un periodo superiore a 30 min., in seguito il valore del potenziale ritorna al livello iniziale. Il tempo necessario per il raggiungimento della massima oscillazione (fino a 2 Gy) è dose-dipendente. Fino a 10 Gy l'andamento è lineare, con l'aumento della dose (fino a 200 Gy) l'andamento diventa bifasico (32). Ciò conferma l'esistenza di un danno radioindotto alla membrana cellulare, già con basse dosi (inferiori ad 1 Gy) si producono alterazioni strutturali che portano alla inibizione del trasporto mediato, pertanto: 1) la membrana cellulare intesa come struttura che opera nel trasporto mediato è un target importante per le radiazioni ionizzanti, 2) la riparazione della membrana dopo un danno radioindotto, se avviene, impiega tempi più lunghi di quelli necessari alla riparazione del DNA e probabilmente solo quando la dose è inferiore a 5 Gy, 3) è probabile che l'alterazione radioindotta alla membrana cellulare sia coinvolta nella depressione della sintesi replicativa del DNA dopo irraggiamento, 4) il danno radioindotto alla membrana cellulare pone molte remore sulle misure di uptake, dopo irraggiamento, che utilizzano precursori presenti nel mezzo di coltura.

DENATURAZIONE DEL DNA

Le catene a doppia elica del DNA si separano quando si scindono i legami idrogeno tra le basi, questo fenomeno può essere ottenuto in soluzione mediante: aumento della temperatura o titolazione con acidi o alcali. Gli acidi riducono i gruppi amminici dell'adenina, guanina e citosina; gli

alcali enolizzano e titolano i gruppi chetonici della guanina e timina. La insolita fragilità dei legami glicosidici nelle purine a basso pH rende inopportuno l'uso di acidi in esperimenti di denaturazione.

Se una soluzione di DNA viene riscaldata oltrepassando le temperature fisiologiche (33) i suoi legami idrogeno divengono via via più instabili con l'aumentare della temperatura fino a quando i due filamenti costituenti la doppia elica non si separano completamente (denaturazione). Le molecole di DNA con un alto contenuto di G-C sono più resistenti al collasso termico di quelle ricche in A-T. Questo perché la coppia G-C è tenuta insieme da tre legami idrogeno ed occorrono di conseguenza temperature più elevate (maggiore gradiente energetico) per rompere i legami. Lo svolgimento delle catene ha inizio in regioni ad alto contenuto di coppie di basi A-T e procede verso regioni a contenuto progressivamente più alto di G-C; pertanto la temperatura per cui si ha il 50% di denaturazione (T_m) è una caratteristica molecolare del DNA legata al suo contenuto in G-C.

La denaturazione alcalina del DNA di batteriofagi (T_2) e la dinamica del processo mostrano un aumento dell'effetto ipercromico in funzione della concentrazione idrossilionica (34). Si sono evidenziati quattro intervalli in cui il DNA si comporta diversamente: 1) l'effetto ipercromico non compare con valori di pH inferiori a 11,5 e il DNA rimane allo stato nativo; 2) tra 11,6 e 11,8 l'effetto ipercromico aumenta con l'aumento del pH pur non raggiungendo il valore massimo; 3) superato 11,8 l'effetto ipercromico raggiunge il valore corrispondente alla denaturazione; 4) a 12,1 l'effetto ipercromico sale istantaneamente con completa denaturazione del DNA. In seguito a neutralizzazione, l'effetto ipercromico trovato tra 11,6 e 11,8 è completamente reversibile, in queste condizioni si stabilisce un equilibrio tra la soluzione alcalina e la molecola del DNA in cui i legami secondari tra le basi sono scissi senza separazione delle catene. Tra 11,8 e 12,1 l'effetto ipercromico residuo è irreversibile, con un valore di punta, corrispondente alla completa denaturazione del DNA, intorno ad un pH = 11,95.

Studi sulla energia necessaria a svolgere la doppia elica del DNA hanno condotto all'ipotesi che gli ioni OH^- interagiscono con l'atomo di idrogeno, interessato ai legami tra le basi, cedendo ad esso parte della energia di formazione della molecola di H_2O , la quale è responsabile dello innesco dello srotolamento dell'elica. Tale srotolamento viene facilitato dalla presenza, all'inizio della catena, di un'alta concentrazione di ioni positivi, i quali agiscono in funzione del loro raggio ionico; d'altra parte essi possono contrastare il meccanismo di srotolamento in quanto tentano a disporsi in modo da neutralizzare l'eccesso di carica negativa, aiutati dal fatto che la struttura tridimensionale del DNA impedisce l'allontanamento delle coppie di basi opposte. Esperienze condotte su fagi a diverso peso molecolare hanno dimostrato come il tempo necessario per completare la separazione delle catene è proporzionale al quadrato del peso molecolare; fagi con peso molecolare intorno a 10^7 dalton hanno tempi di denaturazione dell'ordine di secondi (35). Il processo di denaturazione che avviene durante il trattamento alcalino del DNA di cellule di mammifero è simile a quello dei fagi, anche se la cinetica della separazione e della rinaturazione del DNA ad alto peso molecolare è sensibile alle interazioni molecolari (36). Esperienze condotte su cellule di mammifero mostrano un diverso comportamento verso la denaturazione alcalina del DNA in funzione delle diverse fasi del ciclo cellulare, con effetto più marcato in fase S (rapida separazione) che nelle altre fasi (lenta separazione) (37).

La presenza di materiali cellulari nella soluzione alcalina non sembra influire nel processo di srotolamento del DNA di cellule di mammifero, un innalzamento della temperatura di 20°C incrementa il processo di 2-3 volte, la rimozione del NaCl riduce la velocità di un fattore 10, il processo inoltre è sensibile alle forze meccaniche, alla luce visibile e fluorescente (37-38-39-40).

ROTTURE RADIOINDOTTE AL DNA

L'effetto delle radiazioni ionizzanti sulla molecola del DNA provoca delle alterazioni fisico-chimiche che sotto l'influenza di un trattamento alcalino si esprimono come rotture della catena del DNA con una sua conseguente diminuzione di peso molecolare. Se il danno interessa una sola catena, esso si manifesta come la rottura della stessa (single-strand break); se il danno coinvolge nello stesso punto o in zone limitrofe (nell'arco di 10 nucleotidi) entrambe le catene si otterrà la rottura dell'intero filamento elicoidale (double-strand break).

Le prime misure sperimentali risalgono al 1966 ad opera di McGrath e Williams (41), i quali utilizzando la sedimentazione neutra o alcalina su gradiente di saccarosio riuscirono ad evidenziare picchi di DNA a peso molecolare inferiore, rispetto al controllo, dopo trattamento radiogeno. Una decina di anni dopo questa metodica subì delle modifiche che generarono tre nuove varianti: la prima separa DNA a singola e doppia elica attraverso cromatografia su idrossiapatite (42-37); la seconda sfrutta la facilità di attraversamento di un filtro di esteri di cellulosa a porosità calibrata del DNA a basso peso molecolare (43); la terza più recente, quantizza lo svolgimento del DNA usando un colorante fluorescente (44). E' dello stesso periodo l'uso dell'analisi conformazionale della superelica del DNA nelle misure di danno radioindotto, ma solo recentemente essa è stata impiegata su linfociti umani del sangue periferico (45).

Nel nostro laboratorio, per la misura delle rotture radioindotte alla molecola del DNA è stata messa a punto ed utilizzata la metodica di lisi alcalina e cromatografia su idrossiapatite. Essa deriva dalla fusione delle metodiche di Kanter e Schwartz (42) e Rydberg (37) con l'apporto di alcune modifiche.

Nelle vicinanze delle rotture, i legami idrogeno interessanti le basi complementari non sono strettamente legati ed in questa regione il

DNA tende a perdere la sua struttura elicoidale. Recentemente è stato dimostrato che i cambiamenti della struttura secondaria del DNA radioindotti sono simili a quelli che compaiono nel DNA durante il riscaldamento al di sotto della temperatura di fusione. IL DNA in queste condizioni prende il nome di "DNA intermedio" ed è caratterizzato da cambiamenti di angolatura e di distanza tra le basi complementari, da cambiamenti di idratazione, mentre non è influenzato l'impilamento delle basi (nessun effetto ipercromico). Il trattamento di denaturazione alcalina produce svolgimenti della doppia elica che iniziano in alcuni siti definiti punti di svolgimento (p).

Nella fig. 5 è schematizzata la metodica usata per la misura dei punti di svolgimento (p) e le rotture (n): Il DNA di linfociti umani PHA stimolati è marcato con timidina tritiata, la lisi alcalina controllata denatura parzialmente la doppia elica del DNA, il trattamento con ultrasuoni dopo la neutralizzazione taglia trasversalmente il DNA portando in soluzione filamenti a singola e doppia elica a più basso peso molecolare (intorno a 10^6 dalton), infine la cromatografia su idrossiapatite è capace di selezionare eluati contenenti DNA a singola e a doppia elica.

Per la cromatografia si fa uso di idrossiapatite (BIO GEL HTP DNA grade della BIO-RAD), un fosfato di calcio in speciale forma cristallina tale da possedere delle caratteristiche adsorbenti verso le macromolecole, infatti essa viene impiegata per l'estrazione e la purificazione di proteine, enzimi, acidi nucleici, virus e altre macromolecole. L'idrossiapatite è capace di separare oligo e polinucleotidi in funzione del loro peso molecolare eseguendo eluizioni con soluzioni tampone a diversa forza ionica. E' dimostrato che occorrono soluzioni tampone ad alta forza ionica per eluire DNA ad alto peso molecolare (46). Il meccanismo che lega il DNA all'idrossiapatite è di origine elettrostatica, le cariche negative del gruppo fosfato del DNA sono neutralizzate dalle cariche positive degli ioni calcio presenti nel cristallo e l'incremento della forza ionica dell'eluente tende a diminuire questi legami fino ad ottenere il rilascio della macromolecola

Linfociti con
DNA marcato



Lisi alcalina



Neutralizzazione

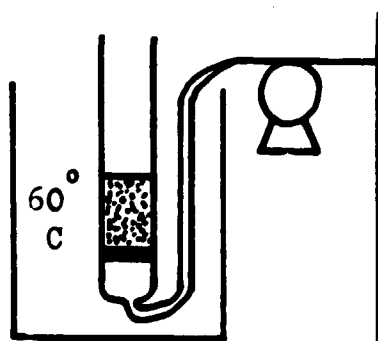


stop di svolgimento

Trattamento con ultrasuoni
(DNA p.m. $< 10^6$ dalton)



Cromatografia su idrossiapatite



0,01 M

Soluzione di lavaggio

0,125 M

Eluato con DNA a singolo
filamento

0,5 M

Eluato con DNA a doppio
filamento

Rotture (n) per unità di DNA

$$F = \frac{DS}{SS + DS}$$

$$p = \frac{\ln F(x)}{\ln F(o)}$$

$$n = p - 1$$

Fig. 5 Metodica in uso per la misura delle rotture (n) per unità di DNA

dal complesso DNA-idrossiapatite. Il rilascio, inoltre, è dovuto anche ad una specifica competizione tra gli ioni fosfato del tampone eluente con i gruppi fosforici del DNA sugli ioni calcio dell'idrossiapatite (46) mentre l'effetto allentante sulle forze attrattive DNA-idrossiapatite è sinergizzato dalla presenza di cationi Cs^+ , K^+ , Na^+ (47). I vantaggi ottenuti utilizzando questo substrato possono essere riassunti in tre punti: 1) esso è un sale inorganico cristallino insolubile con il quale è possibile lavorare in un range ampio di temperatura; 2) il fenomeno adsorbimento-eluzione è associato linearmente ad una sola proprietà del DNA, cioè al suo peso molecolare; 3) semplicità di utilizzo e ampia riproducibilità dei risultati.

