

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ДНП-КОМПЛЕКСЕ ЯДЕР ЗЛАКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Рощенко М.В., Лаптева О.К.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск
220012, ул. Сурганова, 2В, e-mail: biolog@it.org.by

Изучали изменения в дезоксирибонуклеопротеидном (ДНП) комплексе ядер проростков и каллусных тканей злаковых растений, выращенных в зоне ЧАЭС с уровнем радиоактивного загрязнения 15, 40 и 60 Ки/км². Опытные образцы, полученные при прорастивании и культивировании клеток семян растений, выросших на загрязненных территориях, по сравнению с контролем отличались содержанием растворимых полидезоксирибонуклеотидов (ПДН), числом поврежденных ДНК, распределением ДНК по отдельным компартментам клеточного ядра. Отмечается аналогия между радиационно-индуцированными изменениями ДНП-комплекса и процессами, происходящими при старении клетки.

Известно, что ионизирующее излучение вызывает в ДНК разнообразный спектр повреждений. Это однонитевые (ОН) и двунитевые (ДН) разрывы, внутри- и межмолекулярные сшивки ДНК-ДНК, ДНК-белок, повреждения ДНК-мембранного комплекса, оснований, изменения суперспирализации молекулы ДНК [1-7]. Большая часть повреждений ДНК устраняется системами репарации [3,8]. Оставшиеся неотрепарированными повреждения ДНК приводят к различным биологическим эффектам: абберациям хромосом, увеличению частоты генных мутаций, злокачественной трансформации, нарушению функции генома и, как результат, гибели части облученных клеток. Следует подчеркнуть, что все приведенные выше данные относительно повреждающего действия ионизирующего излучения на молекулу ДНК и геном в целом получены в основном на клетках животных и микроорганизмов в модельных опытах. Что касается высших растений, то имеющиеся сведения не позволяют представить ясную картину воздействия сложного комплекса ионизирующего излучения радиационных следов аварии на ЧАЭС на геном растений, без чего радиационный мониторинг окружающей среды в зоне контроля аварии на ЧАЭС будет неполным.

Целью наших исследований было изучение влияния радиационного воздействия на ДНК клеток проростков и каллусных тка-

ней семян растений, выращенных в зоне отселения от Чернобыльской АЭС и подвергавшихся хроническому внешнему и внутреннему облучению. О степени повреждения ДНК судили по накоплению в клеточных ядрах и цитоплазме растворимых в пределах физиологических концентраций солей ПДН, наличие которых указывает на деградацию ДНП-комплекса, а также по количеству одонитовой ДНК, образующейся при денатурации в щелочных условиях. Следует отметить, что степень повреждения этого биополимера, оцениваемая по процентному содержанию одонитовой ДНК, является составляющей величиной таких повреждений, как одно- и двунитевые разрывы, апуриновые, апиримидиновые и другие щелочно-лабильные сайты, переходящие при высоких значениях рН реакционной среды в разрывы ДНК.

Опыты проводили на проростках и каллусных тканях семян озимого тритикале (“Дар Беларуси”) и ярового ячменя (“Жодинский”), выращенных в зоне контроля аварии на Чернобыльской АЭС с уровнем радиоактивного загрязнения 15, 40, 60 Ки/км². Контролем служили проростки и каллусные ткани семян, выращенных на участках с нормальным радиационным фоном. Использовали проростки 24-, 48-, 72-, 96-часового проращивания и каллусные ткани разного срока культивирования, индуцированные из зародышей семян радиоактивного тритикале и ячменя. Культивирование клеток *in vitro* осуществляли по общепринятой методике. Для индукции каллусогенеза применяли модифицированную агаризованную среду Мурасиге и Скуга (макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу, тиамин – 1,0 мг/л, никотиновая кислота – 1,0 мг/л, пиридоксин – 1,0 мг/л, инозит – 100 мг/л, сахароза – 2% и агар Дифко – 0,7%, рН 5,8). Наиболее активным индуктором каллусогенеза на эксплантатах зародышей оказался ауксин 2,4-Д в концентрации 4 мг/л. Ткани выращивали в темноте при 26°C и влажности 70%. В культуре ткани клетки тритикале проходили до трех делений при длительности культивирования 75 суток. Для определения одонитовой ДНК и ПДН использовали суспензию клеток и ядер; последние выделяли по методу, изложенному в работе [9]. Количество одонитовой ДНК находили методом хроматографии на гидроксилпатите (ГАп) согласно работам [10,11]; время лизиса для клеточных ядер и клеток каллуса подбирали экспериментально. При оптимальном подборе времени лизиса денатурация ДНК успевает пройти только в местах щелочно-лабильных повреждений ДНК, после чего лизат быстро нейтрализовали.

