

ЛІТВІНОВ С. В.[✉], РАШИДОВ Н. М.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: slitvinov83@gmail.com

[✉] slitvinov83@gmail.com, (044) 257-82-44, (098) 812-92-89

КІЛЬКІСНИЙ ОПИС РАНЬОЇ ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ ВІДПОВІДІ РОСЛИННИХ КЛІТИН НА РАДІАЦІЙНО ІНДУКОВАНІ ПОШКОДЖЕННЯ ДНК ЗА ДОПОМОГОЮ ПУАССОНІВСЬКОЇ МОДЕЛІ ІНІЦІУЮЧОЇ ПОДІЇ

Мета. Однією з проблем, що не втратили свою актуальність, залишається вивчення механізмів адаптації вищих рослин до дії радіації, пов'язаних із модифікацією роботи системи репарації ДНК у відповідь на опромінення. У пропонуваній роботі представлена пуассонівська математична модель радіаційно індукованої ранньої транскрипційної відповіді генів ключових ферментів відновлення дволанцюгових розривів ДНК в активних клітинах рослин. **Методи.** В роботі використовували тотальне рентгенівське опромінення модельного об'єкта – 35-денних рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – сублетальними дозами 3–21 Гр, екстракцію сумарної РНК, зворотну транскрипцію з рандомними гексануклеотидними праймерами, ПЛР-ампліфікацію отриманої кДНК з праймером до цільових генів, флуоресцентну гелденситометрію продуктів ампліфікації. **Результати.** Запропонована математична модель транскрипційної відповіді на генотоксичну дію іонізуючого опромінення у субпопуляції активних рослинних клітин на основі пуассонівського розподілу, яка задовільно описує отримані експериментальні дані. **Висновки.** Для ініціації максимальної транскрипційної відповіді на пошкодження ДНК достатньо одного детектованого системами репарації дволанцюгового пошкодження на хромосому, в той час як відсутність дволанцюгових пошкоджень або поява їх в кількості більше одного на хромосому пригнічує ранню транскрипційну відповідь клітини на іонізуюче опромінення. Пуассонівська модель ініціюючої події дозволяє передбачити реакцію субпопуляції активних клітин покритонасінних на дію генотоксичних факторів.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, відповідь на пошкодження ДНК (DDR), *Arabidopsis thaliana*, репарація ДНК, транскрипційна активність генів.

Репарація потенційно летальних радіаційно індукованих пошкоджень – дволанцюгових розривів ДНК – підтримує проліферацію меристематичних клітин, що забезпечує нормальний онтогенез, формування властивого певному виду та екотипу рослин фенотипу, репопуляційне відновлення твірних тканин [1].

На основі порівняльного аналізу сучасних даних щодо репарації в клітинах еукаріот були виділені такі ключові гени ферментів репарації дволанцюгових розривів (ДР) ДНК модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* [2, 3].

Вивчали дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді ключових генів репарації ДР ДНК у розеткових листках за тотального рентгенівського опромінення у дозах 3–21 Гр 35-денних рослин на межі вегетативної та генеративної стадій розвитку [3].

Матеріали і методи

Рівень транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* визначали за допомогою флуоресцентної денситометрії в агарозному гелі після зворотної транскрипції екстрагованої із свіжого листя сумарної РНК та ПЛР-ампліфікації отриманої кДНК з праймером до цільових генів. Транскрипційну активність генів нормували за активністю гена *AtEfla* у листі неопромінених рослин, яка відображає рівень конститутивної транскрипції. Докладно методика проведення експериментів та оцінки транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* описана у статті [3].

