

РЕПАРАЦИЯ ДНК НЕ ИНИЦИИРУЕТ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. Е. С. Евстратова¹, *, [В. Г. Петин]², С. А. Гераськин³

¹Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, Калужская обл., Обнинск, 249031 Россия

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии, Калужская обл., Обнинск, 249031 Россия

³Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии,
Калужская обл., Обнинск, 249032 Россия

*e-mail: ekevs7240@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 21.11.2022 г.

Принята к публикации 24.11.2022 г.

Приводятся экспериментально полученные кривые зависимости задержки формирования колоний от дозы ионизирующего излучения (гамма-кванты ⁶⁰Со, мощность дозы 10 Гр/мин) для шести штаммов гаплоидных и диплоидных дрожжей дикого типа (способных восстанавливаться от радиационных повреждений и характеризующихся сигмоидными кривыми выживаемости), а также для шести гаплоидных и диплоидных радиочувствительных мутантов, дефектных по репарации и характеризующихся экспоненциальными кривыми выживаемости. Задержка формирования колоний после облучения является проявлением генетической нестабильности. Показано, что для всех диплоидных штаммов генетическая нестабильность достигала 100% с увеличением дозы ионизирующего излучения, независимо от формы кривых выживаемости и способности клеток восстанавливаться от радиационных повреждений. Наоборот, для всех гаплоидных штаммов генетическая нестабильность была близка к 20%. В отличие от традиционных представлений, полученные нами данные указывают на то, что позднее формирование колоний выжившими после облучения клетками определяется главным образом плоидностью клеток и не зависит от формы кривых доза-эффект и радиочувствительности клеток. Это означает, что репарация ДНК не инициирует генетическую нестабильность дрожжевых клеток.

Ключевые слова: генетическая нестабильность, выживаемость, дрожжевые клетки, радиочувствительные мутанты, гамма-кванты.

DOI: 10.31857/S0016675823060048, **EDN:** SSBVOM

Одной из широко распространенных точек зрения на механизм возникновения генетической нестабильности является ошибочное восстановление повреждений, индуцированных ионизирующими излучениями, УФ светом или другими ДНК-повреждающими агентами. Описаны данные, показывающие, что дефекты в восстановлении ДНК вызывают генетическую нестабильность в клетках различного происхождения [1–5]. В работе [1] приводится доказательство, что двуни-тевые разрывы ДНК запускают сценарий задержанной репродуктивной гибели клеток китайского хомьячка, характеризующей генетическую нестабильность. Преждевременное старение человека в ряде случаев объясняют ошибочным восстановлением повреждений ДНК [2], приводящим к генетической нестабильности и, соответственно, к заболеваниям, сокращающим продолжительность жизни. Дефекты в восстановлении ДНК также индуци-

руют генетическую нестабильность и в популярном объекте исследований *Saccharomyces cerevisiae* [3–5]. Эти результаты согласуются с данными, показавшими, что эффект задержанного по сравнению с контролем колонеобразования, также характеризующий генетическую нестабильность, в большей степени характерен для диплоидных, а не гаплоидных штаммов дрожжей [6]. Известно, что способность диплоидных дрожжевых клеток восстанавливаться от радиационных повреждений более эффективно реализуется в диплоидных, а не гаплоидных дрожжевых клетках [7, 8]. Ранее нами были опубликованы данные по генетической нестабильности дрожжевых клеток различного генотипа после облучения УФ-светом [9–11]. Было показано, что генетическая нестабильность в большей степени зависит от плоидности клеток, а не от их способности восстанавливаться от УФ-повреждений.

