

Г. В. Шевченко, А. С. Талалаев, Дж. Дунан

## Стойкость проростков *Arabidopsis thaliana* из зоны Чернобыльской АЭС к действию ДНК-повреждающих факторов

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Е. Л. Кордюм)

Показано, что проростки *Arabidopsis thaliana*, выросшие из семян, собранных в 30- и 10-километровой зоне Чернобыльской АЭС, характеризуются повышенной стойкостью к ДНК-повреждающим факторам (тяжелым металлам и радиомиметикам). Впервые установлено, что механизм стойкости ДНК формируется на ранних этапах развития растений и осуществляется за счет активации систем репарации ДНК.

Развитие атомной энергетики и сопутствующие техногенные катастрофы в данной области обуславливают необходимость изучения влияния радиации на живые организмы. Известно, что в результате взрыва атомного реактора Чернобыльской АЭС в почву попали радиоактивные элементы стронций-90 ( $\text{Sr}^{2+}$ ) и цезий-137 ( $\text{Cs}^+$ ) с периодами полураспада 29 и 30 лет соответственно, которые создают определенный уровень радиации и в настоящее время. Однако, несмотря на хроническую радиацию, состояние растительности в зоне ЧАЭС свидетельствует о способности растений адаптироваться к данным условиям. Как известно, радиация воздействует на геном живых организмов, вызывая различные повреждения вплоть до одно- и двучечечных разрывов ДНК. В связи с этим актуальным является изучение состояния ДНК растений после 25-летнего воздействия радиации в природных условиях. Мы определяли стойкость растений к генотоксичным факторам, присутствующим в зоне, а именно к воздействию тяжелых металлов и радиации, влияние которых моделировалось кадмием ( $\text{Cd}^{2+}$ ) и радиомиметиком блеомицином. Также определяли экспрессию маркерных генов, участвующих в репарации ДНК. В качестве объекта исследования использовали растение *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), широко представленное во флоре зоны. Диплоидный геном *A. thaliana* полностью секвенирован, поэтому данное растение является удобной моделью для молекулярных и генетических подходов.

Полученные данные показали, что *A. thaliana* из зоны ЧАЭС переносят генотоксический стресс лучше, чем растения из незагрязненных территорий. Впервые установлено, что повышенная стойкость к воздействию радиомиметика проявляется на ранних этапах развития растений *A. thaliana* и зависит от активации систем репарации ДНК.

**Материал и методы исследования.** В мае–июне 2009–2010 гг. семена растений *A. thaliana* собирали в 10 км (Ч-10 км) зоне отчуждения и 30 км (Ч-30 км) зоне отселения. Среднегодовой уровень  $^{137}\text{Cs}$  в зоне отчуждения в настоящее время составляет около 15–40 Ки/км<sup>2</sup>, в зоне отселения — 1–5 Ки/км<sup>2</sup>, а  $^{90}\text{Sr}$  — 1,08–2,7 и 0,1–0,5 Ки/км<sup>2</sup> соответственно. Семена контрольных растений собирали в районе Киевской области (КО) (среднегодовой уровень  $^{137}\text{Cs}$  — менее 1 Ки/км<sup>2</sup>, а  $^{90}\text{Sr}$  — менее 0,1 Ки/км<sup>2</sup>). В качестве второго контроля использовали дикий тип *Columbia* (Col-0). Исследовали второе поколение растений (не менее пяти растений в каждом эксперименте).

Проращивание семян *A. thaliana* осуществляли в двух вариантах.

*Вариант I.* Семена проращивали на питательной среде Murashige–Skoog (MS) [1] в течение 7 сут до появления первых настоящих листьев. Затем 7-суточные проростки переносили на среду MS с добавлением генотоксинов (CdCl<sub>2</sub> или блеомицина) и выращивали в течение следующих 7 сут. CdCl<sub>2</sub> добавляли в среду MS в концентрациях 25, 50, 75, 100 и 200 мкМ, а блеомицин — в концентрациях 0,25, 0,5, 1 и 2 мкг/мл [2, 3].

*Вариант II.* Растения проращивали непосредственно на среде с генотоксином в течение 14 сут до появления листьев розетки.