Результати та обговорення

Розрахунок кількості влучень у ДНК за модифікованим методом Тимофєєва-Ресовського та Лі [4] з урахуванням очікуваної кількості дволанцюгових пошкоджень показує, що за одноразового опромінення рослин *A. thaliana* у дозі 6 Гр, коли досягається максимум

індукованої ранньої транскрипційної відповіді поряд із максимальним зниженням рівня конститутивної транскрипції (див. рис. 1 та рис. 2), очікувана кількість дволанцюгових пошкоджень ДНК складає 4,4–6,6 на 4С геном, тобто в середньому одне дволанцюгове пошкодження на хромосому *A. thaliana*. Доза, за якої транскрипційна відповідь на опромінення є мінімальною (статистично достовірно не відрізняється від неопроміненого контролю), становить 12 Гр, що відповідає в середньому двом дволанцюговим пошкодженням на хромосому *A. thaliana*. Розрахунки зроблені на основі припущення, що під час поглинання енергії рідкоіонізуючого випромінювання 30 еВ у ДНК очікується поява одного одноланцюгового пошкодження (виходячи з прийнятих оцінок радіаційно-хімічних виходів пошкоджень ДНК *in vivo*). Дволанцюгових пошкоджень на одиницю дози виникає приблизно в 100–150 разів менше від загальної кількості пошкоджень.

Відповідно до наведених вище міркувань, механізми, що лежать в основі спостережуваних радіобіологічних ефектів, можна описати таким чином. Внаслідок індукованих радіацією пошкоджень ДНК виникають прямі та опосередковані (ензиматичні) одноланцюгові (ОР) та дволанцюгові (ДР) розриви ДНК. В свою чергу розриви ДНК запускають сигнальні каскади DDR-відповіді, зокрема транскрипцію генів репарації ДР ДНК. Модифікація транскрипції генів репарації, що відповідають за підтримку структурної цілісності геному, здійснюється в результаті детекції спеціалізованими білками нерепарованих ДР ДНК. Індукція генів репарації дволанцюгових розривів ДНК після одноразового опромінення супроводжується зниженням рівня конститутивної транскрипції у клітині (рис. 2). Для ініціації каскаду реакцій достатньо одного нерепарованого ДР ДНК на геном. Проте максимум індукції транскрипційної відповіді досягається за наявності в середньому одного дволанцюгового розриву на хромосому. Два та більше ДР ДНК на хромосому затримують або пригнічують «швидку» транскрипційну відповідь на опромінення та є сигналом, що, імовірно, призводить до блокування переходу клітин до реплікації або поділу (арешт клітинного циклу).

Виходячи з висловлених припущень, які узагальнюють отримані нами експериментальні дані, запропонована пуассонівська модель стохастичного розподілу дволанцюгових пошко-

джень (ДП) ДНК в середньому на хромосому у клітинній популяції як ініціюючих подій каскаду реакцій, що лежать в основі індукції ранньої («швидкої») транскрипційної відповіді на опромінення. В межах цієї моделі ефект опромінення визначається часткою клітин, які не містять індукованих опроміненням ДП ДНК ($\exp(-l)$), клітин, що містять у середньому одне ДП ДНК на хромосому ($l \cdot \exp(-l)$), та клітин, які містять два та більше ДП ДНК на хромосому ($1 - \exp(-l) - l \cdot \exp(-l)$):

$$TA = a \cdot \exp(-l) + b \cdot l \cdot \exp(-l) + c \cdot (1 - \exp(-l) - l \cdot \exp(-l)), \quad (1),$$

де TA – транскрипційна активність відповідного гена; l – математичне очікування кількості ДП ДНК на хромосому; a , b , c – коефіцієнти, які залежать від якісних та кількісних особливостей експресії відповідного гена (конститутивна, індукційна, конститутивно-індукційна (стимульована) експресія, характер залежності від дози опромінення) та відображають середній рівень відносної транскрипційної активності гена у клітинах, що містять 0 (a), 1 (b) та більше 1 (c) ДП ДНК на хромосому. Для індукційних генів, наприклад, *AtRAD51*, та генів із конститутивно-індукційною експресією $a \geq 0$, $b \geq a$, $c = 0$. Для генів, активність яких пригнічується у найближчий період після опромінення (*AtRad1*, *AtEfla* за одноразового опромінення), $a \geq 0$, $b \leq a$ ($b = 0$), $c \geq 0$ ($c = a$).

