УДК [577.112.823:542.934.8:615.849.112]:001.891 (045)

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЦЕСС ДЕГИДРАТАЦИОННОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ ГИСТОНА Н1

¹Брилль Г.Е., ¹Егорова А.В., ¹Бугаева И.О., ²Дубовицкий С.А., ²Власкин С.В., ³Постнов Д.Э.

¹ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, e-mail: meduniv@sgmu.ru; ²OOO «Телемак», Саратов;

³ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», Саратов

Исследовано влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на процесс дегидратационной самоорганизации линкерного гистона Н1. Для изучения процесса структурообразования гистона Н1 использовался метод клиновидной дегидратации, основанный на исследовании структурного следа (фации), формирующегося при высыхании капли препарата в стандартных условиях. Имидж-анализ фаций включал их качественную характеристику, а также расчёт количественных показателей с последующей статистической обработкой. Установлено, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение частотой 1 ГГц, плотностью мощности 0,1 мкВт/см², воздействующее в течение 10 мин, оказывает существенное модифицирующее влияние на структурообразовательные свойства линкерного гистона. Фации контрольных и облучённых образцов отличались по большинству качественных и количественных параметров. Это предопределяет возможность вовлечения генетического аппарата клетки в реализацию эффектов данного вида излучения на биологические объекты.

Ключевые слова: линкерный гистон Н1, структурообразование, УВЧ-излучение

EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION ON DEHYDRATION SELF-ASSEMBLY OF LINCER HISTONE H1

¹Brill G.E., ¹Egorova A.V., ¹Bugaeva I.O., ²Dubovitsky S.A., ²Vlaskin S.V, ³Postnov D.E.

¹Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail, meduniv@sgmu.ru; ²«Telemak» Inc., Saratov;

³Saratov State University. n.a. N.G. Chernyshevsky, Saratov

The analysis of influence of low-intensity electromagnetic radiation on the processes of self-assembly of lincer histone H1 was performed. To study the structure formation of histone H1 wedge dehydration method was used, based on a study of the structural trace (facies), which is formed by drying drops in standard conditions. Image-facies analysis included their qualitative characteristics, as well as the calculation of quantitative indicators, followed by statistical analysis. It was established that UHF-Radiation (1GHz, 0,1 μ W/cm2, 10 min) significantly modifies the process of self-assembly of lincer histone. Facies control and irradiated samples differed on most qualitative and quantitative parameters. This determines the possibility of the involvement of the genetic apparatus of the cell in the effects of this type of radiation on biological objects.

Keywords: linker histone H1, self-organization, UHF-Radiation

Гистоны – щелочные белки, участвующие в структурной организации генетического аппарата клетки. Соединяясь попарно, гистоны отдельных фракций – Н2А, Н2В, Н3.2 и Н4 – формируют октамерный кор, на который «наматывается» молекула ДНК (146 нуклеотидных пар), образуя нуклеосому [4, 6]. Линкерный гистон Н1 соединяет места входа и выхода молекулы ДНК на нуклеосоме. Он имеет молекулярную массу, равную 21500 Да, и представляет собой полипептид, содержащий глобулярный домен (около 90 аминокислот) с длинным неструктурированным С-терминальным и коротким N-терминальным хвостом. Глобулярный домен взаимодействует с ДНК [11].

Гистон Н1 рассматривается как репрессор транскрипции, поскольку он предотвращает доступ транскрипционных факторов и хроматин-ремоделирующих комплексов

к ДНК [11, 12]. По мере удаления гистона Н1 происходит прогрессивная деконденсация хроматина, что, возможно, облегчает взаимодействие РНК-полимеразы с матричной ДНК. Связывание гистона Н1 с хроматином модулируется особым белком, участвующим в построении нуклеосом – NAP-1 (nucleosome assembly protein 1), то есть NAP-1 является шапероном линкерного гистона [7, 10].

Первичная структура гистонов предопределяет конформационную подвижность этих молекул, благодаря которой при образовании генетических структур молекулы гистонов подвергаются самосборке [8, 13]. Совершенно очевидно, что способность гистонов формировать нуклеосомы и подвергаться регуляторным влияниям напрямую зависит от их способности к самоорганизации и характера тех конечных

структур, которые образуются при межмолекулярных взаимодействиях.

