

INFLUENCE OF LOW DOSES OF RADIATION ON THE DNA DOUBLE HELIX, GENE EXPRESSION AND MEMBRANAL STATE

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА СТРУКТУРУ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК, ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН

P. Volpe^{1,2}, T. Parasassi², O. Sapora³, G. Ravagnan^{2,4}, T. Eremenko²

¹Chair of Biophysics of the University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy
tel/fax: 39-6-72594244, E-mail: volpe@utovrm.it

²Institute of Experimental Medicine of the National Research Council, Rome, Italy

³High Institute of Health, Rome, Italy

⁴Chair of Microbiology of the University of Venice, Venice, Italy

П. Вольпе^{1,2}, Т. Парасасси², О. Сапора³, Г. Равагнан^{2,4}, Т. Еременко²

¹Кафедра биофизики Римского университета "Tor Vergata", Рим, Италия
tel/fax: 39-6-72594244, E-mail: volpe@utovrm.it

²Институт экспериментальной медицины Национального совета исследований, Рим, Италия

³Высший институт здравоохранения, Рим, Италия

⁴Кафедра микробиологии Венецианского университета, Венеция, Италия

Abstract

This work suggests that relatively low doses of radiation may cause changes in the structure of the DNA double helix (influencing gene expression) and changes in the structure of the cell membrane (influencing water uptake). A radioinduced variation in the expression of globin genes in Friend erythroleukemia cells is correlated with several events: dynamics of formation of the pyrimidine dimers along the DNA macromolecule; complete or incomplete "repair—modification" of the exon and intron sequences in these genes; inverse correlation between gene methylation and transcription. The influence of radiation on the state of the cell membrane is correlated essentially with the role of cholesterol in its organization.

Keywords: low doses, ionizing radiation, DNA, gene expression, peroxidation

We discuss below a number of points which, in the framework of a fundamental investigation on radiosensitivity of macromolecular biosynthesis as a function of the eukaryotic cell cycle (Howard A., Pelc S.R., 1953; Volpe P. 1976), paid a particular attention to the influence of radiation on the genetic stability of deoxyribonucleic acid (Frisman E., Zarubina O., 1993). It was shown that radiation induces, on the one hand, a degradation of this macromolecule (fragmentation, single-stranded and double-stranded breaks, base loss or hydrogen bond breakage) and, on the other, its rearrangement (intra- and intermacromolecular cross-linking or base change). This abnormal variation of structure, even when induced by relatively low doses of radiation, may account for fine location of the *target* for cell killing, since this is believed to be within the nucleus rather than within the cytoplasm (Munro T.R., 1970). In addition, through studies on regulation of the *repair—modification system* (Volpe P., Eremenko T., 1989) as a function of the culture growth cycle of Friend erythroleukemia (FL) cells (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998), attention was also paid to a possible association of radioinduced damages with expression of given genes, by virtue of the inverse corre-

Ниже обсуждаются ряд моментов, которые в рамках фундаментального исследования радиочувствительности биосинтеза макромолекул как функции клеточного цикла эукариот (Howard A., Pelc S.R., 1953; Volpe P., 1976) особенно касаются воздействия ионизирующих излучений на генетическую стабильность дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (Frisman E., Zarubina O., 1993). Показано, что ионизирующие излучения индуцируют, с одной стороны, деградацию таких макромолекул (фрагментацию, разрыв одной и двух цепей спиралей, потерю оснований или разрывы водородных связей), а с другой, — их перестройку (образование интрагеномных и межмолекулярных связей, замещение оснований). Такого рода аномальные вариации структуры, даже при условии их индукции относительно малыми дозами облучения, могут возникнуть в локусах, ответственных за гибель клетки, поскольку вероятность такого события в пределах ядра гораздо выше, нежели в цитоплазме (Munro T.R., 1970). Помимо этого, с учетом результатов исследований регуляции систем *репарации—модификации* как функции цикла роста культуры клеток эритролейкемии Френда (FL) (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998) также было обращено внимание на возможную связь радиоиндированных повреждений с экспрессией указанных генов ввиду существования обратной корреляционной зависимости

lation between gene methylation and activation which was certainly verified for a large number of *housekeeping* and *tissuespecific* transcriptional units (Volpe P. et al., 1993).

DNA STABILITY AND GENE RESPONSE TO LOW DOSES OF RADIATION

(a) *DNA fragmentation.* A gross radioinduced degradation leading to the breakage of the DNA macromolecule into smaller units or fragments has been shown to occur frequently. In those cases when the polymers contain identical or repeating units (Eremenko T. et al., 1980), breaks may involve the same site several times. This suggests that the energy absorbed in a given point of the macromolecule can migrate through it, up to its weakest site.

(b) *Single-stranded and double-stranded breakages of DNA.* Using a program for computer molecular modelling, we undertook an investigation on the main radioinduced breaks which frequently take place along the DNA double helix. First of all, these can be evidenced as single-stranded (figure 1A,B) or double-stranded (figure 2) breaks. Radioactivity can cause disruption of the phosphodiesteric bonds between a pentose and a phosphate in the direction $3' \rightarrow 5'$ (A) or in the direction $5' \rightarrow 3'$ (B). In the eukaryotic cells grown *in vitro*, over a total of 1,000 damages in the double helix, a radiation dose of 1.0 Gy causes about 950 single-stranded breaks. Phosphodiesteric breaks can be induced one in front of the other or at a given distance from each other. The bonds can be disrupted in the direction $3' \rightarrow 5'$, in the direction $5' \rightarrow 3'$ or in both these directions (thus, in the case that the breaks are closely induced just before and just after two opposite pentoses, with the disappearance inside the double helix of the hydrogen bonds between the corresponding complementary nitrogen bases, two nucleosides are released from the two sides). In the eukaryotic cells grown *in vitro*, over a total of 1,000 DNA damages, a radiation dose of 1.0 Gy causes about 50 double-stranded breaks.

The single-stranded breaks that occur between a sugar and a phosphate residue may rejoin if there is no possibility for the broken ends of the strand to separate. Such a rejoining may be prevented, however, by oxygen when at least one end of the broken strands is in a reactive state: this end may become peroxidized and thus unable to rejoin. A double-stranded break, namely a simultaneous breakage of both chains of the double helix, will occur only if there is a break in each of the two strands less than about five nucleotides apart. This condition occurs when two single-stranded breaks come into juxtaposition or when a single densely ionizing particle produces a break in both

между их метилированием и активацией, что было четко продемонстрировано на обширном материале *нативных и тканеспецифических* транскрипционных единиц (Volpe P. et al., 1993).

СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

(a) *Фрагментация ДНК.* Доказано существование высокоинтенсивных радиационно индуцированных процессов деградации молекул ДНК до меньших субъединиц и фрагментов. Если нуклеиновые полимеры содержат идентичные или повторяющиеся единицы (Eremenko T., 1980), могут возникать неоднократные повторные разрывы в одних и тех же сайтах. Это свидетельствует о том, что, возможно, происходит перенос энергии, поглощенной в одной точке макромолекулы, вдоль нее вплоть до наиболее неустойчивого сайта.

(б) *Разрывы одной и обеих цепей спирали ДНК.* При помощи программы компьютерного молекулярного моделирования, авторы исследовали основные виды радиационно индуцированных разрывов, которые наиболее часто бывают на протяжении двойной спирали ДНК. Встречаются разрывы как одной (рисунок 1A,B), так и одновременно двух (рисунок 2) цепей молекулы. Ионизирующие излучения способны вызвать разрушение фосфодиэтеразных связей между углеводными остатками пентоз и фосфатами в положении $3' \rightarrow 5'$ (A) или положении $5' \rightarrow 3'$ (B). Для клеток эукариот, выращенных *in vitro*, в расчете на 1000 повреждений двойной спирали молекулы ДНК доза 1 Гр вызывает порядка 950 одиночных разрывов. Разрушения фосфодиэтеразных связей могут происходить непосредственно друг против друга или же в пределах определенного расстояния по длине макромолекулы. Возможно разрушение связей в положении $3' \rightarrow 5'$, в положении $5' \rightarrow 3'$, а также в обоих одновременно (при разрыве химических связей непосредственно перед и непосредственно после пентоз с одновременным разрушением внутри двойной спирали водородных связей между соответствующими комплементарными азотистыми основаниями, имеет место потеря двух нуклеотидов с двух сторон). Для клеток эукариот, выращенных *in vitro*, в расчете на 1000 повреждений двойной спирали ДНК, доза 1 Гр вызывает порядка 50 двойных разрывов.

