

УДК 547.963.3 : 535.31

БИОХИМИЯ

В. Н. СОЙФЕР, К. К. ЦИЕМИНИС

ТЕМНОВАЯ РЕПАРАЦИЯ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

(Представлено академиком А. А. Баевым 3 I 1974)

Крупнейшим достижением молекулярной биологии в последние 10–15 лет стало установление способности живых организмов восстанавливать (репарировать) повреждения генетического аппарата клеток. Наиболее универсальным механизмом репарации является темновая репарация, состоящая из пяти последовательных реакций: надрезания ДНК вблизи повреждения, выщепления поврежденного участка из ДНК, расширения образовавшейся бреши, ее репаративной застройки и соединения вновь образованного фрагмента ДНК с предсуществовавшей нитью. Темновая репарация была найдена в клетках бактерий^(1–2), фагах⁽³⁾, в опухолевых^(4–6) и нормальных диплоидных клетках^(7–8) млекопитающих и человека. Однако попытки обнаружения системы ферментов темновой репарации в растительных организмах и в культуре растительных клеток^(9–10) окончились безуспешно.

Одна из основных трудностей в обнаружении феномена темновой репарации у растений обусловлена низким включением радиоактивного тимицина в растительную ДНК^(11–12). Поэтому естественно, что мы прежде всего попытались достигнуть высокой степени включения радиоактивного тимицина в ДНК эмбрионов растений. Работу проводили с эмбрионами чины посевной (*Lathyrus sativa L.*). Семена готовили так, чтобы избежать бактериального загрязнения⁽¹³⁾. Эмбрионы отделяли от семян и переносили в стерильные чашки Петри, содержащие среду Уайта с добавкой пенициллина (10 мкг/мл), H^3 -тимицин (60–80 мкС/мл, советский препарат) и аденин (150 мкг/мл, «Calbiochem», США). После 88-часового инкубирования в темноте при температуре 21° («Colora Box», Швеция) эмбрионы (45-эмбрионов, общий вес 3,5 г) подвергали ультрафиолетовому облучению двумя бактерицидными лампами БУВ-15 с расстоянием 18,5 см. Сразу после облучения и спустя определенные интервалы времени отбирали пробы, замораживали их в жидком азоте, затем выделяли из них ДНК по Мармуру. Определяли степень включения радиоактивного тимицина в ДНК (индекс мечения, указывавший количество импульсов в минуту на 1 мкг ДНК) и снимали спектральные характеристики ДНК. Спектр поглощения ДНК измеряли в автоматическом регистрирующем спектрофотометре SP 8000 (фирмы «Rue Unicam», Англия). Подсчет радиоактивности вели в диоксановом сцинтилляторе в счетчике «Mark II» фирмы «Nuclear Chicago» (США). После этого препараты ДНК гидролизовали в 85% муравьиной кислоте (VEB «Apolda», ГДР) при 175° в вакууме в течение 90 мин. Гидролизат наносили на хроматографическую бумагу Ватман № 1 и подвергали одномерному хроматографическому разделению компонентов в среде бутанол : вода (86 : 14) с трехкратным пропусканием раствора или двухмерному разделению (бутанол — вода 86 : 14, двухкратно, и насыщенный $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1M CH_3COONa — изопропанол 40 : 9 : 1, однократно). Хроматограммы разрезали на участки длиной 1 см, элюировали материал в воде (1 мл) и подсчитывали радиоактивность элюата в диоксановом сцинтилляторе.

Предварительно была определена димеризация тимина в чистой растительной ДНК. Использование богатой питательной среды для выращивания эмбрионов (среда Уайта) и достаточно высокая концентрация тимидина, а также добавление в среду аденина, способствующего большему включению метки (¹⁴) в ДНК, позволили нам получить растительную ДНК высокой удельной активности (500–750 имп/мин на 1 мкг ДНК). При облучении такой ДНК увеличивающимися дозами ультрафиолетового света была снята кинетика димеризации тимины (рис. 1). Подобно тому как