Таблица 1. Количественные параметры, характеризующие радиочувствительность и генетическую нестабильность гаплоидных и диплоидных дрожжевых клеток

Штамм	Генотип	Максимальная генетическая нестабильность, %	LD_{90} , Гр	$\frac{LD_{90}(\text{дипл})}{LD_{90}(\text{гапл})}$	$\frac{LD_{90}(\text{дикий})}{LD_{90}(\text{мутант})}$
K7	<i>RAD</i>	15	155 ± 10	4.1	
Мерри 139-B	<i>RAD/RAD</i>	100	640 ± 44		
211-1a	<i>RAD</i>	17	140 ± 12	6.6	
211	<i>RAD/RAD</i>	100	920 ± 30		
S288C	<i>RAD</i>	20	160 ± 15	5.8	—
XS800	<i>RAD/RAD</i>	100	930 ± 28		—
XS774-4d	<i>rad51</i>	18	65 ± 5	2.3	2.5
XS806	<i>rad51/rad51</i>	100	150 ± 12		6.2
g160/2d	<i>rad52</i>	20	132 ± 14	1.7	1.2
XS1898	<i>rad52/rad52</i>	95	220 ± 19		4.2
g218/7c	<i>rad54</i>	19	45 ± 6	2.1	3.5
L9	<i>rad54/rad54</i>	86	93 ± 11		10.0

В настоящей работе мы приводим результаты о генетической нестабильности разных гаплоидных и диплоидных дрожжевых штаммов дикого типа и их радиочувствительных мутантов после облучения ионизирующим излучением (гамма-кванты ^{60}Co при мощности дозы 10 Гр/мин). Гаплоидные штаммы *Zigosaccharomyces bailii* и *Saccharomyces cerevisiae* получены от В.И. Корогодина (Россия), который получил их от R.K. Mortimer (США). Диплоидные дрожжевые клетки дикого типа (*RAD/RAD*) — штаммы Мерри 139-B, 211 и XS800, а также радиочувствительные гомозиготные мутанты диплоидного типа — штаммы XS806 и XS1898, первоначально получены от Dr. S. Nakai (Япония). Штаммы 211-1a и 211 получены от W. Laskowski (Западный Берлин), штамм L9 — от И.П. Арман (Россия).

В наших опытах перед облучением клетки выращивали до стационарной стадии на твердой питательной среде до тех пор, пока процент почкующихся клеток становился минимальным, и облучаемая суспензия содержала 1–2% почкующихся клеток. Выживаемость клеток оценивали отношением числа колоний, сформированных выжившими после облучения клетками, к числу колоний, образованных в контроле после культивации на стандартной твердой питательной среде в течение трех–четырех суток. Для количественной оценки генетической нестабильности подсчитывали процент колоний, образованных позже появления контрольных колоний выжившими после облучения клетками. Этот тест использовали многие авторы для клеток различного происхождения [1–4, 6, 7]. Каждый опыт повторяли 2–5 раз. Для обра-

ботки экспериментальных данных использован стандартный набор статистических методов, принятых в современных биологических исследованиях. В работе принят 95%-ный уровень значимости различий, что соответствует принятому стандарту и обеспечивает необходимую степень достоверности полученных результатов.

Рис. 1, а, б, в показывают зависимость генетической нестабильности клеток от дозы ионизирующего излучения для шести штаммов дрожжей дикого типа. Все штаммы демонстрировали сигмоидные формы кривых зависимости выживаемости от дозы. Эти кривые были опубликованы нами ранее при описании влияния генотипа клеток на их радиочувствительность и ее модификацию радиопротекторами и радиосенсибилизаторами [12, 13], поэтому в настоящей работе они не приводятся, а об их радиочувствительности можно судить по значениям LD_{90} (10% выживаемости), а также по относительной радиочувствительности диплоидных и гаплоидных штаммов $LD_{90}(\text{дипл})/LD_{90}(\text{гапл})$ или по относительной радиочувствительности диких и радиочувствительных мутантов $LD_{90}(\text{дикий})/LD_{90}(\text{мутант})$ (табл. 1).

Из полученных результатов ясно, что мутантные диплоидные штаммы более радиочувствительны к облучению ионизирующим излучением по сравнению с клетками родительских штаммов: для *rad51/rad51* мутанта в 6.2 раза, для *rad52/rad52* в 4.2 раза и для *rad54/rad54* в 10 раз — на уровне 10% выживаемости клеток. Для этих штаммов поддержка формирования колоний облученными клетками практически достигала 100% (рис. 1, г, д, е) независимо от их радиочувствительности и спо-

