

USO DEL DICROÍSMO LINEAL ELÉCTRICO PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN DROGA-ADN

USE OF ELECTRIC LINEAR DICHOISM TO INVESTIGATE THE DNA-DRUG INTERACTION.

G.M. Corral* and J.A. Bertolotto

Departamento de Física - Universidad Nacional de La Pampa
Avenida Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa (La Pampa) - Argentina
e-mail: gcorral@exactas.unlpam.edu.ar

Se desarrolla la teoría del Dicroísmo Lineal Eléctrico, desde el punto de vista cuántico, a partir del estudio del efecto de la luz sobre una molécula, caracterizada por grupos cromóforos. Se calcula el dicroísmo lineal eléctrico de soluciones diluídas de complejos ADN-droga. Los fragmentos de ADN se modelan como varillas quebradas rígidas, polarizables, sin carga eléctrica y no polares. Se consideran los siguientes casos de interacción ADN-droga: 1) intercalación entre las bases del ADN; 2) fijación en la garganta menor del ADN. Para realizar los experimentos se utilizan, la droga intercaladora proflavina, y la droga que se fija a la garganta menor netropsina. En los cálculos estadísticos se emplea la función de distribución orientacional de Boltzmann, donde la energía es la debida a la interacción entre el momento dipolar inducido y el campo eléctrico orientador. Se mide el dicroísmo lineal eléctrico, en función del campo eléctrico aplicado, de soluciones de ADN sonificado acomplejado, en la longitud de onda correspondiente a la banda de absorción de cada complejo. Se comparan los resultados experimentales obtenidos, con los valores numéricos, del dicroísmo lineal reducido para los dos tipos de fijación, suministrados por la teoría.

Palabras Claves: dicroísmo lineal eléctrico, ADN, fijación garganta menor, intercalación, proflavina, netropsina.

The theory of electric linear dichroism is developed, from the point of view of the quantum theory, studying the light effects on a molecule, characterised by chromophores groups. The electric linear dichroism is calculated for diluted solutions of DNA-drug complex. The DNA fragments can be described as rigid broken rod molecules, with an electric polarizability and without electric charge and dipolar moment. The next cases of the DNA-drugs interaction are considered: 1) intercalation between the DNA bases; 2) binding in the minor groove of DNA. To perform the experiments are utilized the intercalator proflavine and the minor groove binder netropsin. The statistical calculus is performed by using the Boltzmann orientational distribution function, where the energy is due to the interaction between the induced dipolar moment and the orientator electric field. The electric linear dichroism is measured, versus the applied electric field, for aqueous solutions of sonicated DNA-drug complex, in the wavelength corresponding to the absorption band of each complex. The experimental results obtained, with the numerical values, of the reduced electric linear dichroism, for both binding cases, supplied for the theory are compared.

Key Word: electric linear dichroism, DNA, minor groove binding, intercalation, proflavine, netropsin.

I. INTRODUCCIÓN

El Dicroísmo Lineal Eléctrico (ELD), se debe a la absorción anisotrópica de luz linealmente polarizada, en un conjunto de moléculas, orientadas por medio de un campo eléctrico. En espectroscopía de absorción de luz polarizada se utiliza comúnmente una cantidad adimensional llamada Dicroísmo Lineal Reducido, que se define como el cociente entre el ELD, medido para una longitud de onda, una muestra y un camino óptico dados, y la correspondiente absorbancia isotrópica (A) de la misma muestra cuando las partículas están orientadas al azar. El dicroísmo puede ser positivo o negativo, dependiendo de los valores de las componentes del momento de transición asociado con la banda de absorción. Además, se encuentra en la bibliografía que el dicroísmo lineal es una herramienta adecuada para determinar la orientación de drogas, que contienen

grupos cromóforos, ligados a ácidos nucleicos⁽¹⁾. Los experimentos de ELD con complejos ADN-droga, para ajustar nuestra teoría, se realizan con proflavina y netropsina, cuyo modo de fijación al ADN ya se conoce, por trabajos previos, con varias técnicas diferentes. Se ha determinado que la proflavina se intercala entre las bases del ADN y que la netropsina se fija a la garganta menor⁽²⁾.

