

BIODOZIMETRIE I: PRAKTICKÁ POTŘEBA BODOZIMETRIE A NEJDŮLEŽITĚJŠÍ AKTIVOVANÉ MECHANISMY PO OZÁŘENÍ

Mgr. Zdeňka VILASOVÁ, mjr. doc. MUDr. Jan ÖSTERREICHER, Ph.D, prof. RNDr. Jiřina VÁVROVÁ, CSc.
Univerzita obrany, katedra radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové

Souhrn

Práce pojednává o možnostech praktického použití současných metod biodozimetrie včetně informací o jejich omezeních. V další části obsahuje ucelené shrnutí nejdůležitějších poznatků účinků ionizujícího záření na molekulární úrovni, zejména pak postradiační aktivace p53, navození bloku v G2/M buněčného cyklu a související aktivace MAP-kinázové cesty.

Klíčová slova: Biodozimetrie; p53; G2/M blok; MAPK.

Biodosimetry Part I: Practical Need of Biodosimetry and the Most Important Mechanisms Activated After Irradiation

Summary

This study analyzes possibilities of the use of biodosimetric methods in military practice. It also mentions information concerning limited use of these methods. Subsequently it contains a summary of the most important facts concerning radiation-induced mechanisms at the molecular level, in particular those concerning p53 activation, induction of G2/M cell cycle arrest and related activation of the MAP kinase pathway at the molecular level.

Klíčová slova: Biodosimetry; p53; G2/M block; MAPK.

Možnosti použití biodozimetrie

V této práci pojednáváme především o účincích gama záření na lidský organismus, jakož i o ozáření rychlými elektrony a neutrony. Tyto účinky jsou závislé na druhu záření, velikosti absorbované dávky a také na časové a prostorové distribuci ozáření. Proto už od počátku existence radiobiologie je kladen důraz na co nejpřesnější určení velikosti absorbované či efektivní dávky u ozářených osob.

Jedním z důležitých směrů, jak zjistit obdrženou dávku záření až v období po ozáření, je tzv. biologická dozimetrie či biodozimetrie. Biodozimetrii lze charakterizovat jako subdisciplínu oboru radiobiologie, která pomáhá určit velikost absorbované dávky podle intenzity a druhu postradiační odpovědi organismu. Dosud jsou detailně popsány postradiační děje a biodozimetrické ukazatele na úrovni organismu a orgánů samotných. Avšak jejich použití v praxi má řadu úskalí, počínaje jejich nízkou citlivostí a relativně dlouhou latencí, anebo vysokou finanční či edukační náročností.

Praktické využívání biodozimetrie lze předpokládat ve všech oblastech lidského konání, kde je zahrnut faktor ionizujícího záření. Jedná se tedy o pracovníky činné v riziku ionizujícího záření. První oblastí je výroba, zpracování a likvidace zdrojů ionizujícího záření. Zde jde zejména o pracovníky uranových dolů (kteří jsou nejvíce ohroženi vysokým obsahem radonu především ve vzduchu, na což dosud nemá současná věda žádný biodozimetrický ukazatel), zpracovatelského průmyslu, jaderných elektráren a úložišť radioaktivních látek. Pro široké uplatnění radionuklidů v medicíně je nutné do okruhu pracovníků v riziku zahrnout i pracovníky nemocničních oddělení nukleární medicíny, radioterapie, radiodiagnostiky, ale i balneologie, kdy jako příklad lze uvést jáchymovské lázeňské kúry. Významným expozicím jsou dále vystaveni představitelé chirurgických oborů používající kontrastních vyšetření při operaci a peroperační RTG metody. Další skupinou jsou pracovníci laboratorních zařízení využívající ve výzkumných projektech zdroje ionizujícího záření. V neposlední řadě je také nutné zmínit

letový personál, vojáky a kosmonauty. Ve všech výše uvedených oblastech lidského konání je možné se za nestandardních okolností setkat s významnějším ozářením, kdy je nutné všemi dostupnými metodami odhadnout absorbovanou dávku.

Použití biodozimetrických metod v polních podmínkách AČR je limitováno časovými a technologickými možnostmi jejich použití. V první řadě lze použít pouze takové metody, které nejsou příliš finančně nákladné, jsou nenáročné na zaučení zodpovědných laboratorních pracovníků, ale přitom se musí jednat o vysoce specifické metodické postupy s nízkým detekčním prahem. Takovým požadavkům vyhovují metody ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) detekující požadovaný protein a RT-PCR (real time – polymerase chain reaction) detekující požadovaný gen mRNA nebo DNA samotné.

