

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS  
CENTRAL BOTANICAL GARDENS  
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

# **CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION**

After Materials of I Regional Conference,  
Minsk, 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup> of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД  
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

# **Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция**

Материалы I Региональной научной конференции  
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск  
2001

УДК 582.31/9:581.17

Научные рецензенты:

В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)

З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:

В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,

Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

## **ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК ПЕРОКСИДАЗНЫМИ ОКСИДАНТАМИ АМИНОБИФЕНИЛОВ.**

Курченко В.П., Новиков Д.А., Спиридович Е.В.

220050, г. Минск, пр. Фр. Скорины, 4, Белгосуниверситет, биологический факультет, каф. биохимии. Тел: (017)277-18-34, факс: (017)277-55-35; e-mail: biochem@bio.bsu.unibel.by

---

Поступление аминобифенилов в ядра растительных клеток может приводить к их окислению по пероксидазному механизму с образованием продуктов реакции, способных вызывать сшивки ДНК-ДНК. Наличие заместителей в 3-их и 5-ых положениях аминобифенилов снижает степень генотоксичности продуктов их окисления.

**Введение.** Растения и микрофлора остаются на сегодняшний день самыми перспективными резервами в деле очистки биосферы от загрязнителей. Утилизация и биотрансформация ксенобиотиков растениями может иметь и негативную сторону – продукты биотрансформации некоторых веществ, в частности аминобифенилов, повреждая ДНК, проявляют генотоксичные свойства.

Среди аминобифенилов бензидин (БД) и ряд его метильных производных: 3,3'-диметилбензидин (ДМБД), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБД) с убывающей мутагенной активностью, практически не изучены в плане окисления этих веществ в растениях и механизма генотоксического действия продуктов их окисления.

Известно, что в корни гороха БД проникает через плазмолемму и клеточную оболочку цитоплазмы при сохранении архитектоники клетки, и локализуются в хроматине ядра, что может указывать на наличие определенных участков в хромосомах, реагирующих с бензидином или его метаболитами [1]. В ядре содержится пероксидаза (КФ 1.11.1.7), являющаяся у растений ключевым ферментом в детоксикации ксенобиотиков.

В связи с этим, целью наших исследований являлось изучение роли пероксидазного окисления в метаболической активации ряда аминобифенилов с убывающей мутагенной активностью и вскрытие механизма повреждений ДНК продуктами их окисления.

**Материалы и методы.** Пероксидазное окисление проводили в реакционной смеси, содержащей пероксидазу хрена (ПХ)

( $1,25 \times 10^{-9}$ М), 0,1М цитратно-ацетатный буфер (рН 5,5) и субстрат. Смесь инкубировали при 30°C, после чего реакция запускалась добавлением  $H_2O_2$  до конечной концентрации 1мМ. За ходом реакции следили по изменению оптической плотности реакционной смеси при  $\lambda=590$ нм (для БД), 655нм (для ТМБД), 460нм (для ДМБД). Пероксидазную активность определяли по начальной скорости реакции [2].

Спектральный анализ проводили на СФ-26 (“ЛОМО”, Россия) и “Specord”М-40 (“Carlzeiss”, ГДР).

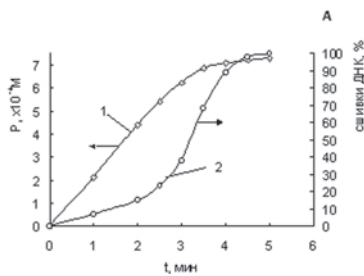
Электрофорез ДНК вели в 0,9% агарозном геле в трис-фосфатном буфере, содержащем бромистый этидий 0,5мг/мл при напряжении 5В/см<sup>2</sup>. Для нанесения проб использовали буфер, содержащий бромфеноловый синий [3]. В лунку вносили 0,5мкг ДНК.

Метод гель-хроматографии [4] использовали для разделения и очистки ДНК, участвовавшей в пероксидазном окислении БД. В качестве сорбента использовали Toyopearl HW-75 (Тоjo Soda, Япония). Хроматографию вели в 25мМ трис-НСl (рН 7,5) при скорости элюции 20мл/ч.

