

С.В. Марутян, Л.А. Навасардян, Г.Г. Бадалян, М.А. Шагинян

Седа Викторовна Марутян (✉), Липарит Айрапетович Навасардян

Кафедра биохимии, Ереванский государственный университет, ул. А. Манукян, 1, Ереван, Армения, 0025

E-mail: marsed@ysu.am (✉)

Гамлет Гургенович Бадалян

Кафедра физики, Ереванский государственный университет, ул. А. Манукян, 1, Ереван, Армения, 0025

E-mail: hbadal@ysu.am

Мариам Ашотовна Шагинян

Кафедра биофизики, Ереванский государственный университет, ул. А. Манукян, 1, Ереван, Армения, 0025

E-mail: m.shahinyan@ysu.am

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ДНК ДРОЖЖЕЙ

C. guilliermondii НП-4

Проведено исследование флуоресцентных и электрофоретических параметров, а также параметров плавления ДНК дрожжей Candida guilliermondii НП-4, подвергнутых рентгеновскому облучению и пострadiaционной репарации. Показано, что под влиянием рентгеновского облучения скорость насыщения ДНК бромистым этидием по сравнению с необлученной ДНК повышается, возрастает температура плавления ДНК, а интервал плавления уменьшается. После репарации скорость насыщения ДНК бромистым этидием и температура плавления ДНК становятся наивысшими, интервал плавления становится наименьшим, в электрофореграммах ДНК появляются дополнительные низкомолекулярные фракции, что говорит о возможных изменениях во вторичной и первичной структурах ДНК.

Ключевые слова: дрожжи, ДНК, рентгеновское облучение, репарация, флуоресценция, электрофорез, плавление ДНК

S.V. Marutyany, L.H. Navasardyan, G.G. Badalyan, M.A. Shaginyan

Seda V. Marutyany (✉), Liparit H. Navasardyan

Department of Biochemistry, Yerevan State University, A. Manukyan str., 1, Yerevan, Armenia, 0025

E-mail: marsed@ysu.am (✉)

Hamlet G. Badalyan

Department of Physics, Yerevan State University, A. Manukyan str., 1, Yerevan, Armenia, 0025

E-mail: hbadal@ysu.am

Mariam A. Shahinyan

Department of Biophysics, Yerevan State University, A. Manukyan str., 1, Yerevan, Armenia, 0025

E-mail: m.shahinyan@ysu.am

INFLUENCE OF X-RADIATION ON STRUCTURE OF DNA OF YEASTS *C. guilliermondii* NP-4

Investigation of fluorescence, electrophoretic and melting parameters of DNA of yeasts Candida guilliermondii NP-4 after X-radiation and postradiation repair was carried out. It was shown that under influence of X-radiation the rate of saturation of DNA by ethidium bromide and the melting temperature of yeast DNA was increased, and the melting interval was decreased. After repair period the rate of saturation of DNA by ethidium bromide and the melting temperature of yeast DNA were the highest, and the melting interval was the lowest, and in the electrophoregrams or repaired DNA there were additional low molecular fractions which testify about possible changes in DNA primary and secondary structures under influence of X-radiation and postradiation repair.

Key words: yeasts, DNA, X- ray radiation, repair, fluorescence, electrophoresis, DNA melting

ВВЕДЕНИЕ

Эукариотическая клетка представляет собой сложный механизм, который не может продолжить свою жизнедеятельность при появлении в его любом участке хоть малейшего повреждения. Любой вид ионизирующей радиации вызывает биологические изменения в организме. Поэтому одной из основных задач радиационной биохимии является выяснение молекулярных механизмов радиационных повреждений, которые приводят к хромосомным aberrациям, нарушению воспроизведения генетической информации и репродуктивной гибели клеток.

Среди актуальных вопросов современной радиобиологии наиболее важной является проблема радиационной устойчивости ДНК как главного звена наследственной системы [1, 2], с которой связывают мутагенный, канцерогенный и летальный эффекты действия ионизирующей радиации. В настоящее время установлены основные типы радиационных повреждений ДНК в клетке на молекулярном уровне. Если летальный эффект ионизирующей радиации связывают в основном с образованием двунитевых разрывов в ДНК клетки, то в процессах радиационного мутагенеза основная роль отводится нерепарируемым с помощью ферментных процессов повреждениям, представляющим собой модифицированные облучением основания ДНК [2].

С этой точки зрения важное значение имеет исследование хроматина и его отдельных компонентов, которое может способствовать выявлению тонких биохимических сдвигов в клетках при экстремальных условиях, в частности – при рентгеновском облучении.

