

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Alteraciones del DNA irradiado con luz ultravioleta

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Fernando Garcés Toledano

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas

T 577.31
GAR
alt



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310031324

ALTERACIONES DEL DNA IRRADIADO CON LUZ ULTRAVIOLETA

Memoria que para optar al grado de Doctor
en Ciencias Biológicas presenta

FERNANDO GARCES TOLEDANO



R. 27.017

Madrid, 1979

El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Biofísica de la División de Investigación Básica de la Junta de Energía Nuclear, y ha estado además soportado económicamente, en parte, por el Instituto de Estudios Nucleares de la J.E.N. y en parte también por III Plan de Desarrollo Económico y Social.

Deseo agradecer a todos los miembros del Grupo de Biofísica la ayuda que de una manera u otra han prestado en la realización de este trabajo. A la Dra. Aránzazu Vigón, Jefe de la División de Investigación Básica por su constante ánimo y apoyo, especialmente en la etapa de redacción de esta memoria.

Deseo agradecer especialmente al Profesor D. Angel Martín Municio su colaboración al haber aceptado revisar esta memoria y actuar como ponente en su presentación como Tesis Doctoral en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Muy especialmente mi agradecimiento va para el Dr. Carlos A. Dávila Sanchez, Jefe del Grupo de Biofísica, Director científico de este trabajo sin cuya colaboración no habría podido llevarse a cabo.

I N D I C E

	Pág.
CAPITULO I	
INTRODUCCION	7
I.1. Introducción general y propósito del presente trabajo	7
I.2. Especificidad de la interacción radiación U.V. materia biológica. El DNA como blanco crítico	10
I.3. Evolución prebiótica y radiación U.V.	15
I.3.1. Atmósfera primitiva y fuentes de energía para la evolución prebiótica	15
I.3.2. La luz U.V. como fuente de energía en la síntesis de biomoleculas en la atmósfera primitiva	16
I.4. Los procesos de reparación de la información genética. Su evolución	19
I.4.1. Reparación de los ácidos nucleicos primitivos. Selección de los más aptos. Mecanismos no enzimáticos	20
I.4.2. Fotorreactivación o el acoplamiento de una actividad enzimática a una fuente energética electromagnética	22
I.4.3. Unión de roturas simples. Selección de cadenas dobles.....	23
I.4.4. Reparación por escisión y resíntesis	24
I.4.5. La recombinación genética como un proceso de reparación ..	26
I.4.6. Evolución de los procesos de reparación: distribución filogenética. Tamaño del DNA reparable. Coordinación entre la reparación y la replicación	27
I.5. Los procesos de reparación como mecanismos de variación de la información genética. Coordinación entre la reparación recombinación y replicación. Teoría del "S.O.S. repair".....	30
I.6. El problema del aumento de la información genética y la radiosensibilidad. Importancia de los mecanismos de reparación	36
I.7. Efectos de las radiaciones U.V. en los ácidos nucleicos	38
I.7.1. Efectos directos en la ribosa desoxirribosa y purinas	41
I.7.2. Efectos directos en las pirimidinas	42
I.7.3. Efectos indirectos, fotosensibilización molecular	53

	Pág.
I.7.4. Dependencia de las reacciones fotoquímicas con la conformación de los ácidos nucleicos	55
I.7.5. Efectos producidos en la estructura secundaria por la presencia de los dímeros	57
APENDICE I	60
 CAPITULO II	
MATERIALES Y METODOS	62
II.1. Producción de materiales biológicos de partida	62
II.1.1. Cultivo continuo de E.coli	62
II.1.2. Cultivo discontinuo de: B. subtilis, B. cereus y M. Lisodeikticus	67
II.1.3. Producción a gran escala de fagos: T ₂ , λ y SPP-1	67
APENDICES DEL APARTADO II.1.	70
II.2. Aislamiento y caracterización de DNA de diferentes orígenes ...	73
II.2.1. Introducción	73
II.2.2. Aislamiento de DNA de bacterias	74
II.2.3. Aislamiento de DNA de timo de ternera	77
II.2.4. Aislamiento de DNA de bacteriofagos	77
II.2.5. Caracterizaciones a los DNAs	77
II.2.6. Aislamiento y caracterización de DNA marcado isotópicamente	83
II.2.7. Métodos de contaje radioactivo	85
APENDICES DEL APARTADO II.2.	87
II.3. Irradiaciones y dosimetrías	94
II.3.1. Descripción de los sistemas de irradiación empleados ..	94
II.3.2. Dosimetría química basada en la reducción de ferrioxalato potásico	96
II.3.3. Dosimetría química basada en la reducción de la leucobase de verde de malaquita	99
II.3.4. Dosimetría química basada en la reducción del oxalato de uranilo	102
II.3.5. Determinación del flujo fotónico. Estudio comparativo .	104
II.4. Degradaciones controladas de DNA	109
II.4.1. Degradaciones haplotómicas	109

	Pág.
II.4.2. Degradaciones diplotómicas	110
II.5. Determinaciones fisicoquímicas del DNA	110
II.5.1. Viscosimetría	110
II.5.2. Sedimentación de DNA nativo y desnaturado	113
II.5.3. Sedimentación en gradiente de sacarosa	114
II.5.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	115
II.5.5. Desnaturación térmica de DNA nativo	119
II.5.6. Determinación de dímeros de pirimidina en DNA irradiado	119
APENDICES DEL APARTADO II.5.	121
II.6. Transformación bacteriana	125
II.6.1. Introducción	125
APENDICES DEL APARTADO II.6.	128
II.7.1. Actividad óptica. Dicroísmo circular de soluciones de DNA ...	130
II.8. Metodologías enzimáticas	132
II.8.1. Aislamiento purificación y ensayo de la U.V.-Endonuclea sa	132
II.8.2. Otras enzimas utilizadas	132
CAPITULO III	
EXPOSICION E INTERPRETACION DE RESULTADOS	145
III.1. Determinación de la densidad de roturas simples en DNA de E. coli irradiado a diferentes longitudes de onda y exposiciones.	145
III.2. Estudio del proceso de formación de dímeros en DNA de E.coli irradiados con radiación U.V. a diferentes longitudes de onda, mediante determinación química de la formación de dímeros	148
III.2.1. Determinación de dímeros de pirimidina ($\hat{T}\hat{T}$ y $\hat{C}\hat{T}$) en DNA- ³ H de E. coli irradiado a diferentes longitudes de onda del espectro U.V. Determinación de las seccio nes eficaces del proceso de dimerización y monomeri- zación	148
III.2.2. Espectros de acción y rendimientos cuánticos de los procesos de dimerización y monomerización	158
III.3. Determinación de dímeros de timina-timina en DNA- ³ H de B. sub tilis, B. cereus y SPP-1. Determinación de la sección eficaz del proceso total	163

III.4. Determinación de la variación de la temperatura media de fusión (ΔT_m) del DNA de E. coli irradiado a diferentes dosis y longitudes de onda. Correlación entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros de ($\hat{T}\hat{T} + \hat{C}\hat{T}$)	167
III.5. Ampliación de la correlación entre la ΔT_m y el % ($\hat{T}\hat{T} + \hat{C}\hat{T}$) respecto de T a otros DNAs	176
III.6. Determinación de la viscosidad intrínseca y de la migración electroforética en gel de agarosa en muestras de DNA de E. coli de diferentes tamaños moleculares y con diferentes proporciones de dímeros de pirimidina	179
III.7. Estudios de dicroísmo circular en DNA irradiado con luz U.V. a diferentes longitudes de onda y dosis	186
III.8. Estudio de la formación de dímeros de pirimidina en DNA de B. subtilis, irradiado con radiación U.V. a diferentes longitudes de onda por determinación de la capacidad transformante	115
III.9. Reconocimiento y liberación de dímeros de pirimidina en DNA de SPP-1 por la acción de la U.V.-Endonucleasa y la DNA-Polimerasa	
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFIA	223

CAPITULO IINTRODUCCIONI.1.- Introducción general y propósito del presente trabajo

La enorme amplificación de los efectos causados por la absorción de cantidades discretas de energía, (aunque de cuantos muy energéticos) ha conducido equivocadamente en numerosas ocasiones a asignar la transcendencia biológica de las radiaciones al fenómeno de la radiosensibilidad. Se olvidaba con frecuencia que el resultado final de la interacción radiación-materia, está condicionada, además de por la energía transferida, y en este caso primordialmente, por la naturaleza del material receptor.

Los conocimientos que tenemos hoy día acerca de la compleja compartimentalización y jerarquización del mundo vivo, gracias al extraordinario desarrollo de la Biología y Genética molecular, han permitido plantear debidamente el tema. En efecto, lo paradójico no es que como consecuencia de la absorción de una cantidad discreta de energía la célula muera, sino que lo que resulta asombroso es que haya sido posible su supervivencia; incluso que haya sido posible la aparición y evolución de la vida sobre la Tierra.

La duda plantea en definitiva la verdadera transcendencia de las radiaciones en el fenómeno biológico, y sólo alcanza merecida respuesta cuando se analiza detenidamente, no sólo los efectos de las radiaciones sobre las células actuales, sino también la aparición y evolución de los ácidos nucleicos y de los mecanismos de reparación así como las diferentes alternativas que el fenómeno vital ha adoptado en su acoplamiento a las diferentes fuentes de energía disponibles a lo largo del proceso evolutivo.

En definitiva, se trata de considerar que la verdadera transcendencia de las radiaciones reside en que, la evolución biológica ha estado gobernada siempre por el acoplamiento entre la energía electromagnética procedente del Sol y la Biosfera. Hasta tal punto ha tenido éxito este acoplamiento, actualmente a la luz visible, que la vida hoy depende de él como fuente de energía en el proceso expansionista de la Biosfera.

Por supuesto que esta interpretación y este estudio es abordable ahora, porque conocemos lo suficiente acerca de cómo pudo desarrollarse la evolución abiogénica, conocemos perfectamente los mecanismos moleculares biológicos relativos al almacenamiento y transmisión de la información gené

tica, así como los mecanismos de reconocimiento y reparación de radiolesiones y su necesaria coordinación con la recombinación y replicación; y por último, acerca de las soluciones que la naturaleza ha encontrado ante la vulnerabilidad que representa el almacenamiento e incremento de la información genética.

En el laboratorio de Biofísica de la Junta de Energía Nuclear, se viene desarrollando un intenso trabajo en torno al problema general de la transcendencia biológica de las radiaciones y concretamente en lo que se refiere a las radiaciones gamma y U.V.. De hecho se ha logrado ya cierta experiencia en los estudios de los efectos de la radiación gamma, tanto "in vivo" como "in vitro" (Sáez and Dávila, 1974). Empezamos pues a conocer el DNA irradiado con gamma, hasta el punto de evaluar perfectamente, en qué medida de lesión que supone una rotura simple afecta a la estructura del DNA y para DNAs de diferentes composiciones (Mingot et al 1978). De otra parte los estudios de radiosensibilidad "in vivo" frente a gamma y U.V. y de reparación "semi-in vitro" frente a U. V. han conducido a constatar las dependencias genéticas de los mecanismos de reparación por encima de las composicionales. (Sáez and Dávila, 1974).

Este trabajo viene a continuar la línea de estudio del DNA alterado por radiaciones U.V. y los mecanismos enzimáticos de reparación. En definitiva pretende cubrir los estudios fisicoquímicos encaminados a conocer al DNA irradiado con luz U.V., el análisis de los fotoproductos de mayor relevancia biológica con especial énfasis en su cuantización, el estudio de las modificaciones sufridas en la estructura y conformación del DNA por la presencia de los fotoproductos así como el estudio y cuantización de su influencia en las propiedades funcionales del DNA; en concreto a su capacidad transformante; por último se incluyen también las primeras experiencias realizadas en el reconocimiento y liberación de fotoproductos, exactamente de dímeros de pirimidina, mediante el uso del sistema enzimático compuesto por la DNA-U.V.-Endonucleasa, y la DNA-Polimerasa-I, enzimas implicadas en el mecanismo de reparación por escisión-resíntesis. Ello nos ha obligado a poner a punto técnicas de aislamiento y caracterización de enzimas, pues la U.V.-Endonucleasa no es una enzima comercial.

Para la comprensión del trabajo realizado se incluyen en esta memoria, primeramente, una revisión de los principales hechos conocidos en la interacción radiación U.V.-materia biológica desde el punto de vista evolu

tivo y bajo la pregunta planteada anteriormente acerca de cómo ha sido posible la aparición y evolución de la vida sobre la Tierra, en un ambiente en el que las radiaciones estuvieron presentes. Antes se describirán someramente las particularidades físicas más importantes de la interacción radiación-materia para poner de manifiesto la enorme especificidad de esta interacción cuando se considera a las radiaciones U.V.. Tras la revisión de los diferentes mecanismos de reparación de radiolesiones, en especial de radiolesiones U.V., desde dos puntos de vista: el del proceso en sí de reparación de lesiones en el DNA que perturban su invarianza y el de mecanismos por los que se elude el efecto letal de una tasa de agresión para convertirlo en un mecanismo evolutivo; se tratará de poner de manifiesto la importancia de estos mecanismos entre las soluciones que la naturaleza ha encontrado para la protección del material genético a lo largo del proceso evolutivo.

Por último se revisará la fotoquímica de los ácidos nucleicos, haciendo hincapié en los diferentes fotoproductos y en su efecto en la estructura y conformación del DNA, pues gran parte de los resultados experimentales obtenidos aportan en este terreno contribuciones tanto cualitativas como cuantitativas.

En el capítulo dedicado a materiales y métodos, si bien se han apartado en forma de apéndices las recetas exactas de los métodos utilizados, se han razonado las particularidades esenciales de todos los métodos utilizados para llevar a la práctica el presente trabajo. Sin embargo, en este capítulo han obtenido especial tratamiento los métodos de determinación dosimétrica, la determinación de peso molecular de DNA por electroforesis en gel de agarosa, el ensayo de actividad de la U.V.-Endonucleasa y la dependencia de la capacidad transformante con el tamaño del DNA utilizado. En el primer caso, porque se ha realizado un estudio comparativo de las tres dosimetrías químicas más utilizadas en la zona U.V. y por ser este parámetro, la dosis, esencial en todos los estudios realizados, y que es necesario conocer lo mejor posible. En el segundo caso porque se ha puesto a punto el método para DNAs de alto peso molecular. En el tercero porque se ha realizado una importante crítica experimental al método de determinación de actividad U.V.-endonucleasica de Grossman (Kaplan et al. 1969) que es el más utilizado en la bibliografía mundial. Y en el último caso porque ha sido necesario conocer esa dependencia para trabajar después en la zona de independencia de la capacidad transformante con el ta-

maño molecular.

Finalmente, tras el capítulo de presentación e interpretación de resultados, se alcanzan las conclusiones definitivas a la vista del presente trabajo. Cierra la memoria, una lista alfabética de las referencias bibliográficas aludidas en el trabajo. Me interesa destacar que las exhaustivas determinaciones realizadas en cada experiencia, no responden a ninguna facilidad en obtenerlas, antes al contrario, sino que responden a una intencionalidad precisa en el planteamiento que nos hicimos de este trabajo, dado que la investigación actual, más preocupada en su política por obtener datos cualitativos nuevos, impide a veces obtener la presión de trabajos exhaustivos y sistemáticos, que cuando se realizan, generalmente ayudan a comprender y elucidar, en la seguridad de sus resultados, las dudas y huecos de conocimiento producidos por el trabajo científico anterior.

I.2.- Especificidad de la interacción radiación U.V.-materia biológica. El DNA como blanco crítico

Dentro del amplísimo tema de estudio de la interacción Radiación-Materia, vamos a intentar esquematizar aquí las características esenciales del fenómeno, en orden a centrar el problema particular que nos ocupa: el de la interacción radiación U.V.-materia biológica.

Adelantaremos ya que si bien no existe una separación intrínseca en lo que a interacción con la materia se refiere entre las radiaciones ionizantes y ultravioletas, las particularidades del mundo vivo y las energéticas de las radiaciones U.V. hacen que este tipo de interacción tenga unas consecuencias específicas dentro de la célula. El que el resultado final de esta interacción o de cualquier interacción radiación materia pueda conducir a efectos desastrosos para la continuidad de la vida, es sólo consecuencia de la naturaleza jerárquica de la célula y no de la interacción radiación-materia en sí.

Dejemos para más adelante la discusión de la importancia de la organización celular en los fenómenos de interacción radiación-materia biológica pues constituyen un aspecto importante de la justificación de nuestra especial preocupación por esta interacción a nivel de una de las especies moleculares biológicas, el DNA, y vamos ahora a tratar de poner de manifiesto las particularidades esenciales de la interacción radiación -

U.V.-materia biológica.

Esta interacción posee el carácter de una transferencia de energía entre el sistema portador, la radiación, y el sistema receptor, el material biológico. Los condicionamientos impuestos por el medio en la interacción son muy complejos ya que la energía se distribuye en él según leyes perfectamente definidas y derivadas de su estructura molecular. Por su parte los condicionamientos derivados del sistema portador son evidentemente energéticos. Por último en cuanto a los efectos primarios producidos y con independencia de los mecanismos por los que se produzca la interacción, se pueden distinguir tres zonas:

Una primera en la que la interacción supone transferencias de energía comprendidas entre el valor del ruido térmico (0,25 eV), y - - 1-2 eV, sus efectos se limitan únicamente a incrementar la energía rotacional y vibracional de las moléculas del sistema, aumentando el grado de activación y por tanto su actividad química. La interacción en esta zona es completamente inespecífica y protagonizada por tanto por las especies moleculares mayoritarias.

Una segunda zona en la que se ponen en juego energías comprendidas entre 1 eV y 12-13 eV (en la que están incluidas las radiaciones U.V.); esta zona presenta características absolutamente propias, debido a que la energía transferida al sistema se distribuye como energía de excitación electrónica de sus enlaces, y determina que a cada longitud de onda, sólo las moléculas que posean las estructuras adecuadas se conviertan en protagonistas del fenómeno, con independencia de su número en el sistema; por ello esta zona está caracterizada por su absoluta especificidad a nivel molecular.

Por fin una tercera zona cuando la energía puesta en juego es superior a 12 eV.. En este caso se producen fenómenos de ionización y disociación moleculares, pero de modo que la estructura no condiciona de manera estricta la probabilidad de que tenga lugar conduciendo de nuevo a la mayor implicación de las especies en mayoría ponderal.

En la zona de 1-12 eV, y en concreto para las radiaciones del U.V. lejano (220 nm a 300 nm) es decir entre 5,63 eV y 4,13 eV la absorción de energía sucede por un único mecanismo que implica la absorción del fotón y que conduce en materiales biológicos, a estados de excitación molecular.

Cada molécula, de acuerdo con los orbitales moleculares de que disponga, presenta una probabilidad diferente a cada valor de la energía para pasar a un estado excitado por absorción de un cuanto de energía de dicha frecuencia. El espectro de excitación, es decir, la función de probabilidad de excitación en función de la energía del cuanto absorbido no es fácil de calcular y totalmente inabordable cuando consideramos moléculas como los biopolímeros, pero de los espectros experimentales de las diferentes moléculas biológicas se puede concluir que normalmente, se trata de transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ que en un doble enlace aislado tienen lugar a 170 nm pero que se desplaza a 220 nm en el caso de conjugación y a 260 nm cuando la deslocalización electrónica alcanza a tres dobles enlaces. (Díaz Peña et al. 1972),

Las moléculas así excitadas son susceptibles de sufrir transformaciones no permitidas desde el estado fundamental y que en general se denominan reacciones fotoquímicas. En ellas se emplea la energía de excitación electrónica resultando un compuesto transformado en estado fundamental.

Es importante indicar que no tiene por que darse necesariamente reacción fotoquímica sino que por el contrario los mecanismos de desexcitación pueden ser otros como: la desexcitación por conversión interna, de desexcitación luminescente etc., dependiendo siempre de las características intrínsecas de la molécula excitada, como por ejemplo: la vida media del estado excitado, o el tipo de estado excitado. A la especificidad en la absorción hay que sumar la especificidad de los modos de desexcitación para poner así de manifiesto que no todas las moléculas susceptibles de excitaciones conducirán a transformaciones.

Pero incluso el que se produzcan o no reacciones fotoquímicas depende también del estado de agregación y estructura de la materia, y en concreto la biológica se encuentra en fase condensada. En esta fase, la probabilidad de choque intermolecular es muy elevada por lo que la desexcitación por conversión interna está muy favorecida, aunque también se produce una mayor probabilidad de reacciones bimoleculares. De entre ellas hemos de destacar la alta formación de hidratos, debido a la abundancia de agua, las reacciones redox fotoquímicas por la presencia de oxígeno y por último, las reacciones fotoquímicas de adición entre moléculas próximas y ligadas por una estructura macromolecular que fija su orientación y distancia.

En este último caso, es decir, medios condensados en los que además existe un alto grado de estructuración se puede dar también y a veces de manera importante, una transferencia de energía de excitación, de tal forma - que moléculas incapaces de absorber el fotón incidente son capaces de esta forma de sufrir transformaciones fotoquímicas.

Entre las moléculas biológicas existen determinados biopolímeros - que como resultado de sus características electrónicas presentan en sus espectros de excitación electrónica grandes probabilidades de absorción en - zonas U.V. energéticamente bajas. En concreto todos los anillos heterocíclicos de las bases púricas y pirimidínicas, los aminoácidos aromáticos etc. Y si además observamos los espectros de absorción de las diferentes biomoléculas, vemos como son los ácidos nucleicos los que presentan mayores coeficientes de absorción en esta zona U.V.; del orden de 10 veces más altos que los que presentan las proteínas; biomoléculas que les siguen en coeficiente de absorción. En definitiva pues, en la interacción radiación U.V.-materia biológica la especificidad de la interacción se dará primordialmente sobre los ácidos nucleicos y en segundo término sobre las proteínas.

Hasta aquí, ha quedado claro como va a ser la interacción entre - las radiaciones U.V. y la materia biológica, mediante qué mecanismos se va a liberar después la energía absorbida, y qué tipo de moléculas de entre - las biológicas van a estar implicadas en la interacción. Sin embargo, no - se puede deducir de lo expuesto la transcendencia y el grado de amplificación que la interacción tiene sobre los seres vivos. Es pues necesario, como anunciábamos al principio, que analicemos brevemente la composición, organización y naturaleza jerárquica de la célula para llegar a comprender - la transcendencia de esta interacción:

La teoría celular nos ha proporcionado la posibilidad de abstraer el fenómeno biológico a un sistema unitario al que adscribir toda la fenomenología de carácter universal. Por supuesto que este sistema unitario, - la célula, es un sistema material y por tanto sujeto a todas las leyes generales de la naturaleza, aunque con una característica diferencial del - resto de los sistemas materiales, que es su grado de organización. Consideraciones no sólo de tipo morfológico, sino también cinéticas, bioquímicas y termodinámicas así lo confirman. El grado de heterogeneidad interna de - los sistemas biológicos, es también una característica diferencial, si bien ambas cualidades, heterogeneidad y organización, son a menudo difíciles de separar.

Del estudio analítico y cuantitativo de la composición de los se res vivos, tomando como ejemplo de sistema celular unitario, a la célula mejor conocida, la bacteria E.coli, se llega a la conclusión de que exis ten entre 4000 y 5000 especies moleculares diferentes, presentes en toda una gradación de concentración; desde una única molécula de la especie - DNA hasta del orden de 15×10^6 de moléculas de lípidos. El peso molecu- lar de estas especies moleculares va desde 23 daltons para el ión Na^+ - hasta $2,5 \times 10^9$ daltons para la molécula de DNA. (Watson 1965; Dávila - 1970). Por otra parte los conocimientos adquiridos con el desarrollo de la Biología y Genética moleculares, acerca de los mecanismos fundamenta- les generalizados en todo ciclo vital, han hecho comprensible la aparente caprichosa heterogeneidad molecular de la célula. En efecto, existe - una perfecta jerarquización molecular, y en esta, el DNA constituye la - materialización del contenido informativo cuya expresión fenoménica es - la célula y su funcionalismo, incluyendo su autorreproducción (DUPLICA- CION). Así la información genética contenida en la secuencia nucleotídi- ca del DNA se transfiere en pequeños paquetes de información, los mRNAs (TRANSCRIPCION) para ser traducida del lenguaje de los nucleotidos al de los aminoácidos (TRADUCCION) formando así las proteínas, responsables en último término de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célu la (FUNCIONALISMO).

Es indudable que estos dos tipos de hechos, sumados a las consi- deraciones hechas anteriormente, respecto a la inespecificidad de la in- teracción de las radiaciones de alta energía a nivel molecular, y sobre todo dada la absoluta especificidad de la acción de las radiaciones U.V. respecto de determinadas estructuras moleculares, de entre las que los - ácidos nucléicos poseen los máximos coeficientes de absorción en el mun- do vivo, apuntan al DNA como blanco crítico del efecto de las radiaciones. Queda pues perfectamente justificada nuestra especial preocupación en - la interacción radiación U.V.-materia biológica por el estudio de esta - interacción al nivel del DNA (molécula única, dentro de su especie, por- tadora del contenido informativo para la vida y reproducción de la célu la), ya que su alteración puede provocar procesos irreversibles, en oca- siones letales, y es por tanto responsable del grado de amplificación ob- servada en la interacción radiación-materia biológica en general.

I.3.- Evolución prebiótica y radiación U.V.

I.3.1.- Atmósfera primitiva y fuentes de energía para la evolución prebiótica

Urey (1956) ha determinado la composición al equilibrio de mezclas de hidrógeno, carbono, anhídrido carbónico, metano, nitrógeno, amoníaco y oxígeno a partir de las propiedades termodinámicas de estos compuestos. Suponiendo constante la velocidad a la que el hidrógeno escapaba de la tierra - Miller y Urey (1959) calculan la presión del hidrógeno en la tierra hace 4.500 millones de años. A partir de esta calculan la del metano y concluyen que ya que el amoníaco se convierte rápidamente en nitrógeno por la acción de cualquier fuente energética, la atmósfera primitiva de la tierra era reductora y estaba compuesta por pequeñas cantidades de hidrógeno, amoníaco y agua además de una moderada presión de metano.

El oxígeno en la atmósfera actual de la tierra parece proceder principalmente de dos tipos de fuentes: la de fotooxidación del agua en las capas altas de la atmósfera por la luz U.V. de longitud de onda corta y a partir de la fotosíntesis de las plantas.

La fotosíntesis, sin embargo, debió comenzar cuando ya la capa de ozono, desarrollada en las capas altas de la atmósfera, fue lo suficiente para proteger relativamente a la tierra de la luz U.V. emitida por el sol. Pero se evitaba la posterior síntesis fotoquímica de compuestos orgánicos en el entorno primitivo. Los seres heterótrofos que prosperaban en los materiales orgánicos producidos fotoquímicamente fueron reemplazados por los auxótrofos capaces de fotosintetizar por sí mismos las moléculas orgánicas para su desarrollo. Solamente aquellos organismos capaces de incorporar moléculas como las porfirinas y hacer uso de la energía de la luz de onda más alta, lograron "sobrevivir" y evolucionar posteriormente. (Ponnampertuma C. 1971).

En las reacciones bioquímicas que tienen lugar en los organismos vivos contemporáneos, el carbono ha de ser primero reducido antes de incorporarse a los aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc. Esto es además un hecho universal en la biosfera (Fruton and Simmonds, 1961). La mayor parte de los organismos tienen también mecanismos para reducir el nitrógeno antes de ser incorporados a las moléculas vivas. Están también dotados de mecanismos para eliminar el nitrógeno en forma de amoníaco o urea. (Hutchinson, 1954). Todo -

esto tal vez sea el resultado de la evolución de rutas bioquímicas en la primitiva atmósfera reductora.

Hasta que las células no alcanzaron un estado altamente organizado y protegido, la presencia del oxígeno libre en la atmósfera no podría haber sido tolerado ya que por su acción los primeros precursores de la vida habrían sido oxidados y por tanto se habría impedido su evolución o incluso su existencia. (Berkner and Marshall, 1965). Los deletereos efectos del oxígeno en los nucleos de las células contemporáneas son también indicativos de que fuesen las condiciones anóxicas las que prevalecieron durante los primeros estados de la evolución de las células (Stern, 1955). La existencia actualmente de anaerobios obligados y la universalidad del ciclo de glicolisis anaerobio sugieren también un ambiente reductor en el despertar de la vida.

La energía incidente en la primitiva atmósfera reductora de la Tierra capaz de iniciar reacciones químicas pudo ser; luz procedente del sol, descargas eléctricas, la radiación ionizante del decaimiento radiactivo y el calor procedente de los volcanes (Miller and Urey, 1959). La luz U.V. es con mucho la fuente energética más intensa para la síntesis de moléculas más complejas a partir de moléculas simples y la síntesis posterior de moléculas más complejas aún a partir de estas. La alta intensidad de las radiaciones U.V. en la radiación solar que afectó a la Tierra, condujo a la producción de reacciones fotoquímicas incluso a partir de productos cuyos coeficientes de absorción eran muy pequeños.

I.3.2.- La luz U.V. como fuente de energía en la síntesis de biomoléculas en la atmósfera primitiva.

Como ya hemos indicado los constituyentes más probables en la Atmósfera primitiva eran: hidrógeno, metano, etano, amoníaco, agua y posiblemente también monóxido de carbono y nitrógeno. Se han realizado numerosas experiencias en intentos de reproducir las condiciones físicas en las que se encontraban aquellas moléculas con el objeto de estudiar la síntesis de moléculas orgánicas y su evolución en el seno de tales condiciones. Así ha sido posible a partir de esas moléculas y por irradiaciones U.V. de corta longitud de onda producir primeramente cianuros, aldehidos e hidrocarburos. Después por posteriores irradiaciones de estos compuestos con luz U.V. o radiación gamma se pudieron obtener purinas y deoxirribosa (Ponnamperuma, 1965). También ha podido sintetizarse estos compuestos además de uracilo y citosina y una -

variedad de azúcares a partir de moléculas precursoras sencillas por calefacción a moderadas temperaturas. (Oro, 1965; Sanchez et al. 1966; Ferris et al. - 1968). La timina ha sido sintetizada más recientemente (Stephen - Sherwood et al. 1971), en posibles condiciones prebióticas, como resultado de la metilación del uracilo. En condiciones prebióticas la adenina se sintetiza más fácilmente y en mayores cantidades que cualquiera de las otras bases. Si - tenemos en cuenta que de todas las bases de los ácidos nucleicos, la adenina es la de mayor energía resonante y que además es la más radiorresistente, además de las anteriores consideraciones de la síntesis prebiótica no nos extraña la universal distribución y los importantes papeles que los derivados de adenina tienen en el mundo vivo. (ATP, cAMP)(Ponnamperuma et al 1963)

La formación de nucleosidos y nucleotidos en posibles condiciones prebióticas ha sido también estudiada con éxito en los últimos años. Así por irradiación U.V. de bases sobre todo de adenina y ribosa ácida se produce adenosina y esta en presencia de etil metafosfato rinde AMP, ADP y ATP (Sagan, 1965; Ponnamperuma, 1965). La formación de nucleótidos a partir de nucleosidos también se ha conseguido mediante temperaturas moderadas en presencia de microcristales de silicato o apatita actuando como una catálisis primitiva, (Neuman et al. 1970). Más recientemente se han obtenido en posibles condiciones prebióticas nucleotidos de citosina y oligonucleotidos (Ta piere and Magyvary, 1971), nucleotidos de timina (Bishop et al. 1972) así como glucosa, 1-6, difosfato. Sin embargo, la fosforilación de los nucleosidos con vistas a la posterior polimerización permanece aún sin dilucidar aunque sobre ella inciden numerosos estudios. (Rabinowitz et al. 1971; Shwartz and Ponnamperuma, 1971).

A partir de mononucleotidos, la polimerización a oligonucleotidos y polinucleotidos puede llevarse a cabo por varios posibles agentes prebióticos tales como la irradiación U.V. (Ibañez et al. 1971), por interacción - de apilamiento entre bases (Buggs et al. 1961) o bien a partir de moldes genuinos como el ácido policitidílico o poliuridílico (Schneider - Bernloehr et al. 1968) (Sulston et al. 1969). La asociación posterior de cadenas polinucleotidicas complementarias puede haber conducido a la formación de largas cadenas dobles (Calvin, 1969). Cualquiera de estas cadenas podría de nuevo servir de molde para la organización de dos nuevas cadenas dobles.