Восстановление целости одной из цепей после разрыва между углеводным и фосфатным остатками возможно при отсутствии расхождения образовавшихся концевых фрагментов. Такое восстановление исключается, если хотя бы один из концов после разрыва пребывает в реактивном состоянии: последний может под воздействием кислорода быть подвергнут перекисному окислению, и следовательно, утратить способность к репаративному воссоединению. Двойной разрыв, а именно разрыв обеих цепей двойной спирали, происходит лишь в случае локализации повреждений каждой из цепей на расстоянии менее пяти нуклеотидов друг от друга. Такое состояние наступает, если два одиночных разрыва оказываются в непосредственной близости, или же

FIGURE 1. RADIOINDUCED SINGLE-STRANDED BREAKS IN THE DNA DOUBLE HELIX

РИСУНОК 1. РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННЫЕ РАЗРЫВЫ ОДНОЙ ИЗ ЦЕПЕЙ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ МОЛЕКУЛЫ ДНК

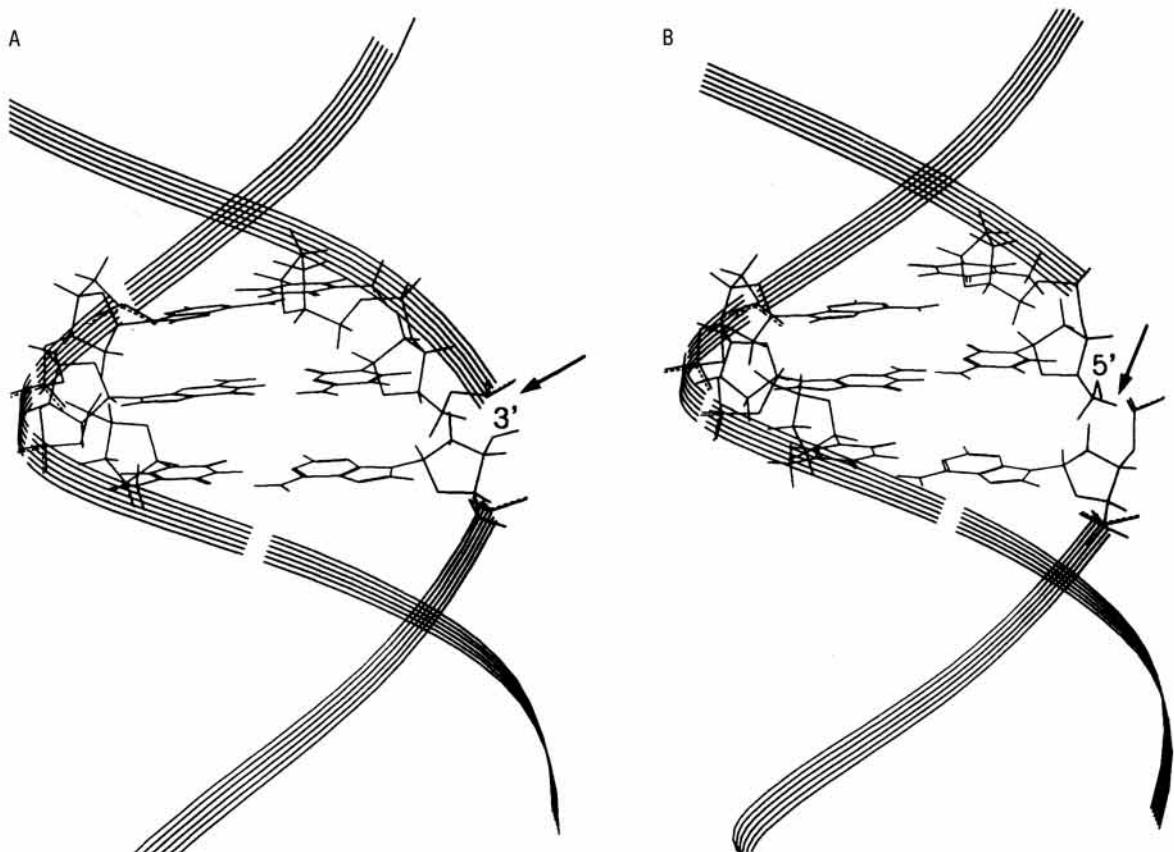
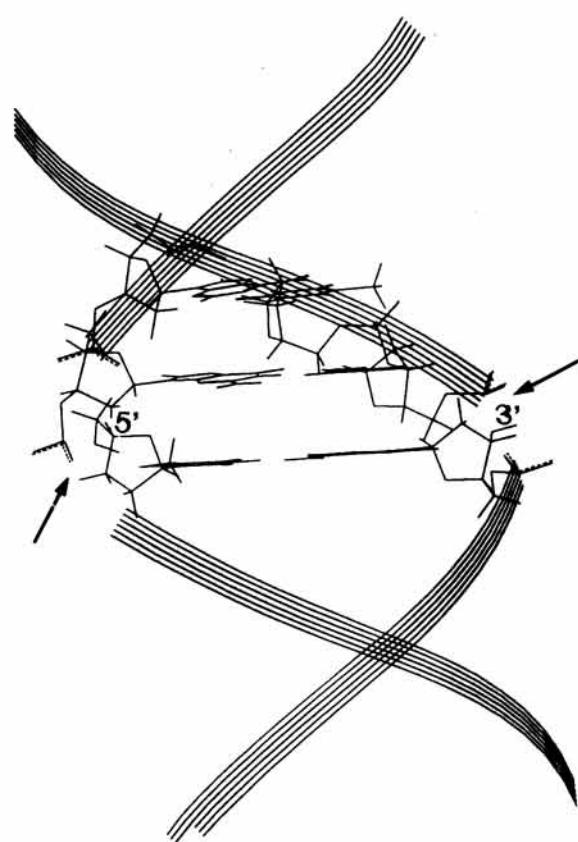


FIGURE 2. RADIOINDUCED DOUBLE-STRANDED BREAKS IN THE BIHELICAL DNA

РИСУНОК 2. РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННЫЕ РАЗРЫВЫ ОБЕИХ ЦЕПЕЙ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ МОЛЕКУЛЫ ДНК



strands. For this, approximately 500 eV are required, while a cluster of ionizations has to take place within 20 Å.

