

# fizikai szemle

AZ EÖTVÖS LORÁND FIZIKAI TÁRSULAT LAPJA

Alapította Eötvös Loránd 1891-ben Mathematikai és Physikai Lapok néven

XXVIII. évfolyam

2. szám

1978. február

## A BIOLÓGIAI SUGÁRSÉRÜLÉS MOLEKULÁRIS PROBLÉMÁI

Tarján Imre  
SOTE Biofizikai Intézet

A sugársérülés számos kérdést vet föl a biológia minden szintjén, a molekulaszinten épp úgy, mint a sejtek, szervek, egyedek szintjén, vagy a populáció és végülis a bioszféra szintjén. Jelen tanulmány csupán a primer jelenségeket magukban foglaló molekuláris folyamatokkal foglalkozik, amelyekhez egyébként azok a témák is kapcsolódnak, amelyek a szerző munkatársainak egy csoportjával, több mint 10 éve dolgozik. A tanulmány előbb áttekinti a kérdéskör jelenlegi helyzetét, majd röviden ismerteti az említett munkacsoport vizsgálatait.

### A terület jelenlegi helyzetének jellemzése

#### Az érdeklődés iránya

A sugársérülés molekuláris szintű problémái közül az érdeklődés előterében a genetikus funkcióban primer szerepet játszó nukleinsav [deoxiribonukleinsav (DNS), ill. ribonukleinsav (RNS)] károsodása és az ezzel összefüggő kérdéskör áll. Ennek több oka van. Ilyen pl. az, hogy egy sejtben egy génből csak egy, vagy néhány példány fordul elő, míg más, ugyancsak fontos alkotórész, pl. egy enzim lényegesen nagyobb számban található a sejtben. Ebből következik, hogy egyfajta enzim-molekula teljes inaktiválása adott besugárzás hatására kis valószínűséggel következik be ahhoz képest, amivel egy génfunkció kiesése jár. Vegyük hozzá ehhez azt is, hogy ép gén esetében egy enzim-fajta csaknem teljes elpusztulásakor is érintetlen az az információ, amely alapján új enzim-molekulák szintetizálódhatnak. A mindennapi életben viszonylag sok olyan fizikai és kémiai hatás ér bennünket, amely elsődlegesen inkább a nukleinsavakra és nem a fehérjékre hat. Érthető ezek után az is,

hogy a sérülést előidéző fizikai ágensek közül az *ultraibolya (UV) fény* és az *ionizáló sugárzások*, a kémiai ágensek közül pedig főként az *alkilező szerek* és a különböző *policiklikus aromás rendszerek* hatásmechanizmusának vizsgálata tartozik a különösen időszerű kérdések közé. A jelen beszámoló középpontjában is a nukleinsavak sérülése áll.

Az ágensek primer hatásaitól a végső biológiai konzekvenciáig hosszú az út. A különböző ágensek közül előidézett folyamatláncnak azonban csak az első láncszemei térnek el egymástól, de még itt is ismeretesek hasonló jelenségek. A láncszakadások pl. ionizáló sugárzások és kémiai ágensek hatására egyaránt bekövetkezhetnek. A replikáció és a transzkripció szintjén pedig már a meglévő különbségek is elmosódnak a különböző ágensek okozta hatások között. Érthető tehát, hogy bármelyik ágens előidézhetheti a magasabbrendű biológiai konzekvenciák mindegyikét, pl. mutációt, malignus transzformációt, sejthalált, sejtöregedést stb. Ezek a körülmények indokolják egyébként a kémiai ágensekkel kapcsolatban használatos *radiomimetikumok* elnevezést is.

#### Kutatási feladatok

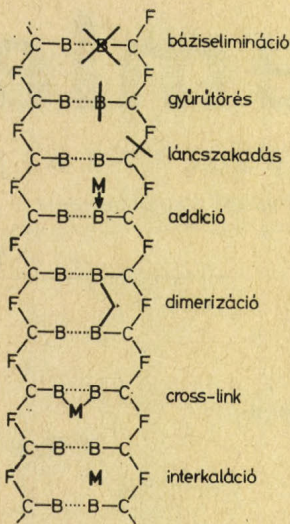
Az alapvető feladatok három csoportra oszthatók:

1. Az ágensek által létrehozott molekul szerkezeti változások megismerése.
2. A reparációs folyamatok feltárása.
3. A különböző molekulásérülések és a biológiai hatások közötti korrelációk kimutatása.

A következőkben néhány megjegyzést fűzünk az említett feladatkörökhöz.

A biológiai hatás szempontjából mai ismereteink szerint lényeges tényező a *DNS térszerkezetének lokális torzulása* [5, 14]. Egy kémiai átalakulás is gyakran ezáltal érezteti hatását. — Az *ismertebb sérülések főbb típusait* [42] az 1. ábra szemlélteti. A két DNS láncban a cukor- és a foszfátcsoportokra, továbbá a bázisokra kezdőbetűik, a láncok

Tarján Imre székfoglaló előadása a Magyar Tudományos Akadémián.



1. ábra. Az ismertebb sérülések főbb típusai

közötti hidrogénhidakra pedig a pontsorok utalnak. Az elnevezéseken kívül az egyes sérüléstípusokat egyszerű szimbólika is jelzi. (Nem szerepel viszont az ábrán, hogy a sérülés következtében a hibás bázisnál, ill. annak környezetében fölszakadnak a hidrogénhidak.) — Adott ágens esetében többféle sérülés is előfordulhat, de mindig létezik egy uralgó folyamat. Pl. 260 nm-es UV fényvel való besugárzásakor a pirimidin dimérek képződése dominál, nitrozometilureával való kezeléskor alkilezésel kezdődő többlépcsős kémiai folyamat zajlik le. (Saját vizsgálatainkban ezek a sérülések játszanak szerepet, ezért kezdtük a felsorolást is ezekkel.)  $\gamma$ -sugárzás esetén főként láncszakadás lép föl. — Addíción nemcsak spontán lezajló kémiai folyamat értendő, hanem ide tartozik a fotoaddíció is. — A bifunkcionális alkilező ágensek hatására kovalens kötés, ún. cross-link alakul ki. Cross-link nemcsak a két polinukleotid lánc között jöhet létre, amit az ábra is szemléltet, hanem egy láncon belül két alkotórész között is kialakulhat. — A sugársérüléssel kapcsolatban — miként más esetekben is, — ismeretes a fotodinámias jelenség, amely most azt jelenti, hogy a DNS-sel kölcsönhatásba lépő (beékelődött) festékmolekula fényt abszorbeálván gerjesztődik, és így jön létre cross-link.

