

УДК 577.34

ВЛИЯНИЕ ГАММА ИЗЛУЧЕНИЯ НА ГИДРАТАЦИЮ И СТРУКТУРУ КОМПЛЕКСА ДНК - КОФЕИН

О.В. Хорунжая, В.А. Кашпур, А.А. Красницкая, В.Я. Малеев

*Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины,
ул. Академика Проскуры, 12, г. Харьков, 61085, Украина
E-mail: dubovits@ire.kharkov.ua*

Статья поступила в редакцию 8 июня 2005 г.

В диапазоне 7,6 мм проведены измерения комплексной диэлектрической проницаемости растворов ДНК, кофеина и комплекса ДНК-кофеин. Показано, что процесс комплексообразования сопровождается изменением диэлектрических свойств раствора. Рассчитана степень гидратации (число молекул воды в пересчете на одну молекулу лиганда или один нуклеотид) для всех изученных веществ. Установлено, что для кофеина эта величина равна 3, для ДНК составляет 16, а для комплекса ДНК-кофеин – 14. Для всех образцов рассчитаны значения релаксационной длины волны. Гамма облучение комплекса приводит к некоторому увеличению количества связанной воды в растворе. Показано, что этот эффект может быть обусловлен ростом гидратации кофеина. Одновременно методом гель-электрофореза установлено, что степень полимерности облученного комплекса почти не отличается от степени полимерности нативного образца. Полученные результаты указывают на радиопротекторные свойства кофеина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, кофеин, гидратация, комплекс ДНК-кофеин, гамма облучение, КВЧ диэлектрометрия, электрофорез.

В связи с разработкой новых лекарственных препаратов и стремлением к их направленному синтезу представляет интерес изучение молекулярных механизмов действия биологически активных соединений (БАВ). Поскольку действие многих препаратов (например, противоопухолевых) связано с их взаимодействием с нуклеиновыми кислотами, то актуальным является изучение на молекулярном уровне взаимодействия таких соединений с ДНК. С другой стороны, подобные исследования необходимы для поиска веществ, которые обладали бы протекторными свойствами, защищая ДНК от вредного воздействия радиоактивного излучения.

Настоящая работа является продолжением исследования влияния гамма излучения на структуру и взаимодействие с растворителем комплекса ДНК-БАВ. Ранее мы изучали комплекс ДНК с одним из производных актиноцина – ActII [1]. Было выяснено, что этот лиганд не препятствует разрушению ДНК и ее водной оболочки при облучении. В предлагаемой работе предметом исследования является комплекс ДНК-кофеин (Cf).

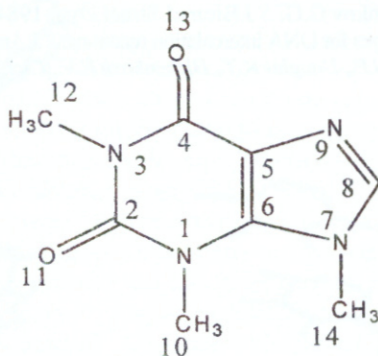


Рис.1. Структурная формула кофеина

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) является производным соединением пурина и аналогом азотистых оснований нуклеиновых кислот. Его структурная формула приведена на рис.1. Согласно существующим представлениям, кофеин взаимодействует с ДНК по типу внешнего связывания, то есть вследствие электростатического взаимодействия с фосфатными группами нуклеиновой кислоты [2]. Интеркаляция (встраивание между соседними парами оснований в двойной спирали ДНК) маловероятна. Кофеин оказывает существенное влияние на характер повреждений в ДНК, вызванных ионизирующим

Влияние гамма излучения на гидратацию и структуру комплекса ДНК-кофеин

излучением [3]. В тех случаях, когда кофеин вводился в изучаемый образец после облучения, он ингибировал ферментативное репарирование послерадиационных повреждений. Однако, как показали многочисленные эксперименты на многих объектах (бактерии, клеточные культуры, мышцы), присутствие в процессе облучения заранее введенного кофеина способствовало защите ДНК от воздействия радиации. Предполагается, что протекторная функция кофеина обусловлена его способностью связывать (и тем самым удалять) послерадиационные свободные радикалы, которые повреждают ДНК.