ПДН экстрагировали на холоде из препаратов клеточных ядер или клеток раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 0,7 мМ ЭДТА (рН 7,0-7,2). О количестве экстрагированных ПДН судили по их процентной доле в экстракте относительно суммарной ДНК ядер или клеток.

Ядерный матрикс выделяли по методу работы [12] в нашей модификации [13]. С целью сохранения ДНК, связанной непосредственно с ядерным матриксом, этап обработки препарата ДНК-зой I, был заменен воздействием ультразвука на УЗДН-2 при частоте 22 кГц в течение 15 секунд. Количество ДНК определяли спектрофотометрически [14] после разделения ДНК и РНК по Шмидту-Таннгаузеру.

Результаты исследований неожиданно показали снижение количества однополовой ДНК и экстрагируемых ПДН у проростков озимого тритикале, выращенного в зоне контроля аварии на ЧАЭС с радиационным фоном 15 Ки/км² (Рис.1).

Полученные данные можно объяснить или активацией систем репарации, вследствие чего у облученных растений повреждений в ДНК меньше по сравнению с контролем, или же значительной компактизацией нуклеопротеидного комплекса и увеличением числа сшивок ДНК-белок и, как результат, уменьшением доступности ДНК для экстракции и лизиса. Поскольку известна высокая степень ассоциации ДНК с белками ядерного матрикса, можно было предположить, что основное число сшивок ДНК-белок, если таковые будут образовываться при радиационном воздействии, должно быть связано именно с этой структурой ядра. Поэтому нами был выделен ядерный матрикс из проростков облученных и контрольных растений и определена доля связанной с ними ДНК. Исследования показали, что в 3-суточных проростках из семян тритикале, выращенных в зоне при радиоактивном фоне в 15 Ки/км, с ядерным матриксом связано ДНК на 13,3 % больше, чем в контроле, что свидетельствует о дополнительном образовании сшивок ДНК-белок.

Следует отметить, что проростки представляют собой комплекс специализированных тканей и клеток, и представилось целесообразным попытаться упростить систему, используя культуру клеток *in vitro*, т.е. исследовать дедифференцированные ткани. Для этого из зародышей облученных зерновок озимого тритикале (при уровне загрязнения 15 Ки/км²), ярового ячменя (при уровне загрязнения

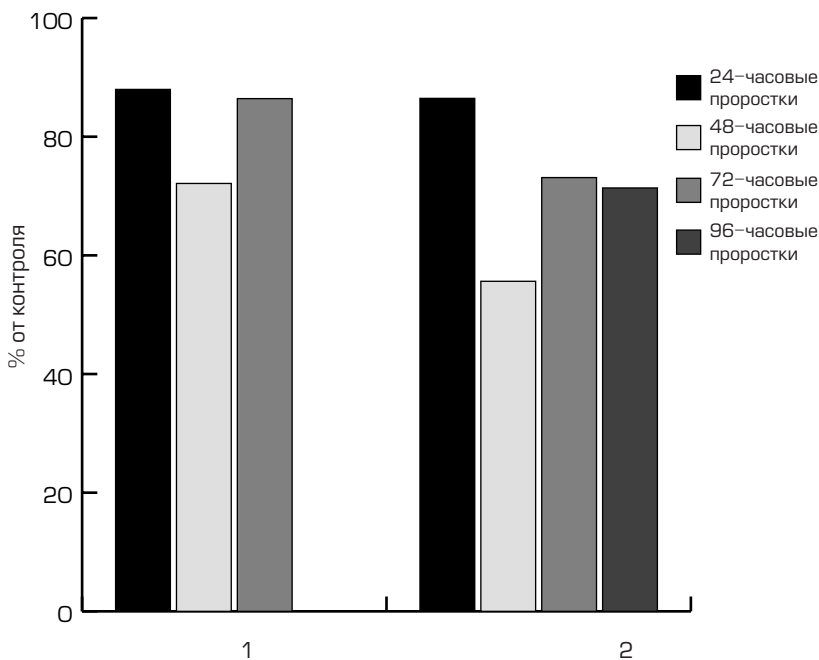


Рис. 1. Относительное количество одностандной ДНК (1) и ПДН (2) в проростках озимого тритикале “Дар Беларуси”, выращенного в зоне контроля аварии на ЧАЭС (15 Ки/км²)

15, 40 и 60 Ки/км²), а также контрольных образцов получали каллусные ткани, и повреждения в ДНК оценивали по тем же параметрам, что и в проростках. Оказалось, что в отличие от проростков молодые (20 суток культивирования) каллусные ткани, индуцированные из зародышей облученных семян озимого тритикале (при уровне загрязнения 15 Ки/км²) характеризуются повышенным количеством одностандной ДНК и экстрагируемых ПДН. Однако с увеличением длительности каллусогенеза величина этих показателей значительно снижается и после 40 суток культивирования оказывается, как и у проростков, ниже таковой в контроле (Рис.2).

