

УДК 551.521.9:582.282.23

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТА МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ*

© 2020 г. В. Г. Королев

Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Российская Федерация
E-mail: korolev_vg@npi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 06.12.2019; после доработки 06.12.2019;
принята к публикации 21.09.2020; опубликована онлайн 30.09.2020.

По определению, малые дозы — это минимальные дозы повреждающего агента, в частности радиации, вызывающие регистрируемый биологический эффект. Проблема воздействия малых доз радиации обсуждается в научной литературе в течение десятилетий, но прийти к общему выводу о наличии каких-то особенностей их воздействия, в отличие от таковых острого облучения, не удаётся. Это связано с тем, что эффекты, если они фиксируются, имеют слабое выражение и легко могут быть подвергнуты критике. Другой важный аспект проблемы — то, что биологические эффекты в основном описаны в научной литературе феноменологически, без расшифровки их молекулярных причин. В последние годы появился ряд статей, в которых авторы, изучая действие малых доз ДНК-тропных агентов, показывают, что ключевую роль в этих эффектах играет пострепликативная репарация, в частности её безошибочная ветвь. В лаборатории генетики эукариот Петербургского института ядерной физики имени Б. П. Константинова удалось выделить уникальных мутантов дрожжей с нарушенной ветвью безошибочной пострепликативной репарации. Исследование процессов ликвидации повреждений ДНК при минимальных отклонениях их количества от спонтанного уровня позволило на молекулярном уровне объяснить различия в клеточном ответе на малые дозы от острого облучения.

Ключевые слова: малые дозы, дрожжи, пострепликативная репарация, толерантность

Клеточный геном функционирует в условиях постоянного воздействия экзогенных и эндогенных факторов, вызывающих повреждения ДНК. Согласно оценкам, в течение одного клеточного цикла эукариотические клетки должны репарировать более 10 000 повреждений ДНК, возникающих только из-за воздействия эндогенных источников, таких как активные формы кислорода, эндогенные алкилирующие агенты и одиночные и двойные разрывы ДНК, которые появляются вследствие коллапса репликативных вилок. Количество ДНК-повреждений увеличивается ещё и в результате воздействия внешних факторов — химических мутагенов, а также ультрафиолетовой и ионизирующей радиации. Нерепарированные генетические повреждения приводят к возникновению мутаций, генетической нестабильности и раковых заболеваний, а также к клеточной гибели.

Репарацию повреждений ДНК подразделяют на ряд независимых или частично перекрывающихся путей: эксцизионную репарацию нуклеотидов (nucleotide excision repair); эксцизионную репарацию повреждённых оснований (base excision repair); репарацию неспаренных

* Материалы статьи были представлены на Чтениях памяти академика Г. Г. Поликарпова «Радиоэкология: успехи и перспективы» (Севастополь, ИвБЮМ, 2019 г.).

оснований (DNA mismatch repair); пострепликативную репарацию (postreplication repair); негомологичное воссоединение разорванных концов ДНК (nonhomologous end joining); гомологичную рекомбинацию (homologous recombination).

В изучении биохимических механизмов основных путей репарации, включая прямую, эксцизионную, рекомбинационную и мисматч-репарацию, достигнут значительный прогресс. Пострепликативную репарацию (далее — ПРР) он затронул в меньшей степени. Этот вид репарации часто включают в систему толерантности клетки к повреждениям ДНК, так как повреждения ДНК не удаляются, а обходятся в процессе репликации с использованием механизмов ПРР. Такой обход далеко не всегда безошибочен; он является основным источником мутагенеза.

В нормальных условиях и при воздействии малых доз мутагенов ключевым способом борьбы с повреждениями ДНК у бактериальных и эукариотических клеток являются системы толерантности к повреждениям ДНК [2 ; 7 ; 8 ; 11 ; 12].

