

С. В. Літвінов*, Н. М. Рашидов

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна

*Відповідальний автор: slitvinov83@gmail.com

ВІДНОСНА РАДІОЧУТЛИВІСТЬ МУТАНТА *ARABIDOPSIS THALIANA Atmsh2 SALK_002708* У ДІАПАЗОНІ СУБЛЕТАЛЬНИХ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ РАДІАЦІЄЮ

Ефективна репарація індукованих опроміненням пошкоджень ДНК є важливим фактором радіостійкості рослин. З огляду на те, що роль репарації помилково спарених нуклеотидів (MMR) у системній реакції рослин на дію сублетальних доз іонізуючої радіації ще недостатньо вивчена, було проведено дослідження впливу випромінювання з низькою іонізуючою здатністю в дозах до 21 Гр включно на накопичення біомаси рослинами *Arabidopsis thaliana Atmsh2*^{-/-}, дефектними за одним з ключових компонентів MMR-репарації, білком MSH2. Встановлено, що мутант *Atmsh2 SALK_002708* більш чутливий порівняно з рослинами дикого типу до дії сублетальних доз радіації як при гострому, так і при фракціонованому опроміненні. Зміни радіочутливості мутантних рослин за дії різних доз та при їхньому фракціонуванні можуть бути пов'язані з транскрипційною відповіддю на опромінення генів, що кодуєть білки репарації ДНК.

Ключові слова: іонізуюче опромінення, сублетальні дози, радіочутливість, місметч-репарація ДНК, MSH2.

1. Вступ

За останні роки отримано чимало даних, що свідчать на користь ключової ролі систем репарації ДНК у пострадіаційному відновленні рослин [7, 8]. Через свої фізико-хімічні властивості та біологічне значення ДНК, поряд із ліпідами мембран, є основною мішенню для іонізуючого опромінення. Тому репарація пошкоджень спадкового апарату клітин, особливо в меристематичних тканинах, забезпечує успішне подолання рослиною негативних наслідків дії радіації [1]. Отримано багато даних, що підтверджують активацію ексцизійної репарації азотистих основ та нуклеотидів, систем ферментативного відновлення одно- та дволанцюгових розривів ДНК у рослинних клітинах, які зазнали опромінення [6]. Проте малодослідженим залишається питання участі однієї з основних конститутивних репаративних систем – репарації помилково спарених нуклеотидів (місметчів) у пострадіаційному відновленні рослин.

2. Матеріали та методи досліджень

З метою оцінки впливу місметч-репарації (MMR) на ефективність пострадіаційного відновлення використали мутант модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. трансгенної лінії *SALK_002708*, отриманої шляхом інсерції T-DNA в локусі *Atmsh2*, внаслідок чого інактивованій шлях MMR через відсутність одного з ключових білків місметч-репарації MSH2 [4]. Для мутанта *SALK_002708* (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Велика Британія) харак-

терна висока частота перебудов мікросателітної ДНК – у 60 разів вище контрольного рівня.

Рослини вирощували в культивативній кімнаті на ґрунтовій суміші «Полісся» в умовах довгого дня (18/6 год) при температурі 22 - 25 °С. Інтенсивність освітлення люмінесцентними лампами білого світла 5,9 кЛк (80 мкмоль фотонів м⁻²·с⁻¹).

Веgetуючі рослини генотипів *Atmsh2*^{+/+} та *Atmsh2*^{-/-} екотипу *Columbia 0* опромінювали 1) гостро на 35-у добу вегетації на рентгенівській установці РУМ-17 (Національний інститут раку, Україна), однократно та фракціоновано (3 фракції з інтервалом у 24 год) у діапазоні сублетальних доз 3 - 21 Гр; 2) хронічно, від проростання до 35-ї доби вегетації змішаним γ/β -випромінюванням від джерела з хлоридом радіоактивного ізотопу ¹³⁷Cs в загальній стимулюючій дозі 20 сГр. У листі опромінених рослин визначали рівень експресії важливих генів репарації ДНК *AtRAD51* (маркер гомологічної рекомбінації), *AtKu70* (маркер негомологічного поєднання кінців двониткових розривів ДНК) та *AtRad1* (маркер ексцизійної репарації нуклеотидів та мутагенних шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК – SSA і MMEJ). Рівень експресії досліджуваних генів визначали за допомогою методу гел-денситометрії продуктів ген-специфічної ампліфікації кДНК, синтезованої на матриці загальної РНК [5]. В якості референс-гена використали ген з конститутивною експресією *AtEfla*. Також вимірювали масу повітряно-сухої надземної частини рослин на момент закінчення вегетації.

