

DNA a radikály

Anna Michaelidesová

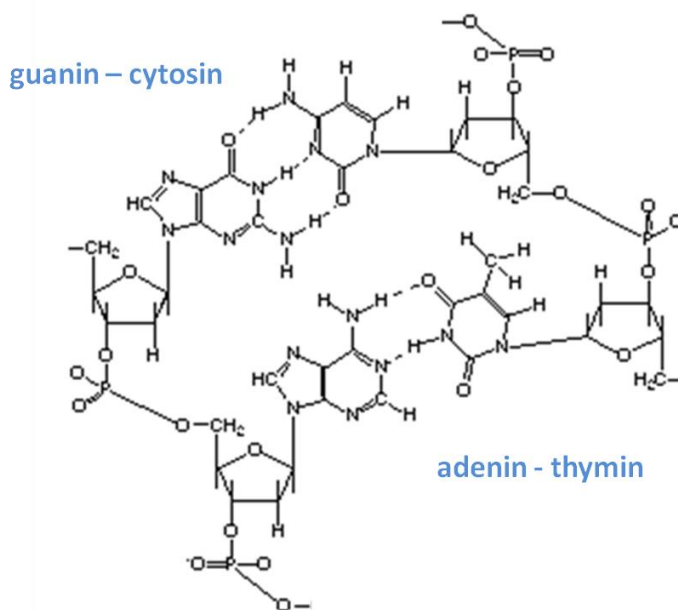
gatoullina@hotmail.com

Seznámíme se s metodou agarózové elektroforézy. Zjistíme, jestli je DNA poškozená více ozářením ve vodě nebo sušená.

DNA, velice stručný základ

Buňka, základní stavební a funkční jednotka živých systémů, se dá krátce popsat jako velmi zředěný vodný roztok. Obsahuje 60 až 90 % vody, anorganické látky a z organických zejména bílkoviny, sacharidy, tuky a nukleové kyseliny. Z hlediska dopadů záření na organismus je zásadním terčem zejména DNA, jejíž poškození může mít fatální následky pro konkrétní buňku i pro celý organismus, zatímco radiční poškození bílkovin a dalších součástí buňky je většinou rychle kompenzováno syntézou nových molekul.

Páteří DNA neboli deoxyribonukleové kyseliny je opakující se sekvence sacharidu deoxyribózy a fosfátu. Na každý sacharid se váže jedna ze čtyř možných dusíkatých bází, buď purinových (adenin A, guanin G), nebo pyrimidinových (cytosin C, thymin T). Trojice skládající se ze sacharidu, fosfátu a báze se nazývá nukleotid. Dva komplementární řetězce jsou spojeny vodíkovými můstky mezi příslušnými komplementárními páry nukleotidů (Obr. 1) a prostorově stočeny do charakteristické šroubovice. Díky vnitřním vazbám i vazbám s buněčnými bílkoviny je vlákno DNA prostorově uspořádáno a stabilizováno do složitých vyšších struktur. Pro naše účely rozlišme chromozomální DNA (delší vlákna nesoucí hlavní část genetické informace) a plasmidovou DNA (menší kruhové molekuly vyskytující se především v cytosolu některých bakterií, samostatně se replikující a nesoucí některé doplňkové informace).



Obr. 1 Párování komplementárních bází DNA

Radiační poškození DNA

Energie ionizujícího záření (IZ) absorbovaná buňkou způsobí excitace a ionizace atomů a molekul podél stopy částice (fyzikální stadium, $10^{-14} - 10^{-10}$ s). Vytvořené ionty, radikály a excitované atomy interagují sami se sebou a s dalšími molekulami, přičemž mohou poškozovat různé struktury buňky (chemické stadium, $10^{-3} - 10$ s). Tato poškození mohou vést ke změnám v celém organismu (biologické stádium, stovky sekund až roky)^[1].

