

МОДЕЛИРОВАНИЕ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Васильева М.А., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований

ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: mal2008@jinr.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0560

Аннотация. В настоящей работе предложено математическое описание основных путей репарации одностранных разрывов (ОР) ДНК, повреждений оснований (ПО), двустранных разрывов (ДР) ДНК в клетках млекопитающих и человека. Модельный подход отражает ключевые молекулярные механизмы восстановления ДНК путем репарации одностранных разрывов ДНК, эксцизионной репарации оснований (BER), негомологичного воссоединения концов (NHEJ). Для формализации молекулярных механизмов составлена динамическая система из дифференциальных уравнений, описывающая химическую кинетику белковых взаимодействий в соответствии с современными представлениями молекулярной биологии. Учет всех трех репарационных механизмов позволяет более полно описать ответ клетки на облучение тяжелыми заряженными частицами. Предложенная модель корректно описывает основные процессы, протекающие в ходе репарации ОР, BER и NHEJ. В ходе работы рассчитана временная динамика формирования и репарации ключевых типов повреждений ДНК (ПО, ОР, ДР) в клетках человека при действии ионов ^{56}Fe ($E = 600$ Мэв/нукл). Проведен сравнительный анализ выхода и репарации повреждений ДНК при действии ионов ^{12}C ($E = 270$ Мэв/нукл) и ^{56}Fe ($E = 600$ Мэв/нукл) в дозе 1 Гр.

Ключевые слова: одностранные разрывы ДНК, двустранные разрывы ДНК, повреждения оснований, кластерные разрывы ДНК, ЛПЭ, репарация, моделирование.

Тяжелые заряженные частицы при воздействии на клетку способны индуцировать повреждения ДНК разной степени сложности, включая одностранные (ОР) и двустранные (ДР) разрывы ДНК, повреждения оснований (ПО), а также труднорепазируемые кластерные разрывы ДНК. Причем характер повреждений ДНК изменяется в зависимости от величины линейной передачи энергии (ЛПЭ) различных заряженных частиц. Так, в работе [1] было показано, что ростом ЛПЭ выход ОР и ПО уменьшается, а выход ДР и кластерных двустранных разрывов (кДР) наоборот возрастает. Образование тяжелых повреждений ДНК влечет за собой нарушения генетических структур, что приводит к гибели клеток, а также появлению мутантных форм белков, являющихся основной причиной онкогенеза. Для поддержания целостности ДНК в процессе эволюции в клетках сформировалась сложная система восстановления структуры ДНК, которая распознает различные типы повреждений и активирует специфические пути репараций поврежденной ДНК [2]. Поэтому изучение систем репарации повреждений ДНК, механизмов активации и взаимодействия ключевых репаративных белков, действие которых направлено на восстановление возникающих повреждений ДНК, является актуальной задачей современной радиобиологии.

Наличие в клетках живых организмов целого ряда систем репарации ДНК обусловлено широким спектром повреждений структуры ДНК, образующихся при действии факторов внешней и внутренней среды. Клетки млекопитающих могут использовать различные пути восстановления ДНК в зависимости от типа повреждения, распределения повреждения и фазы клеточного цикла. При действии ионизирующего излучения (ИИ) наиболее частыми повреждениями структуры ДНК являются поврежденные (модифицированные) основания, которые восстанавливаются в ходе эксцизионной репарации оснований (BER) [3]. Такие повреждения не приводят к нарушению репликации, но являются источником мутаций. Одностранные разрывы ДНК в клетках про- и эукариот представлены в виде: прямых ОР, образующихся в результате разрыва сахарофосфатного остова ДНК при действии ИИ, и энigmatических ОР, возникающих в процессе энзиматического расщепления фосфодиэфирной связи в ходе BER. Восстановление таких повреждений осуществляется посредством репарации одностранных разрывов ДНК и эксцизионной репарации оснований, соответственно [4]. В клетках млекопитающих для удаления наиболее тяжелых структурных повреждений ДНК, представляющих собой двустранные разрывы, применяются гомологичная рекомбинация (HR), негомологичное воссоединение концов (NHEJ) [5-7]. Считается, что HR является точным путем репарации, в то время как в ходе работы NHEJ возможны делеции и вставки нескольких пар нуклеотидов [8,9]. В клетках млекопитающих и человека NHEJ является основным репаративным процессом, способным восстанавливать повреждения ДНК в любой фазе клеточного цикла. Напротив, работа HR ограничена поздней S и G2 фазами, т.к. для ее реализации требуется наличие сестринской хромосомы [10].

