

О. П. ГОЛИКОВА, Д. М. ГРОДЗИНСКИЙ

НАРУШЕНИЕ ДНК-МАТРИЦЫ И ЛУЧЕВОЕ ПОРАЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

(Представлено академиком М. Х. Чайлаханом 26 VIII 1970)

Одним из основных вопросов современной радиобиологии является изучение лучевого поражения матрицы ДНК, которое в последующих процессах транскрипции и трансляции может привести к развитию лучевого патогенеза клетки. В настоящее время установлено, что радиационное повреждение ДНК может быть причиной по крайней мере двух событий: во-первых, непосредственного повреждения самой матрицы ДНК, т. е. повреждения генетического кода (декодирование, деполимеризация), и, во-вторых, нарушения во взаимоотношениях ДНК — белок. При этом не исключается тесная взаимосвязь этих явлений.

Отмеченные процессы очень сложны и изучены еще недостаточно. В основном радиационное повреждение ДНК изучалось в модельных экспериментах. Было бы очень важным сопоставить величину поражения генома облученной клетки со степенью проявления лучевого эффекта в опытах *in vivo*. В этом случае к оценке поражения генома можно попытаться подойти, используя технику гибридизации РНК и ДНК. Суть этого метода состоит в том, что при инкубации РНК с одноцепочечной ДНК соответствующие цепи РНК образуют прочные, не поддающиеся действию РНКазы комплексы с комплементарными им участками ДНК. При гибридизации РНК из необлученных клеток с ДНК из облученных можно выявить нарушения в тех участках ДНК, которые в норме являются комплементарными. Если при облучении происходит репрессия генома или дерепрессия новых участков его, то это можно выявить, изучая гибридизацию РНК из облученных клеток с ДНК из необлученных. Применяя метод конкурентной гибридизации, когда в качестве конкурента используется немеченая РНК, выделенная из облученных или необлученных клеток, можно выявить степень разнокачественности синтезируемых после облучения рибонуклеиновых кислот. Эти соображения были положены в основу проводимых нами экспериментов.

Такой подход к оценке лучевого нарушения реализации генетической информации на ее первой ступени — транскрипции весьма перспективен. В. И. Токарская на зародышах гороха показала, что иРНК, синтезирующиеся к моменту облучения, продолжают образовываться и после облучения. С другой стороны, иРНК, появляющиеся в клетках в другую фазу развития, не обнаруживаются при облучении набухших семян в предыдущей фазе. На основании этого ею сделан вывод, что облучение гамма-радиацией полностью или почти полностью подавляет активацию новых генов. Отсюда следует, что механизмы, регулирующие генную активность, гораздо более радиочувствительны, чем механизмы, определяющие функционирование ДНК в качестве матрицы (¹⁻²).

В США Черри с сотрудниками (⁴) изучали нарушения, вызванные облучением сухих семян (доза 20 кр) арахиса в разных этапах биосинтеза белка. Они констатировали резкое уменьшение гибридизации иРНК, выделенной из облученных зародышей с ДНК из необлученных зароды-

шей (15% для контрольной и 3% для облученной иРНК). Эти авторы связывают снижение гибридизуемости с нарушением матрицы ДНК, ведущим к искажению в «выдаче» генетической информации на уровне транскрипции.

В этом отношении не безынтересна работа (5) на клетках асцитной карциномы Эрлиха мышей при действии на них ультрафиолетовой радиацией. Авторами (6) обнаружено, что при гибридизации рРНК и Д-подобной РНК из облученных на ДНК из необлученных тканей процент гибридизации повышается по сравнению с процентом гибридизации аналогичных РНК, выделенных из необлученных клеток. При объяснении этого явления авторы исходят из допущения, что синтез РНК на матрице ДНК происходит в виде гигантских полицистроновых цепей РНК. Последние являются предшественниками рибосомальных и матричных РНК. В результате облучения происходят нарушения в матрице ДНК, обрывающие нормальный синтез полицистроновой цепи до ее завершения, в связи с чем возрастает доля низкополимерной наиболее активной РНК, входящей в состав полицистрона, а следовательно, повышается и процент гибридизации. Допускается также, что повышение гибридизуемости есть компенсаторное включение ранее репрессированных повторяющихся цистронов.

Для решения поставленных задач мы провели опыты, в которых в качестве ДНК-матрицы использовали ДНК, выделенную как из необлученных, так и из облученных разными дозами проростков корней гороха.