Pokud je energie absorbována přímo v místě cílové molekuly, mluvíme o poškození přímém, pokud k poškození dochází zprostředkovaně přes produkty radikálových reakcí vody, jedná se o poškození nepřímé. Vzhledem k malé pravděpodobnosti přímého zásahu biomolekul, zejména u záření gama, má nepřímé poškození větší význam.

Molekuly vody jsou ionizujícím zářením ionizovány [1] a excitovány [2] následujícím způsobem^[2]



Pokud mají vyražené elektrony dostatečnou energii, mohou excitovat a ionizovat další molekuly vody. Excitovaná molekula i radikálový kation vody se okamžitě rozkládají dál. Po první sérii reakcí vznikají tedy hydratované elektrony e_{aq}^- , vodíkový a hydroxylový radikál $H^\bullet$ a $OH^\bullet$, molekuly vodíku H_2 , peroxidu H_2O_2 , a hydratované protony H_3O^+ ^[2]. Za největší škody je zodpovědný hydroxylový radikál $OH^\bullet$, který je velmi reaktivní a prakticky okamžitě reaguje s molekulami ve svém okolí tak, že z nich vytrhává atomy vodíku. Jeho životnost je asi 10^{-9} s (v savčích buňkách), takže většina reakcí se odehrává přímo v místě vzniku radikálu.

Vůči oxidačnímu poškození je, jak už bylo řečeno, citlivá zejména DNA. Záření může vyvolat zlomy na řetězcích dvojrourbovice – buď pouze jednoho, tzv. jednoduchý zlom, který vede k rozvolnění vyšších struktur DNA, nebo obou, tzv. dvojný zlom, po kterém vznikají fragmenty DNA s nižší molekulovou hmotností. Poškození dusíkatých bází vede většinou k uvolnění původních vodíkových vazeb, přičemž mohou vznikat nové vazby, buď uvnitř jedné molekuly, anebo mezi více molekulami DNA (tzv. crosslinks). Drtivá většina oxidačních poškození DNA je opravena, ale pokud nejsou, mohou způsobit mutace a chromozomální poškození^[3].

Elektroforetické metody

Při studiu radiačních poškození DNA i bílkovin se vedle iontové chromatografie a hmotnostní spektrometrie často využívají elektroforetické metody. Jejich princip spočívá v rozdílné pohyblivosti nabitých molekul v elektrickém poli. Při separaci bílkovin a nukleových kyselin nebo jejich fragmentů je to nejpřesnější dostupná metoda. Za objev elektroforetické separace bílkovin krevního séra obdržel v roce 1948 švédský chemik Arne Tiselius Nobelovu cenu.

Elektroforetická pohyblivost μ je definována jako rychlost pohybu nabité molekuly v elektrickém poli s jednotkovou intenzitou E . Na takovou molekulu působí jednak elektrická síla $F_1 = Q \cdot E$, kde Q je náboj, a jednak síla odporu prostředí $F_2 = k \cdot v$, kde k je koeficient závislý na tvaru a velikosti částice a též na viskozitě prostředí. Se vzrůstající rychlostí

molekuly, roste i odpor prostředí, až se obě síly vyrovnají a je dosaženo rovnováhy. Molekula se potom pohybuje konstantní rychlostí a jejich pohyblivost lze vyjádřit vztahem

