

INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN γ SOBRE LA ESTRUCTURA DEL ADN

J.A. Bertolotto, M.G. Campo*, P. Willging, y B. Follari

Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) Santa Rosa (L.P.) - Argentina
e-mail: mgcampo@criba.edu.ar

Se estudia la acción de la radiación gamma sobre el ADN sonicado en solución acuosa. Se obtienen los parámetros eléctricos e hidrodinámicos de las moléculas a partir de mediciones de birrefringencia eléctrica de las soluciones. Para ello se emplea el modelo y teoría desarrollado por Yamaoka y Fukudome. Se concluye que el ADN en solución irradiada con dosis de hasta 15 Gy no sufre cambios en la longitud de la molécula, mientras que para una dosis de 30 Gy se observa una disminución de la distancia extremo a extremo, debido a un aumento en la flexibilidad de la molécula.

The action of gamma radiation over the sonicated in aqueous solution DNA is studied in this article. The electrical and hydrodynamical parameters of the DNA molecule are obtained by electrical birefringence's measurements of the solutions. The model and the theory developed by Yamaoka and Fukudome are used in order of that. The conclusion is that radiated with to the utmost 15 Gy doses DNA's solution suffers no changes on its molecule's length, as long as, for a 30 Gy doses radiation, a decrease in the distance end to end of DNA molecule's owing to an increase in DNA molecule's flexibility is observed.

I. INTRODUCCIÓN

Cuando se someten células a la radiación ionizante, la destrucción celular está determinada predominantemente por el daño producido sobre la molécula de ADN. La irradiación de una solución acuosa produce la radiólisis del agua, cuyos productos interactúan con la molécula de ADN dañándola⁽¹⁾.

Es usual la utilización de métodos electro-ópticos para el estudio estructural del ADN en solución acuosa, debido a su alta sensibilidad a cambios de naturaleza eléctrica o de estructura molecular, como así también, de la interacción de la molécula de ADN con los iones disueltos en la solución^{(2),(3),(4)}. C.T. O'Konki et al.^{(5),(11)} realizaron medidas electro-ópticas de los efectos de la radiación γ sobre soluciones de ADN nativo, donde la molécula se comporta como un ovillo estadístico.

En este trabajo se utilizó ADN sonicado, con el fin de obtener muestras de un peso molecular menor, que permite aplicar un modelo físico simplificado de la molécula (tipo varilla), aplicando teorías preexistentes^{(4),(6),(7)} para hallar sus parámetros eléctricos, ópticos e hidrodinámicos.

II. SECCIÓN TEÓRICA

Modelo de la molécula de ADN sonicado. Momento dipolar eléctrico.

Se utiliza para el análisis teórico de los valores de birrefringencia obtenidos, la teoría desarrollada por Yamaoka y Fukudome^{(6),(7),(8)}, donde se considera a la molécula de ADN sonicado como un macroión tipo varilla, sin momento permanente. De acuerdo con dicha teoría el momento dipolar eléctrico inducido consta de dos componentes: a) m_s , momento dipolar saturable; b) m_n , momento dipolar no saturable.

Sea $\Delta\alpha = (\alpha_{33} - \alpha_{11})$ la anisotropía de polarizabilidad covalente, responsable del momento inducido no saturable (para el eje longitudinal de la

varilla se utiliza el subíndice 3); y $\Delta\sigma = (\sigma_{33} - \sigma_{11})$ la anisotropía de polarizabilidad iónica, correspondiente al momento saturable. Entonces:

$$m = m_s + m_n$$

$$m = \Delta\alpha \cdot E + \Delta\sigma \cdot E \text{ si } E \leq E_0$$

$$\text{y } m = \Delta\alpha \cdot E + \Delta\sigma \cdot E \text{ si } E > E_0$$

