

Національна академія наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Літвінов Сергій В'ячеславович

УДК 577.39 [58.084.1]:577.391:577.346:577.21:575.175:575.224.22

**ЗВ'ЯЗОК ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ КЛЮЧОВИХ ГЕНІВ
РЕПАРАЦІЇ ДНК З ПОСТРАДІАЦІЙНИМ ВІДНОВЛЕННЯМ РОСЛИН**

03.00.01 – радіобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Рашидов Намік Мамед огли,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії,
завідувач лабораторії біофізики сигнальних систем

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, академік НААН
України
Гудков Ігор Миколайович,
Національний університет біоресурсів і
природокористування України,
завідувач кафедри радіобіології та радіоекології;

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Рябченко Наталія Миколаївна,
Інститут ядерних досліджень НАН України,
старший науковий співробітник відділу радіобіології та
радіоекології.

Захист відбудеться 5 грудня 2019 р. о 15.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148.

Автореферат розіслано «_____» листопада 2019 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради К 26.202.01,
кандидат біологічних наук, н. с.

К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ефективність механізмів репарації розривів ДНК, зокрема потенційно летальних дволанцюгових розривів, пов'язують з пристосуванням представників царства *Plantae* до дегідратації примордіальних клітин на ранніх стадіях онтогенезу (Vonarx, 2000; Tuteja et al., 2001). Закріплені в субстраті рослини в порівнянні з рухомими тваринами більш вразливі до дії генотоксичних факторів, серед яких ультрафіолетова компонента сонячного світла, підвищена та знижена відносно фізіологічного оптимуму температура навколишнього середовища, аніони хлору і катіони важких металів, сполуки, які є джерелом АФК, зокрема хлорофіл (Waterworth, 2011; Yoshiyama, 2013). Не менше значення має й характер розмноження наземних рослин, життєвий цикл яких починається із зародку або зачатку, що проходять через період спокою, часто в умовах дегідратації. Дегідратація є одним із найсильніших генотоксичних чинників, які діють на клітини рослин в природних умовах (Tuteja et al., 2001).

Однак їх чутливість рослин до сублетальних доз іонізуючого опромінення, особливо повторюваного, пролонгованого або хронічного, не так сильно відрізняється від радіочутливості тваринних організмів (Гродзинський та ін., 2008, UNSCEAR, 2012; Boubriak et al., 2016; Danchenko et al., 2016; Kurimoto et al., 2010). Причина таких подібностей і відмінностей в біологічній дії радіації на рослинні та тваринні об'єкти залишається нез'ясованою, але, ймовірно, пов'язана з ефективністю репарації ДНК при різних дозах та режимах опромінення (Boubriak et al., 2008; Sidler, 2015; Singh et al., 2010; Yokota, 2005).

Важливо і те, що індукція комплексних пошкоджень геному під впливом іонізуючого випромінювання дозволяє використовувати радіацію як тестовий стрес-фактор стійкості організму до генотоксичних впливів середовища.

Метаболізм будь-якої еукаріотичної клітини також є потужним джерелом вільних радикалів, що генеруються у мітохондріях, а у рослин ще й у фотосинтетичному апараті хлоропластів. Тому вивчення роботи ключових для підтримки цілісності геному репаративних шляхів рослин в умовах дії іонізуючого випромінювання становить інтерес не тільки для радіобіології, але і для фізіології рослин, а також для біологічної науки в цілому.

Однією з проблем, що не втратили свою актуальність, залишається вивчення механізмів адаптації вищих рослин до дії радіації, пов'язаних з модифікацією роботи системи репарації ДНК у відповідь на одноразове та повторюване опромінення. В цьому контексті має значення встановлення зв'язку між активним характером змін експресії генів, які забезпечують репарацію ДНК, та пострадіаційним відновленням рослин на організменому рівні, особливо на критичних етапах онтогенезу.

Вирішення окреслених наукових проблем можливе за допомогою експериментального одноразового та повторюваного опромінення модельної

рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. рідкоіонізуючою радіацією у сублетальних дозах, вивчення транскрипційної відповіді ключових генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2* на дію радіації, з'ясування характеру зв'язку цієї відповіді з пострадіаційним відновленням життєдіяльності рослин *A. thaliana*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалась з 2011 по 2018 роки у відділі біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України під керівництвом д.б.н. Рашидова Н.М. в межах бюджетних тем: «Епігеномна складова адаптації у рослин» (№ 0108U000875, 2008-2012); III-4-13 «Роль епігеномних механізмів в адаптогенезі рослин» (2012-2016); II-3-12 «Розробка способів скерованого впливу на сигнальні системи і епігенетичну пластичність культурних рослин для підвищення їх продуктивності та стійкості» (2012-2016); European Commission FP-7-PEOPLE IRSES GA-2013-612587 «Plant DNA tolerance».

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження – виявити зв'язок ранньої транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2* на дію сублетальних доз рідкоіонізуючої радіації з ефективністю пострадіаційного відновлення опромінених рослин на рівні цілісного організму.

Відповідно до поставленої мети були сформульовані наступні завдання:

1. Дослідити середньо- та довгострокові ефекти впливу сублетальних доз рідкоіонізуючого опромінення на ріст та розвиток модельної рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.
2. Визначити дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на дію рідкоіонізуючої радіації в сублетальних дозах та пояснити їх особливості.
3. Виявити кореляції фенотипу та морфометричних характеристик рослин у пострадіаційний період з ранньою транскрипційною відповіддю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на одноразове та повторюване опромінення у сублетальних дозах.
4. З'ясувати роль гена *Atmsh2* у модифікації індукованої опроміненням ранньої транскрипційної відповіді генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та у пострадіаційному відновленні рослин.
5. Дослідити вплив індукованих опроміненням змін активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* на життєздатність і варіативність морфометричних ознак нащадків опромінених рослин.
6. Перевірити гіпотезу про трансгенераційне збереження радіаційно модифікованої експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Об'єкт дослідження – пострадіаційне відновлення рослин на організменому рівні та рання транскрипційна відповідь на дію іонізуючої радіації основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2*.

Предмет дослідження – зв'язок ранньої транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMSH2* на дію іонізуючої радіації у сублетальних дозах та ефективності пострадіаційного відновлення рослин.

Методи дослідження – біометричні, радіометричні, молекулярно-біологічні, біофізичні, стандартні методи статистичної обробки та аналізу даних.

Наукова новизна одержаних результатів. З'ясовано, що як стимуляція, так і пригнічення формування, росту та розвитку рослин під впливом радіації в діапазоні сублетальних доз частково зумовлені активацією або репресією транскрипційної активності локусів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*.

Встановлено, що радіобіологічні ефекти малих доз хронічного іонізуючого опромінення частково пов'язані з радіаційною модифікацією активності системи підтримки цілісності геному. Інгібуюча дія хронічного опромінення корелює з підвищенням експресії гена *AtRad1*, а стимулююча – з активацією генів *AtKu70* та *AtRAD51*.

Доведено, що опромінення у сублетальних дозах може не тільки стимулювати, але і пригнічувати транскрипцію генів репарації ДНК, а також призводити до появи нетипових форм мРНК.

Встановлено характер експресії ключових генів репарації ДНК рослин *Arabidopsis thaliana* у листі прикореневої розетки на межі вегетативної та генеративної фаз розвитку: експресія гена *AtRAD51* є радіаційно-індуцибельною, а гени *AtKu70* і *AtRad1* експресуються як конститутивно, так і радіаційно-індуцибельно.

Вперше отримана нелінійна двохпікова дозова залежність транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у тканинах розеткових листків арабідопсису в інтервалі 3-21 Гр рентгенівського опромінення.

Вперше показано, що фракціоноване опромінення менш ефективно індукує експресію генів репарації ДНК арабідопсису *AtKu70* та *AtRAD51* у порівнянні з одноразовим опроміненням при малій сублетальних дозі 3 Гр, а при дозах інтервалу 6 Гр – 21 Гр ефективність повторюваного опромінення щодо індукції досліджуваних генів репарації ДНК є співставною або вищою, ніж при одноразовому опроміненні у тій самій дозі. За умов режиму фракціонованого опромінення виявлена статистично достовірною кореляція між активністю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричними показниками у пострадіаційний період, ніж при одноразовому опроміненні.

Отримано дані на користь існування двох відмінних за радіочутливістю субпопуляцій рослинних клітин, які відіграють різну роль у пострадіаційному відновленні або радіаційній стимуляції, що зумовлює характерну двохпікову залежність «доза-ефект» в інтервалі сублетальних доз.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *Rad1* як маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в тканинах рослин, а зниженого

рівня експресії гена *Efla* – в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Введено додатковий індекс, який відображає радіаційну індукцію DDR-відповіді I_{DDR} .

Вперше встановлено, що змінене опромінення у сублетальних дозах активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* може зберігатись у нащадків першого покоління, а модифікована активність гена *AtKu70* не успадковується. Наслідування зміненої активності генів репарації позначається на кількості дочірніх рослин, що мають аномалії будови та розвитку.