В последние годы молекулярная биология выявила значительное число качественной и количественной информации о механизмах действия репаративных белков на различные типы повреждений, вызванных ионизирующим излучением. Однако полноценное изучение данного явления представляется крайне затруднительным без применения методов математического моделирования, которые позволяют систематизировать экспериментальные данные и более полно описать закономерности молекулярных

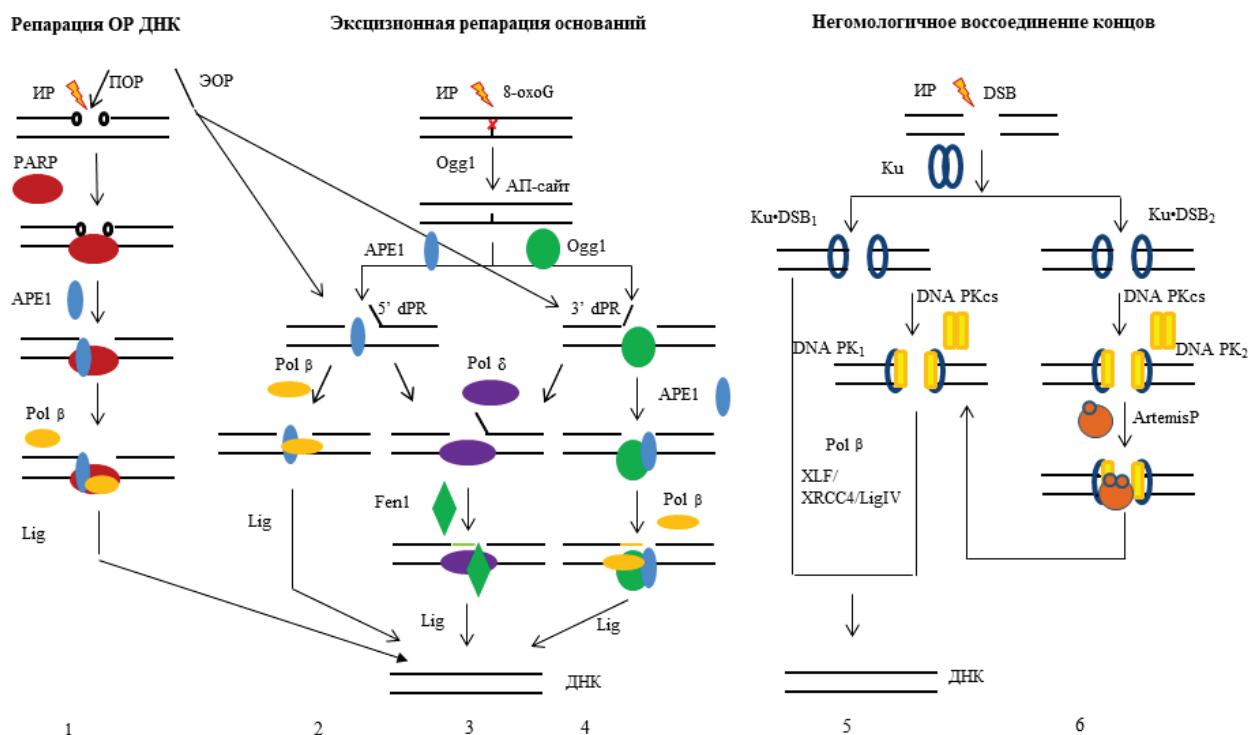


Рисунок 1. Схема механизмов репарации ДНК в клетках млекопитающих и человека

взаимодействий, ответственных за восстановление поврежденной ДНК. Большинство существующих в настоящее время работ по математическому моделированию в области репарации ДНК в клетках млекопитающих и человека представляют собой модели отдельных путей восстановления повреждений ДНК и в них не рассматриваются возможные взаимодействия между различными путями репарации [11-15]. В рамках настоящего исследования предложено математическое описание основных путей репарации повреждений ДНК: репарация однонитевых разрывов ДНК, эксцизионная репарация оснований, негомологичное воссоединение концов.

Математическая модель. На основании современных экспериментальных данных выделены ключевые пути процессов репарации ДНК, вносящие наибольший вклад в эффективность репарации ОР, BER, NHEJ (рис. 1). Формализация молекулярных механизмов выполнена с использованием подхода, основанного на классическом описании ферментативных взаимодействий посредством кинетических уравнений. Наряду с моделированием взаимодействий основных регуляторных белков и белковых комплексов было учтено наличие метастабильных состояний ДНК, формирующихся на разных стадиях репарации.

Эксцизионная репарация оснований. Эксцизионная репарация оснований представляет собой сложную систему скоординированных последовательных ферментативных реакций, направленных на удаление ряда повреждений ДНК: модифицированные основания, АП-сайты, однонитевые разрывы ДНК. Одним из наиболее изученных и часто встречающихся типов поврежденных оснований ДНК, в ходе опосредованного действия ИИ на клетки, является 8-оксогуанин (8-охоG). ДНК-гликозилаза (Ogg1) распознает и удаляет сайт, содержащий 8-охоG, путем гидролиза N-гликозильной связи между сахарофосфатным остовом и поврежденным основанием, инициируя таким образом BER [16]. В результате удаления модифицированного основания в молекуле ДНК образуется АП-сайт. В некоторых случаях Ogg1, проявляя активность АП-лиазы, способна расщеплять нить ДНК с 3' конца от АП-сайта, и формировать однонитевой разрыв (рис. 1₄). Затем АП-эндонуклеаза (Ape1), обладающая 3'-фосфодиэстеразной активностью, удаляет 3'-обструктивный конец, который препятствует репаративному синтезу. После удаления 3'-блокирующей группы ДНК-полимераза β (Polβ) заполняет брешь ДНК, которая в последствии восстанавливается с помощью ДНК-лигазы 1 (Lig1).

