

А. В. Шугалий, М. В. Личина

## ТРАНЗИТНЫЙ ХАРАКТЕР НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ГЕНОМНОГО ОТВЕТА, ТЕСТИРУЕМОГО ПО ИЗМЕНЕНИЮ РЕСТРИКЦИОННОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДНК КРЫСЫ, ПРИ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИИ

Проведена *EcoRI*-рестрикция при насыщающих количествах фермента ДНК тимуса крысы после однократного  $\gamma$ -облучения *in vivo*. Дозы 5 и 0,5 Гр вызывают обратимые изменения степени доступности для расщепления определенных рестрикционных сайтов, что проявляется в возрастании относительной доли *EcoRI*-фрагмента 1500 п. н. и уменьшении — фрагмента 345 п. н. При высокой дозе максимальный эффект отмечен в первые часы после воздействия с возвращением к исходному уровню расщепления к 24-му ч. Генотипная реакция на дозу 0,5 Гр носит более пролонгированный характер, сходные изменения вкладов маркерных фрагментов реализуются через 24 ч.

**Введение.** При анализе любых рестрикционных распределений фрагментов ДНК, особенно препаратов, полученных после различных воздействий *in vivo*, чрезвычайно важным является вопрос о полноте расщепления. Частичная рестрикция способна не только изменить парциальный вклад конкретного фрагмента, но и привести к полному исчезновению из рестрикционного распределения компонента, который ограничен подобными недорестрицированными сайтами. При этом, в отличие от фаговой ДНК, где полная рестрикция достигается при соотношении  $r$  фермент : ДНК, равном (1—2) : 1 [1], для ДНК животного происхождения это соотношение должно быть увеличено, как минимум, в несколько раз [2]. По крайней мере, для четырехчленного тандема 370 п. н. известного сателлита I крысы 92/93 п. н. вид рестрикционной картины не меняется лишь для  $r \geq 16$  [3].

Установление нами факта изменения доли отдельных рестрикционных фрагментов ДНК крысы после  $\gamma$ -облучения *in vivo* [4] не может, по-видимому, считаться окончательным без анализа полноты расщепления. Для этого мы провели рестрикцию ДНК тимуса — одного из радиочувствительных органов  $\gamma$ -облученной крысы — при различном содержании фермента, расширив во времени область наблюдения после воздействия (1—24 ч) и используя, кроме дозы 5 Гр, более низкую — 0,5 Гр.

**Материалы и методы.** Каждая точка в эксперименте получена на препарате ДНК, выделенном из одной крысы. Однократное  $\gamma$ -облучение на кобальтовой установке осуществляли при мощности дозы 0,25 Гр/мин. В результате использования гуанидинтиоцианатного метода выделения [5] с последующей дополнительной очисткой смесью хлороформ/изоамиловый спирт препараты ДНК имели величины отношения  $D_{260}/D_{280} = 1,8—2,2$ ;  $D_{260}/D_{230} = 2,0—2,2$  и чрезвычайно высокую для животной ДНК степень гиперхромизма ( $\sim 40\%$ ), свидетельствующую о совершенстве вторичной структуры. Использовали рестриктазу *EcoRI* (НПО «Вектор», Бердск), отношение фермент:ДНК, выраженное в ед. активности фермента на 1 мкг ДНК, меняли в пределах 3—48. Электрофорез в градиенте концентрации 3—8% полиакриламидного геля (ПААГ) осуществляли при напряжении 35 В в течение 14—16 ч. Сканограммы получали денситометрированием пластинок геля на денситометре ДМ-1.

**Результаты и обсуждение.** Как известно [2, 4], в интервале длин *EcoRI*-фрагментов 90—1500 п. н. рестрикционная картина ДНК крысы

в градиенте концентрации ПААГ представляет собой дисперсное распределение. Удобным показателем потенциальных изменений рестрикции является относительный вклад каждого из фрагментов, оцениваемый по сканограмме. Сохранение отношения  $S$  этих вкладов в опыте и контроле на уровне 1,0 означает, что ситуация в опыте остается неизменной.