Вперше показано, що мутанти *Atmsh2*^{-/-} є більш чутливими у порівнянні з рослинами генотипу *Atmsh2*^{+/+} до дії одноразового та повторюваного іонізуючого опромінення у сублетальних дозах 3 Гр – 21 Гр, а на ранніх стадіях розвитку проростків – до хронічного низькодозового опромінення. Продемонстрована самостійна роль продукту гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, а також його епістатична взаємодія з продуктами генів *AtRad1* і *AtRAD51*.

Практичне значення отриманих результатів. Експериментальні дані показали, що підбираючи режим та дозу іонізуючого опромінення можливо модулювати транскрипцію генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* з метою зміни їх експресії. Спрямована зміна патернів експресії генів підтримки цілісності геному дасть можливість модифікувати такі господарсько значущі характеристики рослин як рівень мутабільності та компетентність до генетичних маніпуляцій, зокрема, до трансгенної трансформації.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *AtRad1* як маркера радіаційно індукованого арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *AtEfla* – в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин.

Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при викладанні курсу радіобіології у вищих навчальних закладах.

Особистий внесок здобувача. Здобувач здійснив самостійний аналіз літератури за темою дисертаційної роботи, оволодів необхідними методами планування та проведення експериментів, аналізу й обробки даних, підготовки до друку наукових робіт. Вибір об'єкту і напрямку досліджень проведено спільно з науковим керівником – д.б.н. Н. М. Рашидовим. Результати дисертаційної роботи отримані автором самостійно або спільно зі співробітниками ІКБГІ НАН України, які є співавторами публікацій. Особистий внесок дисертанта становить понад 75%.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційного дослідження були представлені та обговорені на Міжнародній конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології" (Умань, Україна, 2014 р.), VII З'їзді по радіаційним дослідженням (радіобіологія, радіоекологія, радіаційна безпека) (Москва, РФ, 2014 р.), Міжнародній конференції молодих учених «Today's challenges in molecular and cell biology» (CYS-2015) (Київ,

Україна, 2015 р.), VI з'їзді Радіобіологічного товариства України (Київ, Україна, 2015 р.), на засіданні Київського відділення Біофізичного товариства України (Київ, Україна, 2016 р.), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм» (Долина, Україна, 2016 р.), XXIII-XXVI щорічних наукових конференціях Інституту ядерних досліджень НАН України (Київ, Україна, 2016-2019 рр.), X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2016 р.), Міжнародній конференції молодих учених "Актуальні проблеми ботаніки та екології" (Херсон, Україна, 2016 р.), Науково-практичній конференції із міжнародною участю "Радіоекологія-2017" (Київ, Україна, 2017 р.), Третій конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, Україна, 2017 р.), Науково-практичному семінарі з міжнародною участю "Stress factors and secondary metabolites" (Київ, Україна, 2017 р.), Міжнародному симпозиумі по Євро-Азіатському біорізноманіттю SEAB 2018, (Київ, Україна, 2018 р.), на звітних і наукових семінарах відділу біофізики та радіобіології ІКБГІ НАН України.

Публікації. Результати проведених досліджень викладені у 25 наукових публікаціях, з них 7 статей у фахових журналах (2 в іноземних журналах), розділ колективної монографії, 17 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських конференцій.

Структура і обсяг роботи. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, трьох розділів з описом результатів експериментальних досліджень, узагальнення, висновків, списку використаної літератури (202 найменувань), з яких 168 англomовних. Дисертація викладена на 199 сторінках друкованого тексту (основного тексту 148 сторінок) й містить 32 рисунки і 16 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МОЛЕКУЛЯРНОГО ТА ОРГАНІЗМЕНОГО РІВНІВ ФОРМУВАННЯ ВІДПОВІДІ РОСЛИН НА ОПРОМІНЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Згідно з наявними в сучасній радіобіології даними значна частина ефектів радіації організменого рівня в інтервалі сублетальних доз може бути зумовлена активацією індубельної системи репарації ДНК. Репарація потенційно летальних радіаційно індубованих пошкоджень – дволанцюгових розривів ДНК, підтримує проліферацію меристематичних клітин, що забезпечує нормальний онтогенез, формування властивого певному виду та еко типу рослин фенотипу, репуляційне відновлення твірних тканин. Реалізація змін у транскрипції ключових генів-маркерів і кофакторів відновлення ДР ДНК на рівні змін морфометричних параметрів рослин відображає відомий у класичній радіобіології принцип посилювача. На основі порівняльного аналізу сучасних

даних щодо індукційної репарації в клітинах еукаріот були виділені наступні ключові гени ферментів репарації ДР ДНК модельної рослини *A. thaliana*: *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, а також *Atmsh2* в якості кофактора – модифікатора ефективності відновлення.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Характеристика об'єктів дослідження. Об'єктом дослідження була модельна покритонасінна рослина різущка Таля (гусимка звичайна) або *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – вид роду різущки (*Arabidopsis*) родини капустяні (*Brassicaceae*). У дослідках використовували насіння *Arabidopsis thaliana* стандартного лабораторного еко типу *Columbia-0* двох ліній: дикого типу *wt* та *SALK_002708* – гомозиготного інсерційно-делеційного мутанта за геном *Atmsh2*.

Опис та основні методичні принципи дослідження. Дослідження проводили в три етапи:

- 1) хронічно опромінювали насіння та проростки. Опромінення проводили у радіальному радіаційному полі скляної пробірки з хлоридом радіоактивного ізотопу ^{137}Cs . За неопромінений контроль приймали рослини, закриті від джерела випромінювання екраном із свинцевих блоків, причому потужність дози за екраном значуще не відрізнялася від фонові. Сумарні дози склали 30 сГр, потужність дози 0,45 мГр/год (опромінення насіння рослин дикого типу); 3 сГр, потужність дози 0,18 мГр/год (опромінення проростків дикого типу від проростання до 7-ої доби вегетації); 20 сГр, потужність дози 0,24 мГр/год (опромінення проростків дикого типу та проростків мутанту *Atmsh2 SALK_002708* від проростання неопроміненого насіння до 35-ої доби вегетації).
- 2) 35-денні рослини обох ліній піддавали гострому одноразовому та повторюваному опроміненню (3 рівні фракції з інтервалом у 24 години) в інтервалі доз 3 Гр – 21 Гр.
- 3) Вивчали ефекти, які проявляються у неопромінених нащадків першого покоління опромінених рослин.

Вибірка та повторюваність дослідів. У лабораторних умовах культивували 100 рослин кожного з варіантів. Повторність дослідів трикратна. Морфометричні параметри вимірювали для всіх рослин варіанту. Для проведення інфрачервоної Фур'є-спектроскопії та гель-денситометричної оцінки відносної транскрипційної активності генів використовували 2-3 різних за розміром листка з прикореневої розетки 25 рослин, відібраних випадковим чином.

Визначення відносної транскрипційної активності цільових генів. Для виявлення відмінностей у транскрипційній активності генів використали полімеразну ланцюгову реакцію на матриці продуктів зворотної транскрипції сумарної РНК (ЗТ-ПЛР), виділеної із свіжого листя рослин. Екстракцію здійснювали через 2 години після опромінення. Сумарну РНК виділяли з 2-3-х розеткових листків 25 випадково відібраних рослин варіанту, загальна маса

наважки 500 мг. Листя заморожували рідким азотом та ретельно розтирали у фарфорових ступках, з отриманої маси екстрагували РНК за допомогою набору RIBO-Sorb (AmpliSens, РФ). Зворотна транскрипція сумарної РНК для отримання кДНК проводилась з використанням набору REVERTA-L (AmpliSens, РФ), який містить зворотну транскриптазу M-MLV і випадкові нуклеотидні гексамери в якості праймерів. Всі маніпуляції здійснювали відповідно до протоколу виробника. ПЛР на матриці кДНК, отриманої шляхом зворотної транскрипції сумарної РНК, проводили на ампліфікаторі GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США). Об'єм суміші для кожної реакції 20 мкл, включаючи: 5 мкл кДНК матриці, 9,8 мкл ddH₂O, 2 мкл 10 мМ суміші dNTP (Thermo Fisher Scientific, США), 0,2 мкл Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мкл буферу для ДНК Taq полімерази, 0,5 мкл кожного з двох праймерів, прямого і зворотного, в робочій концентрації 10 мкг/л.

Умови ПЛР були наступними: 1. нагрівання до 95 °С протягом 4 хв; 2. 35 циклів нагрівання до 95 °С протягом 45 с, 63 °С протягом 45 с, 72 °С протягом 60 с; 3. фінальна елонгація одноланцюжкових фрагментів протягом 10 хв при температурі 72 °С.

