

WOLNO ROSNĄCE KLONY KOMÓREK BIAŁACZKI L5178Y I ZAGADKA WEWNĄTRZKLONALNEJ ODNOWY POPROMIENNEJ

Irena Szumiel

Wstęp

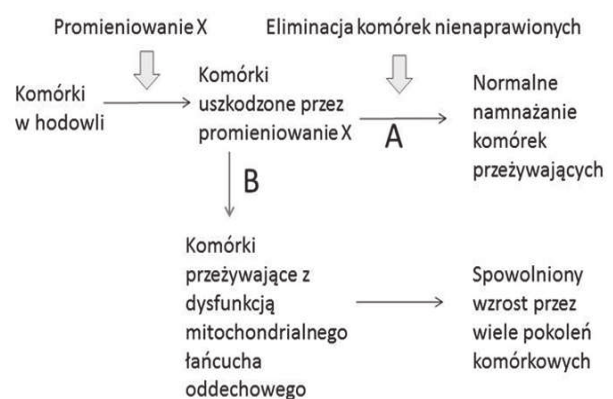
W 1994 r. ukazała się praca [1] podsumowująca wieloletnie badania wykonane w Zakładzie Radiobiologii i Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych. Były to badania nad dziedzicznymi uszkodzeniami popromiennymi komórek mysiej białaczki L5178Y-S (LY-S), zarówno publikowane [2-3], jak niepublikowane. Miarą opisywanych uszkodzeń było upośledzenie wzrostu: komórki kontrolne podwajały swoją liczbę co 11-12 godzin, natomiast w hodowlach komórkowych po ekspozycji na promieniowanie X (0,25-6 Gy) obserwowano wydłużony czas podwajania i obniżoną wydajność klonowania. Zmiany te utrzymywały się przez długi czas, zaś po klonowaniu w miękkim agarze widoczne były liczne klony o średnicy mniejszej niż w przypadku klonowania komórek kontrolnych. Podobne skutki opisywano w różnych liniach komórek ssaków [4-9] i przyjął się termin klony wolno rosnące lub „wolne klony” (ang. *slow clones*).

W odróżnieniu od prac innych autorów, w badaniach wolno rosnących klonów LY-S izolowano je i śledzono ich wzrost w hodowlach zawieszonych przez wiele pokoleń komórkowych. Otrzymano także 2 pokolenia klonów potomnych, z których wybierano klony o najwyższym czasie podwajania do ponownego rozklonowania i obserwacji wzrostu. Okazało się, że można w ten sposób otrzymać klony rosnące coraz wolniej, o coraz niższej wydajności klonowania i obniżonej żywotności, zatem mamy do czynienia z cechami dziedzicznymi. Zaskakująca była jeszcze inna właściwość: po przeniesieniu do hodowli zawieszonych, po wielu pokoleniach komórkowych obserwowano w hodowlach wolno rosnących powrót do kontrolnej szybkości wzrostu i żywotności.

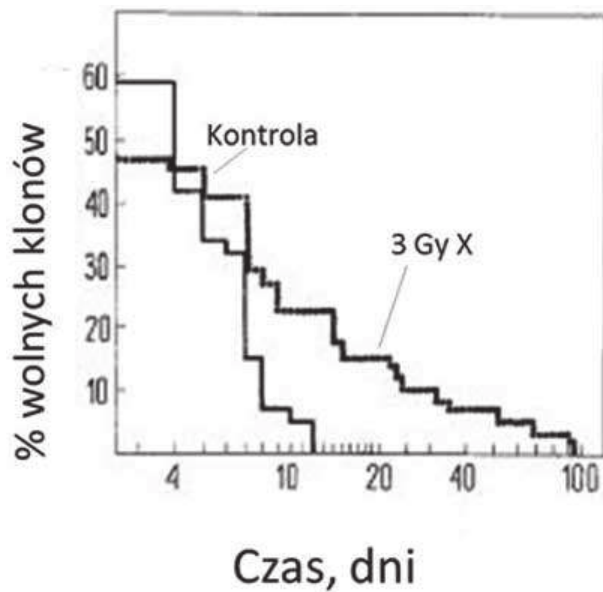
Hodowle kontrolne (tj. nienapromienione) także zawierały klony, które po przeniesieniu do hodowli zawieszonych miały przez krótki czas podwyższony czas podwajania, jednak szybko następował powrót do właściwego linii LY-S czasowi podwajania (10-12h). Znacznie powolniejszy był taki powrót w klonach