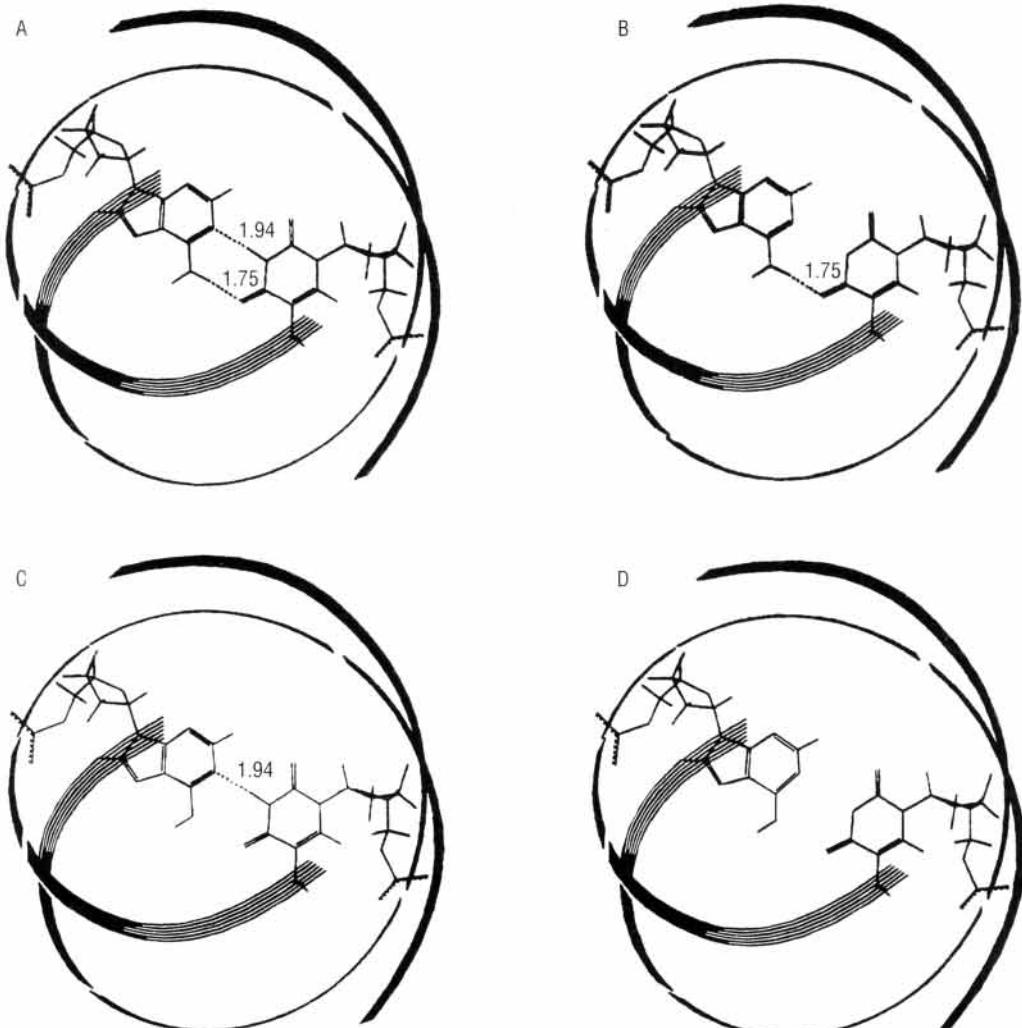
(c) *Hydrogen bond breakage in the DNA double helix.* As is known, the functional groups of certain molecules can be linked by hydrogen bonds to form three-dimensional structures. In DNA they contribute to construct a double helix through base-pairing (figure 3). The two hydrogen bonds, which connect the complementary A and T in the native DNA (A) can be alternatively disrupted (B,C) before a complete separation of these two bases (D). The hydrogen bonds, as weak forces, are highly radiosensitive. Their disruption by radiation can lead to heavy alterations. In fact, radiation can influence the association of DNA with proteins; in chromatin, this leads to alterations of genetic transcription (Volpe P., Giuditta A., 1967; Volpe P., 1981); in a virus, this leads to alterations of the infective properties (Eremenko T. et al., 1972).

если частица с высокой плотностью ионизации производит разрыв обеих цепей. Для этого необходимо около 500 эВ при кластере ионизации до 20 Å.

(в) *Разрывы водородных связей двойной спирали ДНК.* Ряд молекул путем образования водородных связей между их функциональными группами способны формировать трехмерные структуры. В ДНК они образуют двойную спираль посредством парного связывания оснований (рисунок 3). Две водородные связи, которые соединяют комплементарные основания аденин и тимин в нативной ДНК (А), могут быть нарушены (В, С), что предшествует полному разделению двух азотистых оснований (Д). Водородные связи как вид слабого взаимодействия являются высоко радиочувствительными. Их разрушение при облучении приводит к серьезным изменениям молекулярной структуры. Ионизирующие излучения влияют на ассоциацию ДНК с протеинами, т.е. для хроматина следствием этого является нарушение транскрипции генетической информации (Volpe P., Giuditta A., 1967; Volpe P., 1981). В этом случае у вирусов нарушается ви-рулентность (Eremenko T. et al., 1972).

FIGURE 3. KINETICS OF RADIATION-INDUCED DISSOCIATION OF THE ADENINE AND THYMINE NITROGEN BASES IN THE DNA DOUBLE HELIX

РИСУНОК 3. КИНЕТИКА РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИССОЦИАЦИИ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ АДЕНИНА И ТИМИНА В ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ МОЛЕКУЛЫ ДНК

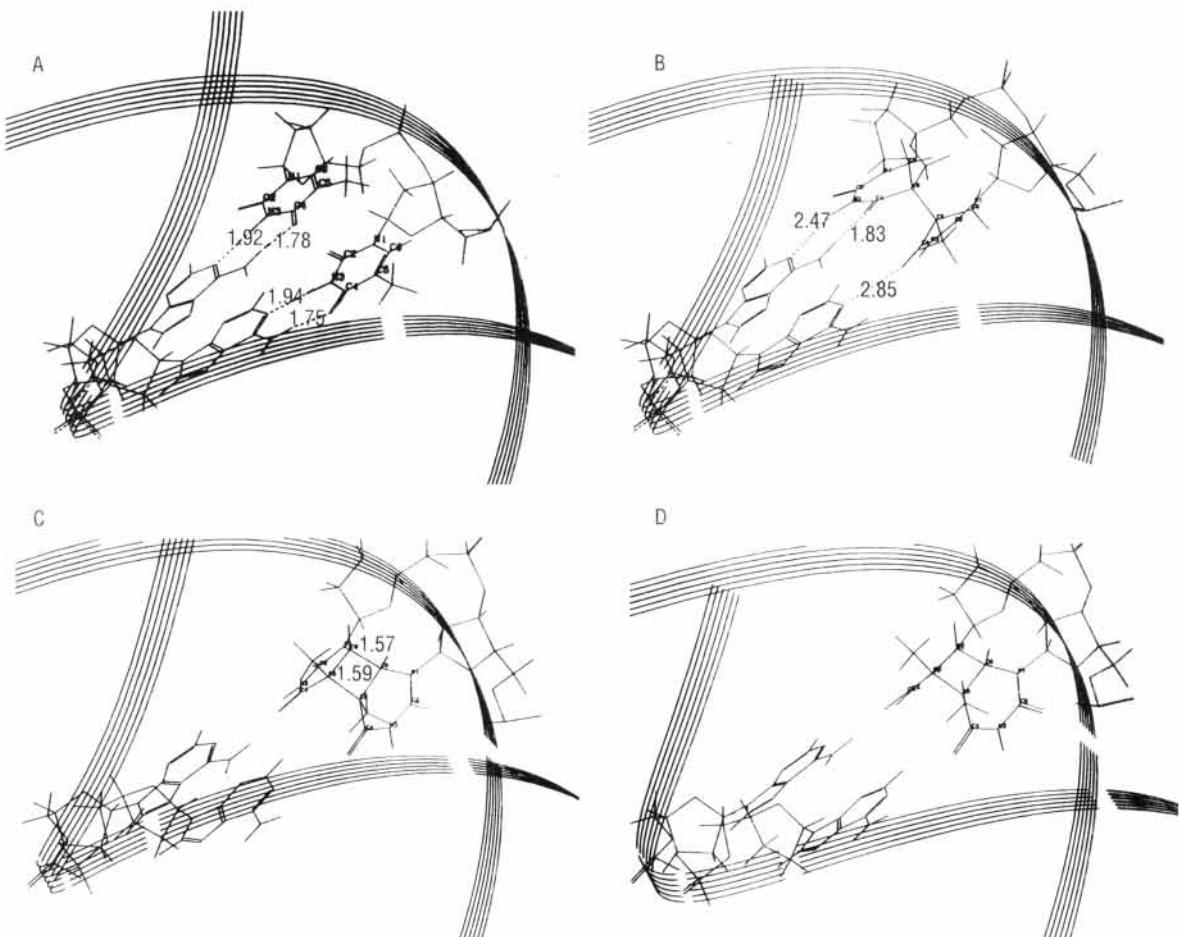


(d) *DNA intramacromolecular cross-linking.* An intramacromolecular cross-linking can take place where, under the effect of radiation, a given macromolecule becomes attached to itself. In this fashion, radiation can lead to the formation of cross-links within a DNA double helix. An example of this is the well known cross-linking between two pyrimidine bases (figure 4), as has been induced by UV (Volpe P., Eremenko T., 1989). (A) Inside the bihelical DNA, the adjacent complementary bases AT and AT essentially share the same plane of symmetry. The two adjacent thymines are not connected with each other, since they are associated with the two complementary adenines through double hydrogen bonds which are parallel one in respect to the other and perpendicular to the axis of the double helix. (B) The effect of radiation begins with the appearance of a first covalent bond between the C₅ and C₅ atoms of the two adjacent thymines (of the four pre-existing hydrogen bonds between the two AT base pairs, only three remain; these, however, are much longer than the former physiological ones). The formation of this first covalent bond implies the attraction of one of the two thymines by the other and this, in turn,