Цільові кДНК до пре-мРНК відповідних генів ампліфікували за допомогою олігонуклеотидних праймерів з послідовностями, які наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності прямого (Fw) та зворотного (Rev) праймерів, використаних для ампліфікації кДНК цільових генів та референсного гена *AtEF1α*

Ген <i>Arabidopsis thaliana</i>	Fw праймер	Rev праймер	Довжина продукту ампліфікації, н.п.
<i>AtKu70</i> (<i>At1g16970</i>)	5'-TCCGTCCGGCTATTCCTGGC-3'	5'-TGCGTCACCGGCTTTTCGCT-3'	2277
<i>AtRAD51</i> (<i>At5g20850</i>)	5'-ACCCAGCACGGACSTTTCCC-3'	5'-ATCGAGCTTCCGCTTCTGGC-3'	2002
<i>AtRad1</i> (<i>At5g41150</i>)	5'-AAGCCAATGCTGTTCGCCCC-3'	5'-TCTTCCGCCTGCTTTTCGGG-3'	660
<i>AtEF1α</i> (<i>At1g07940</i>)	5'-AGCCCSTTCGTCTCCCACTT-3'	5'-GCCAAGTACSTCCGCCACST-3'	826

Для виключення хибно позитивних результатів через контамінацію геномною ДНК ставили наступні негативні контролю: 1. ПЛР з продуктами зворотної транскрипції без додавання до реакційної суміші зворотної транскриптази M-MLV; 2. ПЛР з ddH₂O замість кДНК матриці.

Відмінності у відносному рівні транскрипції генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* визначали за допомогою кількісної денситометрії за цифровим зображенням флуоресценції продуктів ген-специфічної ампліфікації кДНК після електрофорезу в 1% агарозному гелі з вмістом 0,005% EtBr. Рівень транскрипційної активності визначали відносно референсного гена з конститутивною експресією гена *AtEF1 α* .

Інфрачервона Фур'є-спектроскопія. Спектри поглинання середньої інфрачервоної області (400-4000 см⁻¹) були отримані з використанням спектрометра Nicolet FTIR IS50 (Thermo Fisher Scientific, США) лабораторії епігенетики Державної установи «Інститут геронтології ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України». Всі спектри вимірювали з роздільною здатністю 4 см⁻¹. шляхом усереднення 32 сканувань одного і того самого поля з фільтрацією по фоновому спектру.

Статистичний аналіз даних. Для обробки й аналізу даних використовували стандартні методи математичної статистики та біометрії, а також програмні засоби пакетів Microsoft Excel 2003 (Microsoft, США) і SPSS 17.0 (IBM, США). Морфометричні показники та FTIR-оцінки біохімічних параметрів, подані в тексті роботи, є результатом усереднення трьох повторностей дослідів. Як міру точності оцінок використовували стандартну похибку та стандартне відхилення. Дані повторних оцінок транскрипційної активності логарифмували, усереднювали натуральні логарифми вимірів, а потім здійснювали обернене експоненційне перетворення результату, що дозволило зменшити дисперсію математичного очікування оцінки середнього.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

РОЗДІЛ 3. РАННЯ ТРАНСКРИПЦІЙНА ВІДПОВІДЬ ГЕНІВ *ATKu70*, *ATRAD51*, *ATRADI* НА ДІЮ РІДКОІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У СУБЛЕТАЛЬНИХ ДОЗАХ

Вивчення транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* показало відсутність статистично достовірних відмінностей між рослинами дикого типу та мутанту *Atmsh2 SALK_002708*. На основі отриманих даних можна зробити висновок, що гени *AtRad1* та *AtKu70* у тканинах листа арабідопсису напередодні переходу рослин до цвітіння експресуються конститутивно та індукційно, а ген *AtRAD51* – тільки індукційно (рис. 1).

Як одноразове, так і повторюване опромінення викликало підвищення транскрипційної активності генів *AtKu70* і *AtRAD51* при дозах 3 Гр, 6 Гр, 9 Гр, 21 Гр. Дози 3 Гр та 21 Гр обумовлювали максимальний ефект активації сумарної транскрипції генів *AtKu70* та *AtRAD51* при одноразовому опроміненні, а дози 6 Гр та 15 Гр – при повторюваному опроміненні. При фракціонованому опроміненні у дозі 12 Гр, а також одноразово у дозі 15 Гр спостерігалась транскрипційна репресія гена, що кодує фактор негомологічного з'єднання кінців дволанцюгових розривів ДНК *AtKu70*. Це поєднувалось з активацією

експресії гена *AtRad1*. Таким чином, іонізуюче опромінення у сублетальних дозах здатне як активувати, так і пригнічувати експресію ключових генів репарації структурних пошкоджень ДНК рослин.

Отримані нелінійні залежності транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення з критичною точкою 12 Гр (рис. 1) можна пояснити тим, що в нормі активною є радіочутлива субпопуляція, в якій при сублетальних дозах опромінення 3-9 Гр активується індукцибельна репарація ДНК. Дози вище 12 Гр інактивують клітини радіочутливої популяції та активують клітини радіорезистентної популяції, у яких при дозах 15 Гр та 21 Гр відбувається індукція генів репарації ДНК.

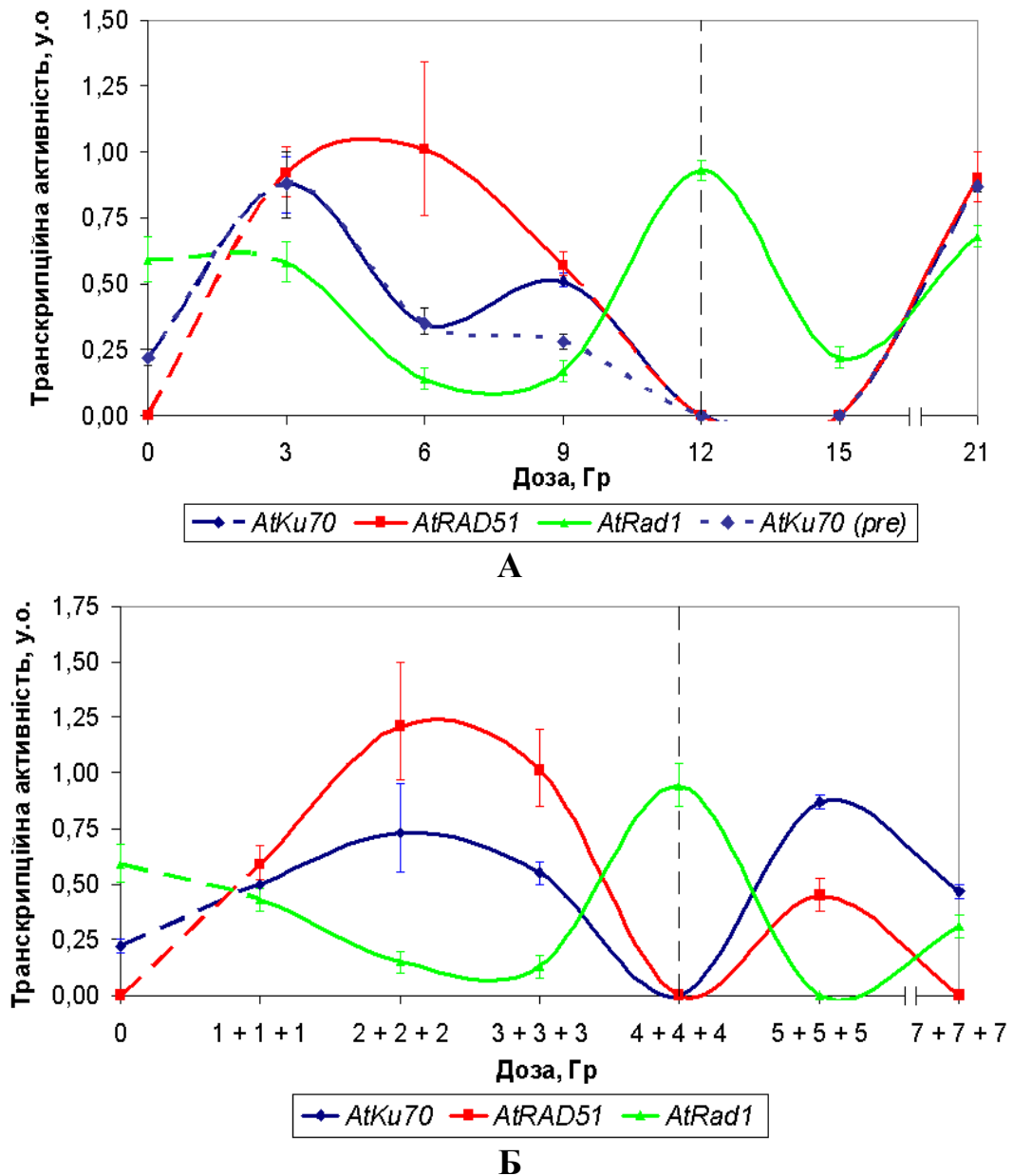


Рис. 1. Залежність рівня транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* від дози опромінення. А – одноразове, Б – повторюване (фракціоноване) опромінення. Пунктиром позначено поділ інтервалу тестованих доз на два субінтервали: 6-9 Гр та 12-21 Гр, що відображає зміну характеру дозової залежності.