Наиболее лабильными при  $\gamma$ -облучении крысы дозой 5 Гр оказались *EcoRI*-фрагменты  $B$  (1500 п. н.) и  $F$  (345 п. н.) ДНК селезенки и тимуса, доля первого имела тенденцию к возрастанию, второго — к уменьшению, а вычисленное отношение  $S$  для фрагмента  $B$  было  $>2,0$ ,

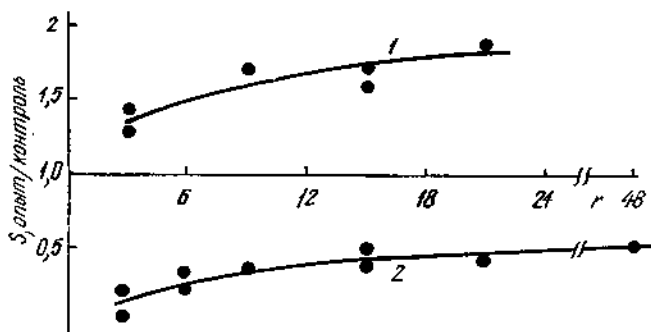


Рис. 1. Зависимость величины относительного вклада  $S$ , выраженного в виде отношения опыт/контроль, для фрагментов *EcoRI*-рестрикции  $B$  (1500 п. н., кривая 1) и  $F$  (345 п. н., кривая 2). По оси абсцисс — соотношение  $r$  фермент: ДНК. Препарат ДНК тимуса выделен спустя 24 ч после  $\gamma$ -облучения дозой 0,5 Гр

для  $F < 1,0$  [4]. Мы провели рестрикцию ДНК тимуса крысы,  $\gamma$ -облученной дозой 0,5 Гр, при значениях  $r$  от 3 до 48. Результаты расчета относительного вклада фрагментов  $B$  и  $F$  представлены на рис. 1, время после облучения 24 ч. При значении  $r=3-6$  в наших условиях для всех фрагментов ДНК нормального тимуса (контроль) и большинства фрагментов ДНК тимуса облученных крыс наступает насыщение, т. е. картина рестрикции не меняется при увеличении  $r$ . В то же время для фрагментов  $B$ ,  $F$ , отчасти  $D$  (530 п. н.) и  $J$  (93 п. н.) ДНК облученного тимуса ситуация близка к насыщению только при  $r=15-20$ . Предельному уровню расщепления соответствует двукратное превышение в опыте над контролем доли фрагмента  $B$  (кривая 1) и такое же уменьшение доли фрагмента  $F$  (кривая 2). Отметим, что сходство этих численных значений отнюдь не свидетельствует о какой-либо физической связи указанных фрагментов в геноме крысы — фрагмент  $B$  повторяется в геноме  $5 \cdot 10^4$  раз, а  $F$  — всего  $5 \cdot 10^3$  раз, их доля также несоизмерима [2]. Для фрагментов  $D$  и  $J$  ДНК тимуса облученных крыс предел соответствует содержанию в контроле.

Критерием полноты расщепления может служить и следующий косвенный факт. Для моно-, ди-, три- и тетрамеров основного повтора сателлита 1 крысы 92/93 п. н., имеющих на концах сайты *EcoRI*-узнавания, предельное соотношение при  $r=16-160$  (полная *EcoRI*-рестрикция) выглядит как 73 : 21 : 4 : 1 [3]. В наших условиях данным компонентам соответствуют, по-видимому, фрагменты, обозначаемые в [2, 4] как  $J$ ,  $I$ ,  $G$  и  $F$  размерами 93, 180, 290 и 345 п. н. [2] или 90, 190, 280 и 357 п. н. (наши оценки), причем некоторая вариация длин вполне естественна из-за погрешностей градуировок [6]. Оцененное нами соотношение вкладов этих фрагментов при  $r > 20$  составляет 76 : 28 : 3 : 1, т. е. очень близкое к тому, что наблюдали в условиях гарантированно полной рестрикции в [3].

