

УДК 577.34

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

ВЛИЯНИЕ γ -ОБЛУЧЕНИЯ НА СОСТОЯНИЕ ИОН-ГИДРАТНОЙ ОБОЛОЧКИ ДНК

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

*Институт радиофизики и электроники НАН Украины,
ул. Академика Проскуры 12, Харьков 310085*

Поступила в редакцию 5 мая 1998 года.

Исследовано влияние γ -облучения на состояние ион-гидратной оболочки ДНК. С помощью дифференциального диэлектromетрического метода (длина волны 7,6 мм) изучены изменения комплексной диэлектрической проницаемости водных растворов ДНК при облучении в дозах 19, 370 и 1650 Гр. Состояние ДНК контролировалось методами кондуктометрии и электрофореза. Найдены заметные изменения гидратации ДНК при дозах радиации 370 и 1650 Гр. Показано, что обнаруженные эффекты можно объяснить нарушениями структуры водного хребта, происходящими при перестройках двойной спирали, которые возникли вследствие радиационных повреждений дезоксирибозила, а так же появлением в составе ДНК радиационно-модифицированных оснований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, КВЧ-диэлектromетрия, электрофорез, гидратация γ -облучение

За последние годы характер нарушений первичной структуры ДНК, возникших под влиянием γ -радиации выяснен достаточно детально [1,2]. В то же время сведения об изменениях во взаимодействии макромолекулы с водным растворителем отсутствуют, хотя именно такое взаимодействие является важнейшим фактором, стабилизирующим конформацию ДНК [3].

Разрушение гидратного монослоя вокруг функциональных групп фосфатов, оснований и сахаров ДНК может индуцировать изменения структуры макромолекулы. С другой стороны, изменения в степени гидратации влияют на условия возникновения того или иного типа агентов, повреждающих ДНК, а также на подвижность радиационно-индуцированных электронов в связанной воде [4]. Известно, что в слое, состоящем из наиболее прочно связанных молекул воды, образуются заряженные частицы (H_2O^+ , $e_{свх}$), которые инициируют появление ион-радикалов оснований, а в слое более свободных молекул воды - радикалы OH^* . Обнаружено также, что температура плавления ДНК уменьшается, а ширина термического перехода увеличивается с возрастанием гидратации при одной и той же дозе облучения [5]. Целью данной работы является получение сведений об изменениях в состоянии ион-гидратной оболочки ДНК, возникающих после γ -облучения при разных дозах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали водные растворы ДНК из тимуса телят (препарат фирмы "Serva", гиперхромизм 38%). Концентрация составляла 0,75% в случае

микроволновых измерений и 0,2 % в случае кондуктометрических. Ионная сила – 0,01 М NaCl, температура – 20°С. Облучение проводили на установке “Исследователь” γ -квантами ^{60}Co при мощности дозы 6 Гр/мин.

Изучали растворы, облученные в дозах 19, 370 и 1650 Гр. Степень радиационного воздействия контролировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 0,089 М трис-боратном буфере pH 8,2 с добавлением 0,003 М ЭДТА [6]. Длины пострадиационных фрагментов оценивали с помощью маркеров: ДНК фага λ (48540 пар оснований (п. о.)) и рестрикта ДНК фага λ -Hind III с фрагментами 23131, 9419, 6559, 4355, 2322, 2023 и 564 п. о.

Из рис. 1 следует, что макромолекулы исходной ДНК содержат 20-50 тыс. п. о., а облученные образцы – в основном фрагменты в интервалах 4-20 тыс. п. о. и 500-6000 п. о. (радиационные дозы 19 и 370 Гр соответственно).