В этом отношении важное значение имеет исследование физико-химических свойств хроматина дрожжей, весь геном которых находится в состоянии активного хроматина, т.е. напоминает часть суммарного хроматина высших эукариот [3]. Следовательно, дрожжевой хроматин может быть рассмотрен как удобная модель для исследования строения и организации активного хроматина эукариот [4].

В литературе имеется достаточная информация о методах выделения, очистки и исследования ДНК из различных объектов высших организмов, но такие данные по отношению дрожжей единичны [3] и вовсе отсутствуют относительно дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4.

Целью настоящей работы являлось сравнительное исследование флуоресцентных и электрофоретических параметров, а также параметров плавления ДНК дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4,

подвергнутых рентгеновскому облучению в стационарной фазе роста и последующей пострадиационной репарации в условиях, способствующих восстановлению повреждений клеток.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлись дрожжевые клетки *C.guilliermondii* НП-4, выращенные в жидкой культуральной среде [5].

Облучение дрожжевых клеток проводилось на рентгеновской установке Дрон 3. Напряжение на рентгеновской трубке составляло 27 кВ, анодный ток – 17 мА. Источником облучения послужил анод Cu, длина волны рентгеновского облучения составляла $1,54 \cdot 10^{-8}$ см, общая доза облучения – 45 кР.

Выделение и очистка ДНК из дрожжевых клеток было осуществлено по модификации [5] метода Мармура [6].

Исследование флуоресцентных параметров ДНК было осуществлено на флуоресцентном спектрофотометре FluoroMaxTM. В качестве флуоресцентного зонда нами был использован бромистый этидий. Были исследованы спектры возбуждения и флуоресценции комплексов бромистый этидий-ДНК, выделенной из необлученных, облученных и репарированных дрожжей *C.guilliermondii* НП-4. Обработка данных и построение графиков было осуществлено с использованием программы DM3000F.

Исследование электрофоретических параметров ДНК проводилось на 0.8% агарозном геле. В качестве электрофоретического буфера был использован однократный Трис-ацетатный буфер (1хТАЭ – 400мМ Трис-ОН, 0.5М EDTA, pH был доведен до 8 ледяной уксусной кислотой). Электрофорез проводили в агарозном геле длиной 18 см. Напряжение соответствовало 2 В на см межэлектродного расстояния (60 В). После электрофореза гель был окрашен флуоресцирующим красителем – бромистым этидием (2 мкг/мл, в течение 30 мин) и был просмотрен на хемископе под УФ-светом. Затем гель был сфотографирован на фотопленке Микрат-300 через красный фильтр в УФ-свете.

Исследование параметров плавления ДНК было проведено на спектрофотометре Рхе Unicam 8-100. Прогревание проводилось температурным программированием, с линейной скоростью роста 0,7 град/мин. Поглощение измерялось на программируемом счетчике HP97S. Измерения проводили в температурном интервале 50-100 °С. Ошибка измерений при регистрации температур составляла 0,025 °С, а для оптического поглощения – $5 \cdot 10^{-4}$ оп.ед. Температуры плавления была

определена по данным интегральной кривой плавления, соответствующих 0,5 значению 1- θ . Интервал температур плавления определялся на основании интегральной кривой плавления, точками пересечения касательной кривой плавления в точке плавления и осей [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нашими исследованиями было показано [8], что для ДНК, выделенной как из необлученных, так и облученных и подвергнутых пострадиационной репарации дрожжевых клеток, при постепенном повышении концентрации бромистого этидия в растворе ДНК наблюдается повышение интенсивности флуоресценции комплексов ДНК-бромистый этидий (ДНК-БЭ) до определенной концентрации красителя, после чего при дальнейшем повышении концентрации бромистого этидия в растворе ДНК больше не наблюдается изменение в интенсивности флуоресценции комплексов ДНК-БЭ. Концентрация бромистого этидия, которая характеризует состояние полунасыщения ДНК красителем, для ДНК из необлученных клеток составляет $C_{БЭ}:C_{ДНК} = 1:18$ (табл. 1), т.е. когда каждой 18 пар нуклеотидов ДНК соответствует одна молекула бромистого этидия.