Измеряли длину корней 14-суточных проростков. Определяли процент ингибирования роста корней, который рассчитывали по отношению прироста корней на среде с генотоксином к приросту в контроле. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Origin 7.5.

**Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.** Экспрессию маркерных генов репарации ДНК исследовали у 14-суточных проростков, выращенных на среде с блеомицином. Количественный анализ ПЦР в реальном времени [4] проводили с использованием амплификатора Real-Time PCR IQ-Cycler (“BioRad”, Великобритания). Специфические пары праймеров конструировали по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1).

**Результаты исследования.** *Влияние тяжелого металла.* Выращивание растений на среде с Cd<sup>2+</sup> в течение 7 сут (вариант I) и 14 сут (вариант II) обнаружило дозозависимое ингибирование роста корней, которое не зависело от времени внесения в среду кадмия (рис. 1). Установлено, что корни проростков Ч-10 км и Ч-30 км росли быстрее, чем корни контрольных КО и Col-0 (рис. 1).

*Влияние радиомиметика.* Влияние блеомицина, как и тяжелого металла Cd<sup>2+</sup>, также приводило к дозозависимому ингибированию роста корней в обоих вариантах проращивания. При этом действие блеомицина зависело от способа внесения его в среду. Так, в I варианте проращивания, после переноса 7-суточных проростков на среду с блеомицином, и контрольные и исследуемые проростки проявляли приблизительно одинаковую чувствительность к генотоксину. При этом разница между контрольными и экспериментальными растениями не обнаруживалась (рис. 2, а). Во II варианте проращивания (т. е. при непосред-

Таблица 1. Список анализированных генов

Ген	GenBank	Последовательности праймеров
<i>Ku70</i>	AK221642.1	5'-CCCTTTATAGTGCTCTCTGGGTTG-3', 5'-GAGATGCCAAGGTCTTGTGCAT-3'
<i>RAD54</i>	DQ912973.1	5'-GCCTCTGGTACTGAGAATATCG-3', 5'-CCAGCTTCCTAGATCTTCTTCC-3'
<i>PARP</i>	AJ131705.1	5'-GAAGACACTAGTGAGAGCCTTG-3', 5'-GATACCGGTAGAGAGATCAGAC-3'
<i>CYCB1;1</i>	NM_119913.2	5'-CTGTTGAGAGTGAATGGAGG-3', 5'-TAACCGACAAGAACCGATCC-3'
<i>BRCA1</i>	AY081328.1	5'-CATTGATTGGATTAAGGCGTG-3', 5'-GATAAGGTCTTCTCGTATTCC-3'
<i>EF-1_alfa</i>	AY128802.1	5'-TGAGCACGCTCTTCTTGTTCATCA-3', 5'-GGTGGTGGCATCCATCTTGTTCATCA-3'
<i>Actin2</i>	AY096381.1	5'-CCTCAAAGACCAGCTCTTCC-3', 5'-CAAGACTTCTGGGCATCTGA-3'

