

16. Perera D. R., Glasunov A. V., Glaser V. M., Borelko A. V. *Molec. Gen. Genet.*, 213, 421—424, 1988.
17. Clancy S., Mann C., Davis R. W., Calos M. P. *J. of Bacteriol.*, 159, 3, 1065—1067, 1984.
18. Symington L. S., Morrison P., Kolodner R. *J. Mol. Biol.*, 186, 3, 515—525, 1985.
19. Webb M. B. T., Debenham P. *Int. J. Radiat. Biol.*, 48, 3, 458, 1985.
20. Kobayashi I., Takahashi N. *Genetics*, 119, 4, 751—757, 1988.
21. Kolowski K. S., Szalay A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 15, 5578—5582, 1986.
22. Thacker J. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50, 1, 1—30, 1986.
23. Roth D., Wilson J. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 10, 3355—3359, 1985.
24. Cox R., Masson N. K., Debenham P. G., Webb M. B. *J. British J. of Cancer.*, 49, 6, 67—72, 1984.
25. Bennett D. A., Smigajski A. C., Cantarini—Cicco R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6, 1762—1766, 1986.
26. Radford I. R. *Int. J. Radiat. Biol.*, 52, 4, 555—563, 1987.

Получено 26.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армении, № 9—10, (42), 1989

УДК 577.391/575.113:575.85.

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ОРГАНИЗМОВ ПО РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Б. И. САРАПУЛЬЦЕВ, С. А. ГЕРАСЬКИН

Всесоюзный НИИ сельскохозяйственной биологии, г. Обнинск

Դեմոսի կառուցվածքային կազմակերպումը հանդիսանում է առաջատար գործակերպ մեկը որը ընտրողում է օրգանիզմների ինչպես միջտեսակային, այնպես ներտեսակային զիջերենցիացիան՝ ըստ ադապտացիոնային մակարդակի: Օրգանիզմների ադապտացիոն տարտևմիայի արդյունքները արտացոլում են որդի գենետիկական ապարատի հուսարկության հերթադիտիկ համակարգի կազմավորման հարթական փուլերը և վկայում են այդ պրոցեսների ֆունկցիոնալ նշանակության մասին Ծրկրի վրա կյանքի էվոլյուցիայում:

Structural organization of genome is one of the leading factors, defining not only interspecific, but also intraspecific differentiation of organisms by the level of radioresistance. Results of radiation taxonomy of organisms reflect successive stages of formation of hierarchie system of safety of the cell genetic apparatus and testify the fundamental importance of these processes in the evolution of life on the Earth.

В основе современных представлений о действии ионизирующих излучений на биологические объекты лежат принципы попадания и мишеней, постулирующие квантовый и вероятностный характер поражения критических структур клетки. Сформулированные в общем виде Дессауэром (1922 г.) и Кроузером (1924 г.) и получившие развитие в работах Н. В. Тимофеева-Ресовского [1], эти принципы способствовали превращению радиобиологии в одну из наиболее точных биологических дисциплин. Успехи, достигнутые в последние годы, позволили в полной мере оценить фундаментальный характер и важнейшую методологическую роль сформулированных в работах Н. В. Тимофеева-Ресовского принципов анализа радиационного поражения биологических объектов.

Именно эти принципы стали теоретической основой сравнительного изучения радиорезистентности широкого круга живых организмов.