Докладно методика дослідів і вимірювань описана в публікаціях [2, 3, 5].

© С. В. Літвінов, Н. М. Рашидов, 2018

3. Результати досліджень та їх обговорення

Раніше нами було показано, що характерна нелінійна залежність дії рентгенівського опромінення в нелетальних дозах 3 - 21 Гр на рослини арабідопсису *A.th. Col-0 (Atmsh2+/+)* корелює з ранньою радіаційно-індукованою модифікацією транскрипційної активності ключових генів пострадіаційної репарації ДНК *AtRAD51*, *AtKu70* і *AtRad1* [5]. Як гостро, так і фракціоноване опромінення дозами 3, 6 і 9 Гр справляє стимулюючу дію на ріст рослин, зменшує частку рослин із затримкою розвитку. При опроміненні в дозі 12 Гр та 4 + 4 + 4 Гр спостерігається збільшення кількості рослин із затримкою росту та розвитку або морфологічними змінами (морфо-

зами). Гостра доза 15 Гр, як і фракціонована 5 + 5 + 5 Гр, має стимулюючу дію на швидкість росту стебла, але інгібує утворення нових розеткових листків, квіток і стручків. Підвищена транскрипційна активність гена *AtRad1* пов'язана із затримкою росту та розвитку, а також з аномальним фенотипом, що формується після опромінення рослин [5]. Активація експресії конститутивних шляхів репарації ДНК, маркерами якої є *AtRAD51* і *AtKu70*, зумовлює зменшення частки рослин з аномаліями розвитку, але тільки в разі фракціонованого опромінення, коли рання транскрипційна відповідь має найбільший вплив на репарацію радіаційно-індукованих дволанцюгових розривів ДНК.

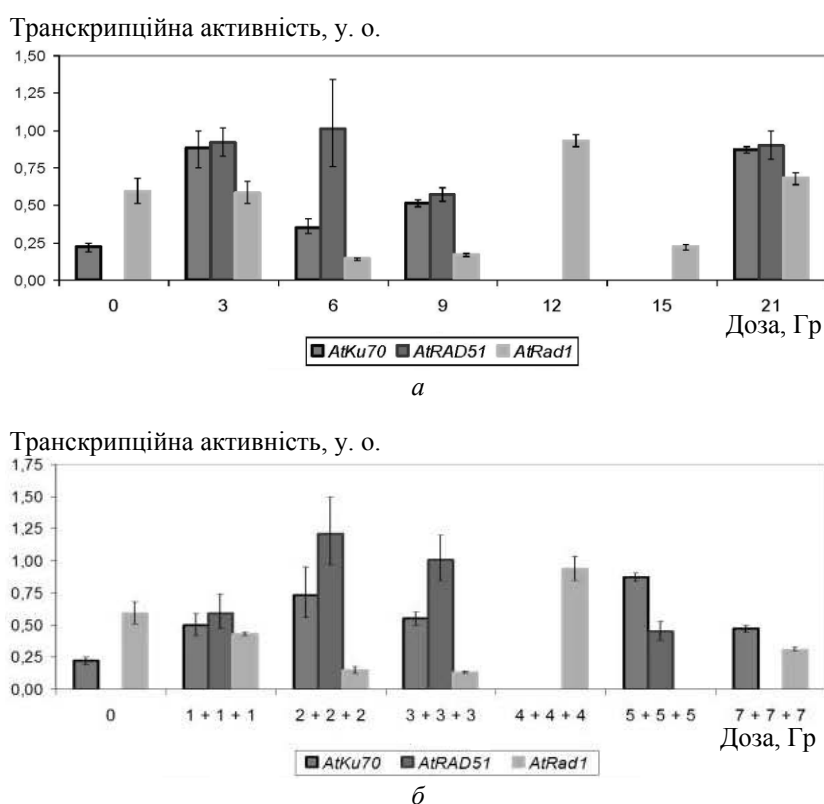


Рис. 1. Відносний середній рівень транскрипції генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в одиницях транскрипційної активності гена з конститутивною експресією *AtEfla*: а – гостре опромінення, б – фракціоноване опромінення.

