
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARTA CREMONESE

Spettro d'azione per l'effetto prodotto dalla radiazione ultravioletta sulla molecola del DNA del fago α in vitro

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.1, p. 87-94.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_1_87_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biofisica. — *Spettro d'azione per l'effetto prodotto dalla radiazione ultravioletta sulla molecola del DNA del fago α in vitro* (*). Nota di MARTA CREMONESE (**), presentata (***) dal Corrisp. M. AGENO.

SUMMARY. — *Action spectra for the effect given by u. v. radiation on the DNA molecule from phage α irradiated in vitro.* — Action spectra have been obtained concerning the effect of ultraviolet radiation on the physico-chemical properties of the DNA of phage α irradiated *in vitro*. Through the use of the analytical ultracentrifuge and of the spectrophotometer the following effects have been studied: *a)* production of interruptions in the single polynucleotide strand; *b)* local denaturation; *c)* presence of a fraction of molecules resistant to denaturation; *d)* increase in the bouyant density of irradiated DNA. All of the action spectra thus obtained show a slight variation of the radiation efficiency in the range between 2600 and 2800 Å, and a well defined peak at $\lambda \simeq 2880$ Å. Threshold values for all of the examined effects are at 3000 Å.

È noto che la radiazione ultravioletta interagisce con il DNA sia *in vitro* che *in vivo* modificandone le proprietà chimico-fisiche e biologiche. Dalle ricerche compiute fino ad oggi si può ritenere che le principali modificazioni subite dal DNA siano le seguenti: *a)* denaturazione [1]; *b)* addizione di una molecola di acqua su un doppio legame della citosina [2-3]; *c)* formazione di dimeri della timina [4-5]; *d)* rottura del supporto zuccheri-fosfati.

In questo lavoro ci si è proposti di iniziare la ricerca delle soglie energetiche per tali processi e delle possibili correlazioni esistenti fra di essi.

Poiché il DNA mostra un massimo d'assorbimento alla lunghezza d'onda $\lambda = 2600$ Å si sono esaminati gli effetti prodotti da radiazioni di lunghezze d'onda più lunghe e precisamente nell'intervallo $2600 \text{ Å} \leq \lambda \leq 3000 \text{ Å}$.

Il materiale usato è il DNA del fago α attivo su *B. megatherium*, particolarmente adatto allo scopo in quanto costituisce una specie molecolare inizialmente omogenea, ed in quanto le due eliche mostrano, dopo denaturazione, una notevole differenza di densità in gradiente di CsCl dovuta a differenza della composizione media in basi e consentono quindi uno studio delle modificazioni subite da ciascuna elica separatamente.

Gli irraggiamenti sono stati fatti con un monocromatore a prisma di quarzo, ad intervalli di 20 Å, con una risoluzione $\Delta\lambda \pm 10$ Å, ed a parità di dose media assorbita.

Per analizzare le modificazioni subite dalla molecola del DNA si sono eseguite una serie di misure relative alle proprietà chimico-fisiche che caratterizzano la molecola stessa: tali sono il coefficiente di sedimentazione della

(*) Questo lavoro è stato eseguito nel quadro dell'attività svolta dai Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità con l'appoggio del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma.

(***) Nella seduta dell'8 gennaio 1966.

molecola allo stato nativo; la densità in gradiente di CsCl per il DNA denaturato dopo l'irraggiamento; l'andamento della curva di denaturazione termica seguita allo spettrofotometro.

Dal valore del coefficiente di sedimentazione $s_{20,w}$ si può risalire al peso molecolare medio M del DNA tramite la formula empirica di Doty, McGill e Rice [6]

$$s_{20,w} = 0,0063 M^{0,37}$$

valida per il DNA nativo.

Dalle misure in gradiente di densità di CsCl è invece possibile osservare come s'è detto l'effetto delle radiazioni sulle singole eliche del DNA. A tal fine i grafici ottenuti dall'analisi microfotometrica delle fotografie vengono scomposti nella somma delle gaussiane corrispondenti alle singole componenti del DNA. Per l'interpolazione si è usato un adattamento del metodo di Montecarlo [7], ed i calcoli numerici sono stati eseguiti con un calcolatore 7040.

