

EVALUAREA MODIFICĂRILOR PROPRIETĂȚILOR ADN-ULUI LA SPIRULINA CULTIVATĂ ÎN PREZENȚA UNOR COMPUȘI COORDINATIVI AI Cr(III)

Valentina BULIMAGA, Valeriu RUDIC*, Daniela CIUMAC*,
Liliana ZOSIM, Tatiana CHIRIAC*, Alexei POPA

LCȘ „Ficobiotehnologie”

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

The Cr(III) coordinative compounds effect on spirulina DNA properties has been studied. The comparison of values of temperature of DNA denaturation and the fractions separation of reassociated DNA on hydroxiapatite column have been carried out. The tested Cr(III) compounds didn't modify the properties of spirulina DNA.

Introducere

În ultimii ani, pentru tratarea diabetului zaharat de tip II se utilizează picolinatul de crom(III), deoarece cromul are capacitatea de a ameliora starea bolnavilor, datorită interacțiunii între crom, insulină și receptorii insulinei [14]. Însă, conform datelor din literatură, unele săruri ale Cr(III) afectează proprietățile ADN-ului și, ca rezultat, pot fi cancerigene [9].

Pentru substituirea unor astfel de compuși chimici ca picolinatul de crom cu preparate inofensive pentru organismul uman în tratarea diabetului zaharat de tip II, cercetările din ultimii ani au fost direcționate spre obținerea pe cale biologică a unor preparate naturale ce conțin crom legat organic [2,4,17].

Este cunoscută capacitatea înaltă a cianobacteriei *Spirulina platensis* de biotransformare a metalelor din compuși anorganici, inclusiv a Cr(III) în elemente legate prin chelatare cu compușii organici din componența biomasei de spirulină [10,19]. Conform rezultatelor obținute în urma cercetărilor efectuate la fracționarea biomasei de spirulină cu conținut de crom, conținutul cel mai înalt de crom a fost determinat în fracția proteinelor, reprezentând 88-98% din cromul total. În fracția extracelulară au fost depistate până la 8,5% din cromul total, iar în cea lipofilică circa 3,5% [11]. Cercetările efectuate privind repartizarea cromului în fracțiile proteice obținute din biomasa de spirulină, cultivată în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III), au demonstrat că conținutul maxim de crom se află în fracțiile de proteine alcalino- și salinosolubile [3]. Conținutul de crom în aceste fracții a constituit 92,8 mg% și 55,9 mg% Cr, pentru compusul $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$ și, respectiv, 128,6 mg% și 70,4 mg% Cr pentru compusul $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$ [3].

Dat fiind faptul că compușii coordinativi ai Cr(III) menționați mai sus contribuie la acumularea cromului în biomasă, prezintă interes evaluarea caracterului influenței acestor compuși asupra activității biosintetice a cianobacteriei *Spirulina platensis*. În această ordine de idei, ne-am propus să cercetăm acțiunea acestor compuși coordinativi ai Cr(III) asupra procesului de denaturare și renaturare a ADN-ului la *Spirulina platensis*. Schimbările semnificative ne-ar permite să stabilim dacă compușii coordinativi utilizați pot cauza modificări în procesul de replicare a ADN-ului prin sinteza incorectă a noii catene de ADN, prin prezența unui conținut sporit sau micșorat al procentajului bazelor GC [13]. Scopul lucrării a constituit evaluarea modificărilor proprietăților ADN-ului la spirulina cultivată în prezența unor compuși coordinativi ai Cr(III).

Material și metode

Obiectul cercetărilor expuse a fost tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene de pe lângă Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM.

Pentru cultivare s-a utilizat mediul nutritiv mineral modificat Gromov 16 [20].

Cultivarea s-a efectuat conform procedurii descris anterior [12]. În calitate de sursă de Cr(III) la cultivarea cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 au fost utilizați compușii coordinativi ai Cr(III): $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$ și $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$, în concentrație de 30 mg/l.