Por lo que respecta a los precursores de las proteínas baste decir

que por medio de la luz U.V. de 254, como fuente de energía, y sulfuro de hidrógeno o formaldehído como donadores de electrones, Steinman et al (1968) y Sagan and Kare (1971) han obtenido con gran eficiencia la fotoproducción de aminoácidos. Además y en los ya clásicos experimentos de descargas eléctricas (Miller, 1955) se han sintetizado aminoácidos, destaquemos sin embargo que, bajo estas condiciones no se ha sintetizado ningún compuesto que absorba luz U.V. similares a las bases heterocíclicas. También parece que el calor ha podido jugar un papel muy importante en la condensación del glicerol con tetramero de cianuro de hidrógeno para formar un dipéptido (Chang et al. 1971) o péptidos más complejos (Fox, 1964). La síntesis de polipéptidos que contienen aspártico, serina, glutámico, glicocola y alanina de un peso molecular de 2000 ha sido realizada por Ponnampereuma et al. (1969), en experimentos de descargas eléctricas. En estos experimentos los aminoácidos aparecen generalmente y en su mayoría en forma condensada, solamente tras la hidrólisis del péptido se encuentran aminoácidos libres, algunos de los cuales han sido identificados como los que existen en las proteínas naturales de los seres vivos actuales junto a otros que no han sido identificados aún. P. Banda and Ponnampereuma en 1971 utilizando una mezcla de 16 aminoácidos y sus formas adeniladas y tras polimerización en presencia de alcali obtuvieron polimeros que pueden ser separados electroforéticamente en un número de bandas cuya composición media no responde a la composición media de la mezcla inicial lo que es indicativo de la distinta reactividad de los aminoácidos o de su diferente facilidad para la formación de formas adeniladas.

A partir de alanil - adenilato, Katchalsky y su grupo han sintetizado polialanina en montmorillonita. El papel de estos cristales como molde para la polimerización de nucleótidos está fuertemente apoyado por el hecho de que en estas experiencias con caolín se obtiene siempre nonameros o cadenas más largas aún (Paecht - Horowitz et al. 1970). Por último simples moléculas orgánicas como las poliaminas o los derivados de las glicinas pueden haber contribuido de manera importante a la estabilización de los nucleótidos en el molde y la formación catalítica de las uniones inter nucleotídicas, como se ha observado en la síntesis de poli-A a partir de adenosina cíclica 2'-3'- fosfato unida organizadamente como una tercera hélice en dos cadenas de poli-U (Renz et al. 1971).

I.4.- Los procesos de reparación de la información genética. Su evolución

Hasta ahora la paradoja enunciada anteriormente al hablar de la interacción del fenómeno vital con las radiaciones U.V., ha quedado disipada sólo en parte. En efecto, hemos visto como ha sido precisamente la existencia de este tipo de radiaciones las que hicieron posible la aparición de las biomoléculas, que constituyen ahora el punto de partida de la evolución biológica. - Pero, y aquí aparece de nuevo la paradoja, esas moléculas son ácidos nucleicos y proteínas, moléculas que sufren preferentemente los efectos de las radiaciones U.V.. Estas consideraciones siguen teniendo validez incluso después de la aparición de las primeras células organizadas y a lo largo de todo el proceso evolutivo.

Sin embargo, podemos afirmar hoy, que la capacidad de recuperarse en mayor o menor proporción de las alteraciones inducidas en su DNA por un ambiente agresivo, del que las radiaciones U.V. han sido el agente más importante - evolutivamente, es una característica intrínseca de todo sistema biológico. - Sea cual sea el agente de la agresión y dependiendo sólo del tipo de alteración sufrida, se ponen en acción mecanismos enzimáticos cuya actuación trata fundamentalmente de preservar la integridad de su información genética materializada en las secuencias del DNA.

Especialmente durante esta última década, se ha logrado un cuerpo de evidencia respecto al carácter potencialmente reversible de las etapas iniciales de todos los procesos de alteración del DNA. Hoy está completamente superada la visión que la Radiobiología clásica tenía de las células como meros blancos pasivos del impacto de las radiaciones. Ahora tenemos que contemplarlas como sistemas capaces, dentro de ciertos límites, de superar con éxito el reto que comporta la alteración derivada de la agresión del medio ambiente.

De hecho y por debajo de tasas de agresión letales, la reparación de las alteraciones conduce con cierta probabilidad a alteraciones en la replicación y por tanto en la transcripción de la información genética, que no tiene que traducirse necesariamente en la imposibilidad parcial o total de una función, sino que puede aumentar su funcionalismo de alguna manera. Es decir, que puede dar lugar a la aparición de una nueva característica en la célula que - salvo nuevas agresiones que la reviertan, da lugar a una cepa con características propias.

De aquí que el conocimiento de los procesos biológicos por los cuales la célula es capaz de reparar, al menos para ciertas dosis, las lesiones causadas en su DNA cubra una doble vertiente; la del proceso en sí de reparación de lesiones que perturben su invarianza, y la del mecanismo por el cual se -

elude el efecto letal de una tasa de agresión para convertirlo en un mecanismo de variación cualitativa del contenido informativo, en definitiva en un mecanismo de evolución. El desplazamiento en una u otra vertiente, en función de las condiciones ambientales a lo largo de la historia de la vida sobre la Tierra, ha conducido el proceso evolutivo hasta nuestros días.

I.4.1.- Reparación de los ácidos nucleicos primitivos. Selección de los más aptos. Mecanismos no enzimáticos

Como veremos al revisar las lesiones causadas por las radiaciones U.V. en los ácidos nucleicos, los oligonucleotidos y polinucleotidos de cadena simple son muy susceptibles a la luz U.V.. La remoción de las lesiones, es decir, la eliminación de los dímeros o de los hidratos por cualquier mecanismo que - hubiese implicado la rotura de la cadena, habría conducido también a la interrupción de la continuidad del molde y por tanto, a la pérdida de la información. Sin embargo, los dímeros pueden ser eliminados sin la interrupción de la cadena por medio de un mecanismo en todo semejante al que los produjo, la monomerización fotoinducida por luz U.V. aunque más energética (240nm) que la que los creó. Por supuesto que este tipo de radiación estuvo presente en las condiciones primitivas y que sólo cuando la capa de ozono fue suficientemente protectora dejaron de llegar apreciablemente. A pesar de ello este sistema de eliminación de dímeros de pirimidina es eficaz hasta un nivel en el cual la eliminación de los dímeros se iguala con la formación de éstos, pues la radiación U.V. a 240nm también es capaz de fotoinducir la formación de dímeros aunque sea con menor eficacia que la de longitudes de onda superiores. (Setlow and Setlow, 1962).

Los hidratos, sin embargo, son eliminados con muy baja eficacia por este sistema fotoinducido. El hidrato de Uracilo es un compuesto muy estable que no se revierte con facilidad. Por tanto esta circunstancia habrá presionado en el sentido de seleccionar a la timina en lugar del Uracilo como componente del soporte informativo. (Lesk, 1969).

Por mecanismos fotoinducidos, pero a través de un intermediario que - actúa como donador de electrones, es posible también la eliminación de los dímeros sin privar a la molécula de su continuidad. Así, los derivados del indol como el triptofano y la serotonina (5-hidroxitriptamina) son capaces de intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos y monomerizar los dímeros cuando se les irradia con luz de 300nm (Helene and Charlier, 1971). También se ha observado la monomerización parcial de algunos dímeros de pirimidina, esencialmente C⁴C cuando se irradia DNA en presencia de proflavina entre 245 y 280nm (Setlow and Setlow, 1965.).

Estas moléculas como la proflavina han podido jugar también en favor de la supervivencia de los ácidos nucleicos ante el ataque inespecífico de las radiaciones ionizantes o U.V. de alta energía que aunque primariamente fuesen absorbidas por las bases púricas o pirimidínicas, su energía puede haber migrado a través de la cadena nucleotídica hasta ser atrapada por estos agentes intercalantes (Sutherland and Shutherland, 1969; Gregori et al, 1970).

En conclusión, la evolución de los ácidos nucleicos y su supervivencia en la etapa abiogénica ha estado condicionada por la presión selectiva de la radiación U.V.. La selección de los ácidos nucleicos más aptos se ha basado esencialmente en sus propiedades químicas: absorción de luz U.V. de 240 nm y capacidad para asociarse con otras moléculas (radioprotectores) o con otros ácidos nucleicos o moldes. Por tanto todas estas propiedades se puede decir que constituyeron lo que podríamos llamar el fenotipo estructural de los primitivos ácidos nucleicos. (Mills et. al. - 1973).

Tras la etapa de evolución abiogénica, los siguientes datos de que disponemos están todos tomados de las células que existen actualmente. - Nada podemos decir acerca de los mecanismos de reparación de las primeras formas replicativas individuales, que aparecieron en la evolución, que no sea por extrapolación de lo que conocemos actualmente. Sin embargo, se ha podido comprobar la existencia de un mecanismo de reparación de lesiones U.V. no enzimático y fotoinducido por luz de longitudes de onda que no son directamente absorbidas por el DNA (Jagger and Stafford, 1965; Jagger et al. 1970). Así tanto en Estafilococos como en Streptomicas ha podido evidenciarse este tipo de reparación fotoinducida por luz entre 310 y - - 360 nm independiente de la temperatura que conduce, por liberación de dímeros a altos valores de supervivencia tras irradiación U.V. de estas bacterias. Similares resultados se han obtenido en la interpretación del espectro de acción de Neurospora (Ikenaya, et al. 1970). Se ha pretendido adjudicar a estos mecanismos gran importancia en el problema de la interrelación de ácidos nucleicos con otras moléculas, durante la génesis del material genético, así como en la reparación de los ácidos nucleicos, en las primeras etapas evolutivas. La elucidación de estos sistemas de reparación fotoinducida quizás ayuden a entender estos problemas.

I.4.2.- Fotorreactivación o el acoplamiento de una actividad enzimática a una fuente energética electromagnética.

Los polinucleotidos de cadena simple que se dieron en las condiciones fuertemente reductoras de la atmósfera primitiva fueron probablemente polidesoxirribonucleotidos. Estos polinucleotidos pudieron constituir las primeras unidades autorreplicativas. Para su protección independiente de las radiaciones U.V. se desarrolló un mecanismo de reparación altamente eficaz, la fotorreactivación enzimática.

La fotorreactivación enzimática es un sistema de reparación específico de dímeros de pirimidina que no requiere una fuente de energía química compleja y que es capaz de eliminar eficientemente tanto "in vivo" como "in vitro" los dímeros formados en DNAs de cadena simple o cadena doble. También se ha demostrado su actividad en polímeros sintéticos.

La enzima fotorreactivamente es capaz de unirse al DNA independientemente de la presencia de la luz. Este complejo es extremadamente estable e independiente de la temperatura (Harm, 1968). La enzima se activa por la presencia de luz de longitud de onda superior a 300 nm monomerizándose los dímeros, tras lo que se libera la enzima del complejo formado con el DNA. (Wulffand Rupert, 1962). El grupo cromóforo de la enzima no ha sido identificado aún a pesar de haberse conseguido preparaciones altamente purificadas de la enzima (Minato and Werbin, 1971). La dificultad principal estriba en conseguir grandes cantidades de esta enzima altamente purificada, pues por ejemplo el número de moléculas por célula estimado en E.coli es tan sólo de 20 (Harm, 1969). Los mutantes que han sido obtenidos a partir de esta cepa tan sólo poseen 5 veces más enzima (Harm, 1969). Sin embargo, se ha conseguido aumentar hasta 2.000 veces la cantidad de enzima en E.coli utilizando un especial fago lambda transductor (Sutherland, 1973 a y b).

Es importante reseñar que en los últimos años, en el estudio del mecanismo de acción de la enzima fotorreactivante se ha logrado definir exactamente el substrato específico mínimo, (Setlow and Bollum 1968, Williams et al. 1971). Así es necesario un oligodesoxitimidilato con 9 residuos de timina entre los que existe 1 dímero de $\hat{T}T$ para la unión efectiva de la enzima.

La distribución filogenética de la actividad fotorreactivante apoya la idea de su aparición en los primeros momentos de la evolución como un sis

tema de reparación de DNA. Esta actividad ha sido encontrada en la mayor parte de los grupos de organismos estudiados desde algas verde-azuladas, levaduras, protozoos, tejidos de metazoos, plantas e incluso últimamente en mamíferos.

El RNA viral (fuera del virus) tras irradiaciones con luz U.V. - puede ser fotorreactivado eficientemente (Werbin et al. 1968) (Hidalgo - Salvatierra and McLaren, 1969). La presencia de mecanismos fotorreparativos enzimáticos en plantas está también descrito (Murphy and Gordon, - - 1971- a y b) aunque la naturaleza de las lesiones y el mecanismo de reparación no se conoce con la misma claridad que en el caso de la fotorreparación del DNA, en bacterias.

I.4.3.- Unión de roturas simples. Selección de cadenas dobles.

Una estructura de doble cadena permanente de DNA no es necesaria - para la replicación o para la transcripción, pero la complementariedad de - las dos cadenas ofrece la posibilidad de la reparación de las roturas simples sin pérdida de la información y la posibilidad de utilizar la información de la cadena opuesta para la reparación de roturas simples seguidas de degradación parcial de un trozo de una de las cadenas. Es decir, que la redundancia de una estructura permanente de DNA de doble cadena debe haber te nido una enorme importancia selectiva en cuanto a la conservación de la información genética ya que de hecho las roturas simples constituyen una de - las lesiones más comunes producidas, tanto "in vivo" como "in vitro" y no - sólo por las radiaciones ionizantes sino por una variedad de agentes.

Dos tipos de ligasas han sido purificadas de diversos organismos: las que como en el caso de la aislada a partir de E.coli necesita de la for mación previa de un complejo entre la Ligasa y el NAD (nicotinamido-adenin- dinucleotido) para formar Ligasa -AMP o la que como en el caso de T₄ acom- pleja con ATP (Ademina trifosfato) para dar lugar a Ligasa - AMP. En cual- quier caso, es este complejo el que se une al 5' fosfato de la rotura simple de DNA para después producir la unión del fosfato al 3' OH de la ribosa del nucleotido anterior en la rotura. Para el funcionamiento de la unión última es estrictamente necesario, no sólomente que la rotura sea en 3' OH y 5'P - como hemos indicado, sino también que no falte ningún nucleotido entre estos dos terminales. (Geller, 1971; Jacobs et al. 1972; Weiss and Richardson, - 1967).

La importancia biológica de la DNA-Ligasa ha quedado demostrada en todos los casos no sólo como enzima responsable de la reparación de roturas simples o de la última etapa de la reparación por escisión y resíntesis de lesiones U.V., sino que también es necesaria para llevar a cabo la replicación del DNA en E.coli (Sugino and Okazaki, 1972; Geller and Bullock, 1970) así como para el crecimiento y recombinación en el Fago T 4 (Geller and Bullock, 1970; Anraku and Lehrman, 1969). De hecho no se han logrado aislar mutantes viables que no posean en absoluto actividad DNA-ligasica.

I.4.4.- Reparación por escisión y resíntesis

Sólo una fracción de las posibles lesiones, esencialmente dímeros de pirimidina y roturas simples, se pueden reparar eficientemente por foto reactivación enzimática o por unión de roturas simples por la acción directa de la DNA-Ligasa. El resto de las posibles lesiones, como la destrucción de las bases heterocíclicas, de los azúcares, roturas simples que no cumplen las estrictas condiciones de actuación de la DNA-ligasa (roturas en 3' OH - 5'-P) etc., dímeros de pirimidina, uniones cruzadas intra e intercadena, uniones cruzadas con proteínas, etc. pueden en principio ser reparadas mediante una eliminación física eficaz del segmento dañado. Naturalmente tal mecanismo requiere la presencia de todo un complejo sistema enzimático pues supone el reconocimiento de la lesión, su eliminación física en una extensión más o menos grande, la reconstrucción del segmento de la cadena de DNA degradada y el restablecimiento de su perfecta continuidad covalente.

La evidencia experimental de la primera de las etapas del proceso y en el caso de la reparación de los dímeros de pirimidina, se consiguió al verificar que eran eliminados "in vivo" desde el DNA (donde se habían originado por irradiación con luz U.V.) al citoplasma junto con cierto número de nucleótidos durante el proceso post-irradiatorio. (Setlow and Carrier, 1964; Boyce and Howard-Flanders, 1964; Swenson and Setlow, 1966; Setlow et al. - 1963). La segunda parte del proceso, es decir, la etapa de resíntesis fue conseguida por Pettijohn and Hanawalt (1965) y ha recibido después amplia confirmación (Pauling and Hanawalt, 1965; Hanawalt and Hayes, 1965; Reiter and Strauss, 1965). Pero quizás la evidencia más importante la constituye el que los mutantes deficientes en DNA-Polimerasa presentan una exaltada sensibilidad frente a la luz U.V. (de Lucia and Cairns, 1969; Gross et al. 1971; Kelly et al. 1969).

La evidencia experimental de que este mecanismo sea capaz también de reparar otro tipo de lesiones además de los dímeros de pirimidina se obtuvo al comparar la supervivencia frente a diferentes mutagenos químicos - de las estirpes salvajes y de los mutantes u.v.r. (1) de E.coli (Howard - Flanders, 1968).

La comprensión detallada de este sofisticado mecanismo de reparación está siendo en la actualidad obtenida a través de las numerosas experiencias "in vitro" llevadas a cabo gracias al aislamiento previo de las enzimas supuestamente implicadas. Así fueron aisladas las enzimas de reconocimiento de los dímeros de pirimidina en bacterias y fagos primeramente (Setlow, et al. 1969; Kaplan et al. 1969; Kushner et al. 1969; Oshikama and Sekigushi, 1970; Friedberg and King, 1971; Ohshikama and Sekigushi, 1972). En los últimos años se ha podido aislar U.V. - Endonucleasa a partir de otros organismos entre ellos de células de mamíferos. (Reagan et al. 1968. Painter, 1970; Edenberg and Hanawalt, 1972).

Los estudios "in vitro" con DNA - Polimerasa han demostrado sus múltiples actividades enzimáticas (Kelly et al. 1969, 1970). Las evidencias obtenidas de los mutantes PolA (1) indican claramente la implicación de esta enzima en la replicación reparadora del mecanismo de escisión-resíntesis (de Lucía and Cairns, 1969; Gross and Gross, 1969). Parece prudente, sin embargo, no confundir la polimerización que tiene lugar durante la replicación normal del cromosoma con la resíntesis reparadora ya que además de los mutantes PolA que son deficientes en resíntesis reparadora y no en replicación normal, existen otros cuya resíntesis reparadora sucede a velocidades normales estando, por el contrario, lentificada la replicación normal en un factor 50 a 100 (Hanawalt et al. 1968; Fangman and Russel, - 1971). En este sentido se ha sugerido que en ausencia de DNA-Polimerasa I funciona otro sistema de replicación reparadora controlada por el producto del gen recA (1) en E.coli (Gross et al. 1971; Cooper and Hanawalt 1972; Gefter et al. 1971).

La última etapa del proceso se realiza mediante la enzima DNA - Ligasa que ha sido aislada de muy diferentes orígenes; su presencia es estrictamente necesaria para la culminación de la reparación como lo demuestra - el hecho de que los mutantes deficientes en dicha enzima presentan una gran sensibilidad a las radiaciones U.V. (Pauling and Hamm, 1968; Gellert and Bullock, 1970; Dean and Pauling, 1970).

(1) Ver Apéndice I.

Podemos decir que la distribución filogenética de este tipo de reparación es total, así además de en bacterias ha sido identificada en levaduras mediante el aislamiento de mutantes defectivos (Unrau et al. 1971; - Fabre and Moustacchi, 1972). También en células humanas (Reagan et al. 1968. Painter, 1970; Edenberg and Hanawalt, 1972) y se ha demostrado su ausencia en fibroblastos epidérmicos de enfermos afectados con el Xeroderma pigmentoso; concretamente se ha demostrado la imposibilidad de realizar la etapa inicial de la escisión (Cleaver, 1970) a pesar de que las células aparentemente contienen U.V.-Endonucleasa (Bacchetti et al. 1972).

I.4.5.- La recombinación genética como un proceso de reparación

Podemos decir que en todos los organismos vivos en los que se ha estudiado, se ha podido comprobar que las radiaciones en general, así como muchos reactivos químicos, aumentan la frecuencia de recombinación genética. (Jacob and Wollman 1955; Roman and Jacob, 1858; Sharp and Freiferder, 1970; Lawrence 1970; Manney and Mortimer, 1964; Wood and Kafer, 1969; Shan field and Kafer, 1971; Jansen, 1970; Holliday, 1971; Proust, 1967; Prudhom meau and Proust, 1969; García Bellido, 1972; Kofman-Alfaro and Chandley - 1971).

En cuanto a la luz U.V. en concreto, parece claro que son las lesiones primarias del DNA, es decir los dímeros de pirimidina, la causa directa del aumento de la frecuencia de recombinación genética; constituyendose ellos mismos en zonas promotoras de recombinación. En efecto, así ha sido demostrado elegantemente por Cordone and Radman (1970) al comprobar que los cambios genéticos inducidos en el fago Lambda con radiaciones U.V. son más frecuentes en los segmentos ricos en AT que en los segmentos ricos en GC.

La recombinación genética puede ser entonces un mecanismo de reparación por segregación de las zonas lesionadas. Existen numerosas evidencias experimentales que así parecen confirmarlo; de un lado tenemos los diversos fenómenos de reactivación genética tras irradiación U.V. como: la reactivación por multiplicidad (Luria 1947), la reactivación por profagos (Jacob and Wollman, 1955); Blanco and Devoret, 1973) y la reactivación cruzada (Luria 1952). De otra parte se han aislado mutantes radiosensibles deficientes en recombinación en hongos y levaduras (Jansen 1970; Fortuin 1971).

Es interesante hacer notar que la reparación dependiente de la recombinación no se identifica exactamente con la recombinación misma. En -

efecto Rup y sus colaboradores (Rup and Howard-Flanders, 1968; Rup et al. 1971) han establecido convincentemente que la reparación dependiente de recombinación es desde luego postreplicativa; que las nuevas cadenas replicadas a partir de DNA lesionado con radiación U.V. contienen enormes huecos opuestos a cada dímero de pirimidina de la cadena original y que estos huecos pueden ser después reparados en el metabolismo postreplicativo del DNA por polimerización o por cambios entre las copias de DNA hijas o ambas cosas simultáneamente. En definitiva la presencia de los huecos favorecen los intercambios moleculares entre las nuevas cadenas del DNA.

I.4.6.- Evolución de los procesos de reparación: distribución filogenética. Tamaño del DNA reparable. Coordinación entre la reparación y la replicación.

El orden que hemos seguido a lo largo de la exposición de los diferentes mecanismos de reparación postulaba ya una secuencia evolutiva de su aparición en la biosfera; primero la reparación por absorción de la luz U.V. de longitud de onda corta, después la fotorreactivación. Tras estos procesos fotoquímicos la reparación enzimática por escisión resíntesis, la recombinación genética y un mecanismo aún no conocido al grado de los anteriores, la reparación postreplicativa. En suma, podemos decir que existen evidencias suficientes para sustentar la idea de que en los primeros estados de la evolución prebiótica, la luz U.V. de longitud de onda alrededor de 240 nm jugó un importante papel en la reversión fotoquímica de los dímeros de pirimidina de los ácidos nucleicos primitivos; la posterior protección de la tierra, por la capa de ozono formada por las capas altas de la atmósfera, a las radiaciones U.V. especialmente a las más energéticas, convirtió en inoperante este sistema de reparación. Aunque concomitantemente con esto se redujo considerablemente la dosis de radiación absorbida por las incipientes estructuras vitales. La fotorreactivación enzimática con luz visible es un sistema que, como hemos visto, está distribuido filogenéticamente de manera amplia y podemos arriesgarnos a decir, incluso que totalmente en el mundo vivo. Supone además una situación intermedia entre los mecanismos puramente fotoquímicos y los puramente enzimáticos, al acoplar a un mecanismo enzimático una fuente energética electromagnética. Sin embargo su acción es completamente específica de un determinado fotoproducto y no es por tanto capaz de reparar otras lesiones en el DNA. Por último, los mecanismos de reparación enzimática por escisión, resíntesis y postreplicativos, no solamen

te están distribuidos en la naturaleza sino que además son capaces de reparar una variedad de lesiones mucho más amplia. Su grado de complejidad es al tiempo mucho mayor, requieren la presencia activa de una serie de enzimas además de las específicas de reconocimiento de las lesiones. Su eficacia, como veremos más adelante, está condicionada por un complejísimo control en la coordinación de todas ellas al actuar conjuntamente y con los procesos de replicación.

Además de las anteriores consideraciones filogenéticas y mecánicas (grado de complejidad enzimática y requerimientos energéticos) es necesario destacar, por lo sugerente, las consideraciones que vamos a hacer acerca de la naturaleza y tamaño mínimo del DNA susceptible de reparación con los diferentes sistemas estudiados.

La reversión de dímeros de pirimidina mediante el sistema puramente fotoquímico, es decir, por absorción de la luz U.V. de longitud de onda alrededor de 240 nm puede reparar como mínimo incluso un único dímero, es decir, un dinucleotido (Setlow and Setlow, 1962). La fotorreactivación enzimática por su parte requiere como hemos visto, un mínimo de 9 nucleótidos. (Setlow and Bollum, 1968; Williams et al. 1971) aunque sin embargo no es específico de DNA de doble cadena, es decir, que es igualmente activo en ácidos nucleicos de cadena simple tanto naturales como sintéticos. El mecanismo de reparación enzimática por escisión-resíntesis requiere DNA de doble cadena y altamente polimerizado, pues como hemos visto desde la liberación del orden de 10 nucleótidos por cada dímero reparado, cuando actúa la U.V.-Exonucleasa, se pasa hasta algunas decenas de ellos (20 a 50 nucleótidos) cuando en el proceso actúa la actividad exonucleasica de la DNA-Polimerasa (Billen et al. 1967, Ley and Setlow, 1972).

Los huecos producidos en la reparación postreplicativa en DNA irradiado con luz U.V. puede ser aproximadamente de 1000 nucleótidos de longitud (Rup and Howard - Flanders, 1968; Lehman, 1972; Buhl et al. 1972). Por último el tamaño de la región de solapamiento híbrido formado durante la recombinación genética es también aproximadamente 1000 pares de bases. La diferencia con la reparación postreplicativa es que necesita de la presencia de dos moléculas de DNA y la de esta última y el mecanismo de escisión resíntesis con el de fotorreactivación enzimática es que necesitan de la existencia de DNA de doble cadena, para que los huecos producidos no conduzcan a la discontinuidad total de la cadena.

Tras lo expuesto parece que los diferentes mecanismos de reparación que evolutivamente han ido apareciendo han sido consecuencias lógicas en orden a acoplarse eficientemente a las condiciones ambientales utilizando las fuentes energéticas disponibles.

Aparentemente no existe redundancia mecánica ni operativa en los sistemas estudiados salvo en los casos de la reparación por escisión resíntesis y de reparación postreplicativa; pues ambos utilizan un mecanismo enzimático de liberación de dímeros en el que hay un reconocimiento de la lesión - en un momento dado para posteriormente, y tras la producción de un hueco más o menos grande, la reparación polimerizante de dicho hueco, ¿Porqué ambos - sistemas de reparación coexisten en las células de una manera universal?. Si ambos sistemas de reparación son independientes, ¿Cómo no se ha seleccionado el más eficiente? ¿Es que es necesaria la presencia de ambos sistemas para - una reparación eficiente?.

Efectivamente los hechos experimentales han confirmado no sólo esta última hipótesis, sino que también han ofrecido la visión de un complejo mecanismo de coordinación entre la replicación y ambos mecanismos de reparación. Cualquiera que sea la verdadera estructura y el mecanismo detallado del punto de replicación, hemos de suponer la necesidad de la continuidad física de las cadenas simples de DNA que se están replicando. Es decir, que la presencia de roturas simples o de huecos en cualquiera de las cadenas del DNA - podría conducir a una replicación abortiva y en definitiva a la producción - de un suceso que podría ser letal. Por tanto, los requerimientos estructurales exigidos por la replicación obligan necesariamente o a la reparación por escisión resíntesis de las lesiones U.V. incluida la recuperación de la continuidad covalente de las cadenas antes del punto de replicación ó no comenzar a excindir dímeros proximamente al punto de replicación. En este último caso en la replicación se forman huecos en las nuevas cadenas frente a los dímeros de pirimidina de las cadenas originales y se reparan después en un - proceso de reparación postreplicativo. (Rup and Howard - Flanders, 1968). Si esto fuese así, sería lógico esperar que la eficiencia de la reparación del mecanismo de escisión-resíntesis aumentase si retrasamos la replicación del DNA y descendiese la eficiencia del mecanismo de reparación postreplicativo ya que requiere la replicación previa del DNA. Osea, en general, cualquier - tratamiento que afecte o retrase la síntesis de DNA deberá afectar a la coordinación entre ambos mecanismos de reparación. Estas predicciones se han comprobado positivamente mediante experimentos genéticos (Radman et al. 1970, -

Radman and Herrera, 1970).

Se ha podido medir en *E. coli* cómo la presencia de únicamente dos dímeros por genoma son suficientes para producir un efecto letal con células que no poseen ninguno de los dos tipos de mecanismos de reparación. Y que son necesarios del orden de 20 a 50 dímeros por genoma para producir efectos letales cuando opera únicamente la escisión o la reparación dependiente del gen *recA* respectivamente. Pero son necesarios más de 3.000 dímeros para matar células que poseen ambos mecanismos de reparación funcionales. (Howard-Flanders et al. 1968). Osea, que la mayor eficiencia, cuando existen coordinadamente ambos mecanismos, no es simplemente la mera adición de los efectos considerados independientes. Las interpretaciones teóricas de los datos experimentales (Formili et al. 1971) sugiere que ésta cooperatividad surge de la coordinación con la replicación del DNA.

I.5.- Los procesos de reparación como mecanismos de variación de la información genética. Coordinación entre la reparación recombinación y replicación. Teoría del "S.O.S. repair"

Los procesos de variabilidad de la información genética son todos - aquellos que en definitiva conducen a la producción de mutaciones. Es en este sentido en el que vamos a tratar de estudiar ahora a los mecanismos de - reparación.

Como ya hemos visto, la radiación U.V. fue probablemente el factor ambiental más importante en la inducción de variaciones en las cadenas polinucleótídicas, antes de que fuera eliminado en gran medida, por la capa de ozono. Aún así la luz U.V. ha continuado siendo un factor importante en la producción de variaciones como lo demuestra el hecho de la amplia distribución de los mecanismos de reparación y la diversidad de sus mecanismos de acción en todos los organismos vivos.

A lo largo de los últimos 15 años, ha sido posible con el desarrollo de la Biología y Genética moleculares, identificar los diferentes mecanismos que pueden estar implicados en los procesos de mutagénesis espontánea, ya - que se cuenta con numerosas evidencias de que la replicación de DNA, al menos en bacterias y fagos, es un elemento decisivo en la determinación de la tasa de mutación espontánea. Por otra parte podemos afirmar que al menos en *E. coli* la mutagénesis inducida, depende de la función del gen *recA*. Pero esto no - quiere decir necesariamente que las mutaciones dependan de la recombinación

genética. Ya hemos indicado como Rup et al. (1971) han demostrado que - tras la irradiación U.V. se producen frecuentemente cambios entre las - cadenas que se están sintetizando, pero que ello no implicaba que la recombinación genética fuese el principal mecanismo de la reparación de - los huecos de las cadenas del DNA., sino que el gen recA estaba implicado en dos mecanismos de reparación: el primero se trata de un proceso de llenado de huecos, mientras que el segundo es un mecanismo de reparación por recombinación de las cromátidas que se han sintetizado.