Известно, что весьма существенный вклад в энергию таких процессов, как стабилизация той или иной конформации биополимера, комплексообразование, перестройка структуры макромолекулы под влиянием внешних факторов (например, ионизирующей радиации), вносит изменение состояния молекул растворителя. Сведения о растворителе позволяют судить о стерической доступности гидратоактивных центров на поверхности ДНК, а также об изменениях их состояния. Отсюда ясна необходимость знания характеристик водно-ионного окружения биомолекул для построения адекватных моделей, описывающих их функционирование. В частности, они необходимы для выяснения условий комплексообразования, для синтеза или подбора БАВ с требуемыми свойствами. Однако для комплекса ДНК-кофеин соответствующих данных почти нет [2,4], а сведения о влиянии облучения на состояние водной оболочки комплекса отсутствуют полностью.

Целью данной работы является получение информации о состоянии молекул растворителя вокруг комплекса ДНК-кофеин. Предполагается также выявить изменения в водно-ионной оболочке комплекса и в его полимерности, которые возникли в результате воздействия гамма-излучения. Методами исследования, как и ранее [1], являются дифференциальная КВЧ диэлектрометрия, позволяющая определить количество связанных с веществом молекул воды, и гель-электрофорез, дающий сведения о степени фрагментации ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали препараты фирмы "Sigma": кофеин и натриевую соль ДНК тимуса теленка. Молекулярная масса образца ДНК – свыше 10^7 Да, кофеина – 194,2. Концентрация ДНК в растворах составляла 0,63%, кофеина – 0,8%. Все измерения проводили при $T = 20^\circ\text{C}$ и ионной силе 0,08 М NaCl. Комплекс ДНК-кофеин изучали при $P/D=1,5$ (отношение молей фосфатных групп ДНК к молям лиганда). Комплексообразование осуществляли добавлением ДНК в раствор, содержащий 0,24% кофеина. Облучение раствора комплекса, а также контрольного раствора ДНК, проводили на установке "Исследователь" гамма-квантами ^{60}Co при мощности экспозиционной дозы 180 Р/мин. Поглощенная доза радиации составила 800 Грей.

Диэлектрические измерения проводили в миллиметровом диапазоне длин волн ($\lambda=7,6$ мм) с помощью оригинального дифференциального диэлектрометрического метода [5]. Использовали мостовую схему измерения. Определяемыми величинами являлись коэффициент затухания α и фазовая постоянная β . Непосредственно измерялись разности $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ коэффициентов затухания и фазовых постоянных воды и изучаемых образцов. Погрешность определения $\Delta\alpha$ составляла $\pm 0,0006$ Нп/мм, а $\Delta\beta$ – $\pm 0,0004$ радиан/мм. Отсюда на основании известных электродинамических соотношений вычисляли соответствующие разности $\Delta\epsilon^*$ ($\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$) комплексных диэлектрических проницаемостей воды ϵ_v^* и растворов ϵ_p^* . Электропроводность растворов определяли на частоте 10 кГц с помощью моста переменного тока Р568 в ячейке с платиновыми электродами (погрешность 1%).