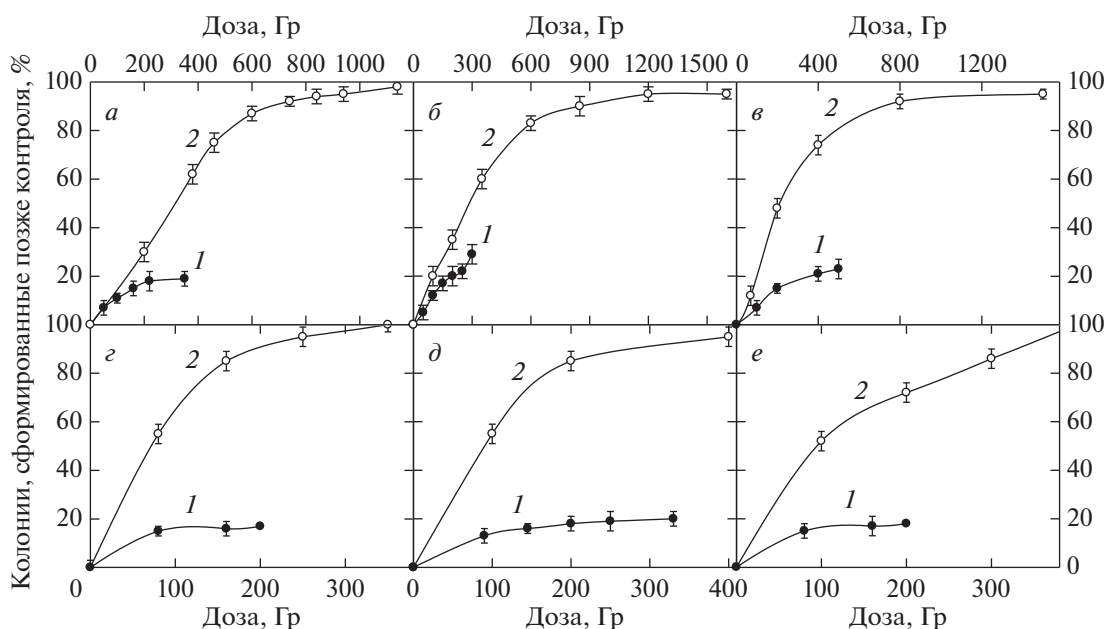


Рис. 1. Кривые зависимости задержанного по сравнению с контролем образования колоний выжившими после облучения клетками от дозы ионизирующего излучения для различных типов клеток. *a* — дрожжевые клетки дикого типа: гаплоидные клетки *Z. bailii* штамм K7 (*RAD*, кривая 1) и диплоидные клетки *S. ellipsoideus*, штамм Мегри 139-B (*RAD/RAD*, кривая 2); *б* — дрожжевые клетки *S. cerevisiae* дикого типа: гаплоидный штамм 211-1а (*RAD*, кривая 1) и диплоидный штамм 211 (*RAD/RAD*, кривая 2); *в* — дрожжевые клетки *S. cerevisiae* дикого типа: гаплоидный штамм S288C (*RAD*, кривая 1), диплоидный штамм XS800 (*RAD/RAD*, кривая 2); *г* — радиочувствительные мутантные дрожжевые клетки *S. cerevisiae*: гаплоидный штамм g218/7a (*rad51*, кривая 1) и изогенный диплоидный штамм XS806 (*rad51/rad51*, кривая 2); *д* — радиочувствительные мутантные дрожжевые клетки *S. cerevisiae*: гаплоидный штамм g160/2d (*rad52*, кривая 1) и изогенный диплоидный штамм XS1898 (*rad52/rad52*, кривая 2); *е* — радиочувствительные мутантные дрожжевые клетки *S. cerevisiae*: гаплоидный штамм g218/7c (*rad54*, кривая 1) и изогенный диплоидный штамм L9 (*rad54/rad54*, кривая 2).

способности клеток восстанавливаться от радиационных повреждений. Однако этот эффект проявлялся заметнее для радиочувствительных мутантов в области меньших доз облучения ионизирующего излучения, чем для штаммов дикого типа. Но главный новый результат настоящего исследования — генетическая нестабильность имела место для радиочувствительных диплоидных мутантов, неспособных к репарации и характеризующихся экспоненциальными кривыми доза-эффект. Генетическая нестабильность гаплоидных штаммов как дикого типа, так и их радиочувствительных мутантов, оставалась близкой к 20%. В отличие от традиционных представлений эти данные указывают на то, что задержанное по сравнению с контролем формирование колоний выжившими после облучения клетками (генетическая нестабильность) определяется главным образом плоидностью клеток и не зависит от формы кривых доза-эффект, их радиочувствительности и способности клеток восстанавливаться от радиационных повреждений.

