

УДК 547.963.3

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МОЛЕКУЛЫ ДНК,  
ВЫЗВАННЫХ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЕМ В ВОДНО-ЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ  
БОЛЬШОЙ ИОННОЙ СИЛЫ**

© 2007 С.В. Пастон\*, И.М. Зырянова, Ю.В. Зайчикова, В.В. Замотин

*Санкт-Петербургский государственный университет, физический факультет**Статья поступила 13 марта 2007 г.*

Методами низкоградиентной вискозиметрии, двойного лучепреломления в потоке, кругового дихроизма и УФ-спектрофотометрии изучены конформационные изменения ДНК в водно-этанольных растворах (содержание этанола 0—22 вес. %, ионная сила  $\mu = 0,15$  М NaCl), подвергнутых действию  $\gamma$ -излучения дозами 10 и 30 Гр. В отличие от водно-спиртовых растворов меньшей ионной силы, в которых наблюдается кооперативное уменьшение удельного объема макромолекулы при критической концентрации спирта, соответствующей нарушению структуры воды ( $C_{кр} = 16,5$  вес. % для этанола), при  $\mu = 0,15$  М объем интактной ДНК остается неизменным во всем исследованном интервале концентраций спирта. В этих условиях также исчезает обнаруженная ранее для водно-спиртовых растворов с  $\mu = 0,003$  М NaCl инверсия зависимости удельного объема ДНК от дозы облучения. При  $\mu = 0,15$  М зависимость  $V_{уд}$  ДНК от  $C_{эт}$  не имеет особенностей при  $C_{эт} = C_{кр}$ , и при  $C_{эт} \geq 1,7$  вес. % объем макромолекулы не меняется при облучении дозами до 40 Гр. Это, по-видимому, объясняется тем, что при больших концентрациях соли спирт перестает влиять на структуру растворителя и его роль в процессе  $\gamma$ -облучения ограничивается только его способностью перехватывать активные продукты радиолиза воды.

**Ключевые слова:** конформация ДНК, водно-спиртовые растворы,  $\gamma$ -излучение.

Присутствие алифатических спиртов в растворе существенно влияет на конформацию молекулы ДНК. Являясь для нативной ДНК плохими растворителями, спирты при больших концентрациях вызывают ее осаждение и денатурацию [1]. При концентрациях 70—80 об. % наблюдается переход во вторичной структуре макромолекулы типа  $B \rightarrow C$ ,  $B \rightarrow A$  или  $C \rightarrow A$  в зависимости от природы и концентрации органического компонента и низкомолекулярной соли, связанный с уменьшением степени гидратации двойной спирали [2—4]. Изменения во вторичной структуре ДНК, фиксируемые при исследовании спектров кругового дихроизма (КД), могут происходить и при меньшем содержании спирта с ростом ионной силы раствора [5]. Присутствие спиртов в растворе уменьшает концентрацию многовалентных катионов, вызывающих конденсацию ДНК [6], причем их влияние не ограничивается снижением диэлектрической проницаемости раствора, так как число и форма сконденсированных частиц при одном и том же значении  $\epsilon$  зависят от природы используемого спирта.

При существенно более низкой концентрации спирта (так называемой "критической" концентрации  $C_{кр}$ , которая для этанола составляет 16,5 вес. % или 3,5 моль/л), не зависящей от ионной силы раствора, был обнаружен переход на уровне третичной структуры макромолекулы — кооперативное падение удельного объема ( $V_{уд}$ ), — не затрагивающий ее вторичную структуру и равновесную жесткость [7—9]. Этот переход был изучен для растворов ряда алифатических