Степень полимерности ДНК и комплексов оценивали, как и ранее [1], с помощью гель-электрофореза. В качестве маркера использовался рестрикт ДНК фага λ -Hind III. После завершения процесса электрофореза негативы с изображением электрофореграмм сканировали с сохранением в виде графических файлов в формате *.bmp с 24-разрядным кодированием цвета (True Color). Яркость каждого пиксела (минимального элемента растрового изображения) выражается числом от 0 до 255. При помощи компьютерной программы MATLAB 6.1 для файла каждой электрофореграммы получали таблицу, содержащую информацию о распределении цветовой яркости (соответствующей распределению концентрации) образца вдоль пути, пройденного им под действием электрического поля. Затем при помощи компьютерной программы Origin 6.1 для каждой дорожки проводили усреднение данных и строили графики зависимости яркости цвета дорожки от размера образца в парах нуклеотидов (п.н.). Для представления полученных данных в единицах оптической плотности D использовали контрольные денситограммы маркерной ДНК, полученные ранее на сканирующем микрофотометре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл.1 во втором столбце приведены известные для воды значения параметров α , β , ϵ' и ϵ'' . Поскольку диэлектрические свойства как воды, так и водных растворов, с очень хорошей точностью описываются теорией, разработанной Дебаем для полярных жидкостей, то для воды в таблице приведены также параметры ϵ_s (эффективная проницаемость, являющаяся низкочастотным пределом величины ϵ' в

области дебаевской дисперсии) и λ_s , (длина волны, соответствующая центральной частоте этой дисперсии). Эти два параметра определяются из соотношений (1,2), являющихся обратными для уравнений Дебая:

$$\varepsilon_s = \varepsilon' + \varepsilon''^2 / (\varepsilon' - \varepsilon'_\infty) \quad (1)$$

$$\lambda_s = \lambda \varepsilon'' / (\varepsilon' - \varepsilon'_\infty) \quad (2)$$

где ε'_∞ – высокочастотный предел ε' в области дисперсии. В столбцах 3, 4, 5 и 6 приведены измеренные разности $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\varepsilon'$, $\Delta\varepsilon''$, $\Delta\varepsilon_s$ и $\Delta\lambda_s$ между значениями параметров α , β , ε' , ε'' , ε_s и λ_s растворителя и всех исследованных растворов. Электропроводность раствора кофеина практически не отличалась от электропроводности растворителя.

Для определения состояния растворителя в исследованных растворах мы находили степень гидратации – число таких молекул воды (приходящихся на молекулу или субъединицу молекулы растворенного вещества), которые вследствие взаимодействия с растворенным веществом имеют резко сниженную подвижность. Такие молекулы растворителя могут считаться связанными. Поскольку частоты характерные для молекулярной подвижности воды и описываемые дебаевскими уравнениями дисперсии соответствуют сантиметровым и миллиметровым длинам электромагнитных волн, то связывание части молекул растворителя с биомолекулами приводит к некоторому снижению диэлектрической проницаемости раствора в диапазоне КВЧ, которое пропорционально степени гидратации [6]. Измерив этот декремент, мы, как и ранее [1], находили количество связанной воды. В предпоследней строке таблицы приведены значения степени гидратации n на молекулу кофеина (столбец 4) или один нуклеотид ДНК (столбцы 3, 5, 6)). При вычислениях использовали следующие значения удельных парциальных объемов ДНК и кофеина: 0,58 (в соответствии с [7]) и 0,74 (определено нами с помощью пикнометра).

Табл. 1.

Диэлектрические характеристики растворов ДНК, кофеина, комплекса ДНК-кофеин и γ -облученного комплекса ДНК-кофеин

Параметры \ Раствор	Вода	ДНК	кофеин	Комплекс ДНК-Cf	Комплекс ДНК-Cf 800 Гр
α , Нп/мм	2,82	-	-	-	-
$\Delta\alpha \times 10^2$, Нп/мм	-	0,86	1,97	1,49	1,74
β , радиан/мм	4,92	-	-	-	-
$\Delta\beta \times 10^2$, радиан/мм	-	0,08	2,76	1,38	1,70
ε'	16,48	-	-	-	-
$\Delta\varepsilon'(\pm 0,01)$	-	-0,04	0,174	0,051	0,069
ε''	27,77	-	-	-	-
$\Delta\varepsilon''(\pm 0,01)$	-	0,18	0,36	0,31	0,35
ε_s	79,9	-	-	-	-
$\Delta\varepsilon_s(\pm 0,04)$	-	1,08	0,92	1,21	1,33
$n(\pm 1)$	-	16	3	14	17
λ_s , мм	17,32	-	-	-	-
$\Delta\lambda_s, (\pm 0,02)$, мм	-	0,17	-0,02	0,12	0,13

Степень гидратации данного образца ДНК имеет ту же величину, что была найдена ранее [1]. Отметим, что релаксационная длина λ_s раствора ДНК заметно (примерно на 1%) отличается от аналогичной величины для растворителя, что указывает на влияние ДНК на релаксационные свойства (подвижность) молекул растворителя.

