УДК 504.54(045)

Королев В.Г.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ИЗЛУЧЕНИЙ И МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ У ДРОЖЖЕЙ КАК ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

В работе приведены материалы исследований, которые были направлены на попытку связи генетических эффектов с поглощением некоторой порции энергии на определенном атоме, входящем в структуру ДНК. Представленные данные дают уникальную информацию для решения одной из главных проблем радиобиологии – связь биологического эффекта с местом и количеством поглощенной энергии.

Ключевые слова: *К-ионизация, мутагенная эффективность, репарация*

У роботі наведено матеріали досліджень, котрі були спрямовані на вивчення зв'язку між генетичними ефектами та поглинанням деякої порції енергії на певному атомі, який входить у структуру ДНК. Наведені дані дають унікальну інформацію для вирішення однієї з головних проблем радіобіології – зв'язок біологічного ефекту з місцем і кількістю поглинутої енергії.

Ключові слова: *К-іонізація, мутагенна ефективність, репарація.*

Materials of researches, which were directed on the attempt of connection of genetic effects with absorption of certain portion of energy on a certain atom, included in the structure of DNA, are in-process resulted. The presented information give unique information for the decision of one of main problems of radiobiology – the connection of biological effect with a mestomplace and amount of eaten up energy.

Key words: *K-ionization, mutagene efficiency, reparation.*

Стабильность генома приоритетна для выживаемости и функционирования всех организмов. При воздействии внешнего ионизирующего излучения и распада инкорпорированных в клетки радиоактивных изотопов возникают повреждения химической структуры ДНК, которая является наиболее радиочувствительным компонентом клетки. В ответ на повреждения ДНК клетки запускают ряд процессов, обеспечивающих репарацию этих повреждений для обеспечения выживаемости и сохранения целостности генома. Большинство данных, которые известны в настоящее время о репарации повреждений ДНК, индуцированных ионизирующим излучением у эукариот, были получены на модели почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это объясняется тем, что репарационные системы всех существующих в настоящее время живых организмов сформировались на ранних стадиях эволюции и представлены в клетках от бактерий до человека в виде высоко гомологичных ферментативных систем. Особенно высока степень гомологии этих систем у клеток эукариот. В связи с этим, дрожжи, будучи простейшим из эукариотических организмов, представляют прекрасную модель для исследования репарационных систем человека.

Известно, что иногда поглощение энергии ионизирующей частицы происходит на внутренних электронных оболочках атомов, при этом количество поглощенной энергии достигает сотен эВ. Перераспределение такой энергии приводит к значительным биологическим последствиям. Это связано с тем, что небольшие повреждения генетического материала легко исправляются мощными системами репарации клетки. Однако при возникновении «грубых» поломок, подобных двунитевым разрывам (ДНР) ДНК, системы репарации резко снижают эффективность работы. Для возникновения «грубых» повреждений ДНК требуется большая энергия.

Использование инкорпорированных радионуклидов, распадающихся по схеме К-захвата, позволяет провести оценку биологической роли К-ионизации атомов, входящих в структуру ДНК. При К-захвате электрон с одной из внутренних оболочек атома захватывается ядром. При этом возникает электронная вакансия (ионизация), которая с высокой вероятностью приводит к

развитию каскада вакансий (Оже-процесс) и, следовательно, к тому, что дочерний атом будет иметь большой положительный заряд. Силы кулоновского отталкивания, возникающие вследствие перераспределения заряда и энергии его нейтрализации, разрушают материнскую молекулу, а также могут быть причиной повреждения химической структуры соседних молекул. В нашей работе были использованы четыре радионуклида, распадающиеся по схеме К-захвата (электрон-захватчики): ^{7}Be, ^{54}Mn, ^{85}Sr и ^{125}I. Эти радионуклиды присоединяются в клетке тем или иным образом к молекуле ДНК. Марганец как переходный металл образует связь с атомом азота в ^{7}-м положении гуанина и остатком фосфорной кислоты, бериллий и стронций присоединяются к остатку фосфорной кислоты. Иод вводили в ДНК с помощью аналога тимидинфосфата – ^{125}I-дезоксиуридинмонофосфата.

Особое место среди изученных радионуклидов электрон-захватчиков занимает ^{7}Be, в случае которого основным источником энергии является радиационная составляющая, т. к. дочерний ион с вероятностью около единицы высвечивает электрон с энергией, равной примерно 70 эВ. В экспериментах число распадов на клетку дрожжей составляло 10^{7}, что соответствует 7 x 10^{8} эВ энергии, поглощенной гаплоидной клеткой. С учетом объема гаплоидной клетки дрожжей можно рассчитать дозу, которая в отдельных экспериментах достигала 200 Гр. Однако при такой большой дозе, поглощенной клеткой, не было обнаружено заметных генетических эффектов. Следовательно, электроны с энергией 70 эВ неспособны в заметной степени индуцировать биологически значимые повреждения генетического материала, хотя эти электроны способны произвести в среднем одну ионизацию по длине пробега.