(2) Внутримолекулярные перекрестные связи ДНК. При облучении могут формироваться перекрестные внутримолекулярные связи, когда части ДНК аномально смыкаются друг с другом. Ионизирующие излучения способны приводить к образованию в норме не существующих перекрестных связей в пределах двойной спирали ДНК. Примером этому может служить перекрестная связь между двумя пиримидиновыми основаниями (рисунок 4), возникающая под воздействием ультрафиолетового излучения (Volpe P., Eremenko T., 1989). (А) В двусpirальной молекуле ДНК смежные комплементарные пары азотистых оснований аденин—тимин и аденин—тимин, по существу, разделяют между собой одну плоскость симметрии. Два смежных тиминовых основания не соединены друг с другом, поскольку они ассоциируются с двумя комплементарными аденинами при помощи двойных водородных связей, параллельных по отношению друг к другу и перпендикулярных по отношению к продольной оси двойной спирали макромолекулы. (Б) Реализация радиационных эффектов начинается с появления первой ковалентной связи между атомами C₅ и C₅ в двух смежных тиминовых основаниях (из четырех существующих водородных связей между двумя парами оснований аденин—тимин остается лишь три; протяженность их существенно превышает таковую в физиологических условиях). Образование данной первой ковалентной связи означает притягива-

FIGURE 4. RADIOINDUCED FORMATION OF A PYRIMIDINE DIMER IN THE DNA DOUBLE HELIX

РИСУНОК 4. РАДИАЦИОННО ИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ПИРМИДИНОВЫХ ДИМЕРОВ В ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК



implies a rotation of the attracted thymine around the β -glycosidic bond of the N₁ atom of the pyrimidine with the C₁ atom of the 2-deoxyribose. (C) Then, radiation causes the disruption of the remaining three hydrogen bonds and induces the formation of a second covalent bond between the C₆ and C₆ atoms of the two adjacent thymines. The formation of the closed C₅—C₅—C₆—C₆ structure (cyclobutane) is accompanied by some non-parallel rotations of the two thymines around their corresponding β -glycosidic bonds: these rotations cause a notable local distortion of the double helix. (D) The unequal rotations of the two adjacent thymines become stabilized when between them an angle of 90° is reached. In this condition, the damage caused by radiation to DNA is maximal. The dimer covalent linkage is much more stable than the hydrogen bonds between complementary bases (figure 3).

(e) *DNA depurination.* One of the frequent changes in irradiated DNA is its depurination (we confirmed that in unirradiated cells this event takes place at a rate of $1 \cdot 10^{-13} \text{ sec}^{-1}$). However, the HPLC analysis (Eremenko T. et al., 1985) shows that, depending on the dose of radiation, DNA can lose not only the guanine (G) or the adenine (A) purine bases, but also the thymine (T) and the cytosine (C) pyrimidine ones. This leads to a very heavy alteration of the DNA coding capacity.

(f) *Influence of radiation on regulation of gene expression.* One of the crucial questions in irradiated cells concerns the eventual correlation between DNA degradation and gene expression (Volpe P., Eremenko T., 1994). This question emerges from the fact that, in UV-irradiated FL cells (Eremenko T. et al., 1995), as in those treated with dimethylsulfoxide (DMSO) (Eremenko T. et al., 1995), the DNA degradation appears in association with expression of the genes for α and β chains of hemoglobin (Hb). For interpretation of this association (figure 5), we proposed two alternative models. The *in vitro* differentiation was performed using 1.5% DMSO (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998). The percentage of the m⁵C labelling (testifying to the occurrence of DNA methylation (Eremenko T. et al., 1985)) was calculated against the sum of radioactivity of A, T and G (testifying to the occurrence of DNA synthesis (Eremenko T. et al., 1985)).

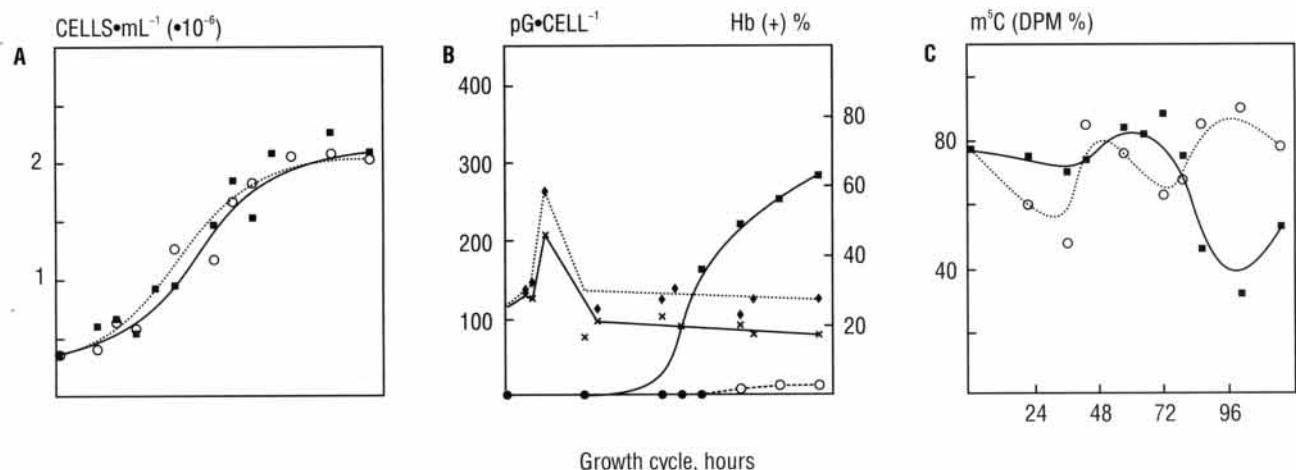
The first model is based on the fact that UV radiation (like DMSO), on the one hand, inhibits a part of the DNA polymerase β ($\text{pol}\beta$) activity (which is responsible for base excision-repair (Eremenko T. et al., 1985; Delfini C. et al., 1985)) and, on the other, induces the expression of the globin genes (Volpe P. et al., 1993). Since these genes can be activated by UV (or DMSO) only if they are within

ние одного из тиминовых оснований другим, что предполагает ротацию смежного тимины вокруг β -гликозидной связи атома N₁ пиримидинового основания с атомом C₁ 2-дезоксирибозы. (С) Далее ионизирующие излучения вызывают разрыв остальных трех водородных связей и индуцируют образование второй ковалентной связи между атомами C₆ и C₆ двух смежных тиминов. Образование замкнутой структуры C₅—C₅—C₆—C₆ (циклогексана) сопровождается некоторой непараллельной ротацией двух тиминовых оснований вокруг их соответствующих β -гликозидных связей: эти ротации обусловливают заметное местное искажение формы двойной спирали макромолекулы. (Д) Неравная ротация двух смежных тиминовых оснований стабилизируется при образовании между ними угла 90°. В данном случае величина радиационного повреждения молекулы ДНК максимальна. Важно отметить, что ковалентная связь димеров является существенно более стабильной, нежели водородные связи между комплементарными основаниями (см. рисунок 3).

(d) *Потеря ДНК пуриновых оснований ("депуринирование").* Одним из частых изменений ДНК при облучении является потеря пуриновых оснований нуклеотидами (нами показана интенсивность аналогичного процесса в интактных клетках на уровне порядка $1 \cdot 10^{-13} \text{ с}^{-1}$). По данным HPLC-анализа (Eremenko T. et al., 1985) ДНК, в зависимости от дозы облучения, способна терять не только пуриновые основания гуанин или аденин, но также и пиримидиновые — тимин и цитозин. Эти процессы приводят к чрезвычайно тяжелым нарушениям способности ДНК хранить генетическую информацию.

(e) *Воздействие ионизирующих излучений на регуляцию экспрессии генов.* Одним из ключевых вопросов, касающихся радиационного воздействия на клетки, является вопрос о возможной корреляции между процессами деградации ДНК и экспрессией генов (Volpe P., Eremenko T., 1994). Его актуальность обусловлена тем, что в клетках FL, подвергнутых ультрафиолетовому облучению (Eremenko T. et al., 1995), так же, как и в обработанных диметилсульфоксидом (ДМСО) (Eremenko T. et al., 1995), деградация ДНК происходит совместно с экспрессией генов α - и β -цепей молекулы гемоглобина. В целях интерпретации данной связи (рисунок 5) нами предложены две альтернативные модели. Дифференциацию *in vitro* осуществляли путем использования 1,5% ДМСО (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998). Процентное содержание меченного m⁵C (свидетельствующее о метилировании ДНК (Eremenko T. et al., 1985)) рассчитано по отношению к сумме активности меток аденина, тимины и гуанина (свидетельствующих о наличии синтеза ДНК (Eremenko T. et al., 1985)).