Когда в качестве объекта исследования использовали каллус яровой культуры – ячменя, зерновки которого формировались в зоне с уровнем радиационного загрязнения 15 Ки/км², то существенных изменений по количеству ПДН и одностандной ДНК обнаружено не было. Такая разница в реакции каллусов озимой и яровой культур может объясняться длительностью пребывания исходно-

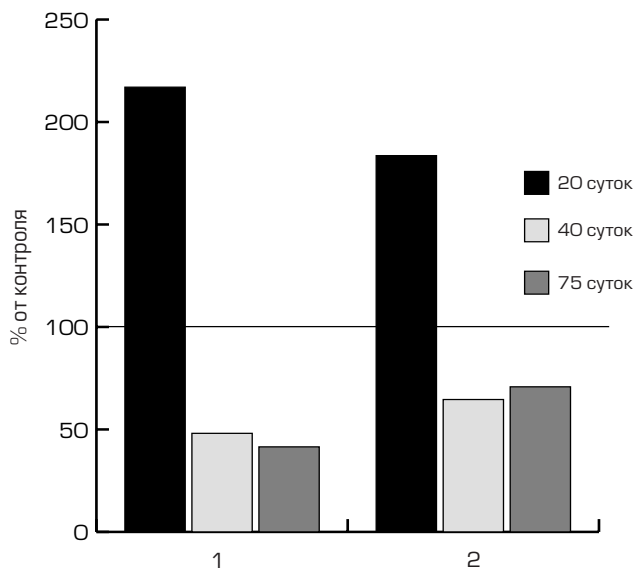


Рис. 2. Относительное количество однонитевой ДНК (1) и ПДН (2) в калусных тканях, индуцированных из семян озимого тритикале “Дар Беларуси”, выращенного в зоне контроля аварии на ЧАЭС (15 Ки/км²)

го маточного растения в условиях радиационного загрязнения (озимые: сентябрь-июль; яровые: май-август). Это подтверждается и тем, что в молодых калусных тканях ячменя при более жестком режиме облучения (40 и 60 Ки/км²), как и у калусов тритикале, обнаруживается большее количество экстрагируемых ПДН (Рис.3).

По-видимому, образование калусной ткани связано с нарушением функции систем репарации в условиях резкого изменения гормонального статуса и типа питания ткани. С увеличением длительности культивирования ткани *in vitro* происходит адаптация к этим факторам и содержание ПДН и однонитевой ДНК становится сопоставимым с таковыми у проростков. Например, увеличение длительности калусогенеза ячменя до 2-х месяцев привело к значительному уменьшению экстрагируемых ПДН (в среднем на 64 %) (Рис.3). Этот радиационный эффект так же, как и у проростков, обусловлен образованием дополнительных ДНК-белковых шивков на ядерном матриксе, что было показано на основании определения доли ДНК, связанной со скелетными белками ядра.

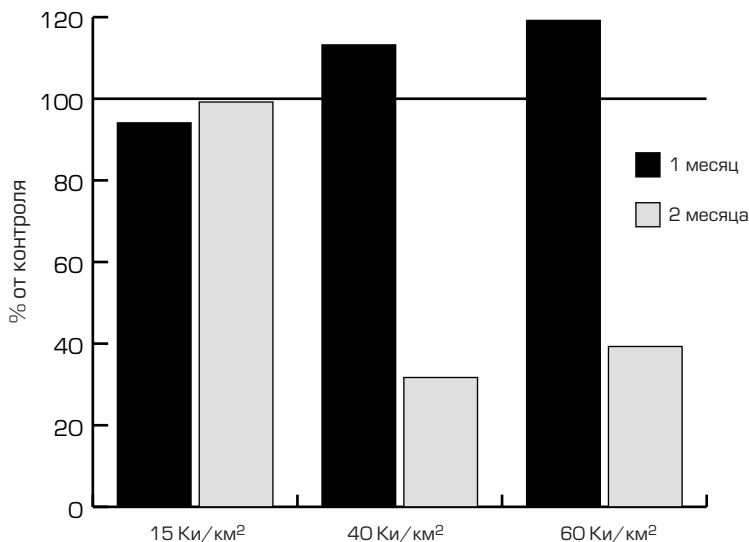


Рис. 3. Относительное количество экстрагируемых ПДН в каллусных тканях ячменя одномесячного (1) и двухмесячного (2) возраста, выращенного в зонах с разным уровнем радиационного загрязнения