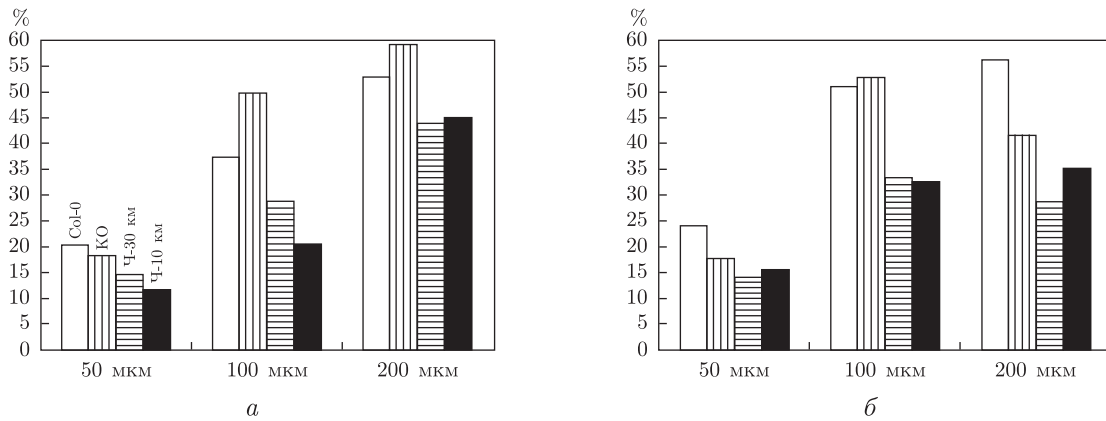


Рис. 1. Ингибирование прироста корней *A. thaliana* на среде с  $\text{CdCl}_2$ ; проращивание: *a* — вариант I; *б* — вариант II

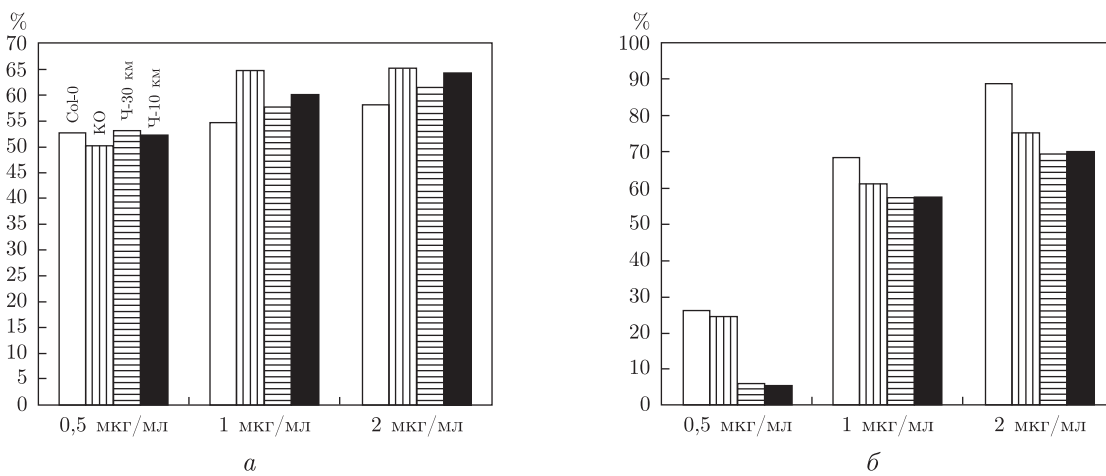


Рис. 2. Ингибирование прироста корней *A. thaliana* на среде с блеомицином; проращивание: *a* — вариант I; *б* — вариант II

ственном воздействии блеомицина на проростки) у проростков Ч-10 км и Ч-30 км отчетливо прослеживалась пониженная чувствительность к генотоксину (см. рис. 2, б).

**Анализ РТ-ПЦР.** Для анализа ПЦР в реальном времени мы выбрали гены, участвующие в наиболее изученных на сегодня путях репарации ДНК: негомологичном соединении концов (NHEJ) — *KU70*; гомологичной рекомбинации (HR) — *RAD54*, *BRCA1* (Breast Cancer Suppressor Protein); репарации путем вырезания (base excision repair pathway) — *PARP* (Poly (ADP-ribose) polymerase). Также изучали экспрессию гена *CycB1;1* (циклин В), который является маркером клеточной пролиферации и ареста клеток в фазе G2/M клеточного цикла [5]. Установлено, что при воздействии блеомицина повышалась экспрессия генов *CycB1;1* и *BRCA1* (рис. 3), а экспрессия генов *RAD54*, *Ku70* и *PARP* существенно не изменялась.

**Обсуждение результатов исследования.** Анализ прироста корней на среде с  $\text{Cd}^{2+}$  и блеомицином свидетельствует о том, что проростки *A. thaliana*, выращенные из семян из 10 км и 30 км зоны ЧАЭС, оказались более стойкими к действию генотоксинов, чем проростки из семян, собранных вне Чернобыля, и семян Col-0.

