

УДК 577.035

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Г. П. ЖИЖИНА, С. И. БОБОВИЧ, К. Е. КРУГЛЯКОВА

ИЗМЕНЕНИЯ В И.-К. СПЕКТРАХ ДНК И ДНП ПОСЛЕ
ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ
И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 22 IX 1972)

В настоящее время радиационная биофизика располагает широким спектром физических и физико-химических методов, позволяющих исследовать повреждения в сложных биомакромолекулах. Одним из этих методов является и.-к. спектроскопия, которая широко используется для изучения вторичной структуры белков и нуклеиновых кислот. Изучается изменение структуры биополимеров под воздействием таких факторов, как

Таблица 1

ν , см ⁻¹	Отнесение	Контроль	γ -облуч. 55 крад	у.-ф. облуч.
ДНК				
3350	ν_{as} NH ₂	1,51±0,04	1,18±0,03	1,34±0,03
3200	ν_s NH ₂	1,26±0,03	0,98±0,03	1,13±0,02
2930	ν NH, ν CH ₃	0,55±0,02	0,48±0,02	0,56±0,02
2800	ν CH	0,30±0,01	0,28±0,02	0,31±0,01
1705	ν C = O _{св}	1,17±0,02	1,10±0,03	—
1680	ν C = O _{несв}	1,20±0,02	1,17±0,04	1,40±0,04
1650	ν C = N	1,31±0,03	1,17±0,03	1,21±0,03
1605	δ NH ₂	0,82±0,02	0,68±0,02	0,76±0,02
1580	ν C = C	0,50±0,01	0,36±0,01	0,40±0,01
1530	δ NH	0,13±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01
1090	ν_s PO ₂ ⁻	1,09±0,03	1,07±0,02	1,03±0,02
1060	ν POC	0,96±0,02	0,96±0,02	1,02±0,02
1010	ν COC _{сах}	0,39±0,01	0,42±0,01	0,42±0,01
960	ν скелета	0,40±0,01	0,32±0,01	0,40±0,01
ДНП				
3270	ν NH	1,81±0,04	1,85±0,07	—
2930	ν CH	0,96±0,04	0,96±0,05	—
1640	Амид I	2,15±0,05	2,16±0,05	—
1530	Амид II	1,10±0,03	0,86±0,03	—
1500	Белок	0,72±0,02	0,70±0,02	—
1440	δ CH ₂	0,18±0,01	0,11±0,01	—
1266	δ NH	0,35±0,02	0,30±0,03	—
1090	ν_s PO ₂ ⁻	1,14±0,03	1,12±0,02	—
1060	ν POC	1,10±0,01	1,10±0,02	—
1010	ν COC _{сах}	0,44±0,02	0,43±0,01	—
960	ν скелета ДНК	0,44±0,02	0,37±0,02	—

влажность, температура, рН среды, комплексообразование с различными веществами (¹⁻³). Естественно предположить, что метод и.-к. спектроскопии может дать существенную информацию о модификации молекул ДНК при воздействии сильных повреждающих факторов и при патологических процессах.

В связи с этим мы использовали метод и.-к. спектроскопии для анализа повреждений первичной и вторичной структуры ДНК, вызываемых ионизирующей и у.-ф. радиацией в опытах *in vitro*. Препарат ДНП был получен по методу Зьюби и Доти (⁴), облучение ДНК проводили в растворе, ДНП — в геле. Запись и.-к. спектров пленок ДНК и ДНП осуществляли при 32% относительной влажности по методике, описанной ранее (⁵). Были измерены величины поглощения полос и.-к. спектров нативных препаратов ДНК