II. TEORÍA

Modelo Macroión Varilla Quebrada Rígida (VQR)

Desarrollamos la teoría del dicroísmo para una solución de moléculas tipo VQR, basándonos en un trabajo previo⁽³⁾. Tenemos en cuenta el caso de intercalación del ligando entre las bases y el caso de fijación a la garganta menor del ADN. Utilizamos un modelo VQR formado por dos varillas rígidas, cada una de longitud L , que forman un ángulo χ entre

ellas, con tensores polarizabilidad eléctrica α^E y probabilidad de transición \vec{T}_i y \vec{T}_g , con N_i y N_g cromóforos por molécula para los casos de intercalación o de fijación en la garganta menor del ADN, respectivamente. Los tensores probabilidad de transición, \vec{T}_i y \vec{T}_g , para cada caso son los siguientes.

$$\vec{T}_i = \begin{bmatrix} \mu^2 & 0 & 0 \\ 0 & \mu^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (1)$$

$$\vec{T}_g = \begin{bmatrix} \gamma^2 & 0 & 0 \\ 0 & \gamma^2 & 0 \\ 0 & 0 & \xi^2 \end{bmatrix} \quad (2)$$

Parámetros físicos:

El ELD de macromoléculas en solución depende de las propiedades eléctricas de la molécula, tales como la polarizabilidad eléctrica, la carga electroforética y del momento dipolar permanente y de las propiedades ópticas, como la probabilidad de transición. Aquí suponemos que las VQR no son polares, pero sí polarizables.

Para interpretar las mediciones de dicroísmo, calculamos el efecto de la luz sobre cada molécula⁽³⁾. Sean $\vec{E}_z = E_0 \vec{v}_z$ y $\vec{E}_x = E_0 \vec{v}_x$, donde E_0 es la amplitud máxima del campo eléctrico de la luz incidente, $\vec{v}_z = (0, 0, 1)$, $\vec{v}_y = (0, 1, 0)$ y $\vec{v}_x = (1, 0, 0)$.

Sean:

$$Z = \vec{v}_z \cdot \vec{T} \cdot \vec{v}_z, Y = \vec{v}_y \cdot \vec{T} \cdot \vec{v}_y = X = \vec{v}_x \cdot \vec{T} \cdot \vec{v}_x \quad (3)$$

Definimos el dicroísmo lineal reducido en términos de diferencias de energía absorbida por monómero por segundo para dos orientaciones perpendiculares, $w_{//}$ y w_{\perp} , respecto de la energía promedio, w , absorbida por monómero para orientación al azar, de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{w_{//} - w_{\perp}}{w} \quad (4)$$

donde

$$w \propto w' = \frac{1}{8\pi^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (Z + 2X) \sin \theta d\theta d\phi d\psi \quad (5)$$

y \vec{T} es el tensor probabilidad de transición que para cada caso de fijación puede tomar una expresión diferente.

Para calcular el dicroísmo empleamos la función de distribución orientacional de Boltzmann:

$$f = \exp\left(\frac{-U}{kT}\right) \left(\int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \left(\exp\left(\frac{-U}{kT}\right) * \sin \theta d\theta \right) d\phi d\psi \right)^{-1} \quad (6)$$

donde la energía es la debida a la interacción entre el momento dipolar inducido y el campo eléctrico orientador:

$$U = -\left(\frac{E^2}{2}\right) \left(\alpha_{11}^E \sin^2 \theta \sin^2 \psi + \alpha_{22}^E \sin^2 \theta \cos^2 \psi + \alpha_{33}^E \cos^2 \theta \right) \quad (7)$$

Siendo: α_{ii}^E las componentes del tensor polarizabilidad eléctrica⁽⁴⁾, que es función de la constante de polarizabilidad eléctrica, de la longitud de cada brazo, del ángulo entre las varillas y del diámetro de las varillas; y donde θ , ϕ y ψ representan los ángulos de Euler que determinan la orientación relativa entre la molécula y el campo eléctrico orientador.

Entonces, el dicroísmo reducido está dada en general por la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{1}{w} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} (Z - X) f \sin \theta d\theta d\phi d\psi \quad (8)$$

Caso de intercalación del ligando entre las bases del ADN.

La interacción de luz incidente linealmente polarizada paralela al eje x (eje perpendicular al campo eléctrico orientador) está dada por:

$$X_i = 2\mu^2 \left[(-\cos \theta \cos \psi \sin \phi - \cos \phi \sin \psi)^2 + \left(\sin \frac{\chi}{2} \right)^2 (\cos \phi \cos \psi - \cos \theta \sin \phi \sin \psi)^2 \right] \quad (9)$$

mientras que la interacción con luz linealmente polarizada paralela al eje z (eje paralelo al campo eléctrico orientador) está representada por la expresión:

$$Z_i = 2\mu^2 \sin^2 \theta \left(\cos^2 \psi + \sin^2 \psi \sin^2 \frac{\chi}{2} \right) \quad (10)$$

La energía promedio absorbida por monómero por segundo para orientación al azar es proporcional a:

$$w'_i = \mu^2 (3 - \cos \chi) \quad (11)$$

Caso de fijación del ligando a la garganta menor del ADN.