В 40-суточных каллусных тканях “радиоактивного” тритикале также с ядерным матриксом ассоциировано ДНК больше, чем в контроле. Все это свидетельствует о том, что при радиационном воздействии и у каллусов образуются дополнительные сшивки ДНК-белок. В связи с этим растет доля нуклеопротеида на основе белков матрикса, с которым связаны основные процессы функционирования генома – репарация, репликация, транскрипция. Пока, правда, трудно однозначно судить, насколько связан такой радиационный эффект с активацией процессов репликации и репарации. Однако можно считать, что возникновение дополнительных сшивок ДНК-белок обусловлено повреждением молекулы ДНК и является одним из типов неотрепарированных нарушений в геноме. Некоторые авторы [15,16] полагают, что накопление ДНК-белковых сшивок является пусковым механизмом старения клетки. Прогрессирующее образование нуклеопротеидных комплексов отмечено при естественном старении организмов, при моделировании старения в пассируемых диплоидных клеточных культурах

на последних пассажах и при “стационарном старении”, когда аналогичные старению изменения в клетках вызывают остановку их деления [17,18]. Наши данные, полученные на культуре тканей *in vitro*, показывают, что в геноме растений, произрастающих в зоне контроля аварии на Чернобыльской АЭС и подвергшихся как внешнему, так и внутреннему хроническому облучению, происходят изменения, которые связаны с частично неотрепарированными повреждениями в ДНК и перераспределением долей ДНК, связанных с белками. Все это аналогично процессам, происходящим при старении клетки.

Литература

- 1 Комар В.Е., Хансон Л.П. Информационные макромолекулы при лучевом поражении клеток. М.: Атомиздат, 1980. 176 с.
- 2 Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. Киев: Наук. Думка, 1989. 360 с.
- 3 Москалева Е.Ю., Илюшина Н.А. // Итоги науки и техники. Сер. Радиационная биология. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1990. С. 3-113.
- 4 Сынзыныс В.И., Саенко А.С., Пелевина И.И. // Итоги науки и техники. Сер. Радиационная биология. Т. 9. М.: ВИНТИ, С. 114-213.
- 5 Hagen V.// *Radiat. Environm. Biophys.* 1990. V. 29. №4. P. 315-322.
- 6 Frankerberg-Schwader V.// *Int. J. Radiat. Biol.* 1991. V. 59. №2. P. 559-560.
- 7 Гудков И.Н. Основы общей и сельскохозяйственной радиобиологии. Киев: УСХА, 1991. 328 с.
- 8 Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. Л.: Наука, 1979. 285 с.
- 9 Техника биохимического исследования субклеточных структур и биополимеров растительной клетки / Под ред. А.С.Вечера. Минск: Наука и техника, 1986. 197 с.
- 10 Rydberg B. // *Radiat. Res.* 1975. V. 61. №2. P. 274-287.
- 11 Газиев А.И., Малахов Л.В., Трофименко А.Ф. // Радиобиология. 1979. Т. 19. Вып. 4. С. 502-506.
- 12 Berezney R., Coffey D.S. // *Adv. Enz. Reg.* 1976. V.14. P. 63-100/
- 13 Решетников В.Н., Ненадович Р.А., Лаптева О.К. и др. // *Вестн АН БССР. Сер. биол. наук.* 1989. №8. С. 94-96.
- 14 Спирин А.С. // *Биохимия.* 1958. Т. 23. Вып. 5. С. 656-661.
- 15 Bjorksten J. // *Theoretical Aspects of Aging.* N.Y.: Acad. Press: 1974. №5. P. 43-59.
- 16 Culter R.G. // *Aging, Carcinogenesis and Radiation Biology.* London: Plenum Press, 1976. P. 443-492.
- 17 Михельсон В.М. // Надежность и элементарные события процессов старения биологических объектов. Киев: Наук. думка, 1986. С. 116-123.

- 18 Хохлов А.Н. // Итоги науки и техники. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.

Summary

The changes in DNP-complex and DNA of seedling and callus tissues of cereals grown in the Chernobyl NPP zones with contamination levels of 15, 40 and 60 Ci/km² were studied. Test samples produced by germinating and culturing seed cells of grown in contaminated areas were notable for the content of soluble polydesoxiribonucleotides, amount of DNA damages, DNA distribution over separate compartments of cell nucleus as compared to the control. Analogy between radiation-induced changes in DNP-complex and processes occurring in cell nucleus senescence was observed.