Аналіз змін транскрипційної активності гена *AtEF1α* засвідчує, що зменшення активності конститутивної транскрипції відбувалося при дозах 3-9 Гр, які стимулюють активацію індукбельної репарації. Даний ефект виражений при одноразовому опроміненні, але не при повторюваному, що свідчить про його короткостроковість. Отримані дані відображають DDR-відповідь клітин на індуковані радіацією пошкодження ДНК в інтервалі сублетальних доз опромінення. При повторюваній дії радіації координація репресії конститутивної транскрипції та активації індукбельної репарації порушується.

У листках хронічно опромінених рослин дикого типу та мутанту *Atmsh2* *SALK_002708* підвищувалась активність генів *AtRAD51* і *AtRad1*, але транскрипційна активність *AtKu70* не змінювалась (рис. 2, рис. 3).

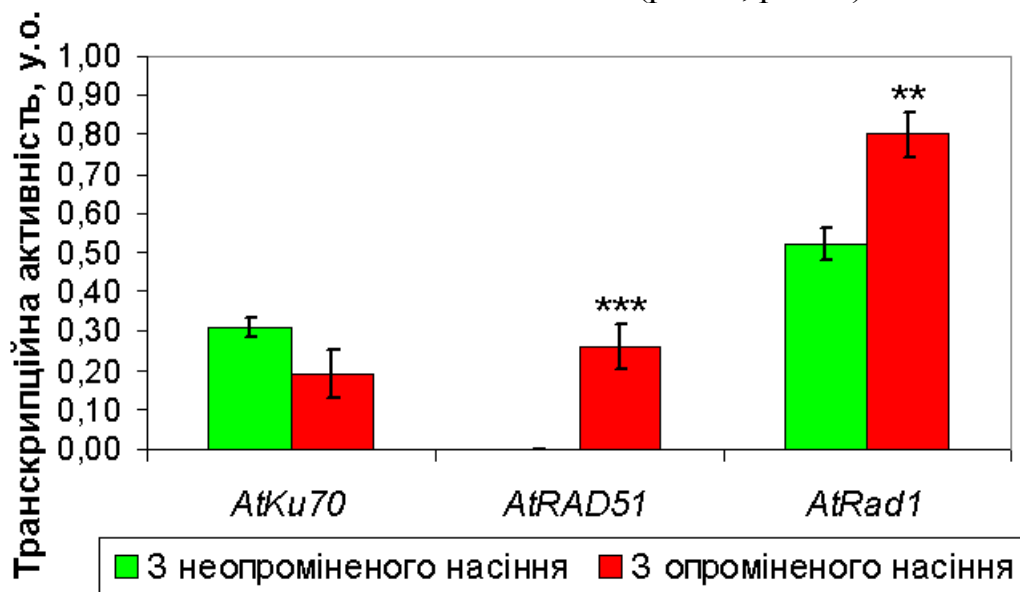


Рис. 2. Транскрипційна активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у розеткових листках 35-добових рослин *A.thaliana* з хронічно опроміненого насіння. Статистична достовірність відмінностей між варіантами опромінених та неопромінених рослин: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Встановлено, що патерни експресії генів *AtRAD51* та *AtRad1* можуть успадковуватись трансгенераційно, а патерни експресії гена *AtKu70* – ні (рис. 4). У листках рослин неопроміненого покоління F_1 рівень експресії *AtRAD51* і *AtRad1*, як правило, був вище у порівнянні з опроміненим поколінням F_0 . Знижена активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* не наслідувалася.

Аналіз дозових залежностей демонструє наявність достовірної кореляції між експресією генів *AtRAD51* та *AtKu70* при одноразовому і повторюваному опроміненні (таблицю 2), що свідчить про SOG1-залежну індукбельну активацію як *AtRAD51*, так і *AtKu70* як складову DDR-відповіді. Зменшення парного коефіцієнту кореляції експресії *AtRAD51* та *AtKu70* при фракціонуванні дози дозволяє припустити зниження ефективності SOG1-залежного сигнального каскаду при повторюваному опроміненні, можливо, в результаті

сильнішого пошкодження клітин. Щодо *AtRad1*, то незначущі часткові коефіцієнти кореляції з транскрипцією *AtRAD51* показують, що регуляція його експресії здійснюється за АТМ-незалежним механізмом. Експресія даного гена, імовірно, є АТМ-залежною.

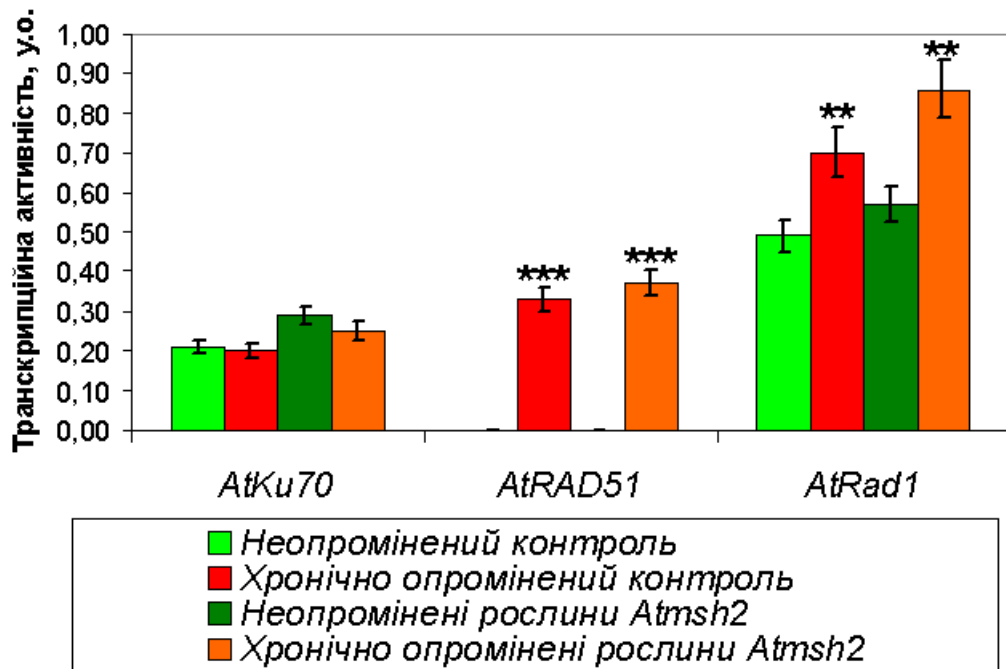


Рис. 3. Транскрипційна активність генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у розеткових листках 35-добових рослин *A.thaliana* ліній дикого типу та мутанта *Atmsh2* SALK_002708, хронічно опромінюваних від початку проростання до 35-ї доби вегетації. Статистична достовірність відмінностей між варіантами опроміненних та неопроміненних рослин: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Таблиця 2

Коефіцієнти парної кореляції Пірсона між рівнями транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtEF1 α* при опроміненні у дозах 3-21 Гр

Одноразове опромінення / повторюване опромінення	<i>AtKu70</i>	<i>AtRAD51</i>	<i>AtRad1</i>	<i>AtEF1α</i>
<i>AtKu70</i>		0,82**/0,64*	0,04/-0,96***	-0,39/-0,35
<i>AtRAD51</i>	0,82**/0,64*		-0,26/-0,64*	-0,51/-0,53
<i>AtRad1</i>	0,04/-0,96***	-0,26/-0,64*		0,46/0,41
<i>AtEF1α</i>	-0,39/-0,35	-0,51/-0,53	0,46/0,41	

Статистична достовірність відмінності від 0: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Примітка. Ліворуч від знаку «/» подано коефіцієнти парної кореляції при одноразовому, праворуч – при повторюваному опроміненні.

Коваріація транскрипційної активності досліджуваних генів за умов гострого та фракціонованого опромінення дає підстави припустити існування механізму негативної корегуляції експресії генів *AtRad1* і *AtKu70*.