Толерантность к повреждениям ДНК (далее — ТПД) исторически называли пострепликативной репарацией из-за наблюдения, что обработка почкующихся дрожжевых клеток УФ-излучением вызывала одностранные бреши в реплицирующейся ДНК [11]. Субстратом для ПРР являются вилки репликации, остановленные на повреждении ДНК. УФ-индуцированные димеры пиримидина, вызывающие одностранные бреши в ДНК, часто сохранялись после «репарации»; это указывает на то, что ПРР просто обходит повреждение, а не репарирует его [3 ; 6].

Во всех эукариотических организмах действуют два разных пути ТПД — ошибочный и безошибочный [10]. У дрожжей ПРР также может идти по двум разным путям. Первый — склонный к ошибкам (translesion synthesis, TLS); он вовлекает белковый комплекс полимеразы zeta, кодируемый генами *Rev1*, *Rev3* и *Rev7*, и полимеразу eta, кодируемую геном *Rad30*. Эти полимеразы консервативны у всех от дрожжей до человека [4]. TLS управляется комплексом *Rad6/Rad18*, который координирует заполнение брешей через моноубиквитинирование PCNA. Во втором пути — безошибочном — одна нить, вновь синтезированная, служит матрицей для репликации другой нити, заблокированной [2 ; 12]. Выбор между этими путями ТПД имеет серьёзные последствия для стабильности генома.

Доминирующую роль в толерантности играет безошибочная ветвь ПРР, которую часто называют рекомбинационной, так как два типа репарации имеют общую стадию образования D-петли. Наибольший прогресс в изучении связи между мутагенезом, репарацией, динамикой хроматина и клеточным циклом достигнут на примере одноклеточного эукариотического организма — почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эксперименты с дрожжами показали, что безошибочные механизмы являются основными путями ПРР как при низких, так и при высоких репликативных стрессах [2 ; 7 ; 8 ; 11 ; 12], хотя путь синтеза через повреждение (TLS) может быть эффективным и при малых количествах повреждений ДНК [8].

Клетки в ответ на повреждения ДНК используют сеть сигнальных переносчиков, относящихся к прохождению клеточного цикла (чекпойнт) и к осуществлению репарации. Отмечено, что в дрожжах нуль-мутанты по чекпойнту профицитны в TLS, но частично дефектны в заполнении брешей [10]. Ещё не ясно, как эти эффекты относятся к роли репликативного чекпойнта в поддержании стабильности остановленных вилок репликации или в регуляции факторов, обеспечивающих толерантность [5]. В любом случае чекпойнтная машина, очевидно, модулирует ответ клетки на повреждения ДНК.

Ранее нами впервые в мире с помощью прямого скрининга выделены мутанты дрожжей, отличающиеся повышенным индуцированным мутагенезом и практически не изменённой чувствительностью к летальному действию мутагенов, а также спонтанные мутаторы [1 ; 9]. Эпистатический анализ этих мутантов показал, что они попадают в три группы; мутанты эпистатической группы *HSM3* относятся к безошибочной ветви ПРР. Дальнейшее изучение этих мутантов

(с наиболее выраженным мутаторным фенотипом) позволило установить, что продукты данных генов имеют отношение к контролю работы полимераз, участвующих в заполнении брешей в ДНК. В клетках мутантов часто происходит замена точных репликативных полимераз на неточную полимеразу Pol η , что значительно увеличивает темп мутагенеза. Исследование молекулярных механизмов биологического действия сверхмалых количеств повреждений ДНК очень удобно проводить с использованием методов учёта спонтанного мутагенеза у дрожжей (табл. 1).