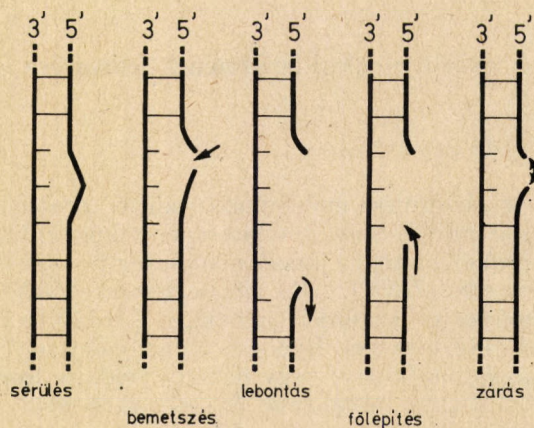
A sérülésekre vonatkozó ismeretek jelenleg még meglehetősen felszínesek. Keveset tudunk adott esetben a különböző sérülések relatív mennyiségéről és a DNS-ben való eloszlásukról is, pl. arról, hogy halmozottan vagy elszórtan képződnek-e, milyen kölcsönhatásokban vesznek részt, léteznek-e a séríthetőség szempontjából kitüntetett helyek. Mindezekből következik, hogy ma még keveset tudunk mondani a DNS strukturális változásai és a biológiai hatások közti kapcsolatról, amit a kutatási feladatok harmadik csoportjaként jelöltünk meg.

Meglehetősen hiányosak ismereteink a másodikként megjelölt problémakörrel, a *sérülések repará-*

*lásával* kapcsolatban is. Jelenleg a fejlődés az adatgyűjtés stádiumában van ezen a területen. Mindenestre lényeges körülmény az, hogy az eddig felismert reparációs lehetőségek sok szempontból hasonló vonást mutatnak a prokaryota és az eukaryota sejtekben [23].

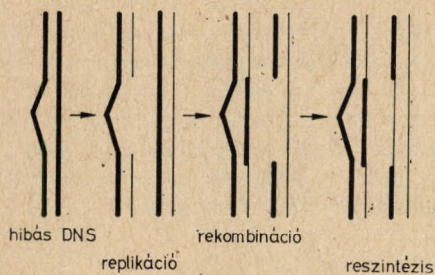
A legegyszerűbb ismert reparáció az *enzimatis fotoreaktiváció*, amely esetében egy enzim és a látható fény együttes hatásáról van szó. Ez a folyamat kevéssé általános: eddigi ismereteink szerint főként a ciklobután típusú pirimidin diméreknek monomerekké való hasításával kapcsolatos.

Jelentős reparációs folyamat a *kivágásos vagy exciziós reparáció*, amelynek főbb fázisait a 2. ábra szemlélteti. A leglényegesebb mozzanat a baloldali ábrarészleten látható, amely a hiba kivágására utal. Ezt a mozzanatot ugyancsak sztochasztikus folyamatként további enzimatis folyamatok, és pedig kimetszések és visszaépülések követik, míg végül egy megfelelő enzim közreműködésével a lánc zárul. Az exciziós reparáció eddig szinte minden vizsgált sejtben megfigyelhető volt, és azt is tudjuk, hogy többféle sérülés kijavítására nyújt lehetőséget. Nyilván szerepet játszik a háttér-sugárzás és más környezeti hatások által okozott, vagy a termikus eredetű hibák kijavításában is. Azáltal, hogy az exciziós reparáció mintegy végigkíséri a sejt életét, őrzi a DNS struktúra korrektségét és ezzel a genetikai információt.



2. ábra. Az exciziós reparáció főbb fázisai

Ugyancsak általános reparációs folyamat a *replikáció utáni rekombinációs reparáció* [21]. A 3. ábrán az eredeti láncrészleteket a vastagabb, a replikáció során kialakult láncrészleteket a vékonyabb vonaldrabok jelölik. A reparáció sebességét valószínűleg a rekombináció szabja meg, ami feltehetően kisebb valószínűséggel zajlik le, mint a folyamat bármelyik más lépése. E viszonylag kis valószínűségű részfolyamat azt is posztulálja, hogy a rekombinációs reparáció kevésbé jelentős az exciziós reparációnál, jóllehet ez is megfigyelhető különböző típusú sérülések esetében. A konkrét kvantitatív össze-



3. ábra. A posztreplicációs rekombinációs reparáció lényeges fázisai

hasonlításra azonban az eddigi adatok alapján nincs lehetőség. Vegyük észre, hogy a folyamat kapcsán a hibás DNS megmarad, és csupán az történik, hogy kialakul egy ép DNS molekula is. A folyamat többszöri megismétlődése során tehát a hibás DNS-ek száma változatlan marad, de relatív számuk egyre csökken, vagyis a hiba felhigul.

### Vizsgálataink tárgya, célja és módszereink

A sugársérülés molekuláris szintű megközelítése is még sokféle lehet. Kutatási elképzeléseink kijelölésénél, a konkrét feladatok meghatározásánál több körülmény, ill. szempont játszott szerepet. Talán érdemes vázolni ezeket, hiszen ma is időszerűek és egyúttal egyfajta szemléletet, gondolkodási módot is tükröznek.

### Az eredeti kutatási irány

Vizsgálataink tárgyaként a baktériumok vírusait, a bakteriofágokat, ill. a fág-baktérium-komplexeiket választottuk [30]. Ugyanis:

a fágok mai ismereteink szerint a legegyszerűbb biológiai rendszerek, amelyek felépítése és funkciói viszonylag jól ismertek, felépítésük és funkcióik közötti kapcsolatok is eléggé áttekinthetők (a 4. ábrán egy T7 fág vázlatos felépítése látható);

ugyanakkor a fágok sugárhatás szempontjából a sejtek modelljeiként tekinthetők;

a kísérleti feltételek velük kapcsolatban egzakt módon biztosíthatók;

a vizsgált populáció egyedeinek nagy száma tág teret biztosít a statisztikai kiértékelések számára;

az in vivo és in vitro körülmények között nyert eredmények jól egybevetethetők;

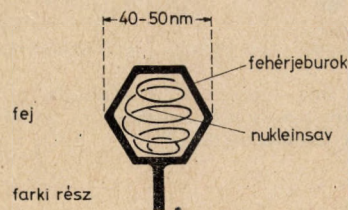
a problémák több oldalról való megközelíthetősége érdekes találkozási lehetőséget nyújt biológus, kémikus, fizikus és matematikus számára egyaránt.