Función de orientación

La función de orientación, indica el grado de orientación de las partículas ionizables en solución con el campo eléctrico. Su relación con la birrefringencia medida a un campo E , $\Delta n(E)$, y la birrefringencia de saturación obtenida por extrapolación en la zona de campos altos, Δn_s , es:

$$\Phi(E) = \frac{\Delta n(E)}{\Delta n_s} \quad (1)$$

Para calcular la función de orientación del conjunto de partículas ionizadas, se siguió el procedimiento dado por Yoshioka⁽⁷⁾. Considerando los siguientes parámetros:

$$\gamma = \frac{(\Delta\alpha + D\sigma) \cdot E^2}{2kT}$$

$$\gamma' = \frac{\Delta\alpha \cdot E^2}{2kT}$$

$$\gamma_0 = \frac{\Delta\sigma \cdot E_0^2}{2kT}$$

$$E^* = \frac{E}{E_0}$$

$$u = \cos\theta$$

donde k es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, y θ el ángulo entre el eje longitudinal de un polímero y la dirección del campo aplicado. Para

construir esta función de orientación, llamada SUSID por sus autores, tres casos se consideran por separado:

I.) $E_0 < E$, la saturación del momento dipolar inducido ocurre para el valor de campo E_0 , en este caso la función de orientación $\Phi(\gamma, \gamma_0, \gamma')$ es:

$$\Phi(\gamma, \gamma_0, \gamma') = \frac{3 I_2 + e^{-\gamma_0} I_4}{2 I_1 + e^{-\gamma_0} I_3} - \frac{1}{2} \quad (2)$$

Las integrales I_1, I_2, I_3 e I_4 están dadas por las expresiones siguientes:

$$I_1 = \frac{1}{\gamma^{1/2}} \int_0^{1/E^*} e^{(\gamma^{1/2} u)^2} d(\gamma^{1/2} u) = \frac{1}{\gamma^{1/2}} \int_0^{1/E^*} e^{x^2} dx$$

$$= \frac{1}{\gamma^{1/2}} F\left(\frac{\gamma^{1/2}}{E^*}\right)$$

$$I_2 = \frac{1}{\gamma^{3/2}} \int_0^{1/E^*} (\gamma^{1/2} u)^2 d(\gamma^{1/2} u)$$

$$= \frac{1}{2\gamma} \left[\frac{1}{E^*} e^{(\gamma^{1/2}/E^*)^2} - \frac{1}{\gamma^{1/2}} F\left(\frac{\gamma^{1/2}}{E^*}\right) \right]$$

$$I_3 = e^{-(\gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2} \int_0^{1/E^*} e^{(\gamma^{1/2} u + \gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2} du =$$

$$\frac{1}{\gamma^{1/2}} e^{-(\gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2} \left[F\left(\gamma^{1/2} + \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}}\right) - F\left(\frac{\gamma^{1/2}}{E^*} + \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}}\right) \right]$$

$$I_4 = e^{-(\gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2} \int_0^{1/E^*} u^2 e^{(\gamma^{1/2} u + \gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2} du$$

$$= \frac{1}{2\gamma} \left(1 - \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma'} \right) e^{(\gamma' + 2\gamma_0 E^*)} - \left(\frac{1}{E^*} - \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}} \right) e^{2\gamma_0 + (\gamma^{1/2}/E^*)^2}$$

$$+ \frac{e^{-(\gamma_0 E^*/\gamma^{1/2})^2}}{\gamma^{1/2}} \left(2 \left(\frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}} \right)^2 - 1 \right)$$

$$\left[F\left(\gamma^{1/2} + \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}}\right) - F\left(\frac{\gamma^{1/2}}{E^*} + \frac{\gamma_0 E^*}{\gamma^{1/2}}\right) \right]$$

$$\text{donde } F(x) = \int_0^x e^{t^2} dt$$

II) $E_0 \geq E$

En el caso $\gamma_0 \rightarrow \infty$ la función de orientación se reduce a:

$$\Phi(\gamma) = \frac{3 \gamma e^\gamma - \gamma^{1/2} F(\gamma^{1/2})}{4 \gamma^{3/2} F(\gamma^{1/2})} - \frac{1}{2} \quad (3)$$