Таблица 1. Спонтанный мутагенез у репарационных мутантов

Table 1. Spontaneous mutagenesis in repair mutants

Штамм	Частота мутаций на генерацию, $\cdot 10^{-7}$ (репликативный)	Частота мутаций на генерацию, $\cdot 10^{-7}$ (репаративный)
Дикий тип	$3,2 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,6$
<i>rad1</i>	$10 \pm 1,4$	$28 \pm 4,0$
<i>rad2</i>	$2,4 \pm 0,5$	$18 \pm 3,9$
<i>rad14</i>	$3,3 \pm 0,2$	$31 \pm 3,5$
<i>pol3</i>	$80,2 \pm 7,2$	$75 \pm 4,5$

В табл. 1 приведены наши результаты измерения скорости мутационного процесса двумя методами. Первый — это общепризнанный метод Коулсона — Ли. Он измеряет скорость мутагенеза у клеток, растущих в максимально благоприятных условиях. Продолжительность генерации составляет менее 2 часов. Число спонтанных повреждений в ДНК клеток за это время минимально, и большая часть мутагенеза является следствием ошибок репликации. Второй — это метод упорядоченного посева, разработанный в Ленинградском государственном университете. Он более прост и удобен в исполнении, но, как мы показали, применим только для штаммов с неповреждённой системой репарации. Этот метод отличается от предыдущего тем, что клеточный цикл искусственно растягивают во много раз (он составляет несколько дней). При этом в ДНК накапливается значительное число спонтанных повреждений, которые в клетках с нормально работающей репарацией эффективно удаляются. В клетках с нарушенной системой репарации часть этих повреждений остаётся и попадает в вилку репликации.

Как видно из табл. 1, клетки дикого типа показывают одинаковую скорость мутирования в обоих тестах. В полимеразном мутанте, где весь повышенный мутагенез определяется ошибками повреждённой полимеразы, два теста также дают одинаковую скорость мутагенеза. В то же время все репарационные мутанты демонстрируют значительно большую скорость мутирования в Ленинградском тесте (см. табл. 1).

Хорошей иллюстрацией действия малых доз спонтанных повреждений являются данные, приведённые на рис. 1. На нём представлен обнаруженный нами эффект адаптивного мутагенеза, контролируемого геном *HSM3*. Верхний ряд — чашки с антибиотиком, засеянные клетками дикого типа. Видны колонии устойчивых к антибиотику мутантов, выросшие через 3 дня (левая чашка) и после 15 дней (та же чашка справа). Чашки нижнего ряда засеяны клетками мутанта *hsm3*. Заметно, что разница в числе колоний через 3 и 15 дней в верхнем ряду небольшая. В нижнем ряду эта разница достигает двух порядков.

Очень тонким инструментом оценки влияния малого количества повреждений ДНК на выживаемость клеток является измерение спонтанной гибели клеток мутантов по определённым путям репарации. Например, выключение рекомбинационной репарации блокирует восстановление ДНК от двунитевых разрывов, которые достаточно редко возникают в нормально растущих клетках дрожжей (менее 1 разрыва на генерацию). Между тем мы видим существенный рост доли мёртвых клеток в популяции клеток с заблокированной рекомбинационной репарацией: дикий тип — $(3,6 \pm 1,2) \%$; мутант *rad52* — $(10,1 \pm 3,2) \%$.

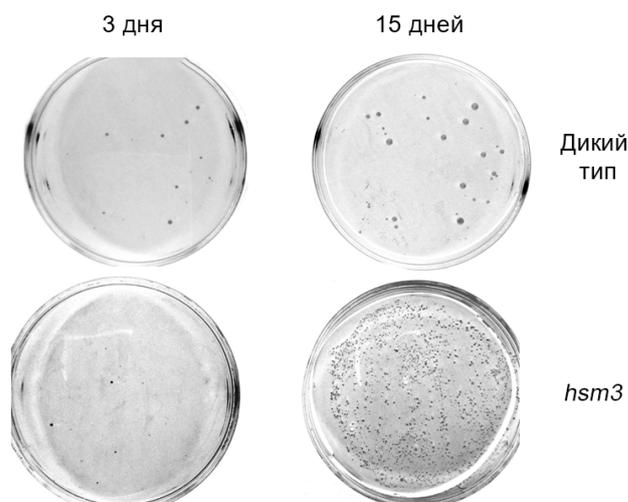


Рис. 1. Адаптивный ответ мутанта *hsm3* с нарушенной безошибочной ветвью пострепликативной репарации