Lo que es importante subrayar es que en las células lesionadas - genéticamente, los mecanismos de supervivencia, es decir, de mutagénesis, reparación, recombinación y replicación son inseparables. Una célula con suficientes lesiones potencialmente letales (inducidas por radiaciones o por tratamientos químicos) puede o no sobrevivir. Sobreviviendo puede o - no, además, haber introducido cambios en el contenido de su información - genética. El resultado final depende pues, tanto de la naturaleza y grado de las lesiones en su DNA como de los mecanismos de reparación de que disponga y también en cierta medida de las condiciones ambientales en que se encuentra, ya que pueden condicionar la eficacia de estos mecanismos así como su coordinación con la replicación.

Vamos a intentar, a continuación, dar una visión global acerca de las conclusiones actuales sobre la mutagénesis reparación y replicación - de acuerdo con las hipótesis ultimamente expuestas, en el marco de la teoría del "S.O.S. repair" (Radman, 1975; Witkin, 1975; Dondney, 1975; Devoret et al. 1975).

Supongamos al DNA dañado, como un disparador de señales que inducen coordinadamente un conjunto de funciones encaminadas a lograr la supervenencia de la célula dañada. Algunas de estas funciones son extraordinariamente eficaces y de muy baja probabilidad de error, otras pueden inducir errores, aunque con baja frecuencia, al tratar de eliminar las lesiones y por último algunas, las menos, están sujetas a una gran probabilidad de error. Ver Fig. I.1.

Supongamos un dímero de pirimidina producido por radiaciones U.V. en una célula de E.coli. Si esta célula posee enzima fotorreactivante (es decir, es una estirpe salvaje) y se encuentra en presencia de luz de la longitud de onda apropiada reparará esa lesión eficazmente y con muy baja probabilidad de error. Por tanto sin la producción de ninguna mutación. La señal "S O S" permanecerá sin embargo si la célula no está en presencia de luz. -

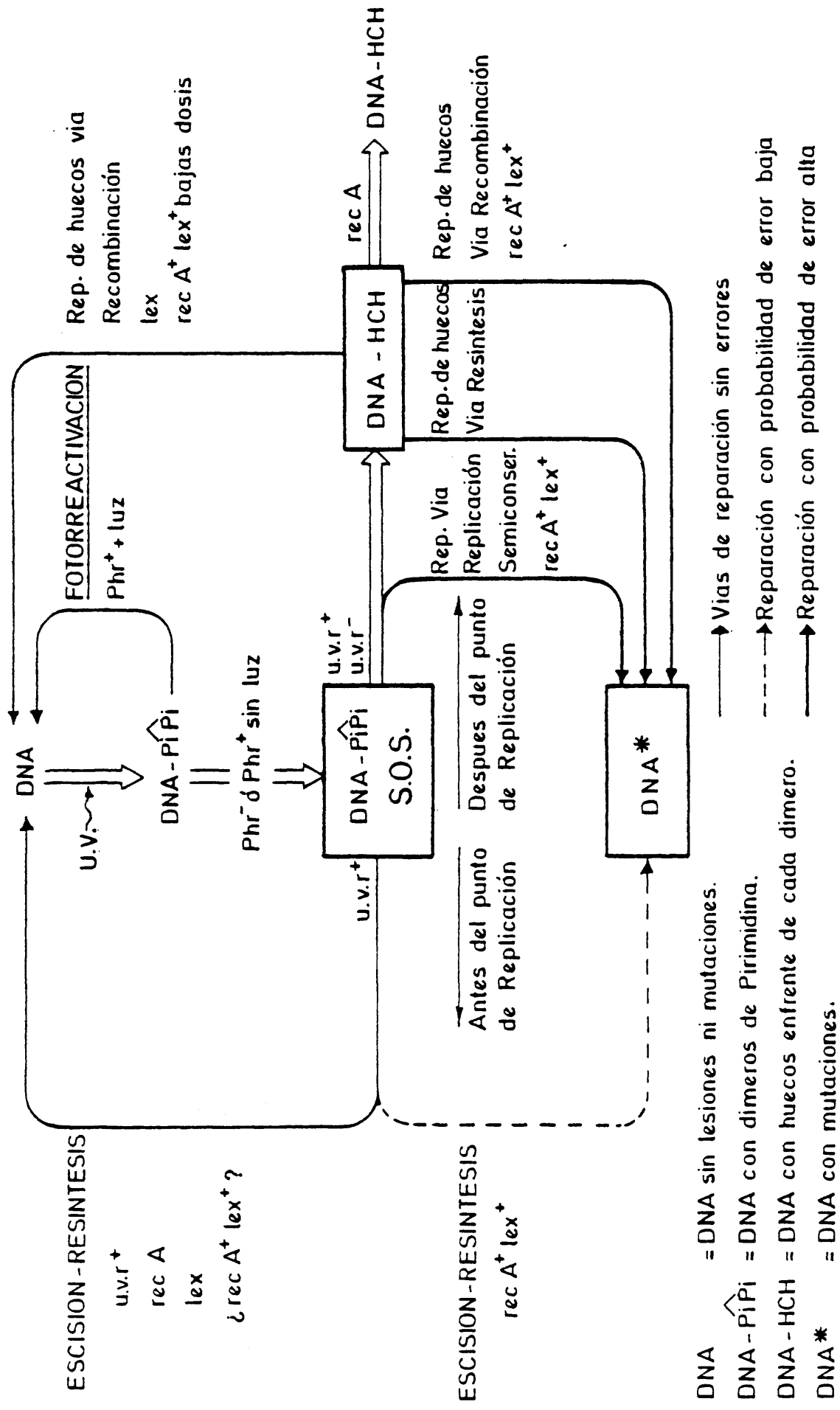


FIG. - I - 1

Entonces si como decíamos estamos hablando del caso de una estirpe salvaje, es decir, $u.v.r.^+$ (1), el mecanismo de escisión liberará al DNA rápidamente de sus lesiones, aunque si existen algunas próximas al punto de replicación éstas se librarán de la escisión. Algunos dímeros, por tanto, pueden pasar sin ser escindidos al menos por una replicación. Naturalmente que en estirpes celulares $u.v.r.^-$ (1) deficientes en escisión, ninguno de los dímeros producidos en el DNA será escindido y por tanto todos ellos pasarán el punto de replicación. Pero volvamos de nuevo a la favorable situación de la escisión - total de los dímeros. En las estirpes salvajes los pequeños huecos producidos en la escisión se reparan eficazmente, en el mecanismo de escisión-resíntesis, por la acción de la DNA-Polimerasa I altamente específica que no produce errores en la replicación de estos huecos tomando como molde la información contenida en la cadena opuesta. El panorama se completa felizmente con el concurso de la DNA-Ligasa. Todo esto sucede también en las estirpes $recA$ y en las lex (1). (Algunas evidencias sugieren la posibilidad de que estos huecos sean a veces reparados mediante un mecanismo de reparación por escisión con ciertas probabilidades de error y que dependa del fenotipo $recA^+$ lex^+ (1). Sin embargo, hay que aclarar que la frecuencia de mutación inducida por estos huecos es muy baja). En concreto podemos decir que en ambos - casos, estirpes salvajes y $recA$ lex , la reparación por escisión-resíntesis es altamente eficaz y que utiliza el concurso de la DNA-Polimerasa I. - - (Kanner and Hanawalt, 1970; Boyle et al. 1970; Cooper and Hanawalt, 1972).

Supongamos ahora que algunos dímeros han llegado al punto de replicación, bien porque han escapado de la escisión en las estirpes $u.v.r.^+$ ó - porque estamos en presencia de una estirpe $u.v.r.^-$. Durante la replicación de las cadenas se forman enormes huecos en frente de los dímeros, que necesitan ser reparados a continuación para lograr la supervivencia de la célula. Existe también la posibilidad de que algunos dímeros no sean reconocidos durante la replicación, en estos casos la replicación continúa progresando - pero se producirán irremediamente errores, pues la DNA-Polimerasa correspondiente no sabe con seguridad qué tiene que copiar ante la presencia de - los dímeros como moldes. Esta replicación tras un dímero de pirimidina sucede en células con genotipo $recA^+$ lex^+ ya que como hemos visto las mutaciones inducidas por la luz U.V. no aparecen en las estirpes $recA$ o lex (Witkin, 1969).

No está claro, sin embargo, que esta replicación semiconservativa - con probabilidad de error alta, que puede suceder cuando un dímero ha logrado pasar el punto de replicación, pueda ser efectuada por cualquiera de las

(1) Ver apéndice I

tres DNA-Polimerasas conocidas en E.coli, al menos en sus formas constitutivas sin modificar (ya que las células *recA* y *lex* (1) no son diferentes en ninguna de estas actividades). Por tanto este tipo de actividad polimerizante, capaz de actuar en presencia de dímeros, podría depender de una polimerasa inducible y que se sintetizase en respuesta a la interrupción de la replicación, o también, simplemente tras la modificación de alguna de las tres polimerasas conocidas mediante un factor, este sí inducible, que en definitiva relajase los estrictos requerimientos de molde de estas polimerasas. - (Esta hipótesis está dentro del marco general de la teoría que estamos esbozando como veremos al final de la discusión).

Ya que el número aproximado de huecos producidos en las cadenas hijas es aproximadamente igual al número de dímeros en la cadena molde, (Rupp and Howard-Flanders, 1968) sólo una pequeña fracción de ellos producirá este anómalo tipo de replicación, que sin embargo da una probabilidad de error del 100%. Es decir, que siempre que se de este proceso se producirán mutaciones.

Volvamos de nuevo a los huecos formados en las nuevas cadenas por esa mayor parte de los dímeros de pirimidina no escindidos tanto procedentes de las estirpes *u.v.r.*⁺ como de las *u.v.r.*⁻. Dos tipos de reparación postreplicativa pueden operar a continuación: Síntesis postreplicativa de los huecos y reparación postreplicativa por recombinación.

Las estirpes *recA* son incapaces de realizar ninguna de ambas funciones, pues el producto del gen *recA* está implicado en ambas. (Smith and Meum, 1970). Por tanto, en estas estirpes se acaba la posibilidad de reparación aquí, ya sean *u.v.r.*⁺ ó *u.v.r.*⁻. Sin embargo, en las estirpes *lex* - que tampoco son capaces de realizar la síntesis reparadora postreplicativa, sí son capaces de realizar la reparación por recombinación postreplicativa. (Young and Smith, 1973) con tal eficacia que llegan a ser tan resistentes como las estirpes *u.v.r.*⁺. Se trata por tanto, de un mecanismo de reparación por recombinación postreplicativo libre de error, que puede darse - también cuando las dosis son muy bajas en estirpes *recA*⁺ *lex*⁺.

En general, sin embargo, sabemos que la reparación postreplicativa por cualquiera de los dos métodos en las estirpes *recA*⁺ *lex*⁺ produce mutaciones. Es decir, que son vías de reparación con posibilidad de error que actúan conjuntamente o competitivamente con la reparación por recombinación postreplicativa llevada a cabo por las estirpes *lex*.

La reparación postreplicativa de los huecos producidos enfrente de los dímeros de pirimidina, pueden realizarse mediante el mecanismo de síntesis merced a la presencia de una DNA-Polimerasa sin un requerimiento estricto de molde, y que naturalmente producirá errores en el llenado de los huecos. Por otra parte, la recombinación reparadora de estos huecos puede ser algo más eficaz (de hecho está libre de error en las estirpes *lex* y en las mismas *recA⁺ lex⁺* a bajas dosis) pero siempre inducirá a algún error. En realidad la distinción entre ambos tipos de vías reparadoras desaparece si pensamos que la síntesis reparadora se lleva a cabo en conjunción con la recombinación.

En definitiva las cuatro posibilidades de producir mutaciones por errores en la reparación, es decir posibilidad de error, aunque con poca frecuencia, en la reparación de los huecos producidos en la escisión de los dímeros en las estirpes *u.v.r.⁺*. Reparación postreplicativa de los huecos opuestos a los dímeros de pirimidina vía síntesis reparadora (alta probabilidad de error) o vía recombinación reparadora (alta probabilidad de error en *recA⁺ lex⁺*, libre de error en *lex*) y por último reparación por replicación semiconservativa tras el paso de un dímero no escindido (alta probabilidad de error) están identificando una única función responsable del éxito total de la reparación; se trata de una actividad polimerásica sin los estrictos requerimientos de molde de las polimerasas normales de *E.coli* (DNA-Polimerasa I, II, III).

Tal actividad postulada es capaz de copiar la cadena de DNA molde aunque tenga dímeros, pero induciendo siempre la presencia de bases erróneas enfrente de los dímeros y quizás alrededor de ellos o en otras zonas del fragmento reparado. Esta actividad polimerásica sería pues la respuesta al mantenimiento de la señal de "S.O.S" del DNA lesionado e iría a inducir allí donde los mecanismos primarios de reparación más eficaces (reparación por escisión-resíntesis prerreplicativa) no hubiesen logrado un éxito total. La inducción de esta enzima está condicionada como hemos visto, por diversos factores genéticos pero es requiriente siempre el genotipo *recA⁺ lex⁺* y responsable siempre de la mutagénesis producida por la radiación U.V.

La ausencia de evidencias bioquímicas de la existencia de tal DNA-polimerasa con probabilidades de error en extractos de *E.coli* puede ser debida a su naturaleza inducible y sólo podría ser encontrada, por tanto, en extractos de células que han sido lesionadas previamente con radiaciones U.V. y a las que les ha sido permitido después la síntesis de proteínas.

I.6.- El problema del aumento de la información genética y la radiosensibilidad. Importancia de los mecanismos de reparación.

Los estudios de radiosensibilidad en diferentes organismos de la escala evolutiva, han venido siempre a poner en evidencia la transcendental importancia que los mecanismos de reparación de radiolesiones han tenido antre la vulnerabilidad que representa el almacenamiento e incremento de la información genética.

Hasta qué punto son importantes estos mecanismos, que desde los primeros intentos de correlación entre radiosensibilidad y tamaño del blanco crítico (contenido en DNA) (Lea 1946; Epstein 1953; Puk 1959; Terzi 1961 y 1965), fue necesario subdividir en diversas clases radiosensibles independientes a los diferentes organismos, quedando agrupados según niveles estructurales. (Kaplan and Mosses, 1964; Sparrow et al. 1963 y 1967; Kaufman and Miller, 1970). Y he aquí que aunque dentro de cada clase radiosensible los individuos con más DNA, son más radiosensibles, entre las diferentes clases se observa un menor blanco crítico para clases cuyo contenido en DNA es mayor. Todo ello viene a indicar que la presencia de niveles estructurales más altos evolutivamente y por tanto, mayor número de diferentes mecanismos de reparación actuando coordinadamente, aportan a la célula capacidades de resistencia muy superiores a las que le corresponde según su contenido en DNA.

Quizás la evidencia experimental más fuerte de la tremenda dependencia de la radiosensibilidad con los mecanismos de reparación sea el que cualquiera de estas correlaciones, así como las obtenidas con organismos de diferente composición en GC dentro de una misma clase radiosensible y tanto frente a radiaciones gamma como U.V. (Haynes, 1962; Kaplan and Zabarine, 1962; Phil and Sauner, 1966; Underbrink and Sparrow, 1968; Sáez and Dávila 1974) no se cumplen para individuos mutantes en cualquiera de los genes estructurales de los mecanismos de reparación. De hecho, mutantes de este tipo de una misma especie con un mismo % GC, poseen una radiosensibilidad varios ordenes de magnitud superior a la de las estirpes salvajes. (Haynes, 1964; Moseley and Schein, 1964).

Por supuesto que las diferencias estructurales y de niveles de organización han influido también en la mayor radiorresistencia de clases con mayor volúmen de blanco crítico, pero no olvidemos que algunos niveles de mayor

organización lo que vienen a aportar de hecho son situaciones en las que se aumenta la eficacia de los mecanismos de reparación. Así, la aparición de los procesos de parasexualidad en bacterias, así como la aparición de la sexualidad y de la fase diploide en organismos superiores vino a potenciar los procesos de reparación por recombinación genética y segregación de mutaciones, además de que tanto la aparición de células diploides como la aparición de genomas eucarióticos subdivididos en diferentes cromosomas, la aparición de la membrana nuclear y la redundancia genética, ha venido a contribuir positivamente con su capacidad tampón frente a la agresión de las radiaciones, y la posibilidad de la actuación simultánea de varios puntos de replicación, a una mejor coordinación de los mecanismos de reparación con los de replicación y transcripción del DNA.

En efecto, la existencia de los complejos entre el DNA y las histonas y otras proteínas en los cromosomas de los organismos eucarióticos, constituyen de por sí una protección eficaz contra el ataque de las radiaciones, bien directamente, o indirectamente al estabilizar al DNA. De manera que no es aventurado pensar en la posibilidad de que la probabilidad de roturas dobles en el DNA y por tanto de discontinuidad total en el mensaje genético en función de la densidad de roturas simples (producidas directamente por efecto del ataque de los radicales libres radioinducidos o las formadas como consecuencia de la actuación de las enzimas de reparación por escisión-resíntesis, o de los huecos formados para la posterior reparación postreplicativa) sea menor que en el caso del genoma de células procarióticas que carecen de esa estructura cromosómica.

De cualquier manera y en orden a estimar los efectos de la organización del material genético en la resistencia celular a las radiolesiones en el DNA, se deberá comparar por ejemplo, la situación de células de *E. coli* y de levaduras, ambas totalmente deficientes en cualquiera de los sistemas de reparación. Si a pesar de que las células de levadura tienen cuatro veces más genoma que las de *E. coli*, continúan siendo más radiorresistentes a las radiaciones U.V., hemos de suponer que el DNA "silencioso" - (no funcional) ha contribuido a la resistencia. Si estos mutantes de levaduras fuesen más radiosensibles que los de *E. coli*, entonces habría que inclinarse a pensar que la mayor eficiencia de la reparación en las estirpes salvajes de las levaduras es debida a una mejor coordinación entre los mecanismos pre y postreplicativos con la replicación cuando existen estructuras cromosómicas (Radman et al. 1970).

I.7.- Efectos de las radiaciones U.V. en los ácidos Nucléicos.

La organización y jerarquización estructural y funcional de los seres vivos, ha desvelado la paradoja del grado de amplificación causa-efecto que se alcanza por la absorción de discretas cantidades de energía. Si el DNA se presenta así como blanco crítico de la acción inespecífica de las radiaciones ionizantes, mucho más lo es cuando consideramos a las radiaciones U.V., pues estas son absorbidas preferentemente por los ácidos nucleicos. Las proteínas, biomoléculas que les siguen en coeficientes de absorción molar, ni dan lugar ellas mismas a fotoproductos con alto rendimiento cuántico ni ocupan un papel transcendental en el funcionamiento de la célula. Existe sin embargo una situación intermedia, en la que cobran especial importancia, y es el caso de las reacciones fotoquímicas entre ácidos nucleicos y proteínas que conducen a fotoproductos de adición entre ambas macromoléculas y que en numerosas ocasiones producen letalidad en los seres vivos.

A pesar de que existen cuatro tipos de evidencias experimentales de la acción biológica de las radiaciones U.V. como son: el que la mutagenicidad molecular al U.V. presente un espectro de acción congruente con el espectro de absorción U.V. de los ácidos nucleicos; el que la radiosensibilidad celular al U.V. depende de su contenido en DNA y de su composición en bases; el que la replicación del DNA sea extremadamente sensible a las radiaciones U.V.; y por último, el que se produce una tremenda exaltación de la radiosensibilidad celular al U.V. por incorporación de ciertos análogos de bases en el DNA, la demostración de la transcendencia de los fotoproductos de los ácidos Nucleicos en estos procesos no fue fácil. Fundamentalmente porque la tremenda amplificación de la relación causa-efecto hace que concentraciones del orden de 10^{-8} M de fotoproducto produzcan ya la muerte de un 90% de las células irradiadas. Si a esto unimos las diferencias existentes entre la fotoquímica de las bases aisladas y de las bases formando parte de los ácidos nucleicos, e incluso de las dependencias conformacionales de la fotoquímica de los ácidos nucleicos, se comprende que se haya tenido que trabajar en sistemas modelos "in vitro" a dosis mucho más altas que las de significación biológica, a pesar de los problemas que se presentan siempre después al intentar extrapolar a condiciones "in vivo".

Además se ha recurrido al marcaje isotópico para aumentar los niveles de sensibilidad y al estudio de los estados excitados de los grupos cromóforos individualmente.

Por lo tanto en este apartado, y para la comprensión del tema de trabajo que estamos desarrollando, estudiaremos la fotoquímica de los ácidos nucleicos, dada su transcendencia y las reacciones fotoquímicas entre ácidos nucleicos y proteínas, pero siempre haciendo hincapié en los fotoproductos formados en su rendimiento y en su significación biológica, más que en los mecanismos por los que tiene lugar su formación. No sin antes, sin embargo, realizar algunas consideraciones mecanísticas que nos permitan simplificar primero la fotoquímica de los ácidos nucleicos y después la de las pirimidinas. La bibliografía al respecto es exhaustiva por lo que en este apartado se han omitido las citas, a excepción de las afirmaciones que no están contenidas en las revisiones que se han utilizado para la elaboración de este apartado y que son las siguientes: Smith, K.C. and Hanawalt, P.C. (1969), Setlow, R.B. (1968), Setlow, R.B. and Setlow J.K. (1972) y Fisher C.J. and Johns, H.E. (1976).

Principios simplificadores en la fotoquímica de los ácidos nucleicos

El conocimiento al que se ha llegado acerca de los estados excitados de los grupos cromóforos de los ácidos nucleicos y de los mecanismos de transferencia de la energía de excitación electrónica conducen ya a una serie de simplificaciones en la fotoquímica de los ácidos nucleicos:

1° Las transiciones electrónicas en los grupos cromóforos de los ácidos nucleicos en la zona del ultravioleta próximo, se corresponden con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ de las bases púricas y pirimidínicas.

2° La absorción de un fotón de frecuencia próxima a la del grupo cromóforo se da en 10^{-15} a 10^{-12} segundos.

3° La desexcitación puede ocurrir después fundamentalmente por uno de estos tres procesos: A) Desexcitación al estado fundamental por reemisión de un fotón de menor energía que la inicialmente absorbida. B) Transferencia de la energía de excitación electrónica a otra molécula del entorno que actúa de extintor. C) Formación de una nueva entidad química o fotoproducto con otra molécula no excitada del entorno.

En las dos primeras vías se recupera el estado fundamental, no así en la tercera. Los estudios de fluorescencia del DNA demuestran que la desexcitación con emisión de fluorescencia sólo se producen en las pirimidinas y no desde las purinas. Además la emisión de fosforescencia sólo se -

produce desde la timina. En efecto sólo se puede observar fosforescencia desde las purinas si se les hidroliza previamente del DNA. Numerosas evidencias experimentales demuestran que las purinas en los ácidos nucleicos se desexcitan según la segunda vía, es decir, transfiriendo la energía - de excitación electrónica a las pirimidinas. Esta migración de excitación electrónica está comprobado que llega hasta de 5 a 10 bases consecutivas.

En cuanto a la última vía, la formación de fotoproducto con otra molécula, de nuevo se simplifica mucho la fotoquímica de los ácidos nucleicos pues las purinas, ni libres ni formando parte del DNA producen fotoproductos estables, formándolos sin embargo y con gran rendimiento cuántico las pirimidinas.

De todo esto se desprende evidentemente que serán los fotoproductos de las pirimidinas los que justifiquen la acción biológica de las radiaciones U.V.

Reacciones fotoquímicas de las pirimidinas. Nuevas simplificaciones.

Los fotoproductos se forman por reacción de la molécula en estado excitado con otra de su entorno en estado fundamental. La reacción depende por tanto de la concentración de las otras moléculas y del tiempo de vida medio del estado excitado.

Las pirimidinas presentan tres tipos de estados excitados:

1° Excitación por transición $\pi \rightarrow \pi^*$. Con un tiempo de vida medio del estado excitado singlete menor que 10^{-6} segundos. La desexcitación desde este estado excitado puede ocurrir por cualquiera de los mecanismos de desexcitación.

2° Excitación por transición $n \rightarrow \pi^*$. Con un tiempo de vida medio del estado singlete inferior a del orden de 10^{-4} a 10^{-5} segundos.

3° Excitación a estado triplete. Poco probable en principio por la necesidad de inversión del espín. Pero la distribución real de los orbitales moleculares de las pirimidinas es tal que sus estados excitados singlete y triplete no son demasiado diferentes en energía y presentan una buena coincidencia en los niveles vibracionales, por lo que la inversión de espín produce con gran probabilidad un cruce entre sistemas singlete y triplete.

La desexcitación desde el estado triplete es ahora mucho más lenta. Precisamente por su marcada asimetría, cuando la transición se realiza por transición $n \rightarrow \pi^*$ se produce con cierta probabilidad el acceso a triplete.

Si bien el estado singlete de menor energía de las pirimidinas se alcanza por la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del doble enlace de los carbonos cinco y seis, el triplete de menor energía de las pirimidinas se consigue más fácilmente en la timina. En efecto existen moléculas orgánicas que por su especial estructura molecular presentan alto rendimiento cuántico en el cruce entre sistemas y algunas de ellas, como la acetofenona, presentan un estado triplete ligeramente superior en energía al de las pirimidinas, en concreto al de la timina por lo que pueden actuar de sensibilizadores, al absorber luz de frecuencia fuera de la banda de absorción de los ácidos nucleicos y transferir la energía de excitación electrónica desde un estado triplete al de la timina.

En definitiva pues la fotoquímica de los ácidos nucleicos queda reducida a la fotoquímica del estado excitado singlete más bajo de las pirimidinas, el de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ del doble enlace de los carbonos cinco y seis y del estado excitado triplete de la timina a donde convergen diversos mecanismos de excitación.

I.7.1.- Efectos directos en la ribosa desoxirribosa y purinas

Los carbohidratos representan el 41% en peso de los ácidos nucleicos. De hecho este porcentaje les hace importantes a la hora de considerar los efectos de las radiaciones ionizantes, es decir, de un ataque inespecífico. Sin embargo son transparentes a las radiaciones U.V. por encima de 230 nm por lo que resultan intrascendentes a la hora de considerar los efectos fotoquímicos primarios de la radiación U.V. sobre los ácidos nucleicos. (Ver efectos indirectos)

El rendimiento cuántico del ataque fotoquímico en la guanina ó adenina es del orden de 10 veces menor que en las pirimidinas. Incluso la absorción U.V. por las purinas no produce cambio fotoquímico en el anillo con gran eficiencia, así en los ácidos nucleicos parte de la energía absorbida por las purinas se transfiere a las pirimidinas ó al esqueleto azúcar fosfato.

I.7.2.- Efectos directos en las pirimidinas.

Productos de hidratación de las pirimidinas

En 1954 Sinsheiner descubrió e identificó la primera reacción fotoquímica, la hidratación del uracilo. Cuando se irradian soluciones de uracilo o citosina o sus derivados con luz U.V. pierden su banda de absorción U.V., hecho que se revierte por calentamiento con alcali o ácido. (Ver Fig.-I-2).

Se ha postulado que tanto la pérdida de absorción como su reversión es debido a la hidratación del doble enlace entre los carbonos 5 y 6. A pesar de que todos los isómeros del hidrato de la timina se han podido preparar químicamente y de que son productos estables, no se ha logrado demostrar la existencia del hidrato de la timina cuando se la irradia con luz U.V.

Productos de hidratación de los ácidos nucleicos

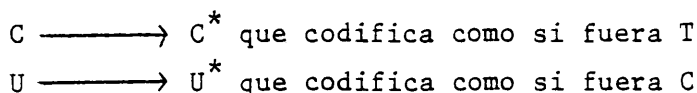
Cuando se irradian soluciones de DNA no se observa la desaparición de ninguna banda de absorción reversible por calor. Esto mismo se aprecia cuando lo que se irradia son ácidos bicatenarios sintéticos como poli dC:dI o poli rC:rI. Sin embargo, sí se encuentran evidencias de la formación de hidratos en ácidos nucleicos monocatenarios sintéticos y en RNAs bicatenarios. En este último caso, la pirimidina hidratada pierde su capacidad para producir puentes de hidrógeno.

La formación de hidratos conduce en último extremo a efectos letales o mutagénicos en los seres vivos:

Así los hidratos pueden ser letales en sistemas cuyo material genético sea monocatenario, caso del RNA del virus del mosaico del tabaco. En el bacteriofago R₇- RNA se ha podido medir que por cada acontecimiento letal se produce una molécula de hidrato al irradiar con luz U.V. a 280 nm. La formación de dímeros de $\hat{U}U$ es prácticamente nula

En sistemas cuyo material genético es DNA bicatenario, durante la replicación y posiblemente durante la transcripción del DNA existen cortas regiones de cadena simple en donde la formación de hidratos puede ser posible e importante produciendo o no mutaciones letales.

Los cambios de citosina a su hidrato o de uracilo a su hidrato codifican como si fueran timina o citosina respectivamente:



Así cuando se irradia ácido policitidílico y se intenta "in vitro" la formación de su mRNA con RNA - Polimerasa se produce ácido riboguanílico pero con adeninas en aumento. Este incremento en la incorporación de adeninas disminuye y desaparece si tras la irradiación se calienta o trata con alcali el ácido policitidílico.

De la misma forma cuando se utiliza "in vitro" poli - U como mRNA se sintetiza polifenilalanina pero tras la irradiación con luz U.V. de este mRNA se produce el cambio de triplete U U U en U U U^{*} en alguna proporción que codifica como si fuese U U C, es decir, serina y aparecen serinas en aumento y fenilalanina en disminución en la cadena de proteína que se está sintetizando.

Productos de dimerización de las pirimidinas.

La timina en solución pierde su característica banda de absorción a 253 nm 10 veces menos que lo hace el uracilo cuando se les irradia con luz U.V.. Esta aparente insensibilidad desaparece cuando la irradiación se hace sobre timina congelada. En estas condiciones la timina es muy fotosensible perdiendo su característica banda de absorción ($\phi = 0,2$) pero no debido a la hidratación del doble enlace C₅ ----- C₆ ya que la fotorreacción no es reversible por calor o alcali. Sin embargo sí se revierte en su mayor parte por irradiación con luz U.V. de longitud de onda más baja. (240 nm).

Una nueva reacción ocurre en este caso en la que está implicada la aparición de un dímero mediante la formación de un anillo ciclobutano a partir de los dobles enlaces C₅ ----- C₆ de ambas timinas. Son posibles cuatro isómeros de este tipo de dímero. (Ver Fig.-I-2).

El papel del estado sólido en el aumento del rendimiento cuántico de la reacción no está muy claro, aunque se ha supuesto que las moléculas de timina no están distribuidas uniformemente en la solución congelada, sino que al congelar quedan rodeadas de moléculas de agua fuertemente orientadas quedando atrapadas en situación favorable para la dimerización.

Así por varias técnicas que incluyen la autorradiografía se ha podido comprobar cómo al congelar las moléculas de timina se reúnen formando grupos cuyas características dependen de las condiciones de experimentación.

En estos grupos estaría favorecida la formación de dímeros al estar algunas posicionadas lo suficientemente cerca para que ambos enlaces puedan interactuar al absorber energía de la luz U.V.

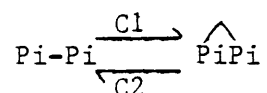
Todas las bases pirimidínicas pueden al ser irradiadas en soluciones congeladas, dar lugar a fotodímeros, pero la máxima eficiencia de dimerización por fotón y por par de nucleótidos se obtiene con el dímero de timina $\hat{T}T$. El dímero de citosina $\hat{C}C$ tiende a desaminarse formando el dímero de uracilo $\hat{U}U$ lo mismo que el de citosina - timina $\hat{C}T$ para formar el de uracilo - timina. Por supuesto que también se pueden formar directamente dímeros de $\hat{U}U$ ó de $\hat{T}C$ ó de $\hat{U}T$. Por tanto son 6 los tipos de dímeros de pirimidina que se pueden formar en experiencias de irradiación de soluciones congeladas de pirimidinas o mezclas de ellas a pesar incluso de la competencia de la formación de hidratos en el caso del uracilo o de la citosina.

Productos de dimerización de los ácidos nucleicos.