III) Dos casos límite de orientación por campo eléctrico:

a) Región de campo eléctrico extremadamente bajo:

$$\Phi(\gamma \ll 1, E^* \ll 1) = \frac{2}{15} \gamma + \frac{3}{315} \gamma^2 \quad (4)$$

b) Región de campo eléctrico suficientemente alto:

$$\Phi(\gamma \gg 1) = 1 - \frac{3}{2\gamma - 1} \quad (5)$$

III. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Se utilizó ADN de timo de ternera altamente polimerizado Sigma D1501 Tipo I, con una concentración de 25 mg/dl en solución de 1 mM de NaCl y 0,5 mM de MgCl₂, sonicado durante 5 min. en un sonicador Conte, a una potencia de 50 W, con una frecuencia de 20 KHz. Se obtuvieron 3 tipos de muestras distintas: a) Muestra sin irradiar, b) Muestra irradiada a 15 Gy, c) Muestra irradiada a 30 Gy, utilizando para esto una bomba de cobalto Theratron 80, con un rendimiento de 124 cGy/min.

Para realizar las mediciones de birrefringencia se utilizó el equipo construido en nuestro laboratorio⁽⁸⁾, que consta de una fuente de luz monocromática y plano-polarizada, generador de pulsos Velonex con el cual se aplican campos de hasta 21 kV/cm, con una duración del orden de 100 μs, celda de Kerr con 0,15 cm entre placas y 1 cm de camino óptico, lámina 1/4 de onda, analizador, fotomultiplicador, y osciloscopio conectado a una computadora mediante una interfase. Se desarrollaron los programas de registro de datos, cálculo de la birrefringencia y de ajuste a la función teórica de orientación.

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Resultados

Para la obtención de $\Phi(E)$ experimental se realiza la extrapolación lineal de Δn vs. $1/E^2$, en la región de valores de E suficientemente elevados (por encima de los 18 KV/cm), obteniendo así Δn_s . La Figura 1 muestra las extrapolaciones realizadas para las diferentes muestras.

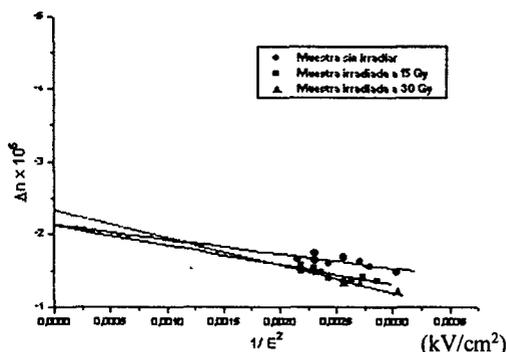


Figura 1. Ajuste de los valores de Δn , con la función SUSID en las diferentes muestras, para la obtención de Δn_s .

En la Figura 2 se muestra $\Phi(E^2)$, para las diferentes muestras, con el ajuste teórico correspondiente. De este ajuste se obtienen las polarizabilidades eléctricas y E_0 , volcados en la Tabla 1.

Tabla 1

Muestra Gy	$\Delta\alpha \text{ F.m}^2$	$\Delta\sigma \text{ F.m}^2$	$E_0 \text{ kV/cm}$	$\Delta\sigma E_0 \text{ C.m}$
0	$1.0 \cdot 10^{-32}$	$3.5 \cdot 10^{-32}$	2.2	7.7
15	0.9510^{-32}	$2.0 \cdot 10^{-32}$	3.6	7.2
30	$0.7 \cdot 10^{-32}$	$0.7 \cdot 10^{-32}$	7.5	5.3

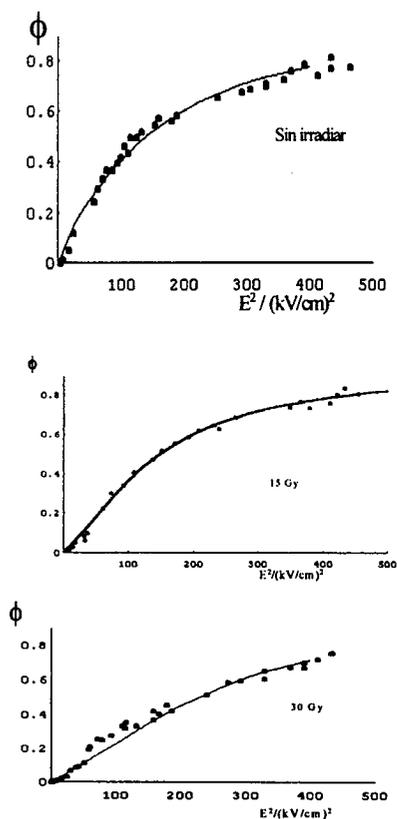


Figura 2. Ajuste de la función ϕ , obtenida a partir de los datos experimentales, por la función teórica SUSID (línea continua).