otrzymanych z hodowli po napromienieniu dawką 3 Gy promieniowania X, pozostawiającą przy życiu 0,06 % komórek. Różnicę między tymi grupami klonów ilustruje rys. 1.

Obserwacja odnowy popromiennej w wiele pokoleń komórkowych po ekspozycji na promieniowanie X była w niezgodzie z przyjętymi teoriami dziedziczenia uszkodzeń popromiennych. Przyjmowano, że otrzymane w wyniku klonowania „makrokolonie” (widoczne okiem nieuzbrojonym) zawierają komórki, które są potomstwem komórki napromienionej. Skoro taka komórka i otrzymane z niej komórki potomne były zdolne do wielu podziałów, oznaczało to brak popromiennych uszkodzeń DNA lub ich skuteczną naprawę. Można też było uznać, że błędna naprawa jakiegось odcinka DNA nieistotnego dla funkcjonowania komórki nie odbija się na zdolności do podziałów mitotycznych. Z obserwacji linii komórek chomika chińskiego [10] wynikało, że obecność uszkodzeń nienaprawionych powoduje śmierć po 2-5 podziałach. Pozostające przy życiu komórki i ich komórki potomne nie tworzą makrokolonii w standardowym dla danej linii komórkowej czasie (rys. 1, droga A).



Rys. 1. Losy komórek przeżywających ekspozycję na promieniowanie X: eliminacja komórek uszkodzonych śmiertelnie (A), spowolnione namnożenie się komórek niestabilnych genetycznie, w stresie oksydacyjnym, z obniżoną żywotnością (B)



Rys. 2. Powrót do kontrolnego czasu podwajania (TD) wolno rosnących klonów izolowanych z hodowli kontrolnych i po ekspozycji na 3 Gy promieniowania X. Wyniki obserwacji wzrostu 41 klonów kontrolnych i 59 klonów izolowanych z hodowli komórek napromienionych. Czas podwajania oznaczano co ok. 48 godzin od dnia osiągnięcia gęstości hodowli wynoszącej 100 komórek/mm³. Klony z TD 9-2 godzin określano jako normalne, z TD >12 godzin, jako wolno rosnące. Rysunek według pracy z *Radiat. Environ. Biophys.* 33, 125-139 (1994), zmodyfikowany

Taki przebieg zdarzeń był spodziewany biorąc pod uwagę uszkodzenia DNA, ich ekspresję na poziomie chromosomów i korelację tych efektów z przeżywalnością. Taki też pogląd przyjął się w radiobiologii na wiele lat. Natomiast wolno rosnące klony LY-S odznaczały się niższym czasem podwajania i po standardowym czasie 10 dni tworzyły makrokolonie zróżnicowanych rozmiarów z większą proporcją małych klonów niż komórki kontrolne; były także zdolne do wzrostu w hodowli zawieszinowej. Tym niemniej, ich powolny wzrost świadczył o odziedziczonych, niezdefiniowanych defektach (rys. 1, droga B). Jak już wspomniano – po dłuższym czasie komórki potomne „wolnych klonów” zaczynały się dzielić równie szybko jak kontrolne. Następową zatem odnowa wewnątrzklonalna.