El posicionado interbases exigido para la dimerización in vitro de soluciones de pirimidina se da de modo natural en las cadenas de los ácidos nucleicos. De hecho la fotodimerización de las pirimidinas ocurre in vivo en los ácidos nucleicos de sistemas celulares, subcelulares y virásicos al irradiar con luz U.V.

En las cadenas dobles de los ácidos nucleicos, en el DNA húmedo (forma B) en general, los dímeros se forman entre bases adyacentes de la misma cadena. En la forma B o forma húmeda las bases en el DNA están apiladas unas sobre otras paralelamente y perpendicularmente al eje de la hélice. Sin embargo, cada base está rotada ligeramente (36°) sobre la siguiente. La dimerización causa una deformación local al hacer coincidir perfectamente los planos de ambas bases vértice a vértice, lo que se traduce en la desaparición de los enlaces de hidrógeno correspondientes a las bases implicadas y sus complementarias.

La reacción de dimerización en los ácidos nucleicos es también reversible por irradiación con luz U.V., llegándose a un equilibrio entre la formación de dímeros y su monomerización:



Las constantes de velocidad $C1$ y $C2$ dependen de la pirimidina de que se trate, y de la longitud de onda a la que se irradie, pero en el valor

final del equilibrio influyen además la absorción molar de las bases implicadas y del dímero. Así aunque en el caso de la timina y a 254 nm $C_1=0,01$ y $C_2=0,5$ como la timina absorbe 400 veces más que el dímero, en el equilibrio la proporción $\hat{T}/T=8$. En general y para cualquiera de las bases pirimidínicas la dimerización alcanza un máximo rendimiento a 280 nm y la monomerización está más favorecida a 240 nm. Así nunca se puede obtener un 100% de los dímeros posibles cuando se irradia DNA en la forma B a no ser en presencia de fotosensibilizadores. (Ver más adelante).

La forma A de DNA o DNA seco se da en la naturaleza en las esporas. En esta configuración, los planos de las bases, aunque siguen siendo paralelos están rotados de forma que tienen entre ellos un ángulo de 70° con respecto al eje de la hélice. En esta configuración y tras fuertes irradiaciones de las esporas se pueden conseguir hasta del orden de un 30% de las timinas en forma de dímeros, que sin embargo no se revierten a la forma monomero por posterior irradiación con luz U.V. de longitud de onda corta - - (240 nm). El rendimiento de dímeros en estas circunstancias se puede acercar mucho más al 100% de los posibles. Este especial tipo de dímeros (SP) se ha obtenido también por irradiación de soluciones congeladas a altas dosis. (Ver Fig-I-2).

La dimerización también puede ocurrir entre cadenas diferentes; - este tipo de dimerización no ha sido observado en DNA humedo (B) y sólo en DNA seco (A) o tras irradiación exhaustiva de esperma de salmón. La formación de dímeros intercadenas está también favorecida en DNA desnaturado o parcialmente desnaturado, dependiendo su rendimiento del contenido en AT. Se ha propuesto una conformación para este tipo de dímeros. (Ver Fig-I-2.) que es extremadamente sensible al ácido, monomerizándose. Quizá esta sea - la razón por la que no se han detectado en DNA irradiado pues normalmente se utiliza una hidrólisis ácida para su análisis.

Además de la dimerización, la asociación de la timina y de la citosina puede ocurrir por otra vía: por apertura del doble enlace 5 --- 6 de la timina y formación de un puente entre el carbono 6 de la timina y la posición 4 de la citosina cuando son adyacentes en la misma cadena. La citosina pierde entonces su grupo amino formando, por tanto, un enlace T - U. (Ver Fig-I-2 PO-T)

Este compuesto absorbe a 313 nm lo que explica por qué el DNA -

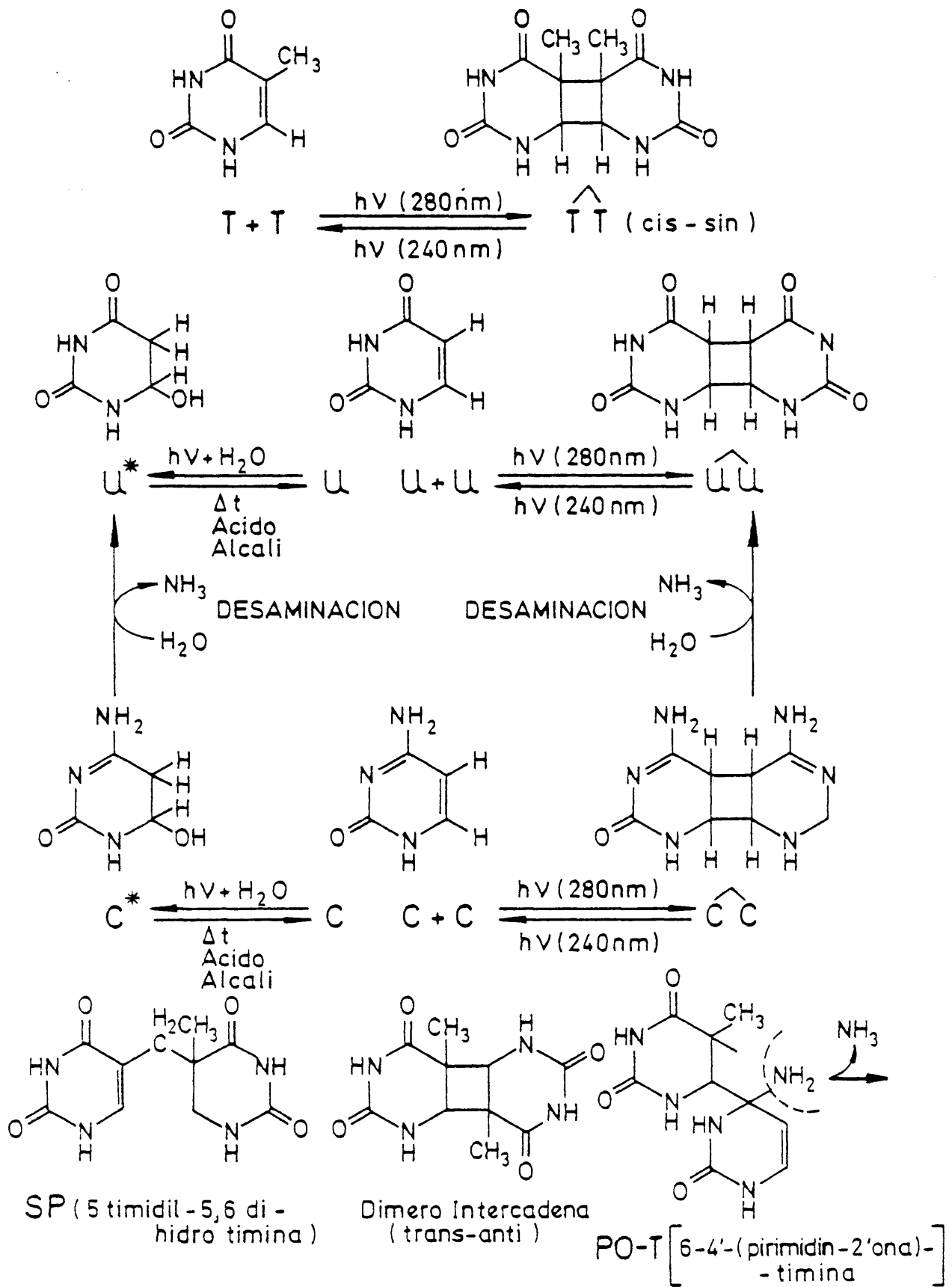


Fig. I - 2

irradiado muestra un aumento de absorción en esta zona del espectro. Este compuesto puede ser relativamente abundante. Así en *Micrococcus radiodurans* representa el 18% de los productos ácido soluble de la timina.

Para que esta reacción se produzca ambas bases deben estar una cerca de la otra, aunque debido a la estructura terciaria de los ácidos nucleicos pueden darse incluso a una distancia de 2 bases. Así con un t-RNA *E. coli* que contiene una base particular el tiouracilo que absorbe especialmente a 334 nm e irradiando a esta longitud de onda, se forma un enlace covalente entre esta base y la citosina que está separada 5 nucleótidos pero suficientemente próxima debido a la estructura terciaria de éste RNA.

Existen numerosas evidencias de la implicación directa de los dímeros de pirimidina como las lesiones de mayor importancia biológica en la interacción entre la radiación U.V. y los seres vivos.

Así utilizando la reversibilidad que experimentan los dímeros de timina cuando se les irradia a 240 nm se ha podido demostrar que tras altas dosis de U.V. a 280 nm, aproximadamente el 50% de la inactivación de la capacidad transformante del DNA en *Hemophilus influenzae* puede ser atribuída a ellos.

"In vitro" la capacidad de DNA-desnaturado para actuar como molde para la síntesis enzimática de DNA, desciende drásticamente cuando se irradia con luz U.V. a 280 nm al DNA. Esta capacidad se recupera parcialmente por irradiación posterior con luz U.V. a 240 nm.

La síntesis de los ácidos nucleicos se interrumpe a nivel del dímero constituyendo así una lesión letal. En el caso de que la célula no se esté dividiendo pero esté metabolizando los dímeros no se transcriben. De esta forma la composición en bases del mRNA se modifica incrementando la relación purinas/pirimidinas.

Las células bacterianas que han sido irradiadas con luz U.V. muestran un aumento de supervivencia si son posteriormente irradiadas con luz visible. (Vease Apdo. I-4-2). Este proceso se conoce como: Fotorreactivación y la enzima responsable de esta reparación reconoce específicamente dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano.

Ciertas estirpes bacterianas son muy sensibles a la luz U.V. mientras otras son muy resistentes. Todas las estirpes resistentes estudiadas poseen la capacidad de escindir dímeros de su DNA. Sin embargo las células

sensibles son incapaces de llevar a cabo este tipo de reparación que libera dímeros del DNA.

Secciones eficaces y rendimientos cuánticos del proceso de dimerización.

El estudio del proceso de dimerización de las pirimidinas en los ácidos nucleicos, en concreto en el DNA natural, ha presentado diversos problemas técnicos derivados sobre todo de dos factores; la reversibilidad de la reacción ya comentada, y las dificultades en la determinación del número de dímeros formados.

En efecto, si la determinación de la concentración de dímeros por medida de cambios de absorción ha dado buenos resultados en sistemas modelo como TpT etc, es necesario tener en cuenta que debido al efecto hipocrómico inherente a la estructura bihelicoidal, el descenso en la absorción del dímero respecto de la base se compensa e incluso se sobrepasa al tener en cuenta el efecto hipercrómico de la desnaturación local producida por la presencia de un dímero en el DNA. (Fisher and Johns 1976). Así ha sido necesario recurrir al marcado isotópico de las pirimidinas en DNAs naturales para aumentar la sensibilidad de los ya de por sí tediosos métodos cromatográficos de separación y cuantización de dímeros de pirimidina.

En la Tabla I-1 he resumido los datos más importantes de cálculo de secciones eficaces de dimerización y monomerización así como de rendimientos cuánticos que existen en la bibliografía al respecto para timina libre o posicionada en situación favorable a la dimerización (soluciones de timina congeladas, TpT, poliT etc) así como los pocos datos existentes en DNA. Como se observa hasta 1977 no se ha realizado un estudio exhaustivo de determinación de secciones eficaces de formación de dímeros en DNA. A pesar incluso de este intento, y debido a que de nuevo se ha eludido la tediosidad de las determinaciones, el estudio resulta incompleto. En efecto Patrick en este trabajo ha ajustado sus cinéticas de formación de dímeros a la pendiente inicial máxima, circunstancia que le impide calcular las secciones eficaces de monomerización en el proceso. (Al pie de la Tabla I-1 se presentan algunos datos de la crítica que el mismo realiza de los valores así obtenidos en el cálculo de las secciones eficaces y rendimientos cuánticos).

TABLA. I.1.- SECCIONES EFICACES Y RENDIMIENTOS CUANTICOS DE MONOMERIZACION Y DIMERIZACION DE PIRIMIDINAS

Substrato	Seguimiento	λ nm	Sec. eficaz monom. $m^2 \times 10^{-23}$	Sec. eficaz dim. $m^2 \times 10^{-23}$	Rend. cuant. monom. calculado con la sec ción eficaz de absor ción de		Rend. cuant. dimeri. calculado con la sec ción eficaz de absor ción de	
					DNA	Pi	PiPi	DNA
T-Solución	1 Absorción U.V.	254	9	9				0,0004
T-Sol. Congel.	2 Absorción U.V.	254						0,20
pTpT-sol.	3 Absorción U.V.	254						0,010
TpT-Sol. pTpT-Sol.	4 Absorción U.V.	254						0,006
	Absorción U.V.	254						0,014
T-Solución	5 Absorción U.V.	230	70,00		0,60			
		238	30,00		0,60			
		248	10,00		0,60			
		254	7,00		0,60			
		265	0,62		0,60			
		280	0,02		0,60			
313	0,00		0,60					
Poli-T-Soluc.	6 Absorción U.V.	238				1,20		0,036
		265						0,022
		280						0,014
DNA-T ₂ DNA-E.coli	7 Hidrolisis ácida Cromat. en papel BuT/Ac/H ₂ O	260						0,019
		260						0,013

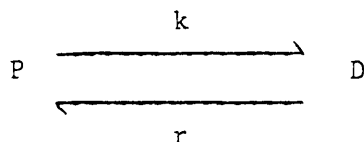
Substrato	Seguimiento	λ nm	Sec. eficaz monom $m^2 \times 10^{-23}$	Sec. eficaz dim. $m^2 \times 10^{-23}$	Rend. cuant. monom. calculado en la sec ción eficaz de absor ción de	Rend. cuant. dimeri. calculado con la sec ción eficaz de absor ción
			9	9	DNA Pi PiPi	DNA Pi $0,6(E_{Pi}+E_{Pi})$
DNA-E.coli	8					
T T	Hidrolisis ácida	240		2,00		0,016
	cromatografía	254		6,20		0,019
	en papel	268		8,30		0,019
C T	But/Ac/H ₂ O	280		5,50		0,019
		240		0,27		0,0012
		254		0,70		0,0023
		265		1,20		0,0029
		280		0,82		0,0027

- 1.- "Photochemistry of the Nucleic Acids" Cap-4- pp 62
- 2.- "Photochemistry of the Nucleic Acids" Cap-1- pp 12
- 3.- Deering and Setlow. B.B.A. 41 (1960) 550
- 4.- Johns et al. J. Mol Biol 4 (1962) 104-114
- 5.- R. Setlow B.B.A. Preliminary notes (1961) 237-238
- 6.- "Photochemistry of the Nucleic Acids" Cap-1- pp 112
- 7.- Wulff D.L. Biophys. J. 3 (1963) 355-362
- 8.- M.H. Patrick. Photochemistry and Photobiology 25 (1977) 357-372.- Todas las cinéticas están realizadas con 3 valores a cada λ con un error del 5% en la determinación tanto en T T como en C T. Supone que en las secuencias CTT ó TTC se suma al introducido por la formación de otros fotoproductos que no se detectan llega a un 20%. Como modelo de aproximación utilizan el de Deering y Setlow (1963) en poli T. Utilizan los valores de frecuencia de T T/T y C T/T tomados del análisis de vecino más próximo. Concluyen que los valores de secciones eficaces de dimerización se obtienen con un error total de un 40%. El cálculo de los rendimientos cuánticos lo realizan a partir de la sección eficaz de absorción de Tpf ó Tpc según la expresión: $0,6(E_T+E_C)$ y $0,6(E_T+E_C)$. Donde E = Coeficiente de absorción molar.
- 9.- Las secciones eficaces se han calculado para un fotón de la longitud de onda considerada.

La determinación de las secciones eficaces y rendimientos cuánticos de monomerización y de formación de dímeros y para los dímeros de \widehat{TT} y de \widehat{CT} en DNAs naturales y para varios longitudes de onda del espectro U.V., ha constituido parte muy importante del trabajo de esta memoria. Por eso presentaré - aquí la exposición del modelo utilizado en la descripción del proceso de dimerización del DNA y que como veremos aunque posee ciertas simplificaciones no ha eludido el problema que supone la monomerización simultánea de los dímeros formados. Este modelo es semejante al propuesto por Johns. (Johns, H.E. 1969)

En un DNA bacteriano como los utilizados en este trabajo se puede suponer que se da una situación próxima al azar en cuanto a la secuencia primaria de sus bases. Sobre todo en el DNA de E.coli en el que además de poseer un número suficientemente de bases, del orden de 10^7 , el porcentaje de cada una de las cuatro posible es aproximadamente del 25%. Pero además y según los resultados de análisis de secuencia por el método de análisis del vecino más próximo, se ha podido comprobar como la frecuencia de las 16 combinaciones posibles de las cuatro bases tomadas de dos en dos son también aproximadamente iguales y de cualquier forma conocidas para este DNA. En definitiva la simplificación introducida es la de considerar como si de la irradiación de dinucleótidos de TT ó de CT se tratase. (Aunque el modelo tendría la misma validez para el caso de los dímeros de \widehat{CC} , sin embargo adelantaré aquí ya que, el marcaje isotópico utilizado no nos permite determinar este tipo de dímeros, que por otra parte se producen con mucho menor rendimiento que los de \widehat{CT} y estos que los de \widehat{TT}).

Supongamos pues la reacción fotoquímica que estamos estudiando como la de formación de dímeros (D) a partir de moléculas precursoras (P). Como ya sabemos la reacción es reversible por la misma radiación U.V., por tanto denominaremos k a la sección eficaz de formación de dímeros y r a la sección eficaz de monomerización:



La variación del número de dímeros en función de la fluencia fotónica ó energética será igual al número de dímeros que se están formando menos el número de dímeros que se están monomerizando. Es decir:

$$dD/d\bar{L} = kP - rD \quad (1)$$

Donde \bar{L} es la fluencia media. Si ahora denominamos P_0 al número inicial de monómeros susceptibles de absorber un fotón U.V. y transformarse fotoquímicamente en dímeros, podemos poner:

$$dD/d\bar{L} = kP - rD = k(P_0 - D) - rD = kP_0 - (k+r)D$$

Integrando:

$$D = kP_0/(k+r) (1 - e^{-(k+r)\bar{L}}) \quad (2)$$

Esta es pues la ecuación que describe el proceso de formación de dímeros.

En esta ecuación el número de dímeros a saturación, es decir, el número de dímeros cuando se ha alcanzado el equilibrio entre la formación y la monomerización se obtiene al calcular el valor de D para \bar{L} infinito. Es decir:

$$D_{\text{saturación}} = D^* = kP_0/(k+r) \quad (3)$$

Podemos poner por tanto que:

$$D^* - D = kP_0/(k+r) e^{-(k+r)\bar{L}}$$

Tomando logaritmos:

$$\ln(D^* - D) = \ln kP_0/(k+r) - (k+r)\bar{L} \quad (4)$$

Es decir, obtenemos la ecuación de una recta en la que la ordenada en el origen (m) vale $\ln kP_0/(k+r)$ y la pendiente (n) es $(k+r)$. El ajuste de los resultados experimentales de cantidad de dímeros a cada valor de \bar{L} y para cada longitud de onda estudiada nos permitirá obtener los valores de esta ordenada en el origen (m) y de esta pendiente (n) que nos permitirán conocer los valores de k y de r , es decir, las secciones eficaces de formación de dímeros y de monomerización si conocemos la frecuencia dinucleotídica de las bases que forman el dímero considerado. Es decir:

$$m = \ln kP_0/(k+r) \quad (5)$$

$$n = (k+r) \quad (6)$$

Sustituyendo

$$m = \ln (n-r)P_0/n; e^m = (n-r)P_0/n; ne^m/P_0 = n-r$$

Es decir:

$$r = n(P_0 - e^m)/P_0 \quad (7)$$

$$k = n - r \quad (8)$$

El cálculo de los rendimientos cuánticos de formación de dímeros y de monomerización a partir de las secciones eficaces así calculadas resulta

ya fácil si se conocen las secciones eficaces de absorción del DNA, lo que conocidos los coeficientes de absorción molar a diferentes longitudes de onda resulta inmediato.

I.7.3.- Efectos indirectos fotosensibilización molecular

Producción de dímeros en presencia de acetona o acetofenona

Hasta ahora hemos hablado de las reacciones que tienen lugar como consecuencia de la absorción directa de los fotones U.V. por las especies reaccionantes. Sin embargo, los dímeros de timina se pueden formar también por irradiación a longitudes de onda que no son apenas absorbidas por la timina siempre que se esté en presencia de ciertas moléculas que sí absorben a esas longitudes de onda. Este proceso denominado de fotosensibilización molecular requiere que el estado triplete de la especie absorbente sea debilmente más energético que el de la timina. Tras la colisión, la energía del triplete del fotosensibilizador se transfiere a la timina originando timina en estado triplete con la subsecuente posibilidad de formación de dímeros de timina.

Ejemplos de esta situación son: La formación de dímeros de timina por luz de longitud de onda superior a 300 nm cuando la timina se disuelve en acetona y la formación de dímeros de timina en DNA cuando la irradiación se realiza en presencia de acetofenona y a longitud de onda superior a 300nm. Esta clase de reacciones rinde grandes cantidades de dímeros porque la reacción de rotura del dímero no ocurre.

En cuanto a la importancia biológica de este tipo de reacciones de dimerización por fotosensibilización molecular, diremos que algunas células se inactivan o sufren mutaciones bajo la acción de la luz visible y que - - podría por tanto pensarse en mecanismos como el descrito para explicar tales efectos.

Producción de roturas simples por sustitución con halogenoderivados

Más indirecto que el efecto estudiado anteriormente es el que se produce como consecuencia de la irradiación con luz U.V. de los ácidos nucleicos con análogos halogenados.

Efectivamente, los 5-halogenoderivados del uracilo se pueden - -

confundir estericamente por timina y consecuentemente incorporarse en el DNA en lugar de la timina. De igual forma si el fluoruracilo se combina con la ribosa puede ser incorporado al RNA en lugar del uracilo.

Si en estas condiciones se produce la absorción de un fotón U.V. por estas nuevas bases se produce inicialmente la pérdida del halógeno quedando un radical 5-uracilo. Este radical toma un hidrógeno de la posición 2 del azúcar más próximo, es decir, del siguiente nucleotido. Esta migración del hidrógeno está acompañada de la producción de una rotura simple y posterior separación de la base del azúcar que ha sido modificado.

Esta fotosensibilización por sustitución hace que los virus que contienen RNA sean más sensibles a la luz U.V. cuando parte de sus urácilos han sido sustituidos por 5-fluoruracilo, de idéntica forma las bacterias son del orden de dos veces más sensibles y las células de mamíferos cinco veces cuando han incorporado análogos halogenados de timina en su DNA.

Este aumento de la sensibilidad "in vivo" está también aumentado por la menor eficiencia de reparación, por los mecanismos enzimáticos conocidos, de este tipo de lesiones.

"In vitro" la irradiación de tales DNAs produce una degradación de tamaño molecular y un aumento de la producción de uniones cruzadas intercadena.

Unión fotoquímica, ácidos nucleicos - proteínas

"In vivo" los ácidos nucleicos están asociados a proteínas, por lo que en algún momento las bases pueden estar lo suficientemente cerca de los aminoácidos como para que se produzcan reacciones fotoquímicas entre ambos monómeros.

Los mecanismos químicos por los que sucede este tipo de reacción no son perfectamente conocidos por el momento. Sin embargo el aislamiento del fotoproducto 5-S-cisteína-6-hidrouracilo a partir de una mezcla de uracilo y cisteína irradiada nos proporciona uno posible para este fenómeno.

En experiencias in vitro se ha producido además de esta reacción la de cisteína con: poli-rU, poli-rC, poli-dC, y poli-dT además de con RNA y DNA. Ha sido identificado como fotoproducto la 5-S-cisteína-6-hidrotimina así como otros fotoproductos de la citosina. Al DNA se le pueden unir también

fotoquímicamente la tiroxina y la serina.

Al uracilo se le pueden unir fotoquímicamente cisteína, lisina, metionina, arginina, histidina, triptofano, fenilalanina y tiroxina. Los demás aminoácidos no se unen en las condiciones hasta ahora estudiadas.

"In vivo" este tipo de uniones se ha encontrado en virus de bacterias e incluso en células de mamíferos. Por ello es razonable pensar que la fotoquímica real entre materia viva y luz U.V. no sea exclusivamente la del DNA o de las proteínas por separado, sino que ésta interacción fotoquímica entre DNA y proteínas juegue un papel importante en la inactivación de las células irradiadas con luz U.V. bajo ciertas condiciones.

I.7.4.- Dependencia de las reacciones fotoquímicas con la conformación de los ácidos nucleicos.

Los fotoproductos inducidos por la radiación U.V. en los ácidos nucleicos muestran una gran dependencia con la conformación de estos. Esta dependencia es muy importante por cuanto implica la posibilidad de formación de una gran variedad de fotoproductos y reacciones. Reacciones con el agua, transferencia de energía con otros solutos, transferencias energéticas desde o a moléculas que se encuentran próximas o unidas a los ácidos nucleicos, además de poder afectar en mayor o menor grado a la formación de distintos dímeros de bases. En este último caso, no sólo la cantidad sino también el tipo de ellos está condicionado por la conformación de los ácidos nucleicos durante la irradiación.

Un ejemplo simple de ello es la dependencia con la conformación de la formación de hidratos de residuos de citosina en DNA por irradiación con luz U.V.. En efecto, el rendimiento de tales fotoproductos en DNA nativo es aproximadamente un orden de magnitud menor que en DNA desnaturado. Otro ejemplo es la producción de dímeros que contienen alguna timina en DNA irradiado "in vitro" a diferentes temperaturas. El rendimiento en DNA nativo es esencialmente independiente de la temperatura y cae bruscamente con la temperatura de fusión. El rendimiento de los dímeros en DNA desnaturado decrece invariablemente con la temperatura. Por otra parte en DNA nativo la mayor parte de los dímeros son de la forma cis-sin, mientras que en DNA desnaturado una apreciable parte de ellos son de la forma trans-sin. Este último tipo de dímero no es fotorreactivable por la enzima fotorreactivante.

Los cambios en la reactividad fotoquímica del DNA son profundamente dependientes de la humedad y consistentes con las diferentes reactividades de las diferentes formas A, B y DNA-desorganizado. A humedades bajas - hay una reducción en el rendimiento de la producción de dímeros de pirimidina en tanto que aparece un nuevo fotoproducto que parece idéntico al fotoproducto formado en las esporas y que tampoco es fotorreactivable. El cambio de fotorreactividad del DNA en función de la humedad tiene su analogía con la mutagénesis y muerte de levaduras a diferentes grados de humedad. Esto quiere decir que "in vivo" y a bajos grados de humedad se produce una alteración fotoquímica que no puede ser fotorreactivada y que por tanto no es un dímero de pirimidina del tipo ciclobutano.

Dependencias cualitativamente semejantes han sido observadas tanto en especies sensibles como resistentes a las radiaciones U.V. en levaduras, aunque los datos cuantitativos sugieren que la eficiencia de reparación en la oscuridad de los productos formados a bajo grado de humedad es menor - que la eficiencia de reparación de los dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano. Los cambios de sensibilidad entre bajos y altos grados de humedad, tienen lugar a valores que se corresponden con cambios de conformación del DNA como se comprueba por los cambios de absorción en películas delgadas - de DNA. Cuando E.coli se irradia en el vacío, su sensibilidad aumenta un orden de magnitud. Es de suponer que el resultado del vacío sea semejante al de la baja humedad (humedad relativa cero) ya que como en el caso de levaduras antes citado, las células de E.coli irradiadas en el vacío no son fotorreactivables. Semejantes conclusiones a las de levaduras se han obtenido en cuanto a la eficiencia de reparación en la oscuridad en E.coli irradiado en el vacío.

La naturaleza de los fotoproductos responsables de la alta sensibilidad no se conocen aún. Se especula con la idea de que pudieran ser fotoproductos del tipo de los encontrados en las esporas o uniones entre el DNA y las proteínas o uniones cruzadas en el DNA.. Sin embargo, es indicativo el hecho de que tanto las esporas como las células vegetativas de B. subtilis sean mucho más sensibles cuando se irradian en el vacío.

En el aire las reacciones fotoquímicas en el DNA de esporas y células son completamente diferentes. En las células vegetativas los fotoproductos que son observables en mayor proporción son los dímeros de pirimidina del tipo ciclobutano como los que se dan en el DNA en solución (forma B)

mientras que en los hidrolizados en ácido de los DNAs procedentes de esporas irradiadas no se presentan este tipo de dímeros. Además la resistencia de las esporas a las radiaciones U.V. en el aire hacen suponer que los fotoproductos formados en ellas (5-timinil-5, 6 dihidrotimina = SP) son sólo un orden de magnitud menos eficientes en la producción de efectos letales en las bacterias.

Por último, la irradiación a temperaturas por debajo de 0°C también afecta a la formación de fotoproductos en polinucleotidos. Tanto los dímeros de tipo ciclobutano como los fotoproductos del tipo de las esporas se producen a bajas temperaturas aunque el rendimiento de los dímeros del tipo ciclobutano decrece a medida que decrece la temperatura. La sensibilidad de los sistemas bacterianos y virásicos también aumenta al descender la temperatura, así la mayor parte de los organismos son más sensibles a -70°C. Los cambios en los fotoproductos responsables de este cambio de sensibilidad no se conocen aunque se tiene una correlación aproximada a bajas temperaturas entre uniones cruzadas DNA-Proteínas y muerte.

I.7.5.- Efectos producidos en la estructura secundaria por la presencia de los dímeros.

Hasta ahora hemos hablado exclusivamente de los efectos primarios, es decir, de los fotoproductos formados en los ácidos nucleicos por la radiación U.V.. Los dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano evidentemente tienen que afectar a la estructura macromolecular del DNA, en efecto, pensemos que la formación de un dímero lleva consigo la desaparición de los 35° de giro de una molécula de pirimidina respecto de la otra. ¿Cómo afecta esto a las propiedades macromoleculares del DNA?. Es decir a las propiedades ópticas, hidrodinámicas, de estabilidad a la temperatura etc...

Diversos trabajos han pretendido responder a estas cuestiones aunque los resultados han sido ciertamente contradictorios. Así por irradiación de soluciones acuosas de DNA a 254 nm varios autores han coincidido en encontrar un descenso de la viscosidad de la solución (Moroson and Alexander, 1960) y en el radio giro de las moléculas (Moroson and Alexander, 1961, 1960) e interpretan estas variaciones como una mayor flexibilidad del DNA como consecuencia de los dímeros porque afirman que no sucede ningún descenso del peso molecular de la preparación a no ser a muy altas dosis. Zieremberg et al. encuentran estos mismos resultados de variación de viscosidad y radio de giro

pero al evaluar el número de roturas simples y dobles de la preparación lo interpretan como un descenso del peso molecular no encontrando por ello ese cambio de flexibilidad. Bagchi et al. (1960) han descrito sin embargo este efecto encontrando incluso un aumento previo del coeficiente de sedimentación a dosis bajas para observar después un descenso paulatino de éste con la dosis. Pero reconocen haber observado la producción de roturas dobles - medidas en microscopía electrónica. La conclusión de estos autores es que solamente a dosis bajas, cuando aún el peso molecular de la muestra es alto, se puede apreciar el cambio conformacional producido por la aparición de - los dímeros (aumento del coeficiente sedimentación) efecto que deja de observarse debido a la aparición creciente de roturas simples donde el cambio - de conformación es más difícil de observar. Otros autores han apreciado de gradaciones del DNA similares cuantitativamente (Cremonese, 1968).

En resumen, se postula un cambio conformacional producido por la - presencia de dímeros en el DNA medido por cambios en el tamaño del DNA por procedimientos hidrodinámicos y ópticos. Además de los 3 grupos de autores citados, al menos 2 de ellos reconocen detectar la presencia de roturas - simples y por tanto a partir de ciertas dosis, dobles, durante la irradiación.

En lo que sí parecen estar de acuerdo todos los autores, es en la rotura de, al menos, los enlaces de hidrógeno implicados en las bases que - forman los dímeros y sus complementarias. Y es especialmente esta alteración estructural lo que está en la base del buscado cambio conformacional.