Dalším limitem je časové období po ozáření vojáka. Biochemická laboratoř s adekvátním vybavením umožňující použití výše uvedených metod se v léčebně odsunovém systému nachází až od stupně Level 2. Na zdravotnickou etapu stupně Level 2 jsou ozáření pacienti přivázeni mezi 2 a 6 hodinami po ozáření (21). A jelikož je nezbytné efektivní léčbu započít již do konce prvního dne po ozáření, výsledné časové rozmezí je mezi 2 a 24 hodinami po ozáření vojáka.

Z uvedeného vyplývá praktická potřeba takových biodozimetrických ukazatelů, které by byly validní v intervalu od 2 do 24 hodin po ozáření a zároveň detekovatelné ELISA nebo RT-PCR metodami.

Mechanismus účinku ionizujícího záření

Abychom dobře porozuměli významu biodozimetrických ukazatelů, je vhodné si nastínit nejdůležitější cesty aktivované v ozářených buňkách a jejich význam pro regulaci buněčného prostředí.

V odpovědi na ozáření buňky má důležitou úlohu aktivace tumor supresorového proteinu P53, který dále reguluje blok buněčného cyklu, reparaci poškozené DNA nebo aktivuje apoptózu cestou aktivace dalších proteinů a genů.

Ionizující záření vytváří v jádře ozářených buněk dvojité zlomy dvoušroubovice DNA. Forma reparace dvojitých zlomů DNA je dvojí: nehomologní rekombinantní reparace (non-homologous end-joining; NHES) probíhající v G1-fázi buněčného cyklu a homologní rekombinantní reparace (homologous recombination; HR) DNA. Homologní reparace je

významná především v G2-fázi buněčného cyklu (32, 37), kdy jsou v jádře dvě sady chromozomů a dvoušroubovice DNA nepoškozená dvojitým zlomem slouží jako vzor k opravě poškozeného úseku DNA druhé dvoušroubovice. Proto blok buněčného cyklu v G1 a v G2/M-fázi slouží k opravě DNA a jsou důležitými faktory pro další existenci a funkci ozářených buněk (37).

Jako odpověď na přítomnost dvojitých zlomů DNA se mimo jiné aktivuje i ATM-protein kináza. ATM je produktem tumor supresorového genu, který je mutovaný u nemoci označované jako ataxie-teleangiektázie. Tato autozomálně recesivně dědičná choroba se projevuje tvorbou teleangiektázií (patologickým rozšířením cév na periférii) a ataxií jako formy poruchy mozečkových funkcí. Dalšími příznaky důležitými pro radiobiologii jsou vyšší radiosenzitivita a vyšší incidence nádorových onemocnění u takto defektních pacientů (22).

Tato ATM-protein kináza je v odpovědi již na malé dávky záření autofosforylována (3) a dále fosforyluje řadu cílů, mezi nimi i p53. Dále bylo zjištěno (2, 34), že bez ATM-protein kinázy není fosforylace p53 v ozářených buňkách dostatečně rychlá. Fosforylace p53 zejména na serinových aminokyselinelinách pak dále určuje roli tohoto proteinu v regulaci buněčných mechanismů. Je zřejmé, že účinky aktivované p53 se mohou lišit lokalizací fosforylovaného serinu.

Jak vyplynulo z *in vitro* studií Banina a spol. (5) a Canmana a spol. (8), ATM-protein kináza dokáže *in vivo* přímo fosforylovat serin 15 p53 (p53 ser15). Dále ATM-protein kináza dokáže aktivovat serin 20 p53 nepřímo prostřednictvím Chk1 nebo Chk2-protein kinázy, ačkoli tato skutečnost byla prokázána pouze *in vitro* pokusem (15, 17, 18, 29, 30). Saito a spol. (23) prokázali *in vitro* také fosforylaci p53 na serinu 9 a serinu 46. Higashimoto a spol. (14) prokázali ATM-dependentní fosforylaci p53 ser6.

Lidský serin 15, korespondující s myším serinem 18, je přímo aktivován rodinou fosfatidylinositol-3-kináz, což zahrnuje DNA-protein kinázu (20), ATR (31) a vlastní ATM kinázu (5, 8). Fosforylace p53 na serinu 15 bez přítomnosti aktivní ATM-protein kinázy je inhibována ve smyslu opožděné nebo nižší aktivace (16, 23) a velmi časná aktivace tohoto serinového rezidua je nezbytná pro plnou p53-dependentní odpověď v buňkách vystaveným vlivu škodlivých látek a činitelů poškozujících DNA, včetně ionizujícího a UV záření (16).