Первая модель основана на том факте, что ультрафиолетовое облучение (подобно ДМСО), с одной стороны, частично ингибирует активность ДНК-полимеразы β ($\text{pol}\beta$), которая ответственна за восстановление потерянных оснований в нуклеотидах (Eremenko T. et al., 1985; Delfini C. et al., 1985), а с другой, — индуцирует экспрессию генов гемоглобина (Volpe P. et al., 1993). Поскольку данные гены могут быть активированы ультрафиолетовым облу-

FIGURE 5. DEVELOPMENT OF DNA METHYLATION VERSUS HEMOGLOBIN SYNTHESIS IN GROWING DIMETHYLSULFOXIDE-TREATED FRIEND ERYTROLEUKEMIA CELLS**РИСУНОК 5. РАЗВИТИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЫ ДНК В СРАВНЕНИИ С СИНТЕЗОМ ГЕМОГЛОБИНА В ОБРАБОТАННЫХ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ КЛЕТКАХ ЭРИТРОЛЕЙКЕМИИ ФРЕНДА**

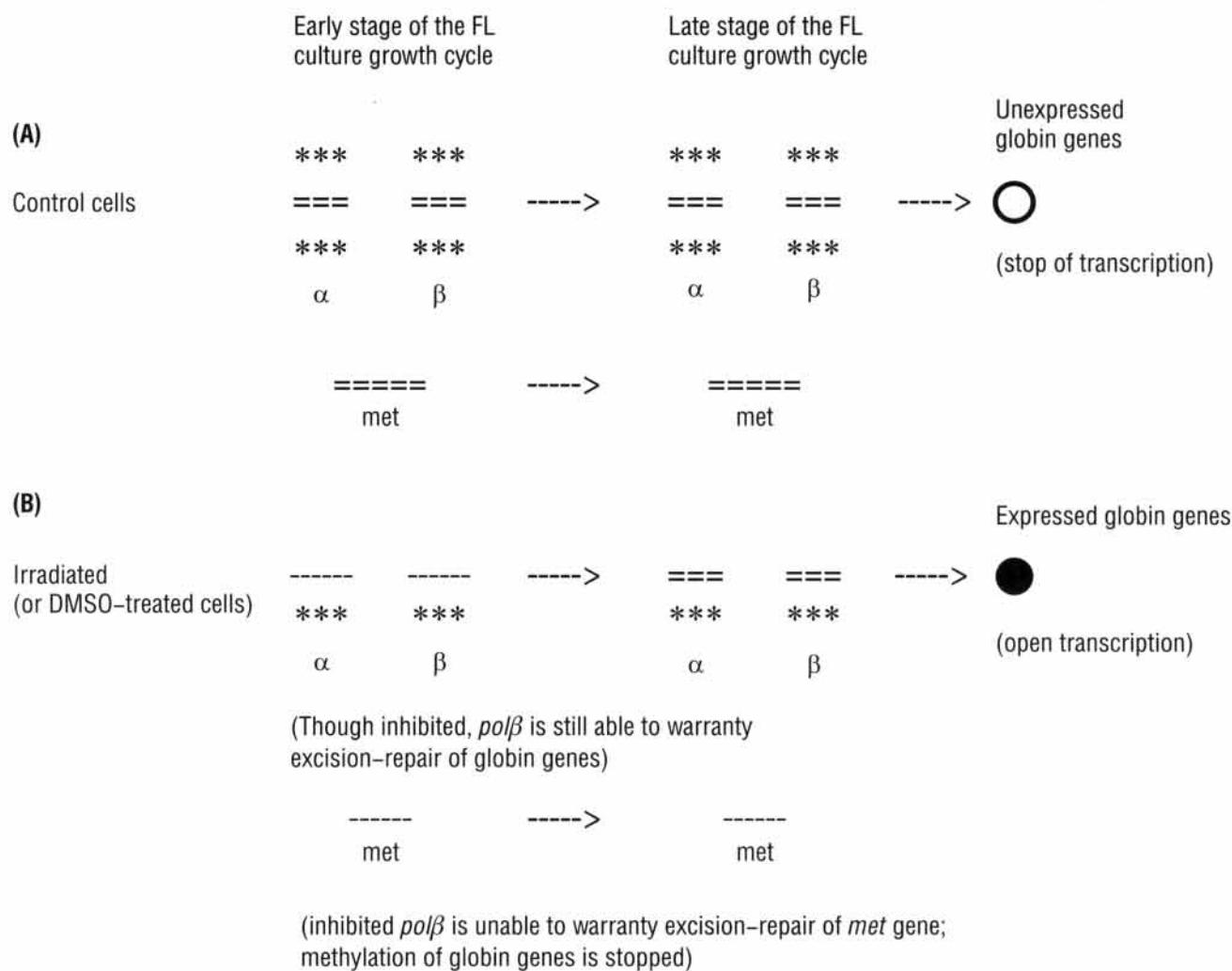
Notes. (A) Culture growth cycle, in the absence (open circles) and in the presence (closed squares) of DMSO. (B) Intracellular protein content ($\text{pg} \cdot \text{cell}^{-1}$) in the absence (closed rhombs) and in the presence (crosses) of DMSO in comparison with Hb production (in per cent according to the benzidine reaction (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998) in the absence (open circles) and in the presence (closed squares) of DMSO. (C) 5-methylcytosine ($m^5\text{C}$) labelling in the DNA hydrolysate, after its separation from labelled A, T and G through reverse phase HPLC (Eremenko T. et al., 1985) in the absence (open circles) and in the presence (closed squares) of DMSO.

Примечания. (A) Цикл роста культуры без (светлые окружности) и в присутствии (темные квадраты) ДМСО. (B) Содержание внутриклеточного белка ($\text{pg} \cdot \text{клет}^{-1}$) без (темные ромбы) и в присутствии (крести) ДМСО в сравнении с продукцией гемоглобина (в процентах соответственно бензидиновой реакции (Eremenko T. et al., 1997; Volpe P. et al., 1998) без (светлые окружности) и в присутствии (темные квадраты) ДМСО.

(C) Меченный 5-метилцитозин ($m^5\text{C}$) в гидролизате ДНК после его отделения от меченных аденина, тимина и гуанина во время обратной фазы HPLC (Eremenko T. et al., 1985) без (светлые окружности) и присутствии (темные квадраты) ДМСО.

an undamaged genome fraction, one may suppose that within the damaged genome fraction there should be those genes which code for their eventual modulators. The second model also assumes that UV radiation, like DMSO, leads to a random genome damage (figure 6). (A) In uninduced control cells, the undamaged genes for α and β chains of Hb are switched-off through symmetric methylation (marked by the asterisks). This is guaranteed by an active *met* enzyme system, the genes of which are supposed to be methylation-independent: Hb is not expressed by virtue of the inverse correlation between globin gene methylation and expression (Volpe P. et al., 1993, 1993a). (B) In irradiated or DMSO-induced cells, at the earlier stage of growth, the damaged globin genes asymmetrically lose previously methylated single-stranded patches, according to figure 5C. At the later stage of growth, although partially inhibited by radiation or DMSO, *polβ* (Delfini C. et al., 1985) is still able to guarantee excision-repair (Eremenko T. et al., 1985) of these genes, but without $m^5\text{C}$ (de-methylation) (Volpe P., Eremenko T., 1989)). Concomitantly, the *met* gene system is supposed to remain always unreconstructed by the partial inhibition of *polβ*. In such a case, it does not re-methylate the hemi-methylated globin

chromosomes (или ДМСО) лишь в случае расположения их в пределах неповрежденной фракции генома, можно считать, что в пределах поврежденной фракции существуют гены, кодирующие возможные модуляторы первых. Вторая модель также предполагает, что ультрафиолетовое облучение, подобно воздействию ДМСО, ведет к бессистемному повреждению генома (рисунок 6). (A) В контроле (нестимулированные клетки) неповрежденные гены α - и β -цепей молекулы гемоглобина "выключены" (супрессированы) путем симметричного метилирования (отмечено **). Это обеспечивается активным состоянием энзимной системы *met*, гены которой считаются независимыми от метилирования: экспрессия генов гемоглобина отсутствует ввиду обратной корреляции между метилированием генов и их экспрессией (Volpe P. et al., 1993, 1993a). (B) В облученных клетках либо стимулированных ДМСО на ранних стадиях их роста, поврежденные гены гемоглобина теряют прежде метилированные участки одиночных нитей (см. рисунок 5, С). На поздних стадиях роста, несмотря на частичное ингибирование вследствие радиационного воздействия или же обработки ДМСО, *polβ* (Delfini C. et al., 1985) сохраняет способность обеспечить reparацию повреждений (Eremenko T. et al., 1985) данных генов, однако без $m^5\text{C}$ (деметилирование) (Volpe P., Eremenko T., 1989)). Наряду с этим считают, что система генов *met* остается всегда неперестроенной ввиду парциального ингибирования *polβ*. В таком

