

Математическая модель репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках млекопитающих и человека

Одним из актуальных направлений современной радиобиологии является изучение молекулярных механизмов восстановления повреждений ДНК, возникающих в клетке после воздействия ионизирующей радиации. В последние годы наряду с экспериментальными исследованиями в этом направлении все бóльшую значимость приобретает применение расчетных методов, позволяющих моделировать отдельные аспекты работы сложных биофизических систем восстановления живых клеток.

К наиболее тяжелым повреждениям ДНК относятся двунитевые разрывы (ДР), являющиеся во многих случаях молекулярным субстратом для формирования структурных мутаций генов, хромосомных аберраций, инициации злокачественной трансформации и гибели клеток. Восстановление таких повреждений в клетках млекопитающих и человека осуществляется двумя основными репарационными механизмами — путем негомологич-

Mathematical Model of DNA Double-Strand Break Repair in Mammalian and Human Cells

Studying the molecular mechanisms of the repair of ionizing radiation-induced DNA lesions in mammalian cells is one of the topical fields of modern radiobiology. Along with experimental research, computational methods have become increasingly important in recent years in this area. They allow modeling specific aspects of the functioning of complicated biophysical systems of living cell repair.

Double-strand breaks (DSBs) belong to the most severe types of DNA damage. In many cases, they become a molecular substrate for the formation of the structural mutations of genes, chromosome aberrations, and initiation of the malignant transformation of cells and their death. In mammalian and human cells, lesions of this type are mainly repaired through the following mechanisms: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). The spe-

ного воссоединения концов (NHEJ) и гомологичной рекомбинацией (HR). Особенностью NHEJ является возможность его реализации в условиях отсутствия в клетке доступной гомологичной последовательности ДНК. Есть основания полагать, что процесс NHEJ может протекать во всех фазах клеточного цикла, реализуясь с большей частотой, чем альтернативный способ восстановления путем HR [1]. В связи с этим считается, что NHEJ является главным способом репарации ДР в клетках высших эукариот.

В известных работах по математическому моделированию молекулярных механизмов NHEJ наибольшее внимание уделяется описанию репарации, индуцированной редкоизионизирующей радиацией, главным образом γ -квантами и рентгеновским излучением. При этом накоплен значительный объем экспериментальных

данных относительно репарации двунитевых разрывов ДНК, вызванных действием ускоренных тяжелых ионов, которые обладают более высокой повреждающей способностью. В связи с этим в задачи настоящего исследования входила разработка математической модели, способной описать динамические характеристики процесса NHEJ после воздействия ионизирующих излучений разного качества, где особый интерес представляют ускоренные ионы с различной линейной передачей энергии (ЛПЭ).

Предложенная модель включает математическое описание механизма NHEJ в рамках следующих современных представлений о его реализации [2, 3]. Рассматриваемый процесс репарации (рис. 1) условно можно разделить на три этапа, соответствующие синтаптической фазе, фазам обработки концов и лигирования. На первом этапе в течение нескольких секунд после возникновения ДР белковый комплекс Ku70/80 присоединяется к образовавшимся концам ДНК и инициирует NHEJ, вовлекая в процесс восстановления каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs). Гетеродимер Ку и DNA-PKcs формируют ДНК-зависимую протеинкиназу (DNA-PK). Ключевым этапом NHEJ является аутофосфор-

Рис. 1. Общая схема механизма репарации ДР ДНК путем нехомологичного воссоединения концов