На основі проведених дослідів встановлено, що опромінення мутанта *Atmsh2-/-* призводить до змін у транскрипції генів *AtRAD51*, *AtKu70* та *AtRad1*, які статистично достовірно не відрізняються від таких у рослинах з генотипом *Atmsh2+/+* (рис. 1). Однак при цьому мутант *Atmsh2-/-* більш чутливий до дії як гострого, так і фракціонованого іонізуючого опромінення за показником накопичення сухої маси надземної частини, тобто зазнає сильніших ушкоджень при дії тих самих доз радіації в порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2+/+* (рис. 2).

Неопромінені мутанти *Atmsh2-/-* демонструють меншу швидкість росту та розвитку в порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2+/+*, пізніше зацвітають, утворюють менше квіток та стручків. Більше 50 % їхніх нащадків у 5-му поколінні гинуть не досягнувши генеративної фази або ж є стерильними, що свідчить про швидке накопичення мутаційного тягаря та виродження лабораторної популяції.

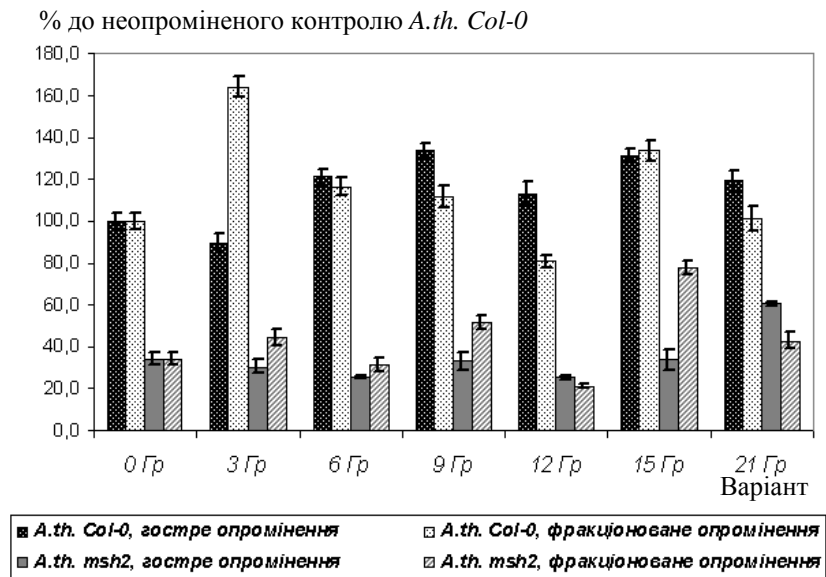


Рис. 2. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослини наприкінці вегетації.

При опроміненні в дозі 12 Гр, яка стимулює активність гена *AtRad1* (див. рис. 1), частка рослин *Atmsh2+/+* з аномальним фенотипом та затримкою розвитку зростає в порівнянні з неопроміненим контролем, а серед рослин з генотипом *Atmsh2-/-*, навпаки, знижується. При дозах фракціонованого опромінення 3, 6, 9 і 15 Гр, що стимулюють експресію *AtRAD51*, знижується відсоток рослин *Atmsh2+/+* з аномальним фенотипом і затримкою розвитку та зростає відповід-

ний відсоток серед опромінених мутантів *Atmsh2-/-*.

Щодо впливу опромінення на накопичення біомаси, то пострадіаційні ефекти є подібними для обох генотипів лише при дозі 3 Гр, коли відбувається індукція *AtRAD51*, а експресія *AtRad1* суттєво не знижується. Для всіх інших доз опромінення в інтервалі 6 - 21 Гр спостерігаються значні відмінності між мутантом та рослинами *Col-0* (рис. 3).