\* E-mail: spaston@pobox.spbu.ru

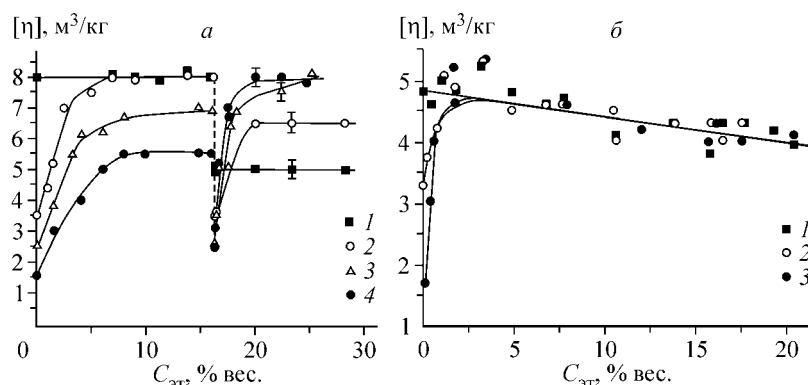


Рис. 1. Зависимость характеристической вязкости водно-этанольных растворов ДНК от концентрации спирта ( $\mu = 0,003$  М NaCl) при разных дозах облучения  $D$ : 0 (1); 10 (2); 20 (3); 30 Гр (4) (а); ( $\mu = 0,15$  М NaCl) при разных дозах облучения  $D$ : 0 (1); 10 (2); 30 Гр (3) (б)

спиртов, и было установлено, что критическая концентрация неэлектролита зависит от длины и степени разветвленности его углеводородной цепочки и в пределах погрешности эксперимента совпадает с концентрацией, при которой происходит изменение структуры растворителя, наблюдаемое в исследованиях термодинамических, спектральных и других свойств водно-спиртовых систем [10—15]. По мнению авторов этих работ, при концентрации спирта  $C_{сп} < C_{кр}$  гидрофобные группы спирта располагаются в полостях каркасной структуры воды, а ОН-группы участвуют в образовании водородных связей с молекулами воды. При этом происходит стабилизация структуры воды, т.е. увеличивается прочность водородных связей между молекулами воды, контактирующими с неполярными группами, вследствие затруднения их вращений. Когда концентрация спирта увеличивается до  $C_{кр}$ , его гидрофобные группы перестают уместаться в полостях водного каркаса, и происходит разрушение структуры воды. Авторы [7—9] сделали вывод, что объемные эффекты в растворах ДНК, наблюдаемые при  $C_{сп} = C_{кр}$ , связаны со структурными перестройками в смешанном растворителе. Следует отметить, что с ростом концентрации соли в растворе величина относительного снижения  $V_{уд}$  ДНК при  $C_{сп} = C_{кр}$  уменьшается, и при  $\mu > 0,1$  М NaCl кооперативный переход исчезает вовсе — объем макромолекулы остается неизменным [7—9].

Известно, что алифатические спирты являются перехватчиками ОН-радикалов и тем самым способны защищать биологические макромолекулы от косвенного действия радиации [16, 17]. Изменение структуры растворителя при критической концентрации спирта приводит к тому, что характеристическая вязкость и, следовательно, удельный объем  $\gamma$ -облученной ДНК резко уменьшаются при  $C_{сп} = C_{кр}$  [18—20] (рис. 1, а), при этом в области  $C_{сп} > C_{кр}$  наблюдается обратная по сравнению с растворами с  $C_{сп} < C_{кр}$  зависимость этих параметров от дозы облучения. Этот удивительный эффект предположительно связан с изменением взаимодействий полимер—растворитель под действием  $\gamma$ -излучения. Таким образом, понятно, что структура растворителя играет важную роль в процессе  $\gamma$ -облучения ДНК. В настоящей работе исследована конформация ДНК,  $\gamma$ -облученной в спирто-водных растворах при  $\mu = 0,15$  М, что должно позволить разделить влияние спирта на структуру растворителя и его действие как перехватчика продуктов радиолитической воды.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали ДНК фирмы Serva из тимуса теленка молекулярной массы 8 МДа. Молекулярную массу ДНК определяли по значению характеристической вязкости  $[\eta]$  в растворе 0,15 М NaCl [21]. Концентрацию ДНК в растворе  $c$  определяли по методу Спирина [22]. Оптическое поглощение растворов ДНК измеряли на спектрофотометре СФ-26 (Россия). Круговой дихроизм изучали на дихрографе Mark IV (Франция). Для всех исследованных систем оценивали молярный коэффициент экстинкции  $E_{260}(P)$ . Использовали растворы, для которых величина

$E_{260}(P)$  соответствовала нативному состоянию ДНК ( $E_{260}(P) < 6900$ ). Этиловый спирт предварительно перегоняли. Спектры УФ-поглощения перегнанного спирта свидетельствовали об отсутствии примесей, поглощающих в интересующей нас области (200—300 нм). Концентрацию спирта в спиртово-водном растворе определяли по плотности.