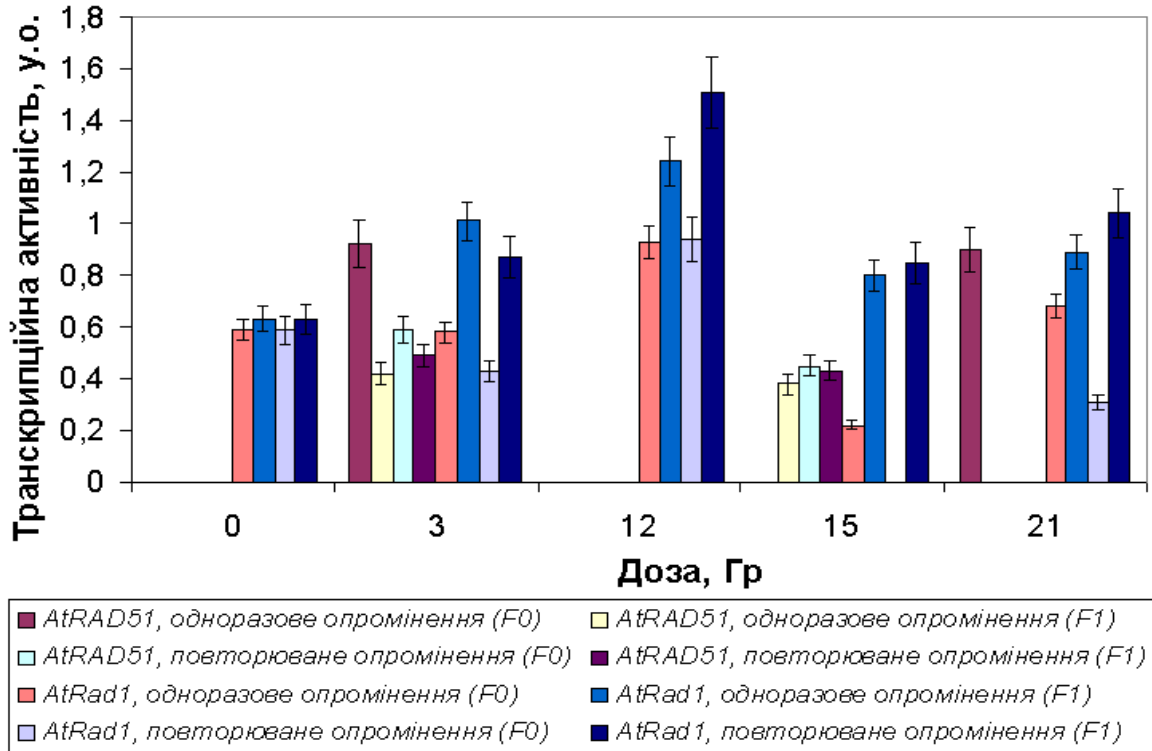


Рис. 4. Транскрипційна активність генів *AtRAD51* та *AtRad1* у поколінні F_0 (опромінені рослини) та F_1 (неопромінені рослини з насіння рослин, опромінених у відповідній дозі)

РОЗДІЛ 4. ДІЯ ХРОНІЧНОГО НИЗЬКОДОЗОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА НАСІННЯ ТА ПРОРОСТКИ РОСЛИН *A. THALIANA*

Проведені експерименти показали значущий вплив малих доз хронічного γ/β - опромінення насіння і проростків *A.thaliana* на ріст та розвиток рослин. Серед основних виявлених ефектів можна назвати – у опромінених проростках: скорочення тривалості вегетації на 2-3 тижні, скорочення термінів початку цвітіння на 1-2 тижні, появу рослин з морфологічними аномаліями та збільшення частки стерильних рослин з редукованим фенотипом.

Стимулюючий ефект опромінення насіння реалізується не відразу, як при хронічному опроміненні проростків, а на етапі ініціації верхівкового росту пагона і до настання генеративної фази. Висока варіація вегетативних та генеративних морфометричних показників, підвищення частоти морфометричних аномалій у дослідному варіанті свідчать про високу індивідуальну мінливість рослин по стійкості до низькодозового хронічного опромінення.

Результати дослідів свідчать про високу чутливість ембріональних ініціалів, апікальної меристеми осьових органів та генеративної меристеми до хронічного рідкоіонізуючого опромінення.

**РОЗДІЛ 5. ЗВ'ЯЗОК МОРФОМЕТРИЧНИХ ПАРАМЕТРІВ
ОПРОМІНЕНИХ РОСЛИН АРАБІДОПСИСУ З РАННІМИ РАДІАЦІЙНО
ІНДУКОВАНИМИ ЗМІНАМИ ТРАНСКРИПЦІЇ ГЕНІВ РЕПАРАЦІЇ ДНК
*ATKu70, ATRAD51, ATRAD1***

Встановлено, що дія сублетальних доз опромінення рослин виявляє залежність від як від дози – при збільшенні дози знижується стимуляція та зростає пригнічення меристем, так і режиму опромінення – повторюване опромінення меншою мірою стимулює та більшою мірою пригнічує активність меристем. Ефекти сублетальних доз радіації зумовлені неоднорідністю різних клітинних популяцій у меристемах, а також гетерогенністю меристем рослинного організму та окремих рослин всередині однієї лінії за радіостійкістю. Найбільшою радіочутливістю відрізняються інтеркалярна меристема міжвузлів та високоактивна у період переходу до цвітіння генеративна меристема. Відносно нижча радіочутливість властива апікальній меристемі. Найбільш радіостійкою на стадії переходу до фази генеративного розвитку є латеральна меристема судинних пучків листя, від стану якої залежить довгострокове збереження життєздатності листка.

На межі інтервалу сублетальних доз опромінення (21 Гр) спостерігались значні зміни кількісного вмісту полісахаридів (зростання вмісту), лігнінів, нуклеїнових кислот і протеїнів (зменшення вмісту), а також конформації макромолекул у розетковому листі. Виявлені віддалені біохімічні зміни можуть бути зумовлені індукцією біохімічної відповіді рослинних клітин на стрес, викликаний іонізуючим опроміненням, що призводить до деградації нуклеїнових кислот, модифікації клітинної стінки, накопичення крохмалю, протеолізу та конформаційних перетворень білків, зокрема, до збільшення співвідношення альфа-спіральних та бета-структурних доменів. Високий рівень активності генів підтримки структурної цілісності геному у поєднанні з маркерами загибелі клітин при дозі рентгенівського опромінення 21 Гр демонструє, що системи репарації ДНК найбільш ефективно забезпечують пострадіаційне відновлення рослин лише в інтервалі стимулюючих доз радіації.

Незважаючи на те, що повторюване опромінення загалом менш ефективно індукувало експресію генів репарації ДНК у порівнянні з одноразовим, саме при цьому режимі спостерігався тісний зв'язок між активністю досліджуваних генів та динамікою морфометричних показників у пострадіаційний період ($r \sim 0,6-0,9$). Зокрема, частка рослин у стані «growth arrest» (затримка росту та розвитку), корелювала з активністю гена *AtRad1*. Водночас експресія гена *AtKu70* була пов'язана з подоланням пострадіаційної затримки розвитку, зменшенням ризику виникнення морфологічних аномалій, стимуляцією росту та накопиченням біомаси. Індукція гена *AtRAD51* запобігала утворенню морфологічних аномалій рослин та формуванню редукованого фенотипу.

З'ясовано, що у інтервалі сублетальних доз рентгенівського 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 взаємодію з продуктами генів *AtRad1* і *AtKu70*.

Трансгенераційна передача підвищеної транскрипційної активності ключових генів підтримки структурної цілісності геному корелює з фенотипними ефектами у неопроміненому потомстві опромінених рослин. Фракціонування дози з 24-годинним інтервалом у порівнянні з одноразовим опроміненням викликає більш виражений та тісний зв'язок між морфометричними характеристиками опромінених рослин та їхнього потомства. Підвищена активність гена *AtRad1* у клітинах неопромінених рослин першого покоління, вирощених з насіння опромінених рослин, пов'язана із зниженням схожості й 30-денної виживаності та підвищеною частотою морфологічних аномалій. Все це дозволяє розглядати підвищену транскрипційну активність гена *Rad1* через тривалий час після дії на організм генотоксичного чинника в якості маркера індукованої нестабільності геному.

На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *AtRad1* в якості маркера радіаційно індукавного арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Efla* в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Показні обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу. Введено додатковий індекс індукції DDR-відповіді $I_{DDR} = (TA_D(AtKu70) - TA_D(AtRad1)) - (TA_0(AtKu70) - TA_0(AtRad1))$, де TA_D – транскрипційна активність відповідного гена при дозі опромінення D , TA_0 – транскрипційна активність відповідного гена за відсутності дії іонізуючого опромінення. Індекс I_{DDR} корелює із стимулюючим впливом рідкоіонізуючого опромінення у сублетальних дозах.

На наш погляд, виявлені радіобіологічні ефекти стимулюючих та сублетальних доз рентгенівського опромінення пов'язані з радіаційною модифікацією активності систем підтримки цілісності геному, а не з прямим впливом радіації. Це має особливе значення при подовженій в часі дії радіаційного фактора на клітини, які раніше зазнали опромінення, наприклад, при повторюваному (фракціонованому), пролонгованому та хронічному опроміненні. Зокрема при фракціонуванні дози з інтервалом 24 години, близьким до тривалості мітотичного циклу, радіаційна модифікація активності генів підтримки цілісності геному суттєвим чином впливає на ефективність та злагодженість процесів репопуляції меристем рослини. Тому радіаційно індукована транскрипційна відповідь ключових генів репарації ДНК пов'язана

більшою мірою із стійкістю рослин до дії повторюваного та хронічного, але не гострого опромінення.

Достеменно встановлена участь білка *AtRad1* у SOG1-залежній зупинці росту та розвитку рослин (growth arrest) у відповідь на гамма-опромінення. На основі цих даних можна припустити участь пострадіаційної активації гена *AtRad1* у ATR-опосередкованій зупинці циклу клітин апікальної меристеми, що призводить до формування редукованого фенотипу рослин (R-фенотипу).

