Poškození DNA vlivem ionizujícího záření

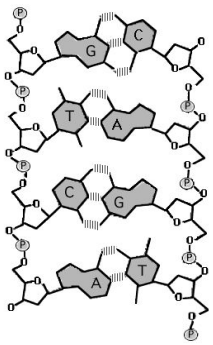
J. Stránský [*1]
L. Kladivová [*2]
K. Štancelová [*3]
[*1] Gymnázium Dobruška
Str.jan@seznam.cz
[*2] Gymnázium a SOŠ Frýdek – Místek
luciekladivova@centrum.cz
[*3] Gymnázium Bučovice
joji@xko.cz
Ústav jaderné fyziky AV ČR, Oddělení dozimetrie záření

Abstrakt:

Cílem výzkumu bylo zjistit, jaký dopad má ionizující záření na strukturu dvoušroubovice DNA, která je považována za primární terč ionizujícího záření. Metodou agarozové elektroforézy byl zjišťován počet jednoduchých a dvojných zlomů s rostoucí dávkou záření. Měření bylo prováděno na různých typech plazmidové DNA ve vodném roztoku. Vzorky byly vyhodnocovány pomocí softwaru ImageQuant. Počet jednoduchých zlomů roste přímo úměrně s dávkou záření. Výskyt dvojných zlomů není v rozsahu použitých dávek významný.

1.Úvod

DNA je jedinečnou nositelkou genetické informace o struktuře a funkci buňky. Základním stavebním kamenem DNA je tzv. nukleotid, který se skládá z fosforečného zbytku, pětiuhlíkového cukru deoxyribóza a purinové (A - adenin a G - Guanin) nebo pyrimidinové dusíkaté báze (T - thymin a C - cytosin). DNA se v organismu uchovává ve formě pravotočivé dvoušroubovice, ve které se nacházejí dva proti sobě jdoucí řetězce nukleotidů. Její poškození může mít vážné důsledky na celý organismus. Obnovení struktury a funkce DNA v biologických systémech po ozáření je pro organizmy jedním ze základních a nenahraditelných mechanizmů [1].

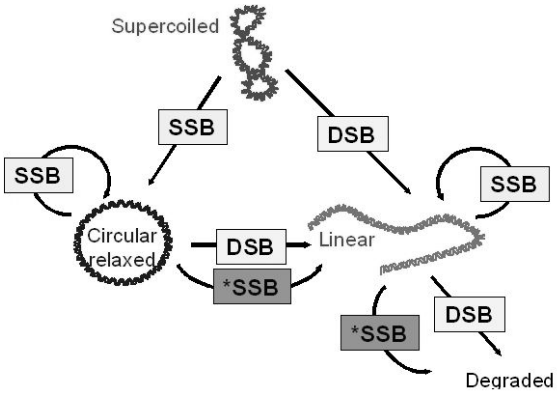


Obr.1
Primární struktura DNA

Ionizujícím zářením nazýváme takové záření, které je schopno vyrážet elektrony z atomového obalu a tím látku ionizovat. Ionizující záření poškozuje DNA buď přímo, tj. interakcí ionizující částice s atomem molekuly DNA, nebo nepřímo prostřednictvím produktů radiolýzy vody. Výsledkem je především produkce zlomů řetězce (jednoduchých i dvojitých), vznikají však také poškození bází, cross-linky uvnitř DNA nebo DNA-protein, lokální denaturace apod.

2.Materiály a metody

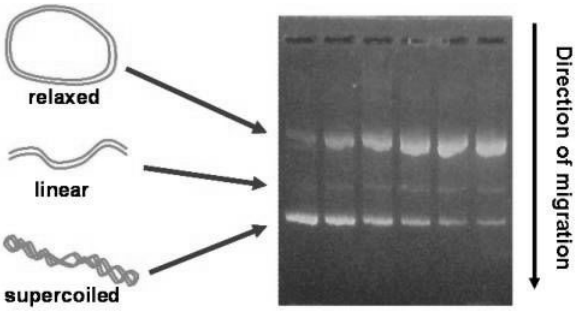
Poškození DNA vlivem ionizujícího záření bylo zkoumáno metodou horizontální agarozové elektroforézy. Byla použita plazmidová DNA typu $pcDNA_3$ a pBS. Plazmid je extrachromozomální (vyskytující se mimo buněčné jádro) samostatně se replikující kruhová DNA. Zpravidla ji tvoří 1000 až 400 000 bázových párů. Nepoškozený plazmid se



Obr. 2

nachází ve smotané (supercoiled) formě. Jestliže dojde účinkem ionizujícího záření ke zlomu jednoho řetězce (tzv. single strand break - SSB), plazmid relaxuje do kruhové formy. Pokud dojde ke zlomu obou řetězců (double strand break – DSB), vznikne lineární forma plazmidu (Obr.2). Vzorky byly studovány ve vodném roztoku, jehož výhodou je absence reparačních mechanismů přítomných v buňce, což umožňuje sledovat výtěžky poškození primárně způsobené ionizujícím zářením.

Vzorky obsahovaly 100 ng DNA v 10 mM fosfátovém pufru a konečný objem vzorku byl 10 µl. Ozařování probíhalo na zdroji ^{60}Co o dávkovém příkonu 3,2 mGy/s (tato hodnota je z 1.1.1997) do 75 Gy po 15 Gy (což odpovídá přibližně 20 minutám). Vzorky byly ozařovány v tubách Eppendorf o objemu 1,5 ml. Ozářené vzorky byly deponovány do 0,8 % agarozového gelu s fluorescenčním barvivem Sybr Green I a pH bylo stabilizováno pufrem TAE 0,5x. Vzorky migrovaly dvě hodiny při napětí 100 V. Metoda agarozové elektroforézy umožňuje odseparovat výše zmíněné tři formy DNA (Obr. 3), neboť v gelu migrují různou rychlostí.