Jak bylo zmíněno výše, serin 20 je fosforylován ATM-protein kinázou cestou Chk1 a Chk2-protein kinázy. Význam aktivace tohoto serinového rezidua spočívá patrně ve stabilizaci samotné p53 v jádru ozářené buňky a plné aktivaci ATM-dependentního p53 fosforylací na serinu 15 (5, 8).

Fosforylace p53 na serinu 46 byla prokázána po ozáření buněčné epiteliální linie ultrafialovým (UV) zářením (7, 20) prostřednictvím p38 MAP-kinázy (7) HIP-kinázy a kinázy HIPK2 (10). Jelikož aktivace p38 MAP-kinázy se projevuje po UV ozáření, a nikoli po ozáření buněk ionizujícím zářením, domnívají se Saito a spol. (23), že fosforylace p53 na ser46 je způsobena jinou protein kinázou, například p53DINP1.

Ačkoli fosforylace p53 na serinu 9 neprobíhá přímo, autoři (23) se domnívají, že ATM-protein kináza je k této aktivaci nezbytná a že dokáže tento tumor supresorový protein aktivovat nepřímo cestou aktivace dosud neznámé protein kinázy.

Higashimoto a spol. (14) prokázali fosforylaci p53 na serinu 6 i 9 po ozáření UV i ionizujícím zářením. Dále zjistili vztah mezi fosforylací p53 na ser6 a ser9, kdy fosforylace na ser6 cestou Chk1 může způsobit fosforylaci ser9. Následky aktivované p53 ser6 a p53 ser9 nejsou zcela známy, ale Saito a spol. (23) se domnívají, že aktivace těchto serinových reziduí po ozáření slouží k amplifikaci primárního účinku ATM-protein kinázy, tj. fosforylaci p53ser15.

Další významnou oblastí funkce a regulace p53 je degradace tohoto proteinu. U neozářených buněk dochází v buněčném jádru prostřednictvím vazby mdm2 na p53 k degradaci tohoto proteinu (6, 36). Takto je zachována adekvátnost odpovědi vůči indukovanému signálu. U ozářených buněk dochází k vzestupu p53 především v důsledku zabránění degradace p53. Tento mechanismus lze vysvětlit fosforylací jak mdm2 ATM-kinázou, tak fosforylací p53 na serinu 15 nebo 20. Aktivovaný mdm2 se poté neváže na aktivovaný p53, který se v jádře stabilizuje a jeho obsah v buňce se zvyšuje. Není však zcela jasné, která z modifikací je zásadní pro zrušení vazby mdm2 na p53. Na inhibici degradace p53 se dále mohou podílet také některé další buněčné proteiny, jako jsou E2F1, Ras, Myc, beta-catenin, pRb a c-Abl (28), které cestou indukce tumor supresorového proteinu ARF blokují aktivitu Mdm2 proteinu (26). Tímto mechanismem je dosaženo výraznější, tj. neadekvátní, odpovědi na indukující signál.

Dalšími důležitými buněčnými molekulami, kte-

ré jsou aktivovány ionizujícím zářením, jsou JNK (19), p38 MAPK (25), SEK (25) a NF-kappaB (35). Tyto molekuly vyvolávají kaskádovou reakci vedoucí k aktivaci časných genů, jako jsou c-jun, c-fos a egr-1 (9, 11, 12, 13, 27).

Po aktivaci ATM-kinázy jsou jedním z dalších cílů fosforylace proteiny p53, Chk1, Chk2. Zásadními proteiny jsou Chk1 a Chk2-proteinkinázy, jejichž fosforylace ATM-kinázou vede k inhibici funkce fosfatáz cdc25a a cdc25c odpovědných za průchod přes G1/S a G2/M klíčové body a za pokračování buněčného dělení (33).

Významnou prací je studie Abotta a spolupracovníků (1), kteří sledovali úlohu mitogenem aktivované protein (MAP) kinázy kinázy 1 (MEK 1) a MAP-kinázy kinázy 2 (MEK 2) v ozářených buňkách s blokováním buněčným cyklem ve fázi G2/M. Tyto dvě kinázy jsou členy MAP-kinázové signální cesty a jsou aktivovány RAF (4). Oba tyto proteiny mohou dále fosforylovat další členy MAPK-kaskády, ERK1 a ERK2 (24).