В радиобиологии накоплен и в значительной степени систематизирован обширный фактический материал, свидетельствующий о разнообразии ответных реакций живых систем с различной структурной организацией генома на действие ионизирующих излучений. Парадоксальность проблемы радиорезистентности при этом заключается в том, что устойчивость к действию радиации присуща всем без исключения известным организмам, однако реально выявляется только в специальных экспериментах с применением мощных искусственных источников ионизирующих излучений. Более того, наблюдаемые уровни радиорезистентности, очевидно, не являются результатом адаптации к действию естественного радиационного фона как фактора отбора устойчивых генотипов, поскольку даже с учетом возможности его 10^1 — 10^2 -кратного варьирования на поверхности Земли и, вероятно, имевших место в некоторые геологические эпохи радиационных аномалий [2], поглощенные в течение клеточного цикла дозы (2×10^{-7} Гр/60 мин) не идут ни в какое сравнение с дозами, которые могли бы приводить к гибели даже наиболее радиочувствительных вирусов (10^3 Гр), бактерий (10^2 Гр), дрожжей (10^1 Гр) и клеток высших эукариот (10^0 Гр). По существующим оценкам [3], на территории США и Европы даже после увеличения радиационного фона за счет антропогенных источников (ядерные технологии, выпадение радионуклидов после испытания ядерного оружия, медицинская техника и др.) до 0,054 Гр/год, лишь незначительная часть генетических нарушений (не более 6% от общего числа спонтанных мутаций) может быть отнесена к действию радиационного фактора. В этой связи закономерен вопрос о механизме возникновения и истинном предназначении этого удивительного свойства живых систем. Является ли устойчивость к действию ионизирующих излучений не более чем любопытным лабораторным феноменом, или же радиобиологи действительно имеют дело с одной из фундаментальных характеристик живых самореплицирующихся систем? Ответ на этот принципиальный вопрос может быть получен только в случае выяснения генетических механизмов формирования этого загадочного свойства биологических систем в ходе прогрессивной эволюции. Если радиорезистентность организмов действительно является фундаментальной характеристикой генетического аппарата клетки, то результаты радиационной таксономии несомненно должны отражать основные этапы структурной реорганизации генома в ходе прогрессивной эволюции.

Уже в пионерских работах Терзи [4] и Каплана, Мизеса [5] была обнаружена корреляция между радиорезистентностью вирусов, бактерий, дрожжей, культур клеток эукариот и содержанием в них нуклеиновых кислот. Дальнейшее развитие это направление получило в работах Спэрроу [6], который, исследуя зависимость радиорезистентности от объема интерфазных хромосом, разделил выборку из 79 организмов на 8 групп, названных им «радиотаксонами». Однако в одни и тот же радиотаксон попадали организмы, принципиально отличающиеся по структурной организации генома, а в разных радиотаксонах оказыва-

лись близкородственные организмы. На основании этого Спэрроу пришел к выводу о том, что радиотаксономия не имеет отношения к биологической систематике и не отражает эволюционных преобразований генома. Однако Шальнов [7], основываясь на данных о содержании нуклеиновых кислот, структурной организации генома и эффективности ферментативной репарации ДНК, выделил 6 радиотаксонов, принципиально соответствующих эволюционным изменениям структурно-функциональной организации живых систем. Идея М. И. Шальнова получила развитие в работах ближайшего сотрудника Н. В. Тимофеева-Ресовского—В. И. Корогодина [8, 9], в которых в качестве радиотаксонов рассмотрены группы организмов с близкой удельной надежностью генома.

Следует отметить, что использованный в работах [4—9] способ объединения биологических объектов в радиотаксоны с помощью линейной регрессии не позволял применять количественные критерии для определения истинного числа радиотаксонов, необходимых для аппроксимации экспериментальных данных. При отсутствии объективных критериев каждый автор определял количество радиотаксонов исключительно из соображений принимаемой им концепции. Субъективность такого подхода привела не только к выделению разного числа радиотаксонов (три—у Капелана и Мозеса [5], четыре—у Терзи [4] и Корогодина [8, 9], шесть—у Шальнова [7] и восемь—у Спэрроу [6]), но и явилась основной причиной существенно различной содержательной интерпретации результатов радиационной таксономии.

Указанные недостатки позволяют избежать методы объективной компьютерной классификации. В этом случае результаты радиационной таксономии оцениваются с двух точек зрения: удачно ли разделены экспериментальные данные (внутренний критерий качества классификации) и сохраняются ли выявленные закономерности на других независимых выборках биологических объектов (внешний критерий качества классификации или непротиворечивости). Внутренний и внешний критерии являются независимыми и не сводятся друг к другу.

В качестве внутреннего критерия нами предложено использовать величину нормированной внутритаксоновой дисперсии T [10]:

$$T = nRSS(=)/(N - n),$$

где N —объем выборки тестируемых организмов, n —число выделяемых кластеров (сложность модели).