Rydberg (37) descrive la relazione tra i dati sperimentali provenienti dalla cromatografia ed il tempo di lisi con la seguente equazione:

$$\ln F = \frac{-K}{Mn} t^{\beta} \quad (\text{I})$$

dove F = frazione della quantità di DNA sotto forma di doppia elica sul totale,

K = indice della velocità di svolgimento (costante legata alle unità di misura),

Mn = peso molecolare medio considerato tra due punti di svolgimento,

t = tempo di lisi alcalina,

β = indice esponenziale del fattore tempo (costante di svolgimento).

Il valore di β viene ricavato da Rydberg attraverso una elaborazione grafica della pendenza sul diagramma $\ln F/t$; mentre Kanter e coll. (42) lo ricavano attraverso calcolo dopo lisi alcalina a tempi diversi.

La nostra sperimentazione, effettuata su linfociti umani alla 46 ora dalla stimolazione con PHA, ci ha condotto ad ottimizzare le condizioni sperimentali di lisi alcalina in maniera tale da poter misurare il danno radioindotto in due intervalli di dose: il primo, fino a 5 GY, che chiameremo intervallo a basse dosi, è un intervallo compatibile con misure di

sopravvivenza; il secondo, compreso tra 5 e 20 Gy che chiameremo alte dosi, è l'intervallo in cui è meglio evidenziabile il danno molecolare. Nell'intervallo a basse dosi, le condizioni ottimali di svolgimento del DNA si sono ottenute con un trattamento alcalino forte (NaOH 0,05 N + NaCl 0,5 M); mentre per l'intervallo ad alte dosi, il trattamento alcalino è più debole (NaOH 0,05 N); entrambi i trattamenti sono condotti per 20 minuti a temperatura ambiente (20° C).

Utilizzando il calcolo di Kanter e coll. (42), la costante di svolgimento β nelle due condizioni sopra citate varia tra 0,36 e 0,38 rispettivamente, tale variazione non è significativa pertanto il fattore esponenziale del tempo in entrambi le condizioni sperimentali è da considerarsi costante (assumiamo come valore 0,37). Ponendo nella equazione (I) $M_n = 1$, cioè considerando il peso molecolare medio compreso tra due punti di svolgimento come valore unitario, la costante lineare K , che esprime la velocità del processo di denaturazione, del $\ln F$ in funzione del tempo t^β assume i seguenti valori:

$$1) \text{ lisi debole } \quad \text{----} \quad \ln 0,65 = -K \frac{1}{1} 20^{0,37} \quad K = 0,14$$

$$2) \text{ lisi forte } \quad \text{----} \quad \ln 0,53 = -K \frac{1}{1} 20^{0,37} \quad K = 0,21$$

i valori sopra citati mostrano che mentre la costante intrinseca del tempo (β) rimane pressochè costante, la velocità di svolgimento aumenta di circa due volte nel trattamento di lisi forte. Ciò significa che la carica ionica aumenta la velocità del processo di denaturazione ma non modifica le sue caratteristiche fisiche. Nella fig. 6 è descritto l'andamento dose-dipendente del valore di F ; dal diagramma risulta che, nei campioni di controllo, 20 minuti di lisi alcalina producono un decremento del rapporto F intorno al valore di 0,65 per lisi debole e 0,53 per lisi forte; mentre in condizioni di lisi neutra il rapporto F si mantiene intorno al valore 0,98 sia nel con-

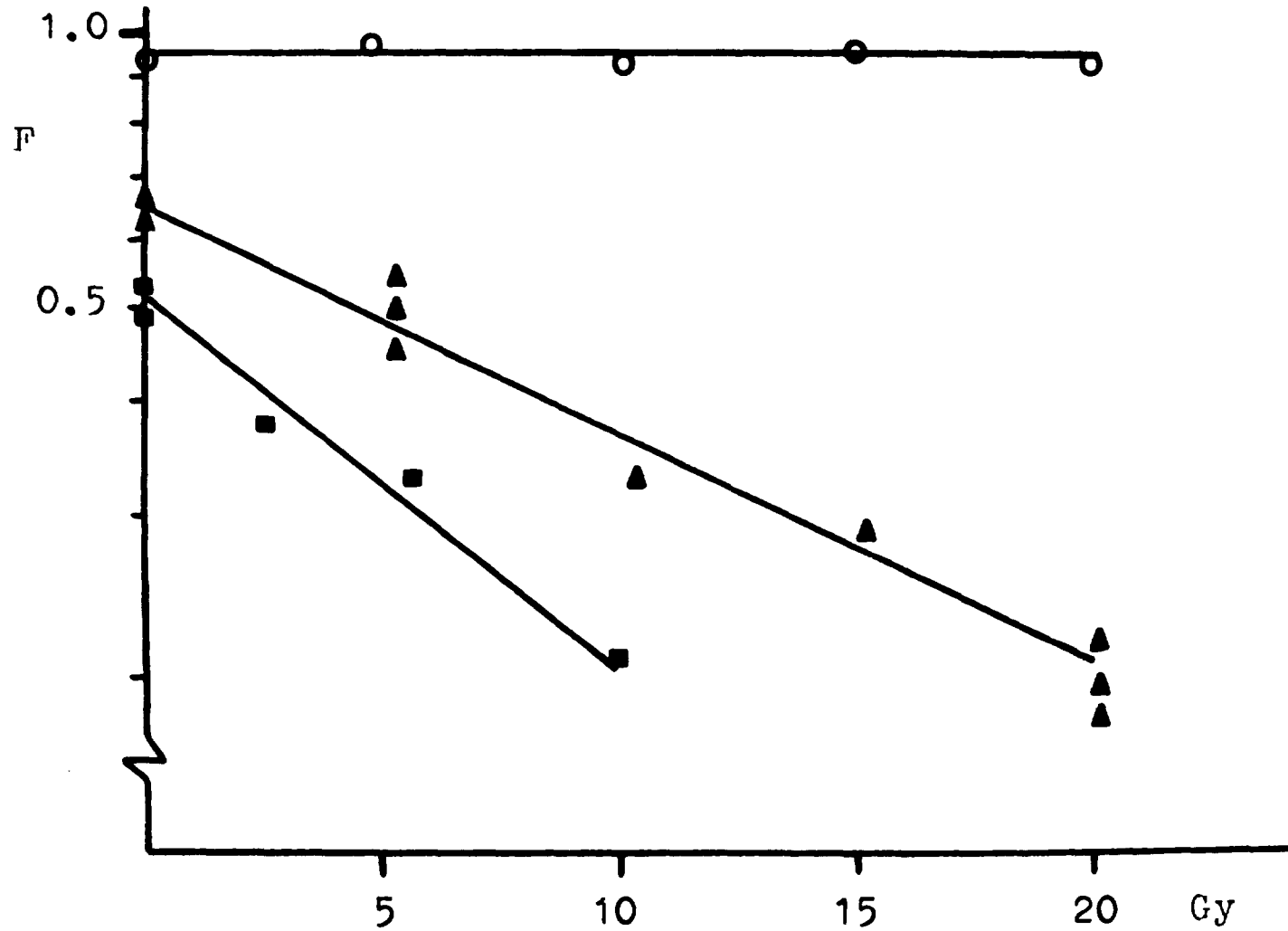


Fig. 6 Curve dose-effetto sul valore di F. Lisi neutra, ○; lisi alcalina debole (NaOH 0,05N), ▲; lisi alcalina forte (NaOH 0,05N + NaCl 0,5M), ■.

trollo che nell'irraggiato. Questi processi di denaturazione alcalina controllata conducono a valori di F intorno a 0,2 per dosi di 10 Gy utilizzando una lisi forte e per dosi di 20 Gy utilizzando una lisi debole. La differenza della pendenza delle due curve si può quantizzare da:

$$\ln F_x = \ln F_o - aD \quad (II)$$

dove F_x e F_o sono i valori di F rispettivamente dell'irraggiato e del controllo; il valore di a sarà pertanto 0,06 e 0,1 rispettivamente per una lisi debole e forte. Ciò giustifica il vantaggio di usare una lisi forte per dosi inferiori a 5 Gy.

Nella fig. 7 è descritto l'andamento delle rotture (r per unità di DNA in funzione della dose. Entrambe le condizioni di lisi mostrano lo stesso dose-effetto con andamento lineare, possiamo perciò esprimere la relazione $n = 0,15D$ valida nell'intervallo di dosi considerato. Ne deriva che per ottenere un numero di rotture equivalenti al numero dei punti di svolgimento presenti nel controllo sono necessari circa 7 Gy ($Mn = 0,5$). Kanter e coll. (42) su linee stabilizzate leucemiche di uomo e di topo trovano un rapporto n/D oscillante tra 0,54 e 0,69; Erixon e coll. (48) su colture primarie di fibroblasti umani trovano per una dose di 10 Gy di raggi gamma 3,1 rotture per ogni intervallo di 10^9 dalton, ossia un rapporto $n/D = 0,31$; Haschimoto e coll. (49) su linfociti umani del sangue circolante stimolati con PHA e non, trovano un numero di rotture per rad rispettivamente di 1,8 e 1,2 per ogni intervallo di 10^{12} dalton, esprimendo tali risultati in n/D per ogni intervallo di 10^9 dalton si otterrà un rapporto variabile tra 0,12 e 0,18. Se consideriamo che probabilmente il peso molecolare della nostra unità di DNA è intorno a 10^9 dalton, i nostri risultati sperimentali concordano con quelli di Haschimoto e coll. (49); per cui valutando il contenuto di DNA di un cromosoma umano intorno a 10^{11} dalton possiamo credere, con buona approssimazione, che in media per ogni cromosoma umano ci siano almeno centinaia