Egy fágfejben egyetlen nukleinsav molekula, és pedig vagy DNS, vagy RNS található. Vizsgálataink célja az, hogy a fág-DNS-ben, ill. a fág-RNS-

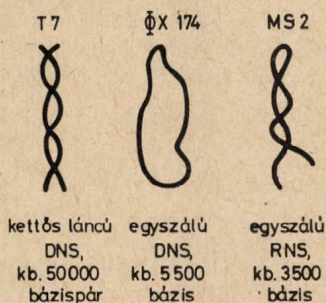
ben kiváltott primer aktusokból kiindulva kövessük a sugárhatás teljes folyamatláncát egészen a biológiai konzekvenciáig. Vizsgálatainkban azokat a sérüléseket vettük tekintetbe, amelyek következtében a fág elveszti szaporodóképességét. Épnek tehát azokat a fágokat tekintettük, amelyek egy gazdaseljtire jutva annak feloldása révén szaporodni képesek. Egy egyszerű mikrobiológiai módszer felhasználásával, az ún. *tarfoltképzés* vizsgálatával éppen ezeknek a számát határoztuk meg.

Az 5. ábra az általunk vizsgált fágokat, ill. fág-nukleinsavakat jelzi. A feltüntetett fágok egy-egy fágcsoport jellegzetes képviselői [12, 38, 40]. A közöttük levő különbség nukleinsavaik felépítésében mutatkozik, aminek következményei természetesen a biológiai funkciókban is jelentkeznek. Elég arra utalni, hogy a DNS-fágok esetében a DNS sérülések első funkcionális konzekvenciái a *transzkripció* (vagy a replikáció) szintjén jelentkeznek, az RNS-fágok esetében viszont az RNS sérülése közvetlenül a transláció szintjén manifesztálódik. A gazdabaktériumok az egyes fágok esetében a megfelelő coli-baktérium törzsek voltak.

Vizsgálatainkban ágensként 254 nm hullámhosszúságú UV fényt alkalmaztunk, kémiai inaktiváció céljára pedig monofunkcionális alkilező szereket, elsősorban nitrozometilureát (NMU) használtunk, amely főként a guanin-bázisokat támadja meg. Az UV fény preferálását a röntgen- és a radioaktív sugárzásokkal szemben több körülmény indokolja. Ilyen pl. az, hogy az elnyelt energia viszonylag pontosan mérhető, az elnyelés egyetlen aktusban következik be, és ami ugyancsak figyelemre méltó: a 254 nm-es fényt a fehérjeköpeny gyakorlatilag átengedi, ez a fény tehát közvetlenül jut el a nukleinsavakhoz.



4. ábra. A T7 fág vázlatos felépítése



5. ábra. Az általunk vizsgált fágok, ill. fág-nukleinsavak

Nyilvánvaló, hogy biológiai szempontból a természetes környezetben levő nukleinsavak tulajdonságainak megismerése képezi az alapvető problémát. Fizikai és kémiai szempontból is érdekes azonban a nukleotida bázisok és származékaik mindenféle rendszerének megismerése. Ilyenek pl. az oldatban levő natív és denaturált DNS és RNS, vagy a bázisok oldatai, szintetikus polimerjei, kristályos fázisai. Biológiai szempontból e rendszerek jelentősége abban áll, hogy mint modellrendszerek ilyen vagy olyan vonatkozásban segítséget nyújtanak a természetes nukleinsavak tulajdonságainak megismerésében, és a különböző rendszerek összevetése az élet alapjainak megértését is segíti. Pl.: miért éppen a natív struktúra egzisztál, hogyan szolgálja éppen ez a szerkezet a genetikai anyag védelmét a sugárkárosodással szemben [3, 20].

Az említett rendszerekről egyelőre keveset tudunk, de feltétlenül érdekesek pl. a következő eredmények. — A kristályos fázisban UV fény hatására többféle dimer alakulhat ki, és ezek kisebb-nagyobb túalakú tartományokat képeznek, amelyeket monomerek vesznek körül [6]. A különböző kristályos fázisok valószínűleg eutektikumot alkotnak. — Említésre méltó az is, hogy a fágfejből és az oldatban levő natív nukleinsavak (jóllehet eltérő konformációjúak), fotoproduktumaik minőségét és mennyiségét illetően hasonlóan viselkednek. — A denaturált DNS és a szintetikus polimerek oldatban UV fény hatására érzékenyebbek, mint a natív DNS [15].

1. táblázat

**Biológiai és kémiai eljárások**

Nagy tisztaságú fágpreparátumok előállítása (5 mg/ml)  
 Nagy tisztaságú fág-DNS és fág-RNS előállítása (2 mg/ml)  
 Tarfoltképző aktivitás egzakt meghatározása (módosított eljárás)  
 Inaktivációs dózishatásgörbék felvétele  
 Konstans paraméterekkel rendelkező gazdasajt-kultúrák előállítása kemosztátban

**Fizikai (fizikai-kémiai) módszerek**

Optikai spektroszkópia	{ ultraibolya, vákuumultraibolya, infravörös, fluoreszcencia, cirk. dikroizmus, szórás { Raman (laser), Rayleigh             }
Mágneses rezonancia spektroszkópia	
Diffrakciós módszerek	{ röntgen- (k i s s z ö g ű), elektron-, neutron-

Magunk is végeztünk vizsgálatokat *vákuumpárologtatással létrehozott polikristályos bázisokon*, közülük is az UV fényre különösen érzékeny pirimidineken. Ebben az esetben közvetlen célunk az, hogy egzakt és elméletileg is jól tárgyalható körülmények között keressünk választ pl. arra a kérdésre, hogy miként változik meg a bázisok közötti kölcsönhatás UV fény hatására.

**Módszereink**

Témáink, mint általában a molekuláris szintű szerkezetkutatások, a megfelelő biológiai eljárásokon kívül igénylik a fizika és a kémia teljes eszköztárát, módszerkészletét. Az 1. táblázatban összefoglaltuk az általunk alkalmazott és továbbfejlesztett *biológiai, valamint kémiai eljárásokat*, a 2. táblázatban pedig a *fizikai (fizikai-kémiai) eljárások* láthatók. Ez utóbbi táblázat egyébként tájékoztatást ad a biológiai sugársérülés tanulmányozásában általában használt fontosabb módszerekről. Az általunk alkalmazott, ill. hazai együttműködésben rendelkezésünkre álló eljárásokat dőlt, a külföldi (főként szovjet és német) együttműködésben alkalmazott módszereinket ritkább szedés jelzi.

**Eredményeink**

Az ismertetésben teljességre nem töreksem, csak néhány talán általános jellegű megállapítást említek, amelyek egyúttal példák kívánnak lenni a kísérleti és elméleti munkák egymást serkentő kölcsönhatására.

*Ultraibolya fény hatása T7 fágokra*

Kb. 12 évvel ezelőtti eredményt idézünk a 6. ábrán, amelyen a *T7 fág UV inaktivációs dózishatásgörbéje látható* [28, 29]. Inaktiváción — mint

2. táblázat

Mikrokalorimetria	
Szeparációs módszerek	{ kromatográfia szedimentáció
Elektronmikroszkópia	
Viszkozimetria	
Elméleti módszerek	{ sztochasztikus, kvantumkémiai, termodinamikai

már említettem — a tarfoltképző aktivitás elvesztését értjük. A vízszintes tengelyen a 254 nm hullámhosszúságú UV besugárzás időtartama, a függőlegesen a túlélő fágok hányada ( $N/N_0$ ), pontosabban  $e$  hányados logaritmus szerepel. Az ábrán a kísérleteinkben alkalmazott UV fluxust ( $\Phi$ ) is feltüntettük.