Полученные решения тем точнее описывают структуру взаимосвязей исследуемых объектов, чем меньше величина T . Характерной особенностью критерия T , выгодно отличающей его от других точностных критериев, является наличие интервалов, на которых его значения остаются практически неизменными. При этом участки кривой $T(n)$, параллельные оси абсцисс, соответствуют кластерным моделям, увеличение сложности которых не компенсируется соответствующим уменьшением среднеквадратической ошибки, т. е. свидетельствуют об однородности структуры в этих интервалах сложности кластерных моделей. В соответствии со второй теоремой Шеннона [11] из решений, объясня-

ющих одинаковую долю остаточной дисперсии, выбирается содержащее наименьшее количество кластеров (радиотаксонов).

Метод объективной компьютерной классификации был использован для анализа экспериментальных данных, на основе которых Спэрроу сформировал концепцию 8-ми радиотаксонов [6], и сформированной нами независимой выборки, включающей 183 различных организма от вирусов до клеток высших эукариот (рис. 1).

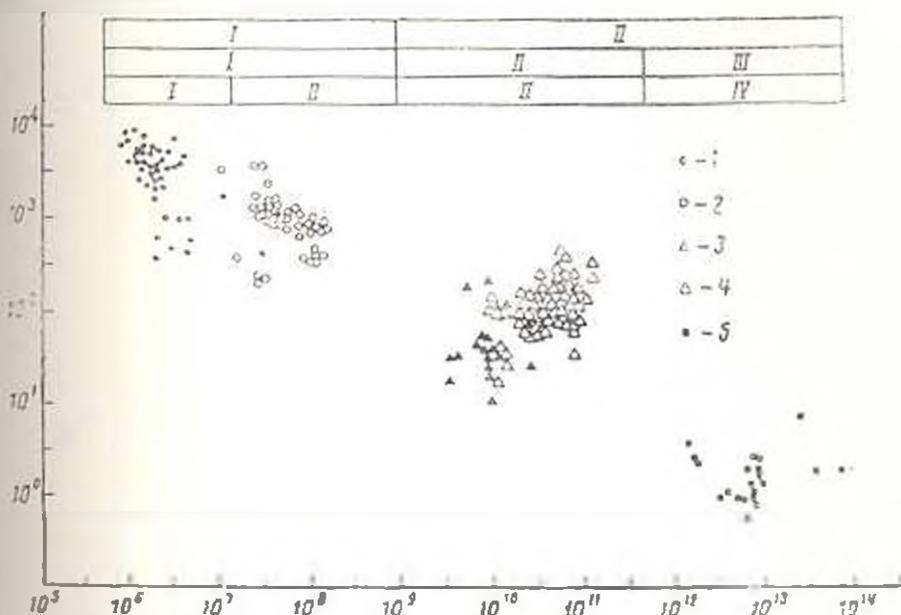


Рис. 1. Радиорезистентность клеток 183 организмов с различным содержанием пуриновых кислот в геноме. 1—вирусы с одноцепочечной ДНК (РНК); 2—вирусы с двуцепочечной ДНК; 3—бактерии; 4—грибы, водоросли; 5—высшие растения и животные (культуры клеток). По оси абсцисс—молекулярная масса ДНК (РНК), Дальтоны; по оси ординат—величина D_0 , Гр.

Из рис. 2 видно, что изменения критериев таксономии и перебор кластеризаций по критерию непротиворечивости свидетельствуют о существовании нескольких поддающихся интерпретации решений в виде двух, трех и четырех таксонов, удовлетворяющих внутреннему и внешнему критериям качества классификации. Решение в виде семи кластеров, полученное на выборке Спэрроу (рис. 2), не подтверждается критерием непротиворечивости и из дальнейшего рассмотрения исключено.

Полученные кластерные решения имеют четкий биологический смысл и поддаются содержательной интерпретации. Решение, содержащее 2 радиотаксона, отделяет вирусы от остальных организмов, содержащее 3 радиотаксона—вирусы, прокариоты и эукариоты. Выделение 4 радиотаксонов приводит к разделению одно- и двуцепочечных вирусов, прокариот и эукариот. Анализ результатов автоматической классификации позволяет сделать вывод о принципиально важном свойстве радиотаксонов—их иерархичности, которую можно определить как последовательность вложенных разбиений, каждое из которых имеет ясный биологический смысл. Полученная классификация

характеризуется не только сходством входящих в радиотаксоны организмов, но и положением в иерархическом древе общепринятой систематики, что свидетельствует об общеприимчивости радиационной таксономии, непосредственно отражающей основные этапы структурных преобразований генома в ходе эволюции.