Точное число атомов ^{54}Mn и ^{85}Sr, связанных с ДНК, в отличие от ^{125}I , неизвестно, поэтому трудно сравнить их летальную эффективность. В связи с этим в качестве параметра генетического действия радионуклидов использовали мутагенную эффективность (m), которая не зависит от константы связывания радионуклида с ДНК и рассчитывается из отношения вероятности возникновения мутации к вероятности летального события на распад радионуклида в клетке. Полученные данные показывают, что с увеличением энергетического вклада в ряду ^{54}Mn – ^{85}Sr – ^{125}I уменьшается мутагенная эффективность распада радионуклида. При этом все радионуклиды, распадающиеся по схеме К-захвата, имеют намного меньшую мутагенную эффективность в сравнении с любым beta-излучающим радионуклидом. Следовательно, электрон-захватывающие радионуклиды индуцируют повреждения генетического материала, которые чаще приводят к летальному, но не мутагенному событию, в сравнении с радионуклидами, распадающимися по схеме beta-распада. Таким образом, при действии внешнего ионизирующего излучения на клетку К-ионизация играет существенную роль в создании генетических эффектов, хотя процесс К-ионизации происходит с небольшой вероятностью по сравнению с ионизацией валентных электронов. Малый выход К-ионизаций вполне может компенсироваться их очень большой биологической значимостью.

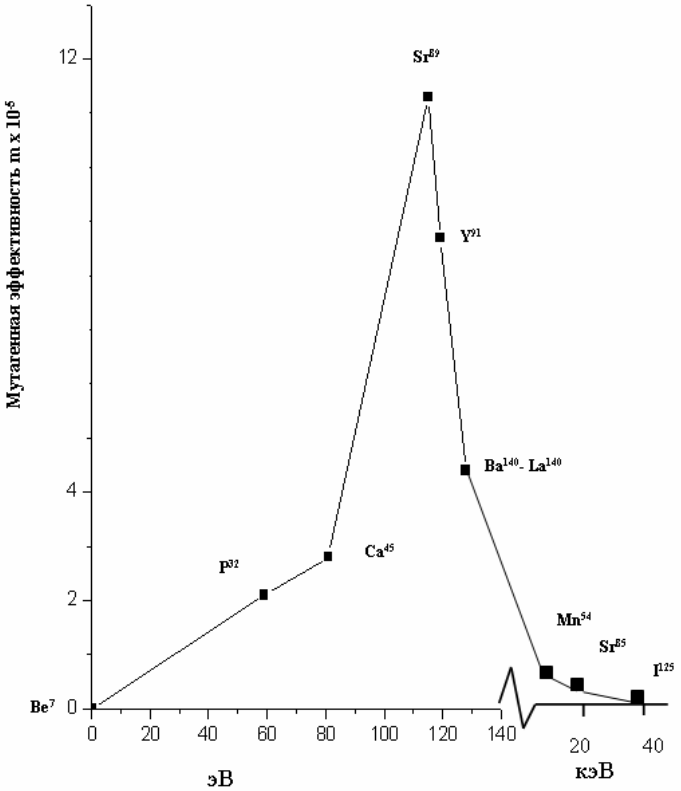

Рис. 1. Энергия возбуждения дочернего атома

Для моделирования ситуации, возникающей при поглощении различных порций энергии молекулой ДНК, что наблюдается и при действии внешнего излучения на клетку, мы использовали радионуклиды, отличающиеся друг от друга энергией возбуждения дочерних атомов. На рис. 1 представлена кривая зависимости мутагенной эффективности от средней энергии возбуждения радионуклида. Из рисунка видно, что с ростом энергии мутагенная эффективность сначала растет, достигая максимума, а затем снижается. Такой ход кривой неудивителен, поскольку с ростом энергии, выделяемой по месту распада, степень разрушения молекулы ДНК будет увеличиваться и при некотором критическом уровне возникающие повреждения не могут быть репарированы, что ведет к летальному исходу, представленному нисходящей ветвью кривой. Из этих данных следует, что наиболее мутагенна передаваемая ДНК порция энергии около 100 эВ.

Таким образом, в наших исследованиях была предпринята попытка связать генетические эффекты с поглощением определенной порции энергии на определенном атоме, входящем в структуру ДНК. Подобные данные невозможно получить при использовании внешних источников ионизирующего излучения. Хотя и не во всех случаях, но распад радионуклида точно моделирует процессы, происходящие при поглощении энергии ионизирующего излучения. Представленные данные дают уникальную информацию для решения одной из главных проблем радиобиологии – связь биологического эффекта с местом и количеством поглощенной энергии. Эксперименты с бериллием и тритием, инкорпорированным в различные положения азотистых оснований ДНК дрожжей, показали, что одиночные повреждения химической структуры ДНК не летальны для клетки, но некоторые из таких повреждений могут служить эффективным источником мутагенеза.