Az inaktivációs görbe menetét természetesen az abszorbeált fotonokon kívül, adott fizikai és kémiai feltételek között is, számos más tényező befolyásolhatja, pl. a spontán inaktiváció, a spontán reaktiváció, a multiplicitás-reaktiváció, az enzimatis fotoreaktiváció, a gazdasejtek részéről mutatkozó sötétreparáció. Az adott esetben kontroll-vizsgálataink alapján mindezeket figyelmen kívül hagyhatjuk, kivéve a sötétreparációt. Ez is bénítható azonban, ha a gazdasejteket *koffeines* kezelésnek vetjük alá. Tapasztalataink szerint a koffein bénító hatása a koffein-koncentráció növelésével telítéshez közeledik. Az *a* görbét sötétreparáció jelenlétében, a *b* görbét pedig olyan esetben vettük föl, amikor a sötétreparáció is figyelmen kívül hagyható. A *b* görbe tehát még egyszerűbb körülményeket tükröz, mint az *a* görbe.

A kísérleti eredmények értelmezése céljából a DNS-ben lejátszódó folyamatokra vonatkozólag egyszerű, plauzibilis feltevésekkel élve egy sugárkinetikai modellt alkottunk, amit matematikailag is megfogalmaztunk. A kísérleti és elméleti eredmények összevetése alapján a következőket mondhatjuk:

a) A vizsgált inaktiváció egytalálatos esemény, vagyis egy fág egyetlen sérülése a tarfoltképző képesség elvesztéséhez vezethet.

b) Az alkalmazott UV fény nemcsak sérteni, de a hibát kijavítani is képes, vagyis a folyamatban ún. *direkt fotoreverzió* is szerepet játszik.

c) Egy ép fág a tarfoltképzés szempontjából több mint 50 sérthető helyet tartalmaz. Felső korlát a modell alapján nem adható meg, ilyen vonatkozásban összefüggéseink érzéketlenek.

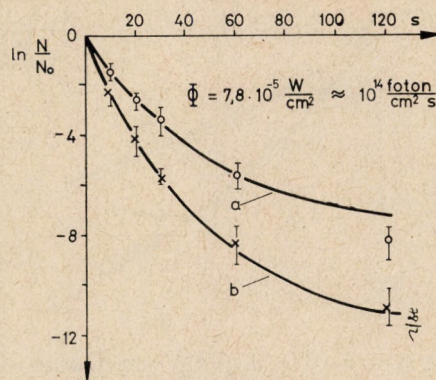
d) Egy sérthető hely csak kétféle állapotban létezhet, és pedig vagy ép vagy sérült állapotban.

e) Elég kis UV dózisoknál az egyes helyek egymástól függetlenül sérülnek, és a sérültek egymástól függetlenül revertálódnak. Ilyen körülmények álltak fenn kísérleteinkben is.

f) A fotonok abszorpciója, a sérülés, a sérült helyek reparációja Poisson-folyamat szerint játszódik le.

g) Meghatároztuk egy ép fág sérülési és egy sérült hely reverziós hatáskeresztmetszetét. Ezek konkrét értékeire később visszatérek. Ugyancsak meghatároztuk azt a valószínűséget is, amivel a gazdasejt a fág-DNS-ben egy sérült helyet reparálni képes. Értéke kb. 0,35, tehát kerekben minden harmadik sérülés reaktiválódik.

h) Az elmélet alapján fölrítható, hogy  $t$  ideig tartó besugárzás után mennyi a tarfoltképzés szempontjából 0, 1, 2, ...  $k$  találattal rendelkező fágok száma [31]. Kísérletileg közvetlenül csak a zérus találatos, vagyis az ép fágok száma ellenőrizhető,



6. ábra. A T7 fág UV inaktivációs dózishatásgörbéi

ezért az alábbiakban csak ezt az összefüggést tüntettem föl, ezt is arra az esetre vonatkozólag, amikor a sötétreparáció eliminálva van:

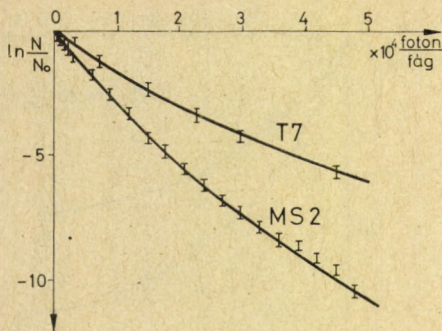
$$\frac{N}{N_0} = \left[ \frac{\sigma_r + \sigma_s e^{-(\sigma_r + \sigma_s) \Phi t}}{\sigma_r + \sigma_s} \right]^s$$

A kitevőben szereplő  $s$  egy fágban előforduló sérthető helyek számát, a  $\Phi$  a beeső fotonfluxust jelöli, a  $\sigma$  pedig hatáskeresztmetszeteket jelez, és pedig  $\sigma_s$  a sérülés,  $\sigma_r$  a fotoreverzió hatáskeresztmetszetét jelenti a DNS egyetlen sérthető ill. sérült helyére vonatkozólag.

Megállapításaink inkább problémafelvető, mint lezáró jellegűek, és — mint a következőkben látni fogjuk — az újabb eredmények részben igazolják, részben kiegészítik azokat. Már itt megemlítjük, hogy mai ismereteink szerint a T7 esetében a sérülés *pirimidin dimérek* képződéséből áll, és az ilyen lehetőségek száma valóban több 50-nél. Továbbra is nyitott kérdés azonban az, hogy a DNS mely helyein levő pirimidin-kettősök ill. -csoportok dimerizációja játszik szerepet a tarfoltképzés elmaradásában [32, 33]. Erre a kérdésre is később még visszatérek.