Diversos autores han comunicado también el descenso de la temperatura media de transición del DNA con dímeros de pirimidina (Setlow et al. 1936...), incluso Beretetskaya et al. (1970) han demostrado cómo el aumento de la anchura de la desnaturación de DNAs rotos por fuerzas de cizalla como consecuencia de la desaparición del apareamiento en los terminales de cadena, es indistinguible del ensanchamiento producido por la presencia de los dímeros.

Kelly et al. (1969) postularon que la rotura de enlaces de hidrógeno afectaba además de a las bases implicadas en el dímero y sus complementarias a un par de bases a cada lado del dímero. En 1971 Hayes et al. aunque utilizando DNAs sintéticos de pequeño tamaño formados únicamente por dA y dT han logrado realizar una evaluación, por estudios de T_m , de la región afectada

da por la presencia de un dímero y encuentran que además de las bases implicadas en el dímero sólo los dos pares de bases adyacentes pierden también sus enlaces de hidrógeno.

Sin embargo el proceso de dimerización en un DNA es más complejo, por métodos de estudio cinético con formaldehído en DNA irradiado con U.V. Shafranovskaya et al. (1973) han medido el número de zonas desnaturadas no habiendo encontrado el mismo número de éstas que de dímeros de pirimidina, sino que se forman zonas ricas en dímeros en los que existen aproximadamente 5, valor este superior al supuesto por Kelly y al medido por Hayes - en DNAs sintéticos.

No ha aparecido hasta la fecha ningún trabajo exhaustivo de relación entre cantidad de dímeros y variación de la temperatura media de transición, anchura de la transición, etc...

El descenso del efecto hipercrómico en función de la dosis ha sido siempre interpretado como consecuencia del menor coeficiente de absorción molar del dímero de pirimidina respecto de sus monómeros. Este hecho, ha sido aprovechado por Setlow and Carrier (1963) para el estudio cinético del acúmulo de dímeros en DNA por medidas ópticas a 270 nm. En los últimos 5 años con la incorporación de las técnicas de dicroísmo circular y dispersión rotatoria óptica a los estudios conformacionales de ácidos nucleicos se están empezando a obtener los primeros resultados en DNAs irradiados con luz U.V. (McClaren, 1972; Lang and Lunk, 1973). En estos estudios parece confirmarse los resultados de Bagchi et al. (1969) ya comentados, en el sentido de que en los espectros de dicroísmo circular de DNA irradiado, se observa un aumento del máximo positivo a 275 nm a bajas dosis, para descender después con el aumento de la dosis. Los valores de dosis para el máximo cambio a 275 nm - coinciden con los de Bagchi et al. En estos espectros aparece también la presencia de un nuevo efecto Cotton negativo alrededor de 320 nm, que aumenta continuamente con la dosis. En resumen Lang y Lunk concluyen que en las regiones fotoquímicamente modificadas del DNA debe existir una conformación del tipo C. En definitiva, proponen el paso de la forma B del DNA por una estructura superhélice a bajas dosis para terminar en DNA en conformación tipo C. - Opinan, que estas regiones con conformación C pudieran estar en la base del reconocimiento específico de las enzimas de reparación.

Apéndice I

- Los genes u.v.r. codifican la información necesaria para las funciones responsables del reconocimiento de los dímeros de pirimidina. El gen u.v.r.A determina una Endonucleasa, la U.V.-Endonucleasa, responsable de la primera etapa de la escisión de dímeros de pirimidina; su localización en el mapa genético del cromosoma de E.coli es la posición 81. El gen u.v.r.B determina, otra subunidad, de la misma endonucleasa determinada por el gen u.v.r.A y su localización en el mapa genético del cromosoma de E.coli es la 18.

El producto del gen u.v.r.C determina una proteína que interacciona con el sistema ligasico, impidiendo la inmediata restauración de la continuidad covalente de las roturas simples producidas junto a los dímeros por la U.V.-Endonucleasa, antes de la liberación de los dímeros por la actividad exonucleasica subsecuente.

Las estirpes celulares de E.coli que son u.v.r.⁺ presentan niveles normales de estas actividades, mostrando por tanto una sensibilidad a la radiación U.V. como las estirpes salvajes, y unos niveles de degradación de DNA tras la irradiación también normales. Las estirpes u.v.r.⁻ son entre sí fenotípicamente similares en cuanto que no pueden escindir los dímeros de pirimidina del DNA, sin embargo las estirpes u.v.r.B y u.v.r.C son menos sensibles que los u.v.r.A. En todos estos mutantes los niveles de degradación del DNA tras irradiación U.V. son mucho más pequeños.

- Los genes pol A pol B y pol C, son genes estructurales de las tres DNA-Polimerasas conocidas en E.coli (DNA-Polimerasa, I, II y III respectivamente). Están localizados en las posiciones 76, 2 y 4, respectivamente del mapa genético del cromosoma de E.coli. El mutante polA-1 no posee su actividad polimerizante y es muy sensible a la radiación U.V.. Aunque apenas tiene afectada su capacidad para la escisión de los dímeros de pirimidina (probablemente porque la DNA-Polimerasa producida en estos mutantes conserva su actividad exonucleasa 5'→3') el DNA tras irradiación U.V. se degrada extraordinariamente produciendo un alargamiento incontrolado de los huecos. La polimerización de estos huecos se puede llevar a cabo por el producto del gen polC es decir por la DNA-Polimerasa III, y su eficacia es tal que la sensibilidad al U.V. en las estirpes u.v.r. y en los dobles mutantes u.v.r. polA 1 es semejante. La DNA-Polimerasa II no parece jugar ningún papel en los procesos de reparación por escisión y resíntesis.

- El gen recA controla la producción de un inhibidor de la Endonucleasa VII producida por el gen recBC. El producto del gen recA es necesario para la recombinación, aunque pudiera estar también implicado en otros procesos como la reparación de los dímeros de pirimidina a través de la producción y reparación de los grandes huecos producidos por la presencia de los dímeros, mecanismo en el que por supuesto estaría también implicado el producto de los genes recB y C, es decir, la Endonucleasa VII. La localización en el mapa genético del cromosoma de E.coli del gen recA es la posición 51, siendo la 54 para los recB y recC.

Los mutantes recA son más sensibles a la radiación U.V. que los recB y recC. La escisión de dímeros ocurre normalmente en todos ellos aunque sólo alcanza el 75% del valor normal en el caso de los recA⁻. La diferencia fenotípica fundamental entre todos estos mutantes está en que aunque todos ellos tienen muy disminuida su capacidad de recombinación, los mutantes recA no la poseen en absoluto. Los mutantes recA además degradan rápidamente su DNA tras irradiación U.V.

- Los mutantes en el gen LexA, que ocupa la posición 81 del mapa genético del cromosoma de E.coli, son dominantes y presentan como los mutantes recA una gran sensibilidad a la radiación U.V., pero y al contrario que los recA no tienen apenas disminuida su capacidad recombinante. Como el gen recA el gen Lex está implicado en la regulación de la nucleasa producida por el gen recBC.

CAPITULO IIMATERIALES Y METODOS

En cualquier experimentación de laboratorio en Biología, tan importante como disponer de buenas técnicas y equipos instrumentales es el disponer de unos materiales biológicos de partida en calidad y cantidad acorde con la experimentación que se desea realizar.

La puesta en rutina de los métodos de aislamiento y purificación así como los de caracterización de los materiales en estudio es sólo eficaz si va acompañada del inconformismo que obliga a un intento constante de revisión y mejora. Esta labor, a menudo ingrata, es la que de manera práctica da la pauta de las posibilidades reales de un laboratorio.

El conocimiento exacto de la calidad de nuestro material es indispensable a la hora de exigirle un comportamiento idóneo en las experiencias que planeamos, otra cosa sólo conduciría al error en la interpretación de los resultados obtenidos.

Es por todo esto que si bien se han apartado en forma de apéndices las recetas exactas de los métodos utilizados, se haga hincapié razonadamente en este capítulo de las particularidades esenciales de los materiales y métodos utilizados para llevar a la práctica este trabajo.

II.1.- Producción de materiales biológicos de partida.

II.1.1.- Cultivo continuo de E.coli. (MONOD, J; 1950) (HERBERT, D. et al. 1956) (ELSWORTH, R. et al.; 1968)

En el sistema de cultivo continuo de crecimiento de E.coli se utilizó un medio de crecimiento definido con todos los substratos en exceso incluido el O_2 a excepción de la única fuente de carbono, la glicerina, que se utilizó como substrato limitante. (Ver Apéndice-II-1-1 para la composición completa del medio).

La ecuación que define el comportamiento de un cultivo continuo en estado estacionario, en lo que a producción se refiere, es la que liga la

cantidad de organismos producidos y la cantidad de substrato limitante utilizado mediante un factor de rendimiento:

$$dx / dt = -y ds / dt \quad \begin{array}{l} x = \text{peso de células.} \\ s = \text{peso de substrato} \\ y = \text{constante de rendimiento.} \end{array}$$

En realidad podemos poner:

$$\text{Peso de bacterias formado} / \text{Peso de substrato utilizado} = y$$

En la determinación de las condiciones de cultivo en continuo - debe conocerse la concentración de las células en el cultivo en régimen estacionario en función de la velocidad de flujo y también la velocidad de dilución a la que la producción de células es máxima.

La concentración de células en función de la velocidad de flujo viene dada por la ecuación:

$$\bar{x} = y(S_R - K_S \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right)) \quad \text{donde:}$$

\bar{x} = Concentración de bacterias en estado estacionario de crecimiento.

S_R = Concentración del substrato limitante en el medio suplementado.

K_S = Coeficiente de saturación del substrato. = Concentración del substrato cuando la velocidad específica del crecimiento (μ) es la mitad de su valor máximo (μ_m).

D = Velocidad de dilución = f/v ; donde f es el flujo y v es la capacidad del vaso de cultivo.

La velocidad de dilución (DM) a la que la salida de células es máxima viene dada por:

$$DM = \mu_m \left(1 - \left(\frac{K_S}{K_S + S_R} \right)^{1/2} \right)$$

El medio de cultivo utilizado tiene como substrato limitante la glicerina, a una concentración de 8 g/l ($S_R = 8$ g/l) y todos los demás - componentes en exceso. En un medio como este y en nuestra instalación se consigue un valor máximo de μ_m trabajando entre 600 y 700 r.p.m. de agitación y a 16 l/h de aireación. (Ver Fig-II-1.), el tiempo de duplicación equivalente para esta velocidad de crecimiento es de 50 min. Utilizando - como valor de K_S 0,0124 g/l y de rendimiento $y = 0,5$, (Herberdt, D. et al. 1956; Elsworth, R. et al. 1968) y sustituyendo en la ecuación que nos da

DO 450mm	Agitacion	Aireacion
—□—	175 r p m	8 l / m
—△—	400 "	4 "
—○—	400 "	16 "
—x—	600 "	16 "
—●—	750 "	16 "

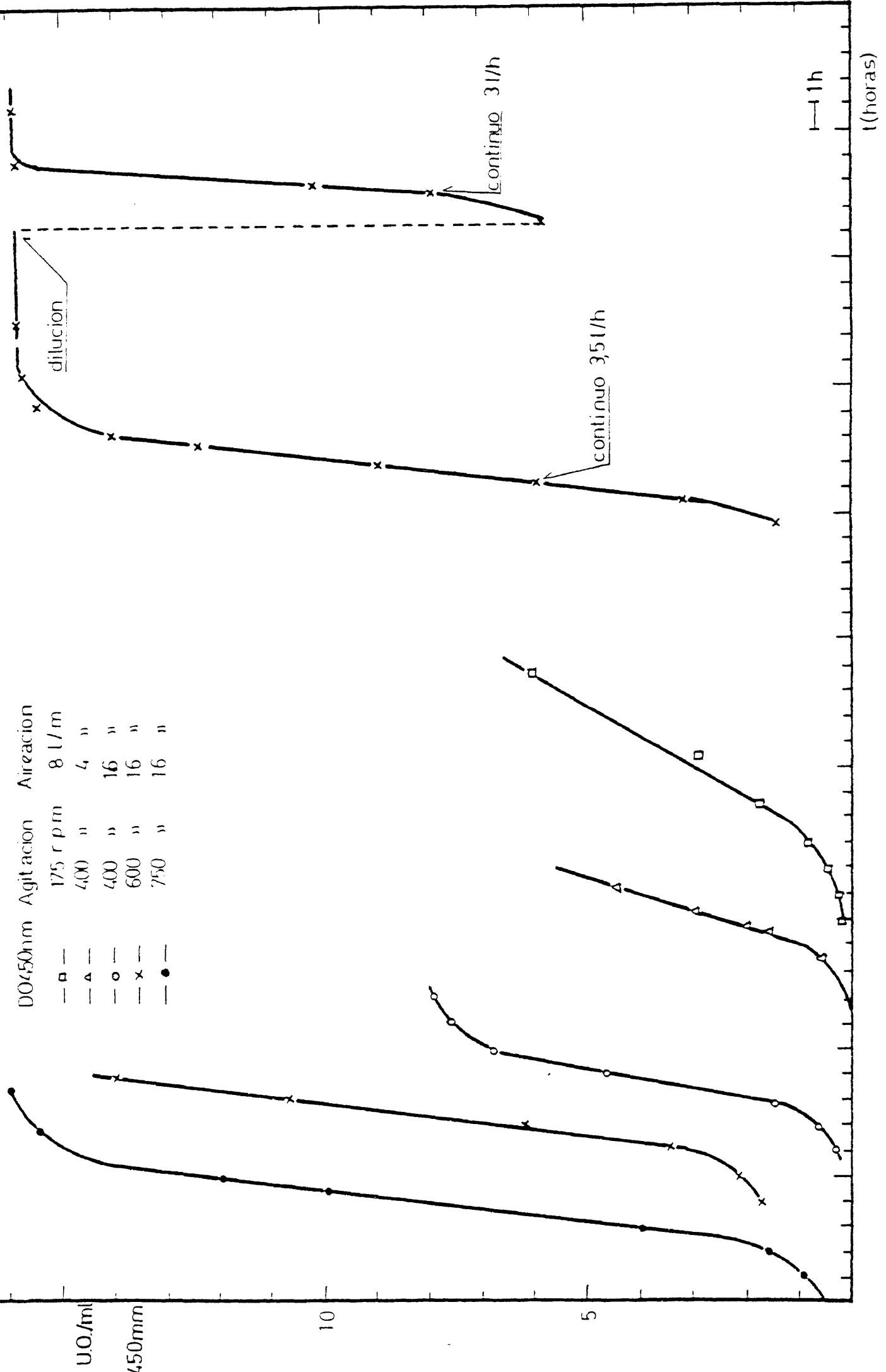
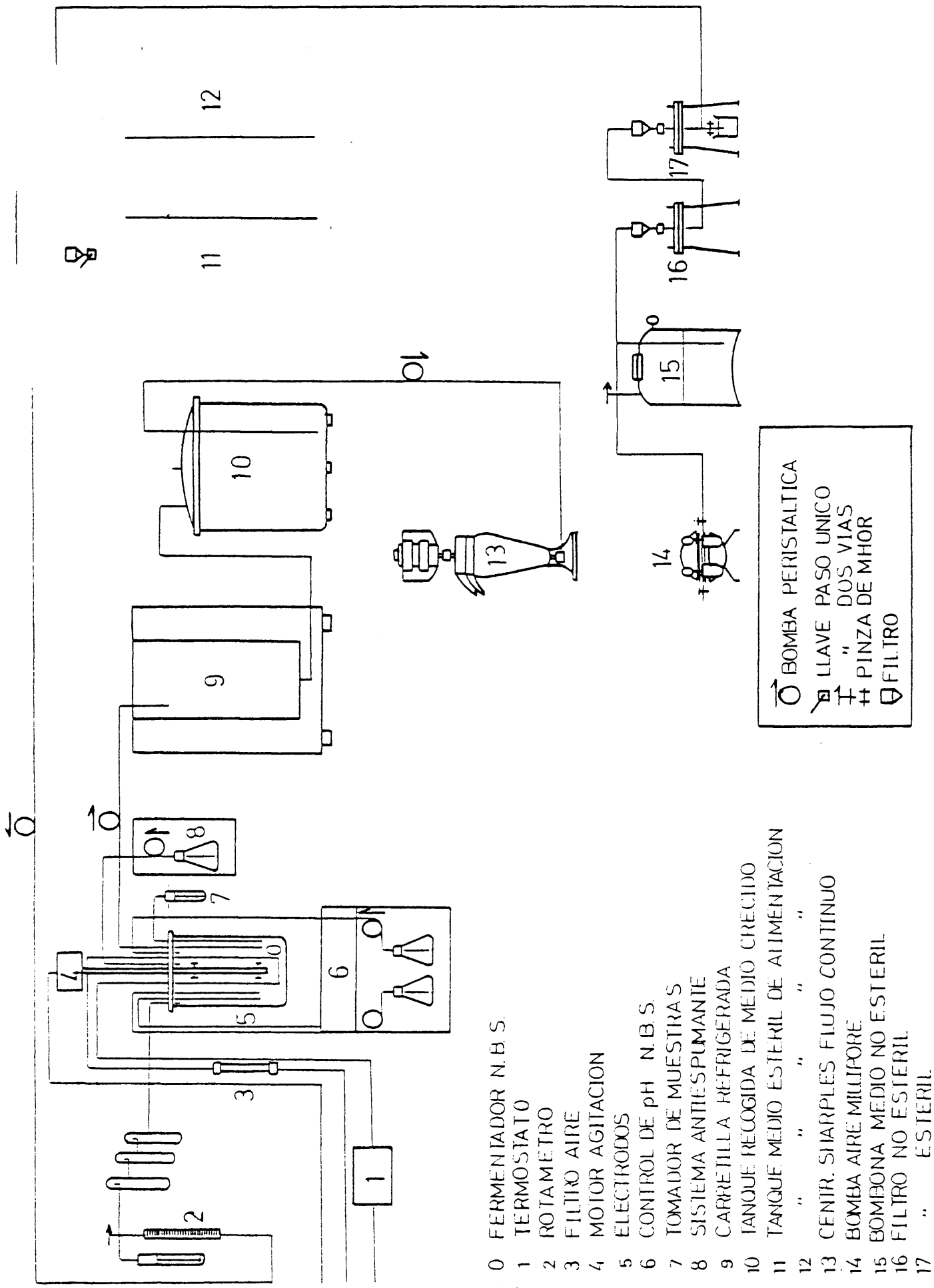


FIG. II-1.- CONDICIONES DE AGITACION Y AIREACION PARA OBTENER UNA μ_m MAXIMA



- 0 FERMENTADOR N.B.S.
- 1 TERMOSTATO
- 2 ROTAMETRO
- 3 FILTRO AIRE
- 4 MOTOR AGITACION
- 5 ELECTRODOS
- 6 CONTROL DE pH N.B.S.
- 7 TOMADOR DE MUESTRAS
- 8 SISTEMA ANTIESPUMANTE
- 9 CARRETILLA REFRIGERADA
- 10 TANQUE RECOGIDA DE MEDIO CRECIDO
- 11 TANQUE MEDIO ESTERIL DE ALIMENTACION
- 12 " " "
- 13 CENTR. SHARPLES FLUJO CONTINUO
- 14 BOMBA AIRE MILLIPORE
- 15 BOMBONA MEDIO NO ESTERIL
- 16 FILTRO NO ESTERIL
- 17 " ESTERIL

- ⊖ BOMBA PERISTALTICA
- ⊘ LLAVE PASO UNICO
- ⊚ " DOS VIAS
- ⊚ PINZA DE MHOR
- ⊚ FILTRO

FIG. II-2.- ESQUEMA DE INSTALACION DE CULTIVO CONTINUO

\bar{x} en función de D para valores conocidos de S_R , K_s y μ_m , se obtiene que se puede trabajar con valores de D entre 0,2 y 0,75 h^{-1} ; es decir entre 2 y 7,5 litros por hora de flujo, para que se mantenga aproximadamente constante $\bar{x} = 3,9$ g/l. Valores superiores de D disminuyen la producción de células hasta un valor de la dilución crítico de 0,794 h^{-1} en el que $\bar{x} = 0$. En orden a una máxima producción habría que trabajar a una velocidad de dilución de 0,71 h^{-1} .

En la práctica normal del laboratorio sin embargo, no se utilizó un valor de flujo de 7,5 l/h, ni siquiera la DM equivalente a 7,1 l/h por problemas en la capacidad del procesado (Almacenamiento y centrifugación). Incluso a veces, y de acuerdo con la teoría del cultivo continuo se paró este durante los fines de semana para, tras el vaciado del vaso, a excepción de una pequeña parte utilizada como inóculo, llenar de nuevo con medio fresco y comenzar el crecimiento. Al poco tiempo se pasa a régimen de cultivo continuo. Esta operación permite comprobar la velocidad específica de crecimiento del cultivo, máxima garantía de que el proceso permanece correcto. (Ver Fig-II-1).

El cultivo se mantuvo intermitentemente en continuo con paradas obligatorias por necesidad de limpieza de la instalación o de esterilización debido a la presencia de algún contaminante. En el mejor de los casos se mantuvo durante 10 días ininterrumpidos a un flujo medio de 3 l/h y a una densidad óptica de bacterias a 450 nm. de 14 a 16 Unidades Ópticas lo que rinde del orden de 15 g. de pasta húmeda de células por litro.

El medio de cultivo crecido se recoge en recipiente refrigerado a 4°C del que pasa a un tanque de almacenamiento de 100 litros de capacidad. La centrifugación de las células se realizó en una centrifuga Sharples de flujo continuo y se almacena después a -30°C.

La esterilización de la instalación se realiza con formaldehído al 16% que se recicla por ella. El formaldehído se retira con vapor fluyente a 100°C desde autoclave, manteniéndolo fluyendo después 3 horas en cada tanque de medio fresco (100 l. de capacidad cada uno) y en el fermentador y conducciones. Esta última operación se realiza tres veces. La esterilización del medio se realiza por ultrafiltración.

La regulación del pH temperatura y nivel de espuma se hace automá

ticamente. Dado que el E.coli B acidifica el medio de cultivo se utilizó hidróxido amónico para su neutralización. La espuma se rompió con silicona antiespumante. El esquema de la instalación aparece en la Fig-II-2.

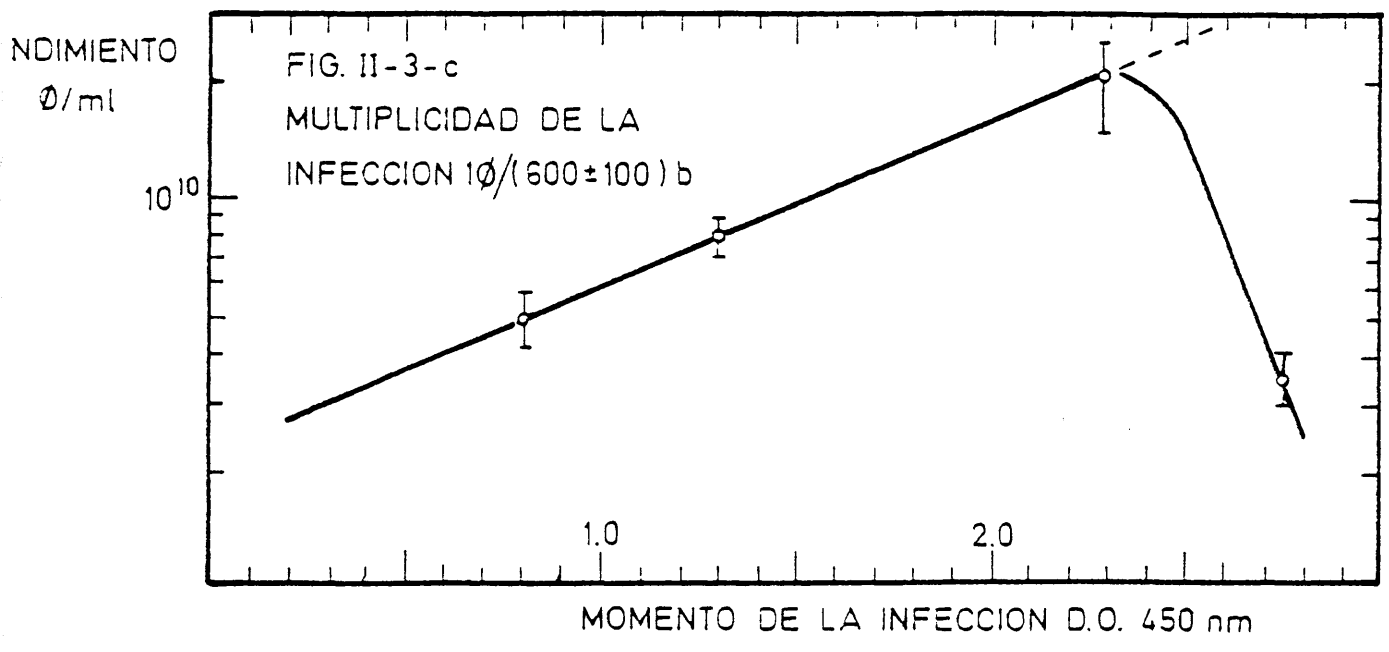
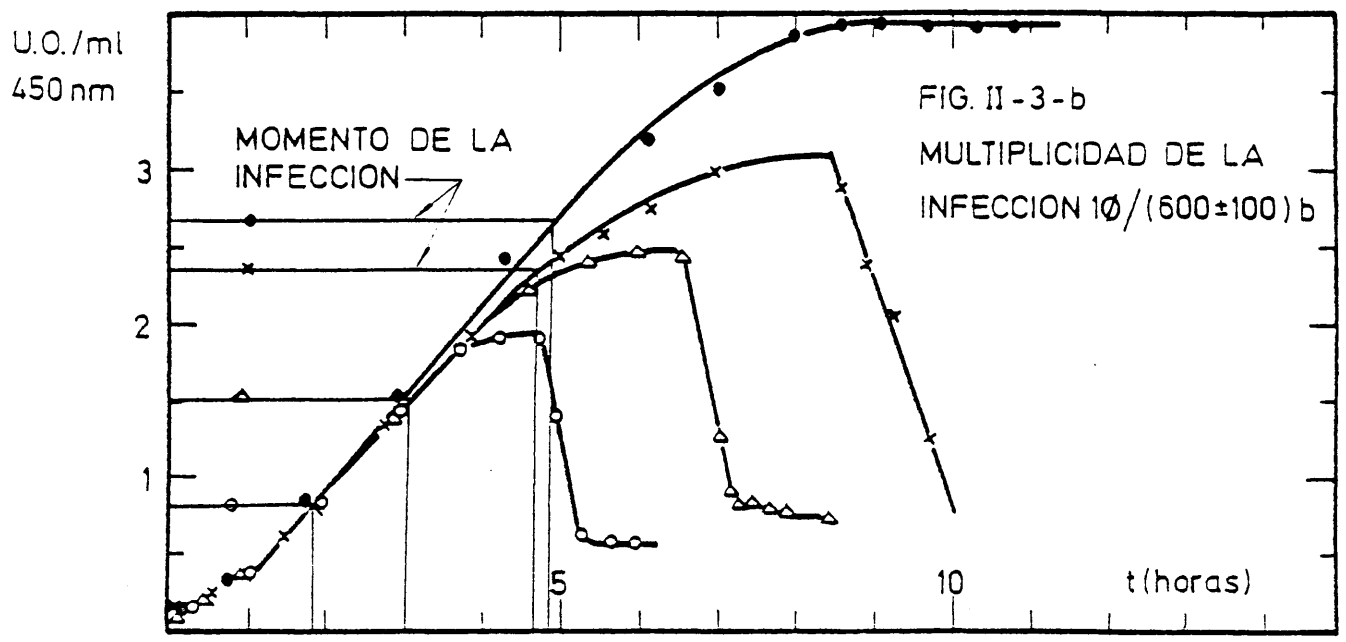
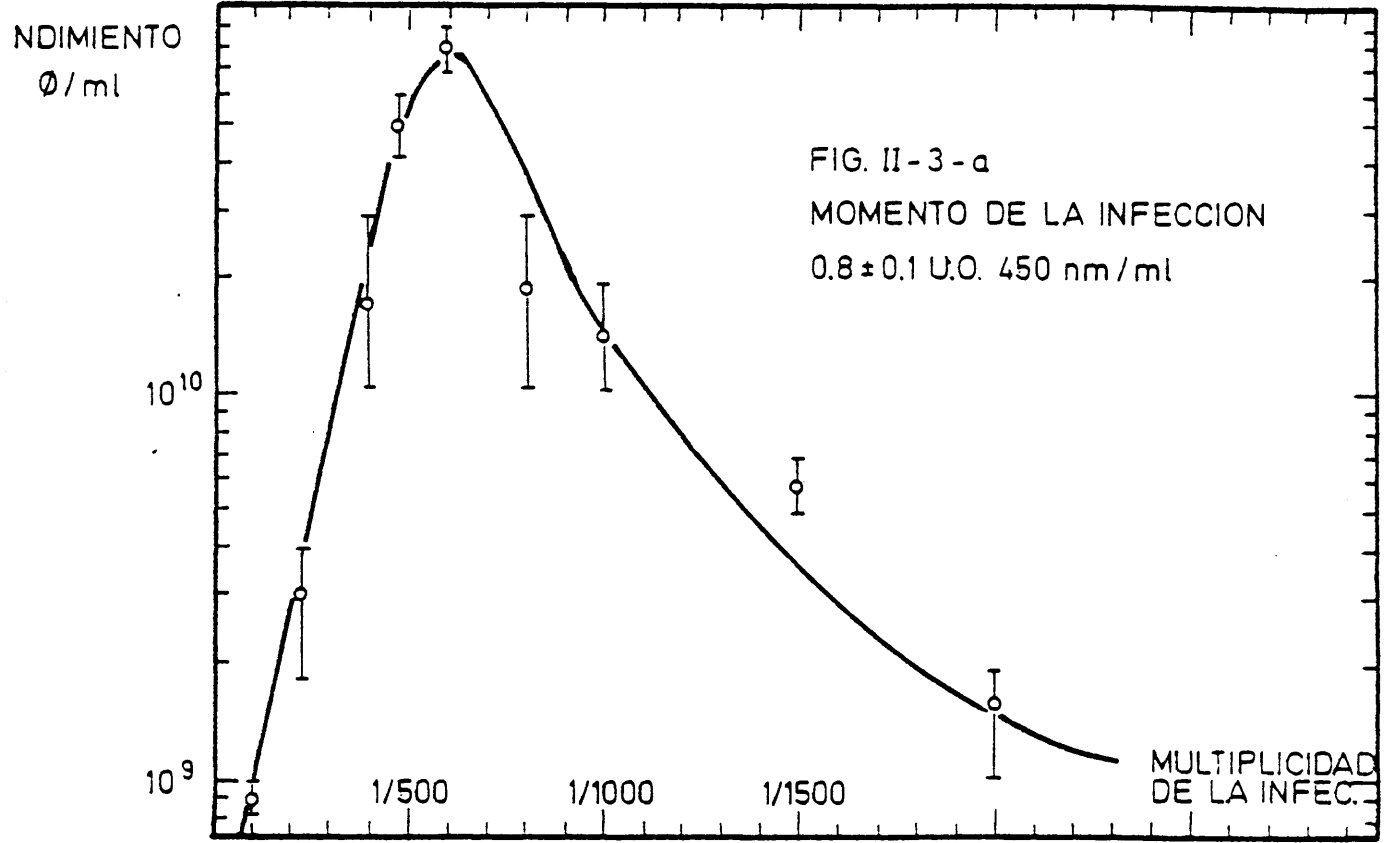
II-1-2.- Cultivo discontinuo de: B.subtilis, B.cereus, y M.lisodeikticus

Micrococcus lisodeicticus se cultivó en fermentador de 10 litros de capacidad con regulación de temperatura a 37°C, aireación a 8 litros/minuto y agitación mecánica centrífuga a 200 rpm. El medio de cultivo es un medio rico como ya es habitual en el crecimiento de esta bacteria que presenta un tiempo de generación muy largo y que en medios definidos plantea problemas de crecimiento. El inóculo de 1 litro de medio se crece durante la noche y antes de inocular se observa al microscopio para detectar la presencia de algún contaminante si lo hubiera. Tras la inoculación del cultivo, se deja crecer durante 24 horas y antes de proceder a su centrifugación se comprueba de nuevo microscópicamente. La recogida de las células se realiza centrifugando en centrifuga de flujo continuo SHARPLES. El rendimiento medio fue de 104,2 g de pasta húmeda de células por cada 10 litros de cultivo compuesto por 58,44 g de NaCl, 100 g de triptona, 100 g de extracto de levaduras y agua hasta 10 litros. El pH se ajusta a 7,4.