Для  $r=21$  мы получили *EcoRI*-рестрикционное распределение ДНК тимуса  $\gamma$ -облученных крыс для доз 5 и 0,5 Гр в интервале времен 1—24 ч после воздействия (рис. 2). Отметим две важные особенности. Во-первых, геномная реакция, выраженная в доступности для расщепления

*EcoRI*-сайтов узнавания фрагментов *B* и *F*, при дозе 5 Гр имеет отчетливо транзитный характер — максимальный эффект спустя 3 ч после облучения и практически полная нормализация через 24 ч (кривые 2 и 3). Ситуация очень похожа на амплификацию интегрированной индикаторной последовательности SV40 и ее последующую элиминацию при облучении культуры эмбриональных клеток китайского хомячка, правда, масштаб времени (несколько суток) был совершенно иным [7, 8].

Во-вторых, ~10-кратное уменьшение дозы  $\gamma$ -облучения до 0,5 Гр вызывает практически тот же (по порядку величины) геномный ответ,

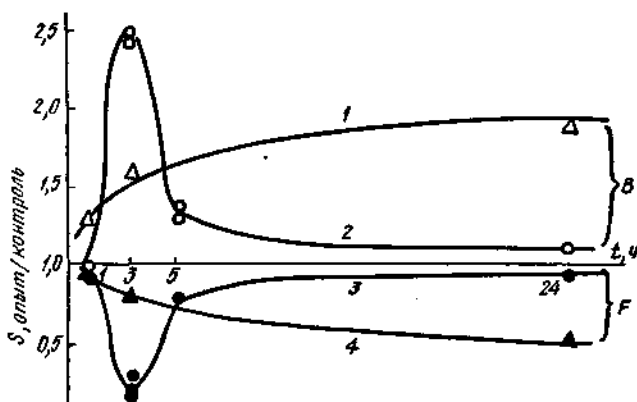


Рис. 2. Изменение во времени после  $\gamma$ -облучения относительного вклада фрагментов *B* и *F* *EcoRI*-распределения ДНК тимуса при дозе  $\gamma$ -облучения 0,5 Гр (кривые 1, 4) и 5 Гр (2, 3). Верхняя часть рисунка относится к фрагменту *B* (1, 2), нижняя — к фрагменту *F* (3, 4)

но растянутый во времени в ~10-кратном интервале (кривые 1 и 4). Подобная картина отличается от случая сублетального воздействия на крысу ингибитора белкового синтеза циклогексимида: только при глубоком ингибировании биосинтеза белка и уровне выживаемости  $\leq 50\%$  нами было зарегистрировано проявление геномной нестабильности — присутствие дополнительной фракции быстрореассоциирующих последовательностей [9]. Впоследствии мы выявили и аналогичное  $\gamma$ -облучению изменение картины рестриционного расщепления ДНК печени крыс после обработки сублетальными дозами циклогексимида [10].

В контексте генетических последствий ионизирующего облучения отметим, что если доза 5 Гр сопоставима со значением  $LD_{50/30}$  для крысы (гибель 50% животных в течение 30 сут), то 0,5 Гр меньше этой величины более чем на порядок. Для этой дозы вклад генетически наиболее значимых радиационно-индуцированных хромосомных аберраций пренебрежимо мал [11]. Вместе с тем отмеченный нами эффект для дозы 0,5 Гр может означать, что и малые дозы (а в пределе и сверхмалые, они являются предметом нашего текущего исследования) вызывают аккумулирующиеся генетические изменения по неизвестному пока механизму.