FIGURE 6. ACTIVATION OF α AND β GLOBIN GENES IN DIMETHYLSULFOXIDE-INDUCED FRIEND ERYTHROLEUKEMIA CELLS THROUGH THEIR DE-METHYLATION**РИСУНОК 6. АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ α – И β –ЦЕПЕЙ ГЕМОГЛОБИНА В СТИМУЛИРОВАННЫХ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ КЛЕТКАХ ЭРИТРОЛЕЙКЕМИИ ФРЕНДА ПРИ ИХ ДЕМЕТИЛИРОВАНИИ**

genes: ultimately, Hb is expressed by virtue of the inverse correlation between their methylation and expression, suggested by figure 5B,C. The open large circle shows that transcription of globin genes is switched-off, while the closed large circle shows that transcription of globin genes is switched-on.

This model is based on the fact that, at the latter stage of the FL culture growth cycle, the globin genes are not expressed when methylated (in control unirradiated cultures) and *vice versa* expressed when unmethylated (in UV- or DMSO-treated cultures) (Volpe P. et al., 1993; Eremenko T. et al., 1995). In control cultures, earlier or later during growth, the genes for α and β chains of Hb would be always unexpressed, because constantly switched-off by a DNA methylase (met) enzyme system (Delfini C. et al., 1987, 1988) encoded by genes with a methylation-independent regulation. In UV- or

случае не происходит реметилирования полуметилированных генов гемоглобина: в конечном счете происходит экспрессия гемоглобина ввиду обратной корреляции между метилированием и экспрессией (см. рисунок 5, B, C). Светлыми крупными окружностями показано, что транскрипция генов гемоглобина “выключена”, темными крупными окружностями — “включена”.

Данная модель основывается на том, что в поздних стадиях цикла роста культуры FL гены, кодирующие структуру гемоглобина, пребывают вне экспрессии при условии их метилирования (согласно данным исследований контрольных культур, не подвергавшихся соответствующему воздействию) и, *наоборот*, при отсутствии такового — происходит их экспрессия (при ультрафиолетовом облучении или при обработке ДМСО) (Volpe P. et al., 1993; Eremenko T. et al., 1995). В контроле на протяжении роста культуры гены, кодирующие структуру α - и β -цепей молекулы гемоглобина, всегда будут вне экспрессии ввиду постоянного “выключения” энзимной системой ДНК-метилазы (met) (Delfini C. et al., 1987, 1988), в свою очередь ко-

DMSO-treated cultures, at the earlier stage of growth, both classes of globin and *met* genes would result in the damaged genome fraction (Hb should not be produced in any case); at the later stage, although partially inhibited, the *polβ* enzyme would be able to guarantee excision—repair of globin genes and unable to guarantee the excision-repair of *met* genes (the *met* enzyme system would not be produced). Ultimately, the unmethylated globin genes would be expressed.

RADIOSENSITIVITY OF THE CELL MEMBRANE

As a starting approach, we investigated the oxidative damage of cell membrane lipids. A particularly sensitive fluorescence technique has been worked up, able to detect the presence of 0.01 M% hydroperoxides with respect to total lipids (Parasassi T. et al., 1995). The technique implies the measurement of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence decay (Parasassi T. et al., 1991). As for its sensitivity, this technique can detect the membrane oxidative damage after a dose of 0.1 Gy. In this respect, membrane lipids can be defined as target for ionizing radiation, as well as DNA molecule (Volpe P., Eremenko T., 1995). We do not consider proteins as target for low radiation doses, since they need doses higher for at least two orders of magnitude to be damaged. Due to the low dose necessary to produce damage, oxidation of membrane lipids does not have lethal consequences. Nevertheless, the damage is accumulated with the exposure time and, from our experimental results, it does not seem to be repaired. Alterations of cell functions should be expected.

(a) *High and low doses of radiation.* We also determined that, at the molecular level, the first consequence of lipid peroxidation is the penetration of water in the hydrophobic interior of membranes (Parasassi T. et al., 1994), causing the modification of the barrier properties of the membrane and the functional alteration of membrane proteins and enzymes (figure 7). (A) High radiation dose can damage both membrane proteins and lipids. (B) Low radiation dose has no detectable direct effect on membrane proteins but can oxidize membrane lipids. As a consequence of structural and dynamical perturbation of lipids, the conformation and the functional properties of membrane can be altered.

(b) *Hydroperoxidation of the irradiated cell membrane.* In dose-response experiments, where the amount of oxidative damage is reported as a function of the radiation dose (Parasassi T. et al., 1995), cholesterol and saturated lipids have been found to protect the

дируемой генами, которым присуща независимая от метилирования регуляция. В ранних стадиях роста культур, подвергнутых ультрафиолетовому облучению (или ДМСО), гены гемоглобина и *met*-гены скажутся в поврежденной фракции генома (синтез гемоглобина будет отсутствовать в любом случае). В поздних стадиях роста, даже на фоне частичного ингибирования, энзим *polβ* способен обеспечить репарацию поврежденных генов гемоглобина и неспособен — *met*-генов (не будет образования энзиматической системы *met*). В итоге произойдет экспрессия неметилированных генов гемоглобина.

РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

В начале мы провели исследование оксидантного повреждения липидов клеточных мембран. Была разработана особо чувствительная флуоресцентная методика, позволяющая определять присутствие 0,01 моль% гидроперекисей по отношению к общим липидам (Parasassi T. et al., 1995). Методика предусматривает измерение изменения флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (Parasassi T. et al., 1991). Данная методика позволяет регистрировать оксидантные повреждения после облучения в дозе 0,1 Гр. В связи с этим липиды клеточных мембран можно рассматривать в качестве мишенией ионизирующих излучений наряду с молекулами ДНК (Volpe P., Eremenko T., 1995). Авторы не считают протеины мишенью воздействия малых доз, поскольку их повреждение наступает при уровнях доз, как минимум, на два порядка выше. Ввиду малой величины доз облучения, вызывающих соответствующие повреждения, перекисное окисление липидов клеточных мембран не сопровождается летальными последствиями. Тем не менее, повреждения такого рода накапливаются на протяжении облучения и, согласно экспериментальным данным авторов, по-видимому, не подвергаются репарации. В результате этого следует ожидать нарушений функции клеток.