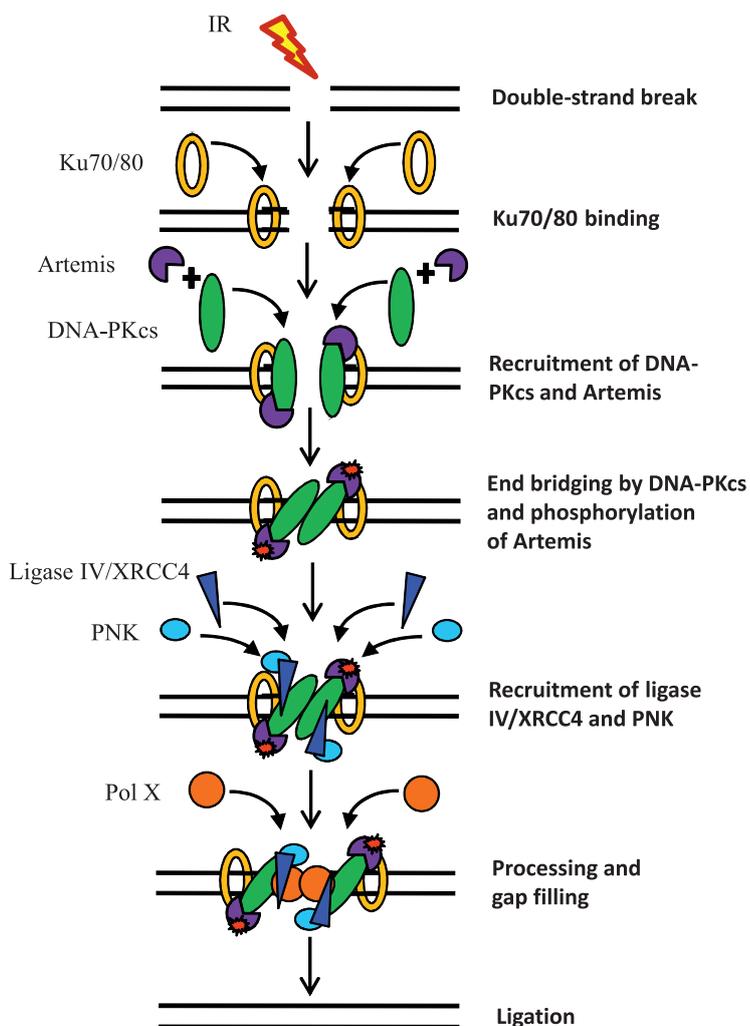


Fig. 1. A general scheme of the NHEJ repair of DNA DSBs

cial feature of NHEJ is that it can be realized in the absence of an available DNA homologous sequence in the cell. There are grounds to believe that NHEJ can take place at all cell cycle phases with a higher frequency than the alternative HR mechanism [1]. In this connection, NHEJ is considered to be the main way of DSB repair in higher eukaryote cells.

The published papers on the mathematical modeling of the NHEJ molecular mechanisms focus on the repair of damage induced by sparsely ionizing radiation — mainly, γ and X-rays. Significant amount of experimental data has been acquired on the repair of DNA DSBs induced by accelerated heavy ions, which have higher damaging capability. For this reason, the present study aimed at the development of a mathematical model that would be able to describe the dynamic characteristics of NHEJ after exposure to ionizing radiations of different quality, among which of special interest are accelerated ions with different linear energy transfer (LET).

The proposed model includes a mathematical description of the NHEJ mechanism within the framework of the following modern concepts of

лирование DNA-ПК, которое приводит к образованию «моста» между двумя концами ДР. Фаза обработки концов протекает с участием нуклеазы Artemis и ДНК-полимераз μ и λ . При этом Artemis, не находящийся в комплексе с DNA-ПК, обладает 5'-3' экзонуклеазной активностью, однако при соединении с аутофосфорилированной DNA-ПК действует как эндонуклеаза. ДНК-полимеразы μ и λ , являющиеся членами семейства ДНК-полимераз X, вовлечены в процесс заполнения образующихся участков однострессовой ДНК. В процессе обработки концов ДР ДНК дополнительно принимает участие полинуклеотидкиназа. На заключительном этапе лигазный комплекс XRCC4/LigIV соединяет специфически обработанные концы ДНК.

Для формализации молекулярных механизмов репарации выбран подход, основанный на описании ферментативных взаимодействий с использованием кинетических уравнений вида

$$\frac{dX}{dt} V_{i+}(X_i, X_0) - V_{i-}(X_i, X_0),$$

где X_i ($i = 1, \dots, n$) — внутриклеточные концентрации регуляторных белковых комплексов n видов, X_0 — концентрация индуцирующего сигнала, представляющего собой определенное количество ДР ДНК, индуцированных излучением; t — время; V_{i+} и V_{i-} — скорости

прироста и сокращения уровня белкового комплекса вида i , участвующего в репарации. В конечном виде предложенная модель представляет собой систему из одиннадцати нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений, решаемых методом Рунге–Кутты четвертого порядка. Параметры модели, определяющие скорости перехода между отдельными состояниями ДНК в комплексе с соответствующими белками, найдены на основании известных к настоящему времени экспериментальных данных и путем фитирования расчетных кривых к результатам измерений, характеризующих кинетику отдельных этапов работы NHEJ.

Решение уравнений предложенной математической модели позволяет получить результаты, отражающие изменение уровня основных белковых комплексов, участвующих в NHEJ, и описать кинетику данного вида репарации. При этом в качестве «маркера» репарации, протекающей путем негомологичного воссоединения концов, в модели принимается уровень фокусов γ -H2AX, локализованных с фокусами DNA-ПКcs, что соответствует традиционным экспериментальным методам идентификации восстановления ДР ДНК путем NHEJ.