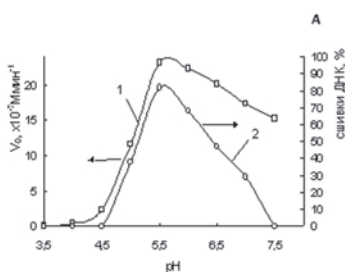
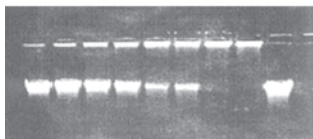
**Результаты и их обсуждение.** В ходе пероксидазного окисления аминобифенилов образуются электрофильные продукты, основное количество которых приходится на диимины, представляющие собой бифункциональные реагенты потенциально способные вызывать межнитевые сшивки ДНК и перекрестные сшивки ДНК-ДНК.

Установлено, что в условиях проведения пероксидазного окисления БД оптическая плотность данной системы на протяжении 3 минут возрастает прямо пропорционально времени инкубации реакционной среды, после чего постепенно выходит на плато (рис.1.А.1). При этом график, отражающий процесс образования сшивок ДНК (рис.1.А.2) во времени имеет S-образную форму. На фореграмме данный процесс выражается в увеличении количества ДНК на старте (рис.1.В).

Постепенное увеличение рН в системе пероксидазного окисления бензидина ведет к росту начальной скорости реакции (рис.2.А.1). Максимальная скорость данного процесса достигается при рН 5,5. При дальнейшем увеличении рН наблюдается снижение скорости реакции пероксидазного окисления БД. В этом случае кривая, отражающая процесс образования сшивок ДНК от изменения рН среды инкубации имеет куполообразную форму с



1 2 3 4 5 6 7 8 9 В



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 В

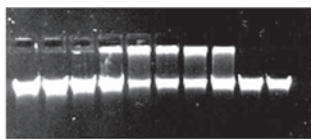


Рис. 1. Зависимость скорости образования продуктов пероксидазного окисления БД (А1) агрегированной на старте ДНК (А2, В) от времени реакции.

В - нативная ДНК (9), ДНК + БД (1 - 8). ДНК - 0,5мкг, [БД] -  $5 \times 10^{-5}$ М, [ПХ] -  $1,25 \times 10^{-9}$ М,  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  -  $10^{-3}$ М, t - дор.

1 - 1мин, 2 - 2мин, 3 - 2мин

30сек, 4 - 3мин, 5 - 3мин

30сек, 6 - 4мин, 7 - 4мин

30сек, 8 - 5мин.

Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции окисления БД (А1) и агрегированной на старте ДНК (А2, В) от рН реакционной среды.

В - дор. 1, 10 - нативная ДНК;

дор. 2 - 9 - ДНК + БД. ДНК - 0,5мкг, [БД] -  $5 \times 10^{-5}$ М, [ПХ] -  $1,25 \times 10^{-9}$ М,  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  -  $10^{-3}$ М,

t - дор. 2 - рН=4,0; 3 - рН=4,5;

4 - рН=5,0; 5 - рН=5,5;

6 - рН=6,0; 7 - рН=6,5;

8 - рН=7,0; 9 - рН=7,5.

максимумом при рН реакционной среды равной 5,5. Процесс образования аддуктов ДНК наблюдается только в диапазоне рН от 5,0 до 7,4 (рис.2.В, дор.4-8).

Рост концентрации БД в реакционной среде ведет к увеличению начальной скорости реакции пероксидазного окисления данного канцерогена (рис.3.А.1). Процесс образования шивков ДНК начался при концентрации БД в реакционной среде  $6 \times 10^{-6}$ М (рис.3.В, дор.4). Стопроцентное повреждение ДНК в данных условиях наблюдалось при концентрации бензидина равной  $2 \times 10^{-5}$ М (рис.3.В, дор.7).

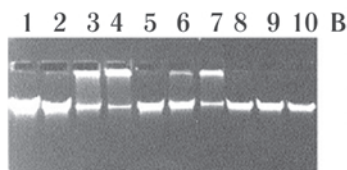
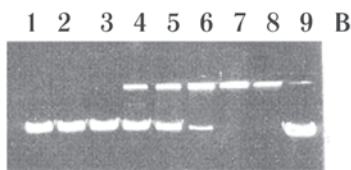
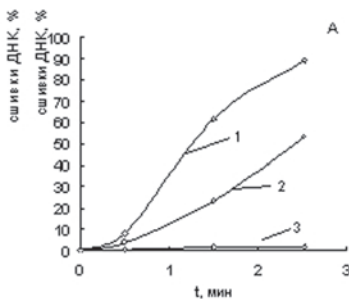
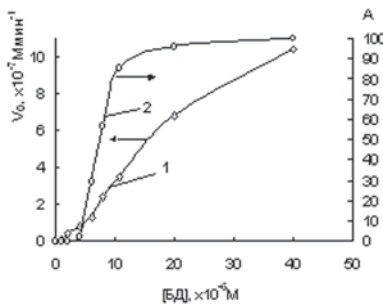