B. subtilis y *B. cereus* se crecen en un medio definido con glicerina y glucosa como fuente de carbono y ácido casamínico como aporte peptidico. Ambos también en fermentador de 10 litros con agitación y aireación a 200 rpm y 8 litros/minuto respectivamente. Del orden de 60 g de células por fermentador ha sido la media obtenida en estas condiciones. Ver Apéndice II-1-2.

II-1-3.- Producción a gran escala de fagos: T₂, λ y SPP-1. (THOMAS C.A. et al. 1966).

La producción de fagos a gran escala requiere la búsqueda de las condiciones de lisis de mayor rendimiento. En definitiva son la cantidad de fagos por bacteria utilizados en la infección y el momento en que hacemos ésta, lo que de manera práctica ha de ajustarse. Sin embargo ambas condiciones no son sino la expresión de dos constantes del cultivo, nos referimos a la velocidad de crecimiento de las células en las condiciones de cultivo y la velocidad de producción de fagos, que viene determinada por el tiempo entre



infección y lisis de una célula y el número de fagos producidos por cada lisis celular. Ya que el tiempo de lisis de una bacteria es mucho menor que el de su duplicación, pero sobre todo debido a que el número de fagos producidos por cada lisis es de algunas decenas, incluso centenas, a la larga se produce una lisis total del cultivo.

Si el número de fagos por bacteria utilizados en la infección y el momento en que sucede ésta son tales que algunas bacterias llegan a la fase estacionaria de crecimiento, situación en la que ya no son lisadas por los fagos producidos, tendremos una lisis parcial y el rendimiento será bajo además de tener una concentración de células no lisadas que nos empeoraran el rendimiento de la purificación posterior.

Si ambas condiciones son tales que la lisis se produce tan rápidamente que el cultivo apenas crece, la lisis será total pero de un número reducido de células. En las condiciones óptimas se consigue mantener el crecimiento hasta que antes de entrar en fase estacionaria lisa completamente y por tanto se produce un rendimiento máximo con la mínima contaminación de células no lisadas.

En la Fig-II-3. se presenta un ejemplo típico de búsqueda de condiciones de lisis. En la Fig-II-3-a se presentan los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento de fagos λ_{vir} en E.coli en función de la multiplicidad de la infección cuando se infecta el cultivo bacteriano a 0,8 U.O. (a 450 nm) y como se observa se obtiene un máximo de rendimiento para multiplicidades de infección de 1 fago por cada 600 bacterias aproximadamente. Este estudio se realizó en pequeños matraces de 50 ml de capacidad. A partir de este dato en la Fig-II-3-b-c aparece el estudio del momento de la infección de máximo rendimiento en fermentadores de 10 litros de capacidad.

Actualmente la producción de fagos λ se hace a partir de fagos λ clear que infectan a E.coli, lo que produce rendimientos del orden de 10^{11} fagos/ml. creciendo en un medio rico que contiene además Mg^{2+} necesario para que tenga lugar la infección. La purificación se realiza mediante tres ciclos de centrifugación diferencial, tras una precipitación previa con polietilenglicol - 6000 y NaCl cuando se parte de 10 litros de lisado. Finalmente se realiza un gradiente de CsCl preparativo. Los fagos flotan a una densidad de CsCl a la que corresponde un índice de refracción a 25 °C de 1,379 a 1,380. Cuando se parte

de lisados de un litro la purificación se realiza como la descrita más adelante para el fago SPP-1. (RIVA, S. et al.; 1968). El fago T₂ se produce infectando E.coli B que crece en un medio definido suplementado con Mg²⁺. La purificación se realiza por precipitación selectiva a pH ácido y posteriores centrifugaciones diferenciales. Finalmente se realiza un gradiente preparativo en CsCl, los fagos se concentran en una banda a un índice de refracción de 1,381. (HARRIOT, R.M. et al.; 1952).

Los fagos SPP-1 se producen infectando B.subtilis que crece en un medio rico suplementado con Mg²⁺ y Mn²⁺. La purificación se realiza mediante una centrifugación diferencial seguida de un gradiente preformado de CsCl. (CZEKALA, A. et al.; 1972).

En todos ellos el CsCl se retira por dialisis frente a SSC (0,15M NaCl 0,015 citrato sódico) y se guardan a 4°C en esta solución ajustada a 0,02% NaN₃. En estas condiciones se pueden conservar durante meses sin apenas pérdida de viabilidad. Las condiciones exactas de producción y purificación aparecen en el Apéndice-II-1-3.

Los contajes de los fagos se realizaron por el método de Gratia o modificaciones de el (ADAMS, M.H.; 1959). Consiste en esencia en la producción de un cesped uniforme de bacterias en una placa donde se extienden diluciones de la solución de fagos que se desea contar, en las diluciones apropiadas aparece una placa de lisis por cada fago estendido. Ver Apéndice-II-1-4.

APENDICES DEL APARTADO II-1

Apéndice II-1-1.- Composición de los medios de cultivo continuo.

Minerales:

MgCl ₂	1,23	mM.
H ₃ BO ₃	0,005	mM.
Na ₂ MoO ₄	0,001	mM.
HCL	2,5	mM.
FeSO ₄	0,01	mM.
KH ₂ PO ₄	3,3	mM.
K ₂ SO ₄	5,0	mM.
Citrato Trisodico	5,0	mM.

Tampon:

Fosfato potasico pH=6,9 50,0 mM.

Fuente de Nitrógeno:

(NH₄)₂SO₄ 17,5 mM.

Fuente de carbono: (1)

Glicerina 8 g/l

(1) La glicerina constituyó el substrato limitante.

Añadir después amoniaco en forma de NH_4Cl hasta una concentración de 5 mM. para dejar el pH entre 6,7 y 6,9.

Apéndice II-1-2.- Composición de los medios de cultivo de B.subtilis B.cereus y M.lisodeickticus

<u>Compuestos</u>	<u>M. lisodeick</u>	<u>B. subtilis</u>	<u>B. cereus</u>
Triptona	10 g/l		
Extr. de lev.	10 g/l		
NaCl	5,8 g/l	5,0 g/l	5,0 g/l
KCl	---	1,5 g/l	1,5 g/l
NH_4Cl	---	0,25g/l	0,25g/l
Na_2SO_4	---	50 mg/l	50 mg/l
MgCl_2	---	100 mg/l	100 mg/l
CaCl_2	---	2 mg/l	2 mg/l
FeCl_3	---	1,5 mg/l	1,5 mg/l
Na_2HPO_4	---	6,1 g/l	6,1 g/l
NaH_2PO_4	---	3,0 g/l	3,0 g/l
Glicerina 98%	---	1,5 ml/l	1,5 ml/l
Glucosa	---	5 g/l	5 g/l
Acido casaminico	---	10 g/l	10 g/l
pH	7,4	7,1	7,1

Apéndice II-1-3.- Condiciones de lisis y purificación de fagos clear SPP1 y T 2

E. coli C 600 se hace crecer en medio rico compuesto por 25 g. de peptona, 5 g. de NaCl y 2,5 g. de MgSO_4 por litro, se infecta con clear purificado. La infección del cultivo se realizó cuando el cultivo alcanzó 2 UO. Las condiciones de aireación y agitación fueron 81/min. y 200 rpm en fermentador de 10 l. a 37°C. Cuando la lisis comienza se añadieron 5 ml de sílicona-antiespumante. El crecimiento y la lisis fue seguido por turbidimetría a 450 nm en un Spectronic.

La purificación de los fagos se realiza por centrifugación diferencial aunque dado el volumen tan grande de 10 litros se procede previamente a la concentración de estos por medio de una precipitación con 24,2g de NaCl y 120 g. de PEG/litro.

Cuando la precipitación se realiza directamente sobre el lisado se pierden prácticamente todos los fagos, no así cuando el lisado se centrifuga previamente en Sharples para retirar rastros celulares en cuyo caso se obtiene, tras la precipitación, el 90% de los fagos.

Tras la resuspensión en 200 ml de Tris-gelatina-cloruro sódico - (4,3 ml de NaCl 4M, 10,0 ml de gelatina al 1% y 10,0 ml de TRIS-HCl 1 M pH= 7,4 por cada litro de solución) se realizan 3 centrifugaciones diferenciales consistentes cada una de ellas en 2 a 10.000 rpm durante 10 min. y una a 28.000 rpm 90 min. El sedimento final se resuspende de nuevo y la operación se repite. El último sedimento se resuspende en 25 ml de SSC y se le realizan dos centrifugaciones más a 10.000 rpm durante 10 minutos.

Cuando se pretende una mayor purificación de los fagos se realiza una sedimentación en cloruro de cesio ajustando la solución a 1,381 de índice de refracción y rodando 23 horas a 28.000 rpm. Una banda intensamente

azul aparece entre 1.379 y 1.380 de índice de refracción en el gradiente. El cloruro de cesio se retira por diálisis frente a un volumen 500 veces superior de SSC con tres cambios.

En matraz de 2.000 ml que contiene 1000 ml de medio rico cuya composición es: 10 g de triptona, 5 g de cloruro sódico, 5 g de extracto de levadura, en 1000 ml de H₂O destilada. El pH se ajusta a 7,3 con NaOH 1 M. Tras la esterilización se le añade 1 ml de M_nSO₄ 0,1 M y 10 ml de MgSO₄ 1,0 M. Se inocula con B.subtilis Mcl. La incubación se realiza en estufa 37°C con agitación a 250 rpm. Cuando el cultivo alcanza 0.8 UO a 500 nm se infecta con fagos SPP 1 a una multiplicidad de 1 fago cada 20 bacterias. La lisis se completa durante la noche. La purificación se realiza por centrifugación del lisado a 13.000 x g 35 minutos para retirar bacterias y rastros celulares. El sobrenadante se centrifuga a 30.000 xg 3 horas. El sedimento se recoge en 30 ml de MgCl₂ 0,01 M y se incuba con RNasa pancreática 50 microgramos/ml y DNasa 1 microgramo/ml 30 min. a 37°C. La reacción se para al añadir 3 ml de EDTA 0,1 M.

Tras concentración a 6 ml en evaporatubos se preforma un gradiente de cloruro de cesio con 5 ml de solución al 50% sobre la que se pone 10 ml de solución al 33% y sobre esta, los fagos.

El gradiente se centrifuga 3 horas a 35.000 x g en Spinco L-2 y después se recogen dos bandas de fagos que se dializan frente a un volumen 500 veces superior de SSC con tres cambios.

Para la obtención del fago T₂ se inoculan 9,5 litros de medio de cultivo (NaH₂PO₄ 10 mM, NaHPO₄ 20 mM, NH₄Cl 20 mM, KCl 6,7 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂SO₄ 2 mM y glucosa 16 mM.) con 0,5 litros de inoculo de E.coli B⁻ (CECT 101) creciendo durante la noche. Cuando la densidad óptica a 450 nm del cultivo ha llegado a 0,8 UO/ml, se infecta con T₂ a una multiplicidad de un fago cada 10 bacterias. Se mantiene el crecimiento a 37°C y 200 r.p.m. de agitación y 8 l/min de aireación durante 12 horas transcurridas las cuales el cultivo ha lisado hasta quedar a aproximadamente 0,3 UO/ml a 450 nm. Las células que quedan se retiran por filtración selectiva a través de varios filtros de poros entre 3 y 0,4 μm. El filtrado se precipita ajustando el pH entre 3,9 y 4,0 con ClH 1 N. El precipitado que contiene los fagos se resuspende en 200 ml de 0,14 M NaCl y se lleva lentamente hasta pH 6,5 con NaHCO₃ 1 M. A continuación se incuba con DNasa a una concentración de 1 μg/ml previa adición de 2 ml de SO₄Mg.

Tras la incubación la purificación de los fagos se realiza por centrifugación diferencial: 30 min a 2.400 xg, el sobrenadante 30 min a 5000xg, el sobrenadante a 11.000 xg, el sedimento así obtenido se resuspende y se repite la operación de centrifugación diferencial hasta que la suspensión de fagos presenta una relación entre la absorción del máximo y del mínimo de su espectro U.V. (240 - 330 nm) de aproximadamente 1,5. Si se desea una mayor purificación puede ahora realizarse una centrifugación en gradiente de CsCl como se ha descrito para los fagos SPP-1 y λ_c. El DNA se extrae por tratamiento con fenol recientemente destilado.

Apéndice II-1-4.- Métodos de conteo de bacteriofagos.

Los métodos de conteo utilizados usan de la propiedad que tienen los fagos de lisar a sus respectivas bacterias huéspedes. Si la lisis se realiza en un medio sólido sobre el que crece una monocapa uniforme de tales bacterias y sobre la que también se extienden los fagos, al cabo del -

tiempo aparecerá una capa opaca de bacterias salpicada de pequeñas placas de lisis transparentes; cada placa de lisis es la consecuencia de un fago lisando a las bacterias que van creciendo a su alrededor.

Dos tipos de modificaciones a este método original han sido utilizados: el primero de ellos consiste en formar la monocapa de células directamente sobre una placa de agar nutritivo. Previamente se han mezclado con las células diluciones apropiadas de los fagos para evitar tanto la aparición de un número pequeño de placas como de obtener una lisis confluyente. Se acepta como un buen contaje aquel en el que se pueden contar entre aproximadamente 30 y 300 placas de lisis. El segundo método utiliza una solución de agar blando, que es líquido a 40°C, donde se mezclan las bacterias que han de formar el césped y las diluciones de los fagos. Tras la extensión de esta mezcla en la placa de agar nutritivo se solidifica al enfriarse formando una capa de distribución uniforme. En cualquiera de los dos casos es necesario que las placas de agar nutritivo estén bien secas.

Las diluciones de los fagos se realizan en medio de peptona y NaCl suplementado con las sales necesarias en cada caso para la infección del fago. Se tomó siempre 0,1ml de suspensión bacteriana que esta creciendo en estos momentos en fase exponencial que se mezcló con 0,1 ml de fagos diluidos que se extienden directamente sobre la placa de agar o se mezclan con 0,3 ml de agar blando a 40°C antes de extender.

Tras la extensión las placas se dejan abiertas durante 20min en la estufa a 37°C antes de cerrarlas e invertirlas. Después se dejan crecer así al menos 5 horas o mejor toda la noche antes de proceder al recuento de las placas de lisis. La composición de los medios es la siguiente:

Agar nutritivo: Agar nutritivo al 2,5% en agua destilada.

Agar blando: 25g de peptona, 5g de NaCl 4g de agar nutritivo por litro suplementado con 2,5g de MgSO₄ para los fagos λ_c y T₂ y con 2,5g de MnSO₄ además para los fagos SPPl.

Medio de dilución de los fagos: Igual que el medio anterior pero sin agar. Este mismo medio se utilizó para el crecimiento de las bacterias.

II-2.- Aislamiento y caracterización de DNA de diferentes orígenes (GROSSMAN, L. et al. 1968).

II-2-1.- Introducción

Con el fin de proveernos de DNAs de unas características determinadas en función del tipo de experimentación a realizar, nos hemos visto obligados a llegar a diferentes grados de aislamiento y purificación de los DNAs en estudio y, en consecuencia, a su caracterización.

Así ante la imposibilidad de obtener un DNA homogéneo en tamaño, partiendo de materiales biológicos Eucarionticos en los que intrínsecamente las células poseen una heterogeneidad inherente a su propia naturaleza, ya que poseen más de un cromosoma diferente. O bien ante la imposibilidad técnica de obtener intacto este DNA homogéneo preparativamente en bacterias, células que sí poseen este grado de homogeneidad en su DNA, es necesario -

recurrir al aislamiento de estos DNAs perfectamente homogéneos e intactos de virus bacterianos.

En cualquier caso el primer problema planteado en el aislamiento de DNA de cualquiera de estos tres orígenes es el de producción en escala preparativa. Este problema es prácticamente inexistente en el caso de la obtención de DNA a partir de timo de ternera, cuyo alto rendimiento contrasta con su poca utilidad analítica en la experimentación habitual del laboratorio. Sin embargo a parte de los estudios realizados en este DNA como representante de DNA de origen Eucarionte, es muy útil como coprecipitante en muchas manipulaciones a las que se someten a otros DNAs, como estabilizante de enzimas y como sustrato para ensayos de actividad de algunas enzimas.

Los DNAs utilizados lo son en función de sus características particulares, como por ejemplo su contenido en Guanina-Citosina, su capacidad transformante, etc...

Por último los DNAs de origen virásico se utilizan como material biológico de características homogéneas e ideales, físicamente hablando, en cuanto que muchos de los parámetros medidos o de sus propiedades ante ciertas condiciones físicas ofrecen este comportamiento idóneo. (Propiedades hidrodinámicas, migración electroforética, cooperatividad macromolecular..).

Por supuesto que aún en los casos en que técnicamente es imposible en plan preparativo la obtención de DNAs de tamaño natural, se forzaron las condiciones de los aislamientos en el sentido de obtener la máxima aproximación a las medidas y condiciones naturales.

II-2-2.- Aislamiento de DNA de bacterias.

El aislamiento de DNA de bacterias plantea de origen tres problemas importantes: tamaño, pureza y rendimiento. Entendiendo siempre que cualquier DNA que se obtenga deberá poseer un tamaño molecular lo más próximo posible a su tamaño original y cuya estructura no ha sido dañada o alterada tanto por agentes internos a la célula como por los procedentes de la misma manipulación del aislamiento. El DNA será tanto más puro cuanto menos contaminantes de otros materiales biológicos (proteínas, ácidos ribonucleicos, mucopolisacaridos etc...) contenga. El rendimiento vendrá condicionado por la cantidad de manipulaciones y el tipo de éstas que sea necesario realizar.

Es evidente que entre calidad y pureza por un lado y rendimiento por otro, se hace necesario encontrar una solución de compromiso que permita trabajar con el DNA deseado y en las cantidades necesarias.

En la actualidad el método utilizado en el laboratorio intenta resolver todos estos problemas haciendo uso de los métodos que en la bibliografía y en la práctica de nuestro laboratorio produce mejores resultados en cada etapa particular del aislamiento y según el tipo de DNA que se desea producir. (Apéndice II-2-1).

Así la lisis clásica de MARMUR (MARMUR, J.; 1961) ha sido reemplazada por la de FREIFELDER (FREIFELDER, D.; 1968), producción de esferoplastos y posterior lisis, mediante la cual el momento de lisis es prácticamente instantáneo en toda la solución y casi al mismo tiempo se produce la primera desproteínización con fenol, según el método de MIURA (MIURA, K.I.; 1963). Todo ello se realiza en un ambiente quelante para inhibir en lo posible la actuación de las DNAsas en los breves momentos entre la lisis y la primera desproteínización.

Como ya queda dicho las desproteínizaciones se realizan con fenol y no con cloroformo-isoamílico según el método clásico descrito por MARMUR menos efectivo. La eliminación del fenol se realiza mediante un sistema de diálisis continua y a 4°C.

La eliminación de los ácidos ribonucleicos se consigue actualmente de una manera más eficaz al hacer actuar junto a la RNasa pancreática (que produce ribonucleótidos pirimidínicos no dializables) la RNasa de T₁, que hidroliza estos últimos nucleótidos, dializando al tiempo que se produce la reacción, con lo que se evita la inhibición por productos finales sobre ambas RNAsas. A continuación en la Tabla-II-1 se expresan los diferentes resultados obtenidos con ambos tratamientos.

TABLA-II-1

Análisis de RNA	RNA control	RNA+RNasa-Panc.	RNA+RNasa-Panc+RNasaT ₁
RNA-Macromolec.	100,00%	0,27%	0,27%
RNA-Soluble en ácido y no dializable.	0,00%	2,90%	0,38%

Por supuesto que estos resultados permiten eliminar la etapa de precipitación selectiva de DNA con alcohol isopropílico lo que redundará en beneficio del rendimiento.

De este modo la última etapa del aislamiento no es más que una precipitación del DNA, lo que contrasta con las tres precipitaciones realizadas por el método MARMUR o las dos según el método de FREIFELDER. Es necesario destacar la violenta manipulación que supone la precipitación y posterior redisolución del DNA y que es además mucho más cuanto menos purificado está el DNA, siendo prácticamente inocua sin embargo cuando se hace sobre DNA purificado si se toman las debidas precauciones.

La ribonucleasa de T_1 es comercialmente cara, por lo que según los casos su utilización en los aislamientos está condicionada por las características requeridas para un DNA dado.

En cualquier caso el aislamiento según el método de MARMUR aunque con lisis según FREIFELDER fue a veces utilizado en el aislamiento de DNA de *B. subtilis* con fines transformantes (Apéndice-II-2-2) con pocas desproteinizaciones con lo que se consigue DNAs de incluso 60×10^6 daltons aunque con un porcentaje alto de proteínas. En la Tabla-II-2 se especifica un estudio comparativo de los diferentes métodos empleados en cuanto a los tres parámetros que han privado a la hora de realizar los aislamientos: tamaño pureza y rendimiento. (Se incluyen además los datos relativos al método de KAY en el aislamiento de DNA a partir de timo de ternera. Ver apartado II-2-3).

TABLA-II-2

METODO	PM en Daltons	% RNA	% Prot.	N°de Prec.	mgDNA/gCel.
MARMUR	$15-20 \times 10^6$	1	1,5-2	3	1
FREIFELDER MIURA MARMUR	$25-50 \times 10^6$	1	1,5-2	2	1,5-2
FREIFELDER MIURA RNasa-Panc RNasa- T_1	80×10^6	0.1	1,5-2	1	1,5-2
KAY (1)	15×10^6	0.1	0,5	5-6	10-12

(1) Riqueza del DNA desecado del 60%.

II-2-3.- Aislamiento de DNA de Timo de ternera (TUNG YUE WANG 1968)

En el aislamiento de DNA de Timo de ternera se utilizó el método de KAY (KAY, E.R.; 1952). La elección de este método está justificada por las especiales características de este tejido si las comparamos con las de las bacterias: la ausencia de pared celular y el bajo contenido en RNA. Así en el método KAY no existe una etapa de lisis enzimática, ni un tratamiento con RNasa, sin embargo es necesario una disgregación previa del tejido con un homogeneizador. Las desproteínizaciones se consiguen simplemente por la acción simultánea del SDS (Dodecil-sulfato-sódico) y la alta concentración salina. El alto rendimiento de este método no es sino consecuencia del tejido utilizado como fuente de DNA, el Timo, glándula cuyas células apenas poseen citoplasma, en las que el núcleo ocupa la mayor parte. En la Tabla II-2 aparecen los datos típicos de un aislamiento. Los detalles del método aparecen en el Apéndice-II-2-3.

II-2-4.- Aislamiento de DNA de bacteriofagos.

Los bacteriofagos λ_{cT_2} y SPPl purificados previamente se ajustan a una densidad óptica a 260 n.m de 5 a 10 unidades aproximadamente en solución 0,15 M NaCl 0,015 M citrato sódico. La ruptura de la capsida se consigue en cualquier caso por tratamiento suave con fenol recientemente destilado y saturado con la misma solución, durante 10 min. en frío. Tras centrifugación $15'$ a 3000x g a la fase acuosa superior se la repite el tratamiento. El fenol se retira por diálisis frente a un volumen 500 veces superior con dos cambios de tres horas y uno de 15.

El rendimiento suele ser en cualquier caso entre 1 y 2 U.O. a 250n.m por cada U.O. de fago. La determinación del peso molecular de la preparación así como el estudio del límite de sedimentación dan ya un buen índice del grado de homogeneidad del DNA en cuestión. Además el intervalo de desnaturación térmica y la velocidad de renaturación son también garantía de un origen virásico. La determinación del P.M. del DNA desnaturado por sedimentación nos indica la ausencia de roturas simples intercadena. Ver Fig-II-4-a y b.

II-2-5.- Caracterizaciones a los DNAs (GROSSMAN, L. et al, 1968)

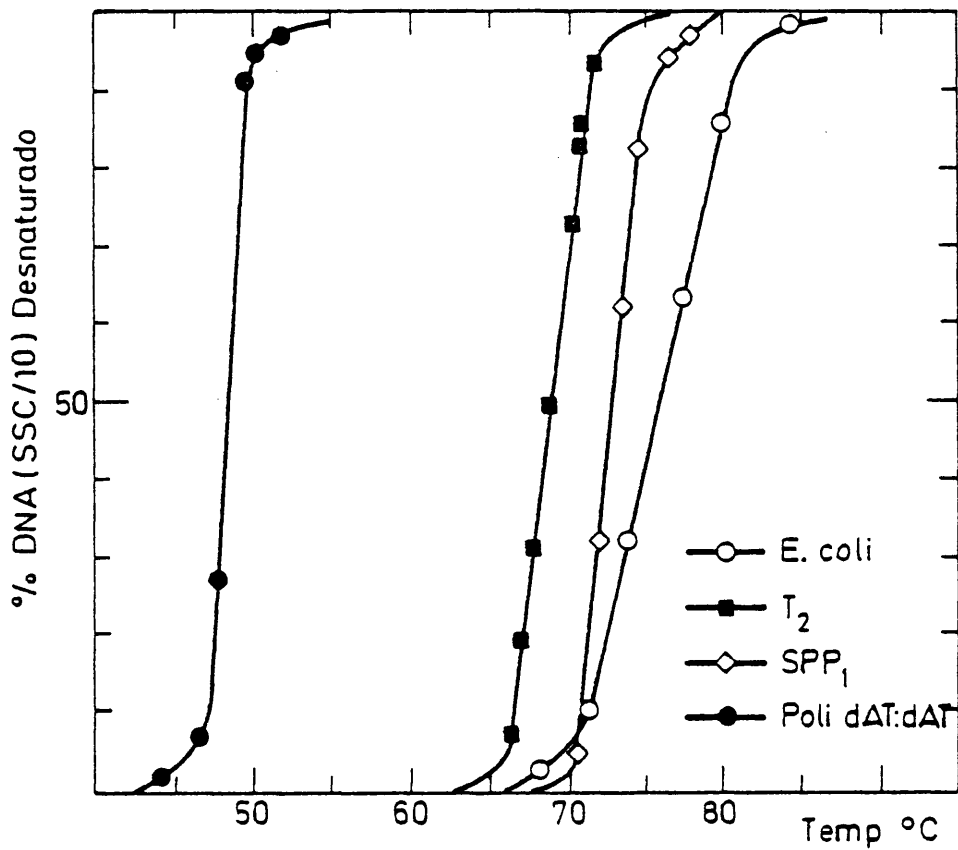


Fig. II-4. a.- Anchura de la transición térmica en DNAs de diferentes orígenes.

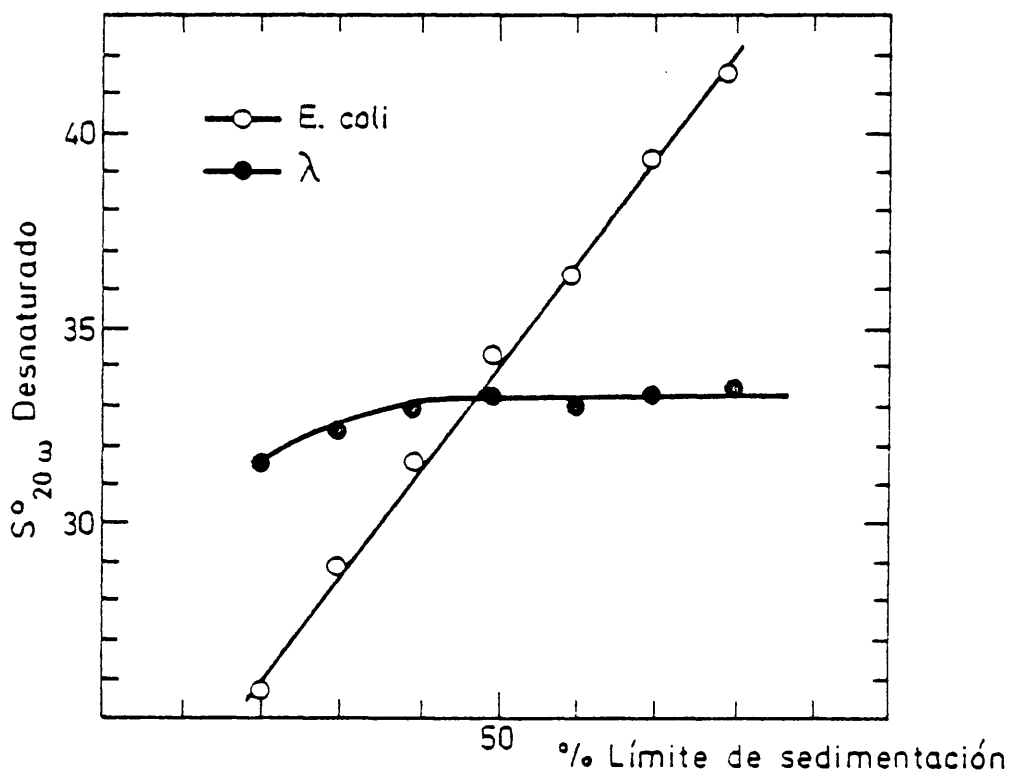


Fig. II-4. b.- Coeficientes de sedimentación a lo largo del límite para DNAs de λ y de *E. coli*.

Los dos contaminantes más importantes que se pueden presentar en una preparación de DNA son: RNA y proteínas. El contenido en RNA se midió por el método de determinación de ácidos nucleicos de SCHMIDT-THANHAUSER (SCHMIDT, - THANHAUSER, 1966) basado en la precipitabilidad en medio ácido de las moléculas de ácidos nucleicos. Si por hidrólisis alcalina se produce degradación del RNA presente y previamente se ha eliminado la fracción soluble, caso de existir, una nueva precipitación dejará como ácido soluble solamente los oligorribonucleotidos procedentes de la degradación del RNA. Es posible así cuantizar el porcentaje de RNA contaminante. (Apéndice II-2-4).

El contenido en proteínas se determinó por el método colorimétrico de LOURY (Loury et al. 1951) aunque hubo que introducir en él algunas modificaciones para lograr detectar cantidades del orden del microgramo, ya que si no con taminaciones del orden del 1 al 2% de proteínas consumirían cantidades de varios mg de DNA en la determinación. La curva patrón se realizó con seroalbumina boví na. Las concentraciones de SAB se determinaron espectrofotométricamente. (Apéndice II-2-5).

En el DNA la comprobación de la exacta correspondencia entre las concen traciones de fósforo, deoxirribosa y base, es decir, de las características de la unidad monomérica es químicamente la mejor caracterización al DNA y la mejor comprobación de la ausencia de proporciones importantes de polinucleotidos dis tintos al DNA.

El método más directo de determinación del coeficiente de Absorción Mo lar (E) de una preparación de DNA es la cuantización de la concentración de fós foro de una muestra de la cual se conoce la absorción. Esta determinación de fósforo la hemos realizado por el método de GRISWOLD (GRISWOLD, B.L. et al; 1951), basado en esencia en el desarrollo de color que tiene lugar en la reducción por el ácido amino naftol sulfónico (ANSA) del complejo fosfomolibdico formado por la reacción entre el molibdato amónico añadido como reactivo y el fosforo inorgánico de la muestra. Es preciso por tanto que todo el fósforo del DNA se encuentre en esta forma, lo que exige una mineralización previa. (Apéndice II-2-6).

La determinación cuantitativa de la deoxirribosa se consigue por la re acción del azúcar con la difenilamina cuando el azúcar se ha hidrolizado previa mente. En las condiciones de DISHE (DISHE, Z.; 1930) modificación de BURTON - - (BURTON, K; 1956) sólo se liberan las deoxirribosas unidas a bases púricas por lo cual la concentración que se obtiene se corrige multiplicando por dos. (Apéndice II-2-7).