Степень гидратации находили, как и ранее [7], по комплексной диэлектрической проницаемости $\varepsilon^* = \varepsilon' + i\varepsilon''$ в КВЧ диапазоне (длина волны 7,6 мм) и по электропроводности σ (частота 10 кГц). Так как в области миллиметровых длин волн молекулы свободной воды имеют полосу поглощения, а нуклеиновые кислоты не активны [8], то изменения ε' и ε'' характеризуют только изменения количества молекул воды, прочно связанной с ДНК и не поглощающей в микроволновом диапазоне. КВЧ измерения выполняли с помощью дифференциального диэлектromетрического метода с использованием в качестве эталона необлученных растворов ДНК. Значения электропроводности определяли мостом переменного тока P567 в ячейке с платиновыми электродами [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в табл. 1. Величины $\Delta\varepsilon'$ и $\Delta\varepsilon''$ являются разностями соответствующих компонент комплексных диэлектрических проницаемостей изучаемого и контрольного растворов. Значения ε' и ε'' раствора нативной ДНК соответственно равны 17 и 28, а электропроводность раствора 0,01 М NaCl составляет $1,01 \cdot 10^{-3} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Радиационное воздействие в 19 Гр практически не влияет на исследуемые параметры, а при 370 и 1650 Гр вызывает небольшие, но четко констатируемые изменения диэлектрических свойств.

Из табл. 1 видно, что лишь при облучении в дозе 1650 Гр наблюдается достоверное увеличение проводимости, которое при расчете гидратации учитывали в виде дополнительного вклада в $\Delta\varepsilon''$ [7]. Рост электропроводности обуславливается переходом части противоионов Na^+ с макромолекулы в раствор при образовании одиночных разрывов (ОР) в ДНК. Учитывая известные значения коэффициентов электропроводности, можно легко показать, что в условиях данной работы (концентрация ДНК и ионная сила) наблюдаемому значению $\Delta\sigma$ отвечает увеличение доли диссоциированных ионов натрия с 0,57 до 0,65 на нуклеотид при дозе 1650 Гр. Отсюда также следует, что средняя длина образовавшихся фрагментов равна нескольким сотням п.о. (при предположении, что на один ОР приходится 8,5 диссоциированных ионов [9], а число двойных разрывов есть функция числа одиночных [1]), что близко к данным электрофореза.

Количество молекул связанной воды на нуклеотид n уменьшается на 4 (~20%) для ДНК, облученной в дозе 370 Гр, по сравнению со степенью гидратации нативной ДНК, определенной диэлектromетрическим методом в 19 молекул воды на нуклеотид [10].

Этот эффект обусловлен, очевидно, нарушениями структуры водного хребта, происходящими вследствие радиационной модификации нативной конформации