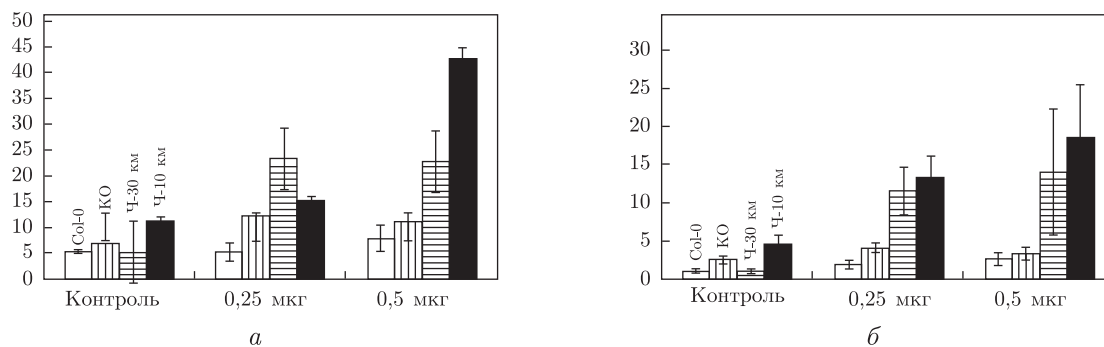


Рис. 3. Экспрессия генов *CysB1;1* (а) и *BRCA1* (б) у 14-суточных проростков *A. thaliana* при воздействии блеомицина

Стойкость к действию генотоксинов у чернобыльских растений обнаруживали и другие исследователи [6]. Так, показано, что семена *A. thaliana*, собранные через 5–6 лет после аварии, давали растения, более стойкие к мутагенам, чем семена, собранные через 3–4 года после аварии. Это указывает на адаптацию в пределах популяции, которая подвергалась продолжительному воздействию хронической ионизирующей радиации [6].

Выращивание растений на среде с  $Cd^{2+}$  и блеомицином в варианте I и II (предусматривающими влияние генотоксинов на ранние (7 сут) и более поздние стадии развития (14 сут)) впервые позволило выявить две противоположные тенденции в чувствительности к разным генотоксинам. Так, низкая чувствительность к кадмию не зависела от стадии развития растения. Напротив, низкая чувствительность к радиомиметику блеомицину обнаруживалась лишь в течение первых 7 сут роста и не проявлялась в случае действия радиомиметика на более поздней стадии развития. Предполагается, что разница в чувствительности к действию тяжелого металла и радиомиметика может быть обусловлена различиями в механизмах их действия. Так,  $Cd^{2+}$  влияет на ДНК растений опосредованно путем активации активных форм кислорода [3], действие которых ингибирует восстановление ДНК. Блеомицин непосредственно воздействует на геном и, как и ионизирующая радиация, вызывает одно- и двуцепочечные разрывы ДНК [7].

Известно, что ранняя стадия развития растений характеризуется пролиферативной активностью меристемы корня и, возможно, что механизм стойкости ДНК сопряжен именно с активностью меристемы. Это предположение подтверждает повышенная экспрессия гена *CysB1;1* у растений *A. thaliana*, свидетельствующая об интенсивной клеточной пролиферации. Обнаружено также, что экспрессия *CysB1;1* повышается и при разрывах ДНК [8]. *CysB1;1* способствует аресту клеток в фазе G2 перед переходом в митоз и, таким образом, блокирует пролиферацию клеток с поврежденной ДНК [5].

О пролиферативной активности меристемы свидетельствует и повышение экспрессии другого маркерного гена, а именно *BRCA1* [9, 10]. Также *BRCA1* необходим для эффективного восстановления двойных разрывов ДНК в процессе, известном как гомологичная рекомбинация (HR) [11, 12]. И. Ковальчук с соавт. [6] отмечали, что частота гомологичной рекомбинации у растений, выращенных из семян 1990–1992 гг. сбора в зоне ЧАЭС, была ниже, чем у растений, полученных из семян 1987–1989 гг. сбора, что является доказательством адаптации растений.

Помимо участия в гомологичной рекомбинации, *BRCA1* способен расщеплять  $\gamma$ -тубулин и влиять на нуклеацию микротрубочек в центрах их организации [13], что способствует рос-

ту и пролиферации клеток меристемы. Возможно, этим также объясняется участие *BRCA1* в цитокинезе [14] и клеточной пролиферации [15].