La comprobación de la equimolaridad del azúcar y fosfato con la base se realizó con el cálculo del coeficiente de absorción molar referido a deoxi rribosa o fósforo del DNA. Este parámetro muy importante en la estimación del

grado de desnaturación del DNA (la relación entre la densidad óptica de su solución y su concentración en átomos gramo por litro) aunque varía ligeramente con la proporción de las cuatro bases es esencialmente distinto del que se obtiene para DNA desnaturado.

El valor del $E(p)$ se puede obtener también por cálculo, a partir de las absorciones a diversas longitudes de onda de la muestra. Este cálculo - está basado en que la forma del espectro (no solo la absorción) está afectada por las interacciones que tienen lugar entre las bases cuando la estructura del polímero es tal que las bases se encuentran apiladas. El que la absorción a las diversas longitudes de onda esté afectada de distinta manera por este apilamiento refleja el hecho de que la interacción tiene distintas consecuencias dependiendo de la base. Así pues un estudio de la forma del espectro, permite reconocer la estructura en que se encuentra la muestra y en consecuencia, calcular el $E(p)$. Así mismo este estudio, debido a las diferencias en las bandas de absorción de las diferentes bases, permite conocer la relación de bases de este DNA. Para estos cálculos se utilizan el método y parámetros - propuestos por HIRSCHMAN y FELSENFELD (FELSENFELD, G. et al.; 1965).

Esta relación de bases a la que aludimos es un parámetro importante en la caracterización de un DNA ya que refleja su origen específico. La determinación de bases puede realizarse cromatográficamente, a partir de un hidrolizado en ácido fórmico del DNA. La cromatografía se realiza en capa fina con pasta de celulosa en polvo tipo M - N - 300 WATMAN con METOH/H₂O como solvente. Las manchas se localizan con luz U.V. a 254 n.m. y su concentración se determina espectrofotométricamente teniendo en cuenta los coeficientes de absorción molar de las bases al pH correspondiente. (BENDICH, - A.; 1957).

Además la estabilidad en función de la temperatura de la estructura nativa del DNA está relacionada con la composición en bases del DNA, debido a las diferentes posibilidades de formación de puentes de hidrógeno en función de las bases. En definitiva el estudio de la transición térmica nos permite conocer la relación de bases de un DNA mediante una correlación empírica que liga la temperatura media de transición con el contenido en guanina-citosina. (MARMUR, J. y DOTY, P.; 1959) (MANDEL, M. y MARMUR, J.; 1968) (SAEZ, R.M. y DAVILA, C.A.; 1974). El valor del efecto hipercrómico observado permite una estimación del estado de una preparación de DNA.

Estas determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro UNICAM SP 700 con accesorio que permite la regulación de la temperatura o en un -

TABLA-II-3.

DNA	E (p)	Abs 100°/Abs 25°C	% GC	% PROT	% RNA	TmSSC
E. coli	6,370 (a)	1,37	51,8 [±] 1,3(d)	1,5-2	1	91,7
	6,670 [±] 70 (b)		51,1 [±] 0,4(e)			
	6,650 [±] 85 (c)					
B. subtilis	6,340 [±] 250(a)	1,39	45,5 [±] 2,5(d)	1,5-2	1	88,8
	6,450 [±] 200(b)		44,0 [±] 1,2(e)			
B. cereus	6,660 [±] 240(a)	1,39	33,9 [±] 0,8(d)	1,5-2	1	84,5
			35,3 [±] 1,4(e)			
M. lisodeick.	6,670 [±] 300(a)	1,37	71,3 [±] 1,7(d)	1,5-2	1	99,2
	6,950 [±] 90 (b)		72,9 (e)			
Timo	6,420 [±] 100(a)	1,41	43,5 [±] 0,7(d)	0,5	1	86,4
	6,510 [±] 150(b)		40,0 (e)			

(a).- Cálculo a partir del espectro.

(b).- Determinación de P.

(c).- Determinación de deoxirribosa.

(d).- Promedio de 12 hidrolizados.

(e).- A partir de la Tm según la expresión (SAEZ, R.M. y DAVILA, C.A.; 1974)

$$\%GC = (Tm_{SSC} / 10 - 48,7) 1,93$$

RESULTADOS CARACTERIZACION DNAs PROCEDENTES DE BACTERIOFAGOS

DNA	E	Abs 100°C/Abs 25°C	T _m (SSC)	% GC	% PROT	% RNA	PM nativo	PM desn
T ₂	6250 ⁺ -620 (b)	1.350	84.5	37,0 (d)	2-4	1	115x10 ⁶ (g)	---
λ	6460 ⁺ -50 (b)	1.330	92.1	55,6 (d)	2-4	1	30x10 ⁶ (g)	15x10 ⁶ (h)
SPP1	6260 ⁺ -70 (a) 6490 ⁺ -70 (b) 5540-180 (c)	1.340	89.1	48,3 (d)	2-4	1	25,5x10 ⁶ (g)	13x10 ⁶ (h)

- (a) Cálculo a partir del espectro
- (b) " por determinación de P
- (c) " " de deoxirribosa
- (d) A partir de la T_m : %GC = (T_m - 69,3)2,44
- (g) Por determinación de viscosidad
- (h) Por determinación de S_{20w}^o desnaturalado.

VARIAM con programador automático. En cualquiera de los dos la temperatura se midió directamente de la cubeta de muestra mediante la introducción en ella de un termopar calibrado.

Por último las medidas de peso molecular se realizaron por viscosimetría en un viscosímetro ZIMM-CROTHERS (ZIMM, B.H. y CROTHERS, D.M.; 1962) y por sedimentación analítica en ultracentrífuga BECKMAN modelo E. La heterogeneidad macromolecular y la densidad de roturas simples se obtuvo estudiando los límites de sedimentación del DNA nativo y desnaturado en sosa y formaldehído. (Ver II-5-2). En las tablas 2 y 3 se han resumido los resultados de las caracterizaciones a los DNAs.

II-2-6.- Aislamiento y caracterización de DNA marcado isotópicamente.

Algunas de las técnicas utilizadas en el seguimiento de los procesos biológicos en estudio imponen condiciones de sensibilidad a veces - muy importantes. Estos condicionamientos limitan el uso de esas técnicas.

Entre los intentos de ampliar el rango de sensibilidad de estas técnicas de detección tiene un éxito espectacular el disponer de los biopolímeros en estudio marcados isotópicamente.

En general en el marcado de DNA se obtienen mejores resultados en cuanto a actividad específica se refiere si se dispone de cepas requirientes genéticos en timina. Así, siendo la timina exclusiva del DNA como polímero, al suministrar en el medio de cultivo este precursor marcado - acaba incorporándose al DNA de la bacteria.

Cuando se pretende marcar con fósforo (P^{32}), tan sólo es necesario suministrarlo en forma de fosfato; mejor en un medio definido, pues la presencia de fosfatos no radioactivos en los medios ricos nos enfriaría el DNA obtenido.

Naturalmente que suministrando ambos precursores con distintos isótopos, es decir; timina- 3H y $^{32}PO_4H_3$ se consiguen marcajes dobles y - en diferentes zonas del DNA lo que en algún caso puede ser de gran utilidad práctica. Teniendo a punto el marcado de DNA bacteriano, conseguir - DNA de fagos también marcado requiere casi exclusivamente solucionar el problema de la lisis de cultivos bacterianos huéspedes que estén creciendo en presencia del precursor marcado.

TABLA-II-4

D N A	M A R C A	Act. Esp. Prec.	Act. Esp. DNA	Rendimiento	PM-Cromt.
E. coli TAU-bar(1)	³ H-Metilo de la Timina	500 mg/1 de 2 Ci / mM	2,4x10 ⁶ dpm/μg	1mg/g celu.	20x10 ⁶ d.
E. coli B 101 (2)	³² P-Fosfatos internucleot	10m Ci	9,1x10 ⁵ dpm/μg	1mg/g celu	15x10 ⁶ d.
E. coli TAU-bar(3)	³ H-Metilo de la Timina ³² P-Fosfatos internucleot	500 mg/1 de 1 Ci / mM 10m Ci	2,0x10 ⁶ dpm/μg 4,6x10 ⁵ dpm/μg	1mg/g celu	10-15x10 ⁶ d
B. subtilis 168-Thy ⁻ (4)	³ H-Metilo de la Timina	1500 mg/1 de 4 Ci/mM	1x10 ⁶ dpm/μg	1mg/g celu	20x10 ⁶ d.
B. cereus (5)	³ H-metilo de la Timina.	1000mg/1 de 4 Ci/mM	2,3x10 ⁵ dpm/μg	1mg/g celu	20x10 ⁶ d.
SPP1 (6)	³ H-Metilo de la Timina	1500 mg/1 de 1,5-3 Ci/mM	3x10 ⁶ dpm/μg	1-2 mg/litro de lisado	8x10 ⁶ d.

(1).- Valores medios de 10 aislamientos.

(2).- Valores medios de 11 aislamientos.

(3).- Valores medios de 4 aislamientos.

(4).- " " " 3 "

(5).- " " " 4 "

(6).- " " " 2 "

El aislamiento de DNA marcado plantea los problemas normales del manejo de un isotopo radioactivo. Por tanto en la práctica se evita el manejo de grandes volúmenes lo que lleva inmediatamente a desechar - el fenol como medio de desproteínización pues las diálisis posteriores o el flujo con eter sulfurico para retirar el fenol dan volúmenes contaminados muy grandes. Entonces se recurre a la desproteínización con cloroformo-isoamilico (según el método MARMUR) que resuelve este problema. La purificación de los fagos y de su DNA marcado se realizó como la ya descrita para los no marcados.

En nuestro trabajo se utilizaron DNAs marcados con tritio o ^{32}P o con ambos tanto de bacterias como de fagos SPPl; así se obtuvo $\text{DNA-}^3\text{H}$ y $\text{DNA-}^3\text{H-}^{32}\text{P}$ a partir de E. coli TAU-bar cepa requiriente en timina suministrada por el Dr. HANAWALT. $\text{DNA-}^3\text{H}$ de B. subtilis-Thy⁻ suministrada por el doctor PORTOLES. $\text{DNA-}^3\text{H}$ de B. cereus en cepa no requiriente. $\text{DNA-}^3\text{H}$ a partir de SPP-1 infectando a la cepa de B. subtilis mencionada y por último $\text{DNA-}^{32}\text{P}$ a partir de E. coli B 101. En los Apéndices-II-2, 8, 9, 10, 11 y 12 se detallan las condiciones de estos aislamientos.

En las caracterizaciones de todos estos DNAs se omitieron todas aquellas que consumen cantidades importantes de DNA como: determinación de RNA, de proteínas, determinación colorimétrica de fosforo y de desorribosa, determinación cromatografica de bases aunque se calcularon el coeficiente de absorción molar y el contenido en guanina-citosina por cálculo a partir del espectro, efecto hipercromico, determinación de la TM y contenido en GC a partir de ella; la determinación del peso molecular y la heterogeneidad molecular por cromatografía centrifugada en DEAE-Celulosa (MINGOT, F. y DAVILA, C.A.; 1974). Por último se hizo un énfasis especial en la determinación de la actividad específica que es por supuesto la característica más importante de estos DNAs. En el Apéndice-II-2-13 se detalla el método de determinación de peso molecular de DNA por cromatografía centrifugada en DEAE-Celulosa. En la Tabla-4- aparece un resumen de los aislamientos de estos DNAs.

II-2-7.- Métodos de contaje radioactivo.

En general y dados los isotopos radiactivos utilizados se utilizó siempre el contaje en centelleo líquido a excepción del caso de las determinaciones cromatográficas de dímeros de pirimidina donde además y previamente al contaje en centelleo líquido para la cuantización de los dímeros se

utilizó el contaje en cámara de ionización en un contador proporcional Philips.

A excepción del contaje de muestras que contienen ^{32}P que se realiza en un medio que tan sólo contenía dioxano, el resto de las mezclas centelleantes fueron esencialmente el medio de Bray, o modificaciones de él. Cuando las muestras contenían altas concentraciones salinas o pHs extremos se añadió etilenglicol a la mezcla de contaje para lograr su solubilización.

Las condiciones de contaje se buscaron en orden a obtener un máximo de eficiencia compatible con fondos bajos. En cualquier caso y para cada tipo de solvente de las muestras medidas se calculó su eficiencia. A continuación se detallan las diferentes composiciones de los medios utilizados y la procedencia de las muestras que se cuentan en estos medios:

	1	2	3	4
Dioxano	1000ml/l	600ml/l	900ml/l	--
Metanol	--	--	100ml/l	--
Etanol	--	150ml/l	--	--
Etilenglicol	--	250ml/l	29ml/l	--
PP0	--	7 g/l	4 g/l	6,9g/l
POPOP	--	0,25 g/l	0,2 g/l	--
Naftaleno	--	60 g/l	60 g/l	--
Tolueno	--	--	--	1000 ml/l

En el medio 1 se contaron todas las muestras que contenían ^{32}P fuese cual fuese su procedencia. En el medio 2 las muestras procedentes de cualquier tratamiento que las dejase con alto contenido en sales o fuerte pH como tras cromatografía centrifugada en DEAE-Celulosa, gradiente de sacarosa neutro o alcalino, determinaciones de actividad enzimática que requieran precipitaciones en ácido etc. El medio 3 se empleó en el contaje de muestras de DNA atrapadas en gel de agarosa tras electroforesis. El medio 4 se empleó para el contaje de muestras que están contenidas en papel como las procedentes de cromatografías de papel etc.

APENDICES DEL APARTADO II-2Apéndice II-2-1.- Aislamiento de DNA de E.coli B.; B. subtilis, B. cereus y M. lisodeicticus. Método del laboratorio.

Todas las operaciones menos las indicadas se realizan a 4°C. - Todas las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrifuga Sorwall refrigerada.

En cada aislamiento se partió de 15 gr de pasta húmeda de celu los. La cantidad en la receta se expresa por gramo de pasta.

1 g. de células se lava en 20 ml de NaCl 0,14 M y se centrifuga 20 min. a 9.000 rpm (rotor 30). El sedimento se suspendió en 12 ml de una solución al 15% en sacarosa en TRIS 0,03 M EDTA 0,02 HCl pH=8,0.

La incubación con Lisozima se realiza en baño de agua a 37°C - 30 min siendo la concentración de enzima de 0,5 mg/ml. (44.000 unidades/mg). Finalizada la incubación se añade hasta una concentración final de 0,5% - SDS¹ al 25% en EDTA² al 50%. La lisis celular produce un aumento de la vis cosidad y transparencia del lisado.

A continuación se añade al lisado 12 ml de fenol recientemente - destilado y saturado con TRIS 0,1 M NaCl 0,15 M pH=9 al 1% de SDS.

La emulsión se consigue habitualmente agitando en matraz Erleme- yer durante 30 a 50 min. Alcanzada la emulsión se centrifuga 2 horas a - - 15.000 rpm (rotor 30).

A la fase acuosa así obtenida se le repite el tratamiento: fenóli co y centrifugación, se pone a dializar frente a solución 0,15 M NaCl, 0,015M citrato sódico en sistema Mariotte continuo a un flujo aproximado de 1 l/h. (Generalmente son necesarios 40 litros para que desaparezca el fenol en un aislamiento típico a partir de 15 grs de pasta de células). Se utiliza el criterio espectrofotométrico.

La hidrolisis del RNA se hace mediante incubación en baño de una solución 0,15M NaCl 0,015 M citrato a 37°C durante 5 horas dializando simul táneamente (para 15 grs de pasta de células la dialisis continua se realiza a 3 l/h. lo que consume del orden de 16 litros de solución salina citrato). La mezcla de reacción contiene 50 mg/ml de RNasa pancreatica y 15 mg/ml de RNasa de T1.

Tras la hidrolisis y dialisis se realizan otras dos desproteini zaciones con fenol. Tras la centrifugación y dialisis continua de la fase acu sa se realiza el espectro del DNA y si no contiene fenol se determina su - contaminación de proteínas por el método Lowry (modificación del laborato- rio). Si la cantidad de proteínas es superior al 2% se realizan nuevas des proteinizaciones hasta que quede entre uno y dos por ciento.

El DNA así purificado es precipitado con un volúmen igual de eta nol y se conserva así a 4°C.

Cuando no es necesario obtener un DNA de pM superior a 30-50x10⁶ daltons la hidróli sis de RNA se realiza únicamente con RNasa pancreática - 50 mg/ml durante 30 min a 37°C en SSC. La RNasa ha sido incubada previamen te 10 min a 80° para destruir las posibles DNasas que contenga. Terminada - la reacción se produce la desproteización. Al final la precipitación se realiza añadiendo 0,33 ml/3 ml de solución de 3M acetato sodico 10⁻³M EDTA pH=7 agitando. Se añade 1/2 volumen de alcohol isopropílico frío que preci pita selectivamente DNA y no RNA.

- (1) SDS Dodecil sulfato sódico
(2) EDTA Etilen diamino tetraacetico

Apéndice II-2-2.- Aislamiento de DNA bacteriano. Método Freifelder-Marmur

El método de aislamiento es el de Marmur aunque la lisis se hace según el método Freifelder. La desproteínización se consigue por desnaturación y precipitación de las proteínas en la interfase de la emulsión de la solución acuosa del crudo con una mezcla de cloroformo e isoamílico. La precipitación del DNA con etanol e isopropanol y la degradación del RNA por la acción de la RNasa así como la alta concentración salina y el uso de agentes quelantes son procedimientos estandar también utilizados en este método.

Método por gramo de células:

Las bacterias son recogidas por centrifugación y lavadas con 20ml de solución 0,15M NaCl 0,1 EDTA pH=8. Se centrifuga y el sedimento se resuspende en 12 ml de esta misma solución. La incubación con Lisozima se realiza en baño de agua a 37°C 30 min, siendo la concentración de enzima de 0,15mg/ml (44000 unidades/mg). Finalizada la incubación se añade hasta una concentración final de 0,5 %, SDS al 25 % en EDTA al 50%. La lisis de las células produce un aumento de la viscosidad y de la transparencia de la solución.

Al lisado se le añade perclorato sódico 5 M hasta llevarlo a 1 M, la alta concentración salina provista por el perclorato facilita la disolución de las asociaciones de proteínas ácidos nucleicos. A continuación se añade un volumen igual de cloroformo-isoamílico en la proporción 24 a 1 agitando durante 30 min (desproteínización según el método Sevag-Lackman-Smollear por desnaturación en la interfase).

La emulsión resultante se separa en capas por centrifugación de 15 a 20 min a 12000xg. La fase acuosa superior contiene los ácidos nucleicos - que se separan y precipitan con doble volumen de alcohol etílico. El hilado se disuelve en 5 ml de solución salina citrato.

Sobre esta solución se repite el Sevag las veces necesarias hasta que no aparezcan proteínas visibles en la interfase. El sobrenadante obtenido después de la serie de desproteínizaciones se precipita de nuevo con etanol y el hilado se disuelve en 3 ml de solución salina citrato.

La eliminación del RNA se consigue añadiendo 150mg de RNasa manteniendo durante 30 min a 37°C. El producto obtenido es sometido de nuevo a una desproteínización. Las desproteínizaciones se repiten hasta que no aparecen de nuevo proteínas visibles en la interfase después de la centrifugación. El sobrenadante después del tratamiento final se precipita otra vez con doble volumen de alcohol etílico. El hilado de DNA obtenido se disuelve en 3 ml de solución salina citrato 1/10 y se añade 0,1 ml de acetato sódico 3 M EDTA 10^{-3} M agitando. Después se precipita añadiendo 1/2 volumen de alcohol isopropílico.

El DNA precipita así en forma de fibras que se pegan a la varilla del agitador; el RNA, oligorribonucleotidos y polisacaridos celulares o capsulares que puedan quedar, permanecen disueltos mientras que las fibras de DNA se pegan a la varilla. Las fibras así obtenidas se conservan a 4°C hasta que se desee usar el DNA.

Apéndice II-2-3.- Aislamiento de DNA de Timo de ternera. Método de KAY

50 gr. de timo de ternera congelado se homogeniza con 200 ml de 0,15M NaCl 0,015M citrato sódico. Tras 3 lavados con el mismo volumen de la misma solución mediante centrifugación y resuspensión del homogeneizado, se resuspende finalmente en 1 litro de solución salina citrato.

La lisis total se consigue al añadir 90 ml de solución de SDS al 5% en etanol al 50% agitando durante 3 horas. Tras ajustar a 1 M NaCl se deja a 4°C durante la noche. Después se centrifuga a 800 rpm durante 4 horas en centrifuga refrigerada. El sobrenadante obtenido se precipita con un volumen igual de Etanol; con ayuda de una varilla se hila el DNA precipitado que se disuelve en 700 ml de NaCl 10^{-2} M.

A la disolución se le añade 65 ml de SDS al 5% en etanol al 50% agitando durante 3 horas. Tras ajustar a 1 M NaCl se deja a 4°C. Centrifugación y precipitación del sobrenadante con etanol. Redisolución en solución salina 10^{-2} M. Este conjunto de operaciones se repite 3 veces más.

Tras la última precipitación con alcohol de 96° las fibras se lavan con alcohol de 80°, de 96° y después con acetona. Evaporada la acetona se seca el DNA en un desecador de vacío. El DNA así obtenido se conserva a 4°C. Por disolución de una parte pesada previamente, en solución salina citrato y tras obtener el espectro de absorción U.V. del DNA se determina la riqueza del DNA desecado. De la misma solución se determina el contenido en proteínas y el peso molecular del DNA.

Apéndice II-2-4.- Determinación de ácidos nucleicos, Método de Schmidt-Thanhanser

La determinación de ácidos nucleicos por este método en su versión actualizada por Munro consiste en esencia en la determinación de la cantidad de ácidos nucleicos solubles en ácido, es decir, de ácidos nucleicos no macromoleculares o muy degradados, para determinar después consecutivamente ácidos ribonucleicos macromoleculares por hidrólisis alcalina y posterior separación de los ácidos deoxirribonucleicos macromoleculares por precipitación y filtración en ácido. La determinación de los ácidos deoxirribonucleicos se realiza posteriormente por hidrólisis de estos en medio ácido. En todos los casos la evaluación de la cantidad de ácidos nucleicos en cada fracción se realiza espectrofotométricamente frente a patrones sin muestra que han sufrido paralelamente todas las etapas.

Las precipitaciones previas a las filtraciones se realizan en frío y el control interno del buen funcionamiento de cada etapa se lleva a cabo mediante patrones de RNA de levaduras y de fagos purificados como muestras de DNA puro.

Los controles y las muestras por triplicado. Las muestras de DNA conteniendo aproximadamente 1 mg de DNA en 5 ml. Se le añade 5 ml de ácido perclórico (PCA) 0,4 N frío y se deja precipitando en baño de hielo durante 15 minutos. Se filtra en Millipore de 0,40 micras de diámetro de poro. Se lava dos veces con 5 ml cada vez de PCA 0,2 N. El filtrado constituye la fracción soluble en ácido. Al precipitado se le trata con 5 ml de hidróxido potásico 0,3 N a 37°C en baño de agua durante una hora. Después se enfría y se añade 5 ml de PCA 0,4N manteniéndolo en frío durante 15 minutos. Después se filtra y se lava el precipitado dos veces con 5ml cada vez de PCA 0,2N. El filtrado así obtenido es la fracción RNA. El sedimento se resuspende en 5 ml de PCA 0,6N y se hidroliza a 70°C durante 20 minutos en baño de agua. Después se enfría y se filtra, lavando el precipitado dos veces con 5 ml de PCA 0,6N. El filtrado así obtenido constituye la fracción DNA.

La concentración de las diferentes fracciones se determina es

pectrofotométricamente midiendo la absorción en el máximo de la región entre 240 y 310 nm y teniendo en cuenta que una unidad óptica de fracción ácido soluble o de fracción RNA equivale a 33 μg y 40 para el caso de la fracción DNA.

Apéndice II-2-5.- Determinación colorimétrica de proteínas. Método de Lowry.

El método de Lowry de determinación de proteínas está basado en la reducción de estas por la presencia del ión Cu^{2+} solubilizado por la presencia de tartrato y en la reducción de reactivo de Folin-Ciocalteu (Fosfomolibdico-Fosfotungstico) por la tiroxina y el triptofano presentes en las proteínas.

Las muestras y los patrones se ajustan a 1 ml. Como solución patrón se utilizó una solución de Seroalbumina bovina ajustada a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ espectrofotométricamente en hidróxido sodico 0,1 M. Muestras que contienen desde 50 μg hasta 250 μg se procesan por duplicado. Las soluciones utilizadas fueron:

- A.- Solución de carbonato sodico al 2% en hidróxido sodico 0,1 M.
- B.- Solución de sulfato de cobre al 0,5% en tartrato potasico al 1%.
- C.- Solución de 50 partes de solución A por 1 de B.
- D.- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1 a 1 en agua destilada.

A las muestras y patrones se les añade 5 ml de solución C, se agita y se deja durante 10 min al menos a temperatura ambiente antes de añadir 0,5 ml de solución D. Tras agitación se espera exactamente 30 min. antes de medir el color desarrollado frente a los controles a 757 nm.

Con el fin de aumentar la sensibilidad del método hasta el punto de poder determinar concentraciones del 0,5% de proteínas en preparaciones de DNA sin necesidad de gastar grandes cantidades de la preparación se modificó el método de la siguiente forma: Se concentró la solución A 5 veces con lo que se pudo aumentar el volumen de la muestra hasta 5 ml. Como curva patrón se utiliza la que se obtiene con concentraciones de 5 a 25 μg de proteína por ml. La lectura del color desarrollado se realiza en cubetas de 5 cm de paso óptico.

Apéndice II-2-6.- Determinación de fósforo método de Griswold.

Se trata de la determinación colorimétrica del fósforo liberado previamente por la hidrólisis exhaustiva del DNA. La concentración del fósforo se determina por comparación con una curva patrón. A partir de este valor de concentración de fósforo y del valor de la absorción a 260 nm de la muestra de DNA se determina el coeficiente de absorción molar.

Las muestras, patrones y controles se procesan por triplicado. Como patrones se utilizan muestras con concentraciones de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{moles}/\text{ml}$. El control se compone exclusivamente de agua destilada. Todos ellos en un volumen total de 1 ml. El material de vidrio a emplear deberá de estar extremadamente limpio dada la sensibilidad del método. La solución madre de fósforo se prepara a partir de fosfato monopotásico desecado.

Todas las muestras se hidrolizan con 1 ml de sulfurico 10 N. a 150°C durante 45 min en baño de arena. La temperatura se sube paulatinamente,

Tras enfriar se añade 0,1 ml de agua oxigenada de 30 V. y se pone 20 min a 150°C de la misma forma. Tras enfriar se añade 1 ml de agua destilada y se mantiene 10 min en baño de agua a 100°C.

Tras la hidrolisis la colorimetría se realiza al añadir 1 ml de molibdato amónico al 2,5% en agua destilada y 1 ml de reactivo ANSA (6 g de bisulfito sódico, 0,2 g de sulfito sódico anhidro, 0,1 g de ácido amino-naftol-sulfónico, todo en 100 ml de agua destilada) y ajustar el volumen a 10 ml. (generalmente añadiendo 7 ml de agua destilada). La mezcla se pone después 10 min a 100°C en baño de agua. Tras enfriar bruscamente se mide la absorción del color producido frente a los blancos a 820 nm, máximo de absorción del complejo fosfomolibdico. El reactivo ANSA debe de estar recientemente preparado.

Apéndice II-2-7.- Determinación colorimétrica de deoxirribosa. Método de Dishe modificación de Burton

La reacción de la difenilamina con la 2-deoxirribosa fue descrita por Dishe y modificada posteriormente por Burton. En medio ácido la reacción rinde aldehído W-hidroxiévulínico produciéndose un intenso color azul. En las condiciones utilizadas la reacción solo se produce con las deoxirribosa unidas a bases puricas por lo que el resultado de la determinación debe de ser multiplicado por dos. Como muestras patrón se utilizan concentraciones de 0 a 0,5 μ moles/ml de 2-deoxiguanosina. - Los patrones y muestras se ajustan a 2 ml. A los 2 ml se les añade 4 ml de reactivo recientemente preparado que contiene: 0,75 g de difenilamina en 50 ml de ácido acético glacial al que se le añade 0,75 ml de sulfúrico concentrado y 0,25 ml de acetaldehído a 16 mg/ml. El desarrollo de color se realiza durante 16 a 30 horas en la oscuridad. La determinación del color desarrollado se realiza espectrofotométricamente a 600 nm. Del orden de 3 Unidades Ópticas a 260 nm de DNA son necesarios para una buena determinación de deoxirribosa en estas condiciones.

Apéndice II-2-8.- Producción de DNA-³H de SPPI

Bacillus subtilis 168 Thy⁻ Trp⁻ crecido durante la noche se utiliza como inóculo para crecer en un medio definido suplementado con los requerimientos específicos de la cepa. Su composición es:

Bases minerales:

NaCl	1×10^{-1} M
KCl	2×10^{-2} M
MgCl ₂	5×10^{-3} M
CaCl ₂	$1,4 \times 10^{-4}$ M
Na ₂ SO ₄	$3,5 \times 10^{-3}$ M
FeCl ₃	$7,4 \times 10^{-5}$ M

Solución tampón:

K ₂ HPO ₄	$4,4 \times 10^{-2}$ M
KH ₂ PO ₄	$2,2 \times 10^{-2}$ M

Fuente de N₂:

NH ₄ Cl	5×10^{-2} M
--------------------	----------------------

Fuente de C:

Glicerina	0,22 %
Glucosa	0,20 %

Aporte peptídico:

Ac. Casaminico 1 %

Requerimientos metabólicos de la bacteria:

Timina-³H 1,5 mg/ ml. Act. Esp. = 1,5 a 3 Ci/mM
 L-Trip. 80 mg/ ml.

Requerimientos catiónicos para la infección de los fagos:

MnSO₄ 0,1 x 10⁻³ M
 MgSO₄ 0,1 x 10⁻³ M

Tras 3 horas de agitación a 37°C el cultivo alcanza 0,71 UO/ml a 500 nm (10⁸ células/ml). En este momento se infecta con el fago SPPI a una multiplicidad de infección de 1 fago por cada 50 bacterias. Tras la lisis que se verifica durante la noche los fagos se purifican por el mismo método que el ya descrito para los fagos SPPI no marcados. (Apéndice II-1-3). El rendimiento de DNA viene a ser de 1 a 2 mg por cada litro de lisado.

Apéndice II-2-9.- Producción de DNA-³H de B. subtilis.

B. subtilis 168 Thy⁻ Trp⁻ se crece en medio definido suplementado con timina y triptofano en estufa a 37°C en matraz Erlenmeyer a 250rpm de agitación. El medio de cultivo es el desarrollado en el Apéndice-12- (Ver II-8-12) a excepción de que no se le pone MnSO₄ ni MgSO₄. La timina empleada fué 1,5 g por litro de 4 Ci/mM. Las células se recogen al día siguiente por centrifugación en Sorwall refrigerada a 3000xg durante 30min.

El aislamiento del DNA se realiza por el método FRIFELDER-MARMUR descrito en el Apéndice II-2-2.

Apéndice II-2-10.- Producción de DNA-³H de B. cereus.

B. cereus se crece en medio definido (Ver apéndice II.1.2) durante la noche. El inóculo así preparado se diluye en este mismo medio hasta que queda a 0,1 UO/ml a 450 nm. Se mantiene a 37°C con agitación a 250rpm hasta que alcanza 0,5 UO/ml; entonces se añade 15 ml de ³H-timina a 65,4 mg/ml a 4 Ci/mM y 350 mg de 2-dexoguanosina. Se deja crecer así durante 6 horas más. Tras la recogida de las células el DNA se aísla según el método FREIFELDER-MARMUR ya descrito en el Apéndice II-2-2. Los resultados obtenidos con este modo de marcado en una estirpe bacteriana no requieren te genético aparecen en la Tabla-II-4. (Ver II-2-6).

Apéndice II-2-11.- Producción de DNA-³²P de E. coli B 101.