Dos teorías prevalecen hasta el presente respecto a la variación de la distancia extremo a extremo, L de la molécula de ADN, L con $\Delta\sigma \cdot E_0$: Una predice una dependencia cuadrática y otra cúbica⁽⁶⁾ con L . De ello se obtiene una disminución del orden del 20 % para las muestras irradiadas a 30 Gy, sin observarse cambios sustanciales en las irradiadas a 15 Gy. El momento no saturable $\Delta\alpha \cdot E_0$ es linealmente dependiente con L , esto resulta de la anisotropía de polarizabilidad electrónica. Desde este punto de vista tampoco existe variación entre las muestras sin irradiar y la irradiada a 15 Gy, y a 30 Gy indica una disminución de L de 25 %.

El tiempo de relajación, τ es el mismo para muestras no irradiadas e irradiadas a 15 Gy. Sin embargo existe una disminución del orden de un 15 %, cuando la irradiación es de 30 Gy. Podría concluirse que esta variación responde a una disminución del peso molecular del ADN, de $2,8 \cdot 10^5$ a $2,3 \cdot 10^5$ Dalton, de acuerdo con Houssier⁽⁹⁾. Sin embargo esto correspondería a roturas de cadenas dobles en la molécula, proceso que, según el conocimiento general, no ocurre hasta dosis muy altas de irradiación⁽¹⁾. Debemos considerar entonces la

posibilidad de que esta modificación se deba a otras causas. Una disminución de τ se puede deber también a un aumento de la flexibilidad de la molécula.

Tabla 2

Tiempo de relajación, τ (μs)	Muestra (Gy)
27.5	0
27.4	15
26.3	30

Conclusiones

Del análisis de nuestros resultados experimentales, se concluye que el ADN en solución irradiado con rayos γ con dosis de hasta 15 Gy, no sufre cambios en la distancia extremo a extremo de la molécula, mientras que para una dosis de 30 Gy se observa una disminución de L del orden del 30 %. Esta disminución de L indica un aumento de la flexibilidad que podría deberse a roturas de cadenas simples en la molécula de ADN.

Referencias

- 1 - Frisman, E. y Zarubina, O. Biophys. Chem., **46**, 37-46 (1973)
- 2 - Fredericq, E y Houssier, C. (1973) en "Electric Dichroism and Electric Birefringence", Ed. Clarendon, Oxford (1973).
- 3 - Porschke, D. Biophys. Chem, **49**, 127-139 (1994).
- 4 - Yamaoka, K. y Fukudome, K. J. Chem. Phys. , **92**, 4994-5001 (1988).
- 5 - O'Konski, C. T. y Farinato, R.S. (1979) en "Electro-Optics and Dielectrics of Macromolecules and Coloids", Ed. Plenum Press, New York (1979).
- 6 - Yamaoka, K. y Fukudome, K. J. Chem. Phys. ,**94**, 6896-6903 (1990).
- 7 - Yoshioka, K. J. Chem. Phys., **79**, 3482-3486 (1983).
- 8 - Bertolotto, J.A., Willging, P.A., Pugnali, L.A., Bustos, H.D. en "Anales AFA", **5**, 486-488 (1994).
- 9 - Houssier, C. en "Molecular Electro-Optics", Plenum Press, New York (1980).
- 10 - De la Torre, J.G. y Bloomfield V. A. Biophysics, **14**, 81-139 (1981).
- 11 - Norman, A. y Fields, J.A., Arch. Biochem. Biophys., **71**, 170-186 (1957).