

ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ РАДИОПРОТЕКТОРЫ И МЕХАНИЗМ ИХ ДЕЙСТВИЯ

П.Н. Лобачевский

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

e-mail: lobachevsky@jinr.ru

Резюме. Широко известный флуоресцентный краситель ДНК бис-бензимидазол Hoechst 33342 и ряд его аналогов, связывающихся в малой бороздке ДНК, обладают радиозащитными свойствами. Эти свойства продемонстрированы в опытах на культуре клеток и на различных моделях животных. В экспериментах на молекулярном уровне установлено, что защитное действие этих соединений опосредовано связанным с ДНК лигандом. Предполагается, что радиопротектор выступает в роли донора электронов для восстановления оксидативных повреждений ДНК.

Ключевые слова: радиопротектор, ДНК-лиганд, повреждения ДНК

DNA-BINDING RADIOPROTECTORS AND MECHANISM OF THEIR ACTION

P. N. Lobachevsky

Joint institute for nuclear research, Dubna, Russia

Summary. The well-known fluorescent DNA dye bis-benzimidazole Hoechst 33342 and a number of its analogues, which are DNA minor groove binders, exhibit radioprotective properties. These properties were demonstrated in studies with cell culture and in various animal models. In experiments at the molecular level, it was found that the protective effect of these compounds is mediated by the DNA bound ligand. It is assumed that radioprotector acts as an electron donor for the repair of oxidative damage to DNA.

Key words: radioprotector, DNA ligand, DNA damage

Радиозащитные свойства флуоресцентного красителя ДНК Hoechst 33342, который связывается с ДНК в малой бороздке, впервые были обнаружены в экспериментах с культурой клеток [1]. Для интерпретации этого неожиданного наблюдения была предложена гипотеза о том, что радиозащитное действие этого соединения опосредовано восстановлением оксидативных повреждений ДНК путем передачи к ним электрона от ДНК-лиганда. Исходя из гипотезы, было синтезировано несколько новых соединений с целью повышения радиозащитной активности путем введения в молекулу лиганда богатых электронами групп. Эти новые соединения, такие как метилпроамин (МП) и пироамин (ПА), построены на общей с Hoechst 33342 структуре бис-бензимидазола и связываются с ДНК в малой бороздке в АТ-богатых участках последовательности ДНК. Константа диссоциации, характеризующая степень связывания комплексов ДНК-лиганд для этих соединений, находится в диапазоне 0,1 - 10 μM , и на каждые 20 - 50 пар оснований приходится один сайт связывания.

Эксперименты по импульсному радиолизу комплексов МП и Hoechst 33342 с ДНК предоставили дополнительные данные в поддержку гипотезы о том, что механизм защитного действия этих соединений опосредован переносом заряда между связанным с ДНК лигандом и короткоживущим радиационно-индуцированным радикалом ДНК [2]. Результаты этой работы позволили оценить диапазон миграции заряда вдоль ДНК, который составил 14 и 31 пару оснований для Hoechst 33342 и МП соответственно.

В экспериментах с культурой кератиноцитов человека (линия FEP-1811) была показана эффективная защита клеток от летальных последствий облучения γ -квантами (^{137}Cs) в среде, содержащей МП или ПА. Фактор изменения дозы (ФИД), характеризующий степень защиты, составил 2,1 и 2,3 для концентраций 10 и 20 μM МП

соответственно, и 2,3 и 2,6 для концентраций 10 и 20 μM ПА соответственно. Увеличение концентрации МП в среде приводило к выходу ФИД на плато при концентрациях, обеспечивающих насыщение лигандом сайтов связывания на ДНК, что косвенно указывает на роль именно ДНК-связанного лиганда в обеспечении радиозащитного эффекта [3]. Характерно, что для достижения радиозащитного эффекта требуется концентрация МП или ПА, которая почти на два порядка меньше, чем концентрация одного из самых распространенных радиопротекторов аминотиола WR1065, для которого ФИД ~ 2 достигается при концентрации 4 - 5 мМ. Это указывает на высокую эффективность ДНК-связывающихся радиопротекторов.

Использование метода подсчета флуоресцентных фокусов модифицированного гистона H2AX (γH2AX), являющегося маркером двунитевых разрывов ДНК, позволило установить, что МП эффективно защищает облученные клетки от этих повреждений [3]. Величины ФИД по этому критерию составили от 1,4 до 3,5 для различных интервалов времени инкубирования в присутствии 20 μM МП перед облучением.

Радиозащитное действие МП и ПА было также показано в экспериментах с лабораторными животными, с использованием модели Withers у мышей, которая заключается в подсчете жизнеспособных единиц пролиферации (крипт) в срезах тонкого кишечника после облучения. Величины ФИД = 1,2 при облучении мышей после введения 150 мг/кг МП или ПА. Результаты указывают на потенциал этих соединений для защиты нормальных тканей.

В настоящей работе была предпринята попытка получить дополнительные результаты, поддерживающие сформулированную выше гипотезу, с использованием молекулярной радиобиологической экспериментальной модели. Ставилась задача подтвердить роль именно ДНК связанного лиганда в радиозащитном действии и установить, имеет ли место альтернативный механизм, ассоциированный с перехватом радиационно-индуцированных гидроксильных радикалов в окружающем растворе.