Растворы ДНК подвергали воздействию  $\gamma$ -излучения  $^{137}\text{Cs}$  в аэробных условиях на установке ЛМБ- $\gamma$ -I в Институте цитологии РАН (С.-Петербург). Мощность дозы составляла 2,86 крад/мин, концентрация ДНК в облучаемых растворах — 0,01 г/дл.

**Вискозиметрия.** Относительную вязкость  $\eta_r$  растворов ДНК разной концентрации измеряли в модифицированном низкоградиентном магнитном ротационном вискозиметре [23] при разных значениях градиента скорости потока  $g$  и экстраполировали к  $g = 0$ . Значение характеристической вязкости  $[\eta]$  находили экстраполяцией по формуле

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{(\eta_r - 1)_{g \rightarrow 0}}{c} \right).$$

Согласно уравнению Флори [24], величина  $[\eta]$  связана с параметрами макромолекулы:

$$[\eta] = \Phi \frac{(\overline{h_0^2})^{3/2}}{M} \alpha^3 = \Phi \frac{(LA)^{3/2}}{M} \alpha^3, \quad (1)$$

где  $(\overline{h_0^2})^{1/2}$  — среднеквадратичное расстояние между концами невозмущенной цепи;  $\alpha$  — коэффициент линейного набухания макромолекулы в хорошем растворителе;  $\Phi$  — коэффициент Флори;  $L$  — гидродинамическая длина макромолекулы,  $A$  — длина статистического сегмента;  $M$  — молекулярная масса ДНК. Таким образом, величина  $[\eta]$  определяется как ближними взаимодействиями в цепи ДНК, т.е. жесткостью макромолекулы  $A$ , так и дальними взаимодействиями — ее полиэлектролитным набуханием.

**Двойное лучепреломление в потоке (ДЛП).** Зависимость величины ДЛП  $\Delta n$  растворов ДНК от градиента скорости потока  $g$  измеряли на оптической установке с эллиптическим компенсатором и фотоэлектрической регистрацией [25] в титановом динамооптиметре с внутренним ротором. Динамооптическая постоянная определяется по формуле

$$[n] = \lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0}}{\eta_0 c} \right),$$

где  $\eta_0$  — вязкость растворителя. Независимо от модельных представлений отношение  $[n]/[\eta]$  пропорционально оптической анизотропии макромолекулы, которая складывается из собственной анизотропии и анизотропии формы, возникающей в случае асимметричных частиц с показателем преломления, отличным от показателя преломления растворителя. В работах [26, 27]

показано, что при отсутствии эффекта формы отношение Петерлина  $\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0}}{(\eta_r - 1)\eta_0}$ , определенное в растворе конечной концентрации, равно отношению  $[n]/[\eta]$ . Последнее, согласно формуле Куна, пропорционально оптической анизотропии сегмента  $(\alpha_1 - \alpha_2)$ :

$$\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0}}{(\eta_r - 1)\eta_0} = \frac{[n]}{[\eta]} = \frac{4\pi}{45kT} \frac{(n_s^2 + 2)^2}{n_s} (\alpha_1 - \alpha_2), \quad (2)$$

где  $k$  — постоянная Больцмана;  $T$  — абсолютная температура;  $n_s$  — показатель преломления растворителя. Оптическая анизотропия сегмента

$$(\alpha_1 - \alpha_2) = (a_{||} - a_{\perp})S, \quad (3)$$

где  $(a_{||} - a_{\perp})$  — разность поляризуемости мономерного остатка в направлении оси спирали ДНК и перпендикулярно к ней,  $S$  — число мономерных остатков в статистическом сегменте, которое можно выразить через длину сегмента  $A$  и длину мономерного остатка  $l$  как  $S = A/l$ .