О. В. Шугалій, М. В. Личина

ТРАНЗИТНИЙ ХАРАКТЕР НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ГЕНОМНОЇ ВІДПОВІДІ,  
ТЕСТОВАНОЇ ЗА ЗМІНОЮ РЕСТРИКЦІЙНОГО РОЗЩЕПЛЕННЯ ДНК ЩУРА,  
ПРИ  $\gamma$ -ОПРОМІНЕННІ *IN VIVO*

Резюме

За умов значного надлишку ферменту доступність деяких сайтів ДНК тимусу щура для *EcoRI*-рестрикції варіює залежно від часу після одноразового  $\gamma$ -опромінення *in vivo*. У перші години дозі 5 Гр відповідають протилежні за знаком ефекти для фраг-

ментів 1500 і 345 пар нуклеотидів — збільшення та зменшення відносного внеску відповідно — з поверненням до вихідного рівня розщеплення на 24-у год. Доза 0,5 Гр викликає подібну геномну відповідь, яка визначається ступенем рестрикційної доступності, але реалізується вона лише через добу.

A. V. Shugaliy, M. V. Lichina

THE TRANSIENT CHARACTER OF NONSPECIFIC GENOME'S REACTION UNDER GAMMA IRRADIATION IN VIVO TESTED BY VARIATION OF RAT DNA RESTRICTION PATTERN

Summary

At the considerable enzyme's abundance the accessibility some rat thymus DNA sites for EcoRI-restriction varies depending on the interval after a single  $\gamma$ -irradiation *in vivo*. At a first hours for 5 Gy the sign-opposite effects for the fragments 1500 and 345 b. p. are occurred-increasing and decreasing of the relative portions accordingly — with the returning to initial restriction level to 24-th hour. The doze 0,5 Gy causes a similar genome's reaction in terms of restriction accessibility, but the manifestation occurred only in a day.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маннатиц Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—479 с.
2. Lapeyre J.-N., Becker F. F. Analysis of highly repeated DNA sequences of rat with EcoRI endonuclease // *Biochim. et biophys. acta.*—1980.—607, N 1.—P. 23—35.
3. Pech M., Igo-Kemenes T., Zachau H. G. Nucleotide sequence of highly repetitive component of rat DNA // *Nucl. Acids Res.*—1979.—7, N 2.—P. 417—432.
4. Личина М. В., Костюк Г. В., Митрохин Ю. И., Шугалий А. В. Рестрикционный анализ ДНК тимуса и селезенки крыс,  $\gamma$ -облученных в дозе 5 Гр // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 1.—С. 31—36.
5. Спитковский Д. Д., Зборовская И. Б., Киселева Ф. А. Транскрипция клеточных онкогенов в опухолях человека // *Молекуляр. биология.*—1986.—20, № 5.—С. 1409—1421.
6. Philipsen P., Streeck R. E., Zachau H. G. Defined fragments of calf, human and rat DNA produced by restriction nucleases // *Eur. J. Biochem.*—1974.—45, N 2.—P. 479—488.
7. Lücke-Huhle C., Herrlich P. Radiation-induced amplification of viral DNA sequence integrated in the genome of chinese hamster embryo cells // *Int. J. Rad. Biol.*—1986.—49, N 4.—P. 702—703.
8. Lücke-Huhle C., Pech M., Herrlich R. Selective gene amplification in mammalian cells after exposure to  $^{60}\text{Co}$ ,  $\gamma$ -rays,  $^{241}\text{Am}$ - $\alpha$  particles or UV light // *Rad. Res.*—1986.—106, N 2.—P. 345—355.
9. Фонарев А. Б., Шугалий А. В., Папина Р. И., Тодоров И. Н. О структурных особенностях ДНК печени крыс в процессе ингибирования белкового синтеза циклогексимидом // *Биохимия.*—1985.—50, № 7.—С. 1162—1166.
10. Личина М. В., Фонарев А. Б., Сидоренко Л. И. и др. Амплификация фрагментов генома при действии *in vivo* ингибитора белкового синтеза и гепатоканцерогена // Структура и функция клеточного ядра: IX Всесоюз. симп.—Черноголовка, 1987.—С. 233.
11. Когал Дж. Биологические эффекты радиации / Под ред. А. Н. Деденкова.— М.: Энергоатомиздат, 1986.—184 с.

Ин-т хим. физики в Черногловке РАН,  
Черноголовка Моск. обл.

Получено 05.05.94