Рис. 3. Зависимость начальной скорости реакции окисления БД (A1) и агрегированной на старте ДНК (A2, B) от концентрации бензидина. В - дор. дор. 9 – нативная ДНК, 1 - 8 – ДНК + БД (1 - БД= $10^{-6}$ М; 2 - БД= $2 \times 10^{-6}$ М; 3 - БД= $4 \times 10^{-6}$ М; 4 - БД= $6 \times 10^{-6}$ М; 5 - БД= $8 \times 10^{-6}$ М; 6 - БД= $10^{-5}$ М; 7 - БД= $2 \times 10^{-5}$ М; 8 - БД= $4 \times 10^{-5}$ М).

Рис.4. Агрегация ДНК различными субстратами. А – БД (1), ДМБД (2), ТМБД (3). В - дор.1 – ДНК, 2 – 4 – ДНК + БД + ПХ +  $H_2O_2$ , 5 – 7 – ДНК + ДМБД + ПХ +  $H_2O_2$ , 8 – 10 – ДНК + ТМБД + ПХ +  $H_2O_2$ ; дор. 2, 5, 8 – 30сек инкубации; дор. 3, 6, 9 – 1,5мин; дор. 4, 7, 10 – 2,5мин.

Наибольшей способностью повреждать ДНК в ряду БД (рис.4, дор.2-4), ДМБД (рис.4, дор.5-7) и ТМБД (рис.4, дор.8-10) обладает бензидин. При увеличении числа метильных заместителей в молекуле аминобифенила их способность модифицировать ДНК уменьшается.

Взаимодействие ДНК с промежуточными продуктами пероксидазного окисления аминобифенилов ведет к снижению оптической плотности реакционной среды, что связано с уменьшением образования и накопления конечных окрашенных продуктов ре-

акции, характерных для пероксидазного окисления бензидина и его производных. В связи с этим нами было проведено исследование влияния ДНК на процесс пероксидазного окисления исследуемых аминобифенилов. Установлено, что вне зависимости от количества ДНК, находящейся в реакционной среде, скорость окисления ДМБД и ТМБД изменяется значительно меньше, чем при окислении БД. Это свидетельствует о том, что электрофильные продукты окисления ДМБД и ТМБД не способны эффективно взаимодействовать с ДНК из-за наличия метильных групп в 3 и 5 положениях. Скорость же окисления БД в присутствии ДНК значительно снижается. При этом концентрация ДНК, необходимая для снижения начальной скорости пероксидазного окисления БД на 50% составляет 1 мг/мл.

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать свойства ДНК, находившейся в системе пероксидазного окисления бензидина. Выделенная из реакционной среды ДНК подвергалась гель-хроматографии на колонке (Toyopearl HW-75, 1,5x50см), при этом взаимодействие ДНК с оксидантами БД приводит к увеличению ее молекулярной массы, в результате чего ДНК элюируется при гель-хроматографии значительно раньше контрольной. Электронный спектр поглощения ДНК, выделенной из реакционной среды окисления БД и очищенной методом гель-хроматографии, помимо максимума поглощения на 260нм, характерного для нативной ДНК, содержит дополнительный пик на 295нм, характерный для бензидина [5]. Установлено, что пероксидазные оксиданты БД ковалентно модифицируют каждое двадцать шестое основание ДНК.

Кривая теплопоглощения ДНК из тимуса теленка резко асимметрична и на ней хорошо различимы, по крайней мере, четыре пика, характеризующих плавление сателлитных фракций ДНК с высоким содержанием гуанин-цитозиновых пар (ГЦ-пар). При модификации ДНК бензидином наблюдается исчезновение ГЦ-богатых сателлитных фракций. Обработка же ДНК ТМБД не приводит к появлению каких-либо изменений в кривых теплопоглощения по сравнению с контрольной ДНК. Это свидетельствует о том, что БД взаимодействует преимущественно с ГЦ-парами в протяженных участках. Энтальпия денатурации ДНК после экспозиции к БД падает до 18,6 кДж/мпо (53% денатурации), в тоже время реакция с участием ТМБД не влияет на энтальпию денатурации ДНК (табл. 1).