Izolarea și extragerea ADN-ului. Extragerea acizilor nucleici din materialul experimental s-a efectuat cu utilizarea extragentului TrisHCl 133mM, Na₂EDTA 6,7mM, NaCl 0,95M, sarcosil de Na 1,33%, β-mercapto- etanol 1,33%, pH = 7,8 în raport de 3:1, în modificarea noastră – cu distrugerea prealabilă a peretelui celular cu soluția haotrofică (90,8% NaI și 1,5% Na₂SO₃) [12,15].

Denaturarea ADN-ului. Alicote de ADN au fost dizolvate în 2 ml tampon fosfat salin (20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl). Cuvele au fost menținute în baia de apă timp de 10 min., la temperatura

de 25°C pentru omogenizarea temperaturii în soluție; a fost determinată densitatea optică a soluției la $\lambda = 260$ nm și $\lambda = 320$ nm. Pentru cercetarea cineticii procesului de denaturare temperatura a fost ridicată la 70°C, unde cuvele au fost menținute timp de 10 min. pentru omogenizarea temperaturii soluției analizate. S-a măsurat densitatea optică la lungimile de undă 260 nm și 320 nm. Temperatura s-a ridică treptat, cu 2°C la fiecare 10 min., apoi s-a determinat densitatea optică la temperatura dată. Conform rezultatelor obținute s-a alcătuit graficul efectului hipercromic.

Procentajul GC a fost determinat după formula:

$$G+C \% = (T_m - 69,3) \cdot 2,44,$$

unde 2,44 – unghiul de înclinare a curbei, care determină valoarea concretă a GC.

Utilizând relația dată, s-a determinat compoziția în nucleotide a soluției de ADN ce conține de la 30 la 70% GC [5].

Conform acestei metode, putem determina nivelul de heterogenitate a ADN-lui după componență, conform relației:

$$2\sigma = (T_m - 30) \cdot 2,44 [18],$$

unde 2σ – nivelul de heterogenitate a ADN-ului, T_m – intervalul de temperatură determinat după curba denaturării.

Renaturarea ADN-ului. O alicotă de ADN (50 μ l) s-a dizolvat într-un ml de soluție tampon fosfat de 0,12M și încălzită până la temperatura de 90°C timp de 10 min., brusc răcită până la temperatura de 60°C. Apoi a fost introdusă în coloana cu o „cămașă termică” cu hidroxilapatită – $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, care leagă ADN-ul bicatenar. La eluarea fracțiilor unice și mediu repetitive a fost utilizată soluția tampon fosfat de 0,12M, fracțiile înalt repetitive au fost eluate cu soluția tampon fosfat de 0,5M. Probele au fost colectate la un interval de 5 minute. S-a măsurat intensitatea de absorbire la $\lambda = 260$ nm și la $\lambda = 320$ nm. În baza rezultatelor a fost construit graficul dependenței concentrației ADN renaturat de timp [1].

Rezultate și discuții

Cercetarea procesului de denaturare și renaturare a ADN-ului la spirulina cultivată în prezența compușilor cromului(III) – $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$ și $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$, care au dus la o maximă acumulare a cromului în biomasă [3], prezintă interes în vederea elucidării apariției posibilelor modificări genetice. Un indice important în determinarea schimbării componenței nucleotidice a ADN-ului prezintă temperatura de topire (T_m) – temperatură la care creșterea absorbției constituie o jumătate din creșterea maximă și se distruge jumătate din structura spiralei, deci are loc denaturarea moleculei de ADN.

Astfel, analizând temperatura de topire (T_m) a ADN-ului spirulinei cultivate pe mediul Gromov 16 și pe mediul cu administrarea compușilor menționați mai sus, am observat o creștere liniară a valorilor temperaturii, direct proporțională cu conținutul de perechi de baze GC (Fig.1).