CHRONICZNY STRES OKSYDACYJNY, ZMIANY EPIGENETYCZNE I EFEKTY NIECELOWANE

Mniej więcej dwadzieścia lat temu zainteresowanie powolnym wzrostem „wolnych klonów” stopniowo wygasło, ponieważ badania skupiły się na innych cechach komórek przeżywających. Cechy te pojawiały się po napromienieniu w późniejszych pokoleniach komórkowych, a rozpatrywane były w kategoriach zjawisk „non-targeted” – niecelowanych (niekierowanych), takich jak efekt sąsiedztwa (efekt widza) [11-14] i niestabilność genetyczna [16]. Wiele wskazywało na epigenetyczny charakter szeregu zmian indukowanych przez promieniowanie jonizujące

[17, 18]. Oznacza to zmiany w ekspresji genów niezależne od ich sekwencji nukleotydowej, zazwyczaj polegające na uniemożliwieniu transkrypcji w wyniku deacetylacji histonów lub metylacji DNA.

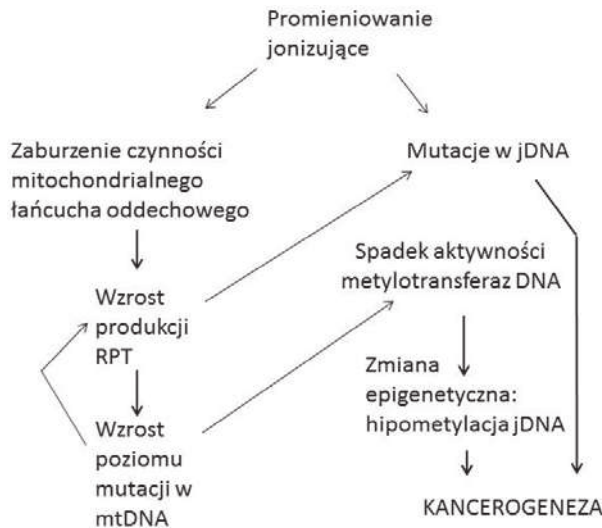
Okazało się, że powolnemu wzrostowi „wolnych klonów” towarzyszy chroniczny stres oksydacyjny oraz niestabilność genetyczna [19-23]. Za chroniczny stres oksydacyjny odpowiada zaburzenie funkcji mitochondriów, w wyniku czego generowane są nadmierne ilości reaktywnych pochodnych tlenu (RPT) [24-27]. Spodziewano się, że wysoki poziom RPT odpowiada za powtarzające się w kolejnych pokoleniach komórkowych uszkodzenia widoczne na poziomie chromosomowym, cechujące niestabilność genetyczną. Nie stwierdzono jednak zwiększenia uszkodzeń oksydacyjnych zasad ani pęknięć jednoniciowych DNA. Na tej podstawie sformulowano wniosek, że - aby zadawałająco wyjaśnić naturę niestabilności genetycznej - należy uwzględnić rolę innych niż jądrowa tarcz promieniowania jonizującego oraz zajście zmian epigenetycznych [28, 29].

ZMIANY EPIGENETYCZNE W GENOMIE JĄDROWYM A FUNKCJA MITOCHONDRIOW

W ostatnich latach ukazało się szereg prac wskazujących na związek między dysfunkcją mitochondriów a niestabilnością genetyczną i zmianami w metylacji DNA jądrowego [30-37]. Stres oksydacyjny powoduje podniesienie poziomu mutacji w genomie mitochondrialnym (mtDNA): mtDNA nie jest osłonięty białkami histonowymi i styka się z błoną mitochondrialną, narażony jest zatem silnie na uszkodzenia wywołane przez RPT, które generowane są w bezpośrednim sąsiedztwie. Ponieważ mtDNA koduje niektóre składniki łańcucha oddechowego, mutacje w mtDNA prowadzą do nieprawidłowego funkcjonowania mitochondriów i dalszego zwiększenia stresu oksydacyjnego. Okazało się, że istnieje związek między mutacjami mtDNA i metylacją jądrowego DNA [32-34, 38, 39].