Соотношение (2) справедливо для ДНК, так как в растворах ДНК эффект макроформы пренебрежимо мал по сравнению с собственной анизотропией макромолекулы [28].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было отмечено выше, в водно-спиртовых растворах ионной силы  $\mu > 0,1$  М NaCl объем интактной ДНК не изменяется при  $C_{сп} = C_{кр}$ , т.е. можно ожидать, что при облучении этих систем мы будем наблюдать только перехватывающее действие спирта. На рис. 1, б показана зависимость характеристической вязкости ДНК от концентрации этанола в растворе с  $\mu = 0,15$  М NaCl для разных доз облучения. В отсутствие спирта, как и следовало ожидать, наблюдается уменьшение  $[\eta]$  и соответственно удельного объема макромолекулы с ростом дозы облучения (рис. 2, кривая 1). Добавление этанола в раствор приводит к снижению радиационного эффекта (см. рис. 1, б) и уже при достаточно малых концентрациях спирта — около 2 вес. % — объем ДНК в пределах погрешности не изменяется под действием облучения во всем исследованном интервале концентраций этанола. Приведенная на рис. 2 (кривая 2) зависимость  $[\eta]$  ДНК от дозы облучения при  $C_{эт} = 1,7$  вес. % свидетельствует о радиопротекторном действии этанола. Однако следует отметить, что, как видно из рис. 1, при  $\mu = 0,003$  М NaCl радиозащитный эффект этанола (о котором можно говорить при  $C_{эт} < C_{кр}$ ) значительно слабее. Видимо, это связано с тем, что в этих двух случаях различны как конформация интактной ДНК, так и структура растворителя.

Подчеркнем, что наблюдаемые конформационные изменения молекулы ДНК при  $\mu = 0,15$  М NaCl и 0,003 М NaCl и дозах облучения до 30 Гр связаны только с изменением объема макромолекулы. Согласно формуле Флори (1)

$$[\eta] = \Phi \frac{(LA)^{3/2}}{M} \alpha^3 = \Phi M^{1/2} \left( \frac{Al}{m} \right)^{3/2} \alpha^3$$

(где  $m$  и  $l$  — молекулярная масса мономерного остатка и длина его проекции на ось спирали,  $L = \frac{M}{m}l$ ), величина характеристической вязкости определяется молекулярной массой макромолекулы  $M$ , жесткостью  $A$  и объемными эффектами  $\alpha$ . По мнению ряда авторов [29, 30], двуниевые разрывы в цепи ДНК, которые могли бы привести к снижению  $M$ , при облучении в растворе практически отсутствуют вплоть до доз около 100 Гр. Согласно оценкам других исследователей [31—34], количество двуниевых разрывов составляет от 0,2 до 0,01 на  $10^7$  Да на 10 Гр, что не может внести заметного изменения в значение  $[\eta]$ .

Возможные нарушения в структуре ДНК под действием облучения, такие как, например, одностебельные разрывы или дефекты вторичной структуры, как оказалось, не влияют на величину жесткости ДНК в проведенном эксперименте. Такой вывод можно сделать на основании исследования динамического двойного лучепреломления растворов ДНК (см. таблицу) [20]. Оптическая анизотропия ДНК, которая определяется произведением длины статистического сегмента макромолекулы и разности поляризуемостей пары оснований (формулы (2) и (3)), максимальная для нативной ДНК в В-форме, остается неизменной. Отметим, что нарушение вторичной структуры привело бы к снижению значений обоих сомножителей в уравнении (3).

Кроме того, согласно выводам работы [35], одностебельные разрывы (ОР), вызванные действием ДНКазы, в количестве до 5 ОР на  $600 \text{ \AA}$  не влияют на величину жесткости ДНК при комнатной температуре. Вместе с тем, по данным [31—34] число одностебельных разрывов при  $\gamma$ -облучении растворов ДНК оценивается как 1—8 ОР на

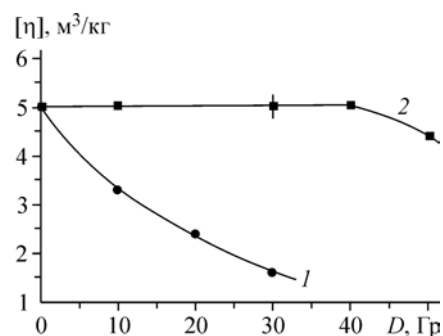


Рис. 2. Зависимость характеристической вязкости растворов ДНК ( $\mu = 0,15$  М NaCl) от дозы облучения:  $C_{эт} = 0$  (1);  $C_{эт} = 1,7$  вес. % (2)

