

612.014.482:577.391

RADIAČNĚ INDUKOVANÉ SIGNÁLNÍ MECHANISMY BUNĚK

¹Jiří STULÍK, ¹Jan ÖSTERREICHER, ²Walter KAFFENBERGER, ¹Aleš MACELA

¹Ústav radiobiologie a imunologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

²Institut für Radiobiologie, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, Bundesrepublik Deutschland

Souhrn

Práce stručně pojednává o nejdůležitějších molekulárních mechanismech, které je možné pozorovat v biologických systémech po ozáření. Předkládá molekulární mechanismy odpovědné za přenos signálu vyvolaného ionizujícím zářením do buňky. Je zde také vysvětlen problém reakce DNA po expozicích ionizujícím záření a úloha p53 v tomto procesu. Dále práce uvádí přehled nejdůležitějších molekul účinkujících při aktivaci apoptózy.

Klíčová slova: Ionizující záření; Transdukce; Apoptóza.

Radiation Induced Cell Signal Mechanisms

Summary

This study introduces briefly basic molecular mechanisms which are seen in biological systems after irradiation. It presents molecular mechanisms responsible for the transmission of a signal into a cell which is caused by ionizing irradiation. The problem of DNA reaction after exposures to ionizing radiation and the role of p53 in this process are also explained. Further, the study provides an overview of the most important molecules acting during apoptosis activation.

Key words: Irradiation; Transduction; Apoptosis.

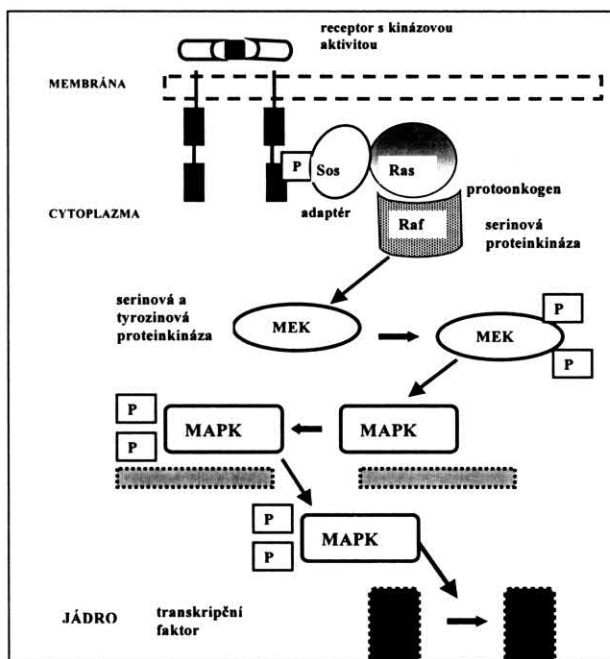
Současný pohled na buněčnou odpověď vůči ionizujícímu záření je spojením tradičních radiobiologických pojmů a zároveň zcela nových informací o molekulárních mechanismech regulujících průběh buněčného cyklu, aktivaci reparačních mechanismů poškozených vláken DNA a také indukci apoptózy. Vzájemná koordinace těchto klíčových dějů zabráňuje vzniku genové nestability v buňce, genovým mutacím a případné nádorové transformaci. Obecně můžeme hovořit o indukci buněčné stresové reakce, jejíž nástup je závislý na přítomnosti signálu, který informuje jednak o možném poškození molekul DNA a jednak obecně o působení škodlivé noxy (ionizujícího záření) na buněčnou populaci. Výsledkem je pak indukce exprese celé řady genů, které kontrolují průběh buněčné stresové reakce na působící agens (2). Šíření informace v buňce je zprostředkováno pomocí signálních řetězců, které jsou většinou složeny ze čtyř základních komponent - enzymů regulujících fosforylaci proteinů, adaptérů, tj. propojovacích proteinů, buněčných protoonkogenů a transkripčních faktorů. Fosforylace proteinů je děj, při kterém dochází k vazbě kyseliny fosforečné na příslušný protein, a to působením enzymů, jež se označují jako kinázy. Zdrojem kyseliny fosforečné je většinou