До настоящего времени для изменения функции гистонов *in vivo* и *in vitro* применялись различные химические воздействия. В литературе имеются сведения о модифицирующем влиянии различных видов электромагнитного излучения (ЭМИ) на работу генетического аппарата клетки [1, 9]. Однако ни в одном исследовании не показана реализация данного эффекта через непосредственное изменение макромолекулярной организации гистонных комплексов.

Цель исследования: изучить модифицирующее влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 1 ГГц на структурообразовательные свойства гистона H1.

Материал и методы исследования

В работе использовался рекомбинантный гистон человека H1, полученный из лаборатории New England Biolabs (США). Гистон в концентрации 1 мг/мл находился в среде, содержащей 20 мМ натрия фосфата, 300 мМ натрия хлорида, 1 мМ ЭДТА (рН 7,0 при 25°C).

Для изучения процесса структурообразования гистона Н1 использовался метод клиновидной дегидратации [2], основанный на исследовании структурного следа (фации), формирующегося при высыхании капли препарата в стандартных условиях. 1 мкл исследуемого гистона (контрольная проба) помещался на сухое, чистое, обезжиренное предметное стекло. Обычно наносились 6-8 капель для сравнительного анализа. Далее предметное стекло с препаратом в строго горизонтальном положении сохранялось при комнатной температуре (20°C) в течение 10 мин. Опытные препараты (10 мкл) непосредственно перед высыханием подвергались электромагнитному воздействию с помощью аппарата «Акватон-2» (производитель - фирма «Телемак», Саратов, Россия), генерирующего излучение с частотой 1 ГГц при выходной мощности – 0,1 мкВт/см². Раструб излучателя помещался на расстоянии 10 см от облучаемого объекта

После высыхания препараты подвергались микроскопическому исследованию. Применялась световая микроскопия (Zeiss, Germany) с фоторегистрацией структурного следа и сохранением информации в файле компьютера. Имидж-анализ фаций включал их качественную характеристику, а также расчёт количественных показателей с последующей статистической обработкой.

При обработке фаций использовалась специальная компьютерная программа, позволяющая рассчитывать следующие параметры: S_1 — площадь периферического ободка, нормированная на общую площадь фации; S_2 — площадь промежуточной зоны, нормированная на общую площадь фации; S_3 — площадь центральной зоны, нормированная на общую площадь фации; S_1/S_2 — смещение центра промежуточной зоны относительно центра ободка фации, S_2/S_3 — смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации. В центральной и промежуточной зонах фации рассчитывались: N — количество гребешков в типичном фрагменте фации; average size (AS) — средний

размер гребешков в типичном фрагменте фации; Entr. – неоднородность поверхности фации в типичном фрагменте; D согг. – корреляционная размерность типичного фрагмента. Количественные параметры обрабатывались статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента с помощью статистического пакета программ Prizm-4.

Результаты исследований и их обсуждение

При высыхании гистона Н1 в контрольных пробах (без облучения) характерно появление структур, имеющих тонкий малоструктурированный ободок с мелкопористыми и древовидными элементами в его внутренней части. Прилегающая к ободку промежуточная зона образована крупными булавовидными кристаллами, расположенными по несколько на общем основании (рис. 1,б). Промежуточная зона имеет чёткую зубчатую границу, отделяющую её от центральной зоны. В центральной зоне фации выявляются одиночные крупные и мелкие кристаллы, а также стержневидные структуры, ориентированные в направлении центра фации (рис. 1,а). Фоном центральной зоны являются мелкие древовидные образования (рис. 1,б).

Облучение раствора гистона H1 низкоинтенсивным электромагнитным излучением с частотой 1 $\Gamma\Gamma$ ц заметно изменяло структуру фаций (рис. 2,a, б).