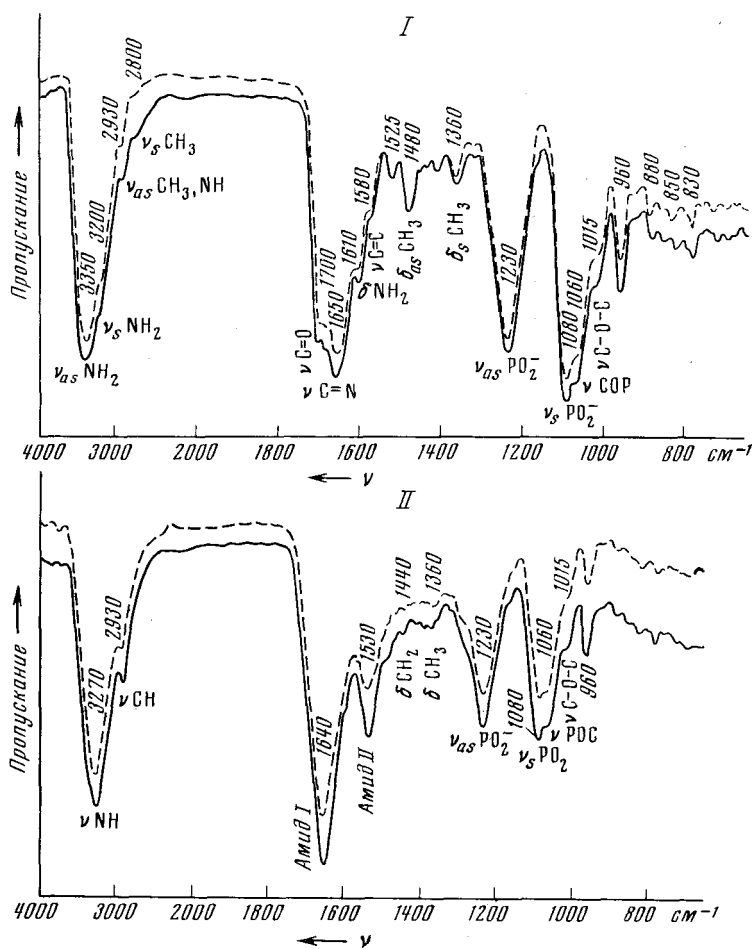


Рис. 1. И.-к. спектры пленки ДНК (I) и ДНП (II) тимуса теленка при 32% отн. вл. Сплошные линии — нативная ДНК, ДНП, пунктирные — γ -облученные ДНК, ДНП, доза 55 и 65 крад соответственно

и ДНП на основе метода базисной линии Рао (⁶) по отношению к внутреннему стандарту — полосе 1230 см^{-1} , соответствующей антисимметричным валентным колебаниям PO_2 -группы (^{5, 7}) (см. табл. 1). Каждое приведенное в табл. 1 значение является средним для 10—15 образцов; там же приведены дисперсии средних значений.

В спектре γ -облученной ДНК полоса 1705 см^{-1} (колебания карбонильных групп оснований, участвующих в водородных связях), характерная для вторичной структуры ДНК (³), становится плохо разрешенной (рис. 1). В области колебаний сахарофосфатного остова ДНК ухудшается разрешение полос 1090 и 1060 см^{-1} . Аналогичные явления, выраженные значительно сильнее, наблюдаются в и.-к. спектре ДНК, денатурированной теплом, и могут быть объяснены разрушением ее вторичной структуры. Таким обра-

зом, по и.-к. спектру γ -облученной ДНК можно судить о ее частичной денатурации.

Количественные воспроизводимые изменения величин поглощения ряда полос в и.-к. спектре ДНК были обнаружены при дозе 20 крэд. При увеличении дозы (55 крэд) наблюдается существенное уменьшение поглощения полос с частотами 3350, 3200 и 1605 см^{-1} , соответствующих валентным и деформационным колебаниям аминогрупп оснований, полосы 1580 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям $\text{C}=\text{C}$ -связей оснований, а в области колебаний сахарофосфатного остова ДНК — полосы 960 см^{-1} (табл. 1) Указанные изменения могут свидетельствовать о дезаминировании оснований и насыщении двойных связей пиримидинов. Эти процессы, как известно, имеют место при облучении ДНК ⁽⁸⁾. На рис. 2 показана зависимость относительного поглощения указанных полос от дозы облучения. Можно видеть, что поглощение этих полос снижается пропорционально дозе, важно отметить также параллельный ход прямых для трех видов колебаний аминогрупп. Деструкцию дезоксирибозы, которая примерно в 3 раза меньше деструкции оснований ⁽⁸⁾, удалось обнаружить только при дозе 95 крэд по снижению поглощения полосы 1010 см^{-1} , соответствующей валентным колебаниям $\text{C}-\text{O}$ -связей дезоксирибозы. При у.-ф. облучении ДНК (260 м μ , доза 4,6 $\cdot 10^6$ эрг/мм²) в ее и.-к. спектре исче-