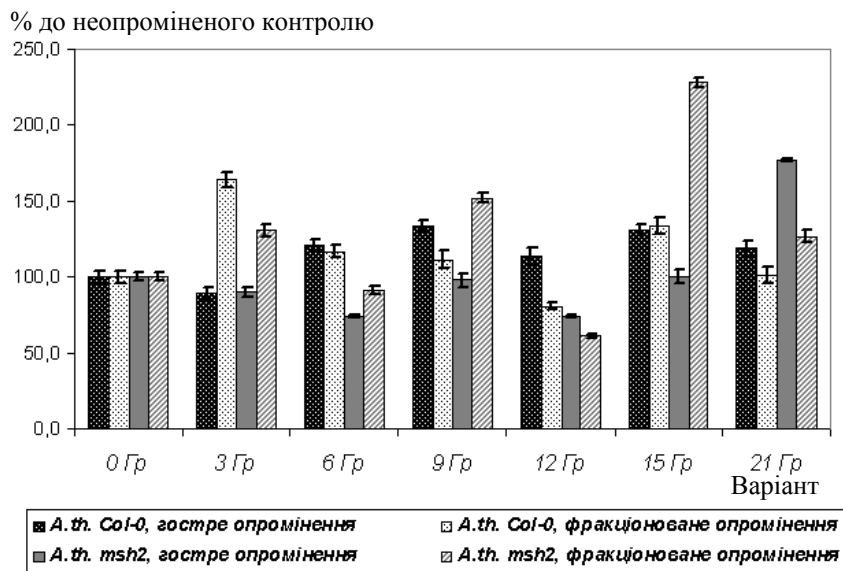


Рис. 3. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослини наприкінці вегетації, % до власного неопроміненого контролю *A.th. Col-0* та *A.th. msh2* відповідно.

Зокрема, при дозі гострого і фракціонованого опромінення 6 Гр (максимальна індукція *AtRAD51* поряд із сильно зниженою експресією *AtRad1*), що є стимулюючою для рослин *Atmsh2+/+*, знижується накопичення біомаси рослинами мутантної лінії *Atmsh2-/- SALK_002708*. Інгібуюча доза 12 Гр (відсутність індукції

AtRAD51 і максимальна стимуляція експресії *AtRad1*) діє на рослини *Atmsh2-/-* значно сильніше в порівнянні з *Atmsh2+/+*. Доза фракціонованого, але не гострого опромінення 15 Гр стимулює збільшення маси надземної частини рослин мутантної лінії. Саме при фракціонуванні дози 15 Гр, проте не при гострому опроміненні, акти-

вугється експресія *AtRAD51*. Водночас опромінення в дозі 21 Гр має значно сильнішу стимулюючу дію на утворення біомаси рослинами з генотипом *Atmsh2*^{-/-} відносно рослин *Atmsh2*^{+/+}.

Фракціонування дози на три фракції з інтервалом у 24 год зумовлює зменшення відносної радіочутливості мутанта *Atmsh2*^{-/-} в середньому у 1,6 раза, крім стимулюючих індуковану репа-

рацію ДНК доз фракціонованого опромінення 3 та 21 Гр, за яких радіочутливість рослин *Atmsh2*^{-/-} підвищується в 1,3 та 1,2 раза відповідно.

Хронічне опромінення в загальній стимулюючій дозі 20 сГр, за якої спостерігається індукція гена *AtRad1*, рівною мірою сприяє накопиченню біомаси як рослинами лінії *Col-0*, так і мутанта *Atmsh2*^{-/-} (рис. 4).