Выявленные при анализе радиорезистентности организмов с различной структурной организацией генома закономерности не позволяют ответить на вопрос о роли размеров генома в формировании диф-

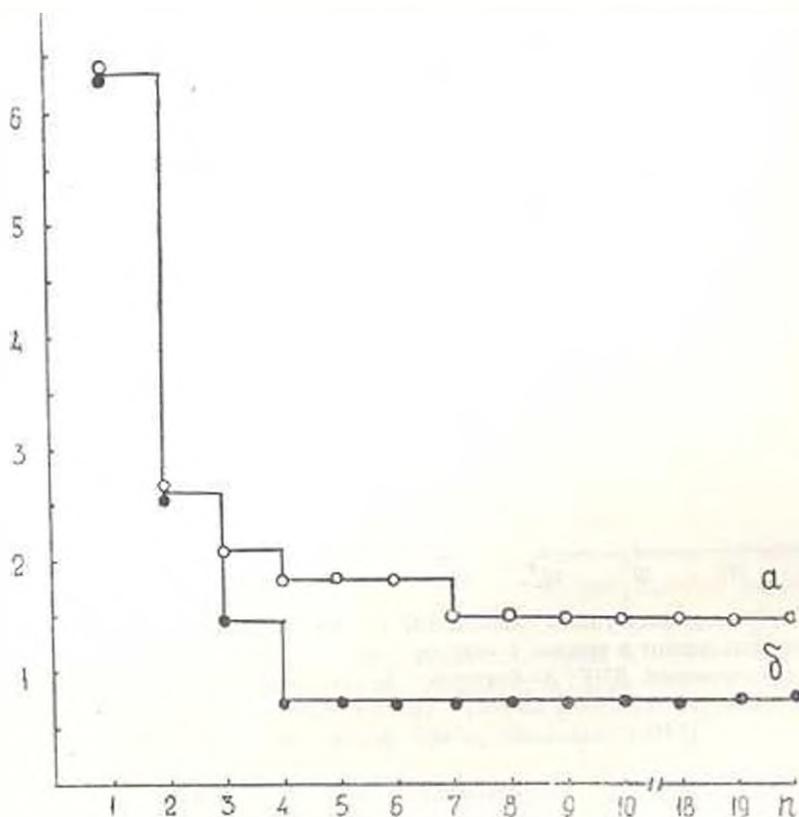


Рис. 2. Определение подлежащих выделению кластерных решений при радиотаксономии клеток 79 организмов — выборка Спэрроу [6] — (а) и клеток 183 организмов — независимая выборка [10] — (б). По оси абсцисс — число выделяемых кластеров; по оси ординат — величина критерия таксономии.

ференциальной радиорезистентности видов и ее связи с филогенезом среди организмов с одинаковой структурной организацией генетических систем. Полученные в ходе радиотаксономии эукариотических клеток результаты [4—10] позволяют с большой вероятностью предположить существование в рамках 4-го радиотаксона дополнительных уровней иерархии. Среди эукариотических организмов наибольшей изученностью видового радиополиморфизма характеризуются высшие растения, что делает их удобным объектом для проверки высказанной гипотезы.

На рис. 3 представлены данные о соотношении радиорезистентности и содержания ДНК в ядре у 99 видов голо- (2 семейства) и покрытосеменных (3 семейства класса однодольных и 25 семейств класса

двудольных растений. Всего, с учетом разновидностей, сортов, линий, а также данных разных авторов об идентичных ботанических объектах, компьютерному анализу было подвергнуто 143 экспериментальные характеристики, отражающие варьирование межвидовой радиорезистентности в 400 раз при изменении содержания ДНК от 10^{12} до 10^{14} Дальтон.