Obr. 3

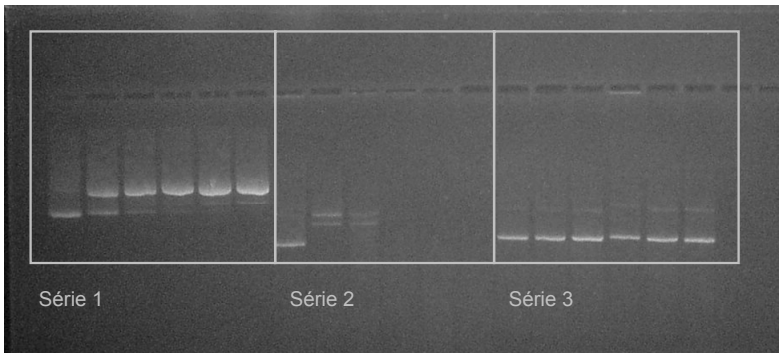
Gel byl umístěn pod UV lampu a vyfotografován přes želatinový filtr. Procentuální zastoupení jednotlivých forem DNA bylo kvantifikováno pomocí softwaru ImageQuant. Počet jednoduchých a dvojných zlomů na jeden plazmid byl vypočten pomocí vztahů [2]:

$$\bar{x} = \ln[(1 - L')/S']$$
$$\bar{y} = L'/(1 - S'),$$

kde $\bar{x}$ je střední hodnota počtu jednoduchých zlomů, $\bar{y}$ je střední hodnota dvojných zlomů, L' je zastoupení lineární formy DNA, S' je zastoupení smotané formy DNA.

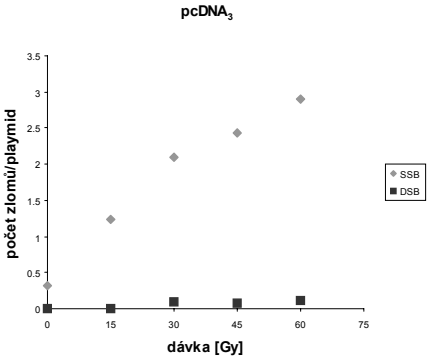
3. Výsledky a diskuse

Bylo ověřeno, že s rostoucí dávkou roste výtěžek SSB a DSB. V grafu 1 je vynesen počet SSB a DSB na plazmid při ozařování $pcDNA_3$ (série 1). Zatímco počet SSB lineárně roste, výskyt DSB není v rozsahu použitých dávek významný. Vzhledem k tomu, že výše uvedené vzorce pro výpočet počet zlomů na plazmid jsou použitelné, pouze pokud jsou detekovány všechny tři formy, nemohly být hodnoty vypočteny pro 75 Gy.

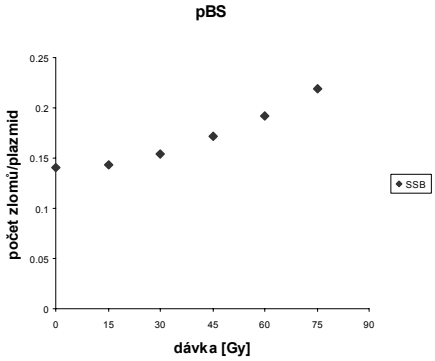


Nárůst počtu SSB s dávkou byl pozorován také pro plazmid pBS (série 3). Počet dvojných zlomů zůstává v rozsahu použitých dávek velmi nízký. Je to způsobeno tím, že původní plazmid se nacházel v roztoku s vysokou koncentrací tzv. scavengerů, což jsou látky, které jsou schopny vychytávat radikály vzniklé při radiolýze vody.

Když byl ozářen plazmid pBS původně rozpuštěný ve vodě (série 2), již při dávce 15 Gy byla všechna DNA poškozena a od dávky 45 Gy byla již tak fragmentována, že nebyla pozorovatelná.



Graf 1



Graf 2

Na snímku gelu bylo také patrno, jak velikost plazmidu ovlivňuje rychlost migrace – plazmid pBS o velikosti 3,5 kb domigroval výrazně dál než pcDNA3 o velikosti 5,4 kb.

4.Shrnutí

Ionizující záření významně poškozuje strukturu molekuly DNA. Bylo ověřeno, že s rostoucí dávkou záření roste počet zlomů molekuly DNA přesně podle hypotézy.

Poděkování

Ústavu jaderné fyziky AV ČR, Oddělení dozimetrie záření za poskytnutí prostorů, techniky a materiálu ke studiu, Viktorii Štísové za objasnění problému a pomoc při realizaci, Václavu Štěpánu za podnětné připomínky, Vojtěchu Svobodovi za organizaci a koordinování Fyzikálního týdne, FJFI ČVUT za poskytnutí prostředků a organizaci.

Reference:

[1] ALPEN, E. L., *Radiation biophysics,* Academic Press 1990, str. 117 - 119

[2] SPOTHEIM-MAURIZOT, M *ET AL. DNA radiolysis by fast neutrons,* INT. J. RADIAT: BIOL. 1990, vol. 57, str. 301 - 313