Кофеин в растворе существует в форме мономеров и ассоциатов. Используя значения констант образования димеров ($13,2 \text{ M}^{-1}$) и тетрамеров (2165 M^{-1}) [8], а также пренебрегая незначительным количеством ассоциатов более высокого ранга, мы нашли, что в нашем случае кофеин находился преимущественно в форме мономера. Для концентрации 0,8% доля мономеров k_1 составила 58%, димеров – 36% и тетрамеров – 6%. Для концентрации 0,24% соответствующие значения были 79%, 20% и 1%.

Гидратация молекулы кофеина составила около 3 молекул воды, что соответствует нашим ранее опубликованным результатам [8], а также расчетам, выполненным методом Монте-Карло [2]. Наиболее вероятными местами связывания воды являются группа $\text{C}=\text{O}$, с которой возможно связывание двух молекул H_2O , а также атом азота – N9. В случае димера гидратация этих групп уменьшается вследствие возникающих пространственных затруднений для взаимодействия молекул воды с лигандом.

Влияние гамма излучения на гидратацию и структуру комплекса ДНК-кофеин

Одновременно появляются иммобилизованные молекулы воды, занимающие мостиковое положение между компонентами димера. Однако в отличие от ДНК воздействие кофеина на структурное состояние основной массы растворителя, регистрируемое по изменению λ_s , незначительно (около 0,1%) и не превосходит ошибки эксперимента.

В пятом столбце таблицы приведены диэлектрические характеристики раствора комплекса ДНК-кофеин. Видно, что происходит уменьшение декремента диэлектрической проницаемости комплекса по сравнению с суммой декрементов ДНК и кофеина. Эффект может быть обусловлен только дегидратацией, так как структура ДНК остается практически неизменной при комплексообразовании [4]. Изменения в структуре растворителя подтверждаются и возрастанием дебаевской релаксационной длины волны. Действительно, как видно из таблицы, параметр λ_s раствора комплекса отличается от λ_s воды на 0,12 мм, в то время как для раствора ДНК аналогичная разность составляет 0,17 мм. Эти факты говорят о том, что связывание ДНК с кофеином (по любому механизму) происходит, по крайней мере, частично, за счет замены связей ДНК-вода и кофеин-вода на связь ДНК-кофеин. Соответствующее изменение энергии должно приводить к дополнительной стабилизации комплекса.

Расчеты по вышеупомянутой модели гидратации приведены в предпоследней строке таблицы. Они показывают, что измеренной величине декремента комплекса соответствует гидратация, которая равна 14 молекулам воды на один нуклеотид (как участвующий в комплексообразовании, так и не участвующий). В то же время образование комплекса сопровождается возрастанием комплексной диэлектрической проницаемости, что указывает на уменьшение гидратации на 3-4 молекулы по сравнению с суммой величин n для ДНК и кофеина.

Сделанные нами выводы согласуются с результатами изучения комплекса ДНК-кофеин методом ИК спектроскопии [4]. В этой работе были обнаружены изменения интенсивности полос, которые соответствуют колебаниям фосфатных групп PO_2^- и оснований. Эффекты были интерпретированы как результат комплексообразования при одновременной частичной дегидратации комплекса по сравнению с ДНК. Гидратноактивные участки ДНК (фосфатные группы, малая бороздка) оказались и предпочтительными местами внешнего связывания лиганда, а молекулы кофеина – конкурентами молекулам воды. Недавние теоретические расчеты методом молекулярной динамики также показали, что кофеин уменьшает гидратацию ДНК, особенно гидратацию оснований [2].