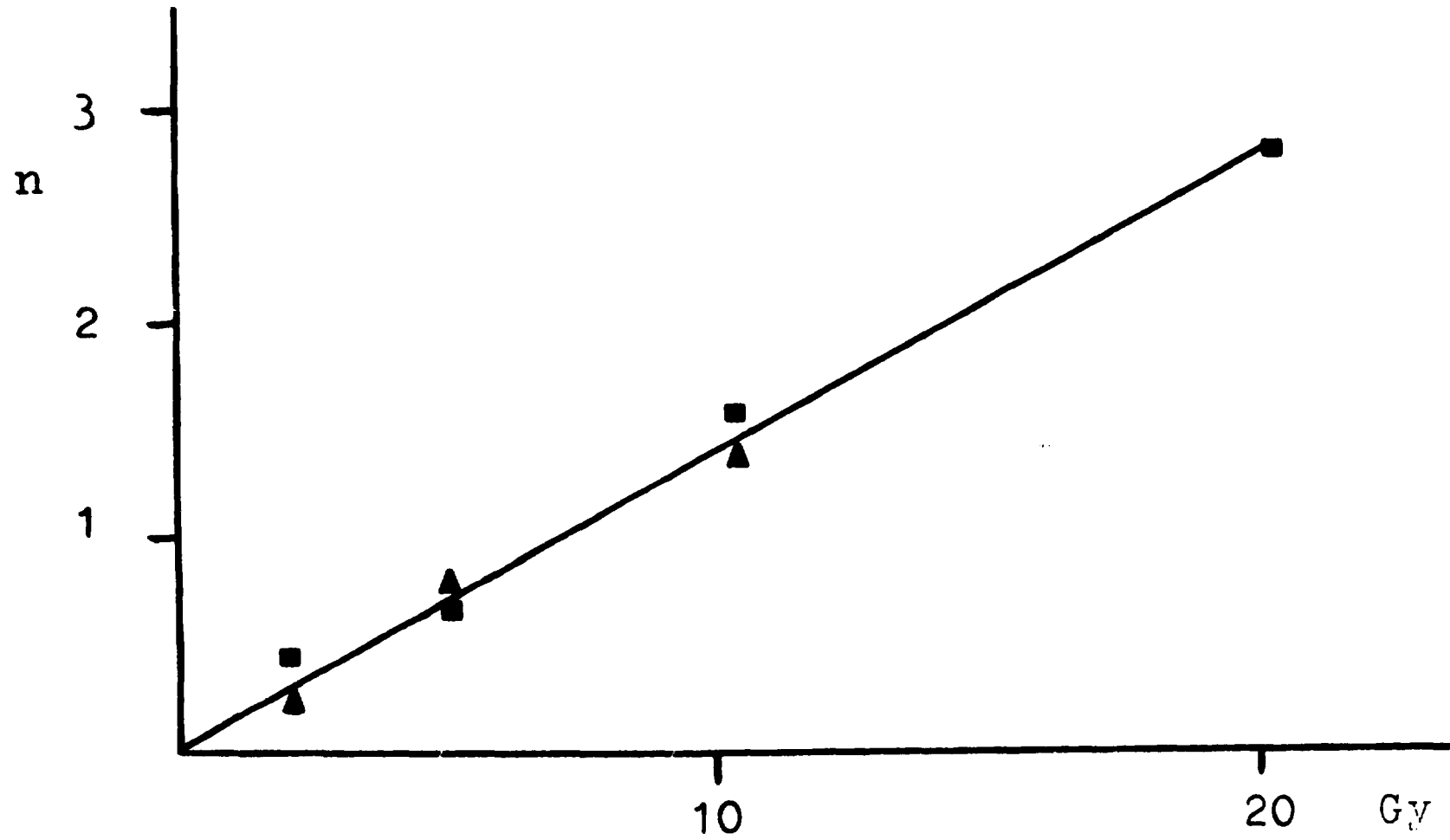


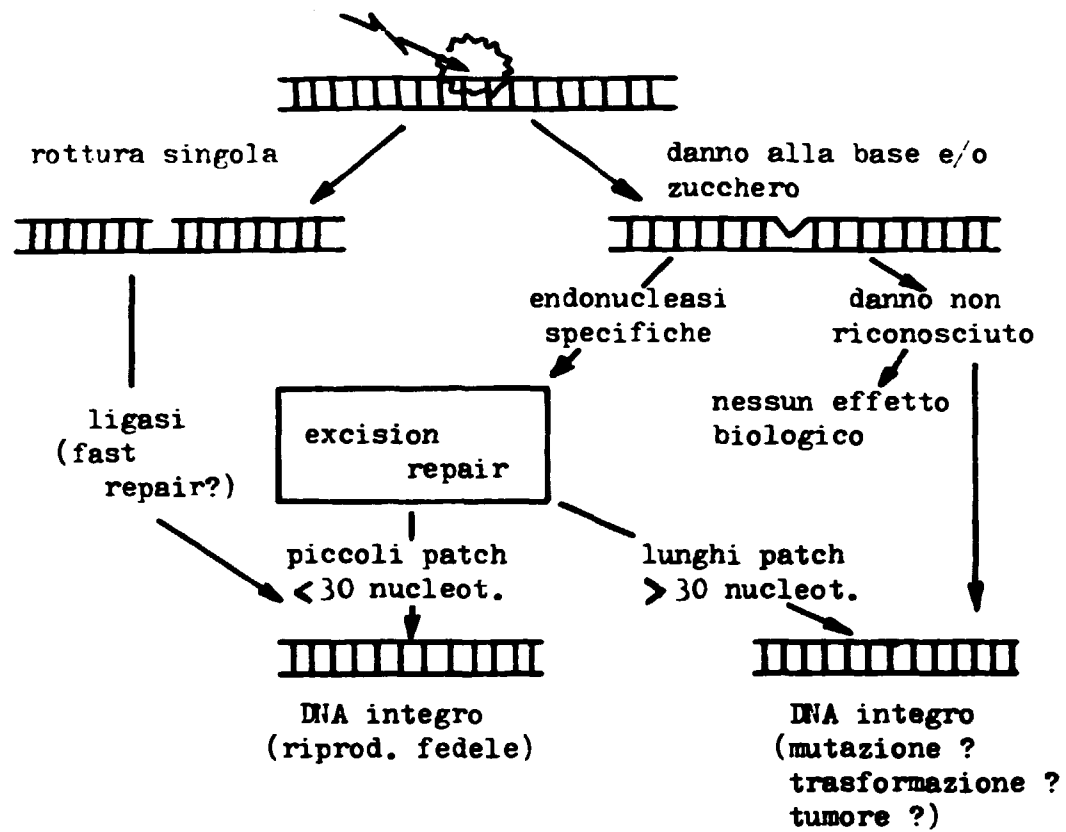
Fig. 7 Curva dose-effetto delle rotture (n) per unità di DNA. Simbologia come da fig. 6.

di punti di svolgimento. Si suppone che questi punti di svolgimento siano da attribuire a quelle zone deputate alla replicazione, in particolar modo alle forche replicative ricche di segmenti di Okazaki (50) e alla trascrizione dell'RNA (zone in cui la doppia elica è parzialmente allentata). Condizioni metaboliche cellulari in cui sono attive queste zone possono modificare l'andamento quantitativo di svolgimento del DNA dopo trattamento alcalino. Linfociti umani, alla 46 ora dalla stimolazione con PHA, possono essere considerati come una coltura a breve termine ed in condizione di parasincronia, cioè al momento dell'irraggiamento le cellule contenenti il DNA marcato si trovano prevalentemente ancora in fase S; pertanto dalle considerazioni sopra esposte si spiega il basso valore di F (0,53 e 0,65) trovato nei controlli rispetto a quello riportato dalla letteratura in colture cellulari stabilizzate ($F > 0,80$). La produzione di rotture dose-dipendenti non varia in funzione delle diverse fasi del ciclo cellulare, variano invece gli eventi biologici riparativi, in particolar modo a livello quantitativo, che avvengono facendo seguire al trattamento radiogeno un successivo periodo di incubazione in terreno di crescita.

RIPARAZIONE DEL DNA

Base fondamentale della sopravvivenza cellulare, intesa come capacità generativa di individui cellulari con continuità genetica, è la trascrizione integrale e fedele del codice genetico; benchè la molecola del DNA è eccezionalmente stabile, la replicazione è estremamente accurata, considerando però l'elevato numero di nucleotidi presenti nel DNA di una cellula di mammifero (10^{10}) è inevitabile che un numero di errori, provocati o da agenti esterni o da veri errori replicativi, possono accadere durante la replicazione. Pertanto, per spiegare la perfetta riproducibilità di questo meccanismo di trascrizione, dovremmo ipotizzare la presenza di meccanismi di controllo e di intervento tali da garantire il mantenimento della perfetta integrità

dell'informazione genetica. Il fenomeno della presenza di questi meccanismi si rende più manifestabile e pertanto più facilmente quantizzabile quando il DNA viene macroscopicamente danneggiato da agenti esterni da noi indotti. Procarioti ed eucarioti possiedono la capacità di modificare la risposta al danno da radiazioni ionizzanti; è dimostrato che delle strutture macromolecolari presenti nella cellula solo la molecola del DNA è capace di rispondere al danno radioindotto. Il processo di risposta può servirsi di molte e diverse vie metaboliche (talune chiarite altre no) che fanno parte di quel complesso di azioni riguardanti la "riparazione del DNA". Differenti sistemi enzimatici possono essere deputati ad intervenire nei vari tipi di danno radioindotti; alcuni autori preferiscono evidenziare due momenti temporali nella riparazione delle rotture del DNA: il primo una riparazione a breve termine (fast repair) poco dipendente dalle condizioni di post irraggiamento, sotto il controllo di un piccolo numero di loci genetici, in pratica espressione di poche attività enzimatiche (es. polinucleotide ligasi); il secondo una riparazione a tempi più lunghi (slow repair) sensibile alle condizioni di post irraggiamento, sotto il controllo di molti loci genetici con un coinvolgimento di una serie di attività enzimatiche (es. excision repair). La maggior parte dello studio sulla riparazione del DNA si è svolto inizialmente sia su DNA in soluzione sia su DNA allo stato "vivo" di organismi procariotici in quanto essi presentano una semplicità configurativa del DNA (assenza di proteine coniuganti) ed una disponibilità di individui mutanti a diversa radiosensibilità; solo più recentemente (negli ultimi 10-15 anni) con la scoperta di sindromi cliniche associate a difetti riparativi si è dato impulso allo studio della riparazione del DNA in cellule di mammifero. A titolo esemplificativo, per ciò che riguarda il danno da radiazioni ionizzanti esprimibile come rotture della catena del DNA vengono proposte nello schema di fig. 8 alcune di queste vie. Appare evidente come il danno alla molecola del DNA possa essere modulato dalla cellula con un risultato biologico che spazia tra la riparazione totale (DNA integro con codificazione inalterata) e la letalità cellulare,



REPLICAZIONE CON DANNO NON RIPARATO

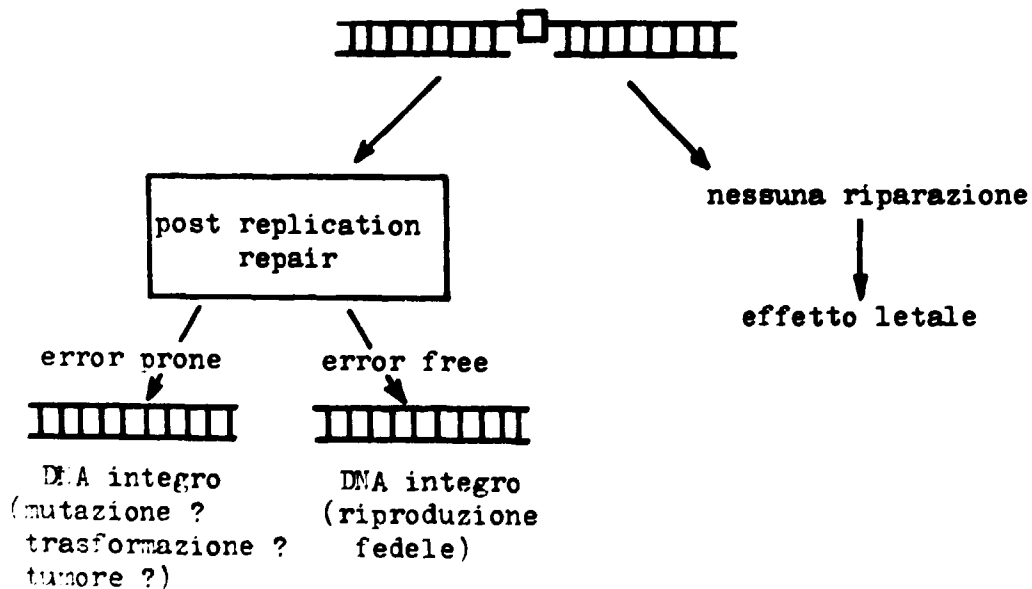


Fig. 8 Passi esemplificativi dell'evoluzione biochimica del danno radioindotto al DNA.

contemplando fasi alternative di mutazione, carcinogenesi, cambiamenti nella divisione del ciclo cellulare, perdita di funzioni specifiche, disturbi metabolici.