Таблица 1

Флуоресцентные параметры комплексов бромистый этидий-ДНК дрожжей *C.guilliermondii*, подвергнутых рентгеновскому облучению ($p < 0,005$)
Table 1. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts *C.guilliermondii* irradiated by X-rays ($p < 0.005$)

	$C_{БЭ}, 10^{-6}M$	$C_{БЭ}:C_{ДНК}$
Необлученная ДНК	$4,67 \pm 0,2$	1:18
Облученная ДНК	$2,78 \pm 0,1$	1:22
Репарированная ДНК	$2,68 \pm 0,11$	1:24

Примечание: $C_{БЭ}$ – концентрация бромистого этидия в растворе, мкМ; $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – соотношение концентраций бромистого этидия и ДНК

Note: $C_{БЭ}$ – concentration of ethidium bromide in solution, μM ; $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – ratio of concentrations of ethidium bromide and DNA

Для облученной ДНК это состояние характеризуется значением $C_{БЭ}:C_{ДНК} = 1:22$, а для репарированной ДНК – $C_{БЭ}:C_{ДНК} = 1:24$. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДНК, выделенная из облученных клеток, насыщается бромистым этидием быстрее, чем необлученная, а для репарированной ДНК скорость насыщения красителем самая высокая среди исследованных вариантов.

Учитывая тот факт, что флуоресцентные свойства бромистого этидия меняются при его интеркаляции в двуспиральную часть молекулы

ДНК, можно заключить, что рентгеновское облучение дрожжевых клеток вызывает нарушение структуры ДНК, в частности, возникают однонитевые разрывы и, возможно, пиримидиновые димеры, что нарушает места связывания бромистого этидия в молекул ДНК и, таким образом, приводит к осложнению интеркаляции красителя, вследствие чего меньшее число молекул бромистого этидия связывается с ДНК, и меняются флуоресцентные параметры комплексов ДНК-бромистый этидий. В случае репарированной ДНК возможно, что после процесса репарации в ДНК остаются невосстановленные однонитевые разрывы, повреждения азотистых оснований, в том числе – ТТ-димеры, которые препятствуют внедрению бромистого этидия в молекулу ДНК. Как свидетельствуют литературные данные, области ДНК, несущие однонитевые разрывы, подвергаются атаке нуклеаз, которые переводят их в двунитевые разрывы, реализующиеся в структурные нарушения хромосом [9]. Таким образом, под влиянием рентгеновского облучения возможно образование различных повреждений вторичной и первичной структуры ДНК, в частности – однонитевые разрывы, которые при последующей инкубации облученных клеток могут привести к образованию двунитевых разрывов путем ферментативного допоражения. Можно предположить также, что вследствие облучения возникают дефекты также и в ферментах репарации, в частности, в ДНК-лигазном комплексе. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что в процессе репарации, помимо ожиданий, повышается степень поврежденности ДНК и в репарированной ДНК имеется большее число структурных повреждений, чем в облученной.

В следующем этапе работ было осуществлено исследование электрофоретических параметров ДНК выделенной из необлученных, облученных и репарированных клеток дрожжей [10]. Как свидетельствуют полученные данные (рис. 1), в электрофореграммах как необлученной (А), так и облученной (Б) ДНК обнаруживаются только высокомолекулярные фракции, которые лишь незначительно отличаются по подвижности. С другой стороны, для ДНК, выделенной из облученных клеток после 24 ч пострадиационной инкубации в жидкой питательной среде (репарированная ДНК) (В), по сравнению с необлученными клетками (А), помимо высокомолекулярной фракции ДНК (1) существуют еще 2 фракции (2, 3), обладающие сравнительно большей электрофоретической подвижностью, что говорит о возможных изменениях во вторичной и первичной структурах ДНК, индуцируемых рентгеновским излучением. Таким

образом, подтверждается возможность показанных нами ранее флуоресцентным методом нарушений в ДНК, которые влияют на процесс интеркаляции бромистого этидия в двуспиральную часть молекулы ДНК.

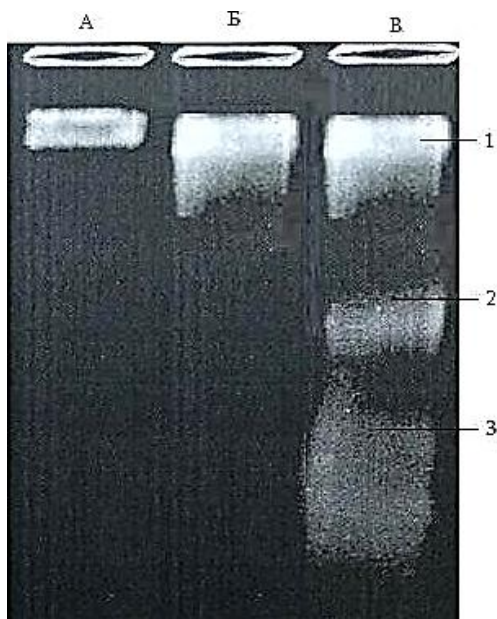


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4. А – необлученная ДНК, Б – облученная ДНК, В – репарированная ДНК, 1 – высокомолекулярная ДНК, 2 – низкомолекулярная ДНК, 3 – фрагменты ДНК