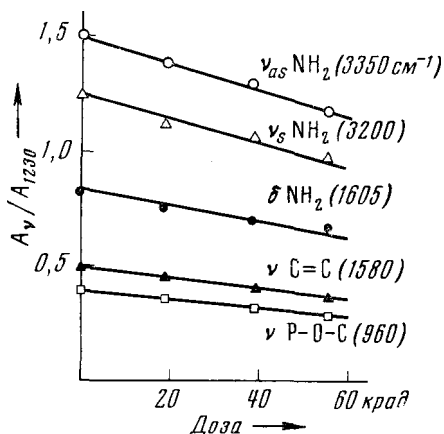


Рис. 2. Дозная зависимость относительного поглощения ряда полос и.-к. спектра γ -облученной ДНК

зает полоса 1705 см^{-1} , смещаясь к 1690 см^{-1} , а полосы 1090 и 1060 см^{-1} меняют взаимное соотношение интенсивностей по сравнению со спектром нативной ДНК (рис. 3, 1). Эти изменения могут указывать на существенную денатурацию молекул ДНК при облучении у.-ф., что согласуется с данными ⁽⁹⁾. Известными фотохимическими реакциями являются димеризация пиримидиновых оснований и дезаминирование димеризованного цитозина, которое сопровождается размыканием связи $\text{C}=\text{N}$ и превращением его в урацил ⁽¹⁰⁾. В соответствии с этим в и.-к. спектре ДНК, облученной у.-ф., наблюдается примерно одинаковое (10%) снижение поглощения полосы $\text{C}=\text{N}$ -связи (1650 см^{-1}) и всех трех полос аминогрупп (3350, 3200 и 1605 см^{-1}). Уменьшение поглощения двойных $\text{C}=\text{C}$ -связей выражено гораздо сильнее (25%), что свидетельствует об участии в процессе димеризации не только цитозиновых, но и тиминовых оснований.

Известно, что выход димера тимина возрастает при понижении температуры и что димер разрушается при облучении ультрафиолетовыми лучами с меньшей, чем 260 м μ длиной волны ⁽¹¹⁾. Понижение температуры облучаемого раствора ДНК до +14° (260 м μ) вызывает усиление полос 1605 и 830 см^{-1} и появление новой полосы с частотой 1400 см^{-1} . Все эти полосы значительно ослабевают после фотореактивации (230 м μ), что позволяет, по-видимому, отнести их к колебаниям димера тимина. Следует отметить, что при анализе изменений поглощения полосы 960 см^{-1} в и.-к. спектрах ДНК при различных воздействиях мы пришли к заключению, что величина поглощения этой полосы снижается в результате разрывов цепей ДНК. Действительно, поглощение этой полосы (при 32% отн. вл.) уменьшалось при воздействиях, вызывающих разрывы в молекулах ДНК — под действием ультразвука и ионизирующей радиации, и оставалось практически неизменным при облучении ДНК у.-ф. лучами, которые денатурируют молекулу ДНК, не приводя к двойным разрывам ее сахарофосфатного остова ⁽⁹⁾.

Весьма интересным представляется исследование повреждений в более сложных системах типа ДНП. Полученные нами и.-к. спектры пленок ДНП (рис. 1, II) хорошо согласуются с данными Бредбери (¹²). Известно, что в области 4000–1500 см^{-1} спектр ДНП обусловлен в основном полосами поглощения белка, а ниже 1400 см^{-1} спектр ДНП идентичен спектру ДНК. При измерении величин поглощения полос спектра ДНП в качестве внутреннего стандарта также использовали полосу 1230 см^{-1} (табл. 1).