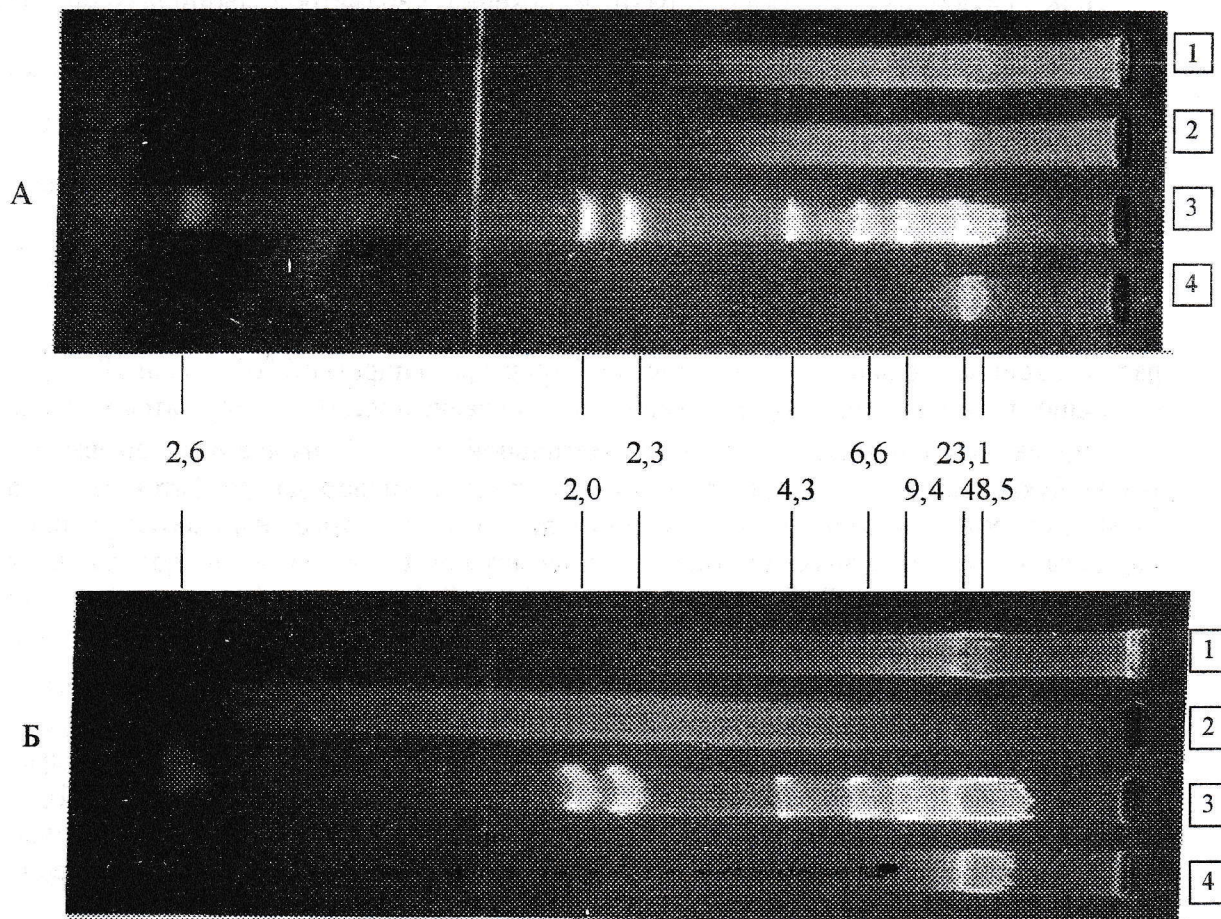


Рисунок 1. Электрофореграммы исследуемых образцов, облученных в дозах 19 Гр (А) и 370 Гр (Б): 1 – контрольный раствор ДНК; 2 – облученный раствор ДНК; 3 – рестрикт ДНК фага λ -Hind III; 4 – ДНК фага λ . Цифрами обозначен размер фрагментов маркерной ДНК в тысячах пар оснований ДНК.

Таблица 1. Диэлектрические и гидратационные свойства γ -облученной ДНК.

Измеряемые параметры	Контроль- ный раствор ДНК	Растворы ДНК, облученные дозах (Гр)		
		19	370	1650
$\Delta\varepsilon'(\pm 0,01)$	0,00	0,01	0,03	0,04
$\Delta\varepsilon''(\pm 0,01)$	0,00	0,00	0,07	0,05
$\sigma(\pm 0,01) \times 10^3, \text{ Ом}^{-1} \text{ см}^{-3}$	1,15	1,15	1,14	1,17
$n(\pm 1), \text{ мол. воды/нукл.}$	19	19	15	(18)

ДНК. Особо важную роль играют искажения параметров двойной спирали, возникающие при радиационном поражении дезоксирибозила.

В настоящее время выяснено, что в результате γ -облучения в сахарном фрагменте происходят такие процессы, как расщепление связей $H-C'_n$, возникновение радикалов \dot{C}'_n , появление эпимеров дезоксирибозила, в том числе в конформации подобной C'_3 -эндо в гуаниновом нуклеотиде в Z-ДНК [2, 11]. В случае таких превращений угол между N-гликозидной связью и направлением ее первоначальной ориентации достигает $80-100^\circ$, что существенно сказывается на расположении основания в пространстве. Структура гидратной оболочки ДНК [3], очевидно, также должна заметно измениться. В главном желобке нарушатся условия формирования водных мостиков между метильной группой тимина и $5'$ -фосфатами тех же нуклеотидов, а также мостиков между атомами кислорода фосфатов цепи (на атом кислорода приходится до 5 молекул воды). Кроме того, нарушатся условия образования бидентатных мостиков между атомами азота и кислорода двух соседних пар оснований. В минорном желобке изменение ориентации оснований разрушит водные мостики между O_2 - атомами тимина и N_3 - атомами аденина. Изменится состояние и тех молекул гидратного хребта, которые примыкают к дефектным участкам остова или гидратного хребта.