#### Ultraibolya fény hatása MS2 fágokra

A kísérleti eredmény a 7. ábrán látható. Összehasonlítás céljából feltüntettük a T7 dózishatás-görbét is [16, 17]. Minthogy különböző méretű fágok (ill. fág-nukleinsavak) összehasonlításáról van szó, célszerű a túlélési rátát a besugárzási idő helyett az *egy fág által elnyelt* fotonok szám függvényében fölrajzolni. Az abszorpciós állandók (abszorpciós hatáskeresztmetszetek) ismeretében az ilyen ábrázolás elvégezhető és ezt tettük a 7. ábra esetében is. (Az MS2-vel kapcsolatban nincs sötétreparáció, ezért a T7 esetében is az ábrán a sötétreparáció nélküli folyamathoz tartozó görbe szerepel.) A görbék a két fág esetében hasonló jellegűek, eltérés csak annyiban mutatkozik közöttük, hogy az MS2-nél a kezdeti, enyhe görbület fokozatosan megszűnik, a görbe kiegyenesedik. Ábrázolásunk-



7. ábra. A T7 és az MS2 fágok UV inaktivációs dózishatás-görbéinek összehasonlítása

ban a kiegyenesedés egyszerű exponenciális csökkenésre utal. Ez a körülmény azt mutatja, hogy az MS2 esetében nemcsak a T7-nél tapasztalt „reverzibilis” fotosérülés fordul elő, hanem „irreverzibilis” károsodás is létezik és fokozatosan ez válik dominánssá. A reverzibilis sérüléseket most is pirimidin diméréknek tulajdonítjuk, az irreverzibilisek pedig, tekintetbe véve, hogy az MS2 RNS molekulájában timin helyett hidratációra hajlamos uracil-bázisok találhatóak, hidratált uraciloknak tekinthetők. (A korábbi irodalom [4, 27] csak az utóbbiak létezésére utal.)

Az MS2 dózishatásgörbéjének értelmezése céljából a sérthető helyek háromféle típusát különböztetjük meg [36]. Az elsőbe azokat soroljuk, amelyek csak irreverzibilisen, a másodikba azokat, amelyek csak reverzibilisen és a harmadikba, amelyek mindkét módon sérülhetnek. Az első típusú helyet reprezentálja pl. egy magányos uracil, a másodikikat pl. egy citozin-pár, a harmadikat pl. egy uracil-citozin-pár. Az újabb irodalom [12] szerint az MS2 primer szerkezete teljes egészében ismeretes, így az egyes sérülési kategóriákba sorolható helyek egyszerűen megszámlálhatók. A dózishatásgörbét leíró elméleti összefüggést már ezen adatok ismeretében határoztuk meg. A jó egyezést a kísérleti eredményekkel az előző ábra mutatja, a görbét ui. a formula alapján húztuk ki.

A meglehetősen bonyolult összefüggés felírását mellőzöm, csak a hatás keresztmetszetekre vonatkozó eredményekre térek ki, és ezeket összehasonlítom a T7 esetében nyert eredményekkel. A cél az, hogy valami közelebbit megtudjunk a sérthető helyekről. Milyen helyek sérülése manifesztálódik a T7 esetében a transzkripció szintén, és milyen helyek sérülése játszik szerepet az MS2 esetében a translációnál? Előbb a dimerizáció szempontjából szóba jövő helyekkel foglalkozom. Ésszerűnek látszik posztulálni, hogy egy dimer átlagos képződési hatás keresztmetszete a két fág esetében egyenlő. Tapasztalatunk szerint ui. az egy bázisra jutó átlagos abszorpciós állandó (abszorpciós hatás keresztmetszet) a két fág esetében egyenlő. Az említett gondolat tehát tulajdonképpen azt fejezi ki, hogy egy dimerizációra alkalmas helyen egy elnyelt foton kb. ugyanakkora átlagos valószínűséggel

hoz létre dimert a T7, mint az MS2 esetében. Ez a gondolat pedig valóban elfogadható, és érdekes konzekvenciával jár. A dimerizációs hatás keresztmetszetek ui. a két fág esetében akkor lehetnek közel egyenlők, ha mind a T7-nél, mind a MS2-nél a dimerizációra képes helyek ugyanakkora hányada felelős a tarfoltképződés elmaradásáért. Ez pedig azt sugallja, hogy a dimerizáció egyformán jelent „végzetes” hibát a transzkripció és a transláció szempontjából. A kérdés most már az, hogy a dimerizációra képes helyeknek hányad része felelős az inaktiváció létrejöttéért. Valószínű, hogy valamennyi hely egyenértékű. E megállapítást mások [4, 27, 37] méréseire építjük, akik kémiai módszerrel meghatározták egy adott UV dózis hatására adott hosszúságú nukleinsavban képződött dimerek számát. Ha eme eredmény alapján számolt dimerizációs hatás keresztmetszetet összevetjük a tarfoltképzés alapján kapott hatás keresztmetszettel, az adódik, hogy valamennyi hely, ahol dimer képződhet, egyenértékű a tarfoltképzés szempontjából. Mind az idézett szerzőknél, mind pedig saját vizsgálatainkban egy dimerképződés hatás keresztmetszete nagyságrendben  $10^{-19}$  cm<sup>2</sup>-nek adódik, ami kereken 100-szor kisebb, mint egy aromás gyűrű területe.

Érdekes eredmény az is, hogy a két fág esetében a fotoreverzió hatás keresztmetszete is nagyságrendben megegyezik. A T7-nél csak néhányszor nagyobb értékkel találkozunk, mint az MS2-nél, ami pl. magyarázható azzal, hogy egyszeres lánc esetében a dimer stabilisabb mint kettős lánc esetében. Egyébként a fotoreverzió hatás keresztmetszete 2–3 nagyságrenddel nagyobb mint a dimerizációé.

A hidratációval kapcsolatban csak annyit említek meg, hogy az ehhez tartozó hatás keresztmetszet a MS2-nél a dimerizációs hatás keresztmetszettel azonos nagyságrendű.

Elméletünk realitása mellett szól az is, hogy azt sikerrel alkalmaztuk mások által más fágokon és más dózistartományokban kapott eredmények értelmezésére is [18, 19, 31]. Itt most azonban inkább az elmélet jelenlegi hiányosságairól szólok. Nem vettük pl. tekintetbe azt a tapasztalatot, hogy a dózis növelésével a T7 esetében az újabb sérülések kialakulásának valószínűsége nő. Ehhez kapcsolódva indokolt azt is feltételezni, hogy a fotoreverzió viszont a sérülések felszaporodásával egyre inkább „megnehezül”. Számításaink szerint T7 esetében az általunk eddig alkalmazott kis dózisoknál a sérült helyek száma nem éri el a sérthető helyek 1%-át sem. Úgy véljük, hogy az említett effektusok csak lényegesen nagyobb dózisoknál jelentkezhetnek jól észrevehető módon. — Valószínűnek tartjuk azt is, hogy a sötétreparáció valószínűsége a sérülések számának növelésével rohamosabban csökken, mint ahogyan ezt a modellben eddig tekintetbe vettük. — Nyitott kérdés marad továbbra is, hogy sérülést ill. reverziót csak a sérthető tartományokban abszorbeált fotonok okozhatnak-e vagy hatások lehetnek-e nagyobb tartományokban abszorbeált fotonok is, föltéve, hogy energiájuk

valamilyen módon (pl. exciton formájában) a sérthető helyre vándorol [7].