ATP a uvolněná fosforečná skupina se váže esterovou vazbou buď na aminokyseliny serin nebo threonin, pak hovoříme o serinových nebo threoninových proteinkinázách, nebo se váže na aminokyselinu tyrosin, potom se jedná o tyrosinové proteinkinázy. Fosforylace proteinu vede ke změně konformace molekuly a výsledně způsobuje její aktivaci. Naopak odstranění kyseliny fosforečné, které je katalyzováno skupinou enzymů označovaných jako fosfatázy, většinou vede k inhibici funkce (obr. 1). Obě skupiny enzymů (proteinkinázy a fosfatázy) mohou být lokalizovány buď přímo v membráně jako součást membránových receptorů, dále v blízkosti membrány, v cytoplazmě a také v buněčném jádru (6).

Proteinkinázy x Fosfatázy			
Fosforylace		Defosforylace	
(Ser/Thr)		(Ser/Thr)	
-AA-AA-Tyr-AA-AA		-AA-AA-Tyr-AA-AA	
+		-	
			

Obr. 1: Fosforylace a defosforylace v buňce

Dosud nejlépe prozkoumanou signální cestou, která přenáší signál z buněčné membrány do jádra, je cesta využívající proteinkinázu aktivovanou mitogeny (MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase). Zjednodušená verze této signální cesty je na obr. 2. Na začátku této cesty stojí aktivace membránového receptoru, ke které dochází po navázání specifické ligandy. V tomto konkrétním případě se jedná o receptor, který se vyznačuje vlastní kinázovou aktivitou. Tato kinázová aktivita je lokalizována v cytoplazmatické části proteinové molekuly a po navázání příslušné ligandy dochází k její aktivaci s následnou autofosforylací vlastního receptoru. Fosforylaci tyrosinu se vytváří vazebné místo pro další molekuly, jako je Ras-protoonkogen, který potom aktivuje Raf-proteinkinázu. Následuje postupná aktivace dalších kináz, která je zakončena přesunem fosforylované MAP-kinázy do jádra s následnou fosforylací a aktivací transkripčních faktorů, které iniciují po vazbě na DNA transkripci cílových genů.



Obr 2: Přenos signálu přes buněčnou membránu do jádra prostřednictvím MAP-kináz

Jak může ionizující záření ovlivňovat přenos signálu v buňce? Předpokládá se, že záření zasahuje klasickou signální cestu probíhající od membránového receptoru směrem do buněčného jádra a navíc vlastní poškození molekuly DNA aktivuje další signální dráhu, pomocí které buňka vnímá alteraci DNA a reaguje na tuto situaci příslušnými reparačními pochody.

Nejprve se zmíníme o modulaci klasické signální cesty, která může nastávat na několika úrovních. V prvním případě se jedná o aktivaci membránového receptoru s kinázovou aktivitou, a to zcela nezávisle na přítomnosti specifické ligandy. Jak již bylo zmíněno, vazba ligandy na receptor s kinázovou aktivitou vede k jeho autofosforylaci, která je nezbytná pro další šíření signálu do buňky. Aktivace receptoru je později zablokována pomocí membránově vázané fosfatázy, která odštěpí fosfát z receptorové bílkoviny a tím se spojení se signální cestou přeruší. V případě ionizujícího záření dochází pravděpodobně k reverzibilní oxidaci SH-skupiny ležící v aktivním centru fosfatázy, čímž je funkce tohoto enzymu inhibována a tím se indukuje spontánní, na přítomnosti ligandy nezávislá aktivita receptorové kinázy (7).