La posizione dei centri delle gaussiane è legata alla densità della componente in esame tramite la formula di Sueoka

$$\rho = \rho_{rif} + 0,0092 (r^2 - r_{rif}^2)$$

in cui r è la distanza del centro della banda dall'asse di rotazione e ρ_{rif} è la densità del DNA di riferimento.

Il valore della semilarghezza σ delle gaussiane è infine legato al numero medio di tagli per molecola tramite la relazione di Montrol e Simha [8]

$$(1) \quad (\rho + 1) \frac{\sigma_0^2}{\sigma^2} = 1 + 2 \frac{(1 - \alpha) [(1 - \alpha)^{\rho+1} + \alpha(1 + \rho) - 1]}{\alpha^2 \rho}$$

in cui σ_0 è la semilarghezza della gaussiana corrispondente al DNA non irradiato, σ è l'analogha grandezza corrispondente al DNA irradiato, α è il grado medio di depolimerizzazione e ρ è il numero noto, di legami suscettibili di essere spezzati.

Noto dalla (1) il valore di α si ottiene il numero medio r_0 di tagli per molecola dalla relazione

$$r_0 = \alpha \rho.$$

Le misure fatte in velocità di sedimentazione hanno mostrato come irraggiamenti a varie lunghezze d'onda, con una dose assorbita $\bar{D}_{ass} = 6,4 \times 10^{14}$ quanti/mm³, pari cioè alla massima dose usata nel corso delle esperienze su cui riferiremo nel seguito, non provocano alcun cambiamento nel peso molecolare della doppia elica del DNA di α . Dopo una dose di radiazione molto maggiore, pari a $\bar{D}_{ass} = 8 \times 10^{15}$ quanti/mm³, data a $\lambda = 2600 \text{ \AA}$, il coefficiente di sedimentazione passa invece dal valore $32 \pm 1 s$ a $10 \pm 2 s$, corrispondente ad una riduzione del peso molecolare medio per un fattore circa 20.

Altri campioni di DNA del fago α sono stati irradiati con una dose $\bar{D}_{ass} = 3,2 \times 10^{14}$ quanti/mm³ e, dopo denaturazione alcalina, esaminati in ultra-

centrifuga analitica in gradiente di CsCl. Come già detto le curve ottenute sono state scomposte in somma di gaussiane: in fig. 1 sono riportati come esempio i grafici ottenuti rispettivamente per un campione di DNA di controllo *a*) ed un campione irradiato a $\lambda = (2820 \pm 10) \text{ \AA}$ *b*). Si vede come