Autoři zjistili, že po expozicích buněk ionizujícím zářením je velmi významně exprimována signální cesta MAPK/RAF/MEK1-MEK2, která zajišťuje včasnou indukci G2/M-bloku buněčného cyklu. Abbott a spol. (1) dále pozorovali, že u buněk s dominantně negativní MEK1 a MEK2 nastává postradiační G2/M-blok opožděně a buňky posléze hůře tento blok buněčného cyklu překonávají. Nicméně, inhibice exprese MEK1 a MEK2 neovlivňuje reparaci dvojitého zlomu DNA vzniklého po ozáření. Z jejich výsledků vyplývá, že radiačně indukovaná aktivace MAP-kinázové cesty je nezbytná k navození bloku v G2/M-fázi buněčného cyklu a jeho rychlejší překonání a vstupu ozářených buněk do mitózy.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem jsme se v naší experimentální práci zaměřili na studium fosforylace ATM-kinázy a p53 v ozářených lymfocytech izolovaných z periferní krve, které by mohly být použity pro stanovení biodozimetrických ukazatelů u ozářených při radiačních nehodách, příp. za válečného konfliktu.

Literatura

1. ABBOTT, DW. – HOLT, JT. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M Checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, p. 2732–2742.
2. ABRAHAM, RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, p. 2177–2196.

3. BAKKENIST, C.J. – KASTAN, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003, vol. 21, p. 486–488.
4. ALESSI, D.R., et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 27489–27494.
5. BANIN, S., et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 1998, vol. 281, p. 1674–1677.
6. BARAK, Y., et al. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, p. 461–468.
7. BULAVIN, D.V., et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, p. 6845–6854.
8. CANMAN, C.E., et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998, vol. 281, p. 1677–1679.
9. DATTA, et al. Ionizing radiation activates transcription of the EGR1 gene via CAR elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, p. 10149–10153.
10. D'ORAZI, G., et al. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2002, vol. 4, p. 11–19.
11. HALLAHAN, D.E., et al. C-jun and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 30303–30309.
12. HALLAHAN, D.E., et al. Radiation signaling mediated by Jun activation following dissociation from a cell type-specific repressor. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, p. 4903–4904.
13. HALLAHAN, D.E., et al. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, p. 2156–2160.
14. HIGASHIMOTO, Y., et al. Human p53 is phosphorylated on serine 6 and 9 in response to DNA damage-inducing Agents. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, p. 23199–23203.
15. HIRAO, A., et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 2000, vol. 287, p. 1824–1827.
16. CHAO, C., et al. Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, p. 11936–11941.
17. CHEHAB, N.H., et al. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, p. 278–288.
18. CHEHAB, N.H., S., et al. Phosphorylation of ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, p. 13777–13782.
19. CHEN, Y.R., et al. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, p. 31929–31936.
20. LEES-MILLER, S.P., et al. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, vol. 12, p. 5041–5049.
21. ŌSTERREICHER, J. – VÁVROVÁ, J. *Přednášky z radiobiologie*. 1. vyd. MANUS, 2003. 116 s.
22. ROTMAN, G. – SHILOH, Y. The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress. *Cancer Surv.*, 1997, vol. 29, p. 285–304.
23. SAITO, S., et al. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including ser 46, in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, p. 12491–12494.
24. SEGER, R. – KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 1995, vol. 9, p. 726–735.
25. SHAFMAN, T.D., et al. Defective induction of stress-activated protein kinase activity in ataxia-telangiectasia cells exposed to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, p. 3242–3245.
26. SHARPLESS, N.E. – DEPINHO, R.A. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1999, vol. 9, p. 22–30.
27. SHERMAN, M.L., et al. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, p. 5663–5666.
28. SHERR, C.J. – WEBER, J.D. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000, vol. 10, p. 94–99.
29. SHIEH, S.Y., et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, p. 289–300.
30. SHIEH, S.Y. – TAYA, Y. – PRIVES, C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, p. 1815–1823.
31. TIBBETTS, R.S., et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.*, 1999, vol. 13, p. 152–157.
32. TSUKAMOTO, Y. – KATO, J. – IKEDA, H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1997, vol. 388, p. 900–903.
33. VÁVROVÁ, J., et al. *Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením*. 1. vyd. Hradec Králové, VLA JEP, 2002. 44 s. Učební texty VLA JEP. Sv. 333. ISBN 80-85109-23-9.
34. WAHL, G.M. – CARR, A.M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.*, 2001, vol. 3, p. E277–E286.
35. WANG, C.Y. – MAYO, M.W. – BALDWIN, A.S. Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science*, 1996, vol. 274, p. 784–787.
36. WU, X., et al. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 1993, vol. 7, p. 1126–1132.
37. YANEVA, M. – KOWALEWSKI, T. – LIEBER, M.R. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, p. 5098–5112.

Korespondence: Mgr. Zdeňka Vilasová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Katedra radiobiologie
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: vilasova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 19. 10. 2004