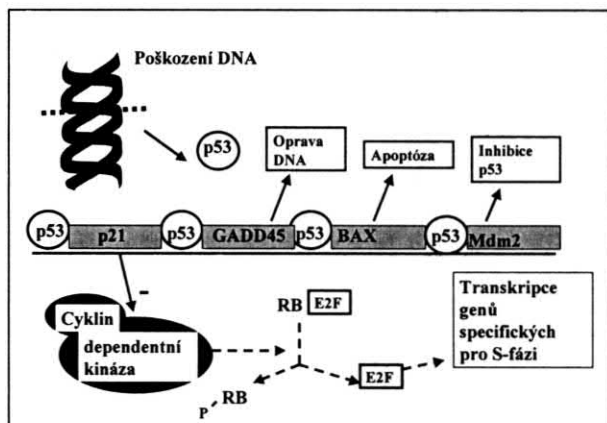
Další složkou signální cesty, která je ovlivněna ionizujícím zářením, je Ras-protoonkogen. Ionizující záření stimuluje zvýšenou produkci tohoto protoonkogenu, což je spojeno s nárůstem radiorezistence buněk.

Třetí úroveň, kde se uplatňuje vliv ionizujícího záření, je aktivace transkripčních faktorů. V tomto směru je pro indukci buněčné odpovědi vůči ionizujícímu záření významná zejména aktivace nukleárního transkripčního faktoru κB (NF- κB). Tento faktor se za normálních okolností nachází v cytoplazmě buněk, a to ve vazbě na inhibiční protein I κB - α , který zabraňuje jaderné translokaci NF- κB . Pro aktivaci NF- κB je tedy nezbytná jeho disociace od tohoto inhibičního proteinu, což fyziologicky nastává po předchozí fosforylaci I κB - α proteinu. Ionizující záření přímo aktivuje NF- κB , protože u ozářených buněk byla opakovaně prokázána vazba NF- κB na DNA-molekulu. Tato aktivace je v tomto případě pravděpodobně zprostředkována reaktivními kyslíkovými mediátory a s tím související změnou redox potenciálu buňky.

Další signální cesta, jak již bylo zmíněno, je aktivována neopravenými nebo nereplikovanými úseky DNA. Výsledkem aktivace této signální dráhy je stresová reakce vedoucí k charakteristické inhibici průběhu buněčného cyklu v G_1/S a G_2/M -fázi. Inhibice buněčného cyklu by měla poskytnout čas nezbytný pro reparaci poškozených úseků DNA. Předpokládá se, že klíčovou molekulou, která je odpovědná za zastavení buněčného cyklu v G_1 -fázi, je protein p53. Tento protein působí vlastně jako transkripční faktor, který po vazbě na specifické sekvence DNA aktivuje transkripci dalších genů,

jež zprostředkují účinky p53 na inhibici buněčného dělení či aktivaci procesu apoptózy. Za potenciální efektorovou molekulu inhibice buněčného cyklu se považuje protein p21^{Cip1}, známý také jako WAF 1. WAF 1 je inhibitor cyklin-dependentních kináz, které fosforylují a tím inaktivují retinoblastoma protein RB. Funkce RB-proteinu potom spočívá v negativní regulaci exprese transkripčního faktoru E2F, jenž je nezbytný pro aktivaci transkripce genů specifických pro S-fázi. Nefosforylovaný RB-protein váže E2F-faktor a tím brání jeho vazbě na DNA. Jakmile ale dojde k fosforylaci RB-proteinu pomocí cyklin-dependentní kinázy, E2F-transkripční faktor se uvolní z vazby na RB-protein a spouští se proces genové transkripce (3).

Další geny, jejichž transkripce je aktivována proteinem p53, zahrnují GADD45, který se pravděpodobně uplatňuje při reparačních pochodech DNA a také při blokaci G₁-S přechodu, MDM2, což je negativní regulátor p53, a cyklin G, jehož funkce je zatím neznámá. Samostatnou skupinu pak tvoří molekuly, které se účastní procesu apoptózy, to znamená proteázy ICE/Ced-3 třídy a členové rodiny Bcl-2 vyznačující se proapoptotickými vlastnostmi jako, je např. BAX-protein (obr. 3).