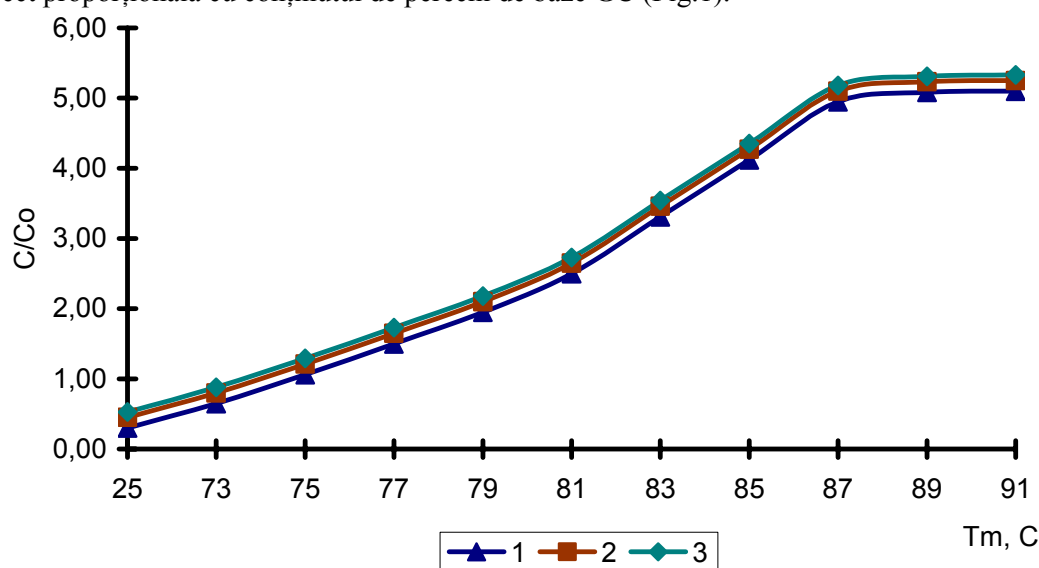


Fig.1. Denaturarea termică a ADN-ului.

1 – T_m pentru ADN (spirulina cultivată pe mediul standard); 2 – T_m pentru ADN (spirulina cultivată în prezența $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$); 3 – T_m pentru ADN (spirulina cultivată în prezența $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$).

Nucleotidele de tipul CG sunt mai stabile datorită prezenței celor trei legături de hidrogen între bazele azotate menționate. Deci, cu cât conținutul în GC este mai mare, cu atât structura ADN-ului este mai stabilă și necesită o cantitate mai mare de energie pentru a despiraliza catenele complementare [18,21]. Datele prezentate în Figura 1 demonstrează că spirulina cultivată pe diverse medii studiate posedă valori ale raportului C/C₀ (concentrația ADN-ului denaturat/concentrația ADN-ului nativ) ce diferă neesențial – raport care reflectă ponderea moleculelor de ADN monocatenar în soluție. Din profilul curbei se constată că evoluția parametrului cercetat în funcție de temperatură este similară pentru spirulina cultivată pe mediul Gromov 16 și pe cele cu adaos de crom(III).

Reieșind din datele prezentate în Figura 1 a fost calculată temperatura de topire (T_m), care variază nesemnificativ în dependență de compoziția mediului de cultivare. Temperatura de denaturare a ADN-ului la spirulina cultivată pe mediul lipsit de crom este de 87°C, iar în prezența [K₂Cr₂(SO₄)₄]·12H₂O și a K₂[Cr(NTA)(C₂O₄)(H₂O)]·2H₂O ea constituie 87,1 și 87,2°C, respectiv.

Datele din Tabel confirmă faptul că genomul spirulinei nu suferă modificări în ceea ce privește conținutul bazelor azotate, precum și gradul de heterogenitate. Deci, putem concluziona că compușii testați nu afectează procesul de sinteză a ADN-ului.