В большинстве случаев разрыв фосфодиэфирной связи ДНК с 5' конца от АП-сайта осуществляется Ape1 эндонуклеазой (рис. 1₂). При этом образуются нормальная 3'-гидроксильная группа и 5'-дезоксирибозофосфатный (dRp) фрагмент. Белок Polβ, обладая полимеразной и dRp-лиазной активностями, синтезирует образовавшийся разрыв цепи ДНК длиной 1 бр и удаляет 5' dRp фрагмент ДНК. Завершается репарационный синтез лигированием посредством комплекса XRCC1/Lig3.

Существует также альтернативный путь BER (рис. 1₃), который включает синтез участка ДНК длиной более одного нуклеотида PCNA-зависимыми полимеразми Pol δ или Pol ε. В ходе работы Pol δ происходит вытеснение участка ДНК, содержащей нуклеотид с поврежденным 5'-концом (flap structure), который удаляется с помощью эндонуклеазы FEN1, а конечный разрыв восстанавливается ДНК-лигазой 1 или XRCC1/Lig3 комплексом.

Имеющиеся экспериментальные данные показывают, что в клетках млекопитающих ежедневно образуются спонтанные повреждения оснований. Их число варьирует в пределах 100-500 сайтов 8-охоG в день [17], и примерно 10000 АП-сайтов в день [18]. Учитывая этот факт, кинетические изменения белков и белковых комплексов BER (рис. 1₂₋₄) можно описать в виде системы обыкновенных дифференциальных уравнений, где, согласно основному уравнению ферментативной кинетики Михаэлиса-Ментена, k_i – константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса, K_i – коэффициент Михаэлиса для реакции типа i , значения вида $[A]$ – внутриклеточные концентрации белков и белковых комплексов системы BER:

$$\begin{aligned} \frac{d[8\text{-охоG}]}{dt} &= 10^{-3} - \frac{k_1 \cdot [\text{Ogg1}] \cdot [8\text{-охоG}]}{[8\text{-охоG}] + K_1}, \\ \frac{d[\text{AP}]}{dt} &= 0.12 + \frac{k_1 \cdot [\text{Ogg1}] \cdot [8\text{-охоG}]}{[8\text{-охоG}] + K_1} - k_2 \cdot [\text{AP}] - \frac{k_3 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[\text{AP}] + K_3}, \\ \frac{d[3'\text{dPR}]}{dt} &= k_2 \cdot [\text{AP}] - \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_4} - \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_7}, \\ \frac{d[\text{SSBe}]}{dt} &= \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_4} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSBe}]}{[\text{SSBe}] + K_5}, \\ \frac{d[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSBe}]}{[\text{SSBe}] + K_5} - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta] + K_6}, \\ \frac{d[5'\text{dPR}]}{dt} &= \frac{k_3 \cdot [\text{APE1}] \cdot [3'\text{dPR}]}{[\text{AP}] + K_3} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_5} - \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_7}, \\ \frac{d[5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_5} - k_8 \cdot [5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta], \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= k_8 \cdot [5'\text{dPR} - \text{Pol}\beta] - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{dt} &= \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [3'\text{dPR}]}{[3'\text{dPR}] + K_7} + \frac{k_7 \cdot [\text{Pol}\delta] \cdot [5'\text{dPR}]}{[5'\text{dPR}] + K_7} - \frac{k_9 \cdot [\text{Fen1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta] + K_9}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}]}{dt} &= \frac{k_9 \cdot [\text{Fen1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta] + K_9} - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] + K_6}, \\ \frac{d[\text{DNA}]}{dt} &= \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSBe} + \text{Pol}\beta]}{[\text{SSBe} + \text{Pol}\beta] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{Lig1}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\delta - \text{Fen1}] + K_6} + \frac{k_6 \cdot [\text{Lig3}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}. \end{aligned}$$

Репарация ор ДНК. Однонитевые разрывы представляют собой нарушение целостности одной из двух нитей ДНК. Репарация энзиматических ОР, продуцируемых АРЕ1 эндонуклеазой, осуществляется в ходе работы ферментов BER [4]. Напротив, прямые ОР, как результат непосредственного действия ИИ на фрагменты ДНК, являются субстратом для белка PARP1 (рис. 1₁). Белок PARP – ключевой белок системы репарации однонитевых разрывов ДНК. Связываясь с ДНК, он активирует синтез других ферментов репарации, участвует в синтезе АТФ при осуществлении заключительной стадии репарации – лигировании концевых групп ДНК, и ингибирует нежелательную рекомбинацию. Большинство ОР ДНК имеют 3'- и 5'-концы, препятствующие нормальному синтезу нити ДНК. Для завершения репарации эти концы должны быть восстановлены до 3'-ОН и 5'-РО₄ фрагментов. Прямые ОР содержат 3'-фосфатный которые удаляются посредством эстеразной активности АРЕ1 эндонуклеазы. Большая роль в этом процессе отводится белку XRCC1, способному рекрутировать и стимулировать работу полипептидов в ходе репарации ОР. Затем ДНК-полимераза β синтезирует обработанный ОР, и завершается репарационный процесс лигированием концов ДНК лигазой 1.

