

## BIODOZIMETRIE I: PRAKTICKÁ POTŘEBA BIODOZIMETRIE 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 Biosimetry and the Most Important Mechanisms Activated After Irradiation

#### Summary

*This study analyzes possibilities of the use of biosimetric 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:** Biosimetry; 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 poslední 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 dvojitá: 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 aminokyselinach 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 fosforylací 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 fosforylací 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. fosforylací 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. Abott 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 dvojitých zlomů DNA vzniklých 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, CJ. – KASTAN, MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003, vol. 21, p. 486–488.
4. ALESSI, DR., 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, DV., 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, CE., 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, DE., 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, DE., 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, DE., 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, NH., 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, NH., 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, YR., 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, SP., 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. ÖSTERREICHER, 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, EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 1995, vol. 9, p. 726–735.
25. SHAFMAN, TD., 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, NE. – DEPINHO, RA. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1999, vol. 9, p. 22–30.
27. SHERMAN, ML., et al. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, p. 5663–5666.
28. SHERR, CJ. – WEBER, JD. The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000, vol. 10, p. 94–99.
29. SHIEH, SY., 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, SY. – 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, RS., 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 inizujícími zářením*. 1. vyd. Hradec Králové, VLA JEP, 2002. 44 s. Učební texty VLA JEP. Sv. 333. ISBN 80-85109-23-9.
34. WAHL, GM. – CARR, AM. 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, CY. – MAYO, MW. – BALDWIN, AS. 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, MR. 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