

А. П. ДМИТРИЕВ, Д. М. ГРОДЗИНСКИЙ

**ПОСТРАДИАЦИОННАЯ СЕНСИБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК
СИНЕЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ ANACYSTIS NIDULANS
ПРИ ПОМОЩИ ДИМЕТИЛБЕНЗИЛРИФАМПИЦИНА — АКТИВНОГО
ИНГИБИТОРА РНК-ЗАВИСИМОЙ ДНК ПОЛИМЕРАЗЫ**

(Представлено академиком М. Х. Чайлахяном 26 II 1974)

Синезеленые водоросли обладают высокой резистентностью к γ -облучению (¹), низким уровнем спонтанного, а также индуцированного мутагенеза (²). Можно предполагать, что в поддержании генетической стабильности у *Cyanophyta* важную роль играют процессы репарации летальных и мутационных повреждений. У синезеленых водорослей обнаружено фотовосстановление после γ -облучения (³) и эффекты радиосенсибилизации, существенно превышающие кислородный эффект (⁴, ⁵); имеются указания о наличии у них механизмов, подобных «темновой» репарации (⁶, ⁷). Однако причины, обуславливающие их высокую радиорезистентность, остаются неясными. При изучении причин исключительной радиорезистентности синезеленых водорослей нам казалось логичным предположить, что вряд ли для обеспечения такой высокой радиорезистентности достаточно одного лишь механизма репаративного синтеза ДНК. По всей вероятности, репаративный синтез ДНК, осуществляющий коррекцию нормальной репликации и транскрипции, является процессом непрерывным, поддерживающим целостность генетического аппарата клетки. А при действии экстремальных факторов (к числу которых относится γ -облучение), по-видимому, могут включаться какие-то дополнительные механизмы репарации.

Открытие явления обратной транскрипции и последовавший за этим ряд исследований показали, что передача генетической информации от РНК к ДНК выходит далеко за рамки проблем онкологии и имеет широкое биологическое значение. Это навело нас на мысль, что обратная транскрипция могла бы участвовать в обеспечении высокой радиорезистентности у синезеленых водорослей. Каким образом она осуществляется у синезеленых водорослей совершенно неясно, но в этом процессе, вероятно, должны были бы участвовать соответствующие ферменты. Если это так, то использование специфических ингибиторов РНК-зависимой ДНК полимеразы (обратной транскриптазы) помогло бы выяснить роль этого фермента в процессе пострадиационного восстановления. Поэтому мы использовали в качестве модификатора лучевой реакции у синезеленых водорослей производное антибиотика рифампицина — диметилбензилрифампицин (ДМБ), 2'-6'-диметил-N(4')-бензил-N(4')-(диметил)-рифампицин, один из наиболее эффективных ингибиторов обратной транскриптазы, любезно предоставленный нам проф. Г. Ланчини и Р. Крихно. Поскольку ДМБ подавляет также РНК полимеразы некоторых бактерий (⁸), то для сравнения исследовали модифицирующее действие актиномицина — ингибитора синтеза РНК.

Культуру одноклеточной синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* выращивали в слабо модифицированной среде Хьюджа (⁴) при 32° и освещенности 1000 лк. В ранней экспоненциальной фазе клетки отмывали от

питательной среды, ресуспендировали при концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл в фосфатном буфере (рН 7,4) и облучали γ -лучами Co^{60} при мощности дозы 6 крад/мин. Ингибиторы добавляли к суспензиям клеток в следующих конечных концентрациях: ДМБ 20 мкг/мл, актиномицин D 10 мкг/мл. Действие ингибиторов прекращалось при разведении жидкой питательной средой перед посевом клеток в чашки Петри на плотную питательную среду, содержащую 0,75% агар. Подсчет колонии производили на 6-е сутки инкубирования клеток при 32° .

На рис. 1 представлены данные о влиянии ДМБ и актиномицина D на выживаемость γ -облученных клеток *A. nidulans*. В качестве теста клеточ-

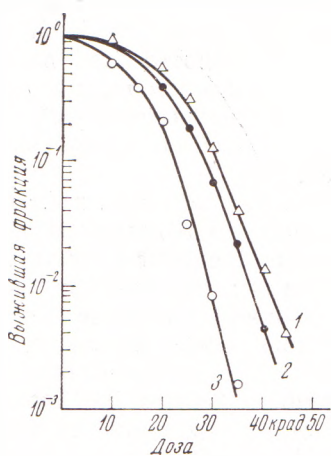


Рис. 1

Рис. 1. Пострадиационная сенсibilизация *A. nidulans*. γ -Облученные клетки обработаны ингибиторами на протяжении 1 часа перед посевом в чашки. 1 — необработанный контроль, 2 — актиномицин D (10 мкг/мл), 3 — ДМБ (20 мкг/мл)