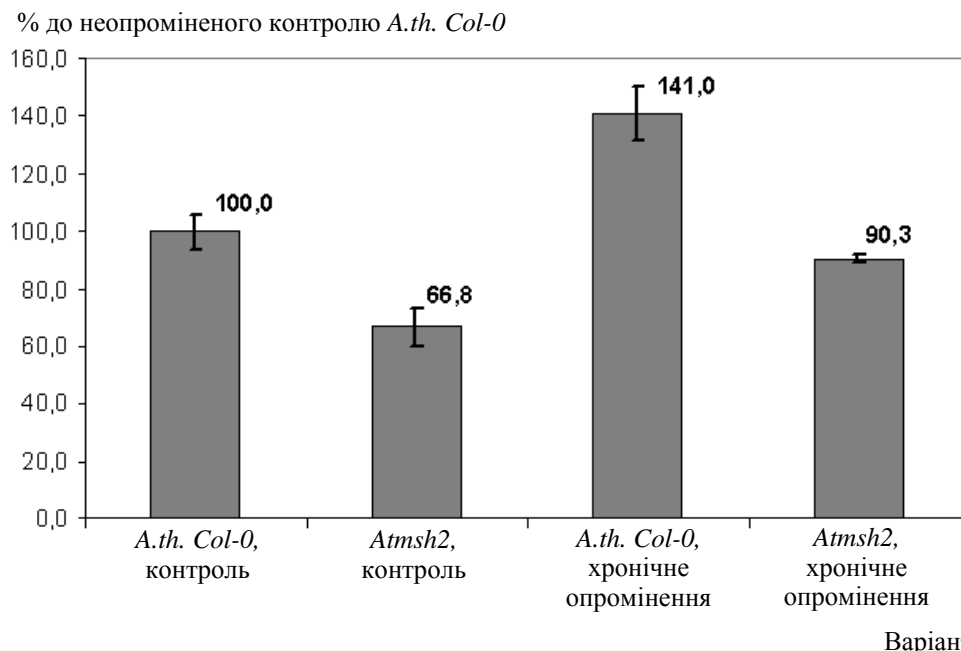


Рис. 4. Середня маса повітряно-сухої надземної частини рослини наприкінці вегетації. Загальна доза хронічного опромінення 20 сГр.

4. Висновки

Доза хронічного опромінення проростків та вегетуючих рослин 20 сГр підвищує суху біомасу надземної частини як інтактних рослин, так і мутантів *Atmsh2* *SALK_002708* приблизно в 1,4 раза. Рослини з генотипом *Atmsh2*^{-/-} в інтервалі сублетальних доз рентгеновського опромінення до 21 Гр включно накопичують меншу суху біомасу надземної частини в порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+}. Отже абсолютна радіочутливість мутантних рослин за даним показником є вищою по відношенню до рослин дико-го типу. У той же час при дозі гострого опромінення 21 Гр, а також при фракціонуванні доз 9, 15 і 21 Гр спостерігається більший відносний приріст сухої маси

опромінених рослин щодо неопроміненого контролю в рослинах *Atmsh2*^{-/-} і менший у рослинах *Atmsh2*^{+/+}. Це означає, що в інтервалі сублетальних доз рентгеновського опромінення відносна радіочутливість рослин, дефектних за білком місметч-репарації MSH2, не однакова, а залежить як від дози, так і від режиму опромінення. Фракціонування доз 6 - 15 Гр знижує відносну радіочутливість мутанта, а доз 3 і 21 Гр, навпаки, підвищує.

Отримані дані свідчать про самостійну роль білка MSH2 у репарації викликаних радіацією пошкоджень ДНК рослин, як і про можливу епістатичну взаємодію з продуктами генів *AtRad1* і *AtRAD51*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Д.М. Гродзинский. *Радиобиология растений* (К.: Наук. думка, 1989) 384 с.
2. С.В. Литвинов. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений. *Ядерна фізика та енергетика* 15(4) (2014) 406.
3. W.D. Bradford et al. An Inexpensive Gel Electrophoresis-Based Polymerase Chain Reaction Method for Quantifying mRNA Levels. *Cell Biology Education* 4(2) (2005) 157.
4. A. Depeiges et al. A new transgene assay to study microsatellite instability in wild-type and mismatch-repair defective plant progenies. *Plant Science* 168 (2005) 939.
5. S. Litvinov, N. Rashydov. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 7(1) (2017) 52.
6. N. Tuteja et al. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 36(4) (2001) 337.

7. W.M. Waterworth et al. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytologist* 192(4) (2011) 805.
8. K.O. Yoshiyama, K. Sakaguchi, S. Kimura. DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology* 2(4) (2013) 1338.