Описанный выше процесс схематически изображен на (рис. 1₁), и представлен в виде следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{SSB}]}{dt} &= - \frac{k_{10} \cdot [\text{PARP}] \cdot [\text{SSB}]}{[\text{SSB}] + K_{10}}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{PARP}]}{dt} &= \frac{k_{10} \cdot [\text{PARP}] \cdot [\text{SSB}]}{[\text{SSB}] + K_{10}} - \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [\text{SSB} - \text{PARP}]}{[\text{SSB} - \text{PARP}] + K_4}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{APE1}]}{dt} &= \frac{k_4 \cdot [\text{APE1}] \cdot [\text{SSB} - \text{PARP}]}{[\text{SSB} - \text{PARP}] + K_4} - \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSB} - \text{APE1}]}{[\text{SSB} - \text{APE1}] + K_5}, \\ \frac{d[\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{dt} &= \frac{k_5 \cdot [\text{Pol}\beta] \cdot [\text{SSB} - \text{APE1}]}{[\text{SSB} - \text{APE1}] + K_5} - \frac{k_6 \cdot [\text{Lig3}] \cdot [\text{SSB} - \text{Pol}\beta]}{[\text{SSB} - \text{Pol}\beta] + K_6}. \end{aligned}$$

Негомологичное воссоединение концов (NHEJ). Двунитевые разрывы ДНК представляют собой наиболее опасный тип повреждений ДНК, который часто приводит к индукции структурных генных мутаций, хромосомных aberrаций и к гибели клеток в целом [20]. Репарация ДР ДНК в клетках млекопитающих осуществляется в ходе негомологичного воссоединения концов на протяжении всех фаз клеточного цикла. В ходе NHEJ комплекс белков Ku70 и Ku80 распознает и образует кольцо вокруг поврежденных концов ДНК, обладая высоким сродством к ним [21]. Затем Ku присоединяет ДНК-зависимую каталитическую субъединицу протеинкиназы (DNA-ПКcs), образуя комплекс ДНК-ПК (молекула ДНК, Ku, и ДНК-ПКcs) [22]. Находясь внутри комплекса ДНК-ПК, белок ДНК-ПКcs становится активным и фосфорилирует несколько мишеней, в том числе и себя. Предполагается, что это аутофосфорилирование необходимо для диссоциации молекул ДНК-ПКcs с поврежденных концов ДНК [23]. Ku и ДНК-ПК способны связывать комплекс, состоящий из XRCC4-подобного фактора (XLF), XRCC4 и ДНК лигазы IV (комплекс XXL). XLF и XRCC4 повышают стабильность и активность ДНК лигазы IV, которая необходима для соединения поврежденных концов [24-26].

Репарация ДР ДНК состоит из быстрой и медленной фаз. Быстрая фаза репарации осуществляется механизмом, описанном выше (рис. 1₅). На ее долю приходится 80-90% двунитевых повреждений ДНК. Однако примерно 10 - 20% ДР ДНК восстанавливаются в ходе медленной фазы (рис. 1₆). Имеются данные, что такие повреждения носят комплексный характер, определяющийся наличием вблизи двунитевого разрыва ДНК поврежденного основания, одноститевого разрыва, двух или более ДР ДНК в пределах одного - двух спиральных витков ДНК [26,28]. Медленный тип репарации зависит от белков ataxia telangiectasia mutated (ATM) и Artemis, помимо основных компонентов NHEJ. Предполагается, что белки ATM и Artemis необходимы для обработки концов поврежденной ДНК перед лигированием [29,30]. Несмотря на то, что во время медленной фазы NHEJ восстанавливается небольшое количество ДР, сбой в функции ATM и Artemis значительно снижает выживаемость клеток в фазе G1 клеточного цикла.

Схематическое описание кинетической модели NHEJ представлено на рисунке 1₅₋₆. В модели белки Ku70 и Ku80 объединены в один белковый комплекс Ku, который представляет собой димер, обладающий высоким сродством к концевому участку ДР ДНК. С другой стороны, на заключающем этапе NHEJ в лигировании свободных двунитевых концов ДНК участвует комплекс связанных белков – XLF-XRCC4/ligase IV, объединенных в гомодимер XXL.