В этих фациях также можно было идентифицировать ободковую, промежуточную и центральную зоны. Однородный ободок на всём протяжении имел мелкопористую структуру. Характерных элементов в этой зоне выявлено не было. Промежуточную область фации заполняли густо и беспорядочно расположенные крупные прямоугольные кристаллы, между которыми в небольшом количестве встречались кристаллы ромбовидной и треугольной формы разной величины. Центральная зона характеризовалась наличием множества кристаллов небольшого размера правильной прямоугольной или квадратной формы, находящихся на различных расстояниях друг от друга.

Результаты количественного анализа фаций представлены в таблице.

Как видно из таблицы, фации контрольных и облучённых образцов гистона H1 отличались по большинству параметров. Облучение раствора гистона низкоинтенсивным ЭМИ с частотой 1 ГГц приводило к уменьшению площади ободковой зоны фации в 13 раз (p < 0.02). Достоверно изменялся показатель, характеризующий смещение центра промежуточной зоны относительно центра ободка фации (p < 0.05). Отмечалось увеличение количества гребешковых объектов в центральной зоне облучённой фа-

ции на 50% (p < 0.05), сопровождающееся уменьшением их среднего размера в 4 раза (p < 0.02). Воздействие низкоинтенсивного ЭМИ значительно уменьшало степень

структурной неоднородности (p < 0.001) и структурированности (корреляционной размерности) типичного фрагмента центральной зоны фации (p < 0.001).

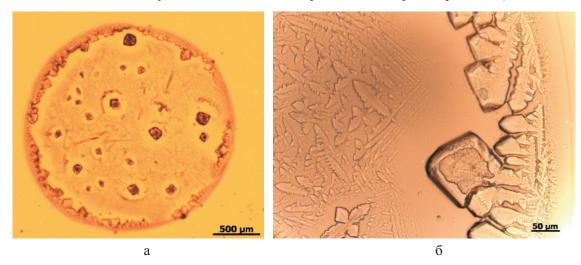


Рис. 1. а — общий вид фации, получаемой при дегидратационной самоорганизации гистона H1 в контроле (x4); б — периферическая зона фации, получаемой при дегидратационной самоорганизации гистона H1 в контроле (x25)

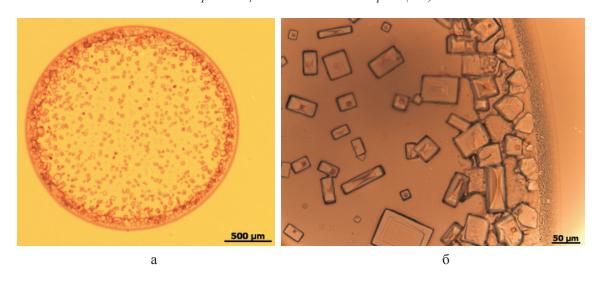


Рис. 2. а — общий вид фации, получаемой при дегидратационной самоорганизации гистона H1 после воздействия ЭМИ УВЧ (1 ГГц) (х4); б — периферическая зона фации, получаемой при дегидратационной самоорганизации гистона H1 после воздействия ЭМИ УВЧ (1 ГГц) (х25)

Промежуточная зона фации после облучения также подвергалась значительной модификации. Наиболее существенные различия затрагивали количество и размер гребешковых объектов, расположенных в данной области. Количество объ-

ектов уменьшалось в 3 раза (p < 0.001), а их размер возрастал на 32% (p < 0.02). Данные изменения происходили на фоне уменьшения степени общей структурной неоднородности этой зоны в 23 раза (p < 0.001).

Результаты статистической обработки количественных показателей имиджанализа фаций, полученных при клиновидной дегидратации раствора гистона Н1 в контроле и после воздействия ЭМИ УВЧ (1 ГГц)