РОЗДІЛ 6. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виявлено прямо пропорційний зв'язок транскрипційної активності гена репаративної ендонуклеази *AtRad1* з порушеннями морфогенезу, зупинкою розвитку та стерильністю опромінених рослин арабідопсису. Підвищена експресія гена *AtRad1* може бути маркером арешту клітинного циклу активних клітин, що призводить до підвищення частки рослин з порушеннями морфогенезу серед нащадків опромінених рослин.

У листі опромінених рослин різко знижується вміст протеїнів та ліпідів, зростає співвідношення бета-структурних і альфа-спіральних доменів білків, руйнується хлорофіл, накопичуються пурпурово-фіолетові пігменти (антоціани), відбувається заміщення пектину та лігніну целюлозою й геміцелюлозою, акумулюється крохмаль, спостерігається модифікація складу жирних кислот кутину. Це підтверджує гіпотезу щодо ураження радіочутливих клітин як причину другого піку стимуляції при дозах в області верхньої межі інтервалу сублетальних доз рідкоіонізуючої радіації, що пов'язано з активацією резервної субпопуляції радіостійких клітин.

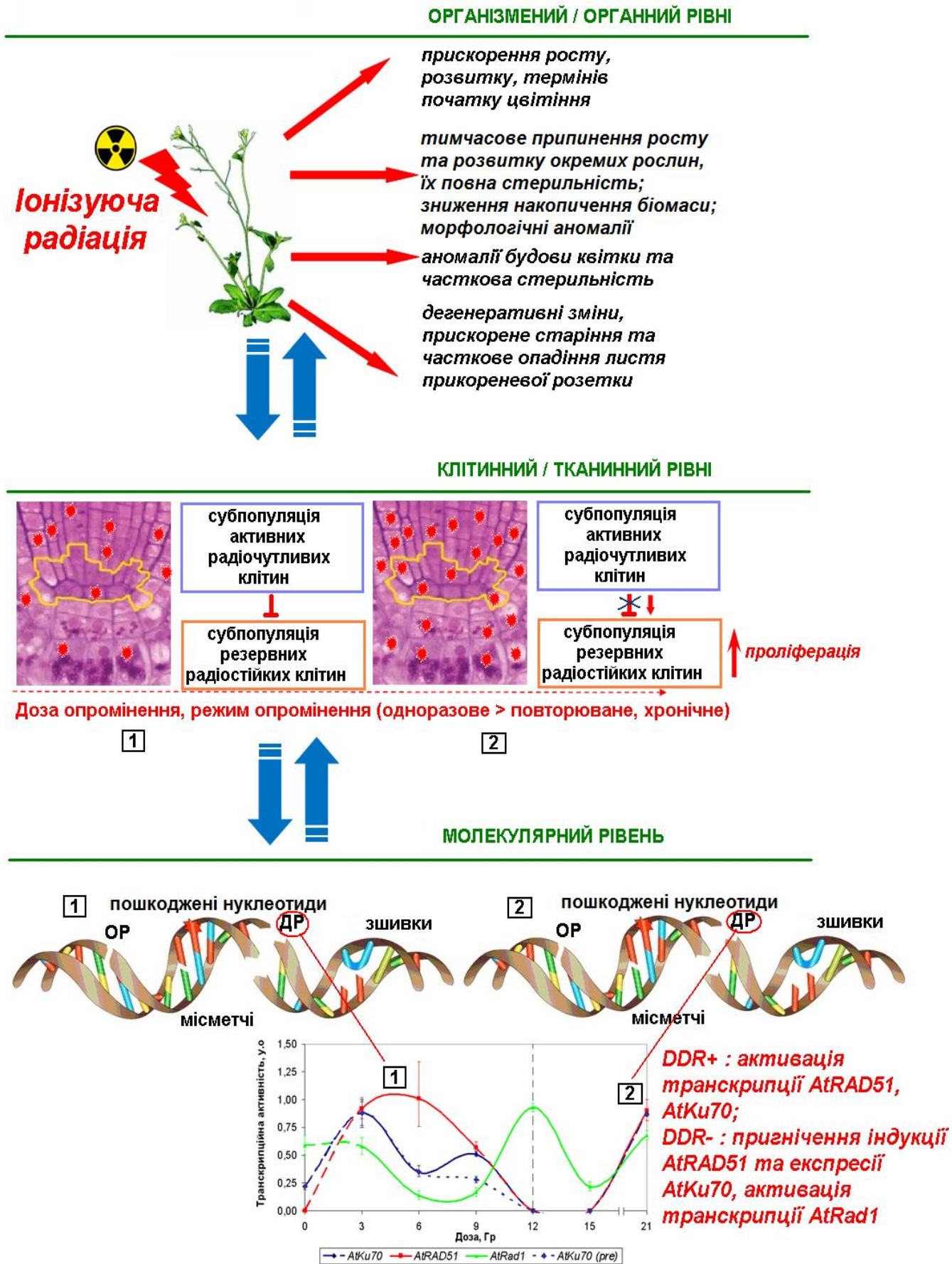


Рис. 5. Узагальнююча схема формування радіобіологічної реакції рослин на іонізуюче опромінення у сублетальній дозі

ВИСНОВКИ

Дисертаційне дослідження дозволило зробити наступні висновки:

1. Дозові залежності ранньої транскрипційної відповіді генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1* на дію рідкоіонізуючої радіації у сублетальних дозах носять нелінійний характер та відображають як стимуляцію, так і супресію активності генів репарації ДНК у відповідь на рентгенівське опромінення. В той час як при дозах 3 Гр – 9 Гр має місце підвищена сумарна експресія генів *AtRAD51* та *AtKu70*, поряд із зниженою експресією гена *AtRad1*, при дозі опромінення 12 Гр активність генів *AtRAD51* і *AtKu70* репресована, а транскрипція гена *AtRad1* навпаки суттєво підвищена у порівнянні з неопроміненим контролем. Одноразове опромінення при дозі 3 Гр більш ефективно індукує експресію генів *AtRAD51* і *AtKu70* у порівнянні з повторюваним (фракціонованим), але при більш високих дозах 6 Гр – 21 Гр ефективність індукції для режиму повторюваного опромінення в цілому вища, ніж для одноразового. Характер отриманих дозових залежностей ранньої транскрипційної відповіді генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1* вказує на наявність у тканинах опромінених двох субпопуляцій клітин – радіочутливої та радіостійкої.

2. Опромінення рослин арабідопсису у сублетальних дозах призводить як до середньо-, так і довгострокових ефектів, серед яких стимуляція росту рослин у довжину, галуження стебла, активація бічних стеблових і квіткових бруньок, кущіння, поява рослин з морфозами та зміненим фенотипом, а також таких рослин, розвиток яких тимчасово зупиняється, стимуляція або пригнічення цвітіння, скорочення або подовження терміну вегетації. Стимулюючий вплив більшою мірою характерний для одноразового опромінення у порівнянні з повторюваним та хронічним.

3. Активність гена *AtKu70* позитивно корелює з приростом рослин та накопиченням біомаси після фракціонованого опромінення; в той час як активність гена *AtRad1* позитивно корелює з затримкою або зупинкою розвитку, порушеннями морфогенезу, стерильністю опромінених рослин. Також встановлена від'ємна кореляція транскрипції гена *AtRAD51* з виникненням морфологічних аномалій.

4. Наявність або відсутність у геномі арабідопсису функціонуючого гена *Atmsh2* не впливає на ранню транскрипційну відповідь генів *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*. Білок AtMSH2 підвищує стійкість рослин до дії іонізуючого опромінення та, імовірно, взаємодіє з рекомбіназою *AtRAD51* й ендонуклеазою *AtRad1* в процесі пострадіаційного відновлення ДНК *A.thaliana*.

5. Підвищена після опромінення експресія генів *AtRAD51* і *AtRad1* зберігається у поколінні нащадків опромінених рослин F₁, на відміну від радіаційно модифікованої транскрипції гена *AtKu70*. Індуковані опроміненням зміни активності генів *AtRAD51* і *AtRad1* позначаються на життєздатності та варіативності морфометичних ознак неопромінених рослин, які є нащадками опромінених – активність гена *AtRAD51* сприяє збільшенню схожості та

виживаності проростків F_1 , активність *AtRad1* – навпаки, пов'язана із зниженням даних показників.