Учитывая существование двух фаз репарации NHEJ, можно разделить белковые комплексы, образующиеся при связывании димера Ku с ДР ДНК, на две группы: Ku-DSB₁ и Ku-DSB₂. Ku-DSB₁ и Ku-DSB₂ участвуют в восстановлении двунитевых разрывов ДНК в ходе быстрой и медленной фаз репарации, соответственно. Их выход в работе представлен в следующем долевым соотношении: 0,85 молекул Ku-DSB₁ и 0,15 молекул Ku-DSB₂.

Математическое описание представленных этапов NHEJ можно записать в виде следующей системы дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{DSB}]}{dt} &= -v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2, \\ \frac{d[\text{Ku}]}{dt} &= -2 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 + 2 \cdot \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}} + 2 \cdot \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}}, \\ \frac{d[\text{Ku-DSB1}]}{dt} &= 0.85 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 - v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2 - \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}}, \\ \frac{d[\text{Ku-DSB2}]}{dt} &= 0.15 \cdot v_{11} \cdot [\text{DSB}] \cdot [\text{Ku}]^2 - v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2, \\ \frac{d[\text{DNA-ПКcs}]}{dt} &= -2 \cdot v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2 - 2 \cdot v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2 + \frac{2 \cdot k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}}, \\ \frac{d[\text{DNA PK1}]}{dt} &= v_{12} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2 - \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}} + \frac{k_{18} \cdot 2 \cdot [\text{DNA PK2}] \cdot [\text{ArtemisPP}]}{2 \cdot [\text{DNA PK2}] + K_{18}}, \\ \frac{d[\text{Artemis}]}{dt} &= -\frac{k_{16} \cdot [\text{Artemis}] \cdot [\text{ATM}]}{[\text{Artemis}] + K_{16}}, \\ \frac{d[\text{ArtemisP}]}{dt} &= \frac{k_{16} \cdot [\text{Artemis}] \cdot [\text{ATM}]}{[\text{Artemis}] + K_{16}} - \frac{k_{17} \cdot 2 \cdot ([\text{DNA PK1}] + [\text{DNA PK2}]) \cdot [\text{ArtemisP}]}{[\text{ArtemisP}] + K_{17}}, \\ \frac{d[\text{ArtemisPP}]}{dt} &= \frac{k_{17} \cdot 2 \cdot ([\text{DNA PK1}] + [\text{DNA PK2}]) \cdot [\text{ArtemisP}]}{[\text{ArtemisP}] + K_{17}}, \\ \frac{d[\text{DNA PK2}]}{dt} &= v_{13} \cdot [\text{Ku-DSB2}] \cdot [\text{DNA-ПКcs}]^2 - \frac{k_{18} \cdot 2 \cdot [\text{DNA PK2}] \cdot [\text{ArtemisPP}]}{2 \cdot [\text{DNA PK2}] + K_{18}}, \end{aligned}$$

$$\frac{d[\text{Repaired DSB}]}{dt} = \frac{k_{14} \cdot [\text{DNA PK1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{DNA PK1}] + K_{14}} + \frac{k_{15} \cdot [\text{Ku-DSB1}] \cdot [\text{XXL}]}{[\text{Ku-DSB1}] + K_{15}}$$

Параметры модели. В рамках настоящего исследования предложено математическое описание основных путей репарации повреждений ДНК (репарация однонитевых разрывов ДНК, эксцизионная репарация оснований (BER), негомологичное воссоединение концов (NHEJ)). Для формализации молекулярных механизмов составлена динамическая система из дифференциальных уравнений, описывающая химическую кинетику белковых взаимодействий. Параметры модели, представленные в таблице 1, были получены из экспериментальных данных.

Начальные концентрации белков каждого вида определяются как количество молекул этого вида на ядро клетки. Значения начальных концентраций ключевых белков репаративных систем представлены в таблице 2. Значения концентраций промежуточных белковых комплексов в начальный момент времени приняты равными 0.

Значения, характеризующие выход начальных повреждений ДНК на 1 Гр поглощенной дозы при воздействии на ядро клетки тяжелых ядер железа и углерода (табл. 3), взяты из работы [1].