Показатели	Контроль	УВЧ
S ₁	$n = 8 \\ 0,1279 \pm 0,007$	$n = 8 0,099 \pm 0,006 p < 0,02$
S_2	$n = 8 \\ 0,1797 \pm 0,009$	n = 8 $0,206 \pm 0,017$ p > 0,1
S_3	$n = 8$ $0,6866 \pm 0,013$	$n = 8$ 0,7009 \pm 0,0228 $p > 0.05$
S ₁ /S ₂	$n = 8 \\ 0,0058 \pm 0,0005$	$n = 8$ 0,0025 \pm 0,0005 $p < 0.05$
S ₂ /S ₃	$n = 8$ $0,0062 \pm 0,0006$	$ \begin{array}{c} n = 8 \\ 0,0078 \pm 0,0014 \\ p > 0,2 \end{array} $
Центральная зона		
N	n = 6 65,7 ± 5,95	n = 6 130,5 ± 6,75 p < 0.05
Average size	n = 6 117,6 ± 4, 43	n = 6 29,2 ± <u>3</u> , 63 p < 0.02
Entr.	$n = 6$ $1,402 \pm 0,223$	$n = 6 0.08 \pm 0.02 p < 0.001$
D corr.	$n = 6 \\ 1,830 \pm 0,012$	$n = 6$ 1,608 \pm 0,0387 $p < 0,001$
Промежуточная зона		
N	$n = 6$ $143 \pm 4{,}18$	$n = 6 48,5 \pm 3,08 p < 0,001$
Average size	$n = 6$ $47,7 \pm 5,64$	$n = 6$ 148.7 ± 4.71 $p < 0.02$
Entr.	$n = 6$ $1,354 \pm 0,187$	$n = 6 0,058 \pm 0,003 p < 0,001$
D corr.	$n = 6$ $1,828 \pm 0,027$	$n = 6$ 1,755 \pm 0,053 $p > 0,2$

 Π р и м е ч а н и е . p — достоверность различий с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что низкоинтенсивное ЭМИ с частотой 1 ГГц оказывает существенное модифицирующее влияние на структурообразовательные свойства гистона Н1. Анализируя полученные результаты, следует принять во внимание, что используемый в наших исследованиях гистон Н1 находится

в сложной солевой среде. Частота 1 ГГц соответствует естественной частоте колебаний водных кластеров [15] и, предположительно, влияние ЭМИ на структурообразование гистона опосредуется через изменение состояния водно-солевого окружения. В этих условиях изменяются гидратационные свойства водных молекул. Концевые участки гистонов (хвосты) могут подвергаться химической модификации – фосфорилированию, ацетилированию, метилированию, убиквитинированию и т.п., что приводит к изменению активности определенных локусов ДНК [3, 5, 14]. Так реализуются генетические эффекты многих транскрипционных факторов, гормонов, метаболитов-индукторов и других регуляторов генной активности. Последнее предопределяет возможность вовлечения генетического аппарата клетки в реализацию эффектов данного вида излучения на биологические объекты.

Список литературы

- 1. Брилль Г.Е. Влияние гелий неонового лазерного излучения на политенные хромосомы хирономид / Г.Е. Брилль, О.Р. Апина, С.И. Белянина // Изв. АН, Серия физическая. 1995. Т. 59, № 6. С. 170–174.
- 2. Шабалин В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н. Шатохина. М.: Хризостом, 2001.-303 с.
- 3. An W. Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation // Subcell. Biochem. 2007. Vol. 41. P. 351–369.
- 4. Arya G.A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning / Arya G., Maitra A., Grigoryev S.A. // J. Biomolec. Structure Dynamics. 2010. Vol. 27, N_0 6. P. 803–820.
- 5. Bannister A.J. Regulation of chromatin by histone modifications / Bannister A.J., Kouzarides T. // Cell Research. $2011.-Vol.\ 21.-P.\ 381-395.$
- 6. Burgess R.J. Histones, histone chaperones and nucleosome assembly / R.J. Burgess, Z. Zhang // Protein Cell. 2010. Vol. 1, N27. P. 607–612.
- 7. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly / M. Eitokua, L. Satoa, T. Sendab, M. Horikoshia // Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. P. 414–444.
- 8. Hansen J.C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions // Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Structure. 2002. Vol. 31. P. 361–392.
- 9. Health Effects from Radiofrequency Electromagnetic Fields. Report of the independent Advisory Group on Non-ionizing Radiation, Health Protection Agency. London, 2012. 333 p.
- 10. Kepert J.F. NAP1 modulates binding of linker histone H1 to chromatin and induces an extended chromatin fiber conformation / Kepert J.F., Mazurkiewicz J., Heuvelman G.L. et al. // J. Biol. Chem. − 2005. − Vol. 280, № 40. − P. 34063–34072.
- 11. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic review organization to genomic regulation // Cell. 2004. Vol. 116. P. 259-272.
- 12. Misteli T. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells / T. Misteli, A. Gunjan, R. Hock et al. // Nature. 2000. Vol. 408. P. 877–881.
- 13. Sperling R. Dynamic equilibrium in histone assembly: self-assembly of single histones and histone pairs /