Odpowiadające za to mechanizmy molekularne nie zostały jeszcze poznane. Za istotną rolę metylacji DNA w niestabilności genetycznej przemawia jednak praca Rugo i wsp. [40]: na modelu mysich zarodkowych komórek macierzystych wykazano, że metylotransferaza DNA jest niezbędna do indukcji niestabilności genetycznej za pośrednictwem efektu widza wywołanego promieniowaniem jonizującym. Rys. 3 przedstawia hipotetyczne (bo jeszcze niewyjaśnione i niepotwierdzone doświadczalnie we wszystkich szczegółach) powiązania prowadzące od indukowanego przez promieniowanie uszkodzenia mitochondrialnego łańcucha przenoszenia elektronów do zmian epigenetycznych i do kancerogenezy popromiennej.

Opublikowany ostatnio przegląd [41] wykazuje przekonująco, że charakterystyczną cechą nowotworów jest zaburzenie epigenetyki prowadzące do heterogenności



Rys. 3. Hipotetyczne powiązania między indukowanym przez promieniowanie uszkodzeniem mitochondrialnego łańcucha przenoszenia elektronów (łańcucha oddechowego) a zmianami epigenetycznymi

komórek w obrębie guza i ułatwiają selekcję komórek najlepiej przystosowanych do warunków otoczenia. Wiadomo także o roli mitochondriów i stresu oksydacyjnego w procesie kancerogenezy [42, 43]. Można przypuszczać, że identyczne procesy zachodzą w hodowlach komórek pochodzących z „wolnych klonów”. Założenie to wyjaśnia skąd się brała heterogenność klonów wolno rosnących, które pochodziły od pojedynczych komórek, a zatem powinny mieć identyczny genom, wskazuje też, w jaki sposób w klonach LY-5 zachodziła odnowa wewnątrzklonalna, której mechanizm pozostał w publikacji [3] z 1994 r. niewyjaśniony.

ODNOWA WEWNĄTRZKLONALNA: CZY TO WYNIK SELEKCJI W KOMÓRKOWYCH POPULACJACH MITOCHONDRIALNYCH ?

Komórkowa populacja mitochondriów jest heterogenna, zwłaszcza w warunkach stresu oksydacyjnego. W dodatku, w czasie długotrwałej hodowli podziały mitotyczne dają początek komórkom o identycznym genomie jądrowym, lecz podział mitochondriów między komórki potomne jest przypadkowy i może być nierównomierny. Stwarza to możliwość zróżnicowania populacji pod względem nasilenia stresu oksydacyjnego i zmian epigenetycznych. Po dziesiątkach lub setkach podziałów dochodzi do selekcji komórek z przewagą mitochondriów „dobrej jakości” i korzystnymi dla wzrostu zmianami epigenetycznymi. Można przypuszczać, że na tym polegała opisana w komórkach LY-5 odnowa wewnątrzklonalna. W okresie popularności badań klonów wolno rosnących problem ten nie został rozwiązany, zaś w latach następnych uwaga radiobiologów skupiła się na innych zagadnieniach. Zmieniły się także kryteria oceny uszkodzeń popromiennych, dzięki

szybkemu rozwojowi odpowiednich technik doświadczalnych oparte raczej na wskaźnikach molekularnych niż komórkowych. Należy dodać, że badania wolno rosnących klonów dostarczyły jednego z najwcześniejszych opisów niecelowanych efektów promieniowania jonizującego, zanim jeszcze termin ten powstał.