В и.-к спектрах γ -облученного раствора ДНП отмечены меньшие изменения по сравнению с контролем, чем в спектрах ДНК (рис. 1, II, табл. 1). Несколько снижается поглощение полос 1266 и 1440 см^{-1} , ухудшается раз-

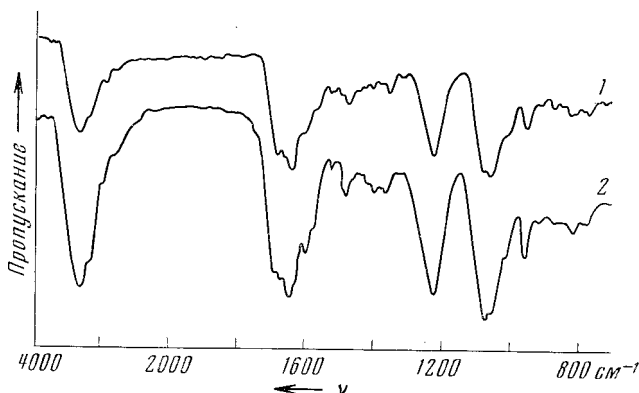


Рис. 3. И.-к. спектр пленки ДНК, облученной γ -ф., при 32% отн. вл., доза $4,2 \cdot 10^6$ эрг/мм²: 1 — облучение при 23°, 2 — при 14°

решение полосы 2930 см^{-1} (валентные колебания CH_2 - и CH_3 -групп). Полоса Амид II (1530 см^{-1}) становится более диффузной, и ее поглощение уменьшается примерно на 25% (доза 65 крад). Снижение интенсивности этой полосы, обусловленной колебаниями полипептидных связей, можно объяснить разрывом этих связей. Несколько неожиданным является уменьшение поглощения полосы 960 см^{-1} , поскольку белок должен снижать радиочувствительность ДНК в составе ДНП.

Таким образом, показано, что метод и.-к. спектроскопии применим для изучения повреждений в макромолекулах ДНК при различных воздействиях и что в сочетании с другими методами исследования он может дать ценную информацию. Метод и.-к. спектроскопии позволяет обнаруживать повреждения целого ряда связей и вторичной структуры ДНК для одного и того же образца биополимера.

Авторы выражают признательность акад. Н. М. Эмануэлю за внимание и интерес к работе.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Ю. Н. Чиргадз, ИК-спектры и структура полипептидов и белков, «Наука», 1965.
- ² Г. П. Жижина, Э. Ф. Олейник, Усп. хим., **41**, 474 (1972).
- ³ M. Tsuboi, Appl. Spectrosc. Rev., **3**, 45 (1969).
- ⁴ G. Zubay, P. Doty, J. Mol. Biol., **1**, 1 (1959).
- ⁵ Г. П. Жижина, В. М. Жильцова, К. Е. Круглякова, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3 (1973).
- ⁶ C. N. R. Rao, Chemical Application of Infrared Spectroscopy, 1963, p. 535.
- ⁷ G. B. Sutherland, M. Tsuboi, Proc. Roy. Soc. A, **239**, 446 (1957).
- ⁸ G. Scholes, Progr. Biophys. Mol. Biol., **13**, 59 (1963).
- ⁹ В. М. Жильцова, Б. П. Уланов и др., ДАН, **164**, 198 (1965).
- ¹⁰ D. Shugar, Abhandl. Dtsch. Acad. Wiss., Berlin, Kl. Med., № 1, 72 (1962).
- ¹¹ H. E. Johns, S. A. Rapaport, M. Delbruck, J. Mol. Biol., **4**, 104 (1962).
- ¹² E. M. Bradbury, W. C. Price et al., J. Mol. Biol., **4**, 50 (1962).