С. В. Литвинов*, Н. М. Рашидов

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина

*Ответственный автор: slitvinov83@gmail.com

**ОТНОСИТЕЛЬНАЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МУТАНТА
ARABIDOPSIS THALIANA ATMSH2 SALK_002708
В ДИАПАЗОНЕ СУБЛЕТАЛЬНЫХ ДОЗ ОБЛУЧЕНИЯ РАДИАЦИЕЙ**

Эффективная репарация индуцированных облучением повреждений ДНК является важным фактором радиоустойчивости растений. Учитывая то, что роль репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR) в системной реакции растений на действие сублетальных доз ионизирующей радиации еще недостаточно изучена, было проведено исследование влияния редкоизионизирующего излучения в дозах до 21 Гр включительно на накопление биомассы растениями *Arabidopsis thaliana Atmsh2*^{-/-}, дефектными по одному из ключевых компонентов MMR-репарации, белку MSH2. Установлено, что относительная радиочувствительность мутанта *Atmsh2 SALK_002708* к действию сублетальных доз радиации зависит от дозы и режима облучения. Изменения радиочувствительности мутантных растений при различных дозах и при фракционировании дозы могут быть связаны с транскрипционным ответом на облучение генов, кодирующих белки репарации ДНК, которые компенсируют отсутствие мисметч-репарации или вместе с MSH2 принимают участие в мутагенных путях репарации ДНК.

Ключевые слова: ионизирующее облучение, сублетальные дозы, радиочувствительность, мисметч-репарация ДНК, MSH2.

S. V. Litvinov*, N. M. Rashydov

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

*Corresponding author: slitvinov83@gmail.com

**RELATIVE RADIOSENSITIVITY OF *ARABIDOPSIS THALIANA ATMSH2 SALK_002708* MUTANT
IN THE SUBLETHAL DOSE RANGE OF RADIATION**

Effective repair of radiation-induced DNA lesions is an important factor in the radioresistance of plants. Taking into account the role of the DNA mismatch repair (MMR) in the systemic reaction of plants to the action of sublethal doses of ionizing radiation has not yet been sufficiently clear enough. The study of the effect of low LET ionizing radiation in doses up to 21 Gy had been performed, including measurement of the biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana Atmsh2*^{-/-} plants, defective in one of the key components of MMR-repair, MSH2 protein. It has been established that the relative radiosensitivity of *Atmsh2 SALK_002708* mutants to the action of sublethal doses of radiation depends on the dose and mode of irradiation. Changes in the radiosensitivity of mutant plants at different doses and due to the fractionation of the dose can be related to the radiation-induced transcriptional response of genes, coding DNA repair proteins, which compensate the lack of MMR-repair or along with MSH2 participate in the mutagenic pathways of DNA repair.

Keywords: ionizing irradiation, sublethal doses, radiosensitivity, DNA mismatch repair, MSH2.

REFERENCES

1. D.M. Grodzinskij. *Radiobiology of Plants* (Kyiv: Naukova dumka, 1989) 384 p. (Rus)
2. S.V. Litvinov. Effects of chronic exposure of seeds and seedlings of *Arabidopsis thaliana* by low doses of γ -radiation on plant growth and development. *Yaderna Fizyka ta Energetyka (Nucl. Phys. At. Energy)* 15(4) (2014) 406. (Rus)
3. W.D. Bradford et al. An Inexpensive Gel Electrophoresis-Based Polymerase Chain Reaction Method for Quantifying mRNA Levels. *Cell Biology Education* 4(2) (2005) 157.
4. A. Depeiges et al. A new transgene assay to study microsatellite instability in wild-type and mismatch-repair defective plant progenies. *Plant Science* 168 (2005) 939.
5. S. Litvinov, N. Rashydov. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 7(1) (2017) 52.
6. N. Tuteja et al. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. and Mol. Biol.* 36(4) (2001) 337.
7. W.M. Waterworth et al. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytologist* 192(4) (2011) 805.
8. K.O. Yoshiyama, K. Sakaguchi, S. Kimura. DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology* 2(4) (2013) 1338.

Надійшла 12.02.2018

Received 12.02.2018