Fig. 1. Adaptive response of *hsm3* mutant with a disrupted error-free branch of postreplication repair

Низкие дозы повреждений ДНК не активируют чекпойнт, индуцируемый ими. Возможно, чекпойнт не играет существенной роли для выживаемости при данных условиях [5]. В связи с этим в клетках с блокированной эксцизионной репарацией нуклеотидов после облучения малыми дозами практически все УФ-индуцированные повреждения попадают в вилку репликации и подвергаются воздействию ПРР. Мы в своих экспериментах использовали мутантов по эксцизионной репарации нуклеотидов для изучения свойств этого типа ПРР. Мы ввели в мутанта *rad2* дополнительную мутацию *hsm3*, нарушающую основной путь безошибочной ветви репарации. Как видно из рис. 2, двойной мутант показал значительно бóльшую УФ-резистентность, чем одиночный *rad2*, и очень высокий индуцированный мутагенез. Таким образом, выключение безошибочной ветви репарации направляет повреждения ДНК в ошибочный путь репарации, который менее цитотоксичен.

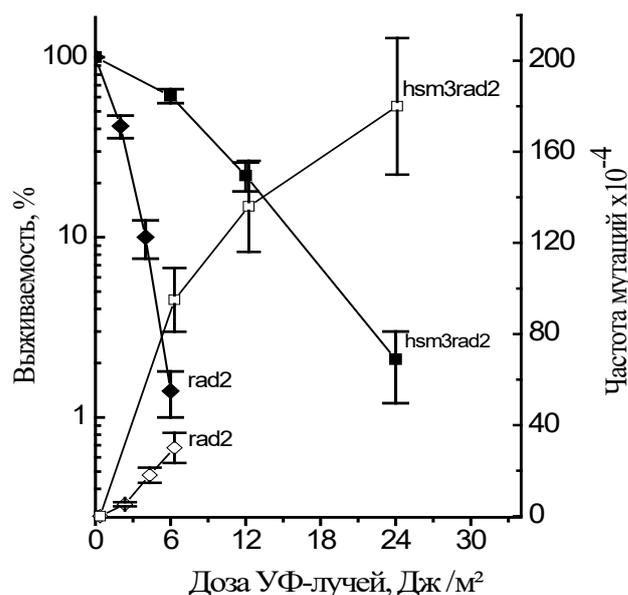


Рис. 2. Эффект блокирования безошибочной ветви пострепликативной репарации

Fig. 2. Effect of blocking the error-free branch of postreplication repair

Интересные данные по эффекту малых доз УФ-лучей на клетки дрожжей получили японские учёные [7]. Они показали (рис. 3), что мутант *rad14*, который блокирует эксцизионную репарацию нуклеотидов, растёт в условиях хронического облучения примерно с той же скоростью, что и клетки дикого типа, в то время как клетки мутанта *rad18* (он блокирует ПРР) демонстрируют высокую чувствительность к данному воздействию. При этом, согласно нашим исследованиям, поведение мутантов *rad14* и *rad18* в эксперименте с обычными дозовыми нагрузками (острое облучение) имеет совершенно другой характер (рис. 4). В этом случае мутант *rad14* оказывается намного чувствительнее *rad18*. Парадоксальное различие объясняется двумя основными причинами. Во-первых, при малом числе повреждений ДНК не включается чекпойнт; как следствие, не происходит индукция репарационных систем, находящихся под его контролем. Во-вторых, при малых дозах большинство возникших повреждений ДНК избегают действия неактивированных репарационных систем из-за трудностей их обнаружения и попадают в репликативную вилку. Субстратом для работы ПРР как раз и являются репликативные вилки, остановленные на повреждении ДНК.