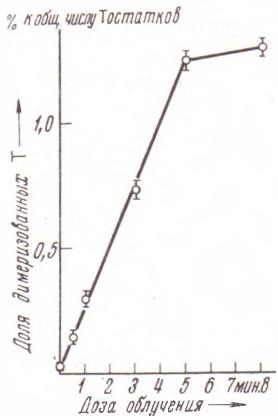


Рис. 1

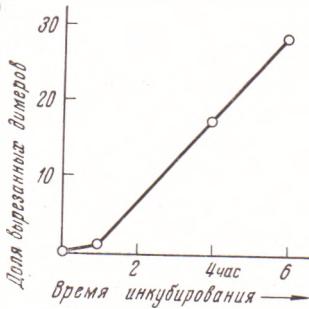


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика димеризации тимина в ДНК чины посевной. Указано среднее квадратичное отклонение по Пуассону. Облучение одной лампой БУВ-15 с расстояния 18 см

Рис. 2. Кинетика выщепления димеров тимина из ДНК проростков чины при инкубировании их после облучения в темноте

это было найдено в экспериментах с ДНК, бактерий, фагов и клеток культуры тканей, в растительной ДНК кинетика димеризации подчиняется уравнению первого порядка. Линейность димеризации сохраняется вплоть до 5-й мин. облучения, после чего кривая выходит на плато. Количественно хроматографический анализ показал, что максимальное число димеризуемых (находящихся рядом в ДНК) тиминовых остатков приближается у чины к 1,3%. Для сравнения можно указать, что Троско и Мансур (⁹⁻¹⁰) смогли отметить наличие 2,2% димеров тимины в клетках культуры *Ginkgo biloba* L., 0,4% в клетках табака и 1,1% в клетках *Naplopparis*.

После снятия кривой димеризации тимины, мы решили, учитывая поглощение света тканями эмбриона, увеличить дозу облучения в 3 раза по сравнению с дозой, дающей максимальную димеризацию. При этом, конечно, внешние ткани получали дозу больше максимальной, а внутренние подвергались слабому облучению, и димеры в них не образовывались. В результате этого внутренние ткани эмбрионов давали только тиминовую радиоактивность, что приводило к «разбавлению» димеров и уменьшению пропорции — димеры тимины/тимин за счет увеличения пика радиоактивности тиминовой области на хроматограммах. Максимальное число димеров составило в этой серии опытов 0,12%. При инкубации облученных эмбрионов в среде Уайта без H^3 -тимидина происходило вырезание димеров тимины из ДНК (табл. 1). К 6-у часу инкубирования вырезание димеров прекращалось. В это время около 70% димеров тимины было удалено из ДНК растений (¹⁵). Основное вырезание происходило в первые 6 час. инкубирования.

Учитывая этот результат, в последующих экспериментах мы изучали процесс вырезания димеров только до 6-го часа инкубирования в тем-

ноте. В качестве радиоактивной метки в этой серии использовали 2-С¹⁴-тиимидин, а анализ вырезания проводили как с помощью одномерной, так и двумерной хроматографии (табл. 2). Полученные в этой серии опытов данные подтвердили вывод о существовании явления вырезания димеров тимида из ДНК интактных проростков чины, подвергнутых ультрафиолетовому облучению. Вплоть до 6-го часа инкубирования сохраняется однoudарная кинетика вырезания димеров (рис. 2).

Таблица 1

Димеризация тимида в ДНК эмбрионов чины под действием ультрафиолетового облучения и вырезание димеров из ДНК в ходе темновой reparации

Время инкубации эмбрионов после облучения, час.	Радиоактивность, имп/мин		Число димеров в ДНК (ТТ/Т), %	Доля вырезанных из ДНК димеров, %
	димерная область	тиминовая область		
Контроль (без облучения)	38	266520	0,014	0
То же	24	322999	0,007	0
»	20	173993	0,011	0
0	246	199468	0,123	0
2	92	212097	0,043	65
6	65	176847	0,037	70
12	458	566199	0,081	34
28	248	404425	0,061	50
46	215	305521	0,071	43

Таблица 2

Вырезание димеров тимида из ДНК проростков чины в темноте и исчезновение димеров тимида на свету