Анализ молекулярной природы повреждений, ответственных за задержку формирования колоний облученными клетками, находится вне основной задачи данной работы, хотя некоторые

результаты достойны упоминания. Полагают, что митотическая рекомбинация может быть ответственной за нестабильность генома [15, 16]. К такому же эффекту могут приводить мутации [17] и ошибки репарации ДНК [3]. Продемонстрировано, что образование двунитевых разрывов ДНК так же как и повреждения хромосом, могут инициировать задержанную репродуктивную гибель как дрожжевых клеток [18, 19], так и культивируемых клеток млекопитающих [20]. В работе [15] на дрожжах *Pichia pinus* показано, что клетки, утратившие одну или несколько негомологичных хромосом, дают начало колониям, вырастающим позже контроля. В работах [21, 22] приводятся данные, демонстрирующие, что анеуплоидия может приводить к генетической нестабильности клеток различного происхождения. Возможным механизмом проявления задержки формирования колоний могут быть дефекты в хромосомах (делеции, анеуплоидия и пр.) в диплоидных клетках как дикого типа, так и их радиочувствительных мутантов. Эти дефекты не являются летальными, если они произошли только в одной хромосоме, но могут приводить к задержке формирования колоний. Но эти события могут быть летальными для гаплоидных клеток, поэтому у них наблюдается