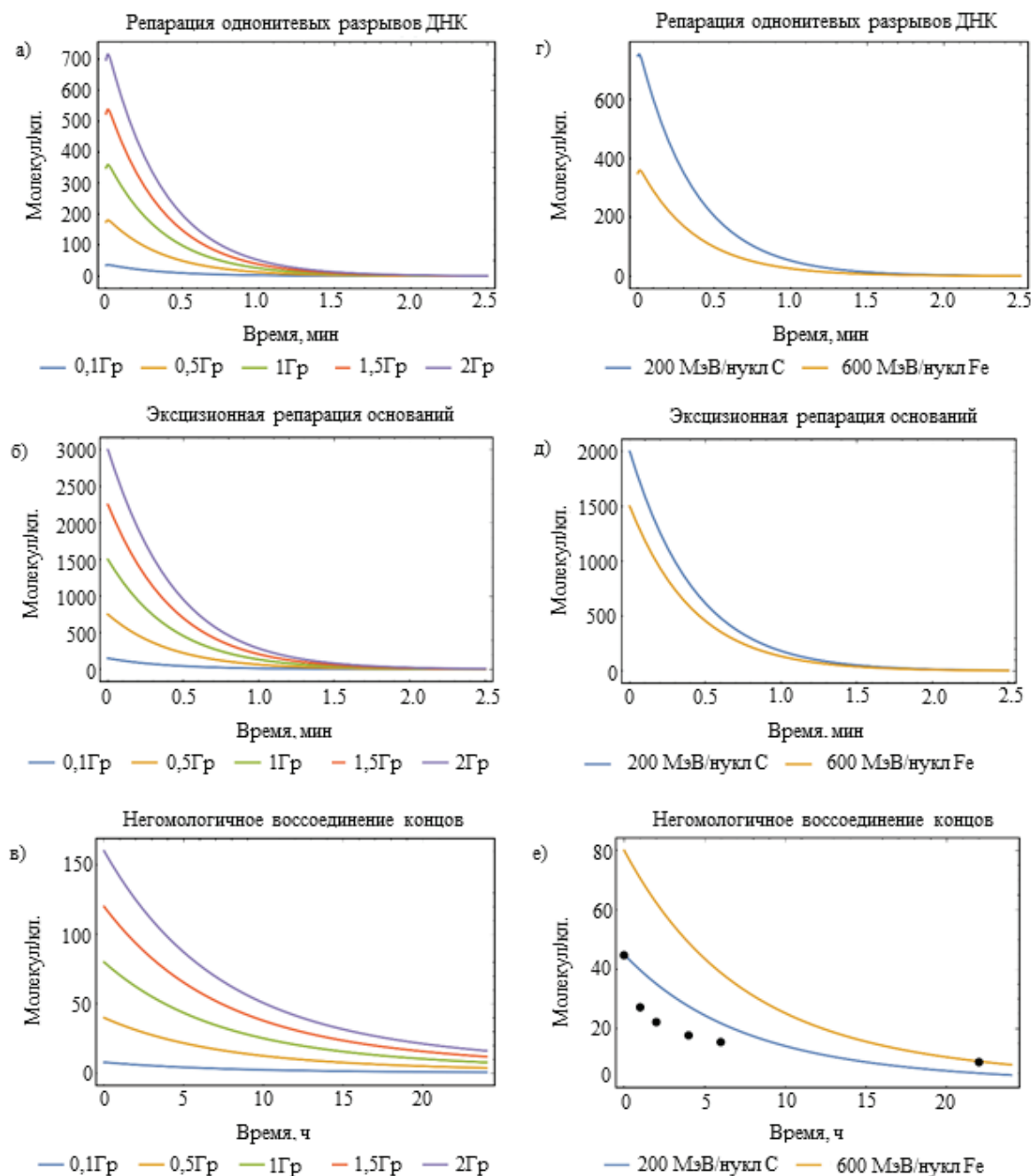


Рисунок 2. Модельный расчет динамики процессов репарации ОР ДНК, ПО и ДР ДНК в клетках человека при действии ионов: (а-в) ⁵⁶Fe с ЛПЭ = 170 кэВ/мкм в дозах 0,1 Гр, 0,5 Гр, 1 Гр, 1,5 Гр, 2 Гр; (г-е) ¹²C с ЛПЭ = 16 кэВ/мкм и ⁵⁶Fe с ЛПЭ = 170 кэВ/мкм в дозе 1 Гр. Экспериментальные данные по репарации ДР в фибробластах кожи человека, индуцируемые ионами ¹²C представлены в работе [30]

Таблица 1. Значения параметров модели

Параметр	Значение, ед.	Параметр	Значение, ед.	Параметр	Значение, ед.
k_1	$7,55 \cdot 10^{-3}$, сек ⁻¹	k_{15}	$6,67 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	K_{10}	7183, молек/кл
k_2	$1,335 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	k_{16}	$1,9 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_{14}	10000, молек/кл
k_3	3,08, сек ⁻¹	k_{17}	$1,9 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_{15}	48000, молек/кл
k_4	$5,0 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	k_{18}	$3,0 \cdot 10^{-5}$, сек ⁻¹	K_{16}	10000, молек/кл
k_5	$6,25 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_1	22432, молек/кл	K_{17}	10000, молек/кл
k_6	$4,0 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	K_3	81933, молек/кл	K_{18}	240, молек/кл
k_7	$2,2 \cdot 10^{-3}$, сек ⁻¹	K_4	327731, молек/кл	ν_{11}	$9,6 \cdot 10^{-5}$, молек ⁻² ·сек ⁻¹
k_8	$7,5 \cdot 10^{-2}$, сек ⁻¹	K_5	757576, молек/кл	ν_{12}	$5,8 \cdot 10^{-4}$, молек ⁻² ·сек ⁻¹
k_9	$7,8 \cdot 10^{-1}$, сек ⁻¹	K_6	3937, молек/кл	ν_{13}	$5,8 \cdot 10^{-4}$, молек ⁻² ·сек ⁻¹
k_{10}	$1,51 \cdot 10^{-9}$, сек ⁻¹	K_7	169192, молек/кл		
k_{14}	$6,67 \cdot 10^{-4}$, сек ⁻¹	K_9	98485, молек/кл		