Дальнейшей задачей работы являлось выяснение степени влияния гамма излучения на структуру и гидратацию комплекса ДНК-кофеин. С этой целью нами на одних и тех же облученных образцах были выполнены электрофоретическое и диэлектрическое исследования.

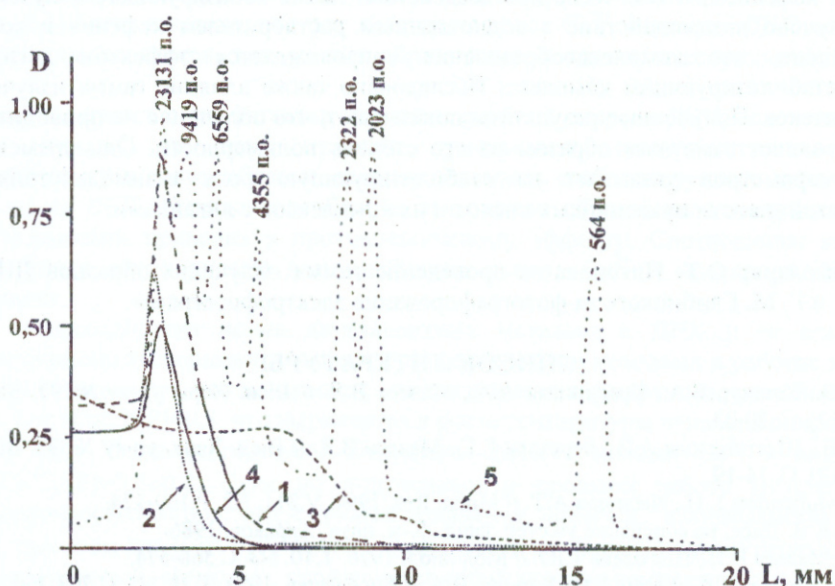


Рис.2. Денситограммы исследуемых образцов: 1 – ДНК тимуса теленка, 2 – комплекс ДНК-кофеин, 3 – ДНК, облученная в дозе 800 Гр, 4 – комплекс ДНК-кофеин, облученный в дозе 800 Гр, 5 – рестрикт ДНК фага λ -Hind III.

На рис.2 представлены денситограммы растворов ДНК (нативной и облученной), комплексов ДНК-кофеин (исходного и гамма облученного в дозе 800 Гр), а также маркера - рестрикта ДНК фага λ -Hind III. Видно, что исходная ДНК характеризуется сравнительно узкой полосой, максимум которой близок к максимуму полосы маркера в 23130 п.н. Полоса комплекса ДНК с лигандом располагается левее полосы

контрольной ДНК, что соответствует увеличению молекулярной массы комплекса по сравнению с контрольной ДНК. Кривая для облученной ДНК характеризуется сильным уширением максимума, присущего нативной ДНК. Этот эффект свидетельствует о распаде ДНК на фрагменты с гораздо меньшей величиной, чем размер исходной ДНК: от 23130 до 1000 п.н. При этом их основная доля имеет размер, превышающий 3000 п.н.

Самой существенной особенностью полученных денситограмм является то, что кривая для облученного комплекса очень близка к кривой для исходного комплекса. Совпадение указывает на то, что присутствие кофеина перед облучением предотвратило разрушение нуклеиновой кислоты. С другой стороны, диэлектрические данные, приведенные в последней колонке таблицы 1, говорят о том, что уменьшения количества связанной воды, то есть разрушения водной оболочки вокруг ДНК, также не происходит. Более того, наблюдается тенденция к увеличению степени гидратации вплоть до 17 молекул воды на нуклеотид. Сохранение гидратного хребта ДНК, находящейся в комплексе с кофеином, указывает на неизменность основных элементов структуры ДНК при воздействии гамма радиации.