Odnowa wewnątrzklonalna wydaje się w tej chwili mało znaczącym epizodem w historii badań radiobiologicznych. Zasługuje jednak na uwagę, ponieważ nie można wykluczyć jej działania *in vivo*. Zrozumienie jej uwarunkowań może mieć znaczenie zarówno dla zapobiegania odrostowi guza po radioterapii, jak i dla zmniejszenia ryzyka kancerogenezy popromiennej.

prof.dr hab. Irena Szumiel,

Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej,
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,
Warszawa

Literatura

- [1] J. Z. Beer, I. Szumiel. Slow clones, reduced clonogenicity, and intraclonal recovery in X-irradiated L5178Y-S cell cultures, *Radiat. Environ. Biophys.* 33 (1994) 125-139.
- [2] J. Z. Beer, B. Ziemia-Zak, O. Rosiek, J. Sablinski, I. Szumiel, M. Kopeć. Regeneration of proliferative activity in the progeny of murine lymphoma cells L5178Y irradiated with X-rays, *Bull. Acad. Pol. Sci. Biol.* 18 (1970) 581-584.
- [3] J. Z. Beer, I. Szumiel. Heritable cell cycle disturbances and late recovery in x-irradiated murine lymphoma L5178Y-S cell populations in vitro, *Adv. Exp. Med. Biol.* 53 (1975) 497-509.
- [4] K. R. Trott, O. Hug. Intraclonal recovery of division probability in pedigrees of single x-irradiated mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 17 (1970) 483-486.
- [5] L. Gorgojo, J. B. Little. Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 55 (1989) 619-630.
- [6] W. P. Chang, J. B. Little. Delayed reproductive death in X-irradiated Chinese hamster ovary cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 60 (1991) 483-496.
- [7] W. P. Chang, J. B. Little. Delayed reproductive death as a dominant phenotype in cell clones surviving X-irradiation, *Carcinogenesis* 13 (1992) 923-928.
- [8] M. Fitzek, K. R. Trott. Clonal heterogeneity in delayed decrease of plating efficiency of irradiated HeLa cells, *Radiat. Environ. Biophys.* 32 (1993) 33-39.
- [9] D. C. Brown, K. R. Trott. Clonal heterogeneity in the progeny of HeLa cells which survive X-irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.* 66(1994) 151-155.
- [10] M. M. Elkind, A. Han, K.V. Volz. Radiation response of mammalian cells grown in culture IV. Dose dependence of division delay and post-irradiation growth of surviving and non-surviving Chinese hamster cells, *J. Nat. Cancer Inst.* 30 (1963) 705-721.
- [11] W. F. Morgan, A. Hartmann, C. L. Limoli, S. Nagar, B. Ponnaiya. Bystander effects in radiation-induced genomic instability, *Mutat. Res.* 504 (2002) 91-100.