Fig. 1. Electrophoregrams of DNA of yeasts *Candida guilliermondii* NP-4. А – non-irradiated DNA, Б – X-irradiated DNA, В – repaired DNA, 1 – high molecular DNA, 2 – low molecular DNA, 3 – fragments of DNA

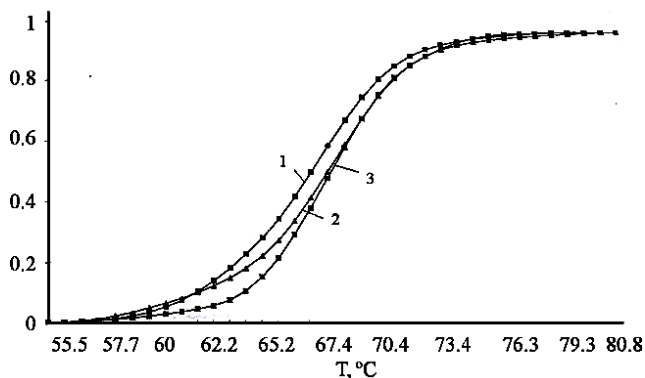


Рис. 2. Интегральная кривая плавления ДНК дрожжей *C.guilliermondii* НП-4. 1-необлученные клетки, 2-облученные клетки, 3- репарированные клетки

Fig. 2. Integral melting curve of DNA of yeasts *C.guilliermondii* НП-4. 1-non-irradiated cells, 2- irradiated cells, 3- repaired cells

Было проведено также сравнительное исследование параметров плавления ДНК дрожжей [11], подвергнутых рентгеновскому облучению и репарации (рис. 2). Как показывают полученные данные (табл. 2), для необлученной ДНК температура плавления составляет $T_m = 66,5$ °С, интервал

плавления – $\Delta T = 8,63$ °С. В случае облученной ДНК параметры плавления составляют $T_m = 67,17$ °С и $\Delta T = 8,33$ °С соответственно. Для дрожжевых клеток, подвергнутых пострadiационной репарации, температура плавления ДНК составляет $T_m = 67,4$ °С, а интервал плавления – $\Delta T = 7,73$ °С. Таким образом, полученные данные показывают, что температура плавления ДНК облученных дрожжевых клеток по сравнению с необлученными повышается примерно на 0,65 °С, в случае репарированных клеток эта разность по сравнению с необлученной ДНК составляет 0,9 °С, а по сравнению с облученными клетками – 0,23 °С. Интервал плавления после рентгеновского облучения по сравнению с необлученными клетками уменьшается на 0,3 °С, а по сравнению с репарированными клетками – на 0,9 °С.

Таблица 2
Параметры плавления ДНК дрожжей *C. Guilliermondii* НП-4, подвергнутых рентгеновскому облучению
Table 2. DNA melting parameters of X-irradiated yeasts *C.guilliermondii* NP-4

Клетки	Температура плавления, T_m , °С	Интервал плавления, ΔT , °С
Необлученные	$66,5 \pm 0,45$	$8,63 \pm 0,11$
Облученные	$67,17 \pm 0,43$	$8,33 \pm 0,2$
Репарированные	$67,4 \pm 0,14$	$7,73 \pm 0,1$

Таким образом, по сравнению с облученными клетками интервал плавления репарированных клеток уменьшается на 0,6 °С. Высокоочищенная ДНК клеток высших организмов содержит около 0,2-0,5% прочносвязанного белка. Этот факт указывает на возможность образования радиационно-индуцированных, ковалентных ДНК-белковых сшивок в ДНК облученных клеток. Такая связь может образоваться между основаниями ДНК и отдельными аминокислотами белков, например: тимин-алифатические аминокислоты, цитозин-тирозин и др. Учитывая тот факт, что в хроматине дрожжей *C.guilliermondii* НП-4 соотношение белок:ДНК составляет 1:12 [5], вероятность комплексообразования ДНК с белками увеличивается. Это обстоятельство может отразиться на процессе образования сшивок типа ДНК-белок в облученных дрожжевых клетках [12]. Факт появления таких сшивок является одним из наиболее вероятных объяснений наблюдаемого увеличения температуры плавления ДНК под влиянием рентгеновского облучения и пострadiационной репарации. Учитывая приведенные факты, можно заключить, что рентгеновское облучение дрожжевых клеток вызывает разнообразные стабильные структурные повреждения в молекуле ДНК, в том числе – односторонние разрывы, что нарушает ме-