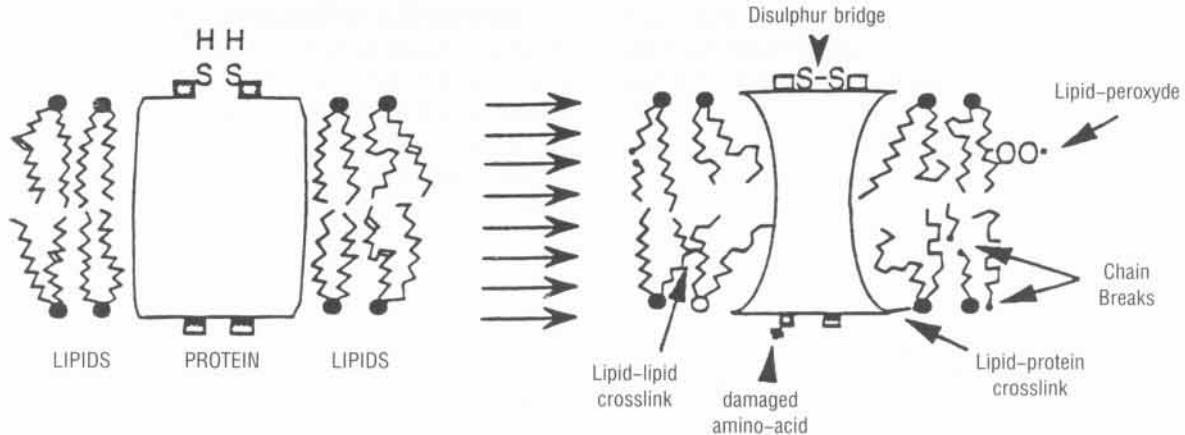
(a) *Большие и малые дозы ионизирующих излучений.* Авторы также установили, что на молекулярном уровне первым последствием перекисного окисления липидов является проникновение воды во внутренние гидрофобные слои мембран (Parasassi T. et al., 1994), что обуславливает изменение барьерных свойств, а также функциональные нарушения их протеинов и энзимов (рисунок 7). (А) Большие дозы ионизирующих излучений способны вызвать повреждения как протеинов, так и липидов мембран. (В) Малые дозы излучений не оказывают ощутимого прямого эффекта на протеины мембран, однако способны вызвать окисление липидов. Последствиями структурных и динамических изменений состояния липидов могут быть нарушения конформационных и функциональных свойств клеточных мембран.

(б) *Перекисное окисление мембран облученных клеток.* В экспериментах по определению зависимости доза—эффект, которые показали, что величина оксидантных повреждений является функцией величины дозы облучения (Parasassi T. et al., 1995), было установлено, что холестерин наряду с насыщенными липидами обладает протекторны-

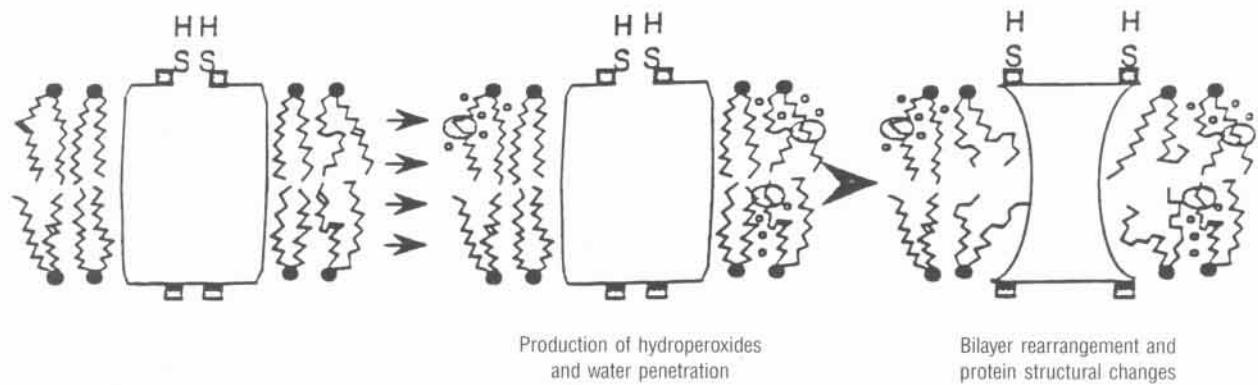
FIGURE 7. SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE DIFFERENT BIOLOGICAL CONSEQUENCES FOR THE EXPOSURE OF MEMBRANES TO HIGH AND LOW DOSES OF IONIZING RADIATION

РИСУНОК 7. СХЕМАТИЧЕСКАЯ ИЛЛЮСТРАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОСЛЕДСТВИЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ БОЛЬШИХ И МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА МЕМБРАНЫ КЛЕТОК

A EXPOSURE TO HIGH DOSES OF IONISING RADIATION



B EXPOSURE TO LOW DOSES OF IONISING RADIATION



membrane from the free radical diffusion, so that the oxidative damage is dramatically reduced (figure 8). A consequence of this protective effect of cholesterol is the low sensitivity to the radioinduced oxidation of "aged" cells with respect to "young" cells in culture. Our experimental model consists of cells maintained in culture for different periods of time, where we determined the concentration of cholesterol to be different for about 50%. The dose-response curve of aged cells, reporting the amount of oxidative damage as a function of the radiation dose, shows a dramatically lower slope with respect to the slope obtained irradiating younger cells. In aged cells, cholesterol concentration is about 50% higher.

(c) *Fractionation of a low dose of radiation.* We then investigated the biological consequences of radioinduced membrane lipid oxidation. Cells in culture were exposed daily to a dose

ми свойствами, предупреждая диффузию свободных радикалов через клеточные мембранны, что резко уменьшает оксидантные повреждения (рисунок 8). Последствием такого защитного эффекта холестерина является низкая чувствительность к радиационно индуцированному перекисному окислению "стареющих" клеточных элементов по сравнению с "молодыми" клетками в культуре. Экспериментальная модель авторов состоит из клеток, существующих в культуре на протяжении различных периодов времени, причем содержание холестерина в них отличалось до 50%. Кривая зависимости дозы—эффект для "стареющих" клеток, иллюстрирующая величину оксидантного повреждения как функцию дозы облучения, характеризуется существенно более пологим наклоном, нежели соответствующая кривая, полученная для "молодых" клеточных элементов. В "стареющих" клетках концентрация холестерина примерно на 50% выше.

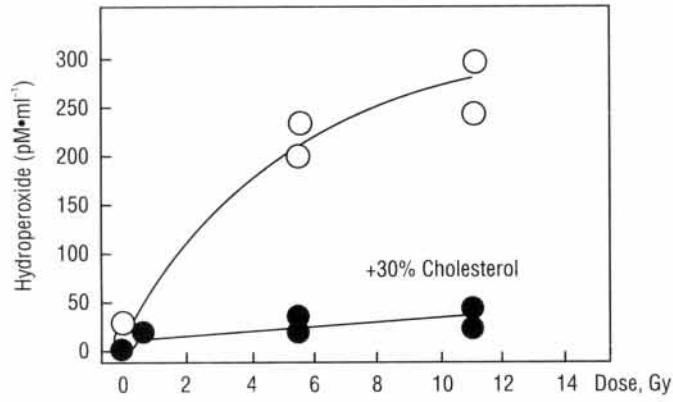
(в) *Фракционное воздействие малых доз ионизирующих излучений.* Далее авторы изучали биологические последствия радиационно индуцированного перекисного окисления липидов клеточных мембран. Культуру кле-

of 0.1 Gy, single or repeated twice with a 10 hours interval. The occurrence of oxidative damage was also observed after such a low radiation dose. Moreover, the damage is progressively accumulated with no evidence of repair activity (figure 9). The parameters of the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence decay were measured as in (Parasassi T. et al., 1991). The width of the lifetime distribution is the most sensitive detector of the oxidative damage, reported in the figure as a function of the days of treatment. For comparison with unirradiated control cells, no alteration of the mitotic index nor of the cloning efficiency was observed.

ток подвергали ежедневному облучению в дозе 0,1 Гр однократно или же дважды с интервалом 10 ч. После столь малого облучения также возникали оксидантные повреждения. Более того, регистрировали прогрессивное накопление нарушений при отсутствии признаков репаративной активности (рисунок 9). Параметры изменения флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена определяли по T. Parasassi и соавторам (1991). Протяженность диапазона распределения продолжительности жизни является наиболее чувствительным показателем величины оксидантного повреждения, представленного на рисунке как функция числа суток радиационного воздействия. В клетках необлученной культуры (контроль) не наблюдалось изменений ни митотического индекса, ни интенсивности роста.