Процесс репарации повреждений ДНК условно подразделяют на шесть обособленных часто перекрывающихся систем: 1) прямая репарация, которая восстанавливает исходную структуру ДНК путем химической реакции обратной реакции, приведшей к повреждению; 2) эксцизионная репарация оснований (ЭРО) – является доминирующей в репарации модифицированных оснований ДНК и осуществляется путем выщепления поврежденного нуклеотида из ДНК и заполнения возникшей бреши ДНК-полимеразой; 3) эксцизионная репарация нуклеотидов – происходит путем выщепления фрагментов ДНК вместе с поврежденными нуклеотидами и застройки бреши ДНК-полимеразами; 4) система коррекции ошибочно спаренных оснований – удаляет ошибочно спаренные основания, возникающие при различных видах синтеза ДНК; 5) рекомбинационная репарация – удаляет наиболее цитотоксические повреждения, такие как двунитевые разрывы ДНК и различного рода сшивки нитей ДНК; 6) пострепликативная репарация – разрешает проблемы синтеза ДНК при встрече репликативных вилок с повреждениями матрицы. В репарации повреждений ДНК, индуцированных ионизирующей радиацией, основную роль играют две последние системы. Именно этим системам будет уделено основное внимание в данном докладе.

Среди повреждений, индуцированных ионизирующей радиацией, наиболее цитотоксичными являются двунитевые разрывы (ДНР) ДНК, которые могут возникать и спонтанно в ходе нормального роста клеток. Репарация ДНР может происходить по нескольким механизмам: 1) гомологичной рекомбинации, которая разделяется на несколько самостоятельных ветвей: а) межсестринская; б) конверсионная; в) индуцированная разрывом ДНК репарация репликативной вилки; г) межхромосомная; 2) незаконная рекомбинация, которая, в свою очередь, подразделяется на: а) соединение разорванной двунитевой ДНК конец в конец и б) соединение концов путем отжига процессированных однонитевых концов ДНР. Выбор механизма, по которому будет происходить репарация ДНР, зависит от нескольких факторов: стадии клеточного цикла, плоидности клетки, числа ДНР ДНК, наличия достаточного количества дезоксинуклеотидов. В свете современного понимания первых этапов репарационного процесса наиболее трудным для ответа остается вопрос о том, как клетка узнает о появлении в ее геноме ДНР? Этот вопрос в настоящее время не имеет однозначного ответа, но на основании имеющихся в литературе данных можно представить следующую цепь событий.

Концы ДНР являются субстратами для белковых комплексов Ku и MRX. Первый из этих комплексов обеспечивает инициацию незаконной рекомбинации (nongomologous end joining – NHEJ), второй принимает участие в инициации обеих ветвей рекомбинационной репарации. Оба комплекса имеют сродство к концам ДНР и быстро с ними связываются. Кроме этих комплексов, в инициации рекомбинационных событий принимают участие еще ряд белковых комплексов. Комплекс MRX состоит из трех субъединиц (Mre11, Rad50 и Xrs2) и может процессировать концы ДНР с образованием 3'-однонитевых «хвостов» ДНК. Скорость процессинга ДНР под действием этого комплекса на первом этапе низкая, что приводит к образованию коротких ОН хвостов. Эти ОН участки покрываются белком RPA, который является гетеротримерным белком, связывающим ОН ДНК. RPA эффективно связывается как с комплексом MRX, так и с чекпойнтным комплексом *MEC1/DDC2*. Связывание комплекса *MEC1/DDC2* с RPA приводит к его активации, при этом две субъединицы Mec1 фосфорилируют друг друга, и комплекс разрушается, высвобождая активную форму белка Mec1. Активный Mec1 начинает быстрый процесс модификации RPA и гистонов вокруг ДНР. В почкующихся дрожжах серин-129 гистона H2A фосфорилируется в мотиве SQE, у

млекопитающих такая же модификация происходит по серину-139 в том же мотиве.