ста связывания бромистого этидия, а также сшивки типа ДНК-ДНК и ДНК-белок, которые затрудняют процесс плавления ДНК. Образовавшиеся структурные изменения в ДНК, и в первую очередь – модификации оснований, делают их “неузнаваемыми” для ферментов системы репарации, и поэтому остаются неисправленными. С другой стороны, репарация облученных клеток, по-види-

мому, приводит к образованию двунитевых разрывов путем ферментативного допоражения. Это явление описано также в литературе и названо «неправильной или ошибочной репарацией» [9]. Не исключается также возможность изменений в ферментах репарации ДНК, в результате чего нарушается их нормальная деятельность и возможности клеток – исправить возникшие нарушения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Жижина Г.П.** // Современные проблемы радиобиологии. 1999. Т. 39. № 1. С. 41-48.
2. **Высоцкий В.И., Корнилова А.А., Самойленко И.И.** // Радиационная биология, Радиоэкология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 494-507.
3. **Hamsalo B.A., Rattner J.B., Davie J.R.** // J. Cell Biochem. 1982. N 6. P. 325.
4. **Lohr D., Hereford L.** // Proc.Nat.Acad. Sci. USA. Biochemistry. 1979. V. 76. N 9. P. 4285-4288.
5. **Navasardyan L.H.** Influence of different stress factors on protein fractions and DNA of yeasts. Dissertation for doctor degree on biological Sciences. Yerevan: Yerevan State University. 2003. 197 p.
6. **Marmur J.J.** // Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208.
7. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukian G.A., Karapetian A.T.** // Experimental and Molecular Medicine. 2001. V. 33. N 4. P. 205-208.
8. **Марутян С.В., Навасардян А.Л., Навасардян Л.А.** // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2015. Т. 58. Вып. 1. С. 5-8.
9. **Obe G., Natarajan A.T., Palitti F.** // Progr.: In Mutat. Res. 1982. N 4. P. 1-9.
10. **Навасардян Л.А., Марутян С.В.** // Вестн. МАНЭБ. 2001. Т. 6(42). Вып. 2. С. 56-58.
11. **Навасардян Л.А., Марутян С.В., Вардеванян П.О.** // Вестн. МАНЭБ. 2003. Т. 8. № 7. С. 55-58.
12. **Газиев А.И.** // Радиационная биология, радиоэкология. 1999. Т. 39. № 6. С. 630-638.

REFERENCES

1. **Zhizhina G.P.** // Sovremennyye problemy radiobiologii. 1999. V. 39. No 1. P. 41-48 (in Russian).
2. **Vysotskiy V.I., Kornilova A.A., Samoiylenko I.I.** // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. 1997. V. 37. N 4. P. 494-507 (in Russian).
3. **Hamsalo B.A., Rattner J.B., Davie J.R.** // J. Cell Biochem. 1982. N 6. P. 325.
4. **Lohr D., Hereford L.** // Proc.Nat.Acad. Sci. USA. Biochemistry. 1979. V. 76. N 9. P. 4285-4288.
5. **Navasardyan L.H.** Influence of different stress factors on protein fractions and DNA of yeasts. Dissertation for doctor degree on biological Sciences. Yerevan: Yerevan State University. 2003. 197 p.
6. **Marmur J.J.** // Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208.
7. **Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Manukian G.A., Karapetian A.T.** // Experimental and Molecular Medicine. 2001. V. 33. N 4. P. 205-208.
8. **Marutyanyan S.V., Navasardyan A.L., Navasardyan L.A.** // Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. 2015. V. 58. N 1. P. 5-8. (in Russian).
9. **Obe G., Natarajan A.T., Palitti F.** // Progr.: In Mutat. Res. 1982. N 4. P. 1-9.
10. **Navasardyan L.A., Marutyanyan S.V.** // Vest. MANEB. 2001. V. 6(42). N 2. P. 56-58 (in Russian).
11. **Navasardyan L.A., Marutyanyan S.V., Vardevanyan P.O.** // Vest. MANEB. 2003. V. 8. N 7. P. 55-58 (in Russian).
12. **Gaziev A.I.** // Radiatsionnaya biologiya, radioekologiya. 1999. V. 39. N 6. P. 630-638 (in Russian).

Поступила в редакцию 01.02.2016 г.

Принята к опубликованию 10.03.2016 г.