La interacción de luz incidente linealmente polarizada paralela al eje x (eje perpendicular al campo eléctrico orientador) está dada por:

$$X_g = 2\xi^2 \left(\cos \frac{43\pi}{180} \right)^2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi \left(\sin \frac{\chi}{2} \right)^2 + 2\gamma^2 \left(\cos \frac{43\pi}{180} \right)^2 (-\cos \theta \cos \psi \sin \phi - \cos \phi \sin \psi)^2 + 2\gamma^2 \left(\sin \frac{\chi}{2} \right)^2 (\cos \phi \cos \psi - \cos \theta \sin \phi \sin \psi)^2 \quad (12)$$

mientras que la interacción con luz linealmente polarizada paralela al eje z (eje paralelo al campo eléctrico orientador) está representada por la expresión:

$$Z_g = 2\gamma^2 \left(\cos \frac{43\pi}{180} \right)^2 \cos^2 \psi \sin^2 \theta + 2\xi^2 \left(\cos \frac{43\pi}{180} \right)^2 \cos^2 \theta \left(\sin \frac{\chi}{2} \right)^2 + 2\gamma^2 \sin^2 \theta \sin^2 \psi \left(\sin \frac{\chi}{2} \right)^2 \quad (13)$$

La energía promedio absorbida por monómero por segundo para orientación al azar es proporcional a:

$$w'_g = 2.07\gamma^2 - \gamma^2 \cos \chi + 0.53\xi^2 (1 - \cos \chi) \quad (14)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas

Se prepararon soluciones de ADN Sigma Tipo I "Altamente Polimerizado" de timo de ternera, en NaCl 1 mM, las cuales se sonicaron, para obtener moléculas de aproximadamente 130 nm de longitud, cuyo comportamiento se puede ajustar con el modelo de VQR. La droga intercaladora utilizada es Proflavine Hemi-Sulfato ICN Biomedicals Inc MW: 258.3, coeficiente de extinción $\epsilon_{444}=41000 \text{ (mol/l)}^{-1} \text{cm}^{-1(5)}$. La droga utilizada, que se fija a la garganta menor del ADN, es Netropsin dihydrochloride Sigma-Aldrich MW: 503.39, coeficiente de extinción $\epsilon_{295}=21000 \text{ (mol/l)}^{-1} \text{cm}^{-1(6)}$. La preparación de los complejos se realiza por la simple mezcla de soluciones de colorantes con las soluciones macromoleculares.

Método electro-óptico

Se coloca la solución en estudio en la celda de Kerr, la cual contiene dos electrodos sobre los cuales se aplica un campo eléctrico. Se hace incidir un haz de luz monocromático colimado linealmente polarizado sobre la muestra, produciendo un haz de luz emergente anisotrópico. El pulso eléctrico y la señal óptica, el cambio en la intensidad de la luz detectado por un fotomultiplicador, son registrados por un osciloscopio⁽⁷⁾.

El Dicroísmo Lineal Eléctrico se mide para relaciones ADN-droga para los cuales se considera que la fijación es completa⁽²⁾. Para el complejo ADN-proflavina las mediciones se realizan a P/D = 20, donde P = 385 μM es la concentración de ADN y D es la concentración molar de colorante. Para el complejo ADN-netropsina las mediciones se realizan a P/D = 10, a la misma concentración de ADN que en el caso anterior.

IV. RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra el Dicroísmo Lineal Eléctrico Reducido del ADN acomplejado con proflavina y netropsina, en función del campo eléctrico orientador. La intensidad de la señal de ELD medida en la banda de absorción de cada complejo, depende de la orientación de la droga relativa a la

dirección del eje macromolecular. El ELD muestra signo opuesto para los dos tipos de colorante.

Intercalación

La parte negativa del ELD en 444 nm se debe a la absorción de la proflavina intercalada entre las bases del ADN. Para realizar la curva de ajuste teórica se toman los siguientes valores: L=65 nm, K= 2×10^{-6} cm para la constante de polarizabilidad, diámetro de las varillas 10 nm y $\chi = 150^\circ$. Se compara este ajuste con los valores experimentales obtenidos por nosotros para fragmentos de ADN acomplejados con proflavina, como droga intercaladora.