На рис. 2 приведены результаты расчетов, описывающие кинетику двух важных этапов репарационного

its realization [2, 3]. For convenience, the considered repair process (Fig. 1) can be divided into three stages: the synaptic phase and the phases of processing the ends and ligation. At the first stage, during several seconds after DSB formation, the Ku70/80 protein complex binds with the DNA ends that emerged and initiates NHEJ, involving the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) in the repair process. The heterodimer Ku and DNA-PKcs form a DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). The key stage of NHEJ is DNA-PK autophosphorylation, which produces a “bridge” between the two DSB ends. The end processing phase progresses with the participation of the nuclease Artemis and DNA polymerases μ and λ . Artemis, which is not in a complex with DNA-PK, has 5'-3' exonuclease activity; but when combined with autophosphorylated DNA-PK, it acts like an endonuclease. DNA polymerases μ and λ , which belong to the X family of DNA polymerases, are involved in the process of filling the formed single-strand DNA sections. Also, polynucleotide kinase participates in processing the DNA DSB ends. At the final stage, the XRCC4/LigIV ligase complex connects the specifically processed DNA ends.

To formalize the molecular mechanisms of repair, an approach has been chosen that is based on the description of enzymatic interactions using kinetic equations of the following type:

$$\frac{dX}{dt} V_{i+}(X_i, X_0) - V_{i-}(X_i, X_0),$$

where X_i ($i = 1, \dots, n$) are the intracellular concentrations of regulatory protein complexes of n types; X_0 is the concentration of the inducing signal, which is some number of radiation-induced DNA DSBs; t is time; and V_{i+} and V_{i-} are, respectively, the rates of the increase and decrease in the level of the i th protein complex participating in repair. Finally, the proposed model is a system of 11 non-linear ordinary differential equations that are solved by the fourth-order Runge–Kutta method. The model parameters determining the transition rates between separate DNA states in a complex with the corresponding proteins were found based on the known experimental data and by fitting the calculated curves to the measurement results characterizing the kinetics of the specific NHEJ stages.

Solving the equations of the proposed model allows one to obtain the results reflecting changes in the levels of the main protein complexes participating in NHEJ and to

процесса, протекающего в культуре фибробластов кожи человека HSF42 после воздействия ионизирующих излучений с разной ЛПЭ. Рис. 2, *а* отражает динамику вовлечения фосфорилированной ДНК-зависимой протеинкиназы в процесс восстановления повреждений, индуцированных γ -квантами и ускоренными ионами железа (1 ГэВ/нуклон) в одинаковой дозе, равной 1 Гр. На рис. 2, *б* представлены результаты расчетов, описывающие кинетику индукции фокусов γ -H2AX, колокализированных с DNA-PKcs, для разных видов ионизирующих излучений в широком диапазоне ЛПЭ (0,2–236 кэВ/мкм). Приведенные на рисунках экспериментальные данные свидетельствуют о корректном воспроизведении в модели основных закономерностей реализации NHEJ в фибробластах кожи человека при действии радиации. Совпадение рассчитанных времен, на которых наблюдаются максимальные и минимальные значения белковых комплексов, с экспериментальными значени-

ями [4] дает основание полагать, что модель корректно воспроизводит сравнительно короткий период индукции фокусов, который в ряде случаев достаточно сложно измерить в эксперименте.

Специфика репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений разного качества учтена в модели путем вариации параметров, характеризующих скорость связывания гетеродимера Ku70/80 с повреждением, и введения величин, отражающих уровень ДР, не подвергающихся репарации с помощью механизма NHEJ. Такой подход соответствует современным представлениям о зависимости определенных скоростных характеристик NHEJ от вида излучения. При этом с учетом результатов современных экспериментальных исследований [5] полагается, что данная зависимость реализуется через специфику индуцируемых повреждений.