- R. Sperling, M. Bustin // Biochemistry. 1975. Vol. 14, № 15. P. 3322–3331.
- 14. Suganuma T. Signal and combinatorial functions of histone modifications / T. Suganuma, J.L. Workman // Annu. Rev. Biochem. 2011. Vol. 80. P. 473–499.
- 15. Sunkari V.G. Effect of low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation / V.G. Sunkari, B. Aranovitch, N. Portwood, A. Nikoshkov // Electromagnetic Biology and Medicine. 2011. Vol. 30, № 2. P. 80–85.

References

- 1. Brill' G.E., Apina O.R., Beljanina S.I., Panina H.P. Vlijanie gelij neonovogo lazepnogo izluchenija na politennye hpomosomy hiponomid, Izv. AH, Sepija fizicheskaja. 1995., T.59, no. 6. pp. 170–174.
- Shabalin V.N., Shatohina S.N. Morfologija biologicheskih zhidkostej cheloveka, M.: Hrizostom. 2001. 303 p.
- 3. An W. Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation, Subcell. Biochem. 2007, Vol. 41, pp. 351–369.
- 4. Arya G., Maitra A., Grigoryev S.A. A structural perspective on the where, how, why, and what of nucleosome positioning, J. Biomolec. Structure Dynamics. 2010. Vol. 27, no. 6. pp. 803–820.
- 5. Bannister A.J., Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications, Cell Research. 2011. Vol. 21. pp. 381–395.
- $6.\ Burgess\ R.J.,\ Zhang\ Z.$ Histones, histone chaperones and nucleosome assembly, Protein Cell. 2010. Vol. 1, no. 7. pp. 607–612.
- 7. Eitokua M., Satoa L., Sendab T., Horikoshia M. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly, Cell. Mol. Life Sci. 2008. Vol. 65. pp. 414–444.
- 8. Hansen J.C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions, Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Structure. 2002. Vol. 31. pp. 361–392.

- 9. Health Effects from Radiofrequency Electromagnetic Fields. Report of the independent Advisory Group on Non-ionizing Radiation, Health Protection Agency, London, 2012. p. 333.
- 10. Kepert J.F., Mazurkiewicz J., Heuvelman G.L. et al. NAP1 modulates binding of linker histone H1 to chromatin and induces an extended chromatin fiber conformation, J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, no. 40. pp. 34063–34072.
- 11. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic review organization to genomic regulation, Cell. 2004. Vol. 116. pp. 259–272.
- 12. Misteli T., Gunjan A., Hock R. et al. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells, Nature. 2000. Vol. 408. pp. 877–881.
- 13. Sperling R., Bustin M. Dynamic equilibrium in histone assembly: self-assembly of single histones and histone pairs, Biochemistry. 1975. Vol. 14, no. 15. pp. 3322–3331.
- 14. Suganuma T., Workman J.L. Signal and combinatorial functions of histone modifications, Annu. Rev. Biochem. 2011. Vol. 80. pp. 473–499.
- 15. Sunkari V.G., Aranovitch B., Portwood N., Nikoshkov A. Effect of low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation, Electromagnetic Biology and Medicine. 2011. Vol. 30, no. 2. pp. 80–85.

Рецензенты:

Бородулин В.Б., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ» Минздрава России, г. Саратов;

Ульянов С.С., д.ф.-м.н., профессор кафедры оптики и биофотоники ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 29.01.2013.