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k} \quad [3]$$

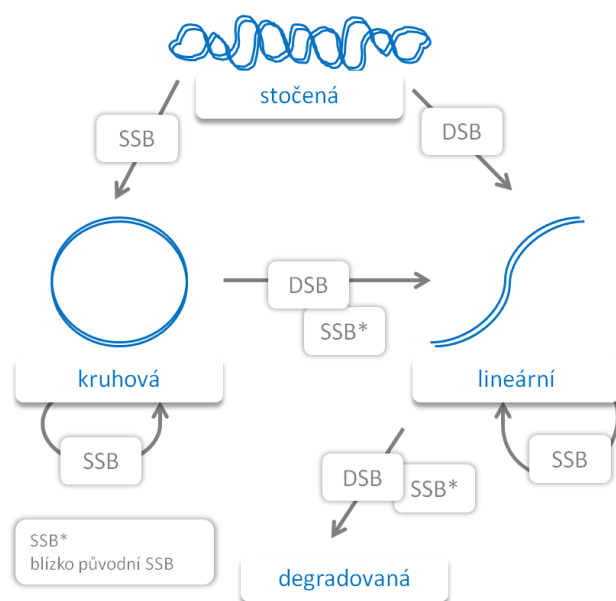
V případě pouze částečně disociovaných molekul, jako jsou bílkoviny či nukleové kyseliny, musíme uvažovat tzv. efektivní pohyblivost μ_{ef} , která je ještě závislá na stupni disociace α podle

$$\mu_{ef} = \mu\alpha \quad [4]$$

Stupeň disociace lze ovlivňovat volbou pH pufru, ve kterém je molekula disociována, a tím také měnit separační možnosti systému.

Difúze vzorků, která by probíhala ve volném prostředí, je u elektroforetického systému potlačena volbou gelového nosného média. Podle druhu gelu rozlišujeme čtyři elektroforetické systémy: škrobový, polyakrylamidový, acetylcelulózový a agarózový^[4].

V agarózovém elektroforetickém systému lze separovat různé formy plasmidové DNA vznikající různým stupněm poškození:



stočená (forma bez zlomů)

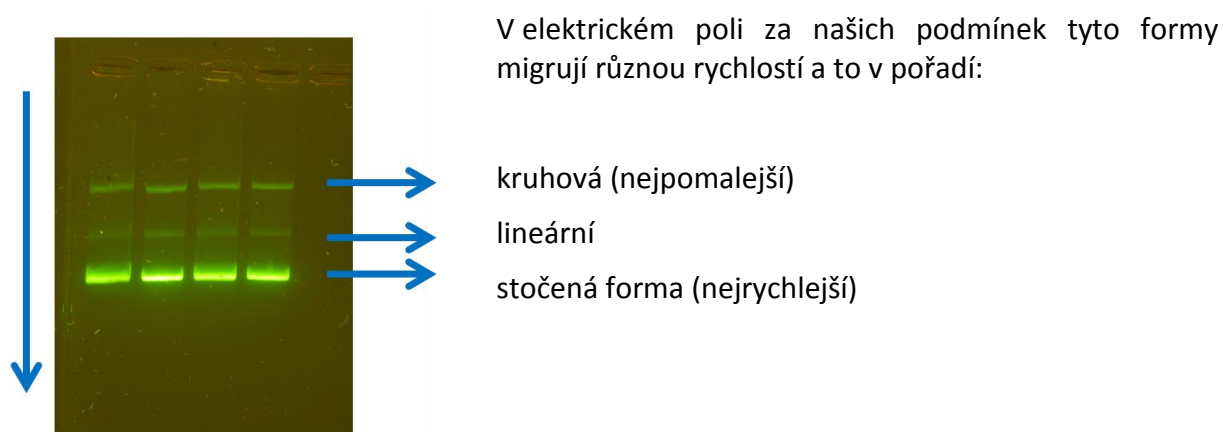
kruhová neboli relaxovaná (s jedním zlomem na jednom vlákně nebo s více takovými zlomy v dostatečné vzdálenosti od sebe)

lineární (s jedním zlomem na obou vlákněch)

Po mnohonásobném poškození se lineární forma degraduje.

SSB = single strand-break (jednoduchý zlom)

DSB = double strand-break (dvojný zlom)



Úloha

Rozhodněte, jestli je DNA při ozáření různými dávkami záření gama ^{60}Co více poškozená když je rozpuštěná ve vodě nebo suchá.