Tabel

Conținutul de GC și temperatura de topire a ADN-ului

Tipul mediului de cultivare	<i>Gromov 16</i>	<i>Cu administrarea [K₂Cr₂(SO₄)₄]·12H₂O (30mg/l)</i>	<i>Cu administrarea K₂[Cr(NTA)(C₂O₄)(H₂O)]·2H₂O (30mg/l)</i>
T _m , (°C)	87,00±0,30	87,10±0,17	87,20±0,45
Conținutul, CG%	43,20±0,27	43,40±0,13	43,70±0,39
Nivelul heterogenității (2σ)	139,10±0,56	139,30±0,78	139,60±0,80

Cercetarea proceselor de denaturare și renaturare a ADN-ului la diverse genotipuri furnizează informații asupra diferențelor compoziției bazelor azotate ale ADN-ului în genom. Dependența directă dintre mărimea genomului determinată după cinetica de reasociere a secvențelor unice și conținutul de ADN în genomul haploid, determinat cu ajutorul metodei chimice, confirmă faptul că ADN-ul unical constă din secvențe individuale, prezente în genom într-o singură copie [5]. Prezența secvenței unice a ADN-ului atestă că genomul de dimensiuni mai mari nu se formează prin multiplicarea numărului de exemplare de gene. Deosebirile în dimensiunile genomului se explică prin faptul că genomului cu un număr mai mare de perechi de nucleotide îi corespunde o varietate mare de secvențe unice [18].

Viteza de reasociere a fracțiilor unice depinde de condițiile experienței. În condiții dure (ex.: creșterea temperaturii, concentrații înalte de săruri), secvențele unice constituie o parte mai mare din genom decât în condiții blânde. Acest fenomen poate fi rezultatul divergenței evolutive a secvențelor, eroarea recombinativă diminuează viteza renaturării, astfel încât reasocierea dintre secvențele divergente se desfășoară mai încet decât reasocierea catenelor combinate ale fiecărui exemplar [18].

În pofida faptului că *Spirulina platensis* este un organism procariot și în arborele filogenetic ocupă o poziție inferioară, în componența ADN-ului întâlnim prezența secvențelor unice, mediu și înalt repetitive (Fig.2).

Conform datelor din literatură [6,12], spirulina este lipsită de capacitatea de sinteză a toxinelor. Noi ne-am propus să stabilim dacă în prezența cromului nu pot fi activate genele ce răspund de asamblarea componentelor ribozomale sintetizatoare de toxine. Cercetările au demonstrat că fracțiile unice sunt prezente indiferent de condițiile de cultivare (Fig.2), deoarece reprezintă genele ce codifică proteine structurale și sunt elementele primordiale pentru procesele fiziologice ale tuturor organismelor [18]. Secvențele mediu repetitive, care în mare parte participă la biosinteza histonelor, sunt identificate în cantități reduse la spirulină. Este cunoscut că procariotele sunt lipsite de histone [5], însă prezența acestor secvențe în cazul spirulinei ar putea fi argumentată prin faptul că cianobacteriile sunt unicele procariote la care întâlnim primordiile histonelor – „histone-like protein” [7,8].