- [12] J. B. Little, E. I. Azzam, S. M. de Toledo, H. Nagasawa. Bystander effects: intercellular transmission of radiation damage signals, *Radiat. Prot. Dosimetry* 99 (2002) 159-162.
- [13] C. Mothersill, C. Seymour. Radiation-induced bystander effects: Past history and future directions, *Radiat. Res.* 155 (2001) 759-767.
- [14] K. M. Prise, O. V. Belyakov, M. Folkard, B. D. Michael. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam, *Int. J. Radiat. Biol.* 74(1998) 793-798.
- [15] I. Szumiel. The bystander effect: is reactive oxygen species the driver? *Nukleonika*
- [16] U. Aypar, W. F. Morgan, J.E. Baulch. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? *Int. J. Radiat. Biol.* 87 (2011) 179-191.
- [17] O. Kovalchuk, J. E. Baulch. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects--is there a link?, *Environ Mol. Mutagen.* 49 (2008) 16-25.
- [18] W. F. Morgan. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene* 22 (2003) 7094-7099.
- [19] S. M. Clutton, K. M. Townsend, C. Walker, J. D. Ansell, E. G. Wright. Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures, *Carcinogenesis* 17 (1996) 1633-1639.
- [20] C. L. Limoli, A. Hartmann, L. Shephard, C. R. Yang, D. A. Boothman, J. Bartholomew, W. F. Morgan. Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity, *Cancer Res.* 58 (1998) 3712-3718.
- [21] C. L. Limoli, E. Giedzinski, W. F. Morgan, S. G. Swartz, G. D. Jones, W. Hyun. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells, *Cancer Res* 63 (2003) 3107-3111.
- [22] G. J. Kim, G. M. Fiskum, W. F. Morgan. A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating radiation-induced genomic instability, *Cancer Res.* 66 (2006) 10377-10383.
- [23] G. J. Kim, K. Chandrasekaran, W. F. Morgan. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review, *Mutagenesis* 21 (2006) 361-367.
- [24] J. K. Leach, T. G. Van, P. S. Lin, R. Schmidt-Ullrich, R. B. Mikkelsen. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen, *Cancer Res.* 61 (2001) 3894-3901.
- [25] R. E. Rugo, R. H. Schiestl. Increases in oxidative stress in the progeny of X-irradiated cells, *Radiat. Res.* 162 (2004) 416-425.
- [26] T. Yamamori, H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura, O. Inanami. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 260-270.
- [27] T. Yoshida, S. Goto, M. Kawakatsu, Y. Urata, T. S. Li. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation, *Free Radic. Res.* 46 (2012) 147-153.
- [28] W. F. Morgan, A. Hartmann, C. L. Limoli, S. Naga, B. Ponnaiya. Bystander effects in radiation-induced genomic instability, *Mutat. Res.* 504 (2002) 91-100.
- [29] L. Huang, A. R. Snyder, W. F. Morgan. Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis, *Oncogene* 22(2003) 5848-5854.
- [30] D. J. Smiraglia, M. Kulawiec, G. L. Bistulfi, S. G. Gupta, K. K. Singh. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus, *Cancer Biol. Ther.* 7 (2008) 1182-1190.
- [31] M. Takasugi, S. Yagi, K. Hirabayashi, K. Shiota. DNA methylation status of nuclear-encoded mitochondrial genes underlies the tissue-dependent mitochondrial functions. *BMC Genomics* (2010) 19;11:481.
- [32] S. Minocherhomji, T. O. Tollefsbol, K. K. Singh. Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases, *Epigenetics* 7 (2012) 326-334.
- [33] P. F. Chinnery, H. R. Elliott, G. Hudson, D. C. Samuels, C. L. Relton. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases, *Int. J. Epidemiol.* 41 (2012) 177-187.
- [34] D. Bellizzi, P. D'Aquila, M. Giordano, A. Montesanto, G. Passarino. Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants, *Epigenomics.* 4 (2012) 17-27.
- [35] O. Kovalchuk, J. E. Baulch. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects--is there a link? *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (2008) 16-25.
- [36] Y. Ilnytskyy, O. Kovalchuk. Non-targeted radiation effects - an epigenetic connection, *Mutat. Res.* 714 (2011) 113-125.
- [37] J. Tamminga, O. Kovalchuk. Role of DNA damage and epigenetic DNA methylation changes in radiation-induced genomic instability and bystander effects in germline in vivo. *Curr Mol Pharmacol* 4 (2011) 115-125.
- [38] R. K. Naviaux. Mitochondrial control of epigenetics, *Cancer Biol. Ther.* 7 (2008) 1191-1193.
- [39] P. D'Aquila, G. Rose, M. L. Panno, G. Passarino, D. Bellizzi. SIRT3 gene expression: a link between inherited mitochondrial DNA variants and oxidative stress, *Gene* 497 (2012) 323-329.
- [40] R. E. Rugo, J. T. Mutamba, K. N. Mohan, T. Yee, J. R. Chaillet, J. S. Greenberger, B. P. Engelward. Methyltransferases mediate cell memory of a genotoxic insult, *Oncogene* 30(2011)751-756.
- [41] W. Timp, A. P. Feinberg. Cancer as a dysregulated epigenome allowing cellular growth advantage at the expense of the host. *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 497-510.
- [42] W. C. Copeland, J. T. Wachsman, F. M. Johnson, J. S. Penta. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest* 20 (2002) 557-569.
- [43] J. Lu, L. K. Sharma, Y. Bai. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Res.* 19 (2009) 802-815.