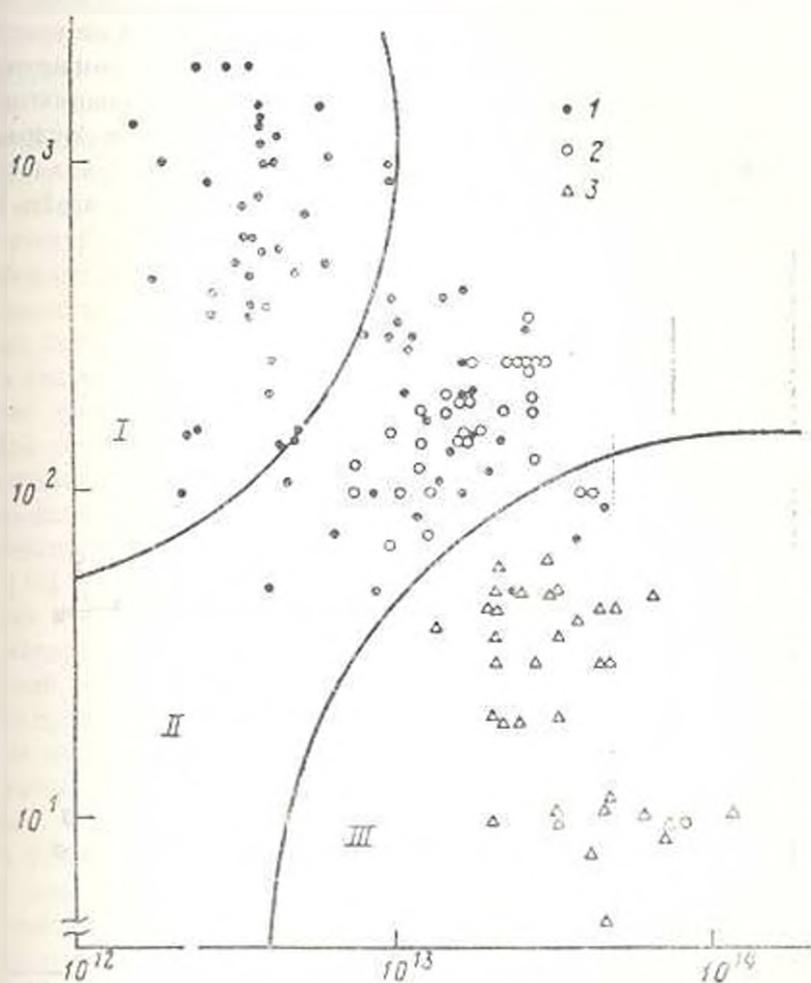


Рис. 3. Радиорезистентность в фазе покоящихся семян и содержание ДНК в геноме 143 представителей 99 видов высших растений (выборка Б. И. Сарапульцева и С. А. Гераскина [13]). По оси ординат—величина LD_{50} , Гр; по оси абсцисс—содержание ДНК в геноме, Дальтон.

На рис. 4 показано изменение критерия таксономии, указывающее на необходимость выделения двух уровней иерархии, соответствующих 2- и 3-кластерным моделям. Анализ полученных решений свидетельствует о том, что более древние виды отдела Голосеменных, являясь наиболее радиочувствительными и обладая высоким содержанием ДНК в геноме, ограничены рамками радиотаксона III. С продвижением по филогенетическому древу радиополиморфизм растений возрастает: представители класса однодольных формируют радиотаксон II, однако их наиболее древние виды (лилия, лук, крокоцвет) обнаруживаются в

радиотаксоне III среди наиболее радиочувствительных организмов; представители класса Двудольные формируют свой собственный радиотаксон I, объединяющий наиболее эволюционно продвинутые и радиорезистентные виды с низким содержанием ДНК в геноме, однако представители древних семейств (бобовые, пасленовые, мальвовые) присутствуют в радиотаксонах II и III. Аналогичные результаты были получены при радиотаксономии 64 видов высших растений в фазе вегетации [12]. Таким образом, анализ результатов объективной компьютерной классификации свидетельствует о связи выделенных радиотаксонов с филогенезом высших растений от голосеменных до одно- и двудольных покрытосеменных видов и позволяет сделать вывод о том, что и среди эукариотических организмов размеры генома продолжают играть важ-