Рис. 2. Изменение уровня фокусов DNA-PKcs (*а*) и фокусов γ -H2AX, колокализированных с DNA-PKcs (*б*) в культуре фибробластов кожи человека HSF42 при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками в дозе 1 Гр. ЛПЭ частиц (кэВ/мкм): $L_{Cs} = 0,2$; $L_O = 14$; $L_{Si} = 44$; $L_{Fe1,0} = 150$; $L_{Fe0,3} = 236$. Кривые — результаты расчета, точки — экспериментальные данные [4]

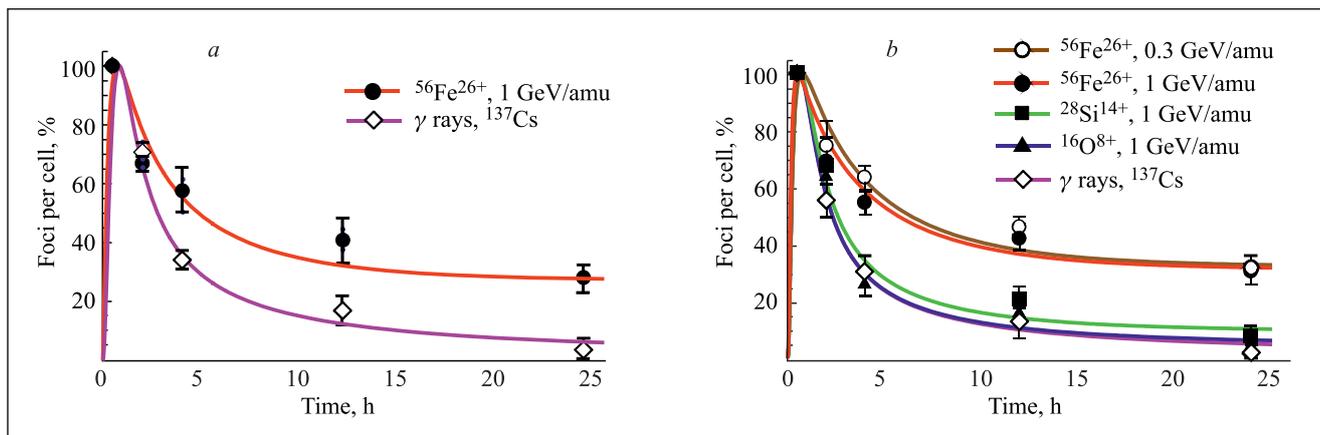


Fig. 2. Changes in the level of DNA-PKcs (*a*) and γ -H2AX foci co-localized with DNA-PKcs (*b*) in a culture of human skin fibroblasts HSF42 after exposure to ionizing radiations with different physical characteristics at 1 Gy. Particle LET, keV/ μm : $L_{Cs} = 0.2$; $L_O = 14$; $L_{Si} = 44$; $L_{Fe1,0} = 150$; $L_{Fe0,3} = 236$. The curves are the calculated results; the dots are experimental data [4]

describe the kinetics of this type of repair. As an NHEJ repair marker, the level of the γ -H2AX foci, which are co-localized with the DNA-PKcs foci, is taken in the model. This choice corresponds to the traditional experimental methods of the identification of the NHEJ repair of DNA DSBs.

Figure 2 shows the calculated kinetics of two important stages of repair in a culture of human skin fibroblasts HSF42 after exposure to ionizing radiations with different LET. Figure 2, *a* illustrates the dynamics of the involvement of a phosphorylated DNA-dependent protein kinase in the repair of damage induced by γ rays and accelerated iron

ions (1 GeV/nucleon) at the same dose of 1 Gy. Figure 2, *b* shows the calculated kinetics of the induction of γ -H2AX foci co-localized with DNA-PKcs for different ionizing radiations in the LET range of 0.2–236 keV/ μm . The experimental data in these graphs indicate that the model reproduces correctly the main NHEJ regularities in human skin fibroblasts under exposure to radiation. The agreement between the calculated times at which the maximal and minimal concentrations of protein complexes are observed and the corresponding experimental values [4] suggest that the model correctly reproduces a relatively short period of the

Предложенная математическая модель, отражающая общие принципы репарации ДР ДНК по механизму NHEJ, предполагает дальнейшее развитие, связанное с учетом второго основного способа восстановления таких повреждений путем гомологичной рекомбинации. При этом представляется возможным построение модели, отражающей баланс между двумя репарационными системами, вносящими неодинаковый вклад в репарацию ДР у клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла.

Список литературы / References

1. *Asaithamby A., Chen D.J.* // *Mutat. Res.* 2011. V. 711. P. 87–89.
2. *Lieber M.R.* // *Ann. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 181–211.
3. *Hefferin M.L., Tomkinson A.E.* // *DNA Repair.* 2005. V. 4. P. 639–648.
4. *Asaithamby A., Uematsu N., Chatterjee A., Story M.D., Burma S., Chen D.J.* // *Rad. Res.* 2008. V. 169. P. 437–446.
5. *Reynolds P., Anderson J.A., Harper J.V., Hill M.A., Botchway S.W., Parker A.W., O'Neill P.* // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. P. 10821–10831.