В работе использовали модель плазмидной ДНК (плазида pBR322). Эта модель основана на том, что исходная суперспиральная форма плазмиды трансформируется в открытую релаксированную кольцевую форму вследствие индукции одного однострессового разрыва (ОР) ДНК или в линейную форму вследствие индукции двунитевого разрыва (ДР) ДНК. Все три формы плазмидной ДНК могут быть разделены с помощью агарозного геля электрофореза, и доля каждой формы может быть определена количественно исходя из интенсивности индивидуальных полос в геле, окрашенных с помощью ДНК специфичного флуоресцентного красителя SYBR Green. Выход ОР и ДР ДНК может затем быть рассчитан исходя из этих долей. Кроме выхода ОР и ДР ДНК, модель позволяет определить выход некоторых поврежденных оснований (ПО), таких, например, как 8-оксогуанин. Для этого раствор плазмидной ДНК после облучения обрабатывают ферментом гликозилазой, принимающим участие в репарации ПО и приводит на начальном этапе к образованию ОР на месте ПО. В настоящей работе использовали фермент формамидопиримидин гликозилазу (ФПГ).

Поскольку ПО представляли наибольший интерес в данной работе, облучение плазмиды проводили в буферном растворе, благоприятствующем образованию ПО в ущерб ОР ДНК. Этот раствор содержал 1 мМ тиоцианата натрия, который перехватывает радиационно-индуцированные радикалы гидроксила с образованием более слабого окислительного радикала тиоцианата, вызывающего образование преимущественно ПО, а не ОР ДНК.

ДНК плазмиды pBR322 (11,4 μM пар оснований) облучали γ -квантами (^{137}Cs) в диапазоне доз до 100 Gy в растворе, содержащем различные концентрации МП или ПА, а затем по дозовым кривым форм плазмиды вычисляли ФИД и степень защиты,

определенную как доля повреждений (ПО или ОР), образование которых предупреждается радиопротектором. Результаты экспериментов продемонстрировали высокую радиозащитную активность МП и ПА в отношении ПО ДНК и существенно меньшую активность в отношении ОР ДНК. Величины ФИД составили для 1 μM ПА 1,1 в отношении защиты от ОР ДНК и 18,1 в отношении защиты от ПО ДНК. Эти величины соответствуют степени защиты 0,13 и 0,94. Т.о. 1 μM ПА предупреждает образование 94% потенциальных ПО ДНК. Для 2 μM МП величины ФИД составили 1,2 и 9,4 в отношении ПО и ОР ДНК и соответствующие им величины степени защиты 0,18 и 0,9. Эти результаты подчеркивают высокую способность ДНК лигандов МП и ПА восстанавливать короткоживущие радикалы ДНК, например, радикал-катион гуанина - предшественник ПО 8-оксогуанина, и низкую способность восстанавливать предшественники разрывов ДНК. Последнее наблюдение указывает также на низкую эффективность перехватывания гидроксильных радикалов этими соединениями.

Степень защиты ДНК от ПО изучали при концентрациях ПА от 0,1 до 10 μM . В этом диапазоне происходило увеличение степени защиты от 0,4 с насыщением до 0,94 при концентрации 0,5 - 1 μM . При дальнейшем увеличении концентрации ПА степень защиты не увеличивается, что согласуется с насыщением всех сайтов связывания на плазмиде молекулами лиганда. Данное наблюдение поддерживает гипотезу о том, что именно ДНК-связанный радиопротектор отвечает за защиту. Проведенный в рамках этой гипотезы расчет показывает, что передача заряда вдоль ДНК происходит на расстоянии до 40 - 50 пар оснований.

В серии экспериментов с разными концентрациями ПА в буфер для облучения добавляли ДНК-носитель – синтетический олигодеоксинуклеотид, состоящий из 16 пар оснований и содержащий единичный сайт связывания ДНК лиганда (GAATTC) в концентрации 50 μM пар оснований. В присутствии ДНК носителя степень защиты резко снижалась, например, с 80 до 10% при 0,2 μM ПА. Кривая зависимости степени защиты от концентрации ПА сдвигалась в сторону более высоких концентраций. Данное наблюдение легко поддается объяснению, если предполагать, что радиозащитное действие ПА обусловлено связанным с ДНК лигандом, а добавление ДНК носителя связывает большую часть лиганда, тем самым уменьшая количество его молекул, связанных с плазмидной ДНК. Данная интерпретация поддерживается также наблюдением, что кривые степени защиты практически совпадают, если представить их зависимость не от концентрации лиганда, а от отношения лиганд/сайт.

В другой серии экспериментов с разными концентрациями ПА в буфер для облучения добавляли ДНК лиганд, который не имеет радиозащитных свойств, но конкурирует с ПА за сайты связывания ДНК (его константа диссоциации 50 нМ, а у ПА 200 нМ). При концентрации конкурирующего лиганда 0,15 μM степень защиты уменьшалась с 95 до 60% для 1 μM ПА. Это наблюдение можно интерпретировать, предполагая, что именно ДНК-связанный ПА обеспечивает защиту, соответственно степень защиты уменьшается при уменьшении количества связанного с ДНК лиганда. Кроме того, этот результат указывает на то, что защитное действие ПА не связано с перехватом радиационно-индуцированных радикалов в растворе.

Таким образом, полученные результаты поддерживают гипотезу о том, что радиозащитное действие ДНК-лигандов обусловлено связанным с ДНК радиопротектором, который способен восстанавливать предшественники повреждений оснований путем переноса к ним электрона.

1.Young, S.D., Hill, R.P. Br J Cancer. 1989. V.60. P.715.

2.Martin, R.F., Anderson, R.F. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1998. V.42. №4. P.827.

3.Lobachevsky, P.N. et al. Int J Radiat Biol, 2011. V.87. №3. P.274.