Репарация ДНР по механизму объединения концов предшествует репарации таких повреждений с помощью гомологичной рекомбинации. Это связано с тем, что для NHEJ не требуется процессинг концов разрыва (рис. 1). Первой стадией NHEJ у эукариот является связывание концов разрывов гетеродимером Ku. В клетках млекопитающих каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) облегчает объединение концов, в то время как у почкующихся дрожжей эту роль выполняет комплекс MRX. Ku-комплекс у дрожжей содержит две субъединицы (кодируемые генами *HDF1* и *HDF2*), которые гомологичны Ku-белкам млекопитающих. С этим комплексом взаимодействует другой комплекс Dnl, состоящий из ДНК- лигазы 4 (ген *DNL4*), ее вспомогательного белка Lif1 (ген *LIF1*) и ДНК-полимеразы 4 (ген *POL4*). Ku-гетеродимер является ДНК-связывающим белком, опознающим структуру, а не нуклеотидную последовательность ДНК. Этот белок связывается с концами линейных молекул ДНК и физически удерживает их в положении удобном для лигирования.

Активность комплексов Ku, MRX и Dnl необходима и достаточна для осуществления NHEJ в клетках дрожжей. Первые два комплекса способны связывать и удерживать концы ДНР, в то время как последний производит физическое воссоединение нитей ДНК. Если концы ДНР тупые и немодифицированые, то возможно их прямое воссоединение под действием комплекса ДНК-лигазы 4. Когда концы разрыва липкие, ансамбль комплексов NHEJ организует соединение концов ДНК по гомологии, завершая процесс лигированием ников. Если произошла частичная деградация концов ДНР и в результате отжига липких участков этих концов образуется брешь, то для ее заполнения у дрожжей используется непроцессивная ДНК-полимераза Pol4, которая способна застраивать бреши по обе стороны от разрыва. При этом липкие концы могут иметь гомологию от одного до четырех нуклеотидов. Репарация становится менее зависимой от NHEJ, когда 3'-OH концы становятся длиннее 4-х нуклеотидов или обогащены Г:Ц парами. Действительно, когда резекция концов ДНР достигает длины более 4-х нуклеотидов, для ликвидации повреждения необходимы другие ветви рекомбинационной репарации.

Вторая ветвь незаконной рекомбинации осуществляется по механизму отжига OH концов ДНК (SSA – single strand anneling). Если ДНР ДНК фланкируют повторяющиеся нуклеотидные последовательности, то репарация разорванной хромосомы происходит очень эффективно; при этом образуется делеция, содержащая одну копию повтора. SSA дуплицированных последовательностей зависит от деградации концов ДНР с образованием длинных OH «хвостов», которые могут отжигаться. В дрожжах SSA происходит почти со 100 % эффективностью, когда фланкирующие повторы составляют 400 пар оснований, но только с 5% эффективностью для гомологии в 60 пар оснований. Репарация эффективна даже, если повторы разделены 15 тпо.

Репарация ДНР по механизму гомологичной рекомбинации может происходить при наличии в клетке двух и более гомологичных хромосом или хроматид. Следовательно, этот процесс идет в поздней S-фазе гаплоидных клеток и в диплоидных (полиплоидных) клетках. В поздней S-фазе гаплоидной клетки гомологичная рекомбинация между сестринскими хроматидами является преимущественной. Когда в одной из сестринских хроматид возникает ДНР, для гомологичная хроматида может быть использована для репарации поврежденной. Большую роль в запуске гомологичного межхроматидного обмена играет когезиновый комплекс. Этот комплекс осуществляет правильную сегрегацию сестринских хроматид по дочерним клеткам. Однако, как показывают недавние работы, этот же комплекс играет ключевую роль в репарации ДНР ДНК в S- и S/G2-фазах клеточного цикла. В норме когезиновый комплекс скрепляет сестринские хроматиды в определенных сайтах, разделенных расстоянием в 10-15 тпн. Однако, когда в одной из хроматид появляется ДНР, с обеих сторон от последнего собирается множество когезиновых комплексов, скрепляющих разорванную и нативную хроматиды в районе ДНР. Этот акт облегчает поиск гомологичного участка при рекомбинационной репарации ДНР. Сигналом же для перестройки когезинового комплекса является фосфорилирование гистона H2A.

Рекомбинация может происходить по механизму внедрения OH хвоста в дуплексную ДНКс образованием D-петли. Главными участниками процесса образования D-петли у дрожжей являются белки Rpa, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55 и Rad57. В случае межсестринских обменов рекомбинационный процесс идет, как правило, по конверсионному пути. При этом внедрившийся OH хвост удлинняется с помощью, возможно, ДНК-полимеразы I относительно коротким фрагментом ДНК и D-петля разрушается, что приводит к объединению концов ДНР за счет отжига вновь синтезированного участка ДНК с комплементарной последовательностью на другой стороне ДНР. Далее происходит удаление излишков ДНК и застройка возникших брешей. Репарационный процесс заканчивается лигированием ников.

Рецензенти: Кутлахмедов Ю.О., д.б.н., професор;
Моссе І.Б., д.б.н., професор

© Корольов В.Г., 2009

Стаття надійшла 12.04.2009 р.