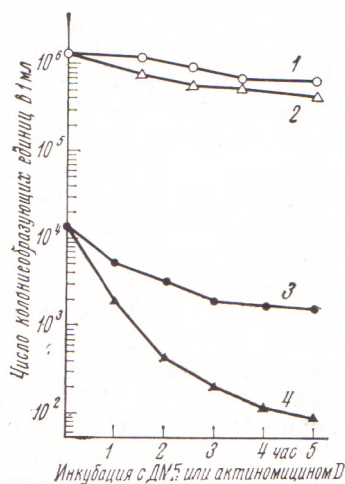


Рис. 2

Рис. 2. Пострадиационная обработка клеток *A. nidulans* ДМБ (20 мкг/мл) и актиномицином D (10 мкг/мл). Фракция выживших клеток изображена как функция времени инкубации в ДМБ или актиномицине D после γ -облучения. 1 — только актиномицин D, 2 — только ДМБ, 3 — γ -облучение (40 крад) + обработка актиномицином D, 4 — γ -облучение (40 крад) + обработка ДМБ

ной выживаемости использовали способность клеток образовывать макроколонии через 6 дней инкубации. При добавлении ДМБ или актиномицина D до облучения эффекта радиосенсибилизации не наблюдали. Добавление облученных растворов этих веществ к необлученным клеткам также было неэффективно (не показано на рис. 1). Если облученные клетки обрабатывались ДМБ на протяжении 1 часа до посева в чашки, то наблюдалась заметная сенсibilизация (кривая 3). Актиномицин D вызывал менее эффективную пострадиационную сенсibilизацию у *A. nidulans* (кривая 2). При продолжительном инкубировании с облученными клетками ДМБ значительно больше усиливает гибель клеток *A. nidulans*, чем актиномицин D (рис. 2).

Известно, что актиномицин D является сильным ингибитором ДНК-зависимой РНК полимеразы. Поэтому его радиосенсибилизирующее действие у *A. nidulans* можно рассматривать как результат прекращения синтеза РНК и, следовательно, ингибирования синтеза белка. Эти процессы, по-видимому, могут приводить к нарушению репарации потенциально летальных повреждений в клетке, если предположить, что для репарации потенциально летальных повреждений необходим синтез белка de novo при участии короткоживущей мРНК. Этот ингибитор одновременно мо-

жет прекращать синтез рибосомальной и транспортной РНК, но, по-видимому, не будет тормозить активность долгоживущей мРНК.

В настоящее время высказываются предположения о том, что время транскрипции и время трансляции данного гена не связаны между собой непосредственно (⁹, ¹⁰), т. е. мРНК поступают в цитоплазму клетки в форме в общем устойчивой к разрушению внутри клетки и сохраняются в ней длительное время. Механизм, с помощью которого сохраняется от деградации такая мРНК, так же как и место ее нахождения в клетке, пока неизвестны. Инициация, регуляция и репрессия синтеза белка на этих в высшей степени стабильных матрицах может осуществляться различными ферментами. Не исключена возможность, что среди этого комплекса ферментов находится и обратная транскриптаза. Заманчиво предположить, что существование у синезеленых водорослей таких стабильных долгоживущих мРНК и обратной транскриптазы предоставляет возможность для синтеза копий ДНК на матрице РНК с целью замещения поврежденной облучением ДНК. Возможно, что такой дополнительный механизм пострадиационного восстановления участвует в обеспечении высокой радиорезистентности синезеленых водорослей.

Радиосенсибилизирующее действие ДМБ на клетки *A. nidulans* могло быть в принципе результатом ингибирования РНК-полимеразы или же результатом действия ДМБ на какие-то иные процессы в клетке. Последнее предположение подтверждается тем фактом, что актиномицин D при использовании в концентрации, вызывающей примерно одинаковый эффект на выживаемость, обладал значительно менее выраженным эффектом пострадиационной сенсибилизации. Если же ДМБ ингибирует обратную транскриптазу, то он будет останавливать синтез ДНК на матрице долгоживущей РНК. Таким образом, пострадиационное действие ДМБ можно объяснить, предполагая, что ДМБ ингибирует РНК-зависимую ДНК полимеразу и, следовательно, предотвращает процесс обратной транскрипции.

Выражаем благодарность проф. Г. Ланчини и Р. Крихио за предоставление диметилбензилрифампицина (AF/ABDP).

Институт физиологии растений
Академии наук УССР
Киев

Поступило
18 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ M. Kraus, *Radiation Bot.*, v. 9, 6, 481 (1969). ² С. В. Шестаков, Т. Н. Мигронова, *Биол. науки*, т. 2, М., 1971, стр. 98. ³ Y. Asato, *Radiation Bot.*, v. 11, 4, 313 (1971). ⁴ А. П. Дмитриев, Д. М. Гродзинский, *Микробиология*, т. 42, 2, 307 (1973). ⁵ А. Р. Dmitrijew, D. M. Grodzinsky, *Stud. biophysica*, v. 35, 3, 157 (1973). ⁶ H. N. Singh, *Radiation Bot.*, v. 8, 4, 355 (1968). ⁷ S. E. Stevens jr., C. Van Baalen, *J. Physiol.*, v. 5, 2, 136 (1969). ⁸ R. Adman, L. D. Schultz, B. D. Hall, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 69, 1702 (1972). ⁹ M. Sussman, R. R. Sussman, *Biochem. et biophys. acta*, v. 108, 463 (1965). ¹⁰ R. Roth, J. M. Ashworth, M. Sussman, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 59, 1235 (1968).