6. На основі отриманих результатів запропоновано використання підвищеного рівня експресії гена *Rad1* (*UVH1*) в якості маркера радіаційно індукаваного арешту клітинного циклу активних клітин в органах рослин, а зниженого рівня експресії гена *Efla* – в якості характеристики ступеню пошкодження субпопуляції активних клітин. Показні обмеження застосування транскрипційної активності гена *RAD51* як маркера рівня пошкоджень ДНК у клітинах цілої рослини чи органу.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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.
С.В. Літвінов провів аналіз публікацій, присвячених основним шляхам репарації дволанцюгових розривів геномної ДНК еукаріот, узагальнив їх, запропонував типологію шляхів репарації дволанцюгових розривів ДНК, написав текст публікації.
2. Литвинов С.В. Влияние хронического облучения семян и проростков *Arabidopsis thaliana* малыми дозами γ -радиации на рост и развитие растений. *Ядерна фізика та енергетика*. 2015. Т. 15, № 4. С. 406-414.
Здобувач провів лабораторні експерименти з вивчення впливу хронічного опромінення на насіння та проростки рослин *Arabidopsis thaliana*, їх подальший ріст і розвиток до кінця вегетаційного періоду.
3. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Изменение параметров морфогенеза *Arabidopsis thaliana* L. при хроническом облучении семян и проростков малыми дозами редкоизирующей радиации. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Збірник наукових праць. 2016. Т. 18. С. 51-55.
Дисертант вивчив зміни основних параметрів морфогенезу *Arabidopsis thaliana* L. при хронічному опроміненні насіння малими дозами γ -радіації, проаналізував отримані дані, зробив висновки та написав текст статті.
4. Litvinov S.V., Rashydov N.M. The transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* L. *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes to X-rays. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 2017, 7 (1). P. 52 – 60. doi: 10.17265/2161-6256/2017.01.008
С.В. Літвінов виростив та опромінив рослини *Arabidopsis thaliana* на рентгенівському терапевтичному апараті РУМ-17, виділив із свіжого листа сумарну РНК, провів зворотну транскрипцію з випадковими гексануклеотидними праймерами, здійснив ПЛР з праймерами, специфічними до кДНК генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, оцінив відносний рівень транскрипційної активності генів за допомогою методу гель-денситометрії, проаналізував зв'язок цієї активності з деякими морфометричними характеристиками рослин у пострадіаційний період, зробив висновки та написав текст статті.
5. Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Зміни непігментних сполук у листках опромінених рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*. 2018, № 2 (73). С. 157-164.
Здобувач разом з М.В. Кривохижою за допомогою методу інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (FTIR) визначив вміст основних непігментних сполук у свіжому ліофілізованому листі арабідопсису через місяць після опромінення у пошкодуючій сублетальній дозі 21 Гр., проаналізував отримані дані, написав текст статті.

6. Litvinov S., Rashydov N. Transgenerational Transmission of Radiation-Induced Expression Patterns of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Rad51 and Rad1 Genes. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2018. Vol. 5, No. 2. P. 149-155.

Дисертант провів весь комплекс лабораторних робіт з культивації рослин, їх опромінення, виділення сумарної РНК та оцінки відносного рівня транскрипційної активності цільових генів, проаналізував дані для двох послідовних поколінь арабідопісису – опроміненого та неопроміненого, зробив висновки та написав текст статті.

7. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Відносна радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз опромінення радіацією. *Ядерна фізика та енергетика*. 2018. Т.19, №2. С. 145-149.

С.В. Літвінов оцінив відносну радіочутливість мутанта *Arabidopsis thaliana Atmsh2 SALK_002708* у діапазоні сублетальних доз 3-21 Гр одноразового та повторюваного (фракціонованого) рентгенівського опромінення за параметром накопичення біомаси пагону, провів аналіз даних, підготував текст статті.

8. Кравець О.П., Літвінов С.В., Рашидов Н.М., Соколова Д.О. Розвиток захисних реакцій за умов дії гострого опромінення. // Епігенетичні фактори адаптації рослин : монографія / за редакцією д.б.н. О.П. Кравець та к.б.н. Ю.В.Шиліної. К.: ПАЛИВОДА А.В., 2018. С. 100-124.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

9. Літвінов С.В. Пострадіаційні ефекти малих доз хронічного гамма-опромінення насіння та проростків *Arabidopsis thaliana* L. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених. Умань: Видавець «Сочінський», 2014. С. 128.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою.

10. Литвинов С.В. Радиационные и пострadiационные эффекты хронического гамма-облучения семян и проростков *A. thaliana* в малых дозах. *VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность)*: Москва, 21-24 октября 2014 г. Москва : РУДН, 2014. С. 288.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

11. Litvinov S.V., Rashydov N.M. Transcription of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in leaves of *A. thaliana* L. plants under conditions of acute and fractionated X-rays irradiation. *International Conference of Young Scientists-2015 (CYS-2015) «Today's challenges in molecular and cell biology»*, Kyiv, 21-25 September 2015: Abstract Book. Lutsk, 2015. P. 45.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

12. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипция генов *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в листьях растений *A.thaliana* L. в условиях острого и фракционированного рентгеновского облучения. *Тези доповідей VI з'їзду Радіобіологічного Товариства України*, Київ, 5-9 жовтня 2015 р. Київ, 2015. С. 83.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку. Доповідь відзначено грамотою як найкращу серед молодих науковців.

13. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Зв'язок транскрипційної активності генів підтримки цілісності геному з морфо-фенологічними характеристиками опромінених рослин *A. thaliana* L. *XXIII щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 01 - 05 лютого 2016 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2016. С. 180-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

14. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Радіаційна модифікація транскрипційної активності генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричні характеристики опромінених рослин *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної

конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 51.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

15. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Роль генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в пострадіаційному відновленні *A. thaliana* L. *Біотехнологія XXI століття*: матеріали X Всеукраїнської науково-практичної конференції присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (Київ, 22 квітня 2016). Київ: НТУУ «КПІ», 2016. С. 52.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

16. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Транскрипційна відповідь на іонізувальне опромінення генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* *A. thaliana* L. та пострадіаційне відновлення рослин. *Актуальні проблеми ботаніки та екології*. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (м. Херсон, 29 червня – 3 липня 2016 року). Херсон: ХДУ, 2016. С. 119.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

17. Литвинов С.В., Рашидов Н.М. Трансгенерационное наследование радиационно модифицированных паттернов экспрессии генов поддержания целостности генома арабидопсиса. Тези доповідей Науково-практичної конференції з міжнародною участю «*Ефекти радіації та інших ксенобіотиків на репродуктивну систему і організм*», м. Долина, Івано-Франківська обл., 4-7 жовтня 2016 р. Ів.-Франківськ: «Місто НВ», 2016. С. 78.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

18. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *A. thaliana* L. *XXIV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 10 - 13 квітня 2017 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2017. С. 203.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

19. Літвінов С.В., Кривохижа М.В., Кухарський В.М., Рашидов Н.М. Пострадіаційні зміни біохімічного складу нефотосинтезуючих структур листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Радіоекологія-2017*: Збірник статей Науково-практичної конференції із міжнародною участю, м. Київ, 24-26 квітня 2017 року. Житомир: Вид-во ЕЦ «Укрекобіокон», 2017. С.168-172.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

20. Litvinov S.V., Rasydov N.M. Transgenerational inheritance of radiation-induced activation of *Arabidopsis thaliana* (L.) *RAD51* and *Rad1* genes. Збірка тез Третьої конференції молодих учених «*Біологія рослин та біотехнологія*» (м. Київ, 16-18 травня 2017 р., Національний авіаційний університет). К.:НАУ, 2017. С. 48.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

21. Litvinov S., Krivohizhaya M., Rasydov N. Radiation induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Abstract book. Scientific & practical Seminar with international participation «*Stress factors & Secondary metabolites*», December 11-15, 2017 Kyiv, Ukraine. Kyiv, 2017. – P. 4.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

22. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Непігментні біохімічні маркери радіаційно індукованого старіння листя рослин *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., опромінених рентгенівськими променями у сублетальній дозі. *XXV щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 16 - 20 квітня 2018 року): додаток до збірника тез доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2018. Д17.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

23. Litvinov S., Rasydov N., Krivohizhaya. Radiation-induced long-term changes in the non-pigmented compounds in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. *RAD 2018*: Sixth

International Conference on radiation and applications in various fields of research, 18.06-22.06.2018, Ohrid, Macedonia. Ohrid, 2018. P. 35.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

24. Litvinov S., Rasydov N. A model of Early Transcriptional Response of the Plant Genome Integrity Maintenance Genes to Ionizing Radiation. *The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 03-06 July 2018, Kiev - Ukraine: Abstract Book. Kiev, 2018. P. 305.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

25. Літвінов С.В., Рашидов Н.М. Чутливість мутанта *Atmsh2* лінії *SALK_002708* до дії сублетальних доз іонізуючої радіації. *XXVI щорічна наукова конференція Інституту ядерних досліджень НАН України* (Київ, 8 - 12 квітня 2019 року): тези доповідей. Київ: Ін-т ядерних досліджень, 2019. С. 181-182.

Здобувач отримав експериментальні дані, інтерпретував результати, підготував матеріали до друку.

АНОТАЦІЯ

Літвінов С. В. Зв'язок транскрипційної активності ключових генів репарації ДНК з пострадіаційним відновленням рослин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.01 радіобіологія (091 – Біологія). – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, Київ, 2019.