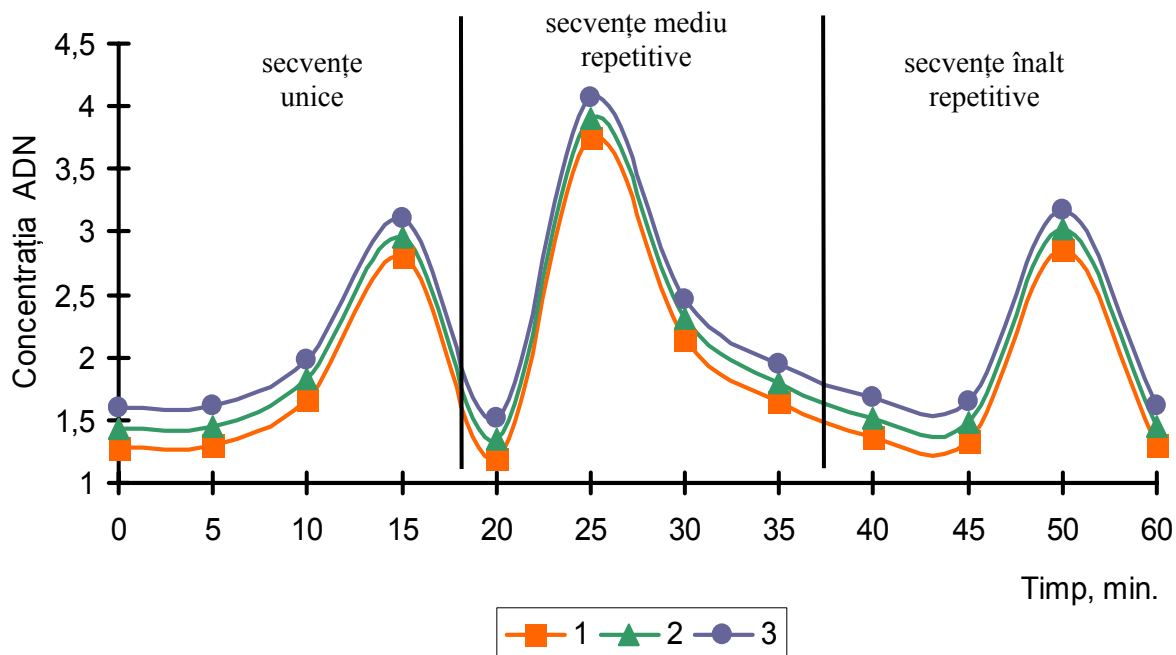


Fig.2. Dinamica eluării fracțiilor reasociate de ADN la separare pe coloana de hidroxilapatită: 1 – ADN-ul la spirulina cultivată pe mediul Gromov 16; 2 – ADN-ul la spirulina cultivată în prezența $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$; 3 – ADN-ul la spirulina cultivată în prezența $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$.

În baza rezultatelor obținute a fost atestat că valorile temperaturii de denaturare a ADN-ului la spirulina cultivată pe mediul lipsit de crom și în prezența unuia din compușii coordinați $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$ sau $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$ nu diferă semnificativ, ceea ce confirmă faptul că genomul spirulinei nu suferă modificări în ceea ce privește conținutul bazelor azotate, precum și gradul de heterogenitate.

Rezultatele cercetărilor efectuate asupra procesului de modificare a proprietăților ADN-ului la cianobacteria *Spirulina platensis* cultivată în prezența unor compuși coordinați ai Cr(III) demonstrează că acești compuși nu influențează negativ procesul de replicare a ADN-ului, nu afectează complexitatea genetică, nemodificând componența standardă a secvențelor unice, mediu și înalt repetitive.

Concluzii

1. S-a constatat că valorile temperaturii de denaturare a ADN-ului la spirulina cultivată în prezența unuia din compușii coordinați $[K_2Cr_2(SO_4)_4] \cdot 12H_2O$ sau $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$ nu diferă semnificativ de valoarea determinată pentru ADN-ul izolat din spirulina cultivată în condiții standard, ceea ce demonstrează că nu este afectat genomul spirulinei.

2. S-a stabilit că la cromatografia pe coloana de hidroxilapatită timpul de eluție a fragmentelor reasociate unice, mediu și înalt repetitive de ADN, obținut din biomasa de spirulină cultivată în prezența compușilor coordinați ai Cr(III) nu diferă de cel obținut din biomasa de spirulină standard, ceea ce demonstrează că acești compuși nu influențează negativ procesul de replicare a ADN.