Шляхом математичного аналізу дозової залежності транскрипційної активності (TA) на інтервалі, якому відповідає крива з одним екстремумом або без нього, встановлюють величини коефіцієнтів a , b , c і змінної l . Якщо отримана крива не є гладкою, здійснюють апроксимацію найближчим до емпіричного розподілу точок рівнянням гладкої функції. Надалі можна описати залежність l від дози опромінення.

Значеним вище умовам відповідають дозові залежності транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК *AtRAD51*, *AtRad1* (рис. 1) та гена з конститутивною експресією *AtEfla* після одноразового опромінення (рис. 2). Щодо гена-маркера негомологічного з'єднання кінців *AtKu70* та *AtEfla* за повторюваного опромінення, то за певних доз спостерігаються вкорочені форми їх мРНК [3], а тому механізм регуляції їх активності у відповідь на пошкодження ДНК за певних доз та режимів опромінення може відрізнятися від запропонованої вище простої моделі.

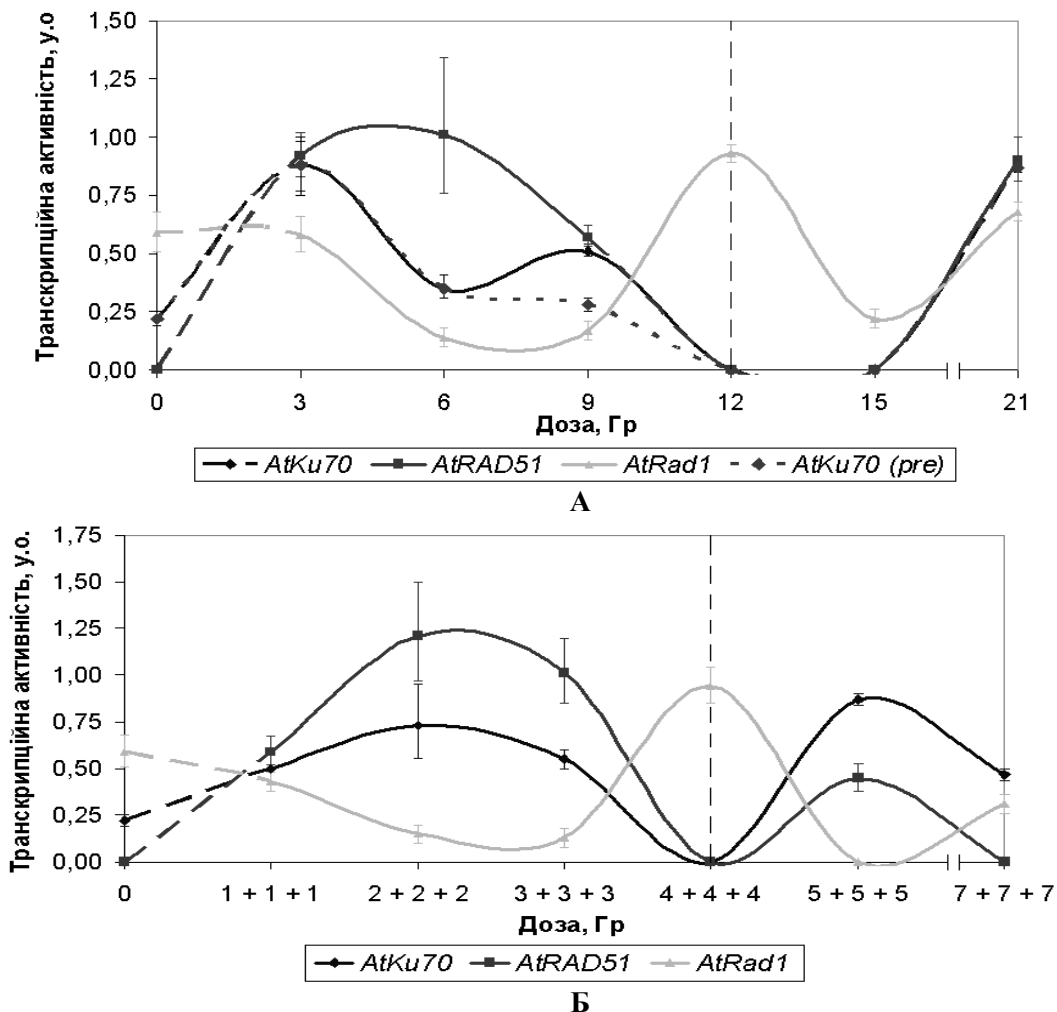


Рис. 1. Залежність транскрипційної активності генів *A. thaliana* *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози рентгенівського опромінення. **А** – одноразове, **Б** – фракціоноване опромінення, інтервал між фракціями 24 години. Вертикальною пунктирною лінією позначено поділ інтервалу тестованих доз на два субінтервали: 6–9 Гр та 12–21 Гр, що відображає наявність двох різних за радіочутливістю субпопуляцій клітин. Пунктиром за 9 Гр зображена відносна концентрація у тканинах листка канонічної форми мРНК *AtKu70*, а безперервна лінія за такої дози відповідає сумі концентрацій канонічної та вкороченої форм.