Опыты проводились на корнях 2-х дневных проростков гороха, сорт Рамонский 77, облученных гамма-радиацией в дозе 5, 10 и 25 крэд, мощность дозы 25 рад/сек. Облучение проводили на гамма-установке К-1600 с источником гамма-лучей кобальта-60 в Институте физической химии АН УССР.

Выделение нуклеиновых кислот проводили через 3 часа после облучения. ДНК выделяли фенольным методом с применением 0,5% додецил-сульфата натрия (6), осаждали из водной фазы изопропиловым спиртом, обрабатывали РНКазой (50 мкг/мл РНКазы на 200—250 мкг/мл нуклеиновых кислот 30 мин. при 37°), чистили фенолом и хлороформом с добавлением додецил-сульфата натрия (0,5%) и вновь осаждали этанолом. Осадок ДНК наматывали на палочку и переносили в 0,01 × ССЦ (1 × ССЦ — 0,15 М хлористый натрий и 0,015 М цитрат натрия).

РНК выделяли также фенольным методом по Черри и др. (7). В начале при 4° без применения детергента, но с применением бентонита выделяли цитоплазматическую РНК, затем из фенольного остатка с применением додецил-сульфата натрия (0,5%) выделяли РНК, которая по своему нуклеотидному составу была ближе к ДНК, чем РНК, выделенная нами ранее без использования детергента (7). Водный слой дважды по 5 мин. чистили фенолом и хлороформом, затем осаждали холодным этанолом, растворяли в 0,1 М хлористом натрии, приготовленном на 0,05 М фосфатном буфере, и 2,5 М хлористым натрием высаливали высокополимерную Д-подобную РНК.

В качестве радиоактивного предшественника РНК был использован Р-32 ортофосфат в виде калийной соли или ортофосфорная кислота без носителя. Время насыщения отрезков корней в радиоактивном фосфоре—30 мин.

Гибридизацию вели по методу Георгиева с сотрудниками на геле ДНК, сшитой у.-ф. радиацией (8). Количество используемой в опытах ДНК 500 мкг на пробу; соотношение ДНК/РНК 10 : 1.

Активность гибридов и РНК определяли на торцовом счетчике БФЛ Т-25. Повторность счета каждой пробы 3-кратная. Ошибка счета не превышала 1—3%.

В табл. 1 представлены результаты опытов, в которых проростки гороха подвергались облучению в дозе 5 кр. Из табл. 1 видно, что процент гибридизации РНК из необлученных корней на ДНК-матрице как из облу-

ченых, так и из необлученных корней — одинаков. Это может говорить о том, что при облучении проростков в дозе 5 кр на матрице ДНК не наблюдается массовых повреждений в кодирующих последовательностях и РНК, синтезированная на необлученной ДНК-матрице, находит на ней комплементарные ей участки. Если же используется РНК, выделенная из облученных корней, то, как мы видим из той же таблицы, ее гибридизационная способность ниже, чем у необлученной РНК, хотя процент гибридизации как на ДНК из облученных корней, так и из необлученных также одинаков.

Таблица 1

Гибридизация РНК на матрице ДНК при облучении проростков гороха, %

РНК	5 кр		10 кр		25 кр	
	ДНК из необлученных корней	ДНК из облученных корней	ДНК из необлученных корней	ДНК из облученных корней	ДНК из необлученных корней	ДНК из облученных корней
Из необлученных корней	13±2,7	12,7±1,3	12,7±0,7	11,2±1,3	12,0±0,5	7,6±1,8
Из необлученных корней + конкурент — контрольная РНК	6,7±0,8	6,2±0,3	—	—	—	—
Из необлученных корней + конкурент — облученная РНК	7,7±1,7	7,8±0,9	—	—	—	—
Из облученных корней	10,0±1,4	9,0±1,1	13,9±0,6	14,3±0,5	7,4±1,6	11,9±2,1
Из облученных корней + конкурент — облученная РНК	5,8±0,7	4,7±0,5	—	—	—	—
Из облученных корней + конкурент — контрольная РНК	5,0±2,3	5,7±2,1	—	—	—	—