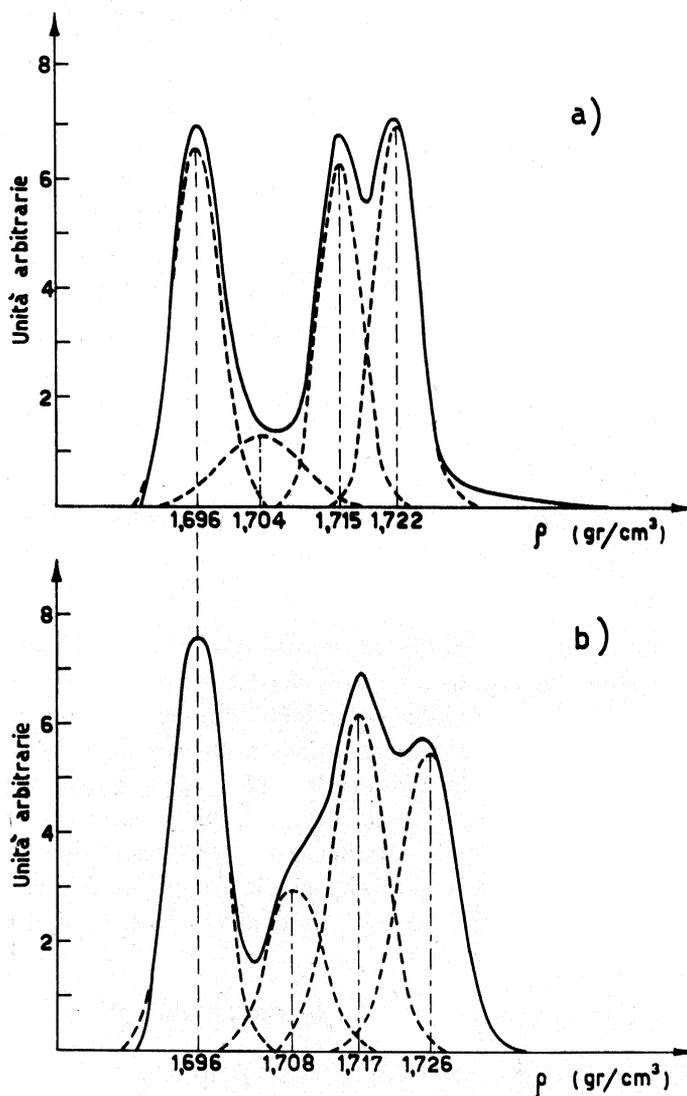


Fig. 1.

nel campione irradiato sia presente una banda molto netta, corrispondente a circa il 25% del DNA totale, imputabile ad una frazione di DNA non denaturato. Tale banda risulta inoltre spostata verso le alte densità: uno spostamento analogo hanno subito le componenti corrispondenti alle due eliche del DNA: queste ultime due gaussiane risultano allargate rispetto al controllo.

Un uguale studio è stato condotto per 16 diversi valori della lunghezza d'onda: in figura 2 sono riportati i valori della densità del DNA resistente a denaturazione, presente dopo l'irraggiamento.

In tale curva si nota come l'efficienza della radiazione varia lentamente fra i 2600 ed i 2800 Å, per poi aumentare fino ad un massimo a $\lambda \simeq 2880$ Å e ridiminuire poi rapidamente con un valore di soglia per $\lambda = 3000$ Å.

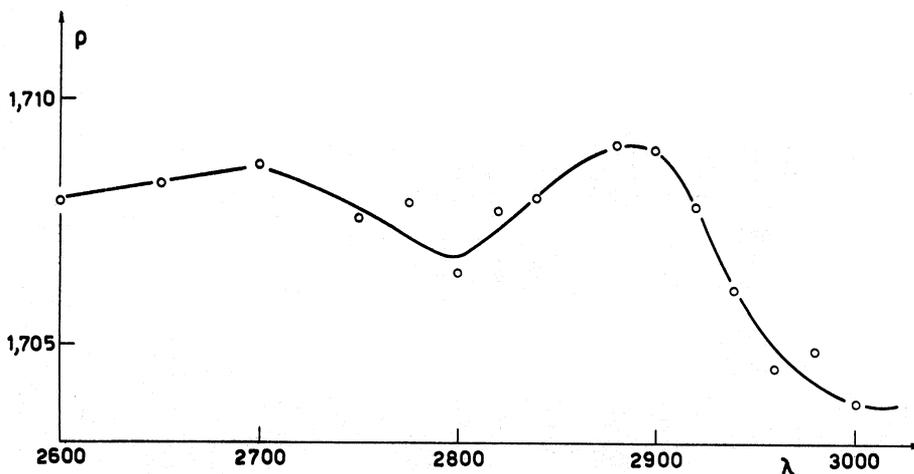


Fig. 2.

In fig. 3 sono riportate inoltre le densità delle due eliche del DNA irradato (ρ_1 elica meno densa; ρ_2 elica più densa): si nota come la radiazione risulta più efficace sull'elica più densa del DNA del fago α e come la differenza di efficienza sia massima per $\lambda = 2860$ Å e nulla per $\lambda = 2980$ Å.