№ опыта	Длительность инкубирования	Вид хроматографии	Радиоактивность, имп/мин		Содержание димеров (ТТ/Т), %	Доля димеров, вырезанных из ДНК, %	Среднее по всем опыта
			димерная область	тиминовая область			
1	Контроль (без облучения)	Одномерная	14	131425	0,011	—	
3		Двумерная	10	127802	0,008	—	
1	Без инкубации	Одномерная	852	567330	0,150	—	
2	Без инкубации (сразу после облучения)	»	258	232700	0,111	—	
3		Двумерная	825	444972	0,185	—	
4		»	94	38016	0,247	—	
1	1 час в темноте	Одномерная	845	548320	0,154	0	
3		Двумерная	704	385795	0,182	1,6	0,8
1	4 часа в темноте	Одномерная	532	423070	0,126	16,0	
2		»	139	161410	0,086	22,6	
3		Двумерная	755	472814	0,160	13,5	17,4
1	6 час. в темноте	Одномерная	580	492290	0,148	22,0	
2		»	124	135820	0,091	18,1	
3		Двумерная	496	398387	0,125	32,4	28,6
4		»	36	24991	0,144	41,7	
2	6 час. на свету	Одномерная	62	98559	0,063	43,3	
4		Двумерная	63	38323	0,164	33,6	38,5

В клетках проростков чины удается также обнаружить исчезновение димеров тимида из ДНК при освещении проростков видимым светом. Для изучения этого процесса (по своей природе являющегося, по-видимому, фотопрививкой) часть материала после ультрафиолетового облучения оставляли в течение 6 час. на свету (одна люминесцентная лампа) и за-

тем в этих проростках анализировали процентное содержание димеров тимина по методу, описанному выше. Данные этой серии опытов приведены в табл. 2 (две последних строчки). Было установлено, что около 40% всех возникших в ДНК димеров исчезало (возможно восстанавливалось в мономерное состояние) после освещения видимым светом. Важно подчеркнуть, что на свету происходит устранение большего числа димеров тимина, чем в темноте. Однако в обоих случаях устраниению подвергается менее половины всех возникших в ДНК димеров тимина. Напомним, что и в другой исследованной системе клеток высших организмов (клетки млекопитающих) отмечено также выщепление лишь около половины (иногда до 70%) всех возникших димеров тимина (⁴⁻³).

Таким образом, в наших экспериментах удалось установить наличие первых двух этапов темновой репарации, заканчивающихся вырезанием димеров тимина из ДНК. Тем самым показана универсальность распространения темновой репарации в живом мире. Растения, у которых ранее не удавалось установить существование темновой репарации, обладают этим важнейшим для жизнедеятельности ферментным аппаратом.

Лаборатория молекулярной биологии и генетики
Всесоюзной Академии
сельскохозяйственных наук
им. В. И. Ленина
Москва

Поступило
12 X 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. P. Boyce, P. Howard-Flanders, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 51, 293 (1964).
² R. B. Setlow, W. L. Carrier, ibid., v. 51, 226 (1964). ³ R. B. Setlow, W. L. Carrier, In: Replication and Recombination of Genetic Material, Australian Acad. Sci., 1968, p. 134. ⁴ J. D. Regan, J. E. Trosc, W. L. Carrier, Biophys. J., v. 8, 319 (1968). ⁵ M. Horikawa, O. Nikaido, T. Sugahara, Nature, v. 218, 489 (1968). ⁶ B. H. Сойфер, Л. П. Матусевич, Г. И. Горошкина, Радиобиология, т. 10, 275 (1970). ⁷ R. B. Setlow, J. K. Setlow, W. L. Carrier, J. Bacteriol., v. 102, 187 (1970). ⁸ B. H. Сойфер, А. Н. Мустафина, Н. И. Яковлева, ДАН, т. 205, 1251 (1972). ⁹ J. E. Trosc, V. H. Mansour, Radiation Res., v. 36, 333 (1968). ¹⁰ J. E. Trosc, V. H. Mansour, Mutation Res., v. 7, 120 (1969). ¹¹ W. Scheuermann, K. Tägder, Radiation Res., v. 36, 483 (1968). ¹² M. Bopp, Zs. Pflanzenphysiol., v. 63, 10 (1970). ¹³ K. K. Cieminis, B. H. Сойфер, Докл. ВАСХНИЛ, № 10, 8 (1973). ¹⁴ R. P. Boyce, R. B. Setlow, Biochem. et biophys. acta, v. 61, 618 (1962). ¹⁵ V. N. Soifer, K. K. Cieminis, Lietuvos Gen. Selekc. Resp. Konf. Tezes, 1973, p. 3-5.