Il tema sviluppato in questo capitolo riguarda l'analisi dei dati sperimentali ottenuti su linfociti umani PHA stimolati provenienti da misure della riparazione del DNA dopo danno radioindotto. In linfociti umani, alla 46 ora dalla PHA stimolazione dopo una dose di 20 Gy, l'andamento della riparazione delle rotture al DNA segue una cinetica enzimatica temperatura-dipendente (51). Nella fig. 9 sono plottate le curve di riparazione effettuate a diversa temperatura, mentre nella fig. 10 sono riportati gli stessi dati plottati come reciproci. Graficamente si può calcolare il valore del tempo necessario a riparare la metà delle rotture prodotte ($t_{1/2}$), esso viene stimato in 20 min. e 3 min. rispettivamente per 25° e 37° C. Le rette attraversano l'ordinata in uno stesso punto che rappresenta il numero massimo delle rotture riparabili. Nelle nostre condizioni esso coincide con il numero delle rotture prodotte, per cui se la riparazione a 25° C in tempi lunghi (> 50 min.) non si discosta dall'andamento cinetico è ipotizzabile la completa riparazione anche a questa temperatura; una temperatura di 4° C inibisce completamente l'evento riparativo. Ormerod (52) trae alcune indicazioni relative alla riparazione delle rotture al DNA: circa una metà delle rotture sono riparate nei primi 10-20 min. fino a raggiungere il 90% entro un'ora; nell'intervallo di temperatura tra 22° e 37° C l'energia di attivazione della reazione è di 19 Kcal/mole, essa è indipendente dalla sintesi di RNA, DNA e proteica; mentre è bloccata dalla 2,4-dinitrofenolo che inibisce la fosforilazione ossidativa. Haschimoto e coll. (49) dimostrano che linfociti umani non trasformati (fase G_0) possiedono la capacità di riparare le rotture al DNA prodotte da 30 Gy di raggi gamma con una velocità di circa 10 volte inferiore rispetto a quelli trasformati; essi ottengono valori di $t_{1/2}$ rispettivamente di 7 e 70 min. per quelli trasformati e non. Lavin e coll. (53) trovano

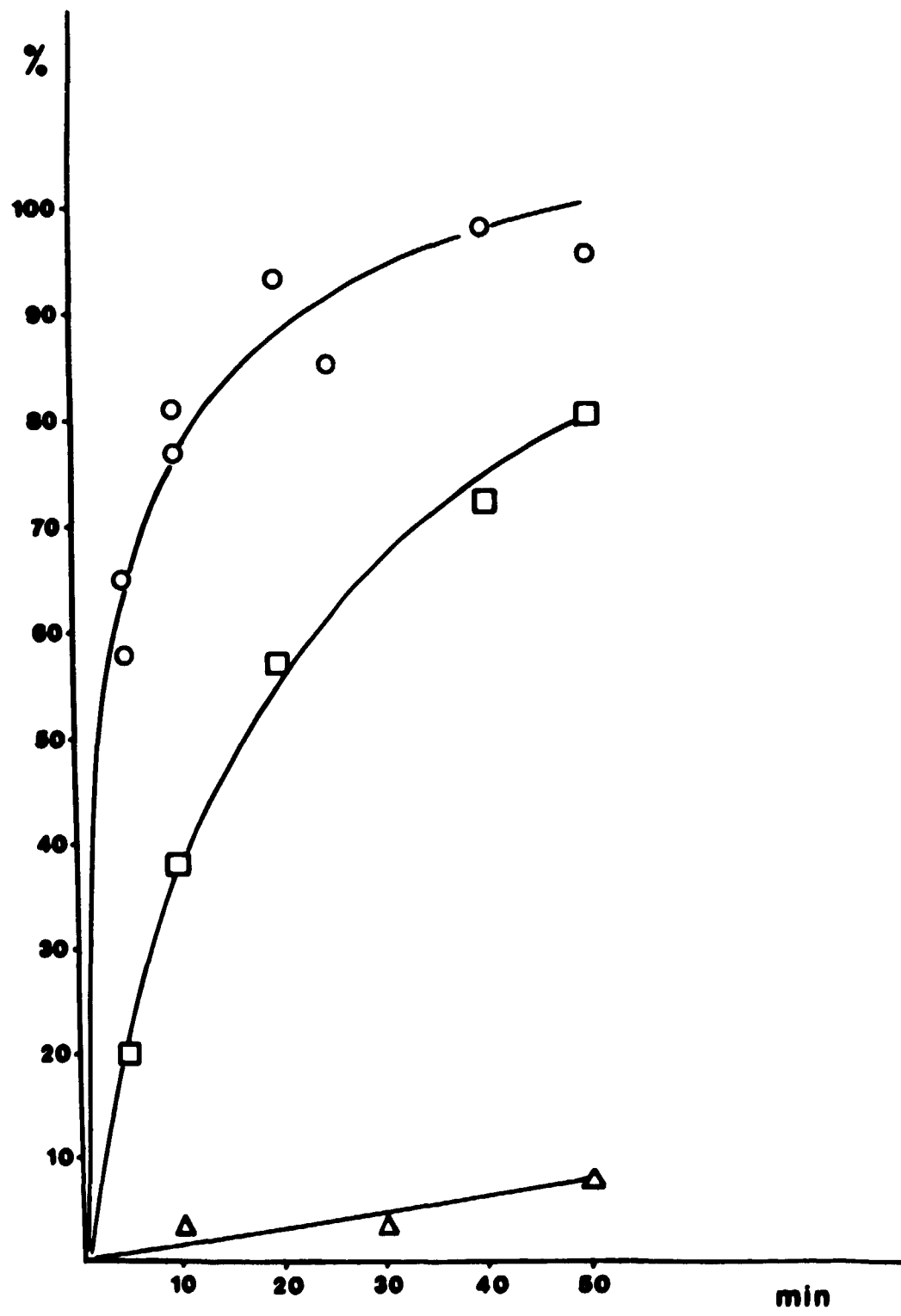


Fig. 9 Attività (%) riparativa delle rotture indotte al DNA dopo 20 Gy a diverse temperature di incubazione: ○, 37°C; □, 25°C; △, 4°C.

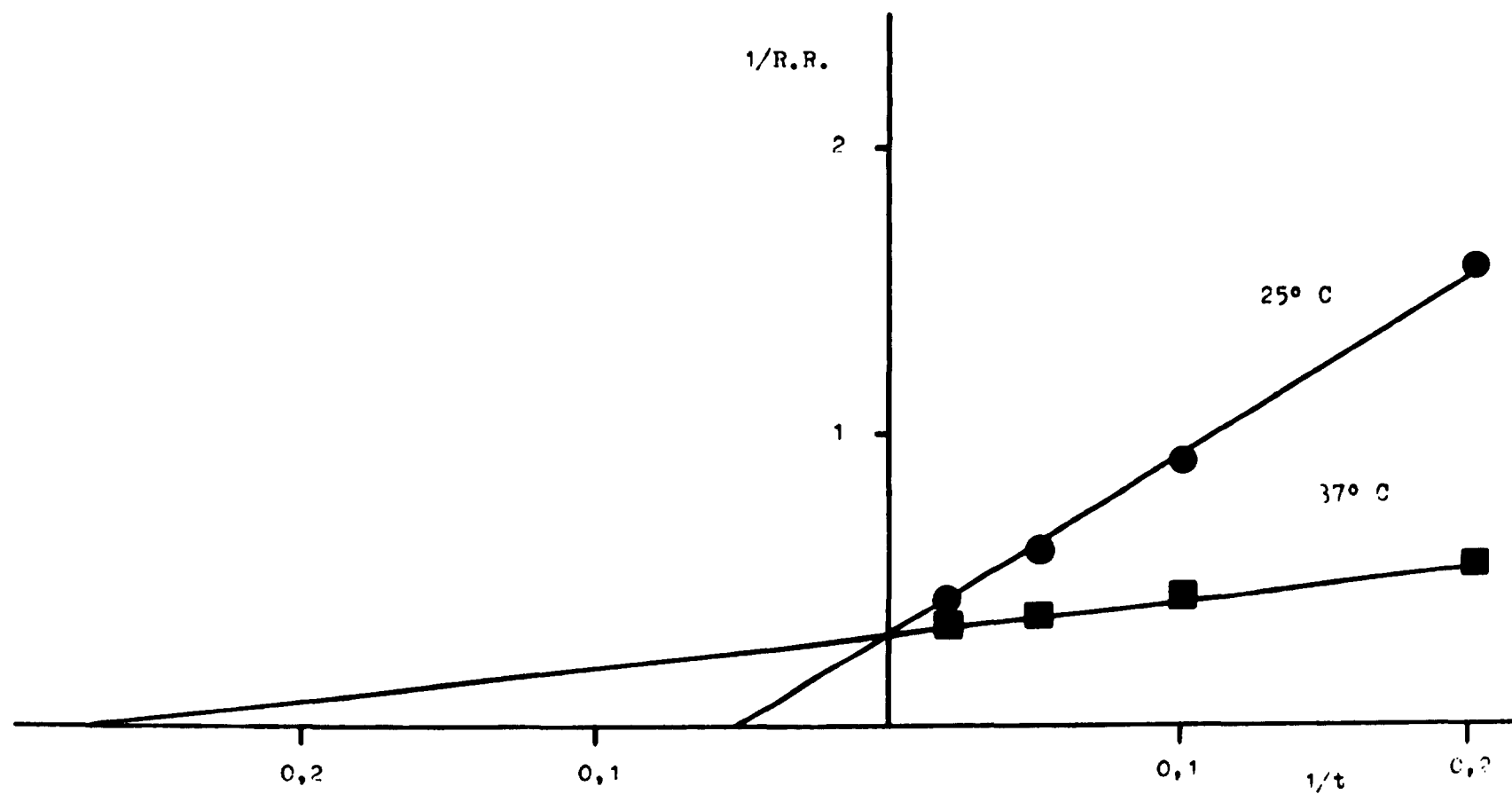


Fig. 10 Diagramma dei valori reciproci delle rotture riparate ($1/R.R.$) in funzione del reciproco del tempo ($1/t$) a 25° e 37° C.

un aumento di circa 20 volte nella capacità riparativa dopo PHA stimolazione. Anche la riparazione del danno indotto al DNA da raggi ultravioletti viene potenziata (circa 10 volte) dalla PHA stimolazione; Hamlet e coll. (54) suggeriscono che l'incremento è dovuto all'induzione di enzimi coinvolti nello stadio successivo all'incisione nucleotidica (aumento della attività polimerasica e ligasica). Ciò detto avvalorava fortemente l'ipotesi che il meccanismo riparativo, nelle sue varie forme, sia per il danno da UV che da radiazioni ionizzanti, viene potenziato quando la cellula entra in ciclo cellulare pur rimanendo indipendente dalla sintesi replicativa. Accettata l'ipotesi che cellule in fase G_0 abbiano una diminuita velocità riparativa, è interessante conoscere i valori della velocità durante le diverse fasi del ciclo cellulare. Usando linfociti umani in coltura sincronizzata abbiamo misurato la cinetica riparativa durante la fase S; i risultati sperimentali dimostrano che essa è bassa all'inizio della fase S, aumenta con il procedere della fase e raggiunge il suo valore massimo (circa 6 volte di quello iniziale) alla fine della fase S (51). Ciò comporta il dubbio di quanto sia veramente, questo tipo di riparazione (legata prevalentemente alla ligasi e all'excision repair), indipendente dalla sintesi replicativa. E' probabile che un'attività replicativa in corso (durante la fase S) sia sostenuta da una intensa attività enzimatica ed energetica, la quale può influenzare, come effetto sinergizzante, i processi riparativi.