Таблица 2. Начальные значения концентрации белков репарации

Фермент	Начальное значение, молек/кл	Фермент	Начальное значение, молек/кл
Ogg1	123000	PARP	500000
APe1	300000	Ku	400000
Pol β	50000	DNA-ПКcs	80000
Pol δ	50000	XXL	3000
Fen1	50000	ATM	140
Lig1	5000	Artemis	50
Lig3	5000		

Таблица 3. Выход повреждений в зависимости от ЛПЭ заряженных частиц на 1 поглощенной дозы [1]

	ПО	ОР	ДР	кДР
¹² C ($E = 200$ МэВ/нукл, ЛПЭ = 16 кэВ/мкм)	2000	750	45	2
⁵⁶ Fe ($E = 600$ МэВ/нукл, ЛПЭ = 170 кэВ/мкм)	1500	350	80	25

Численное интегрирование полученных нелинейных дифференциальных уравнений произведено в программном пакете Wolfram Mathematica, который также был использован для анализа и визуализации полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате численного решения уравнений настоящей модели были построены кривые (рис. 2), описывающие динамику систем репарации основных повреждений молекулы ДНК при облучении ее ядрами тяжелых заряженных частиц ¹²C и ⁵⁶Fe. Видно, что кривые, описывающие кинетику репарации при этих воздействиях, имеют экспоненциальный вид. При моделировании дозовой зависимости ответа клеток на повреждающее действие ядер железа были рассмотрены следующие значения поглощенной дозы: 0,1 Гр, 0,5 Гр, 1 Гр, 1,5 Гр, 2 Гр (рис. 2 а-в). С ростом дозы происходит значительное увеличение выхода повреждений оснований. Выход повреждений оснований примерно в 20 раз выше, чем выход ДР ДНК, и примерно в 4 раза выше, чем выход ОР ДНК. ПО и ОР восстанавливаются достаточно быстро (1,5–2 минуты) в ходе эксцизионной репарации оснований и репарации однонитевых разрывов ДНК. Репарация двунитевых разрывов ДНК – более сложный процесс. На восстановление клеток требуется больше 20 часов.

Анализ кривых, представленных на рисунке 2 г-е, показывает, что с ростом ЛПЭ выход ОР ДНК и ПО уменьшается, в то же время происходит увеличение выхода ДР ДНК. Представленные на рисунке 2е экспериментальные данные были получены в работе [30]. Для анализа повреждений ДНК в фибробластах кожи человека, находящихся в интерфазе, был применен метод преждевременной конденсации хромосом (PCC, premature chromosome condensation), позволяющий определить начальное число ДР почти сразу после облучения. Облучение клеток проводилось ионами ¹²C с $E = 200$ МэВ/нукл (ЛПЭ = 16 кэВ/мкм). Полученные в ходе моделирования репарационных систем кривые согласуются с экспериментом.

Таким образом можно заключить, что предложенный нами модельный подход демонстрирует возможность механического описания трех основных систем репарации, способных восстанавливать повреждения ДНК в клетках млекопитающих и человека, при воздействии на них тяжелых заряженных ионов. Математическое описание этих систем осуществлялось в соответствии с концепциями современной системной биологии и методами моделирования сложных биологических взаимодействий. Модель адекватно описывает основные процессы, протекающие в ходе репарации ОР, BER и NHEJ.

Список литературы / References:

1. Батмунх М., Баярчимэг Л., Бугай А.Н., Лхагва О. Компьютерное моделирование формирования повреждений ДНК в нервных клетках при воздействии тяжелых заряженных частиц. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 2, с. 214-219. [Batmunkh M., Bayarchimeg L., Bugay A.N., Lkhagva O. Computer simulation of the DNA damage formation in neural cells under exposure to heavy charged particles. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 214-219. (In Russ.)]
2. Zhou B.B., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, vol. 408, pp. 433-439.
3. Memislogu A., Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.*, 2000, vol. 451, pp. 39-51.
4. Caldecott K.W. DNA Single-Strand Break Repair and Spinocerebellar Ataxia. *Cell*, 2003, vol. 112, pp. 7-10.
5. Kanaar R., Hoeijmakers J.H.J., van Gent D.C. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends Cell Biol.*, 1998, vol. 8, pp. 483-489.
6. Symington L.S., Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.*, 2011, vol. 45, pp. 247-271.
7. Neal J.A., Meek K. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.*, 2011, vol. 711, pp. 73-86.
8. Robberecht C., Voet T., Esteki M.Z., Nowakowska B.A., Vermeesch J.R. Nonallelic homologous recombination between retrotransposable elements is a driver of de novo unbalanced translocations. *Genome Res.*, 2013, vol. 23, pp. 411-418.
9. McVey M., Lee S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.*, 2008, vol. 24, pp. 529-538.
10. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 2010, vol. 44, pp. 113-139.
11. Sokhansanj B.A., Rodrigue G.R., Fitch J.P., Wilson III D.M. A quantitative model of human DNA base excision repair. I. Mechanistic insights. *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, no. 8, pp. 1817-1825.
12. Kessler K.J., Kaufmann W.K., Reardon J.T., Elston T.C., Sancar A. A mathematical model for human nucleotide excision repair: damage recognition by random order assembly and kinetic proofreading. *J. Theor. Biol.*, 2007, vol. 249, no. 2, pp. 361-375.
13. Cucinotta F.A., Pluth J.M., Anderson J.A., Harper J.V., O'Neill P. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining. *Radiat. Res.*, 2008, vol. 169, no. 2, pp. 214-222.
14. Taleei R., Nikjoo H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. *Mutation Research*, 2013, vol. 756, no. 1-2, pp. 206-212.
15. Rouhani M. Modeling the interplay between DNA-PK, Artemis, and ATM in non-homologous end-joining repair in G1 phase of the cell cycle. *J Biol Phys*, 2019, vol. 45, no. 2, pp. 127-146.
16. Wilson III D.M., Sofinowski T.M., McNeill D.R. Repair mechanisms for oxidative damage. *Front Biosci.*, 2003, vol. 8, pp. 963-981.
17. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 1993, vol. 362, pp. 709-715.
18. Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B., Chiang S.Y., Kow Y.W., Swenberg J.A. Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physical conditions. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, pp. 222-225.
19. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, 2001, vol. 29, pp. 430-438.
20. Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 134-147.
21. Walker J.R., Corpina R.A., Goldberg J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 2001, vol. 412, no. 6847, pp. 607-614.
22. Yoo S., Dynan W.S. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 27, no. 24, pp. 4679-4686.
23. Uematsu N., Weterings E., Yano K., Morotomi-Yano K., Jakob B., Taucher-Scholz G., Mari P.O., van Gent D.C., Chen B.P., Chen D.J. Autophosphorylation of DNA-PKcs regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.*, 2007, vol. 177, no. 2, pp. 219-229.
24. Ahnesorg P., Smith P., Jackson S.P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006, vol. 124, no. 2, pp. 301-313.
25. Grawunder U., Wilm M., Wu X., Kulesza P., Wilson T.E., Mann M., Lieber M.R. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6641, pp. 492-495.
26. Tsai C.J., Kim S.A., Chu G. Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, vol. 104, no. 19, pp. 7851-7856.
27. Riballo E., Kuhne M., Rief N., Doherty A., Smith G.C., Recio M.J., Reis C., Dahm K., Fricke A., Krempler A., Parker A.R., Jackson S.P., Gennery A., Jeggo P.A., Lobrich M. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell*, 2004, vol. 16, no. 5, pp. 715-724.

28. Goodarzi A.A., Noon A.T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Lobrich M., Jeggo P.A. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell*, 2008, vol. 31, no. 2, pp. 167-177.
29. Darroudi F., Wiegant W., Meijers M., Friedl A.A., van der Burg M., Fomina J., van Dongen J.J., van Gent D.C., Zdzienicka M.Z. Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutat. Res.*, 2007, vol. 615, no. 1-2, pp. 111-124.
30. Ritter S., Berger S., Groesser T., Gudowska-Novak E., Hessel P., Kehr E., Nasonova E., Kraft G. High LET Induced Chromosomal Damage in Human Fibroblasts. *GSI-Report 1999-1*, 1999, pp. 134-135.

MODELING OF DNA DAMAGE REPAIR INDUCED BY HEAVY IONS IN MAMMALIAN CELLS

Vasileva M.A., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot Curie str, 6, 141980, Dubna, Russia; e-mail: mal2008@jinr.ru

Received 25.07.2022. DOI: 10.20930/rusjbpс.2022.0560

Abstract. In this paper the mathematical description of main DNA repair pathways of single-strand break (SSB), base damage (BD), and double-strand break (DSB) in mammalian and human cells are proposed. The model shows key molecular mechanisms of DNA recovery through the single-strand DNA repair, base excision repair (BER), nonhomologous end-joining (NHEJ). To formalize the molecular mechanisms the dynamic system of differential equations describing the chemical kinetics of protein interactions according the modern concepts of molecular biology is constructed. Taking into account three repair pathways it makes possible to describe the cell's response to heavy charged particles influence. The proposed model is validated for main mechanisms of SSB repair, BER, NHEJ. In the course of the work, the time-dependent dynamics of formations and repairs of key DNA damage types (BD, SSB, DSB, cluster damages) in human cells under ^{56}Fe ions ($E = 600 \text{ MeV/u}$) exposure are calculated. A comparative analysis of the DNA damages and theirs repair under ^{12}C ($E = 270 \text{ MeV/u}$) and ^{56}Fe ($E = 600 \text{ MeV/u}$) ions exposure at 1 Gy was carried out.

Key words: single-strand breaks, double-strand breaks, base damages, LET, repair, modeling.