Referințe:

1. Britten R., Kohne D. Repeated sequences in DNA // Sciences. - 1968. - Vol.161. - P.529-540.
2. Bulimaga V., Rudic V., Gulea A., Gudumac V., Dencicov L., Cordileanu C., Ciornea V., Chihai E., Cîrjev M. Perspectiva utilizării unor compuși coordinați ai Cr(III) în biotehnologie // Analele Științifice ale USM. Seria „Științe chimico-biologice”. - Chișinău: CEP USM, 2003, p.156-159.
3. Ciumac D. Studiul repartizării cromului în fracțiile proteice din spirulină. Conferința Internațională dedicată jubileului de 60 de ani ai Universității de Stat din Moldova. - Chișinău, 2006, p.215-216.
4. Ding W., Qian Q., Hou X., Feng W., Chen C., Chai Z., Zhang B., Wang K. A preliminary study of chromium distribution in chromium-rich brewer's yeast cell by NAA // Biol. Trace Elem. Res. - 2002. - Vol.88. - No2. - P.193-199.

5. Gavrilă L. Genomica. Vol.II. - București: Editura Enciclopedică, 2004.
6. Heddman M., Janvier M., Waterbury J., Rippka R., Stanier R., Mandel M. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. - 1979. - Vol.111. - P.63-71.
7. Hulton C., Higgins J., Sharp C., Eric P. Sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria // Mol. Biol. - 1991. - Vol.58. - P.825-834.
8. Katayama T., Okamoto S., Narikawa R., Fujisawa T., Shuichi K., Itoh M., Ohmori M., Kanehisa M. Comprehensive analysis of tandem repeat sequences in *Cyanobacteria* genome // Genome informatics. - 2002. - Vol.13. - P.400-401.
9. Norseth T. The carcinogenicity of chromium and its salts // Br. J. IND. Med. - 1983. - Vol.43. - P.649-651.
10. Li Z., Li Y., Guo S., Zhang S. Study of the factors of Cr(III) bioaccumulation on *Spirulina platensis* // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. - 2000. - Vol.16. - No1. - P.108-112.
11. Mazo G., Savvin S., Pronina N. Chemical specification of Zn, Cu and Cr in *Spirulina platensis* microalgae // ICP Information Newsletter. - 2002. - Vol.27. - 138 p.
12. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologie moderne. - Chișinău: Știința, 1993. - 140 p.
13. Rudic V., Duca M., Ciurac D., Țurcanu E. Polimorfismul genetic la diferite filumuri de alge // Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Secția „Științele vieții”. - 2005. - Nr.2. - P.48-56.
14. Vincent J. The biochemistry of chromium // J. Nutr. - 2000. - Vol.130. - P.715-718.
15. Wu X., Zarka A., Boussiba S. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria // Plant Molecular Biology. - 2000. - Vol.18. - P.385-392.
16. Yang Y., Ferro-Luzzi A. DNA-gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1988. - Vol.85. - P.8850-8854.
17. Zetic V., Stehlic-Tamas V., Grba S., Lutitsky L., Kozlek D. Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass // J. Biosci. - 2001. - Vol.26. - No2. - P.217-23.
18. Аиала Ф. Современная генетика. Т.1. - Москва: Мир, 1988, с.260-265.
19. Белокобыльский А., Киркесали Е., Фронтасьева М., Павлов С., Аксенова Н. и др. Аккумуляция селена и хрома клетками *Spirulina platensis* в динамике роста. - Дубна, 2002. - 7 с.
20. Громов Б., Титов Н. Коллекция культур водорослей Лаборатории микробиологии Института биологии Ленинградского ун-та. Культивирование коллекционных штаммов водорослей. - Ленинград, 1983, с.3-27.
21. Ленинджер Ю. Общая биохимия: Учебник для биологических и медицинских факультетов высших учебных заведений. - Москва: Знание, 1986. - 362 с.

Aducem mulțumiri șefului catedrei „Chimie Anorganică și Fizică” Aurelian Gulea, membru corespondent al AȘM, și cercetătorului științific V.Ciornea, laboratorul „Chimie Bioanorganică” pentru amabilitatea de a ne oferi pentru cercetare compusul coordinativ $K_2[Cr(NTA)(C_2O_4)(H_2O)] \cdot 2H_2O$.

Prezentat la 12.02.2008