Fijación a la garganta menor

El signo positivo del ELD en 310 nm refleja el anclaje de la netropsina a la garganta menor. Para realizar la curva de ajuste teórica se toman los siguientes valores: L=65 nm, K= 1.1×10^{-6} cm para la constante de polarizabilidad, diámetro de las varillas 10 nm, $\chi = 150^\circ$ y $\frac{\xi}{\gamma} \approx 3$. Se compara este ajuste con

los valores experimentales obtenidos por nosotros para fragmentos de ADN acomplejados con netropsina como droga que se liga a la garganta menor del ADN.

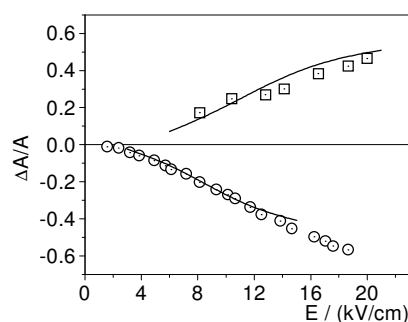


Figura 1: ELD reducido en función del campo eléctrico aplicado. Valores experimentales: \odot proflavina-ADN, \square netropsina-ADN. Ajuste teórico(—)

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para interpretar la dependencia del dicroísmo reducido con el campo eléctrico, para complejos de ADN, con drogas, en solución acuosa, se puede utilizar la expresión obtenida para el dicroísmo lineal eléctrico de VQR debido a la interacción entre el momento dipolar eléctrico inducido y el campo eléctrico aplicado.

El modelo predice valores negativos del ELD para campos eléctricos de 2 a 20 kV/cm, y, en el caso de intercalación entre las bases del ADN, para ciertos parámetros, que indican que el complejo tiene una constante de polarizabilidad eléctrica menor que la del ADN. En el caso de fijación en la garganta menor, el modelo predice valores positivos del ELD, para campos eléctricos de 2 a 20 kV/cm, para ciertos parámetros, que indican que el complejo tiene una constante de polarizabilidad eléctrica menor que la

del ADN. La teoría para ambos casos ajusta correctamente la forma de las curvas del ELD Reducido en función del campo eléctrico orientador. Para campos altos la curva teórica muestra un principio de saturación lo cual puede estar mostrando que en ese rango se debe tener en cuenta la flexibilidad de las moléculas. Lo cual se puede realizar suponiendo la solución de moléculas flexibles como una mezcla de varillas rígidas con una distribución de conformaciones, aplicando la función de distribución conformacional, para el estado estacionario, que resulta de resolver la ecuación de Fokker-Planck del sistema.

Las predicciones de nuestro modelo coinciden con las obtenidas previamente por otros autores ^{(1) (2)}. Pero, a diferencia de éstas, dado que nuestra teoría fue desarrollada a partir de la interacción microscópica, a nivel molecular, obtenemos que se pueden calcular separadamente la absorbancia de la solución y el dicroísmo lineal eléctrico, no reducido, como se describe en un trabajo anterior para el caso de intercalación ⁽³⁾. Combinando la técnica de ELD con otras como espectroscopía de absorción y diálisis

de equilibrio, se pueden ajustar los parámetros microscópicos involucrados en el fenómeno, sin recurrir a la difícil obtención experimental del dicroísmo de saturación a campo infinito. Esta técnica, además, es motivo de controversias ya que implica trabajar con campos eléctricos muy altos, lo cual puede provocar la desnaturalización, por efecto Joule, de las muestras biológicas en estudio.

VI. REFERENCIAS

- 1- Norden B., Kubista M., Kurucsev T., Quarterly Review of Biophysics, 25 (1), 51-170 (1992).
- 2- Colson P., Bailly C., Houssier C., Biophysical Chemistry, 58, 125-140 (1996).
- 3- Corral G.M., Bertolotto J.A. Anales AFA, 16, 185-188 (2004).
- 4- Bertolotto J.A., Campo M.G., Roston G.B., Ascheri M.E., Colloids and Surfaces A, 203, 167-183 (2002)
- 5- Haugen G.R., Melhuish W.H., Trans. Faraday Soc., 60, 386-394 (1964)
- 6- Zimmer, C. Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 15, 285-318 (1975)
- 7- Fredericq E. and Houssier C., in "Electric dichroism and electric birefringence", Clarendon Press, Oxford, (1973).