

Jak chránit DNA před zářením

Marie Davidková

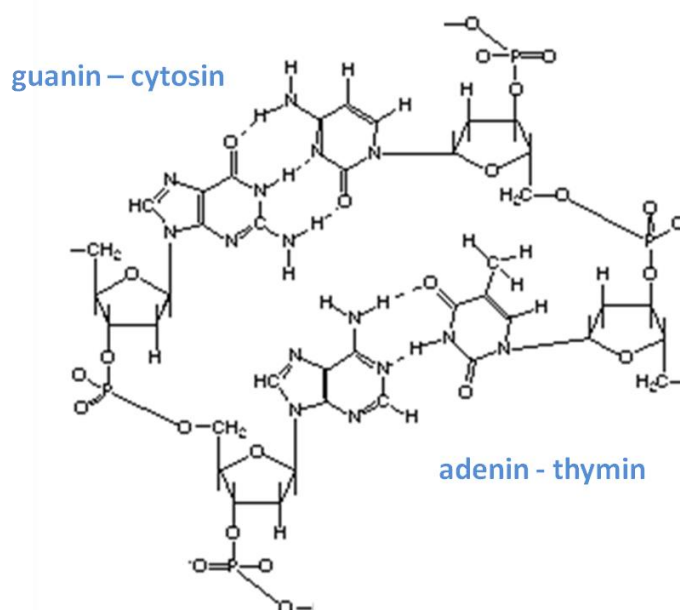
davidkova@ujf.cas.cz

Seznámíme se s metodou agarózové elektroforézy. Prozkoumáme, jak přítomnost různých sloučenin (scavengerů) zmenšuje riziko poškození plasmidové DNA ionizujícím zářením.

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.

Nepříznivé působení volných radikálů může být redukováno přítomností tzv. vychytávačů neboli scavengerů. Mezi účinné scavengery patří např. thiole, vitamin E, vitamin C, alkoholy a mnoho dalších.

Vůči oxidačnímu poškození je, jak už bylo řečeno, citlivá zejména DNA. Záření může vyvolat zlomy na řetězcích dvojšroubovice – 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 nabitě 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 $F_2 = kv$, 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

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

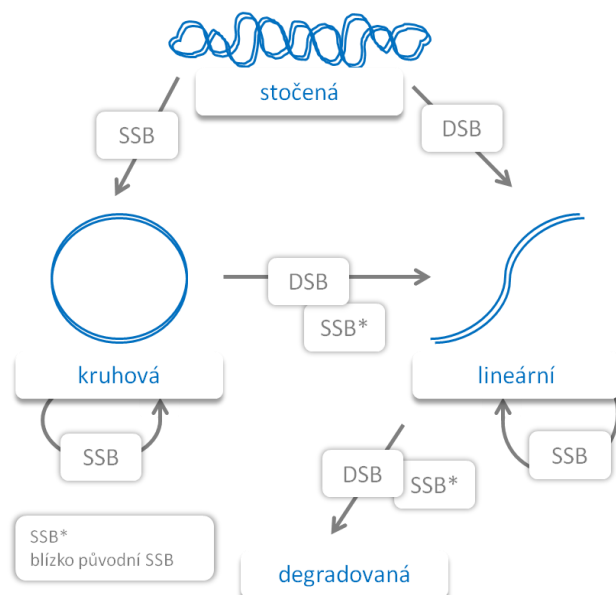
V případě pouze částečně disociovaných molekul, jako jsou bílkoviny či nukleové kyseliny, musíme uvažovat tzv. efektivní pohyblivost μ_{ef} , která je ještě závislá na stupni disociace α podle

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

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)