Таким образом, гидратация ДНК при облучении должна уменьшиться. Следует отметить, что в случае чередующегося сополимера поли(дГ-дЦ)·поли(дГ-дЦ), в котором происходят такого же типа искажения ориентации компонент по сравнению с их ориентациями в В-ДНК (так расстояния между соседними атомами кислорода фосфатов уменьшаются с $8-9 \text{ \AA}$ до $4.4-5.2 \text{ \AA}$) количество связанной воды уменьшается с 19 молекул на нуклеотид до 9 для сополимера [10].

Об искажении нативной конформации ДНК свидетельствует также появление большого числа радиационных разрывов водородных связей – до 10% при 370 Гр, как это следует из опубликованных данных [1, 12].

При облучении в дозе 1650 Гр положительная величина $\Delta\varepsilon'$ и $\Delta\varepsilon''$ также указывает на дегидратацию. Однако в этом случае эффект меньше, что можно объяснить преобладающим влиянием на гидратацию возникновения при больших дозах облучения новых гидратно-активных центров, которые появляются вследствие радиационной модификации канонических оснований. Для дозы 1650 Гр количество гидроксилпроизводных пуриновых и пиримидиновых оснований составляет до 10% от общего числа оснований (согласно результатам работ [13, 14]). Для этих соединений характерно наличие гидроксильных групп ОН и других гидрофильных центров, активно связывающих молекулы воды. Однако точное определение числа n затруднено в этом случае, так как при большей дозе в растворе появляются низкомолекулярные компоненты ДНК. Так, количество освобожденных оснований для 424 Гр составляет 0,2% от их общего числа, но быстро увеличивается с дозой [15].

ВЫВОДЫ

Радиационное воздействие вызывает искажение пространственной структуры ДНК, а при больших дозах и модификацию компонент, что обуславливает разрушение водного хребта макромолекулы. Дегидратация может усиливать первичные радиационные дефекты структуры ДНК, особенно в условиях сильного межмолекулярного взаимодействия в клетке (например, способствовать

Влияние γ -облучения на состояние ион-гидратной оболочки ДНК

образованию нековалентных сшивок). Уменьшение величины гидратной оболочки создает также условия для появления дополнительных ОН-радикалов, которые возникают в свободной воде и гораздо сильнее разрушают структуру ДНК, чем частицы, образующиеся в слое связанной воды [4].

Авторы благодарят О. Т. Николова за помощь при облучении ДНК.

Авторы благодарят Государственный фонд фундаментальных исследований Украины за финансовую поддержку этой работы (грант N 2.4/764)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Рябченко Н.И. Радиация и ДНК. М. Атомиздат, 1979. 192с.
- Шарпаты В.А. // Радиобиология. 1992. Т.32. С.180-193.
- Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584с.
- Swarts S.G., Sevilla M.D., Becker D., Tokar C.J., Wheeler K.T. // Radiat. Res. 1992. V.129. P.333-344.
- Pankowski E. // Studia biophys. 1988. V.128. P.27-36.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М. Наука, 1981. 286с.
- Кашпур В.А., Малеев В.Я., Щеголева Т.Ю. // Мол. биол. 1976. Т.10. С.568-575.
- Maleev V.Ya., Kashpur V.A., Glibitsky G.M., Krasnitskaya A.A., Veretelnik Ye.V. // Biopolymers. 1987. V.26. P.1965-1970.
- Adinarayana M., Bothe E., Schulte-Frohlinde D. // Int. J. Radiat. Biol. 1988. V.54. P.723-733.
- Umehara T., Kuwabara S., Mashimo S., Yagihara S. // Biopolymers. 1990. V.30. P.649-656.
- Trumbore C.N., Myers Y.N., Hyde C.K., Hudson R.D., Rhodes C.N., Masselink J.K. // Int. J. Radiat. Biol. 1994. V. 66. P.479-483.
- Collins B., Okada S., Scholes G., Weiss J.J., Wheeler C.M. // Radiat. Res. 1965. V. 25. P.526-536.
- Fuciarelli A.F., Wegher B.J., Blakely W.F., Dizdaroglu M. // Int. J. Radiat. Biol. 1990. V.58. P.397 - 415.
- Dizdaroglu M. // Int. J. Radiat. Biol. 1992. V. 62. P.175-183.
- Henle E.S., Roots R., Holley W.R., Chatterjee A. // Radiat. Res. 1995. V.143. P.144-150.