Si è già visto inoltre come dal valore delle σ delle gaussiane si risale al numero medio di rotture per singola elica del DNA. Anche tale parametro ha andamento in funzione della lunghezza d'onda simile a quello riportato in fig. 2 e fig. 3; si può inoltre dire che per le frequenze più efficaci la dose $\bar{D}_{\text{ass}} = 3,2 \times 10^{14}$ quanti/mm³ provoca in media tre tagli per singola elica: l'efficienza quantica risulta quindi

$$\Phi_{\lambda=2860\text{Å}} = 6 \times 10^{-6} \text{ tagli/quantità assorbiti.}$$

Infine sono state fatte delle curve di denaturazione per riscaldamento. Da queste si possono ricavare tre parametri diversi: il valore dell'effetto ipercromico, la temperatura di fusione dei legami idrogeno, T_m , e la rapidità della denaturazione, data dalla larghezza della transizione, cioè l'intervallo di temperatura corrispondente a un aumento della densità ottica compreso tra il 10% e il 90% dell'aumento massimo.

In fig. 4 è mostrata una curva di denaturazione per DNA di α irradato a (2820 ± 10) Å con una $\bar{D}_{\text{ass}} = 6,4 \times 10^{14}$ quanti/mm³ (b) rispetto all'analogica curva relativa al controllo (a). Si nota come l'effetto ipercromico sia

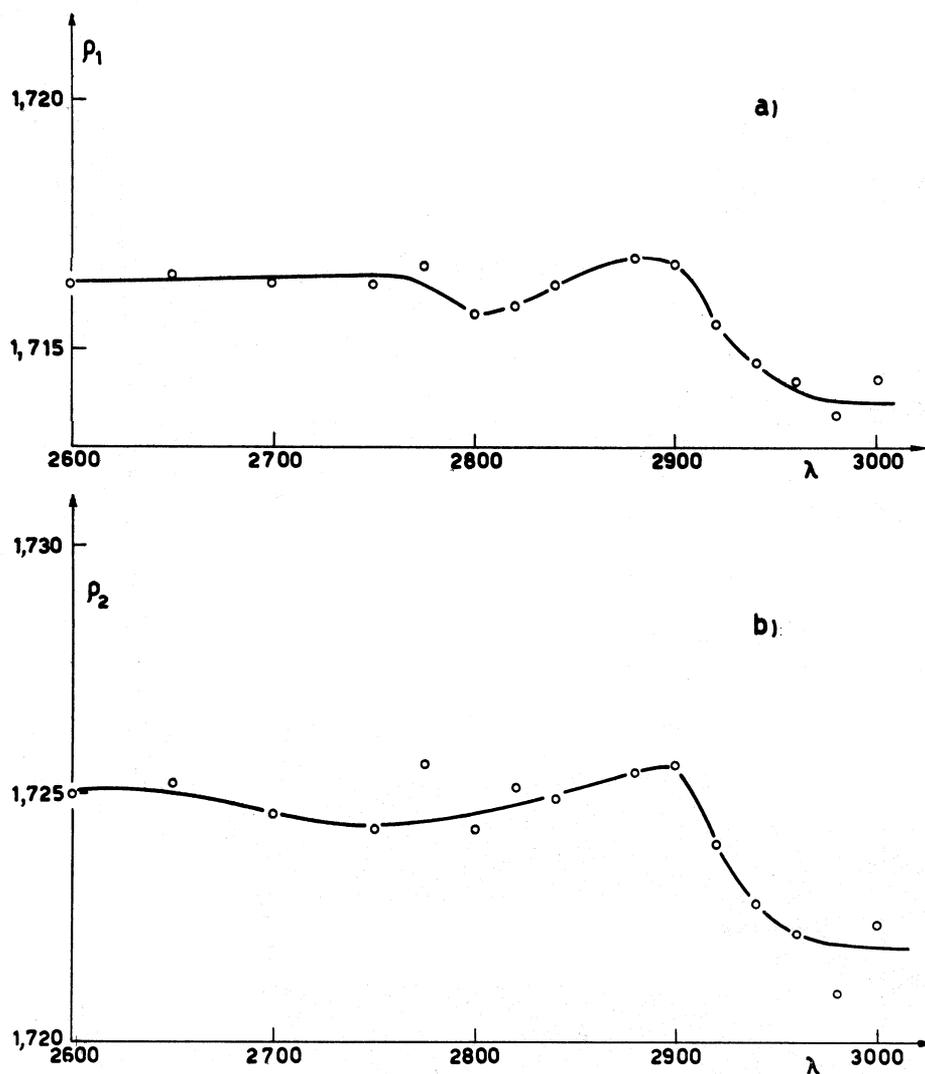


Fig. 3.

diminuito solo leggermente, mentre il valore del T_m e la larghezza della transizione passano rispettivamente dai valori $84,5^\circ\text{C}$ e $3,6^\circ\text{C}$ relativi al controllo, ai valori $80,0^\circ\text{C}$ e $7,2^\circ\text{C}$.