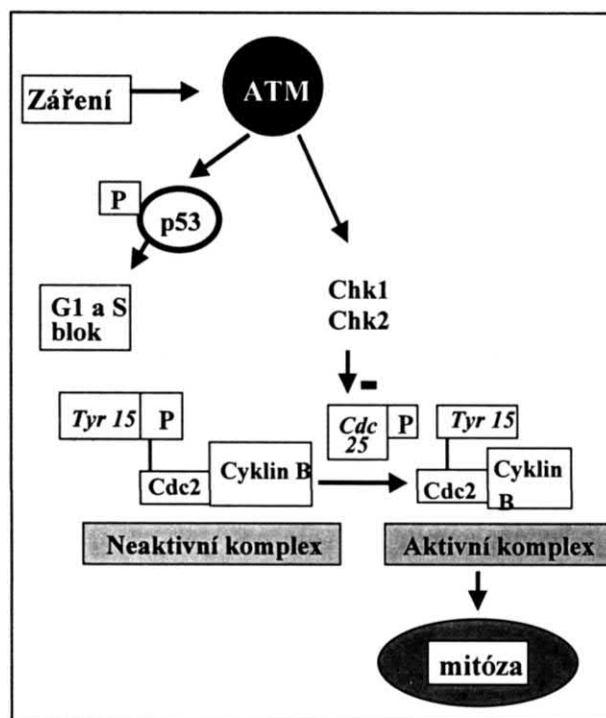


Obr. 3: Reakce DNA na ozáření a úloha p53

Zatímco je docela dobře popsána signální cesta směrem od p53 dolů k regulaci genové transkripce, málo je známo o signálních molekulách, které se účastní procesu aktivace p53. Zde se zdá být opět rozhodujícím faktorem fosforylace p53. Mezi kinázy, které prokazatelně *in vitro* fosforylují p53, se řadí kaseinkináza 1, MAP-kináza, DNA-PK kináza, c-JUN (JNK) kináza a zejména ATM-kináza. Právě ATM-kináza, která fosforyluje p53 na serinu číslo 15, je podle posledních výzkumů rozhodující i pro *in vivo* fosforylaci p53 v odpovědi na ionizu-

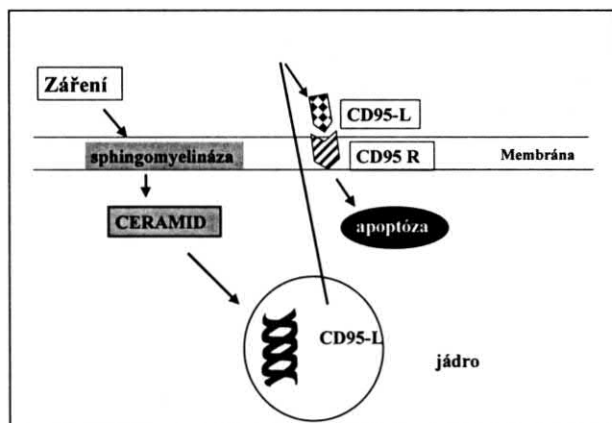
jící záření. ATM-gen, který je mutován u pacientů s onemocněním ataxia teleangiectasia (A-T), kóduje 350 kDa velký protein, který patří do rodiny proteinů příbuzných fosfatidylinositol-3-kináze. Pacienti s A-T syndromem, včetně buněčných linií odvozených od pacientů s A-T, se vyznačují hypersenzitivitou vůči ionizujícímu záření, nedostatečnou inhibicí buněčného cyklu a malým nárůstem hladiny p53. Naopak buňky s divokou formou ATM akumulují v reakci na ionizující záření protein p53 a zvyšují jeho aktivitu (1).

Kromě defektu v navození G₁-bloku vykazují buňky získané od pacientů s A-T i defekt v indukci inhibice G₂-fáze buněčného cyklu. Je tedy zřejmé, že přítomnost divoké, nemutované formy ATM-kinázy je významná i pro navození bloku G₂-fáze. Indukce tohoto bloku je nezávislá na aktivaci p53, ale vyžaduje přítomnost dalších dvou kináz označovaných jako Chk1 a Chk2, jež regulují přechod z G₂/M-fáze. Tyto kinázy fosforylují fosfatázu Cdc25c, tím ji inhibují a indukují ustavení bloku G₂-fáze. Aktivní fosfatáza Cdc25c totiž odstraňuje fosfát vázaný na tyrosin č. 14 komplexu cdc2/cyklin B. Tento kinázový komplex, který je také znám pod názvem mitózu podporující faktor, je po uvolnění inhibičního fosfátu aktivován, což je nezbytné pro zahájení mitózy (obr. 4).