У дисертаційному дослідженні показано кореляційний зв'язок індукованої радіацією транскрипційної відповіді основних генів репарації ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMsh2* з ефективністю пострадіаційного відновлення опромінених рослин на рівні цілісного організму. Цей зв'язок проявлявся у діапазоні сублетальних доз радіації 0,2 Гр – 21,0 Гр, залежав від режиму опромінення та був характерний не тільки для опромінених рослин, але і для нащадків цих рослин покоління F_1 , які не зазнали дії радіації. Найвищі коефіцієнти кореляції для більшості морфометричних показників опромінених рослин з ранніми змінами експресії генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* у тканинах розеткових листків арабідопсису спостерігалися при повторюваному опроміненні. До зкорельованих з ранньою транскрипційною відповіддю параметрів належали: тимчасова або термінальна зупинка росту, поява морфологічних аномалій, стерильність, приріст і галуження стебла, накопичення біомаси. Виявлені кореляції відображають залежність морфометричних параметрів від зміни активності досліджуваних генів як складової реакції на пошкодження геному опромінених рослин.

При режимі повторюваного опромінення виявлена значно більш висока статистично достовірна кореляція між активністю генів *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* та морфометричними показниками у пострадіаційний період, ніж при одноразовому опроміненні.

Активність гена *AtKu70* позитивно корелювала з приростом рослин та накопиченням біомаси після фракціонованого опромінення, в той час як активність гена *AtRad1* була позитивно зкорельована із затримкою або

зупинкою розвитку, порушеннями морфогенезу, стерильністю опромінених рослин. Також встановлено від'ємну кореляцію транскрипції гена *AtRAD51* з виникненням морфологічних аномалій. Продемонстрована самостійна роль гена *Atmsh2* у пострадіаційній репарації ДНК, як і його взаємодія з генами *AtKu70* та *AtRad1*.

Ключові слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., іонізуюче випромінювання, репарація ДНК, транскрипційна активність, *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, *Atmsh2*, пострадіаційне відновлення.

АННОТАЦІЯ

Литвинов С. В. Связь транскрипционной активности ключевых генов репарации ДНК с пострадиационным восстановлением растений. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.01 радиобиология (091 – Биология). – Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев, 2019.

В диссертационном исследовании показана корреляционная связь индуцированного радиацией транскрипционного ответа основных генов репарации ДНК *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMsh2* с эффективностью пострадиационного восстановления облученных растений на уровне целостного организма. Эта связь проявлялась в диапазоне сублетальных доз радиации 0,2 Гр – 21,0 Гр, зависела от режима облучения и была характерна не только для облученных растений, но и для потомков этих растений поколения F1, не подвергшихся воздействию радиации. Самые высокие коэффициенты корреляции для большинства морфометрических показателей облученных растений с ранними изменениями экспрессии генов *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* в тканях розеточных листьев арабидопсиса наблюдались при повторном облучении. К скоррелированным с ранним транскрипционным ответом параметрам принадлежали временная или терминальная остановка роста, появление морфологических аномалий, стерильность, прирост и ветвление стебля, накопление биомассы. Выявленные корреляции отражают зависимость морфометрических параметров от изменения активности исследуемых генов как составляющей реакции на повреждение генома облученных растений.

При режиме повторного облучения выявлена значительно более высокая статистически достоверная корреляция между активностью генов *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* и морфометрическими показателями в пострадиационный период, чем при однократном облучении.

Активность гена *AtKu70* положительно коррелировала с приростом растений и накоплением биомассы после фракционированного облучения, в то время как активность гена *AtRad1* была положительно скоррелирована с

задержкой либо остановкой развития, нарушениями морфогенеза, стерильностью облученных растений. Также установлена отрицательная корреляция транскрипции гена *AtRAD51* с появлением морфологических аномалий. Продемонстрирована самостоятельная роль гена *Atmsh2* в пострадиационной репарации ДНК, как его взаимодействие с генами *AtKu70* и *AtRad1*.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ионизирующее излучение, репарация ДНК, транскрипционная активность, *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, *Atmsh2*, пострадиационное восстановление.

SUMMARY

Litvinov S.V. Relationship between transcriptional activity of the key DNA repair genes and postradiational recovery of plants. – Qualification scientific work (Manuscript).

Thesis for a degree of the Candidate of Biological Sciences (Ph.D) in specialty 03.00.01 – Radiobiology (091 – Biology). – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

In the dissertation research the correlation of radiation-induced transcription response of the main DNA repair genes *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1*, *AtMsh2* with the efficiency of postradiational recovery of irradiated plants at the level of the whole organism was shown. This correlation manifested itself in the range of sublethal doses of 0.2 Gy - 21.0 Gy, depending on the irradiation mode and was characteristic not only for the irradiated F_0 plants, but also for the non-irradiated plants of the generation F_1 . The highest correlation coefficients (Pearson correlation coefficients $r = 0.6$ to $r = 0.9$, $p < 0.05$) for most morphometric indices of irradiated plants with early changes in the expression of *AtKu70*, *AtRAD51* and *AtRad1* genes in the tissues of the rosette leaves of *Arabidopsis thaliana* were observed with repeated irradiation. Correlated with the early transcriptional response parameters included: temporal or terminal growth arrest, the emergence of morphological anomalies, sterility, growth and branching of the stem, accumulation of biomass.

For the first time the nonlinear double-peak dose dependence of the transcriptional activity of *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes in the tissues of rosette leaves of *Arabidopsis* plants, irradiated at sublethal doses of 3-21 Gy of X-rays, was obtained. These data could be explained by the existence of two subpopulations of plant cells with significantly different radiosensitivity.

The character of expression of the key DNA repair genes of *Arabidopsis thaliana* plants in the rosette leaves at the margin between the vegetative and generative phases of development is established: expression of the *AtRAD51* gene is radiation-inducible, and the *AtKu70* and *AtRad1* genes are expressed both constitutively and in radiation-inducible manner. It has been shown that irradiation in sublethal doses can not only stimulate, but also suppress transcription of DNA repair genes, as well as lead to the appearance of truncated mRNA.

It was found, that both stimulation and inhibition of the growth and development of plants under the influence of radiation in the range of sublethal doses are partly due to activation or repression of the transcriptional activity of the *AtKu70*, *AtRAD51*, *AtRad1* genes. The inhibitory effect of repeated and chronic, but not single irradiation correlates with increased expression of the *AtRad1* gene, and stimulating – with the activation of *AtKu70* and *AtRAD51* genes. *AtKu70* gene positively correlates with plant growth and accumulation of biomass, while the activity of the *AtRad1* gene positively correlates with delayed or arrested growth and development, morphological anomalies, sterility of irradiated plants. A negative correlation of transcription of the *AtRAD51* gene with morphological anomalies was also established.

Expression of *AtRAD51* and *AtRad1* genes, increased after irradiation in sublethal doses, might be transmitted to the first-generation progeny, while the induced activity of *AtKu70* had not been transmitted. The transgenerational transmission of the increased activity of the *AtRad1* gene had been associated with the increased frequency of plants with morphological anomalies in the first postradiation generation as compared to non-irradiated control. Also activity of the *AtRAD51* gene has been promoted an increase in the germination and survival of F1 seedlings, the activity of *AtRad1* on the contrary.

It has been shown that according to a number of biochemical markers X-ray irradiation at a sublethal dose of 21 Gy leads to accelerated aging of plant leaves. In particular, the ratio of beta-layers and alpha domains of proteins increases and their total content decreases, the content of nucleic acids and lipids decreases, pectin and lignin are replaced by cellulose and hemicellulose, starch is deposited, modification of composition of the fatty acids of cutin is observed, chlorophyll is destroyed and purple pigments are accumulated.

It has been shown for the first time that *Atmsh2*^{-/-} mutants are more susceptible than *Atmsh2*^{+/+} plants to the single-dose, but not repeated or chronic ionizing irradiation in sublethal doses. An independent role of the *Atmsh2* gene product in post-radiation DNA repair, as well as its interaction with *AtRad1* and *AtKu70* genes have been demonstrated.

Based on the obtained results, the application of measured elevated levels of *Rad1* (*UVH1*) gene activity as a marker of radiation-induced arrest of cell cycle of active cells in plant organs and a reduced level of expression of the *Efla* gene as characteristics of the damage of subpopulation of active cells were proposed. At the same time, the limitations of the use of transcriptional activity of the *RAD51* gene as a marker of the DNA damage level in cells of a whole plant or an organ had been shown. An additional index $I_{DDR} = (TA_D(Ku70) - TA_D(Rad1)) - (TA_0(Ku70) - TA_0(Rad1))$ is proposed, where TA_D is the transcription activity of the corresponding gene at the dose of irradiation D, TA_0 is the transcription activity of the corresponding gene in the absence of ionizing irradiation exposure.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ionizing radiation, DNA repair, transcriptional activity, *AtRAD51*, *AtKu70*, *AtRad1*, *Atmsh2*, post-radiation recovery.