Протекторные свойства кофеина объясняют его взаимодействием с послерадиационными свободными радикалами [9-11]. В частности, исследования с помощью метода электронного парамагнитного резонанса показали, что в результате реагирования с ними в молекуле кофеина происходит ряд химических процессов с участием таких атомов, как N1, N3, N7 (монодиметилирование), а также C8 (гидроксильное). При этом образуются новые химические соединения – теобромин, параксантин, теофиллин и 8-гидроксикофеин, соответственно. Возможно, что эти процессы являются причиной и наблюдаемой тенденции к возрастанию степени гидратации после облучения. Действительно, отсутствие изменений в релаксационной длине указывает на то, что возрастание гидратации обусловлено вероятнее всего кофеином (для него, как видно из четвертого столбца таблицы, гидратация не сопровождается изменениями релаксационной длины), а не ДНК (для нее гидратация влияет на величину λ_s). Однако данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Полученные данные указывают на существенное отличие результатов облучения комплекса ДНК-Cf от последствий облучения ранее исследованного комплекса ДНК-ActII. В противоположность кофеину лиганд ActII, как это следует из работы [1], не препятствует процессам фрагментации и дегидратации комплекса, вызванным радиационным воздействием.

ВЫВОДЫ

Показана эффективность метода КВЧ диэлектротометрии для изучения природы стабильности комплекса ДНК с лигандом кофеином, в том числе при воздействии гамма ионизирующего излучения. С помощью этого метода изучено взаимодействие с водно-ионным растворителем кофеина и комплекса ДНК с кофеином. Найдено, что комплексообразование сопровождается эффектом дегидратации ДНК, дополнительно стабилизирующим комплекс. Исследовано также влияние гамма излучения на степень гидратации комплекса. Полученные результаты показывают, что облучение не приводит к дегидратации комплекса и не влияет заметным образом на его степень полимерности. Одновременное сохранение величин этих параметров указывает на стабилизирующую роль взаимодействия с водой для радиационной устойчивости нуклеиновых кислот и их комплексов с лигандами.

Авторы благодарят О.Т. Николова за проведение гамма облучения образцов ДНК на установке "Исследователь" и Г. М. Глибичкого за фотографирование электрофореграмм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хорунжая О.В., Кашпур В.А., Красницкая А.А., Малеев В.Я. // Вісн. Харк. ун-ту №593. Біофізичний вісник. 2003. Вип.1 (12). С. 20-23.
2. Анищенко Д.Б., Шестопалова А.В., Березняк Е.Г., Малеев В.Я. // Вісн. Харк. ун-ту №593. Біофізичний вісник. 2003. Вип.1 (12). С. 14-19.
3. Stoilov L.M., Mullenders L.H., Natarajan A.T. // *Mutat. Res.* 1994. V.311. N2. P.169-174.
4. Шестопалова А.В. Дисс. на соискание уч. степ. канд. ф.-м. наук, Харьков, 1986.
5. Кашпур В.А., Малеев В.Я., Щеголева Т.Ю. // *Мол.биол.* 1976. Т.10. N3. С.568-574.
6. Малеев В.Я., Семенов М.А., Гасан А.И., Кашпур В.А. // *Биофизика.* 1994. Т.38. N5. С.768-790.
7. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. Л.: Наука. 1973. 578 с.
8. Шестопалова А.В., Кашпур В.А., Малеев В.Я. // *ДАН УССР.* 1984. сер.Б. №7. С. 75-78.
9. Kumar S.S., Devasagayan T.P.A., Jayashree B., Kesavan // *Int. J. Radiat. Biol.* 2001. V.77. N5. P.617-623.
10. Telo J.P., Vieira A.J.S.C. // *J.Chem.Soc. Perkin. Trans.* 1997. V.2. P.1755-1757.
11. Rumar M., Adinarayana M. // *Proc. Ind. Soc. (Chem. Sc.).* V.112. N5. P.151-157.