Nyilván elhanyagolást tartalmaz az a feltevés is, hogy a sérthető helyek sérülési valószínűsége egyenlő. Ez a kérdés érinti azt az alapvető problémát, hogy *milyen kölcsönhatás van a nukleinsav és a fehérjeburok között*. Ekvivalensek-e tehát a burok közelében levő sérthető helyek a buroktól távolabb levőkkel? Erről máris tudunk mondani valamit. T7-en végzett mikrokolorimetriás és abszorpciós vizsgálataink egybehangzóan azt mutatják, hogy míg az oldatban levő natív DNS esetében az 50–100 °C tartományban csak *egy* fázisátalakulás lép fel 87–87,5 °C-nál, addig a fágfejben levő DNS-hez *két* jól megfigyelhető fázisátalakulás tartozik, az egyik 85 °C-nál a másik 89 °C-nál jelentkezik. UV fényvel (254 nm) besugárzott fágok esetében az alacsonyabb hőmérséklet 85 °C-ról 83,5 °C-ra változik, míg a 89 °C-os hőmérséklet változatlan marad [22]. Az UV fény tehát főleg a gyöngébb kötéseknél hat, és fokozza a fehérjeburok által létesített föllazulást.

#### Nitrozometilurea hatása T7 és $\Phi$ X174 fágokra

A 8. ábra a DNS tartalmú T7 és  $\Phi$ X174 fágok kémiai inaktivációs dózishatásgörbéit mutatja abban az esetben, amikor az inaktivációt nitrozometilureával (NMU) idéztük elő [34]. Az inaktiváció most is, miként az UV besugárzás esetén, azt jelenti, hogy a sérült fág nem képes tarfoltképzésre. (A T7 fág esetében sötétreparáció is előfordul, ezt azonban az idézett kísérleteinkben koffein segítségével kizártuk.)

Az inaktiválást sztochasztikus folyamatként tekintve sikerült a dózishatásgörbéket kvantitatíve értelmezni. Ennek során felhasználtuk mások [39] in vitro vizsgálataiból adódó ama felismerést, hogy egy elindult kémiai sérülés önmagától tovább mélyül: a sérülés alkilezéssel kezdődik, az alkilezést

depurinezés, ezt pedig egyszeres láncszakadás követi stb. Az elméleti úton nyert összefüggésnek, amit ebben az esetben sem ismertetek, a kísérleti eredményekkel való összevetéséből érdekes következtetések vonhatók le [41].

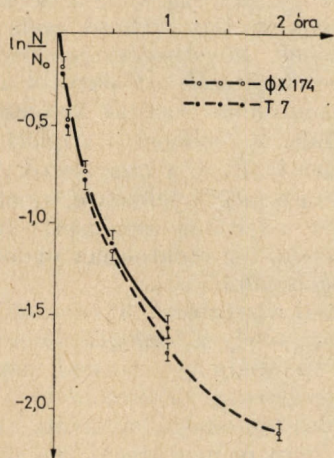
Úgy látszik, hogy a sérthető helyek — bár reakciókinetikailag hasonló módon viselkednek — biológiailag nem ekvivalensek, és pedig legalább háromféle sérthető hellyel kell számolnunk. Léteznek olyanok, amelyeknél már az alkilezés inaktivációhoz vezet, de vannak olyanok is, amelyeknél az alkilezés kevés, de a depurineződés már elegendő az aktivitás elvesztéséhez, és modellünk szerint biztosan előfordulnak még „ellenállóbb” helyek is, amelyeknél legalább egyszeres láncszakadásnak kell bekövetkeznie, hogy létrejöjjön a biológiai sérülés. Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy nem szükséges feltételezni olyan sérthető helyeket, amelyek egyszeres láncszakadás után is aktívan hagyják a fágot. A sérthető helyeknek egyébként kb. fele olyan, amelynek az alkilezése is már inaktivációhoz vezet, és a másik felénél, ha a depurinezés még nem is, de az egyszeres láncszakadás már minden esetben elegendő a fág inaktivációjához.

Érdekes megállapítást tehetünk a sötétreparációval kapcsolatban is. Vizsgálatainkból az adódik, hogy ennek valószínűsége jelen esetben is kb. ugyanakkora, mint az UV fényvel okozott sérülések esetében [35]. Ez a körülmény igazolni látszik azt a más oldalról kapott eredményt, amely szerint a gazdasejtben ugyanaz a reparációs mechanizmus javítja ki az UV fény, mint az NMU okozta hibákat.

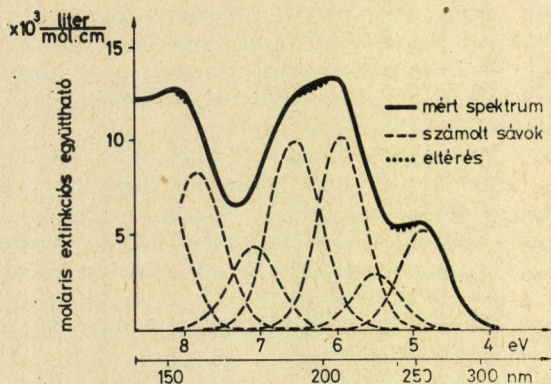
#### Ultraibolya fény hatása mikrokristályos bázisrétegekre

Végezetül a párologtatással előállított mikrokristályos bázisrétegeken nyert eredményeinkről szeretnék röviden szólni. Eddigi tapasztalataink főként a citozin és az uracil bázisokkal és ezek a- valamint metilezett származékaival kapcsolatosak. Megismertük *abszorpciós spektrumaikat* az ultraibolya és a vákuumultraibolya tartományban (135 nm-től), és egyeseket felbontottunk egyszerű sávokra [13, 24, 26]. Példaként az 5-aza-citozin abszorpciós színképét és annak felbontását mutatom be (9. ábra).

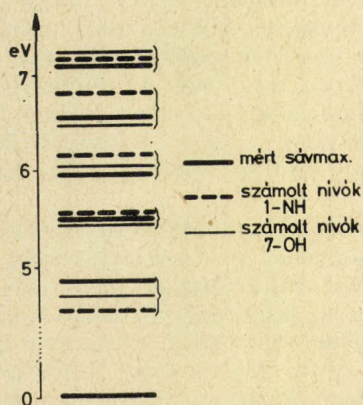
A *spektrumok jellemzőit kvantumkémiai módszerekkel értelmeztük* is. Meghatároztuk az alap- és gerjesztett állapotok energiáit, hullámfüggvényeit, a dipólátmenetek oszcillátor-erősségeit, az átmeneti momentumok irányát [24, 26]. Példaként az 5-aza-citozint említem, és energianívó-rendszerét a 10. ábrán mutatom be. — A számolásokat nemcsak a közönséges (vagyis oldatban is előforduló) 1-NH tautomerre vonatkozólag, hanem mind az ötféle lehetséges tautomerrel kapcsolatban elvégeztük. Csupán egyetlen kristályfizikai megállapítást említek. Az ábrán a kísérleti adatokon és az 1-NH tautomerre vonatkozó számolási eredményeken



8. ábra. NMU-val való kezelés hatása T7 és  $\Phi$ X174 esetében



9. ábra. 5-aza-citozin abszorpciós színekének felbontása



10. ábra. 5-aza-citozin energianívórendszere

kívül csak a 7-OH tautomer nívói láthatók. A többi tautomer nívóit nem tüntettem fel, ezek ugyanis a kísérleti nívóktól nagymértékben különböznek. Ez pedig valószínűleg azt jelenti, hogy az utóbbiak előfordulása a párolgatott mikrokristályos rétegben nem lehet számottevő.