Pro úlohu jsou připravené následující chemikálie:

- destilovaná H_2O
- plasmid pBR322 (80 ng/ μl)
- fosfátový pufr (pH 8, 0.1 M)
- agarosa
- TAE pufr (pH 8, 50x)
- SYBR Green I
- nanášecí (loading) pufr

1. Příprava vzorků

Připravíme dvě sady vzorků, které budou obsahovat 100 ng DNA ve vodě o celkovém objemu 10 μl . První sadu vzorků budeme ozařovat ve vodě. Druhou sadu vzorků nakapeme na krycí sklíčko nalepené na dno petriho misky a necháme na vzduchu uschnout. Vytvoříme tak tenkou vrstvu suché DNA.

Příprava gelu pro elektroforézu

Připravíme si 40 ml 1 % agarózový gel v 0.5 x TAE. Roztok přikryjeme alobalem a dáme za stálého míchání povařit, dokud se nevyčechá. Poté necháme zchladnout na 60 °C a přidáme fluorescenční barvivo SYBR Green I v poměru 1: 10 000. Poté vlijeme roztok do příslušné formy a necháme tuhnout.

2. Ozařování vzorků kobaltem 60

Vzorky ozáříme na zdroji ^{60}Co dávkou 2, 5, 10 a 20 Gy ve vzdálenosti 0.268 m na vzduchu za pokojové teploty.

Vypočtete doby ozařování, víte-li, že $\frac{At}{Ao} = e^{-\lambda t}$ a $\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}}$, kde

Ao je aktivita zdroje k 1.1.1997 (aktivita je počet přeměněných jader za sekundu)

At je aktivita zdroje k 17.6.2013 (tj. po čase $t = 6011$ dní)

λ je přeměnová konstanta a $T_{1/2}$ je poločas rozpadu (oboje vyjadřuje míru aktivity, $T_{1/2}$ kobaltu 60 je 1925,5 dnů).

Dále víte, že příkon zdroje ve vzdálenosti 1 m k 1.1. 1997 byl 0,0032497 Gy/s, vypočtete tedy

- a) jaký je nyní příkon zdroje ve vzdálenosti 1 m
- b) jaký je nyní příkon zdroje ve vzdálenosti ozařování
- c) jak dlouho trvá ozářit v této vzdálenosti vzorky 10 Gy.

Nápověda: příkon zdroje je úměrný aktivitě a klesá s druhou mocninou vzdálenosti.

3. Elektroforéza

Ztuhlý gel přesuneme do horizontální lázně, kterou vyplníme 0.5 x TAE pufrem. Do každého vzorku přidáme 2 μ l nanášecího (loading) pufru a rychle nanášíme vzorky na gel v definovaném pořadí (každý do jedné jamky). Elektrody zapojíme tak, aby DNA migrovala na gelu ve správném směru. Nastavíme 100 V napětí tak a zapneme elektroforézu. Migrace trvá hodinu, čas aktivně vyplníme obědem.

Otázka: Jaký náboj má DNA a kam se v elektrickém poli tedy bude pohybovat?

4. Zobrazení gelu

Gel opatrně vyndáme z lázně a vyfotíme v temné komoře na UV stolku.

5. Vyhodnocení výsledků

Výsledky vyhodnotíte pomocí programu Luthien. Sestavíte protokol a prezentaci, kde diskutujete vlastní měření. Protokol bude mimo jiné obsahovat: výpočet doby ozáření, graf vyhodnocení změn stočené formy plasmidové DNA, hezké obrázky, především gelu.

Literatura

1. von Sonntag, C.: Free-radical-induced DNA damage and its repair, a chemical perspective, Springer, Heidelberg 2006.
2. Mozumder, A. and Hatano, Y.: Charged particle and photon interactions with matter, chemical, physicochemical, and biochemical consequences with applications, Marcel Dekker, Inc., New York 2004.
3. Kuna, P. and Navrátil, L.: Klinická radiobiologie, Manus, Praha 2005.
4. Garfin, D.E.: Electrophoretic methods, Academic Press, 2000.