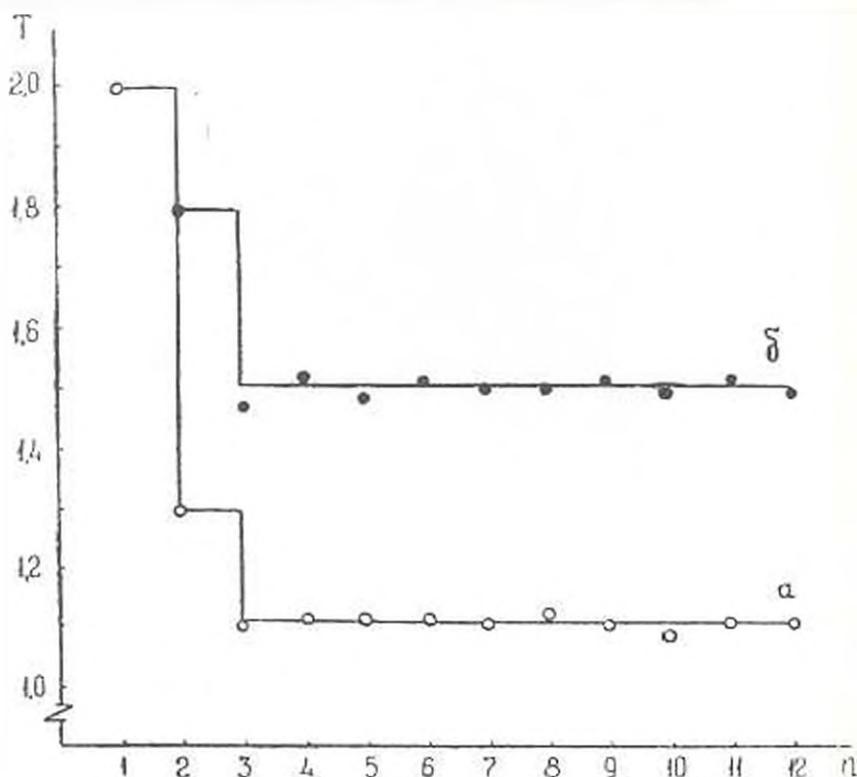


Рис. 4. Определение подлежащих выделению кластерных решений при радиотаксономии в фазе покоящихся семян (а) и вегетации (б). По оси абсцисс — количество выделяемых кластеров; по оси ординат — величина критерия таксономии.

ную роль в формировании радиорезистентности, позволяющую объяснить дифференциацию по этому признаку между отделами, классами и семействами высших растений.

В свете полученных результатов представлял интерес вопрос о возможности применения методов автоматической классификации на основе физических параметров ядра для интерпретации радиополиморфизма мелких таксономических групп. Однако проведенный нами компьютерный анализ 33 видов шавеля показал, что изменение критерия таксономии аналогично таковому при анализе нормально распределен-

ной случайной выборки, т. е. тестируемая выборка не содержит внутренней структуры, является гомологичной и не подлежит классификации на основе физических параметров клеточного ядра. Неэффективность предпринятой классификации при анализе уже внутривидового радиополиморфизма делает необходимой разработку качественно новых методических подходов для интерпретации экспериментально установленного внутривидового полиморфизма по радиорезистентности, регистрируемого на фоне константных параметров клеточного ядра. Вместе с тем иерархическая организация радиотаксонов, отражающая основные этапы структурной реорганизации генетических систем в ходе биологической эволюции, позволяет сформулировать гипотезу о том, что в основе внутривидового радиополиморфизма также лежат факторы структурной природы, связанные, однако, не с размерами генома, а с особенностями его тонкой структурной организации. В пользу этого свидетельствуют результаты анализа радиорезистентности нулли-тетрасомных линий пшеницы Чайниз Сириг, указывающие на различный вклад индивидуальных хромосом аллогексаплоидного генома в формирование уровней радиорезистентности анеуплоидных серий [14].