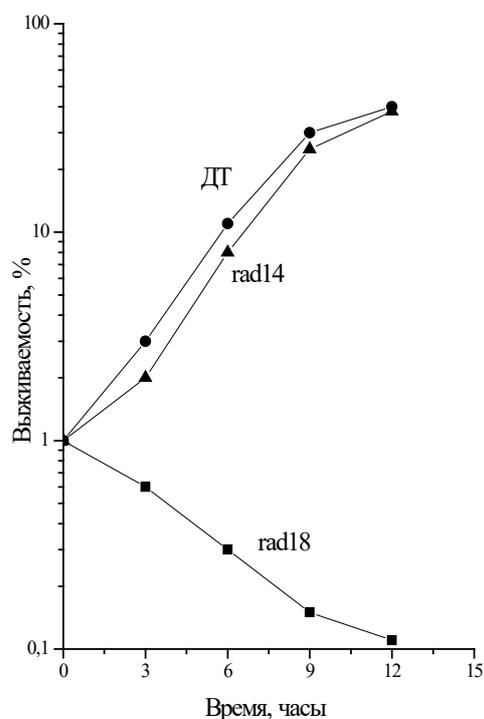


Рис. 3. Зависимость выживаемости штаммов дрожжей от облучения хроническим УФ с малой мощностью дозы

Fig. 3. Dependence of yeast strains survival on exposure to chronic UV with a low dose rate