Il processo di riparazione delle rotture al DNA è stato studiato più recentemente con l'analisi conformazionale della superelica; Klimov e coll. (45) trovano un completo rilascio dopo 8 Gy per linfociti di ratto e 7,5 Gy per linfociti umani; la successiva incubazione in terreno di coltura evidenzia tre fasi: la prima (primary restoration) della durata di 50-90 min. dove avvengono dei fenomeni di ricostituzione della superelica da associare probabilmente alla componente riparativa delle rotture indotte; la seconda (secondary restoration) dove la ricostituzione della superelica

si completa entro le prime 5-6 ore dopo il trattamento radiogeno. Gli autori sono indotti a credere che mentre le due fasi ricostitutive (I e III) sono espressione del processo riparativo, la fase di rilasciamento è correlata con l'espressione dell'attività della DNAsi. Cramp e coll. (55) evidenziano una degradazione del DNA di E. coli dopo trattamento radiogeno; per il ceppo B/s-1 la degradazione è dose-dipendente, mentre per il ceppo B/r non appare degradazione fino a 60 Gy e diviene dose-dipendente per dosi superiori; dopo un trattamento con 100 Gy, la degradazione, presente nei primi 40 min. di incubazione, è nettamente superiore per il B/s-1 che per il B/r. Kanter e coll. (56) trovano in due linee cellulari umane (CCRF-CEM e RPMI 8402) una ricomparsa del danno (secondary DNA damage) dopo una quasi totale riparazione maturata nelle prime due ore; questa ulteriore manifestazione di danno si mantiene costante fino alla 24 ora; al contrario il fenomeno non compare per la linea cellulare HeLa. Ahnstrom e coll. (57) in cellule di Hamster Chinese trovano, se pur ad alte dosi (500 Gy), durante le prime ore di incubazione dopo il trattamento radiogeno, una comparsa di siti sensibili all'attività endonucleasica che si esprimono come doppie rotture; probabilmente, data l'alta dose, il fenomeno è la manifestazione di lesioni non riparabili che coinvolgono le basi e il pentoso presenti nella molecola del DNA. Un aumento di queste rotture si manifesta dopo trattamento con β -araC (un inibitore della riparazione delle doppie rotture), ciò dimostra che vi è un equilibrio tra rotture riparate e rotture indotte dall'endonucleasi. Promwichit e coll. (58) trovano anch'essi un danno secondario, dopo un'apparente riparazione, in timociti di ratto in coltura; mentre il fenomeno non compare in cellule tumorali umane stabilizzate HT29R. La ricomparsa del danno, che comincia ad avvenire dopo la prima ora di incubazione, è proporzionale alla dose e non si modifica durante le successive 5 ore. Studi sull'aumentata attività della DNAsi dopo irraggiamento a condotto gli autori a credere che nei timociti ci sia una diminuzione della attività inibitoria della DNAsi dopo irraggiamento.

Da questa breve esposizione, si può ragionevolmente ritenere che i

fenomeni di amplificazione del danno manifestatosi durante l'incubazione, dopo una quasi completa riparazione, sono probabilmente da ricondurre ad uno stesso processo biochimico, non comune a tutte le linee cellulari, e probabilmente coadiutore della induzione della morte in interfase (nuclei picnotici).

Abbiamo iniziato recentemente lo studio di questo fenomeno sia su linfociti umani PHA stimolati sia su cellule stabilizzate V-79, affrontandolo sotto due aspetti paralleli: il primo è la misura della capacità riparativa delle rotture al DNA; il secondo, in collaborazione con la Dr. F. Pacchiarotti del Laboratorio di Tossicologia, la formazione di aberrazioni cromatidiche (gaps, frammenti, ecc.) in linfociti umani dopo poche ore dal trattamento radiogeno. La fig. 11 mostra l'andamento della riparazione, in funzione del tempo di incubazione, dopo una dose di 5 Gy sia per i linfociti che per le V-79. Linfociti umani riparano il danno iniziale con una velocità maggiore delle V-79, infatti mentre i linfociti trattati raggiungono i valori del controllo dopo 30-40 min. le V-79 sono più lente e raggiungono i valori del controllo solo dopo i 60 min. mantenendolo come tale almeno per le prime 4 ore. Per quel che riguarda il danno secondario, i linfociti mostrano una depressione dei valori in maniera diversa, sia del controllo che dell'irraggiato. Per il momento non possiamo dare nessuna spiegazione del fenomeno in quanto la sperimentazione è ancora in corso, comunque le alterazioni cromatidiche (fig. 12 e 13) trovate in linfociti, della stessa coltura utilizzata per la misura delle rotture, dopo 6 ore di incubazione, potrebbero essere correlate con l'incremento del danno secondario prodotto dalle radiazioni.

E' nostra intenzione approfondire il problema, chiarendo in tempi brevi, il legame esistente tra degradazione del DNA e formazione di alterazioni cromatidiche, in particolar modo con l'uso di inibitori specifici delle polimerasi e delle altre attività enzimatiche coinvolte nella riparazione; in tempi più lunghi, eseguendo misure di sopravvivenza cellulare

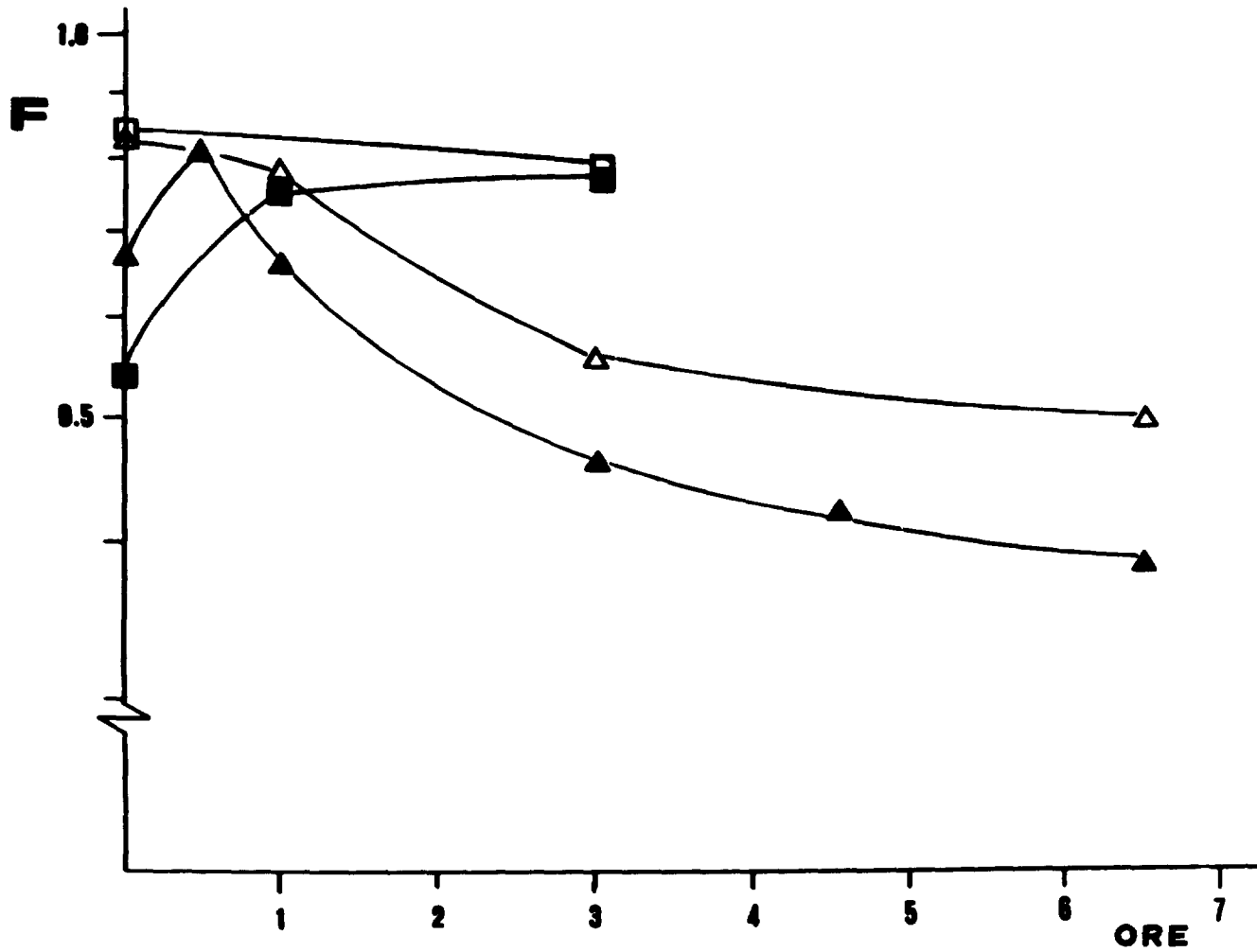


Fig. 11 Andamento del valore di F dopo incubazione a tempi lunghi. V-79: □, controllo; ■, 5 Gy. Linfociti umani PHA stimolati: △, controllo; ▲, 5 Gy.



Fig. 12 Prima metafase linfocitaria dopo PIA stimolazione di un campione non trattato.



A



B

Fig. 13 Prime metafasi linfocitarie dopo PMA stimolazione di un campione irraggiato con 5 Gy 6 ore prima della fissazione. A), evidenza di aberrazioni cromatidiche diffuse, in particolar modo "gaps". B), frammentazione multipla con quasi completa distruzione della struttura cromosomica.

di sviluppo di mutanti e/o trasformanti, determinazione di induzione o di inibizione di alcune attività enzimatiche.

DISCUSSIONE

L'analisi della capacità riparativa della cellula umana (linfocita stimolato) verso un danno alla molecola del DNA acquista un interesse bivalente:

- 1) come aspetto estrinseco, l'identificazione di agenti (chimici e fisici) capaci di interagire con la molecola del DNA di cellule umane e la valutazione del loro "effetto residuo" inteso come permanenza dello effetto indotto (incapacità riparativa);
- 2) come aspetto intrinseco, la valutazione della capacità riparativa individuale umana vista anche in relazione all'età, al sesso, al corredo genetico individuale, alle alterazioni cliniche più o meno apparenti.

Esistono alcune indicazioni (59-60) a favore dell'ipotesi che la senescenza sia correlata con la diminuzione della capacità riparativa del DNA, intesa come deterioramento dei meccanismi deputati al controllo della riproduzione fedele del codice genetico; come altresì alcune indicazioni (61-62-63-64) hanno posto in evidenza la possibilità, con interventi esterni, di modificare la capacità riparativa cellulare. Se tutto ciò venisse ampiamente dimostrato, si può ipotizzare la fattibilità di intervenire positivamente sulla durata della vita e forse anche sull'annullamento di alcune forme patologiche legate prettamente all'inefficienza riparativa del DNA. Riteniamo che l'indagine sulla valutazione della capacità riparativa del DNA in linfociti umani PHA stimolati, in particolar modo in colture sincronizzate, possa essere di valido aiuto nella comprensione dei fenomeni biologici implicati negli aspetti sopra descritti; inoltre l'utilizzo della nostra metodica semplifica tale indagine in quanto la sperimentazione

è relativamente semplice, valida e riproducibile; condizioni essenziali per la formulazione di un test da proporre anche ai laboratori di analisi cliniche.

Gli effetti prodotti da un trattamento ipertermico sono stati studiati anche in termine di riparazione del DNA. Gli autori traggono alcune considerazioni sul fenomeno: l'ipertermia produce un'inibizione del processo di ricongiunzione della catena del DNA (rejoining process) dopo un danno radioindotto (65); è suggerita una correlazione, dopo un trattamento ipertermico, tra gli effetti sulla sopravvivenza cellulare e l'effetto sulla cinetica riparativa delle rotture radioindotte al DNA (66); individui sottoposti a "sauna" (60°-100°C per 10-20min.) con un aumento di temperatura corporea che raggiunge i 38,6°C, hanno i loro linfociti del sangue circolante con un'attività riparativa modificata che si esprime come una diversa cinetica riparativa, per quel che riguarda la riparazione fuori dalla sintesi replicativa (unscheduled DNA synthesis), e come un ampio decremento del processo di ricongiunzione (rejoining process)(67). Sarebbe interessante poter approfondire il tema, applicando la nostra metodica allo studio della sopravvivenza (sia di cellule normali che neoplastiche) dopo trattamento combinato tra ipertermia e agente induttore di un danno al DNA.