**Таблица 1.**  
**Влияние пероксидазных оксидантов аминобифенилов**  
**на свойства ДНК**

	$\Delta H$ , кJ	$T_m$ , °C	Денатурация, %	[Q] <sub>275</sub>	[Q] <sub>245</sub>
ДНК	39,9	82,0	0	8210	9950
ДН+БД	18,6	82,1	53,4	5710	6320
ДН+ДМБД	24,1	81,9	39,6	6350	4620
ДН+ТМБД	39,2	81,9	0	9590	9010

Значительная денатурация ДНК, модифицированной БД видна также из спектров кругового дихроизма по снижению значений молярной эллиптичности при 245 и 275 нм, характеризующих нативное состояние ДНК. Для ДНК, обработанной ТМБД, такого эффекта не наблюдалось.

На примере БД, являющегося сильным мутагеном [5], было предложено объяснение агрегации с ДНК. При действии пероксидазы и  $H_2O_2$  на БД, образуется первичный радикал, затем диимин (рис.5). Монопротонированный диимин БД реагирует с пуринами ДНК, что приводит к образованию пятичленного гетероциклического кольца, которое включает  $N_7$  и  $C_8$  атомы пурина,  $C_3$  и аминогруппа бензидина. Пятичленное кольцо затем раскрывается, образуя пуриновый аддукт. На следующем этапе может окисляться незамещенная аминогруппа N-(дезоксигуанозил-8-ил)-БД, которая в свою очередь взаимодействует с другими пуринами, приводя к агрегации ДНК.

Из предложенной схемы вытекает, что способность аминобифенилов взаимодействовать с ДНК зависит от наличия заместителей в 3,3'-положениях (ДМБД), обладающих меньшей мутагенной активностью и 3,3',5,5'-положениях (ТМБД), не проявляющие мутагенной активности.

Таким образом, поступление аминобифенилов в ядро и последующее их окисление по пероксидазному механизму может приводить к образованию сшивок ДНК-ДНК. При этом наличие заместителей в третьих и пятых положениях этих ксенобиотиков снижает генотоксическое действие продуктов их окисления.

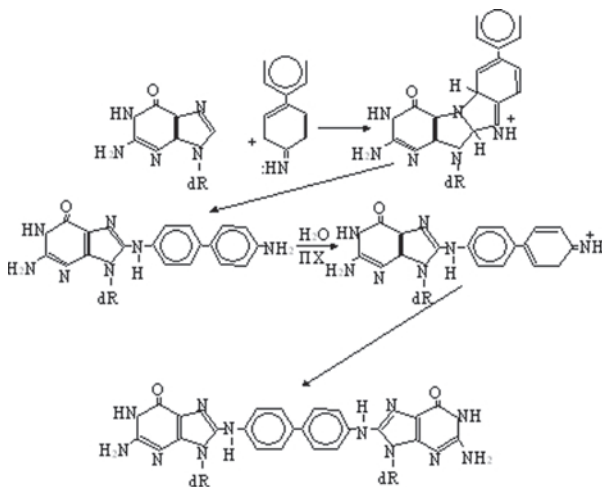


Рис.5. Механизм образования ДНК-БД аддукта с последующим образованием перекрестной сшивки.

### Литература

- 1 Дурмишидзе С.В., Джикиян А.Н., Ломидзе Э.П. Усвоение и превращение бензидина высшими растениями в стерильных условиях. — ДАН СССР, 1979. — Т.247, №1. — С.244-247.
- 2 Исмаил И. Роль пероксидазного окисления в метаболической активации бензидина и его канцерогенных производных: Автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Инст. Радиобиол. НАНБ. — Мн., 1992. —35с.
- 3 Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. - М.: Мир, 1978 - 328с.
- 4 Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 1985 — 635с.
- 5 Канцерогенные вещества. Справочник // Материалы международного агентства по изучению рака. / Под ред. Турусова В.С. - М.: Медицина, 1987. — 273с.

### Summary

Penetration of aminobiphenils into plant cells nuclei leads to them oxidation on the peroxidase mechanism. Compounds formed in result this process capable to link of DNA-DNA. Substitutes in 3,3' and 5,5' states of aminobiphenils decrease degree of the genotoxic action of oxidation products.