Для установления роли тонкой структурной организации генома в формировании внутривидового радиополиморфизма была использована модель контрастных сортов гексаплоидной пшеницы, уровни радиорезистентности которых различались в 2—5 раз [15]. Предложенный в работе [16] метод факторного анализа неравновесности по сцеплению аллелей гландинирующих и изоферментных локусов позволил выявить иерархическую организацию генетических систем, маркирующих геномный, хромосомный, кластерный и локусный уровни тонкой структурной организации генома аллогексаплоидной пшеницы. Классификацию 24 контрастных по радиорезистентности сортов в пространстве биохимических признаков проводили с помощью Q-техники факторного анализа. Результаты классификации свидетельствуют о том, что только на основании информации о полиморфизме гландинирующих генов, маркирующих различные уровни иерархии тонкой структурной организации генома, без использования радиобиологических тестов, возможно выделить дискретные и генетически гомогенные группы сортов с близкими уровнями радиационной устойчивости [17]. Факт сопряженности радиационного и биохимического полиморфизма однозначно указывает на важную роль тонкой структурной организации генетических систем в поддержании внутривидового радиационного полиморфизма.

Таким образом, получен целый ряд доказательств ведущей роли структурной организации генома как фактора межвидовой и внутривидовой дифференциации организмов по уровням радиационной устойчивости. Выявленное объективными методами соответствие основных этапов структурной реорганизации генома от «голых» одно- и двуцепочечных молекул нуклеиновых кислот вирусом до хроматинового комплекса ДНК высших эукариот, включая возможность внутривидовой дифференциации тонкой структурной организации их генома, экспериментально регистрируемым уровням радиорезистентности организмов и их

положению в иерархии радиотаксонов, очевидно, не является простым совпадением и отражает последовательные этапы формирования иерархической системы надежности генетического аппарата клетки. Результаты радиационной таксономии свидетельствуют о том, что радиорезистентность является фундаментальной характеристикой живых самореплицирующихся систем, позволяющей реконструировать наиболее вероятные пути эволюции генома с момента перехода автокаталитических арханцих прокариот к ферментативному катализу матричных процессов (радиотаксон 1), удвоения одноцепочечной молекулы ДНК и создания молекулярного механизма рекомбинации и репарации поврежденных кодирующих матриц (радиотаксон 2), совершенствования упаковки ДНК в нуклеоид прокариот с повышением эффективности репарации вследствие жесткой фиксации поврежденных цепей ДНК белковым матриксом (радиотаксон 3) и переходом к полихромосомным эукариотическим клеткам с максимальной степенью конденсации нуклеиновых кислот белками хроматина при параллельном создании и шлифовке молекулярного механизма сегрегации множественных компактизированных элементарных геномов—хромосом (радиотаксон 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимофеев-Ресовский Н. В., Иванов В. И., Коргодин В. И. Применение принципа попадания в радиобиологии, 228, М., 1968.
2. Неручаев С. Г. Природа, 1, 72—81, 1988.
3. Дубинин Н. П. Общая генетика, 559, М., 1986.
4. Terzi M. Nature, 191, 4787, 461—463, 1963.
5. Kaplan H. S., Moses L. E. Science, 145, 3627, 21—25, 1964.
6. Sparrow A. H., Underbrink A. G., Sparrow R. C. Radiat. Res., 32, 4, 915—945, 1967.
7. Шальнов М. И. Радиобиология, 17, 5, 652—671, 1977.
8. Корогодин В. И. Радиобиология, 22, 2, 147—154, 1982.
9. Корогодин В. И. Чтения памяти Н. В. Тимофеева-Ресовского (под ред. Атаян Р. Р.). Ереван, 27—40, 1983.
10. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 28, 2, 160—165, 1988.
11. Шеннон К. Работы по теории информации и кибернетике. 820, М., 1963.
12. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 29, 1, 100—107, 1989.
13. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Радиобиология, 29, 1, 94—99, 1989.
14. Сарпульцев Б. И. Докл. ВАСХНИЛ, 2, 7—10, 1989.
15. Корнеев И. А., Сарпульцев Б. И., Сарпульцев Б. И., Моргунова Е. А. и др. Радиобиология, 25, 6, 768—773, 1985.
16. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А. Сельскохозяйственная биология, 1, 76—82, 1989.
17. Сарпульцев Б. И., Гераськин С. А., Корнеев И. А. Докл. АН СССР, 305, 6, 1988.

Поступило 26.VI 1989 г.