Значение отношения Петерлина для растворов ДНК при разных дозах  $\gamma$ -облучения (погрешность определения  $\pm 0,5 \cdot 10^{-7}$  (м·с<sup>2</sup>)/кг)

D, Гр	$\frac{(\Delta n / g)_{g \rightarrow 0}}{(\eta_r - 1)\eta_0} \times 10^7, (\text{м} \cdot \text{с}^2) / \text{кг}$	
	$C_{\text{эт}} = 0$	$C_{\text{эт}} = 18 \text{ вес. \%}$
0	21,8	21,5
10	21,5	22,7
30	22,0	21,4

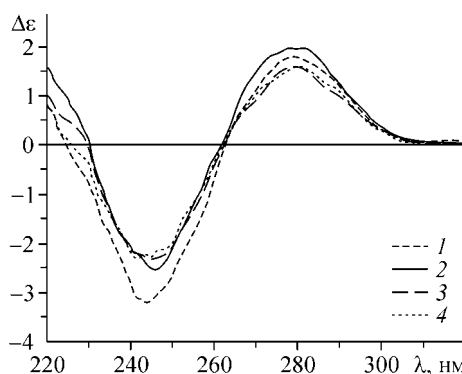


Рис. 3. Спектры КД водно-этанольных растворов ДНК ( $\mu = 0,15 \text{ M NaCl}$ ):  $C_{\text{эт}} = 0, D = 0$  (1);  $C_{\text{эт}} = 0, D = 30$  (2);  $C_{\text{эт}} = 18 \text{ вес. \%}, D = 0$  (3);  $C_{\text{эт}} = 18 \text{ вес. \%}, D = 30 \text{ Гр}$  (4)

$10^7$  Да (т.е. около  $5 \cdot 10^4 \text{ \AA}$ ) на 10 Гр. Таким образом, если ОР и появляются при используемых нами условиях облучения, их количество незначительно и они, по-видимому, не оказывают влияния на конформацию макромолекулы.