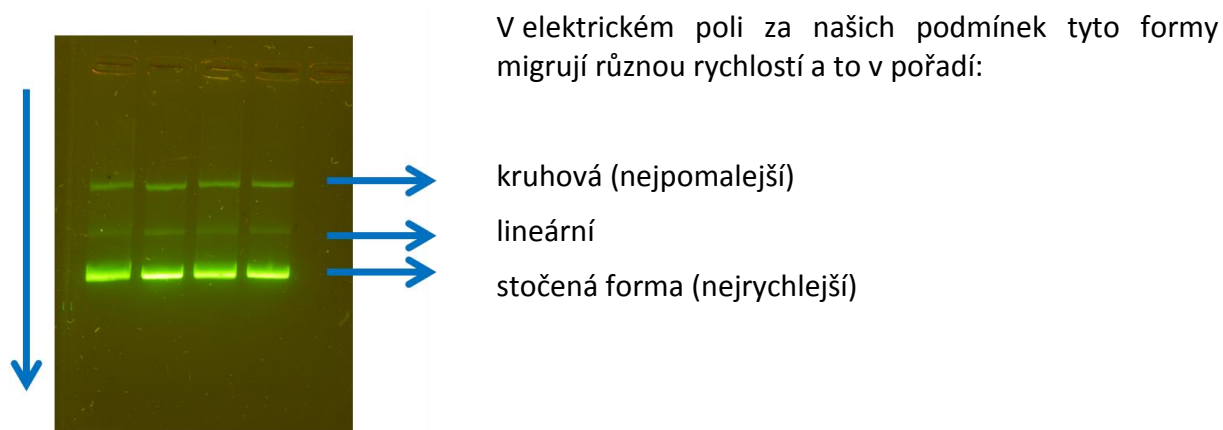
kruhová neboli relaxovaná (s jedním zlomem na jednom vlákně nebo s více takovými zlomy v dostatečné vzdálenosti od sebe)

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, který scavenger (ethanol, dimethyl sulfoxid, glycyglycin) je nejúčinnější při ochraně plasmidové DNA před různými dávkami záření gama ^{60}Co .

K úloze jsou připravené následující chemikálie:

- destilovaná H_2O
- ethanol
- DMSO (5 M)
- GlyGly (1.5 M)
- plasmid pBR322 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- fosfátový pufr (pH 8, 0.1 M)
- agarosa
- TAE pufr (pH 8, 50x)
- SYBR Green I
- nanášecí (loading) pufr

1. Příprava vzorků

Připravte si tři sady po třech vzorcích, které budou vždy obsahovat 100 ng DNA v 20 mM fosfátovém pufru a celkový objem vždy doplníte vodou do 10 μl . První vzorek nebude obsahovat žádný scavenger, další dva různé koncentrace vychytávačů dle tabulky:

sada č.	scavenger	koncentrace
1	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	0,01 a 0,1 M
2	DMSO	0,01 a 0,1 M
3	GlyGly	0,01 a 0,1 M

2. Příprava gelu pro elektroforézu

Připravte si 40 ml 1 % agarózový gel v 0.5 x TAE. Roztok přikryjte alobalem a dejte za stálého míchání povařit, dokud se nevyčeří. Poté nechte chlادنout až na 60 $^{\circ}\text{C}$. Přidejte fluorescenční barvivo SYBR Green I v poměru 1: 10 000 a promíchejte. Poté vlijte do

příslušné formy, zamezte alespoň částečně přístupu světla (SYBR je citlivý na světlo) a nechte tuhnout.

3. Ozařování vzorků kobaltem 60

Vzorky ozařujte na zdroji ^{60}Co dávkou 10 Gy ve vzdálenosti 0.293 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.

Správná odpověď:

4. Elektroforéza

Ztuhlý gel přesuneme do horizontální lázně, kterou vyplníme 0.5 x TAE pufrem. Do každého vzorku přidáme 2 μl 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?

5. Zobrazení gelu

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

6. Vyhodnocení výsledků

Výsledky vyhodnoťte pomocí programu Luthien. Sestavte protokol a prezentaci, kde diskutujte vlastní měření. Protokol bude mimo jiné obsahovat: krátký popis jednotlivých scavengerů včetně vzorců, 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.