Vizsgálataink kiterjedtek a polikristályos uracil-rétegben UV fény (254 nm) hatására végbemenő folyamatok, vagyis a dimerizáció tanulmányozására is [8, 9, 10, 11, 25]. Tapasztalataink szerint az uracil vékonyrétegek abszorpciós spektruma a besugárzás hatására jelentősen változik: a 260 nm körüli abszorpciós sáv fokozatosan csökken, míg 180 nm tájékán ill. annál rövidebb hullámhosszknál új abszorpciós maximumok jelentkeznek. A jelzett változást elsősorban a fotodimerek keletkezésével hozzuk kapcsolatba. Meghatároztuk a dimerizáció dóziszfüggését, és abból a fotodimerizációs hatáskeresztmetszetet.

Föltételezve, hogy fágok esetében is ciklobután (cisz head to head) típusú dimerek képződnek, hasonlítjuk össze a különböző struktúráknál kapott hatáskeresztmetszeteket. Mikrokristályos uracil rétegek esetében a dimerizációs hatáskeresztmetszet két nagyságrenddel nagyobb, mint amit a vizsgált fágok esetében kaptunk, és amit az előzőekben már említettem. Ez az eredmény meglepő, ha csak azt

tekintjük, hogy a bázis-síkok közötti távolság a kristályban ugyanakkora, mint az RNS-ben. Vegyük azonban számba azt is, hogy fágokban nemcsak a hidrogén-hidak nehezítik, hanem a cukor-foszfát gerinc is akadályozza a dimerképződést, másrészt pedig, — és talán ez a lényegesebb tényező, — a bázisok egymáshoz képest elfoglalt térbeli helyzete is kedvezőbb a dimerizációra az uracil kristályban, mint a natív nukleotid láncban. — Érdekes az is, hogy a fotoreverzió, vagyis a dimer—monomer átalakulás hatáskeresztmetszete a kristályos állapotban is ugyanakkora nagyságrendbe esik, mint a két fág esetében. Ez pedig arra utal, hogy a vizsgált esetekben egy dimernek monomerré való visszalakulásakor a különböző környezeti hatások nagyjából ugyanolyan konzekvenciáihoz vezetnek.

A dimerizációra vonatkozólag további információkkal is szolgálnak *kvantumkémiai számításaink*. Dimerizációkor az egymás fölötti bázis-síkok közötti távolság 3—4 Å-ról kb. felére csökken (és az eredetileg parallel síkok egymáshoz kb. 30° alatt hajlónvá válnak). Kiszámoltuk több bázis és azok származékai esetében, hogy miként függ a bázis-síkok közötti távolságtól a szinglett alapállapot, valamint az első gerjesztett szinglett ill. tripllett állapotok energiája [10, 26]. Az eddig alkalmazott  $\pi$ -elektron pertubációs módszer csak 2,4 Å-nél nagyobb távolságok esetében ad megbízható energiaértékeket, de ezekből következtetni lehet a dimer-állapot szempontjából érdekes, kisebb távolságoknál fennálló energiaviszonyokra is. A vizsgálatok magyarázatot adnak arra, hogy alapállapotban kedvezőtlenek a viszonyok a dimerizációra (a dimerképződést ugyanis egy energiahegy akadályozza), kedvező viszont a helyzet a dimerképződésre, ha a rendszer megfelelő energiájú foton révén szinglett gerjesztett állapotba kerül, és akkor is, ha ebből a tripllett gerjesztett állapotba jut. Ez utóbbi átmenet bázisokon belüli spin—pályakölcsönhatások révén, vagy megfelelő idegen atomokkal, ill. molekulákkal való kölcsönhatás következtében jöhet létre (szenzibilizált dimerizáció). Rendezett bázis-struktúrában, amilyen kristályos fázisban, vagy polinukleotid láncokban (sőt tömény oldatokban is) található, ezek a folyamatok jelentéktelenek, következőképp szinglett—szinglett átmenetek játszák a főszerepet a dimerizációban, míg oldatokban viszont kedvező feltételeket teremthetünk a szinglett—tripllett dimerizáció kialakulására is. Ezek a vizsgálatok magyarázatot adtak azokra a megfigyelésekre, amelyek szerint a dimerizációs aktivitás rendezett struktúrákban uracil esetében, míg oldatokban viszont 6-aza-uracilnál a legnagyobb [10].

Befejezésül visszatérek a bevezetőben említett gondolathoz, amely a biológiai sugársérülés molekuláris szintű tanulmányozásának alapvető jelentőségét hangsúlyozta. Eredményeink említésével nem a kérdés fontosságát akartam alátámasztani, úgy vélem, hogy ez nem szorul a mi támogatásunkra, csupán helykoordinátáinkat kívántam jelezni egy nagy területen.