Спектры КД для необлученных и  $\gamma$ -облученных водно-этанольных растворов ДНК (рис. 3) обнаруживают незначительные изменения по сравнению со спектром интактной ДНК в бесспиртовом растворе, но в целом соответствуют B-форме. Спектры УФ поглощения ДНК в исследованных системах остаются неизменными в пределах погрешности эксперимента. Таким образом, наблюдаемое поведение характеристической вязкости макромолекулы при варьировании концентрации этанола в растворах  $\mu = 0,003 \text{ M NaCl}$  (см. рис. 1, а) и  $0,15 \text{ M NaCl}$  (см. рис. 1, б) связано только с изменением дальних взаимодействий, т.е. объемных эффектов в растворе. Можно заключить, что при  $\mu = 0,15 \text{ M NaCl}$  спирт уже не влияет на структуру воды (возможно, из-за того, что она уже в значительной мере изменена ионами), и мы видим только эффект перехвата ОН-радикалов плюс монотонное ухудшение качества растворителя для ДНК, проявляющееся в постепенном снижении удельного объема как необлученной, так и облученной макромолекулы. В случае же растворов с  $\mu = 0,003 \text{ M NaCl}$  при  $C_{\text{эт}} > C_{\text{кр}}$  мы фактически наблюдаем, как с ростом дозы облучения увеличивается сродство ДНК и растворителя.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Herskovits T. // Arch. Biochem. Biophys. – 1962. – **97**. – P. 474 – 484.
2. Ivanov V.I., Minchenkova L.E., Schyolkina A.K., Poletaev A.I. // Biopolymers. – 1973. – **12**. – P. 89 – 110.
3. Malenkov G., Minchenkova L., Minyat E. et al. // FEBS Lett. – 1975. – **51**, N 1. – P. 38 – 42.
4. Zimmerman S.B., Pfeiffer B.H. // J. Mol. Biol. – 1979. – **135**. – P. 1023 – 1027.
5. Huey R., Mohr S.C. // Biopolymers. – 1981. – **20**. – P. 2533 – 2552.
6. Arcott P.G., Ma C., Wenner J.R., Bloomfield V.A. // Ibid. – 1995. – **36**. – P. 345 – 364.
7. Frisman E.V., Veselkov A.N., Slonitsky S.V. et al. // Ibid. – 1974. – **13**. – P. 2169 – 2178.
8. Frisman E.V., Slonitsky S.V., Veselkov A.N. // Int. J. Quant. Chem. – 1979. – **16**. – P. 847 – 855.
9. Веселков А.Н., Фрисман Э.В. // Молек. биол. – 1979. – **13**, № 1. – С. 184 – 191.
10. Franks F., Ives D.J.G. // Quart. Rev. (London). – 1966. – **20**. – P. 1.
11. Белоусов В.П., Кочнев И.Н., Сидорова А.И. Молекулярная физика и биофизика водных систем. Вып. 2 / Под ред. А. И. Сидоровой. – Л.: ЛГУ, 1974. – С. 3 – 15.
12. Вукс М.Ф. // Там же. – С. 16 – 22.
13. Свищев И.М., Гончаров В.В. // Журн. структур. химии. – 1990. – **31**, № 3. – С. 71 – 76.
14. Ланишина Л.В., Дакар Г.М. // Журн. физ. химии. – 1996. – **70**, № 3. – С. 411 – 415.
15. Zana R., Eljebbari M.J. // J. Phys. Chem. – 1993. – **97**. – P. 11134 – 11136.
16. Siddiqi M.A., Bothe E. // Rad. Res. – 1987. – **112**. – P. 449 – 463.
17. Worm K.H., Klimczak U., Schulte-Frohlinde D. // Int. J. Rad. Biol. – 1993. – **64**, N 5. – P. 485 – 495.
18. Фрисман Э.В., Зарубина О.П., Зырянова И.М. и др. // Биофизика. – 1997. – **42**, № 1. – С. 117 – 124.
19. Пастон С.В., Сушко М.Л., Мельник Б.С. и др. // Там же. – 2002. – **47**, № 3. – С. 453 – 458.

20. Пастон С.В., Замотин В.В., Зырянова И.М. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – **43**, № 6. – С. 633 – 639.
21. Eigner J., Doty P. // J. Mol. Biol. – 1965. – **12**. – P. 549 – 580.
22. Спирин А.С. // Биохимия. – 1958. – **23**. – С. 656 – 662.
23. Фрисман Э.В., Щагина Л.В., Воробьев В.И. // Коллоидн. журн. – 1965. – **27**. – С. 130 – 133.
24. Flory P. / Principles of the polymer chemistry. – N. Y.: Cornell Univ. Press, 1953.
25. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворе. – М.: Наука, 1964.
26. Фрисман Э.В., Сибилева М.А., Красноперова А.В. // Высокомол. соед. – 1959. – **1**. – С. 597 – 606.
27. Peterlin A.A. // J. Polym. Sci. – 1954. – **12**. – P. 45 – 51.
28. Фрисман Э.В., Воробьев В.И., Щагина Л.В. // Высокомол. соед. – 1964. – **29**. – С. 884 – 890.
29. Крушинская Н.П., Шальнов М.И. // Радиобиология. – 1967. – **7**, № 1. – С. 24 – 30.
30. Herskind C. // Int. J. Radiat. Biol. – 1987. – **52**, N 4. – P. 565 – 575.
31. Klimczak U., Ludwig D.S., Mark F. et al. // Ibid. – 1993. – **64**, N 5. – P. 497 – 510.
32. Peak J.G., Ito T., Robb F.T., Peak M.J. // Ibid. – 1995. – **67**, N 1. – P. 1 – 6.
33. Жижина Г.П., Бунина Е.Ф., Скалацкая С.И. // Радиобиология. – 1983. – **23**, № 6. – С. 783 – 786.
34. Pogożelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. // Rad. Res. – 1999. – **151**, N 4. – P. 442 – 448.
35. Hays J.B., Zimm B.H. // J. Mol. Biol. – 1970. – **48**. – P. 297 – 317.