FIGURE 8. HYDROPEROXIDE CONCENTRATION AS A FUNCTION OF THE RADIATION DOSE

РИСУНОК 8. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА КАК ФУНКЦИЯ ВЕЛИЧИНЫ ДОЗЫ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

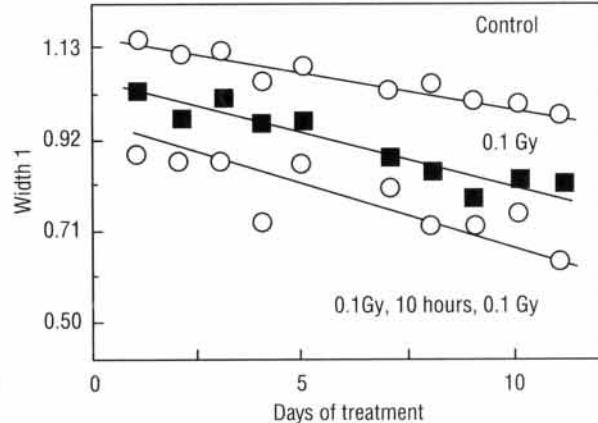


Note. In the absence (open symbols) and in the presence (filled symbols) of 30 M% cholesterol.

Примечание. В условиях отсутствия (светлые значки) и присутствия (темные значки) 30 моль% холестерина.

FIGURE 9. HUMAN K562 ERYTHROLEUKEMIA CELLS EXPOSED TO FRACTIONATED LOW RADIATION DOSE FOR 11 DAYS

РИСУНОК 9. КУЛЬТУРА КЛЕТОК ЭРИТРОЛЕЙКЕМИИ K562, ПОДВЕРГНУТАЯ ФРАКЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ПРОТЯЖЕНИИ 11 СУТ



Notes. Control cells (open circle); cells exposed once a day to 0.1 Gy (filled box); cells exposed twice a day to 0.1 Gy with 10 hours interval (filled circle).

Примечания. Контроль — необлученные клетки (светлые окружности); клетки, подвергавшиеся радиационному воздействию в дозе 0,1 Гр один раз в сутки (темные квадраты); клетки, подвергавшиеся облучению в дозе 0,1 Гр два раза в сутки с интервалом 10 ч (темные окружности).

CONCLUDING REMARKS

This investigation described in detail the radioinduced step-by-step breakages of the hydrogen bonds between the complementary AT and GC base-pairs, in the DNA double helix, and the dynamics of radioinduced formation of the covalent bonds between two adjacent thymines (TT dimer) along a strand. Then, in addition to the crucial observation concerning the radiation-dependent switch-on and off- of genes for α and β chains of Hb

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлено объяснение поэтапных радиационно индуцированных повреждений водородных связей между комплементарными парами оснований аденин—тимин и гуанин—цитозин в двойной спирали молекулы ДНК, а также динамики радиационно индуцированного образования ковалентных связей между вошедшими в соприкосновение тиминовыми основаниями (ТТ димер) на протяжении макромолекулы. В дополнение к основополагающим данным о радиационно зависимом “включении” и “выключении” генов,

in FL cells (figure 6), this work underlined the importance of peroxidation in certain radio-induced processes (Volpe P., Ravagnan G., 1993): first, it was suggested that the rejoining of sugar and phosphate residues, after a single-stranded break (figure 1), may be prevented by oxygen when at least one end of the broken strands is in a reactive state (this end may become peroxidized and thus unable to rejoin); second, an immediate consequence of the lipid peroxidation proved to be the penetration of water in the hydrophobic interior of membranes (figure 8). On such a basis, we believe that in general the role of peroxidation should be taken into serious consideration in the analysis of an irradiated target both at the molecular and cellular levels.

кодирующих α - и β -цепи гемоглобина в клетках культуры FL (см. рисунок 6), подчеркнута важность перекисного окисления для радиационно индуцированных процессов (Volpe P., Ravagnan G., 1993). Во-первых, воссоединение углеводного и фосфатного остатков после разрыва одной из цепей молекулы ДНК (см. рисунок 1) может быть блокировано кислородом при условии, что хотя бы один из концов обрыва пребывает в реактивном состоянии (последний способен подвергнуться перекисному окислению и, таким образом, потерять способность к воссоединению). Во-вторых, немедленным последствием перекисного окисления липидов является проникновение воды в гидрофобные внутренние слои мембран (см. рисунок 8). На основании этого авторы утверждают, что роль процессов перекисного окисления необходимо учитывать при анализе состояния облученных биологических систем как на молекулярном, так и на клеточном уровне.

REFERENCES

- Delfini C, Alfani E, De Venezia V, Oberholzer G, Tomasello C, Eremenko T, Volpe P. Cell-cycle dependence and properties of the HeLa cell DNA polymerase system. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1985, 82: 2220–2224.
- Delfini C, Crema AL, Alfani E, Eremenko T, Volpe P. DNA methylases separated through HeLa cell cycle methodology. FEBS-Lett., 1987, 210: 17–21; 1988, 227: 85.
- Eremenko T, Benedetto A, Volpe P. Poliovirus replication during the HeLa cell life cycle. Nature, 1972, 237: 114–116.
- Eremenko T, Esposito C, Pasquarelli A, Pasquali E, Volpe P. Cell-cycle kinetics of Friend erythroleukemia cells in a magnetically shielded room and in a low-frequency/low-intensity magnetic field. Bioelectromagnetics, 1997, 18: 58–66.
- Eremenko T, Palitti F, Morelli F, Whitehead EP, Volpe P. Hypomethylation of repair patches in HeLa cells. Mol. Biol. Rep., 1985, 10: 177–182.
- Eremenko T, Tartaglini E, Volpe P. Regulation of DNA repair and replication in proliferating FL cells. Phys. Proc. Acad. Lincei, 1995, 6: 199–312.
- Eremenko T, Timofeeva M.Y., Volpe P. Organization, modification and replication of the human genome: III. Temporal order of replication and methylation of palindromic, repeated and unique HeLa nDNA sequences. Mol. Biol. Rep., 1980, 6: 131–136.
- Frisman E, Zarubina O. Effect of g-irradiation on the conformation of the native DNA molecule. Phys. Chem., 1993, 46: 37–46.
- Howard A, Pelc S.R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, 1953, 6: 261–273.
- Munro T.R. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. Radiat. Res., 1970, 42: 451–470.
- Parasassi T, Giusti AM, Gratton E, Monaco E, Raimondi M, Ravagnan G, Sapora O. Evidence for an increase in water concentration in bilayers after oxidative damage of phospholipids induced by ionizing radiation. Int. J. Rad. Biol., 1994, 65: 329–334.
- Parasassi T, Giusti AM, Raimondi M, Ravagnan G, Sapora O, Gratton E. Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. Free Radicals Biol. Med., 1995, 19: 511–516.
- Parasassi T, Sapora O, Giusti AM, De Stasio G, Ravagnan G. Alterations in erythrocyte membrane lipids induced by low doses of ionizing radiation as revealed by 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence lifetime. Int. J. Radiat. Biol., 1991, 59: 69.
- Volpe P. The gene expression during the cell life cycle. Horizons Biochem. Biophys., 1976, 2: 285–340.
- Volpe P. Chronology of cell and virus transcription. In: Molecular Bases of Genetic Processes (Belyaev D.K., ed.). MIR Publishers, Moscow, 1981, Vol. 3, pp. 7–21.
- Volpe P, Eremenko T. Repair-modification and evolution of the eukaryotic genome organization. Cell Biophys., 1989, 15: 41–60.
- Volpe P, Eremenko T. Complete and incomplete repair of radiodamaged gene sequences. UNESCO Technical Reports, 1994, 19: 27–43.
- Volpe P, Eremenko T. Repair-modification of radiodamaged genes. Rad. Prot. Dos., 1995, 62: 19–22.
- Volpe P, Esposito C, Iacovacci P, Butler RH, Eremenko T. Language of genes with inverse correlation between methylation and transcription. Macromol. Funct. Cell, 1993, 7: 59–71.
- Volpe P, Iacovacci P, Butler R.H., Eremenko T. 5-methylcytosine in genes with methylation-dependent regulation. FEBS-Lett., 1993a, 329: 233–237.
- Volpe P, Giuditta A. Kinetics of RNA labelling in fractions enriched with neuroglia and neurons. Nature, 1967, 216: 154–155.
- Volpe P, Parasassi T, Esposito C, Ravagnan G, Giusti AM, Pasquarelli A, Eremenko T. Cell membrane lipid molecular dynamics in a solenoid vs. a magnetically shielded room. Bioelectromagnetics, 1998, 19: 107–111.
- Volpe P, Ravagnan G. (eds.) Open Problems of Human Radiobiology (The Post-Chernobyl). Pacini Publishers, Pisa, 1993, pp. 1–91.