Poichè la condizione neoplastica è un'espressione fenotipica del genoma, esistono molte indicazioni favorevoli l'ipotesi che lo stato neoplastico sia il risultato di un'alterazione del genoma. Si va sempre più convalidando l'ipotesi che il processo di carcinogenesi sia legato ad una mutazione del DNA. Tale convincimento è tratto dalle seguenti osservazioni: 1) natura clonale del tumore, 2) proprietà mutagena della maggior parte dei carcinogeni, 3) esistenza di una correlazione tra danno al DNA in vitro, mutazione in vitro e trasformazione neoplastica in vivo. Se consideriamo, inoltre, la forte correlazione tra l'alta frequenza mutazionale di fibroblasti umani, portatori di alcune carenze enzimatiche della riparazione del DNA, con l'ampia disponibilità di queste cellule alla trasformazione neopla-

stica, possiamo credere che i processi riparativi del DNA giocano un ruolo importante nella carcinogenesi. Pertanto, è nostra convinzione che, l'uso della metodica sopra descritta può essere valido per caratterizzare la capacità riparativa del DNA di cellule tumorali o di cloni cellulari sospetti di alta trasformazione neoplastica. L'evidenziazione di vie metaboliche preferenziali, legate ai processi riparativi del DNA, caratteristiche della cellula tumorale, potrebbe suggerirci la possibilità di intervenire sulla sopravvivenza cellulare; pertanto l'utilizzo della nostra metodica e l'uso di inibitori selettivi per i processi riparativi ci consentono di poter affrontare il problema nel tentativo di valutare, in cellule tumorali, la relazione esistente tra riparazione del DNA e sopravvivenza cellulare.

A conclusione di questa breve panoramica, che investe problemi di notevole interesse applicativo, riteniamo che al momento attuale esistono nel nostro laboratorio le competenze scientifiche e le strutture operanti, anche se vi è una notevole carenza di operatori, capaci di affrontare alcuni aspetti che coinvolgono lo studio della riparazione del DNA.

METODICHE E TECNICHE

COLTURA CELLULARE

Linfociti umani del sangue periferico, prelevato dalla piega del gomito di individui sani, sono purificati dalle altre cellule del sangue attraverso centrifugazione su gradiente. Il sangue eparinizzato (150 USP/ml) diluito 1:1 con soluzione di Hanks è stratificato su un battente di linfoprep (Nyegard), centrifugato per 40 min. a 400 g; le cellule linfocitarie, con una purezza superiore al 90% compariranno come un anello opalescente sul gradiente mentre i globuli rossi e le altre cellule bianche sedimentano sul fondo. Il prelievo dello strato linfocitario è eseguito con l'aiuto di un dispositivo (fig. 14) che consta di un supporto metallico con azione di supporto per una pipetta a palloncino (circa 30 ml) collegata ad una siringa di plastica capace di produrre una aspirazione e di una lampada orientabile capace di illuminare lo strato da prelevare.

I linfociti così separati sono lavati due volte con soluzione di Hanks, si elimina così ogni inquinamento di linfoprep e la maggior parte delle piastrine, e posti in terreno di coltura RPMI 1640 (Dutch modification della Flow) contenente 20% di siero fetale di vitello (Flow), 2 mMol di l-glutamina e antibiotici (penicillina-streptomina = 100 UI-100 µg./ml). Nelle nostre condizioni sperimentali, in incubatore a CO₂ (5%) e a 37°C, una stimolazione ottimale con fitoemoagglutinina (PHA) si ottiene con una concentrazione cellulare intorno a 10⁶ lin./ml ed una concentrazione del mitogeno pari a 1 µg./ml. Per ottenere una coltura linfocitaria sincronizzata si sfrutta la condizione di parasincronia caratteristica della coltura a brevi tempi dalla stimolazione. Come agente bloccante la fase di sintesi del DNA è utilizzata l'idrossiurea (HU) in ragione di 5 x 10⁻³ M. Essa posta alla 21 ora dalla stimolazione crea un blocco sul processo di avanzamento della coltura, eliminata dopo 24 ore (45 ore dalla stimolazione) la crescita

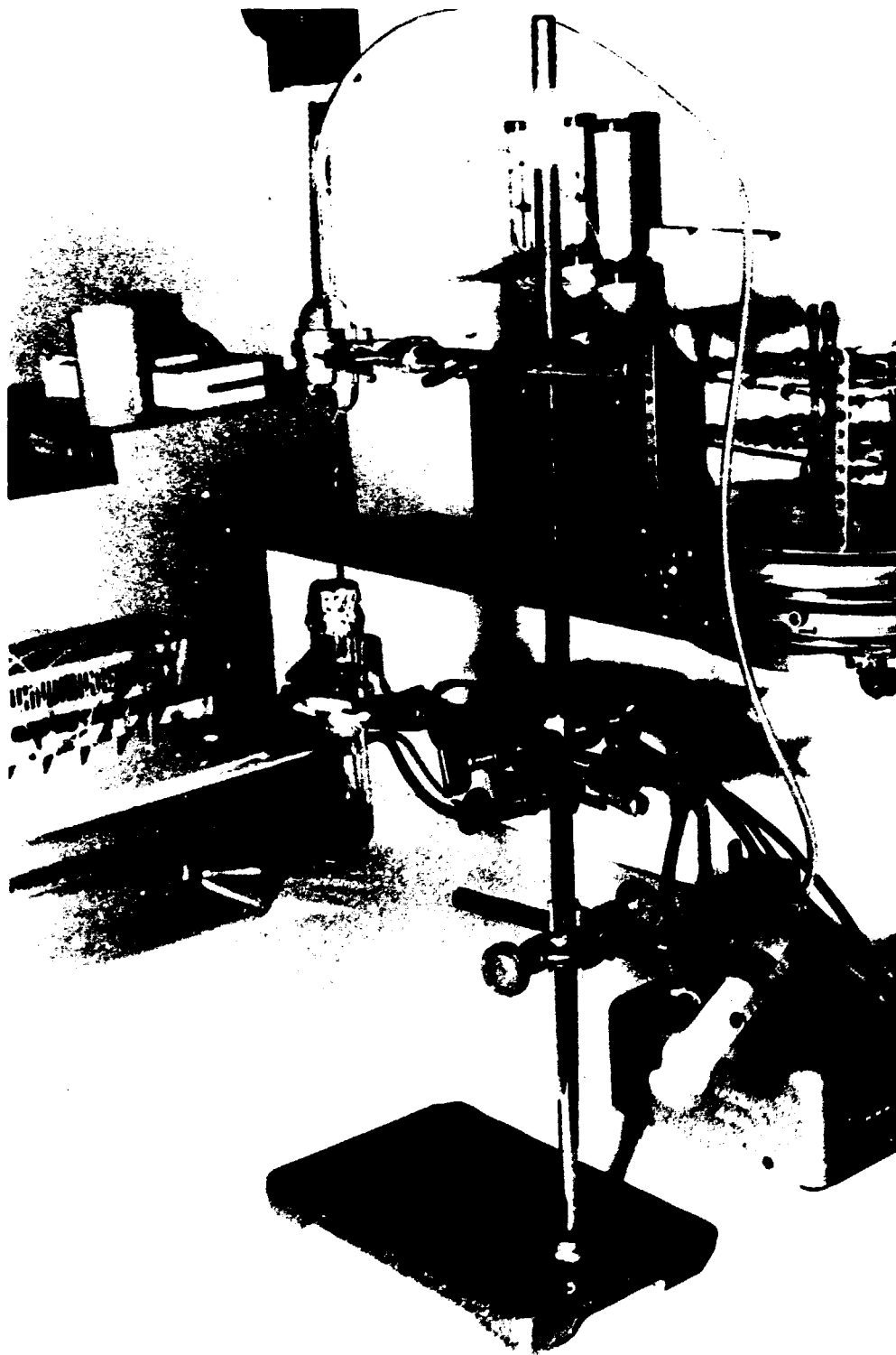


Fig. 14 Sistema di estrazione del battente linfocitario dopo separazione su gradiente.

cellulare riprende in modo sincrono (oltre il 70% delle cellule blastizzate) con l'inizio della fase S (51).

MARCATURA DEL DNA

Il procedere della blastizzazione, con l'ingresso dei linfociti in ciclo cellulare, viene seguito attraverso pulse continui o discontinui di precursori necessari alla sintesi del RNA e/o DNA. I precursori marcati con tritio (H^3) o carbonio (C^{14}) sono: uridina per la sintesi del RNA e timidina per la sintesi del DNA; i precursori con tritio hanno un'attività specifica di 25 Ci/mMol, mentre i precursori con carbonio hanno un'attività specifica di 56 mCi/mMol. Per pulse continui si usa un'attività di 1 μ Ci/ml mentre per pulse discontinui (da 15 a 30 min.) l'attività ottimale è 6 μ Ci/ml. Per la misura delle rotture del DNA in cellule in crescita esponenziale, la marcatura del DNA è eseguita dalla 28 ora fino alla 45 ora dalla PHA stimolazione con 1 μ Ci/ml di timidina tritiata. Terminato tale periodo viene eliminato il sopranatante, le cellule sono lavate due volte con soluzione di Hanks, risospese in terreno privo di precursore radioattivo ed incubate a 37°C per un'ora (chaise). Per la misura delle rotture del DNA in cellule in crescita sincrona, il DNA è marcato per 1 ora con 1 μ Ci/ml di timidina tritiata immediatamente prima del trattamento radiogeno.

IRRAGGIAMENTO

Alla sospensione cellulare è tolto il terreno di coltura, le cellule sono risospese in un tampone fosfato 0,01 M a pH 7,2 (PBSL) alla concentrazione di 2×10^5 lin./ml, poste in capsule di petri (60 mm di diametro) inserite in contenitori di alluminio chiusi a prova di luce e mantenuti a 4°C. Per l'irraggiamento è utilizzato un generatore STABILIPAN della SIEMENS set-

tato a 250 Kv, 15mA; nell'analisi delle rotture al DNA si utilizza un filtro di 0,2 mm di rame con un dose-rate di 4 Gy/min mentre per le misure di trasporto si utilizza un filtro di 4 mm di alluminio con un dose-rate di 10 Gy/min.

MISURA DELLA ATTIVITA' FUNZIONALE DELLA MEMBRANA CELLULARE

La misura dell'attività funzionale della membrana cellulare, intesa come capacità di trasporto della timidina è eseguita con pulse discontinui della durata di 30 min. Per saggiare l'andamento del trasporto sia nel controllo che nell'irraggiato in un range di concentrazione del precursore da $2,6 \times 10^{-7}$ M a $4,1 \times 10^{-6}$ M si è dovuto ricorrere ad una miscela di timidina tritiata e non (fredda) con titolo opportuno. Per le misure della radioattività incorporata nella cellula (timidina trasportata) la sospensione cellulare (1 ml) subito dopo il pulse, è trasferita su filtro millipore da 0,8 μ m. Il filtro e le cellule trattenute sono lavati rapidamente con quattro passaggi consecutivi di 5 ml di acqua distillata, il tutto è posto in vial da scintillazione con 10 ml di Filter-Count (Packard) e contato in uno spettrofotometro a scintillazione liquida TRI-CARB 460 CD (Packard). Le conte per minuto (cpm) sono trasformate in disintegrazioni per minuto (dpm) attraverso un programma di calcolo impostato sul rapporto tra i canali.