Curve analoghe sono state fatte per tutti i campioni irradiati: i risultati ottenuti sono riportati in fig. 5 dove sono graficati valori del T_m e la larghezza della transizione in funzione della lunghezza d'onda dell'irraggiamento. Si può dire che le due curve hanno identico andamento e che esso è anche qualitativamente uguale all'andamento delle curve di figura 2 e figura 3. Si hanno ancora due componenti: un picco, con il massimo a $\lambda = 2880 \text{ \AA}$ e soglia a $\lambda = 3000 \text{ \AA}$, ed una banda che si estende verso le lunghezze d'onda minori di 2800 \AA .

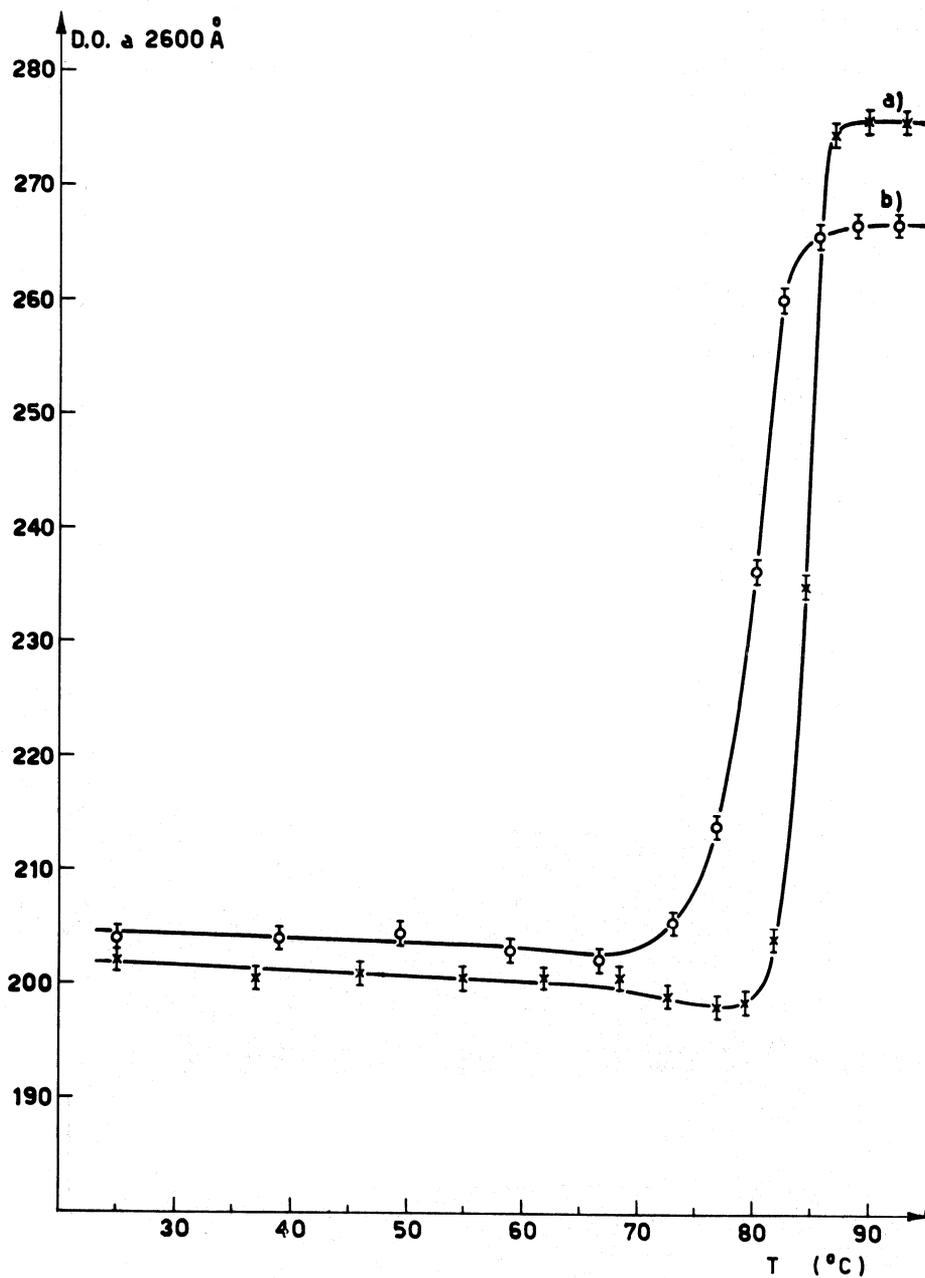


Fig. 4.

I risultati ottenuti possono riassumersi nelle seguenti osservazioni, valide per le dosi e la zona spettrale di radiazione esaminate:

- a) formazione di tagli lungo le singole eliche del DNA;
- b) lieve effetto di denaturazione;
- c) diminuzione del valore del T_m ed allargamento della transizione di denaturazione;

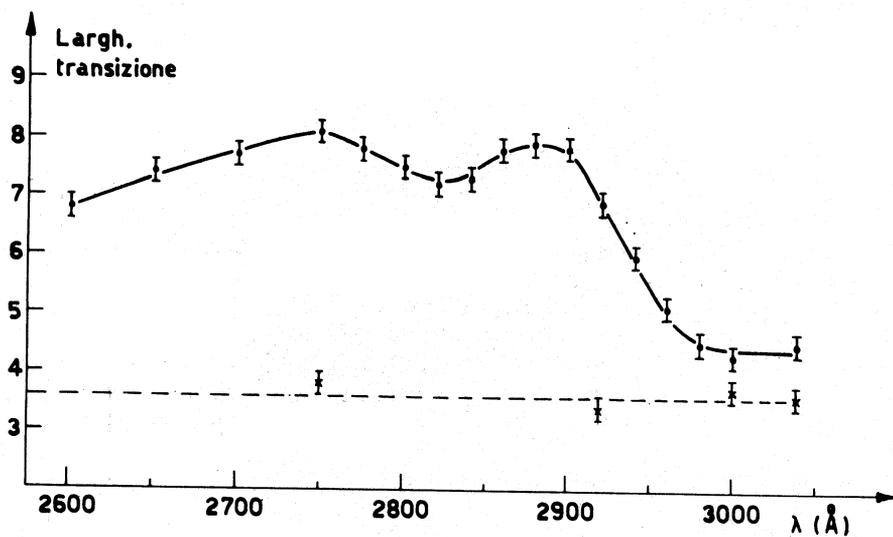
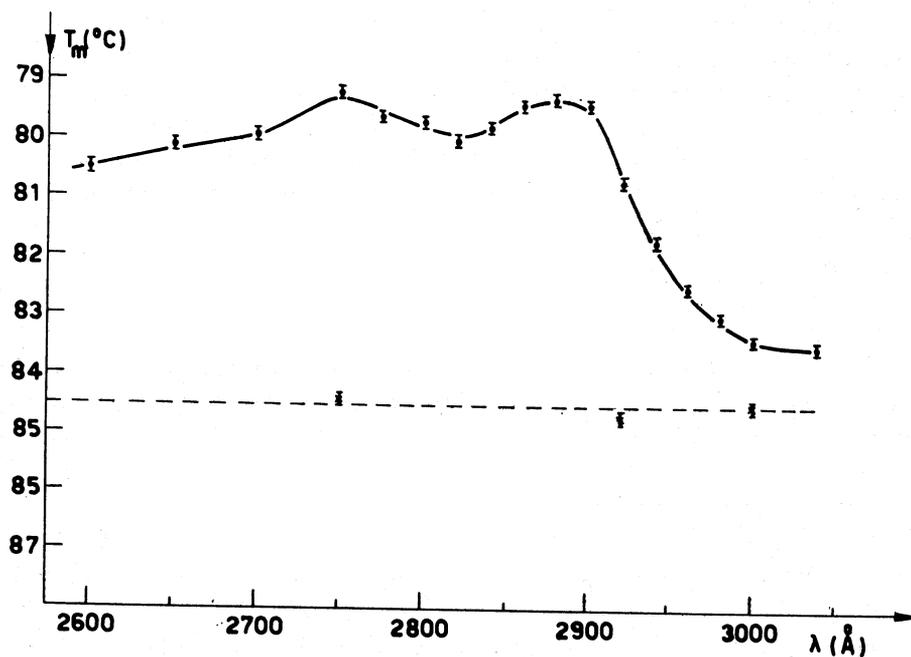