Таким образом, наши исследования впервые показали, что после 25-летнего воздействия хронической радиации в природных условиях зоны ЧАЭС у проростков *A. thaliana* на ранних этапах развития формируется механизм стойкости генома к действию радиации. Формирование механизма стойкости происходит во время интенсивной пролиферации клеток меристемы и осуществляется за счет активации репаративных процессов ДНК. Данный механизм имеет адаптивное значение и направлен на сохранение целостности генома растений и ограничение потенциально вредных перестроек в условиях хронической радиации.

1. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* – 1962. – **15**, No 3. – P. 473–497.
2. *Menke M., Chen I.-P., Angelis K., Schubert I.* DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins // *Mutat. Res.* – 2001. – **493**. – P. 87–93.
3. *Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Pazmiño D. et al.* Cellular response of Pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium // *Plant Physiol.* – 2009. – **150**. – P. 229–243.
4. *Livak K. J., Schmittgen T. D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$  CT method // *Methods.* – 2001. – **25**. – P. 402–408.
5. *Wu S., Scheible W. R., Schindelasch D., Van Den Daele H. et al.* A conditional mutation in *Arabidopsis thaliana* separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1;1 stability // *Development.* – 2010. – **137**. – P. 953–961.
6. *Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O.* Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone // *Plant Physiol.* – 2004. – **135**, No 1. – P. 357–363.
7. *Markmann-Mulisch U., Wendeler E., Zobell O. et al.* Differential requirements for *Rad51* in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* development and DNA damage repair // *Plant Cell.* – 2007. – **19**. – P. 3080–3089.
8. *Culligan K. M., Robertson C. E., Foreman P. et al.* ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation // *Plant J.* – 2006. – **48**. – P. 947–961.
9. *Lomonosov M., Anand S., Sangrithi M. et al.* Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein // *Genes Dev.* – 2003. – **17**. – P. 3017–3022.
10. *Bartek J., Lukas C., Lukas J.* Checking on DNA damage in S phase // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – **5**. – P. 792–804.
11. *Hughes-Davies L., Huntsman D., Ruas M. et al.* EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer // *Cell.* – 2003. – **115**. – P. 523–535.
12. *Boulton S. J.* Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34**. – P. 633–645.
13. *Binarova P., Cenklova V., Prochazkova J. et al.* Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2006. – **18**. – P. 1199–1212.
14. *Nakanishi A., Han X., Saito H. et al.* Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **355**. – P. 34–40.
15. *Tian X. X., Rai D., Li J. et al.* BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1 // *Cancer Res.* – 2005. – **65**. – P. 4747–4753.

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного  
НАН Украины, Киев  
Институт биологических, экологических  
и сельскохозяйственных наук  
Университета г. Абериствиз, Великобритания

Поступило в редакцию 22.03.2012

Г. В. Шевченко, А. С. Талалаєв, Дж. Дунан

**Стійкість проростків *Arabidopsis thaliana* із зони Чорнобильської АЕС до дії ДНК-руйнуючих факторів**

*Показано, що проростки *Arabidopsis thaliana*, які виростили з насіння, зібраного у 30- та 10-кілометровій зоні Чорнобильської АЕС, характеризуються підвищеною стійкістю до ДНК-руйнуючих факторів (важких металів та радіоміметиків). Вперше визначено, що механізм стійкості ДНК формується на ранніх етапах розвитку рослин за рахунок активації систем репарації ДНК.*

G. V. Shevchenko, A. S. Talaliev, J. Doonan

***Arabidopsis thaliana* seedlings from the Chernobyl NPP zone are tolerant to DNA-damaging agents**

*Arabidopsis thaliana seedlings which were germinated from seeds gathered in the 30-km and 10-km Chernobyl NPP zones are tolerant to DNA damaging agents (heavy metals and radiomimetics). For the first time, it is shown that the mechanism of DNA tolerance is established at the first stages of plant development and is facilitated by the activation of DNA repair systems.*