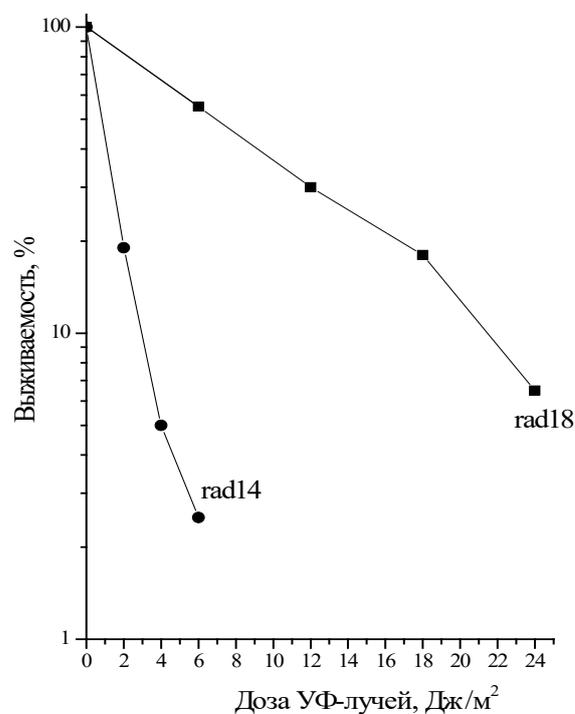


Рис. 4. Выживаемость мутантов *rad18* и *rad14* в остром эксперименте

Fig. 4. Survival of *rad18* and *rad14* mutants in an acute experiment

Включение чекпойнта имеет пороговый характер и происходит при накоплении определённого количества одонитевой ДНК, возникающей при репарации повреждений. Таким образом, при превышении порогового уровня повреждений ДНК в результате индукции эффективность работы репарационных систем резко возрастает, что позволяет клеткам избавиться от подавляющего числа повреждений ДНК и уменьшить нагрузку на пострепликативную репарацию. Отсюда следует, что эффективность репарации повреждений ДНК до порогового уровня будет значительно ниже, чем в случае его превышения, а биологическая значимость первых окажется выше вторых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Иванов Е. Л., Федорова И. В., Ковальцова С. В. Выделение и характеристика новых мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с повышенной спонтанной мутабельностью // *Генетика*. 1992. Т. 28. С. 47–55. [Ivanov E. L., Fedorova I. V., Kovaltzova S. V. Isolation and characterization of new mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with increased spontaneous mutability. *Genetika*, 1992, vol. 28, pp. 47–55. (in Russ.)]
2. Baynton K., Bresson-Roy A., Fuchs R. P. P. Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: A requirement for *Rev3* DNA polymerase in translesion synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, vol. 18, iss. 2, pp. 960–966. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.960>
3. Bridges B. A., Munson R. J. Mutagenesis in *Escherichia coli*: Evidence for the mechanism of base change mutation by ultraviolet radiation in a strain deficient in excision-repair. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1968, vol. 171, iss. 1023, pp. 213–226. <https://doi.org/10.1098/rspb.1968.0065>
4. Friedberg E. C. Suffering in silence: The tolerance of DNA damage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, vol. 6, iss. 12, pp. 943–953. <https://doi.org/10.1038/nrm1781>
5. Gangavarapu V., Santa Maria S. R., Prakash S., Prakash L. Requirement of replication checkpoint protein kinases Mec1/Rad53 for postreplication repair in yeast. *mBio*, 2011, vol. 2, iss. 3, e00079-11. <https://dx.doi.org/10.1128/mBio.00079-11>
6. Ganesan A. K. Persistence of pyrimidine dimers during post-replication repair in ultraviolet light-irradiated *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, 1974, vol. 87, iss. 1, pp. 103–119. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90563-4)
7. Hishida T., Kubota Y., Carr A. V., Iwasaki H. *RAD6–RAD18–RAD5*-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature*, 2009, vol. 457, pp. 612–615. <https://doi.org/10.1038/nature07580>
8. Huang D., Piening B. D., Paulovich A. G. The preference for error-free postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to low-dose methyl methanesulfonate is cell cycle dependent. *Molecular and Cellular Biology*, 2013, vol. 33, iss. 8, pp. 1515–1527. <https://doi.org/10.1128/MCB.01392-12>
9. Ivanov E. L., Kovaltzova S. V., Korolev V. G. *Saccharomyces cerevisiae* mutants with enhanced induced mutation and altered mitotic gene conversion. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1989, vol. 213, iss. 2, pp. 105–115. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90141-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90141-3)
10. Pages V., Santa Maria S. R., Prakash L., Prakash S. Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast. *Genes & Development*, 2009, vol. 23, iss. 12, pp. 1438–1449. <https://doi.org/10.1101/gad.1793409>
11. Prakash L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of *rad6*, *rad18*, *rev3*, and *rad52* mutations. *Molecular and General Genetics MGG*, 1981, vol. 184, iss. 3, pp. 471–478. <https://doi.org/10.1007/bf00352525>
12. Zhang H., Lawrence C. W. The error-free component of the *RAD6/RAD18* DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, vol. 102, iss. 44, pp. 15954–15959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504586102>

MOLECULAR BASES OF THE EFFECT OF LOW DOSES OF RADIATION***V. G. Korolev**

Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov
of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russian Federation
E-mail: korolev_vg@pnpi.nrcki.ru

By definition, low doses are minimum doses of a damaging agent, in particular radiation, causing a recorded biological effect. The problem of exposure to low doses of radiation is being discussed in scientific literature for decades, but there is still no generally accepted conclusion concerning the existence of some features of the effect of low doses in contrast to that of acute exposure. This is due to the fact as follows: if being fixed, these effects have a weak expression and can be easily criticized. The second important aspect of this problem is that biological effects are mainly described phenomenologically in literature, without deciphering their molecular causes. In recent years, a number of articles appeared in which the authors, when studying exposure to low doses of DNA-tropic agents, show that postreplication repair (in particular, its error-free branch) plays a key role in these effects. In the laboratory of eukaryotic genetics of Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov, it was possible to isolate unique yeast mutants with a disrupted branch of error-free postreplication repair. A study of the processes of eliminating DNA damage with minimal deviations of their number from a spontaneous level made it possible to explain at the molecular level the differences in cell response to low doses from acute exposure.

Keywords: low doses, yeast, postreplication repair, tolerance

*The materials of the article were presented at the Readings in memory of Academician G. G. Polikarpov “Radiochemoecology: Progress and Prospects” (Sevastopol, IBSS, 2019).