Fig. 5.

- d) aumento della frazione di DNA non denaturabile;
 e) aumento della densità media delle due eliche del DNA e della parte non denaturabile di esso.

I primi tre effetti possono essere correlati pensando che i tagli lungo le singole catene del DNA siano accompagnati dalla rottura dei legami idrogeno più vicini: questo spiega l'abbassamento dell'effetto ipercromico e del valore

del T_m , in quanto supponendo che i legami idrogeno fra le due eliche vengano stabilizzati dalla presenza di legami analoghi adiacenti, tali rotture casuali portano ad una distribuzione continua dell'energia necessaria alla denaturazione e quindi ad una curva del tipo di quella ottenuta nel grafico di figura 4.

Gli ultimi due effetti sono molto probabilmente legati alla formazione di dimeri di timina infra e inter elica. È infatti noto che la formazione di un tale prodotto nel DNA provoca uno spostamento della densità verso i valori maggiori, e che la lunghezza d'onda più efficace per tale tipo di danno è compresa fra 2800 e 3000 Å. D'altra parte il maggior aumento di densità dell'elica pesante del DNA del fago α sarebbe in tal caso legato alla diversa percentuale di timina contenuta nelle due eliche (per l'elica leggera 24,5 % di timina, per la pesante il 32,1 %). Infine la somiglianza fra gli andamenti delle curve ottenute in ultracentrifuga analitica (fig. 2 e fig. 3) e spettrofotometricamente (fig. 5), fa pensare che il processo di formazione dei dimeri e la rottura del supporto zuccheri-fosfati siano collegati fra di loro.

Interessante ci sembra infine l'osservazione che tutti i grafici ottenuti sembrano potersi interpretare come somma di due componenti, legate probabilmente a due diversi effetti della radiazione. Un primo picco è centrato sul valore $\lambda = 2860 - 2880$ Å ed ha un valore di soglia per $\lambda = 3000$ Å, mentre una seconda componente si estende per valori di $\lambda \leq 2800$ Å. Il massimo di efficienza, centrato a $\lambda = 2860 - 2880$ Å è probabilmente collegato agli effetti già discussi, mentre per ciò che riguarda l'origine della banda presente per $\lambda \leq 2800$ Å non abbiamo per ora alcuna indicazione.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. MARMUR e L. GROSSMAN, « PNAS », 47, 778 (1961).
- [2] W. BERENDS, *Deoxyribonucleic Acid* (Symposium Publications Division, Pergamon Press (1962)).
- [3] W. SAUERBIER, « J. Mol. Biol. », 10, 551 (1964).
- [4] R. BEUKERS e W. BERENDS, « Biochim. et Biophys. Acta », 41, 550 (1960).
- [5] R. B. SETLOW e W. L. CARRIER, « PNAS », 51, 226 (1964).
- [6] P. DOTY, B. B. MCGILL e S. A. RICE, « PNAS », 44, 432 (1958).
- [7] G. CORTELESSA e G. FARCHI, Rapporti dei Laboratori di Fisica dell'Ist. Sup. Sanità, ISS 65/10.
- [8] E. W. MONTROLL e R. SIMHA, « J. Chem. Phys. », 8, 721 (1940).