MISURA DEL DANNO E DELLA RIPARAZIONE

Nella sperimentazione si utilizzano due bagni maria, uno a 37°C e l'altro a 4°C. Il disegno di fig. 15 mostra lo schema della distribuzione delle soluzioni necessarie all'esperienza. A 37°C sono poste due beute, della capacità doppia del loro contenuto, in cui è posto il terreno completo di coltura: nella beuta I e II le quantità di terreno è 8 ml per

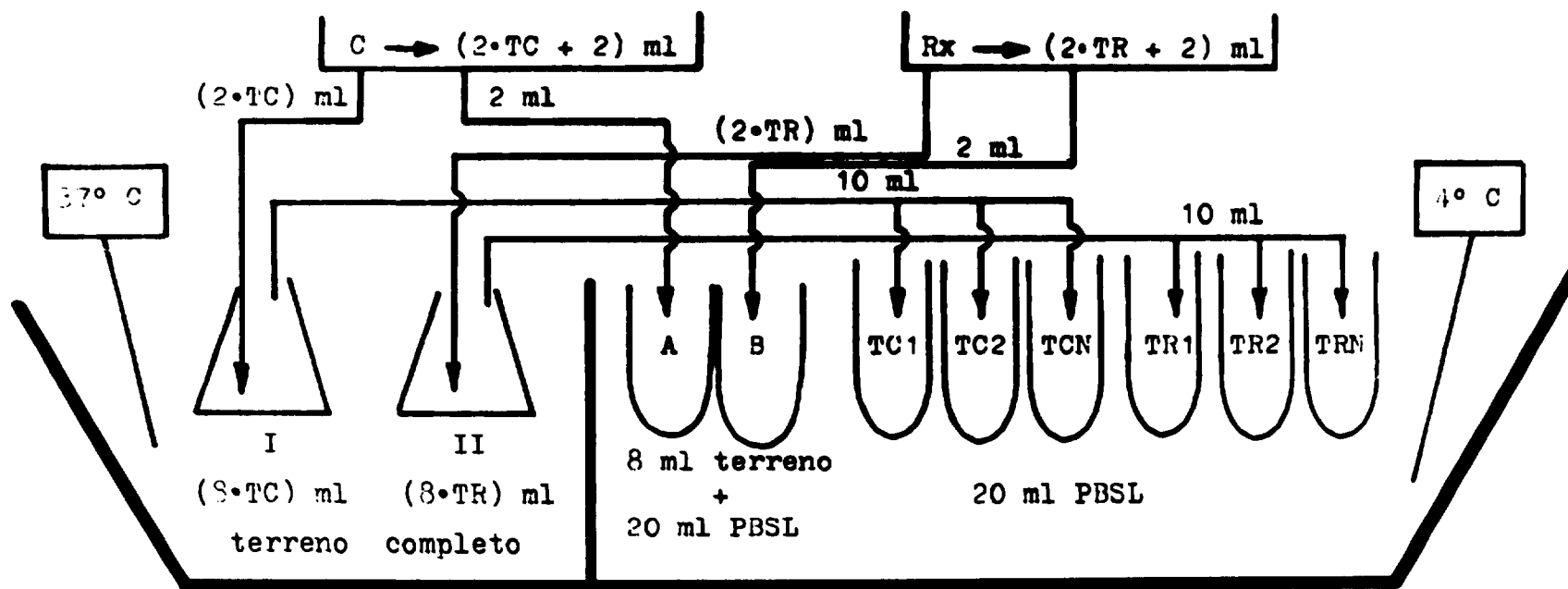


Fig. 15 Schema metodologico usato dopo il trattamento radiogeno.

sequenza dei passi	azione	ripar. (min.)	oggetto	deduzione
1	2 ml C → A	—	controllo] misura del danno
2	2 ml Rx → B	—	trattato	
3	(2·TC) ml → I	0	incubazione DNA cont.] — —
4	(2·TR) ml → II	0	incubazione DNA trat.	
5	10 ml I → TC1	T1	DNA cont. a T1] andamento post-incu- bazione DNA del controllo
6	10 ml I → TC2	T2	" " " T2	
*	10 ml I → TCN	TN	" " " TN	
10	10 ml II → TR1	T1	DNA trat. a T1] andamento post-incu- bazione DNA del trattato
11	10 ml II → TR2	T2	" " " T2	
*	10 ml II → TRN	TN	" " " TN	

Fig. 16 Sequenza dei passi in riferimento alla fig. 15.

ogni punto TC e TR rispettivamente. A 4°C sono posti una serie di provettoni da centrifuga così distribuiti: A e B contengono 8 ml di terreno completo e 20 ml di PBSL; i provettoni siglati con TC e TR contengono 20 ml di PBSL. Appena le temperature dei bagni ed il loro contenuto sono a regime viene iniziato il trattamento delle sospensioni cellulari (controllo e trattato). La sequenza temporale dei passi che vengono eseguiti è tabulata nella fig. 16. Le prime due azioni riguardano il prelievo di 2 ml dal controllo e dal trattato ed immessi rispettivamente nei due provettoni A e B, dopo centrifugazione a 2000 rpm per 10 min. le cellule vengono risospese in 2 ml di PBSL per essere trattate successivamente con lisi alcalina. I dati provenienti da questi due campioni ci forniranno la misura del danno indotto. La terza azione riguarda il prelievo di 2 ml della sospensione di controllo per ogni punto TC (2 x TC). Il prelievo è posto nella beuta I dove, a vari tempi, vengono effettuati prelievi di 10 ml (azione 5,6, ecc.) ed inoculati nei provettoni TC1, TC2, ...TCN; dopo centrifugazione, come sopra, le cellule vengono risospese in 2 ml di PBSL per essere trattate successivamente con lisi alcalina. I dati provenienti da questi campionamenti ci forniranno l'andamento del controllo durante l'incubazione. La quarta azione è simile alla terza solo che riguarda la sospensione cellulare trattata, i prelievi di 10 ml (azione 10,11, ecc.) saranno inoculati nei provettoni TR1, TR2, ...TRN; dopo centrifugazione le cellule trattate seguiranno lo stesso destino di quelle del controllo. I dati provenienti da questo campionamento ci forniranno l'andamento del processo riparativo.

LISI ALCALINA E CROMATOGRAFIA

Il trattamento di lisi alcalina è eseguito in vial di vetro a temperatura ambiente; 1 ml di sospensione cellulare (controllo e trattato) è aggiunto ad 1 ml di soluzione lisante. Nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo ottenuto i migliori risultati misurando il danno prodotto con

dosi inferiori a 5 Gy con un trattamento alcalino "forte" (NaOH 0,05 M + NaCl 0,5 M), mentre per dosi comprese tra 5 e 20 Gy con un trattamento alcalino "debole" (NaOH 0,05 M). La lisi procede per 20 min. al buio e protetta da eventuali vibrazioni meccaniche. La lisi viene arrestata con una soluzione di HCl leggermente tamponato, il lisato è sottoposto immediatamente ad un trattamento con ultrasuoni per 15 sec. (Branson Sonifier W-140 con microtip), viene aggiunto SDS alla concentrazione finale del 0,25%. Un'aliquota del lisato (0,4 ml) è usata per misurare la radioattività totale del lisato; il rimanente (3,6 ml) è sottoposto alla cromatografia su idrossiapatite (HY).

La cromatografia si effettua su speciali colonnine di vetro con sifone incorporato (gentilmente costruite dal nostro laboratorio di soffieria della Casaccia) del diametro di 13 mm aventi un setto poroso di vetro (G2) che sorregge un letto di 0,4 gr. di idrossiapatite (DNA Grade BIO-GEL HTP della BIO-RAD). Nella fig. 17 è mostrata la foto del complesso utilizzato per la cromatografia, le colonne sono immerse in un bagno maria a 60°C e collegate attraverso un sistema a sifone con una pompa peristaltica a 20 canali (mod. 1512/20 della Carlo Erba) avente una portata di 0,45 ml/min.; i tubi di uscita sono inseriti in un supporto che permette di trasferire contemporaneamente gli eluati in 20 vial di vetro. Al lisato cellulare (3,6 ml) è aggiunto 0,4 ml di formamide ed il tutto è trasferito in colonna. Il lisato cellulare e l'idrossiapatite vengono miscelati delicatamente, con l'aiuto di una pipetta pasteur, ciò permette di ripristinare il letto, si attende 10 min. in maniera che la temperatura del lisato raggiunga i 60°; si estrae il primo eluato che viene eliminato, si lava il letto con 3 ml di tampone fosfato 0,01 M. Le frazioni di DNA a singola elica (SS) e a doppia elica (DS) sono estratte con due lavaggi consecutivi di 3 ml cadauno di tampone fosfato rispettivamente 0,125 e 0,5 M. Tutti i tamponi contengono il 20% di formamide ed hanno un pH 6,8. Agli eluati è aggiunto Pico-Fluor 30 e la misura della loro radioattività è effettuata con uno spettrofotometro a scintillazione liquida TRI-CARB 460 CD.