Наявність двох піків на кривих транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* відображає наявність двох різних, відмінних за радіочутливістю субпопуляцій клітин – активних щодо індукції транскрипційної відповіді за менших доз опромінення та активних за більших доз опромінення (за яких транскрипційна відповідь клітин радіочутливої популяції пригнічена).

Аналіз отриманих залежностей дає підстави стверджувати, що ці дві клітинні субпопуляції відрізняються за радіочутливістю приблизно у 2 рази (рис. 1). Можна припустити, що, оскільки ініціюючою подією є один детектований ДР ДНК на хромосому, то відмінності за

радіочутливістю зумовлені тим, що більш радіочутлива популяція складається з клітин, геном яких містить двоохроматидні хромосоми (4С геном, пізня S, G₂ та М фази клітинного циклу), а менш радіочутлива – з клітин, геном яких містить однохроматидні хромосоми (2С геном, G₀/G₁ та рання S-фази клітинного циклу). Крім того, така модель реакції на пошкодження ДНК передбачає, що хромосоми в інтерфазному хроматині зберігають свою топологічну автономність. Можливо, це і зумовлює ініціацію транскрипційної відповіді в середньому одним ДР ДНК на хромосому, що призводить до різкого зниження її суперспіралізації.

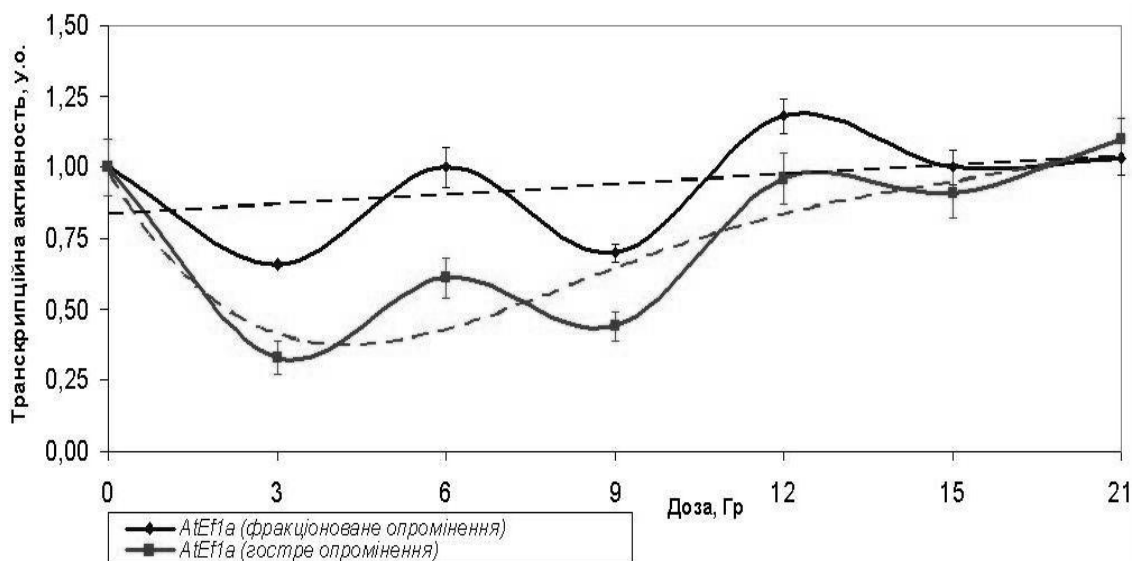


Рис. 2. Залежність транскрипційної активності одного з найважливіших для живих клітин еукаріот гена *AtEfla* з конститутивною експресією від дози рентгенівського опромінення рослин *A. thaliana*.