- [1] Bräutigam, A. R., Sauerbier, W.: Transcription Unit Mapping in Bacteriophage T7. I. In vivo Transcription by E. coli RNA-Polymerase, *J. Virology* 12, 882. (1973)
- [2] Bräutigam, A. R., Sauerbier, W.: Transcription Unit Mapping in Bacteriophage T7. II. Proportionality of Number of Gene Copies, mRNA and Gene Product, *J. Virology* 13, 1110. (1974)
- [3] Bugg, C. E., Thomas, J. M.: Stereochemistry of Nucleic Acids and Their Constituents. X. Solid-State Base-stacking Pattern in Nucleic Acid Constituents and Polynucleotides. *Biopolymers* 10, 175. (1971)
- [4] Cerutti, D. A., Miller, N., Pleiss, M. G., Remsen, J. F., Ramsay, W. J.: Photohydration of Uridin in the RNA of Coliphage R17, *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 64, 731. (1969)
- [5] Cerutti, P. A.: Excision Repair of DNA Base Damage. *Life Sciences* 15, 1567. (1974)
- [6] Cohen, M. D., Ron, I., Schmidt, G. M. J., Thomas, J. M.: Photochemical Decoration of Dislocations inside Crystals of Acenaphthylene, *Nature* 224, 167. (1969)
- [7] Dee, A., Baur, M. E.: Charge and Excitation Migration in DNA Chains. *J. Chem. Phys.* 60, 541. (1974)
- [8] Fidy, J., Földvári, I., Raksányi, K.: The UV Photo-damage of Polycrystalline thin Layers of Uracil and Methylated Uracils. *Acta Physiol. Hung.* in press
- [9] Fidy, J., Földvári, I., Raksányi, K.: The UV Radiation Chemistry of Thymine and Uracil thin Layers, *Studia biophys.* in press
- [10] Fidy, J., Karczag, A., Raksányi, K.: Electronic Structure of Uracil and its UV Photoproducts, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 11, 185. (1976)
- [11] Fidy, J., Földvári, I., Raksányi, K.: Spectroscopic and Kinetic Study of the UV Photochemistry of Uracil Thin Crystal Layers, *Biophysical Chemistry* in press
- [12] Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Reaymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G., Ysebaert, M.: Complet Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene, *Nature* 260, 500. (1976)
- [13] Földvári I.: Újabb eredmények a széles tiltott sávú anyagok vákuum-ultraibolya spektroszkópiai vizsgálata alapján. Kandidátusi értekezés. Budapest (1976)
- [14] Hagen, U.: Strahlenwirkung auf Struktur und Funktion der Desoxyribonukleinsäure, *Biophysik* 9, 279 (1973)
- [15] Hosszú, J. L., Rahn, R. O.: Thymidine Dimer Formation in DNA between 25°C and 100°C. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 29, 327. (1967)
- [16] Karczag, A., Rontó, Gy.: The Comparative Analysis of UV Effect on Bacteriophages Containing DNA and RNA, *Proc. I. Eur. Biophys. Congr. Baden near Vienna*, 2, 263. (1971)
- [17] Karczag, A., Rontó, Gy., Tarján, I.: Study of the UV Effect on MS2 Phages, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 7, 173. (1972)
- [18] Karczag, A., Rontó, Gy., Tarján, I.: Further Data on the Radiation Injury of MS2 Phages, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 8, 281. (1973)
- [19] Karczag, A.: A természetes m-RNS ultraibolya sugársérülésének vizsgálata MS2 fágokon. Kandidátusi értekezés. Budapest (1976)
- [20] Lamola, A. A.: Photochemistry and Structure in Nucleic Acids, *Pure and Applied Chemistry* 34, 281. (1973)
- [21] Lehmann, A. R.: Postreplication Repair of DNA in Mammalian Cells. *Life Sciences* 15, 2005. (1974)
- [22] Monaselidze, D. R., Chanchalashvili, Z. I., Mgeladze, G. N., Madjagaladze, G. V., Fekete, A., Rontó, Gy.: Thermodynamical Properties of Phages T7, *Studia biophys.* in press
- [23] Radman, M.: Mechanisms of DNA repair, 13<sup>th</sup> Ann. Meeting of ESRB, Liège. (1977)
- [24] Raksányi, K., Fidy, J., Földvári, I., Tarján, I.: Spectroscopic Study of Cytosine and its Derivatives, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 11, 187. (1976)
- [25] Raksányi, K., Császár, P., Földvári, I., Fidy, J.: Photodimerization of Uracil and 6-azauracil, *Studia biophys.* in press
- [26] Raksányi, K., Fidy, J., Földvári, I., Kittler, L.: The Electronic Structure of Cytosine, 5-azacytosine and 6-azacytosine. Theory and Experiment, *Biopolymers* in press
- [27] Remsen, J. F., Mattern, M., Miller, N., Cerutti, P. A.: Photohydration of Uridine in the Ribonucleic Acid of Coli-phage R17. Lethality of Uridine Photohydrates and Nonlethality of Cyclobutane-Type Photodimers, *Biochemistry* 10, 524. (1971)
- [28] Rontó, Gy., Sarkadi, K., Tarján, I.: Zur Analyse der UV-Dosiswirkungskurven der T7 Phagen, *Strahlenther.* 134, 151. (1967)
- [29] Rontó, Gy., Tarján, I.: Zur Reaktivierung der UV-Strahlenschäden der Coliphagen T7. *Strahlenther.* 132, 143. (1967)
- [30] Rontó, Gy., Tarján, I.: A bakteriofágok mint a biofizikai vizsgálatok objektumai, *Fizikai Szemle* 17, 1. (1967)
- [31] Rontó, Gy.: Ultraibolya sugárzás hatásmechanizmusa T7 fág-coli rendszeren. Kandidátusi értekezés. Budapest (1969)
- [32] Rontó, Gy., Karczag, A., Tarján, I.: Ein Kinetisches Modell zur Strahlenschädigung von viraler und bakterieller DNS, *Studia biophys.* 33, 121. (1972)
- [33] Rontó, Gy., Tarján, I.: Relationship between Structure and Function in the Radiation Injuries of T7 Phages, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 7, 251. (1972)
- [34] Rontó, Gy., Smotryaeva, M., Kruglyakova, K., Emanuel, N., Tarján, I.: Inactivation of Bacteriophages T7 and  $\Phi$ X174 by Radiomimetics, *Acta Biochim. Biophys. Hung.* 10, 115. (1975)
- [35] Rontó, Gy.: Quantitative Analysis of the Effectiveness of Dark Repair in the System E. coli-Phage T7. *Studia biophys.* 61, 111. (1977)
- [36] Rontó, Gy., Tarján, I., Karczag, A.: A Radiation Kinetic Model for the Interpretation of UV Inactivation of Phages MS2, 13<sup>th</sup> Ann. Meeting of ESRB, Liège (1977)
- [37] Rosen, P. A.: Ultraviolet Carcinogenesis, *Int. Journ. of Quantum Chemistry* 9, 473. (1975)
- [38] Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchinson III, C. A., Slocombe, P. M., Smith, M.: Nucleotide Sequence of Bacteriophage  $\Phi$ X174 DNA, *Nature* 265, 687. (1977)
- [39] Smotryaeva, M. A., Zhizhina, G. P., Kruglyakova, K. E., Emanuel, N. M.: Kinetics of Structural Conversion of DNA in Reaction with NMU, *Studia biophys.* 57, 59. (1976)
- [40] Studier, F. W.: Bacteriophage T7, *Science* 176, 367. (1972)
- [41] Sugár, I., Rontó, Gy., Tarján, I.: Inactivation of Phages by Radiomimetics — a Stochastic Process, *Acta Physiol. Hung.* in press
- [42] Varghese, A. J.: Photochemical Addition of Amino Acids and Related Compounds to Nucleic Acid Constituents. Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology, Ed. by K. C. Smith; New York, Plenum Press (1975)