Примечание. Удельные активности РНК: при дозе 5 кр — контрольной 8850 имп/мин-мг РНК, облученной 7500 имп/мин-мг РНК, время отжига 18 час.; при дозе 10 кр — контрольной 8820 имп/мин-мг РНК, облученной 9563 имп/мин-мг РНК, время отжига 20 час.; при дозе 25 кр — контрольной 13067 имп/мин-мг РНК, облученной 12476 имп/мин-мг РНК, время отжига 22 часа

Интересны результаты, полученные нами при использовании немеченой РНК (выделенной из облученных и необлученных корней) в качестве конкурента (табл. 1), показывающие, что внесение в инкубационную среду конкурента в 2 раза уменьшает процент гибридизации в обоих случаях. Исходя из приведенных данных, мы можем предположить, что при облучении проростков гамма-лучами в дозе 5 кр уменьшается число активных генов, ранее функционирующих; однако, качественный набор рибонуклеиновых кислот не изменяется, что в какой-то мере служит показателем того, что матрица ДНК в этом случае не повреждается.

В табл. 1 представлены данные по гибридизации РНК на ДНК-матрице, выделенной из проростков гороха, облученных в дозе 10 кр. Видно, что процент гибридизации РНК из облученных корней как на ДНК-матрице из облученных, так и на ДНК из необлученных корней выше по сравнению с процентом гибридизации РНК из необлученных корней. Выше указывалось, что такой результат может получиться только в том случае, когда на матрице ДНК будет больше открытых участков, синтезирующих РНК, т. е. в том случае, когда наблюдается депрессия генома.

И, наконец, в табл. 1 представлены данные по определению процента гибридизации РНК на матрице ДНК при облучении проростков гороха в дозе 25 кр. Как видно, процент гибридизации РНК из облученных проростков на ДНК из необлученных корней выше по сравнению с процентом гибридизации, полученным нами при использовании ДНК из облученных корней. Если же мы гибридизируем облученную РНК, то процент гибридизации ее на аналогичной ДНК выше, чем на необлученной. Это свидетельствует о том, что облучение проростков в дозе 25 кр вызывает нарушения непосредственно матрицы ДНК, вследствие чего вновь синтезированная РНК на этой матрице отличается от РНК, синтезированной на необлученной ДНК. Подтверждением этого могут служить данные по конкурентной гибридизации, где в качестве конкурента используется не-

меченая РНК, выделенная из необлученных корней (табл. 2). Приведенные данные показывают, что внесение в инкубационную среду необлученной РНК-конкурента ингибирует связывание в комплексы меченой РНК почти на 50%. Это говорит о том, что обе эти РНК равноценны по своему качественному составу. Если та же немеченая РНК-конкурент вносится в инкубационную среду с меченой РНК из облученных тканей, то процент гибридизации меченой РНК хоть и понижается, но в значительно

Таблица 2

Конкурентная гибридизация РНК, выделенной из облученных 25 кр корней проростков гороха, с немеченой РНК из необлученных корней

РНК	Гибридизация, %
Из необлученных корней	9,8±1,25
Из необлученных корней + конкурент	4,5±1,22
Из облученных корней	4,95±0,98
Из облученных корней + конкурент	3,03±0,49

Примечание. Удельные активности РНК и время отсига то же, что и в табл. 1. В качестве матрицы была использована ДНК, выделенная из необлученных корней.

средственно матрицы ДНК, так и в нарушении связи ДНК — белок. Процессы, связанные с регуляцией репрессии и дерепрессии генома, более радиочувствительны, чем повреждение самой матрицы ДНК.

Институт физиологии растений
Академии наук УССР
Киев

Поступило
8 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. И. Токарская, Информ. бюлл. Радиобиология, № 11, 15 (1968). ² В. И. Токарская, С. Р. Уманский, Радиобиология, 8, в. 2, 185 (1968). ³ В. И. Токарская, С. Р. Уманский, П. А. Нелипович, В сборн. Свойства и функции макромолекул и макромолекулярных систем, «Наука», М., 1969, стр. 255. ⁴ R. V. van Huystee, W. Jachymszyk et al., J. Biol. Chem., 243, № 9, 2315 (1968). ⁵ В. Л. Мантьева, В. Я. Арион, Молекулярная биол., 3, в. 2, 294 (1969). ⁶ E. R. M. Key, Nature, 202, 4930, 391 (1964). ⁷ J. Ingle, J. L. Key, R. N. Holm, J. Mol. Biol., 11, 730 (1965). ⁸ Г. П. Георгиев, В. Я. Арион, ДАН, 171, 716 (1967).