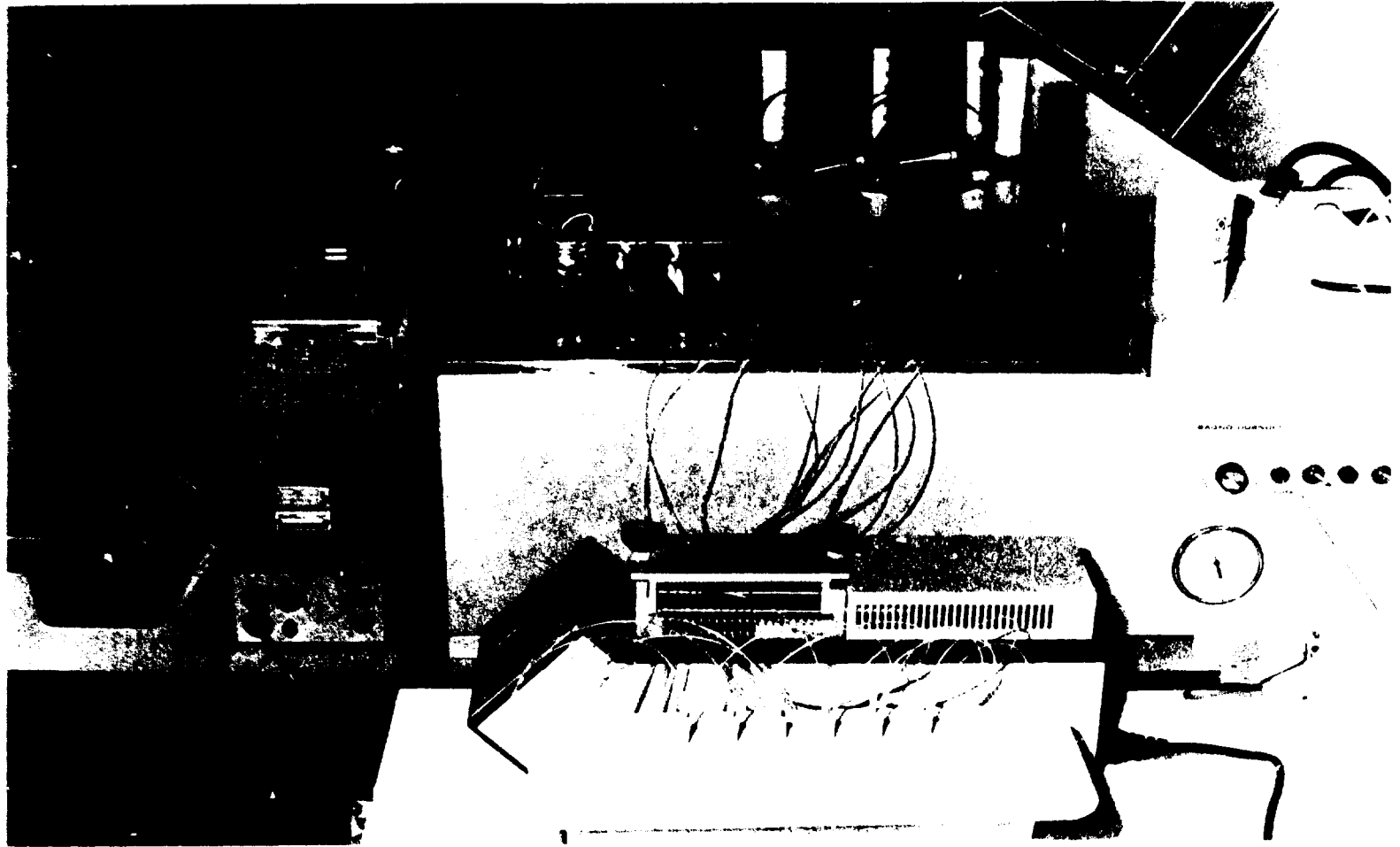


Fig. 17 Complesso strumentale per la cromatografia su colonne.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hedges M.J. and Hornsey S. The effect of X-rays and neutrons on lymphocyte death and transformation. *Int. J. Radiat. Biol.* 33, n. 3, 291-300; 1978.
- 2) Kwan D.K. and Norman A. Radiosensitivity of human lymphocytes and thymocytes. *Radiat. Res.* 69, 143-151; 1977.
- 3) Scaife J.F. Nuclear pyknosis and the development of radiation damage in peripheral lymphocytes. *EUR* 3939e; 1968.
- 4) Schrek R. and Stefani S. Radioresistance of phytohaemagglutinin treated normal and leukemic lymphocytes. *J.N.C.I.* 32, n. 2, 507-517; 1964.
- 5) Conard R.A. Quantitative study of radiation effects in phytohaemagglutinin stimulated leukocyte cultures. *Int. J. Radiat. Biol.* 16, n. 2, 157-165; 1969.
- 6) Sato C. Change in the type of radiation cell-killing on human lymphocytes after blast formation by phytohaemagglutinin. *Int. J. Radiat. Biol.* 18, n. 5, 483-485; 1970.
- 7) Sato C. and Sakka M. Radiation effects on human lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Tohoku J. Exp. Med.* 100, 375-381; 1970.
- 8) Durum S.K. and Gengozian N. The comparative radiosensitivity of T and B lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 34, n. 1, 1-15; 1978.
- 9) Prosser J.S. Survival of human T and B lymphocytes after X-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 30, n. 5, 459-465; 1976.
- 10) Szczylik C. and Wiktor-Jedrzejczak W. The effects of X-irradiation in vitro on subpopulations of human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 39, n. 3, 253-263; 1981.
- 11) Thomson A.E.R., Vaughan-Smith S., Peel W.E. A mathematical model resolving normal human blood lymphocyte population X-ray survival curves into six components: radiosensitivity, death rate, and size of two responding subpopulations. *Int. J. Radiat. Biol.* 41, n. 1, 15-32; 1982.
- 12) Rickinson A.B. and Ilbery P.L.T. The effect of radiation upon lymphocyte response to PHA. *Cell Tissue Kinet.* 4, 549-562; 1971.

- 13) Roberts W., Kartha M. and Sagone A.L. Effect of irradiation on the hexose monophosphate shunt pathway of human lymphocytes. *Radiat. Res.* 79, 601-610; 1979.
- 14) Agarwal S.S., Katz E.J., Krishan A., Loeb L.A. A replication in X irradiated human lymphocytes. *Cancer Research* 41, 3973-3978; 1981.
- 15) Sato C., Kojima K., Matsuzawa T. Change in the electrophoretic behaviour of X-irradiated lymphocytes by phytohaemagglutinin. *Int. J. Radiat. Biol.* 20, n.1, 97-99; 1971.
- 16) Sato C. and Kojima K. Phytohaemagglutinin induced change in the distribution of acid sugars in surface membrane of lymphoid cells and blocking of the radiation effect. *Experimental Cell Research* 98, 90-94; 1976.
- 17) Scholes G., Ward J.F., Weiss J. Mechanism of the radiation induced degradation of nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 2, 379-391; 1960.
- 18) Keck K. Bildung von cyclonucleotiden bei bestrahlung wässriger lösungen von purinnucleotiden. *Z. Naturforsch* 23b, 1034-1043; 1968.
- 19) Anderson C., Hart E.J. Molecular product and free radical yields in the decomposition of water by protons, deuterons and helium ions. *Radiat. Research* 14, 689-704; 1961.
- 20) Schachinger L. Von, Eindl B. Strahlenwirkung auf NAD I/ adenin und adenin derivative. *Atomkernenergie* 24, 43; 1974.
- 21) Hems G. Chemical effects of ionizing radiation of deoxyribonucleic acid in dilute aqueous solution. *Nature* 186, 710-712; 1960.
- 22) Krushinskaya N.P., Shal'nov M.I. Nature of breaks in the DNA chain upon irradiation of aqueous solutions. *Radiobiology* 7, 36-45; 1967.
- 23) Kapp D.S., Smith K.C. Chemical nature of chain breaks produced in DNA by X-irradiation in vitro. *Radiat. Research* 42, 34-49; 1970.
- 24) Ullrich M., Hagen U. Base liberation and concomitant reaction in irradiated DNA solutions. *Int. J. Radiat. Biol.* 19, 509-517; 1971.
- 25) Ward J.F. Mechanism of radiation induced strand break formation in DNA. *Israel J. Chem.* 10, 1123-1138; 1972.

- 26) Mattoni A., Catena C. Trasporto mediato e diffusione semplice della timidina (d-Td) in linfociti umani PHA stimolati. Atti Convegno Soc. Ital. Biof. Biol. Mol. Cortona 11-14 ottobre 1983, p.78.
- 27) Catena C., Mattoni A. Effetto dei raggi X sul trasporto intracellulare della timidina in linfociti umani PHA stimolati. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. (in stampa).
- 28) Kwok C.S., Chapman I.V. The effects of X-radiation on thymidine transport kinetics and DNA synthesis in Ehrlich ascite tumour cells in relation to extracellular thymidine concentration. Int. J. Rad. Biol. 32, 409-429; 1977.
- 29) Sato C. and Kojima K. Changes in electrophoretic mobility of cultured cells after X-irradiation and their modification by SH-blocking agents and hemagglutinin. Radiat. Res. 60, 506-515; 1974.
- 30) Baisch M. Effects of X-rays on cell membranes. Rad. and Environm. Biophys. 15, 221-228; 1978.
- 31) Sontag W. A comparative kinetic study on the conversion of fluoresceindiacetate to fluorescein in living cells and in vitro. Rad. and Environm. Biophys. 14, 1-12; 1977.
- 32) Baisch M. and Bluhm M. Effects of X-rays on cell membranes. Rad. and Environm. Biophys. 15, 213-219; 1978.
- 33) Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3, 208-218; 1961.
- 34) Ageno M., Dore E., Frontali C. The alkaline denaturation of DNA. Biophysical J. 9, n.11, 1281-1311; 1969.
- 35) Davison P.F. The rate of strand separation in alkali-treated DNA. J. Mol. Biol. 22, 97-108; 1966.
- 36) Ahnstrom G. and Erixon K. Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells - Strand separation in alkaline solution. Int. J. Radiat. Biol. 23, n.3, 285-289; 1973.
- 37) Rydberg B. The rate of strand separation in alkali of DNA of irradiated mammalian cells. Radiat. Res. 61, 274-287; 1973.
- 38) Sedgwick S.G. and Bridges B.A. Survival, mutation and capacity to repair single strand DNA breaks after gamma irradiation in different Exr^r strains of E. coli. Molec. Gen. Genet. 119, 93-102; 1972.

- 39) Elkind M.M. Sedimentation of DNA released from chinese hamster cells. *Biophysical J.* 11, 502-520; 1971.
- 40) Bradley M.O., Erickson L.C., Kohn K.W. Non-enzymatic DNA strand breaks induced in mammalian cells by fluorescent light. *B.B.A.* 520, 11-20; 1978.
- 41) McGrath R.A. and Williams R.W. *Nature* 212, 534; 1966.
- 42) Kanter P.M. and Schwartz M.S. A hydroxylapatite batch assay for quantitation of cellular DNA damage. *Analytical Biochemistry* 97, 77-84; 1979.
- 43) Erickson L.C., Osieka R., Sharkey N.A., Kohn K.W. Measurement of DNA damage in unlabeled mammalian cells analyzed by alkaline elution and a fluorimetric DNA assay. *Analytical Biochemistry* 106, 169-174; 1980.
- 44) Birnboim H.C. and Jevcak J.J. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res.* 41, 1889-1892; 1981.
- 45) Klimov N.A., Vashchenko V.I., Kolyubaeva S.N., Komar V.E. Changes in the supercoiled structure of nuclear DNA in rat and human peripheral blood lymphocytes after gamma irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 41, n.2, 221-225; 1982.
- 46) Bernardi G. Chromatography of nucleic acids on hydroxyapatite. *Nature* 206, 779-783; 1965.
- 47) Martinson H.G. The nucleic acid-hydroxylapatite interaction. *Biochemistry* 12, n.1, 139-150; 1973.
- 48) Erixon K. and Ahnstrom G. Single-strand breaks in DNA during repair of UV induced damage in normal human and Xeroderma Pigmentosum cells as determined by alkaline DNA unwinding and hydroxylapatite chromatography. *Mutation Research* 59, 257-271; 1979.
- 49) Hashimoto Y., Ono T., Okada S. Radiosensitivities of DNA molecules in lymphocytes from the circulating blood of man. *Blood* 45, n.4, 503; 1975.
- 50) Rydberg B. Dna unwinding in alkali applied to the study of DNA replication in mammalian cells. *FEBS Lett.* 54, n.2, 196; 1975.

- 51) Catena C., Mattoni A. DNA strand break rejoining in human lymphocytes during S phase. *Int. J. Radiat. Biol.* (sottomesso).
- 52) Ormerod M.G. Radiation-induced strand breaks in the DNA of mammalian cells. *Biology of Radiation Carcinogenesis* ed. by Yuhas J.M., Tennant R.W. and Regan J.D. Raven Press., New York 1976, p.67.
- 53) Lavin M.F., Kidson C. Repair of ionizing radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Nucleic Acids Research* 4, n.11, 4015-4022; 1977.
- 54) Hamlet S.M., Lavin M.F. and Jennings P.A. Increased rate of repair of ultraviolet-induced DNA strand breaks in mitogen stimulated lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 41, n.5, 483-491; 1982.
- 55) Cramp W.A., George A.M., Ahnstrom G. Post-irradiation degradation and strand breaks in DNA; the sequence of events in *E. coli*. *Int. J. Radiat. Biol.* 36, n.5, 531-535; 1979.
- 56) Kanter P.M., Schwartz H.S. Post-repair DNA damage in X-irradiated cultured human tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 38, n.5, 483-493; 1980.
- 57) Ahnstrom G., Bryant P.E. DNA double-strand breaks generated by the repair of X-ray damage in Chinese Hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 41, n.6, 671-676; 1982.
- 58) Promwichit P., Sturrock M.G. and Chapman I.V. Depressed DNaseI inhibitor activity and delayed DNA damage in X-irradiated thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 42, n.5, 565-571; 1982.
- 59) Hart R.W. and Setlow R.B. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, n.6, 2169-2173; 1974.
- 60) Hart R.W., D'Ambrosio S.M., Kwokei J.N.G., Modak S.P. Longevity, stability and DNA repair. *Mechanisms of Ageing and Development* 9, 203-223; 1979.
- 61) Berger N.A. and Sikorski G.W. Nicotinamide stimulates repair of DNA damage in human lymphocytes. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 95, n.1, 67-72; 1980.
- 62) Tuschl H., Altmann H., Kovac R., Topaloglou A., Egg D., Gunther R. Effects of low-dose radiation on repair processes in human lymphocytes. *Rad. Res.* 81, 1-9; 1980.

- 63) Bohr V., Klenow H. 3-Aminobenzamide stimulates unscheduled DNA synthesis and rejoining of strand breaks in human lymphocytes. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* 102, n.4, 1254-1261; 1981.
- 64) Kol R. and Ben-Hur E. Nicotinamide protects human lymphocytes from radiation inhibition of mitogenic stimulation. *Proc. VII Int. Congress of Radiation Research* 3-8 july, Amsterdam, 1983.
- 65) Mills M.D. and Meyn R.E. Effects of hyperthermia on repair of radiation induced DNA strand breaks. *Rad. Res.* 87, 314-328; 1981.
- 66) Jorritsma J.B.M. and Konings A.W.T. Inhibition of repair of radiation induced strand breaks by hyperthermia, and its relationship to cell survival after hyperthermia alone. *Int. J. Radiat. Biol.* 43, n.5, 505-516; 1983.
- 67) Tuschl H., Altmann H., Topaloglou A., Kovac R., Sooki-Toth A., Teren J., Gunther R., Egg D. Hyperthermic treatment in the finnish bath and its effect on DNA metabolism. *J. of Mol. Med.* 4, 307-315; 1981.