меньший выход колоний, сформированных позже контроля. Разнообразие возможных механизмов запуска генетической нестабильности показывает необходимость дальнейших исследований этого явления.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chang W.P., Little J.B.* Evidence that DNA double-strand break initiate the phenotype of delayed reproductive death in Chinese hamster ovary cells // *Radiat. Res.* 1992. V. 131. № 1. P. 53–59.
2. *Brosh R.M., Bohr V.A.* Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases // *Nucl. Ac. Res.* 2007. V. 35. № 22. P. 7527–7544.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm1008>
3. *Degtyareva N.P., Chen L., Mieczkowski P. et al.* Chronic oxidative DNA damage due to DNA repair defects causes chromosomal instability in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 17. P. 5432–5445.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00307-08>
4. *Aggarwal M., Brosh R.M.* Functional analysis of human DNA repair proteins important for aging and genomic stability using yeast genetics // *DNA Repair (Amst)*. 2012. V. 11. № 4. P. 335–348.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.01.013>
5. *Donigan K.A., Cerritelli S.M., McDonald J.P. et al.* Unlocking the steric gate of DNA polymerase η leads to increased genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae* // *DNA Repair (Amst)*. 2015. V. 35. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.07.002>
6. *Капульцевич Ю.Г., Корогодин В.И., Петин В.Г.* Анализ радиобиологических реакций дрожжевых клеток. I. Кривые выживания и эффект дозирования // *Радиобиология.* 1972. Т. 12. № 2. С. 267–271.
7. *Корогодин В.И.* Феномен жизни. Избранные труды. М.: Наука, 2010. Т. 1. 436 с.
8. *Петин В.Г., Белкина С.В., Жураковская Г.П.* Математические модели и реакции клеток на облучение ионизирующими излучениями разного качества. М.: ГЕОС, 2020. 263 с.
9. *Евстратова Е.С., Хрячкова А.В., Жураковская Г.П. и др.* УФ-индуцированная задержка формирования колоний дрожжевыми клетками // *Рад. биология. Радиоэкология.* 2018. Т. 58. № 3. С. 245–250.
<https://doi.org/10.7868/S0869803118030037>
10. *Евстратова Е.С., Королев В.Г., Петин В.Г., Толкаева М.С.* Выживаемость и генетическая нестабильность дрожжевых клеток разного генотипа после облучения УФ-светом // *Рад. биология. Радиоэкология.* 2021. Т. 61. № 6. С. 608–614.
<https://doi.org/10.31857/S0869803121060035>
11. *Евстратова Е.С., Королев В.Г., Петин В.Г.* Задержка образования колоний диплоидными клетками разного генотипа после облучения УФ-светом // *Генетика.* 2019. Т. 55. № 7. С. 832–836.
<https://doi.org/10.1134/S0016675819070063>
12. *Saeki T., Machida I., Nakai S.* Genetic control of diploid recovery after gamma-irradiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mut. Res.* 1980. V. 73. № 2. P. 251–265.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90192-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90192-x)
13. *Petin V.G., Ryabchenko V.I.* A study of oxygen effect and radiosensitization of hypoxic cells by metronidazole in wild-type and radiosensitive mutants of yeast // *Int. J. Radiat. Biol.* 1982. V. 42. P. 491–500.
14. *Petin V.G.* Influence of misonidazole on survival of wild-type and radiosensitive mutants of yeast // *Mut. Res.* 1983. V. 108. P. 121–131.
15. *Толсторуков И.И., Близник К.М., Корогодин В.И.* Митотическая нестабильность диплоидных клеток дрожжей *Pichia pinus*. Сообщение I. Спонтанное расщепление // *Генетика.* 1979. Т. 15. № 12. С. 2140–2147.
16. *Chang W.P., Little J.B.* Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation: Association with delayed reproductive death phenotype // *Mut. Res.* 1992. V. 270. № 2. P. 191–199.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90130-t](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90130-t)
17. *Marder B.A., Morgan W.F.* Delayed chromosomal instability induced by DNA damage // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 11. P. 6667–6677.
<https://doi.org/10.1128/mcb.13.11.6667-6677.1993>
18. *Korogodin V.I., Bliznik K.M., Kapultceovich Yu.G. et al.* Cascade mutagenesis: Regularities and mechanisms // *Proc. 2nd Int. N.W. Timofeef-Ressovsky Conference.* Dubna: 2007. V. 1. P. 419–447.
19. *Корогодин В.И., Близник К.М., Капульцевич Ю.Г., Петин В.Г.* Оценка частоты митотической рекомбинации в клонах, вырастающих из облученных клеток // *Радиобиология.* 1974. Т. 14. № 5. С. 681–685.
20. *Sheltzer J.M., Blank H.M., Pfau S.J. et al.* Aneuploidy drives genomic instability in yeast // *Science.* 2011. V. 333. № 6045. P. 1026–1030.
<https://doi.org/10.1126/science.1206412>
21. *Urushibara A., Kodama S., Yokoya A.* Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome // *Mut. Res.* 2014. V. 766. № 1. P. 29–34.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.02.005>

DNA Repair Does Not Trigger Genetic Instability of Yeast Cells

E. S. Evstratova^{a, *}, **V. G. Petin**^b, and S. A. Geraskin^c

^a*National Medical Research Center for Radiology, Kaluga region, Obninsk, 249031 Russia*

^b*Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Center for Radiology, Kaluga region, Obninsk, 249031 Russia*

^c*Russian Institute of Radiology and Agroecology, Kaluga region, Obninsk, 249032 Russia*

**e-mail: ekevs7240@mail.ru*

The dependence of the delayed formation of colonies on the dose of ionizing radiation (gamma rays of ^{60}Co , dose rate 10 Gy/min) was obtained for six strains of wild-type haploid and diploid yeast, capable of recovering from radiation damage and characterized by sigmoidal survival curves as well as for six haploid and diploid radiosensitive mutants defective in reparation and characterized by exponential survival curves. The delay in the formation of colonies by survival cells after irradiation is considered as a genetic instability display. It was shown that for all diploid strains, genetic instability reached 100% with an increase in the dose of ionizing radiation, regardless of the shape of survival curves and the cell ability to recover from radiation damage. Conversely, for all haploid strains, genetic instability was only close to 20%. In contrast to traditional concepts, these data indicate that the late formation of colonies by surviving yeast cells after irradiation is determined mainly by cell ploidy and does not depend on the shape of the dose-response curves and cell radiosensitivity. This means that DNA repair does not trigger genetic instability in yeast cells.

Keywords: genetic instability, gamma rays, yeast cells, haploid and diploid, radiosensitive mutants.