Висновки

Запропонована модель (1) досить якісно та кількісно описує індукцію транскрипційної відповіді генів субпопуляції активних клітин у випадку відсутності процесів посттранскрипційної модифікації, які призводять до появи вкорочених форм мРНК або мРНК із зміненою послідовністю. Для ініціації максимальної транскрипційної відповіді достатньо одного детектованого системами репарації дволанцюгового пошкодження на хромосому, в той час як відсу-

тність дволанцюгових пошкоджень або поява їх в кількості більше одного на хромосому пригнічує ранню транскрипційну відповідь клітини на іонізуюче опромінення. Постає питання, чи такий механізм є притаманним для покритонасінних, чи універсальним для вищих рослин (або навіть для всіх рослин, еукаріот і прокаріот). Так чи інакше, але Пуассонівська модель ініціуючої події дозволяє передбачити реакцію субпопуляції активних клітин покритонасінних на дію генотоксичних факторів.

References

1. Hrodzynskyy D.M. *Radyobyolohyia rastenyu*. Kyev: Naukova dumka, 1989. 380 p. [in Russian] / Гродзинский Д.М. *Радиобиология растений*. К.: Наукова думка, 1989. 380 с.
2. Litvinov S.V. The main repair pathways of double-strand breaks in the genomic DNA and interactions between them. *Cytology and Genetics*. 2014. Vol. 48, No. 3. P. 64–77. <https://doi.org/10.3103/S0095452714030062>.
3. Litvinov S., Rasydov N. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 2017. Vol. 7 (1). P. 52–60. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2017.01.008>.
4. Yvanov V.Y., Lystsov V.N. *Osnovy mykrodozymetryu*. M.: Atomizdat, 1979. 192 p. P. 105. [in Russian] / Иванов В.И., Лысцов В.Н. *Основы микродозиметрии*. М.: Атомиздат, 1979. 192 с.

LITVINOV S.V., RASHYDOV N.M.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: slitvinov83@gmail.com

QUANTITATIVE DESCRIPTION OF EARLY TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF PLANT CELLS TO RADIATION-INDUCED DNA DAMAGE USING A POISSON INITIATION EVENT MODEL

Aim. One of the problems that have not lost their relevance is the study of the mechanisms of adaptation of higher plants to the effects of radiation associated with the modification of the DNA repair system in response to radiation. This paper presents a Poisson mathematical model of the radiation-induced early transcriptional response of genes of key enzymes, which catalyze recovery of double-stranded DNA breaks in active plant cells. **Methods.** We used total X-ray irradiation of a model object – 35-day-old *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants at sublethal doses of 3–21 Gy, total RNA extraction, reverse transcription with random hexanucleotide primers, PCR amplification of the obtained cDNA with primers to target genes, fluorescence gel densitometry of amplified products. **Results.** A mathematical model of transcriptional response to the genotoxic action of ionizing radiation in a subpopulation of active plant cells

based on Poisson distribution, which satisfactorily describes the experimental data obtained, is proposed. **Conclusions.** To initiate a maximal transcriptional response to DNA damage, one two-strand lesion per chromosome, detected by DNA repair systems, is sufficient, while the absence of double-stranded lesions, or the appearance of more than one double-stranded lesion per chromosome inhibits early transcriptional response of the cell on the action of ionizing radiation. The Poisson model of the initiating event makes it possible to predict the response of subpopulations of active cells of angiosperms to the action of genotoxic factors.

Keywords: ionizing radiation, DNA damage response (DDR), *Arabidopsis thaliana*, DNA repair, gene transcriptional activity.