Obr. 4: Mechanismus vlivu ionizujícího záření na buněčný cyklus

Dosud jsme popisovali pouze indukci genů, jejichž exprese bezprostředně souvisí s regulací buněčného cyklu, příp. s indukcí apoptózy. Nicméně buněčná odpověď na radiační působení se ukazuje být mnohem komplikovanější. Poslední vědecké výzkumy prokazují, že kromě indukce inhibice buněčného dělení a reparace DNA dochází také k aktivaci transkripce tzv. rychle reagujících genů, jež většinou kódují různé transkripční faktory patřící do genových skupení typu c-jun, c-fos, a Egr-1. Tyto transkripční faktory, které za normálních okolností zprostředkovávají obecné buněčné pochody, jako je proliferace nebo diferenciace, přenášejí v případě radiace časné signály, na jejichž základě se spouští dlouhodobě trvající změny genové exprese, které umožňují savcím buňkám adaptovat se na radiační stres. Identifikace produktů těchto tzv. genů sekundární odpovědi je velmi důležitá, protože tyto proteiny pravděpodobně vystupují jako efektorové molekuly v biologických následcích ionizujícího záření. Jako příklady některých efektorových genů působících v pozdější fázi buněčné reakce na ionizující záření lze uvést např. tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF) a transformující růstový faktor beta (TGF- β). Tento poslední cytokin je pravděpodobně odpovědný za vznik radiační fibrózy plic (5).



Obr 5: Mechanismus postradiační indukce apoptózy

Jednou z posledních možností jak zabránit vzniku buněčného klonu s poškozenými úseky DNA je indukce apoptotického procesu s následnou buněčnou smrtí. Již jsme naznačili, že pro indukci apoptózy je významná účast p53 proteinu. Přítomnost nemutované formy tohoto proteinu je totiž nezbytná pro indukci Fas (CD95) receptoru v membráně

ozářených buněk. Fas-receptor patří do rodiny receptorů vázajících TNF- α a jeho hlavní funkcí je po vazbě Fas-ligandy indukce apoptózy v senzitivních buňkách. Právě ionizující záření se ukazuje být výrazným induktorem Fas-ligandy, a to přes uvolnění ceramidu v buněčné membráně (obr. 5).

Lze tedy shrnout, že aktivace p53 a produkce ceramidu spojují stresovou reakci vyvolanou zářením s CD95 signální cestou indukce apoptózy (4).

Závěr

Ačkoli tato studie nevysvětluje jednotlivé post-radiačně indukované signální cesty stran vzájemných regulačních mechanismů detailně, je vhodným východiskem pro další studium v oblasti molekulární radiobiologie.

Literatura

1. CANMAN, C., et al.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 1998, vol. 281, p. 1677-1679.
2. COLEMAN, CN.: Beneficial liaisons: radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiotherapy and Oncology*, 1993, vol. 28, p. 1-15.
3. ENOCH, T. - NORBURY, C.: Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *TIBS*, 1995, vol. 20, p. 426-430.
4. HERR, I., et al.: Activation of CD95(APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J.*, 1997, vol. 20, p. 6200-6208.
5. CHATURVEDI, P., et al.: Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene*, 1999, vol. 18, p. 4047-4054.
6. JUNG, M. - DRITSCHLO, A.: Signal transduction and cellular responses to ionizing radiation. *Seminars in Radiation Oncology*, 1996, vol. 6, p. 268-272.
7. KNEBEL, A., et al.: Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, p. 5314-5325.

Korespondence: MUDr. Jiří Stulík, CSc.

Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: jstulik@pmfhk.cz

Do redakce došlo 5. 1. 2000