El DNA-³²P fue aislado a partir de células de *E. coli* B 101 crecidas en medio *E. coli* TAU bar (Apéndice II-2-12) pero sin suplementar con aminoácidos ni con timina. Sin embargo se les suministró 5 mCi de P³² por cada litro además de 10 mg de PO₄ HNa₂. La recogida de las células y el aislamiento del DNA según el método ya descrito en el Apéndice II-2-2.

Apéndice II-2-12.- Producción de DNA-³H y de DNA-³H-³²P de E. coli TAU bar

E. coli TAU bar Thy⁻ Trp⁻ se crece en matraz Erlenmeyer a 37°C y con agitación a 250 rpm. Las células se recogen por centrifugación a 3000xg 30 min en centrifuga Sorwall refrigerada. El aislamiento del DNA se

realiza por el método FREIFELDER-MARMUR descrito en el Apéndice II-2-2. En general en las producciones de DNA- ^3H - ^{32}P se enfrían las células al mezclarlas con una cantidad 2 veces mayor de células frías que han sido crecidas en este mismo medio pero sin marcadores radioactivos. Los medios utilizados para el crecimiento de E. coli TAU bar para estos marcjes fueron:

<u>Sales</u>	^3H	^3H - ^{32}P
KCl	26 mM	26 mM
MgCl ₂	25 mM	25 mM
Na ₂ SO ₄	2,5 mM	2,5 mM
^{32}P (NH ₄) ₃ PO ₄		10 mCi/litro
		10 mg/litro
<u>Solución Tampón</u>		
Na ₂ HPO ₄	25 mM	25 mM
TRIS	0,099 mM	0,099 mM
HCl	hasta pH=7,4	hasta pH=7,4
<u>Fuente de carbono</u>		
Glucosa	0,5% (w/v)	0,5% (w/v)
<u>Suplementos</u>		
Arginina	0,02%	0,02%
Prolina	0,02%	0,02%
Metionina	0,02%	0,02%
Triptofano	0,02%	0,02%
Uracilo	0,02%	0,02%
Timina	500mg/l 1,5-3Ci/mM	500mg/l 1,5-3Ci/mM
<u>Fuente de N</u>		
NH ₄ Cl	40 mM	40 mM.

Apéndice II-2-13.- Cromatografía centrifugada en DEAE-celulosa de DNA.

25g de DEAE-celulosa Watman DE-81 se trocean, se resuspenden en agua y se pulverizan. La pulpa así obtenida se escurre y resuspende en NaOH 1 M y se deja así durante 1 hora, tras la cual se lava con agua destilada - - hasta que se alcanza de nuevo el pH 7. Entonces se seca al aire para su almacenamiento y conservación a 4°C tras lavarla con tampón fosfato SORENSEN 10⁻² M.

La cromatografía se realiza en unas columnas diseñadas al efecto que poseen dos compartimentos comunicados por un gran número de pequeños agujeros. En el compartimento superior se introducen 0,5 g de celulosa resuspendida en 15 ml de agua destilada y se centrifuga en MARTIN-CRISS a - aproximadamente 150 x g. Una vez formada la pastilla la columna está lista para la carga y elución del DNA.

La carga de DNA no debe de ser superior a 500 μg para seguridad en su funcionamiento y no inferior a 150 μg para la defeción y cuantización de las fracciones espectrofotométricamente. Cuando se trata de DNA - marcado isotópicamente la cantidad será dependiente de la actividad específica del DNA pero siempre muy inferior al caso de DNA no marcado. Las condiciones en las que tiene que encontrarse el DNA se reducen a: Fuerza - - iónica inferior o igual a 0,2 M Na⁺ y pH próximo a 7.

En las condiciones de carga descritas el DNA se retiene en la - pastilla, se pasa a continuación 10 ml de cada una de los eluyentes que -

aparecen a continuación, acelerando su paso por centrifugación y los eluidos se recogen en la parte inferior de la columna de donde se extraen antes del paso del siguiente eluyente. En estos eluidos se determina la cantidad de DNA por espectrofotometría o contaje en centelleo líquido. A partir de estos valores se determina el porcentaje en peso de muestra de cada eluyente. Cada eluyente tiene asignado un peso molecular, de esta forma se puede calcular la contribución al peso molecular medio del DNA de cada una de las fracciones además de su peso molecular: $PM_m = \sum 0,0A_i \times PM_i$; donde $0,0A_i =$ tanto por 1 de la fracción i y $PM_i =$ peso molecular de la fracción i .

<u>ELUYENTE</u>	<u>COMPOSICION</u>	<u>PM x 10⁶</u>
1	0,01M Fosfato (sorensen) pH=7,0	--
2	0,01M " " " 0,14M NaCl	--
3	0,01M " " " 0,50M NaCl	0,5
4	0,01M " " " 1,50M NaCl	0,5
5	2M NaCl 0,2M NH ₄ OH pH = 10,9	2
6	2M NaCl 0,4M NH ₄ OH pH = 11,1	6
7	2M NaCl 1,0M NH ₄ PH pH = 11,4	17
8	1.0M NH ₄ OH pH = 14,0	50

II.3.- Irradiaciones y dosimetrías.

II.3.1.- Descripción de los sistemas de irradiación empleados.

Se utilizaron dos tipos de lámparas que proporcionan luz U.V. - para la irradiación de DNA: Lámparas de alta presión de Xenon, que se caracterizan por producir un espectro continuo de luz U.V. y lámparas de baja presión de Mercurio que producen esencialmente luz U.V. a 254 nm.

Las lámparas de Mercurio utilizadas fueron del modelo PEN-RAY - cuyo espectro analizado en un espectrografo de emisión utilizando como patrón de referencia el espectro del hierro, demostró no sólo la enorme proporción de luz U.V. de 254 nm frente a otras minoritarias, sino también la pureza del gas contenido en la lámpara. Con estas lámparas se utilizó un dispositivo que permitía el uso de dos de estas lámparas que iluminaban sendas caras de una cubeta de cuarzo de 2 cm de paso óptico en la que se irradiaron muestras de 5 ml. con una superficie total expuesta a la luz de 439 mm².

Las lámparas de Xenon se utilizaron en un monocromador de alta intensidad BAUSCH and LOMB. La monocromación utilizada fue tal que por cada unidad de intensidad de la longitud de onda deseada se deja pasar también 0,5 unidades de esa longitud de onda ± 5 nm y 0,1 unidad de esa longitud de onda ± 10 nm. En este dispositivo se empleó una cubeta de 1cm de paso óptico en la que se irradiaron muestras de 2 ml y con una superficie de exposición de 90 mm².

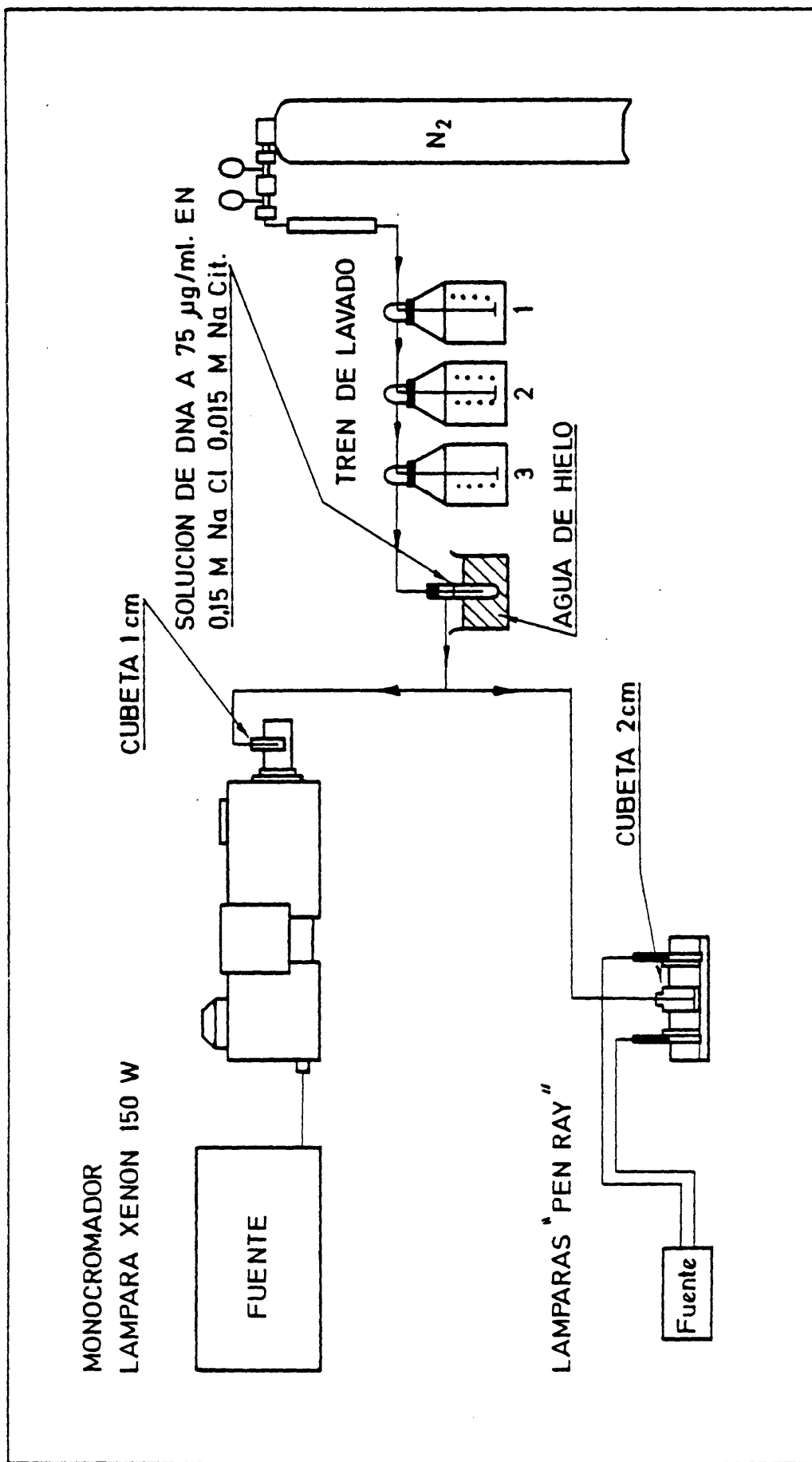


FIG. II - 5 - DISPOSITIVOS DE IRRADIACION

Ambos dispositivos, el de las lámparas de Mercurio y el de la lámpara de xenon aparecen esquematizados en la Fig.-II-5.

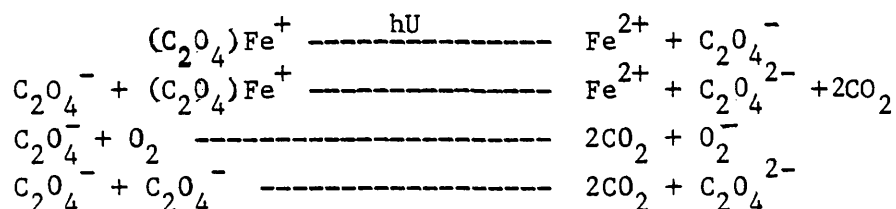
Las condiciones a que fueron sometidas las soluciones de DNA - para su irradiación, se pensaron en orden a dos intenciones principales; de una parte se puso el DNA en condiciones en las que no ocurriesen otros tipos de reacciones fotoquímicas que dieran lugar a otras secundarias que afectaran al DNA. En este sentido se puso especial énfasis en la eliminación del oxígeno disuelto en la solución para lo que la solución de DNA en SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M Citrato sódico) y las muestras que se están irradiando se someten a un burbujeo de nitrógeno (59) libre de oxígeno, 30 min antes de la irradiación en baño de hielo y después continuamente durante la irradiación. El nitrógeno se libera de oxígeno y se humedece - previamente mediante su paso a través de un tren de lavado, que está formado por una solución acuosa de sal sódica de antraquinona-2-sulfonato e hidrosulfito sódico en hidróxido sodico, seguida de dos frascos lavadores que contienen agua destilada.

De otra parte, la concentración de las soluciones de DNA empleada para la irradiación fué de $75 \mu\text{g/ml}$, es decir, una solución de DNA que está a 1,5 U.O. de absorción a 260 nm. Así se asegura la absorción de la mayor parte de la luz incidente para casi todas las longitudes de onda estudiadas.

II.3.2.- Dosimetría química basada en la reducción de ferrioxalato potásico. (JAGGER, J.) (PARKER, C.A.; 1953) (PARKER, C.A.; 1954) (HATCHARD, C.G. y PARKER, A.; 1956).

De los tres tipos de dosimetrías empleadas, la basada en la reducción del ferrioxalato potásico en medio ácido es un tipo de actinometría - sensible no sólo a la luz U.V. sino también a la luz visible por lo que las determinaciones han de realizarse en la oscuridad.

La reducción fotoquímica del Fe^{3+} se produce por la transferencia fotoinducida de un electrón desde uno de los ligandos oxalato del complejo ferrioxalato potásico hasta el Fe^{3+} . Esta reducción va acompañada de la formación de un radical ión oxalato que dependiendo de las circunstancias experimentales tiene varios caminos para su estabilización:



La mayor o menor importancia de las dos últimas reacciones hace que el rendimiento cuántico de formación de Fe^{2+} se aparte del valor teórico de 2. Sin embargo después de los trabajos de Parcker y otros (C.A. - PARKER; 1953, 1954. HATCHARD, C.G. and PARKER, C.A. 1956) se conocen con toda precisión los valores reales de dichos rendimientos para amplias zonas del espectro.

A continuación en la Tabla-II-5 se exponen los resultados obtenidos por estos autores en la determinación del rendimiento cuántico de la reacción a diferentes longitudes de onda y por diferentes métodos. Como se observa el valor del rendimiento cuántico en la zona del U.V. estudiada y que es la que nos interesa, permanece constante.

TABLA-II-5.

Rendimientos cuánticos de la reducción fotoinducida del ferrioxalato potásico en las condiciones utilizadas en función de la longitud de onda.

λ nm	C.A.Parker (1953)	Por comp. con Act. de Ura. C.G.Hatchard (1956)	Por comp. con Termopila cal. C.G.Harchard (1956)	Por comp. con Ferrioxalato a 436nm usan do termo. cal. C.G.Harchard (1956)	Valores utilizados en: Moles/Einst.
436	--	1,12	1,11	1,11	1,11
405	--	1,14	1,18	1,13	1,14
365/6	--	1,16	1,26	1,22	1,21
361/6	--	--	--	--	--
334	--	1,25	--	1,21	1,23
313	--	1,23	--	1,24	1,24
302	1,21	--	--	--	1,22
297/302	--	1,24	--	--	--
280,4	1,23	--	--	--	1,23
265,4	1,23	--	--	--	1,23
257,0	1,24	--	--	--	1,24
254,0	1,23	1,22	--	1,29	1,247

Los cristales de ferrioxalato potásico se preparan mezclando 3 volúmenes de 1,5 M oxalato potásico y un volumen de 1,5 M cloruro férrico con agitación. El ferrioxalato potásico precipitado se recrystaliza tres veces desde agua caliente secando en corriente de aire a 45°C . Todo el proceso debe llevarse a cabo en la oscuridad o bajo luz de lámparas rojas y en todo caso de longitud de onda superior a 500 nm.

La solución actinométrica se prepara ajustando a 0,0006 M ferrioxalato potásico en sulfurico 0,1 M. La solución así preparada debe conservarse en la obscuridad y en frascos de color topacio. El desarrollo de color se produce al añadir 1/6 del volumen irradiado de solución 1,10 fenantrolina al 0,1% Peso/Volumen, 1,8 N acetato sódico en sulfúrico 1,08 N. La mezcla de reacción da un pH de 3,5. El desarrollo de color es prácticamente instantáneo aunque sin embargo se esperó siempre 30 min antes de medirlo a 510 nm frente a un blanco no irradiado. Se utilizó a tal fin un SPECTRONIC -SP - 700. Aunque la agitación no es estrictamente necesaria se agitó por burbujeo de nitrógeno libre de oxígeno.

La respuesta espectrofotométrica es lineal hasta un valor de absorción de 0,7 en cubetas de 0,5 cm de paso óptico y por encima de 1,0 en cubetas de 1 cm a 4 cm de paso. Una absorción de 1,0 en cubeta de 1 cm de paso se produce por una concentración de Fe^{2+} de $9,05 \times 10^5 M$. lo que supone un coeficiente de extinción molar de 11.050. Una absorbancia de 0,002 en cubeta de 1 cm de paso, representa $6,3 \times 10^{-10}$ moles de ferroso como límite inferior de detección. En la práctica cantidades de ferroso del orden de 100 veces más pueden ser detectadas con un error del orden del 1 al 2%. En definitiva pues, en la práctica la solución actinométrica debe de irradiarse el tiempo suficiente para producir una concentración de ferroso entre 5×10^{-9} y 3×10^{-6} moles/ml.

La calibración se realizó utilizando cantidades diferentes de sulfato ferroso en sulfurico 0,1 N y realizando las oportunas diluciones. La solución madre del sulfato ferroso se preparó cada vez que se deseó hacer una calibración.

A partir de los micromoles de ferroso producido, el cálculo de la tasa de fluencia energética en $ergios/mm^2s$ se realiza teniendo en cuenta

el volumen tras el desarrollo de color, el tiempo de irradiación, la superficie expuesta al haz de luz, el valor del Einstein a esa longitud de onda y el rendimiento cuántico. Es decir:

$$\text{Tasa de Fluencia Energética} = \frac{(\text{Fe}^{2+}) V E(\lambda)}{S \phi} = \text{Ergios mm}^{-2} \text{ s}^{-1}.$$

(Fe^{2+}) = moles Fe^{2+} /ml s

V = Volumen en ml.

$E(\lambda)$ = Einstein (λ) en Ergios

S = Superficie en mm^2

ϕ = Rendimiento cuántico en Moles/Einstein (λ)

II.3.3.- Dosimetría química basada en la reducción de la Leucobase de Verde de Malaquita (L.V.M.). (HARRIS, L. et al. 1935) (JOHNS, H.E. 1969)

Harris et al. (1935) demostraron las ventajas que la leucobase de verde de malaquita poseía para su uso en actinometrías en la zona U.V., frente a otras leucobases que también absorben luz ultravioleta. Los cristales de L.V.M. son del orden de 30 veces más solubles en soluciones alcohólicas, además poseen una banda bien definida en la zona U.V. entre 330 nm y 220 nm así como que producen un fotoproducto estable en soluciones alcohólicas a pH ácido que es de color verde, lo que le hace más fácilmente medible. En efecto el fotoproducto formado posee una banda de absorción con un máximo bien definido a 622 nm. La absorción molar a 622 nm de este fotoproducto es muy alta 106.300 según datos de Fisher et al (1967).

El rendimiento cuántico de la reacción fotoquímica ha sido estudiado sucesivamente por tres grupos de trabajo. Los valores obtenidos por todos ellos aparecen en la Tabla-II-6. De su comparación queda clara la no dependencia del rendimiento cuántico con la longitud de onda en la zona U.V. desde 300 nm hasta 225 nm. El valor en esta zona es muy próximo a 1,00. Sin embargo los datos más recientes encontrados por Fisher et al. (1967) dan valores de $0,91 \pm 0,01$. La diferencia con los otros autores está también en el coeficiente de absorción molar del fotoproducto a 622 nm ya que los otros autores utilizan como valor de este coeficiente y a 620 nm 94.900. En nuestro trabajo hemos utilizado los valores de Fisher.

El coeficiente de absorción molar de la L.V.M. es de 5×10^3 o mayor entre 220 nm y 313 nm. A longitudes de onda mayores la absorción es

muy pequeña, por lo que no puede ser usado como dosímetro en la zona del visible y en la práctica su uso no es recomendado por encima de 320 nm.

La solución actinométrica se prepara disolviendo la L.V.M. en etanol redestilado ya que cualquier impureza presente en el etanol y que absorba en la zona U.V. puede afectar a la medida realizada. El metanol se ajusta a 1 mM HCl. La acidez comunicada por el HCl estabiliza el fotoproducto formado durante la irradiación. La solución se ajusta a 1,5 UO a 270 nm. Dado el espectro de absorción de la L.V.M. es necesario después tener en cuenta un factor de absorción para cada longitud de onda.

TABLA-II-6

Rendimientos cuánticos de la reducción fotoinducida de la L.V.M. en las condiciones utilizadas en función de la longitud de onda

λ nm	Por comp. con termopila cal. Harris and Kaminsky (1935)	Por comp. con termopila cal. Calvert and Reichen (1952)	Por comp. con termopila cal. Fisher et al. (1967).
225	--	--	
248,7	1,046	--	
253,7	1,003-0,013	1,00-0,02	0,91 ⁺ -0,01
265,4	1,007-0,012	1,01-0,02	
280,4	--	0,90	
296,7	0,994	--	
313,0	0,995-0,018	0,99-0,03	
334,2	0,985		

La L.V.M. se prepara a partir del oxalato de verde de malaquita y de cianuro potásico. El crudo obtenido se purifica por cristalizaciones y destilaciones sucesivas.

El cálculo de la tasa de fluencia energética, en ergios/ mm^2 S, a partir del número de moléculas de fotoproducto formado es función del volumen de solución actinométrica irradiada, del coeficiente de absorción molar del fotoproducto y de la absorción del fotoproducto formado además del número de Avogadro. Es decir;

$$N^{\circ} \text{ de molec transf} = A_{622} (1/E_{622}) V \cdot N$$

A_{622} = Absorción del fotop.

E_{622} = Coef. abs. molar del fotop.

V = volúmen en litros

N = $6,002 \times 10^{23}$ molec x mol⁻¹

El número de fotones absorbidos está relacionado con el número de moléculas transformadas mediante el rendimiento cuántico y el número de fotones incidentes con el de absorbidos por un factor de absorción que tiene en cuenta el espectro de absorción de la L.V.M. Es decir;

$$N^{\circ} \text{ de fot. inc.} = \frac{A_{622} V N}{E_{622} \phi} \quad \text{donde } \phi = n^{\circ} \text{ de molec. trans/fotón abs.}$$

$$n^{\circ} \text{ de fot. inc.} = n^{\circ} \text{ de fot. abs.} / \text{Factor de abs.}$$

$$\text{donde fact. de abs.} = (1 - e^{-2,30 A \cdot b_0})$$

es decir:

$$N^{\circ} \text{ de fot. inc.} = \frac{A_{622} V N}{E_{622} \phi F}$$

Si ahora pretendemos saber la energía que supone este número de fotones incidentes en unidades de tasa de fluencia energética, tendremos en cuenta la energía de los fotones a la longitud de onda de que se trate así como la superficie expuesta a la radiación y el tiempo de irradiación, o sea:

$$E = n^{\circ} \text{ de fotones inc.} \cdot h \nu$$

h = Const. de Planck = $6,22 \times 10^{-27}$ ergios x s
 ν = Frecuencia de la luz = c/λ
 c = Vel. de la luz = 3×10^{10} cm/s
 λ = Long. de onda en cm = $\lambda_{nm} \times 10^{-7}$ cm.

$$E = \frac{A_{622} V N h c}{E_{622} \phi F \lambda}$$

Siendo la superficie de irradiación en mm² y t el tiempo de irradiación en segundos queda:

$$E_i = \frac{N h c}{E_{622} \phi F \lambda_i} \times \frac{A_{622} V}{S t}$$

Agrupando constantes y poniendo el volúmen en ml, queda:

$$E_i (\text{Ergios/mm}^2 \text{ s}) = \frac{11,65 \times 10^6}{\lambda_i F} \times \frac{A_{622} V}{S t}$$

Los factores de absorción se calcularon estudiando la absorción a las diferentes longitudes de onda del espectro U.V. de una solución de L.V.M. ajustada a una absorción máxima de 1,5 a 270 nm. En la Tabla-II-7 que aparece a continuación aparecen estos factores en función de la longitud de onda así como el valor de la constante que queda en el primer término de la fórmula anterior, es decir el valor de $11,65 \times 10^6 \lambda_i F$.

TABLA -II- 7.

Factores de absorción a diferentes longitudes de onda y constantes para el cálculo de la tasa de fluencia energética según la ecuación anterior

λ nm	$F = (1 - e^{-2,30 A_i})$	$C_i = 11,65 \times 10^6 / \lambda_i F_i$
230	0,763	$6,62 \times 10^4$
240	0,642	$7,54 \times 10^4$
250	0,822	$5,65 \times 10^4$
254	0,910	$5,02 \times 10^4$
260	0,943	$4,74 \times 10^4$
270	0,968	$4,45 \times 10^4$
280	0,899	$4,62 \times 10^4$
290	0,655	$6,12 \times 10^4$
300	0,528	$7,13 \times 10^4$
310	0,494	$7,59 \times 10^4$
320	0,421	$8,63 \times 10^4$

II-3-4.- Dosimetría química basada en la reducción del oxalato de uranilo (GLICK LEIGHTON, W. y SHANNON FORBES, G.; 1930) (BRACKETT, F.P. y FORBES, G.S. 1933)(FORBES, G.S. y HEIDT, L.J.; 1934).

La fotólisis del oxalato de uranilo, por reducción de éste y de la composición del oxalato ha sido muy utilizada en fotoquímica debido sobre todo a las ventajas que presenta sobre la de ferrioxalato potásico. Estas son principalmente las derivadas de que el rendimiento cuántico de la fotólisis del oxalato de uranilo caiga bruscamente a partir de 460 a 480 nm para dar un valor de cero a 500 nm. Es decir, su gran insensibilidad a la luz visible.

Por los trabajos de Forbes G.S. (W.G. Leighton and G.S. Forbes; 1930, F.P. Brackett and G.S. Forbes; 1933 y G.S. Forbes and L.J. Heidt; - 1934) se conocen hoy perfectamente los valores de los rendimientos cuánticos en una amplia zona del espectro U.V.. Ver Tabla-II-8. Además estos se han determinado con soluciones de diferentes concentraciones de uranilo y oxalato y a diferentes temperaturas por lo que se conocen también las condiciones de máxima sensibilidad y rendimiento de la reacción. El método no

es aconsejable sin embargo para longitudes de onda por debajo de 210 nm.

TABLA-II-8

Rendimientos cuánticos de la reducción fotoinducida del oxalato de uranilo en función de la longitud de onda y de las condiciones de temperatura

λ nm	0,01 M UO_2SO_4 0,05 M $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_2$ Leighton and Forbes 1930 25° 9,8°C	0,01 M UO_2SO_4 0,05 M $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_2$ Brackett and Forbes 1933 28°C	0,01 M UO_2SO_4 0,05 M $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_2$ Forbes and Heidt 1934	0,02 $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{-CO}_2)$ 0,10 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_2$ Valor utilizado en este trabajo a tem peratura ambiente.
208		0,48		
210			0,51	
240				0,62
253		0,63		
254			0,64	0,62
255	0,60			
260				0,62
265	0,58			
278		0,59		
279			0,59	
280				0,62
300	0,57			0,62
313	0,56 0,53		0,56	
366	0,49 0,47			
406	0,56			
435	0,58			
460	0,40			
494	0,00			

En nuestro caso se utilizó acetato de uranilo en lugar de sulfato de uranilo a una concentración final de 2 mM en oxalico 10 mM. Las soluciones madres 4 mM acetato de uranilo y 20 mM oxalico se conservan en frascos de color topacio. La determinación del ácido oxalico descompuesto se realiza mediante permanganimetría, utilizando una bureta automática ABU-12 y un - - peachimetro automático pHM-64 ambos de Radiometer.

A partir del cálculo de los miliequivalentes de permanganato consumidos, el cálculo de la fluencia energética se realiza teniendo en cuenta el volumen valorado, el volumen de muestra irradiado, la superficie de exposición de la cubeta, el tiempo de irradiación y el rendimiento cuántico de la reacción. Para el caso de tasas en $\text{ergios/mm}^2 \text{ S}$:

Sea:

v = volumen de muestra valorada en ml.

v^{\wedge} = volumen de permanganato consumido en ml.

V = volumen de muestra irradiado en ml.

(c) = concentración del permanganato utilizado en la valoración en meq ml^{-1}

\emptyset = Rendimiento cuántico en Moles Einstein $^{-1}(\lambda) = 0,62$ Moles Einstein $^{-1}$

A = valor en ergios de un Einstein (λ) de fotones, en ergios Einstein $^{-1}$

S = la superficie de irradiación en mm^{-2}

t = tiempo de irradiación en segundos.

$$\text{Fluencia Energética} = \frac{v^{\wedge} \text{ml} \cdot (c) \text{meq} \times \text{ml}^{-1} \cdot V \text{ml} \cdot 0,5 \text{mmoles} \cdot \text{meq}^{-1}}{v \text{ml} \cdot 0,62 \text{ moles} \cdot \text{E}^{-1}} \cdot \frac{10^{-3} \text{ moles} \cdot \text{m} \text{mol}^{-1} \cdot A \text{ erg} \cdot \text{E}^{-1}(\lambda)}{S \text{ mm}^2 \cdot t \text{ seg.}}$$

Agrupando constantes queda:

$$\text{Flu. } \frac{n.}{\text{eng}} \text{ en Erg } \text{mm}^{-2} \text{ seg}^{-1} = \frac{v^{\wedge}}{t} \left(\frac{(c) \cdot V \cdot 0,5 \cdot 10^{-3} \cdot A}{v \cdot 0,62 \cdot S} \right).$$

II-3-5. Determinación del flujo fotónico. Estudio comparativo.

La determinación de la fluencia fotónica de los diversos sistemas de irradiación empleados se llevó a cabo mediante los tres tipos de dosimetrías que han sido ya descritas ampliamente en el apartado II-3(2-4). Estas han sido: la actinometría basada en la reducción del ferrioxalato potásico, la basada en la reducción de la leucobase de verde de malaquita y la basada en la reducción del oxalato de uranilo.

Mediante estas tres dosimetrías se obtienen los datos relativos a la intensidad del haz de fotones que llega a la superficie de la cubeta de irradiación de cada sistema empleado. El tipo de cálculo en cada caso se ha detallado también oportunamente en el apartado II-3(2-4). La técnica dosimétrica más empleada tanto por su rapidez como por su sencillez y comodidad ha sido la que utiliza la leucobase de verde de malaquita. Cualquiera de las otras dos lo han sido en menor grado. De cualquier forma en la Tabla-

II-8 se detalla el estudio comparativo de los resultados obtenidos por - estos tres métodos en la determinación de la tasa de fluencia energética para tres longitudes de onda del espectro U.V. Los valores expuestos son la media de los valores obtenidos con determinaciones independientes realizadas en días diferentes durante un periodo de tiempo en algunos casos de varios meses. El margen de error en estas determinaciones expresado - entre paréntesis en la parte superior de las columnas, relativas a cada técnica, representa pues un error que incluye, no solamente el error estadístico experimental de una determinación, sino también el debido a - las posibles fluctuaciones de las lámparas, posicionado de las cubetas, preparación de las soluciones, errores propios de los equipos de medida utilizados.. etc. a lo largo del tiempo en que se hace la comparación. - Es por tanto este error una medida de la estabilidad del sistema de irradiación.

El error estadístico propio de cada técnica en una determinación es naturalmente menor y aparece en último lugar en las columnas. La media de los valores medios obtenidos así por las tres técnicas usadas aparecen en una cuarta columna y como se ve el error relativo está dentro del margen de los errores relativos de cada técnica. Es decir, la coincidencia - de los resultados de evaluación de la tasa de fluencia energética por cualquiera de los tres métodos es muy buena.

En esta misma Tabla se indican también los tiempos de irradiación necesarios para que con estos órdenes de magnitud de tasa de fluencia se realice una buena medida en cada técnica. Como se observa son necesarios tan sólo del orden de segundos (15 a 20) para la detección del fotoproducto formado en la reacción fotoquímica de la leucobase de verde de malaquita. Son necesarios varios minutos en el caso de la actinometría de ferrioxalato potásico y del orden de horas para tener buena sensibilidad con la técnica del acetato de uranilo. Si a esto le unimos además - el error menor en la determinación por el método de la leucobase de verde de malaquita (1-2%) muy parecido al del acetato de uranilo (1-3%) en comparación con el error de las determinaciones del ferrioxalato potásico - (2-10%) y tenemos en cuenta la simplicidad metodológica de la leucobase de verde de malaquita (irradiación y medida directa de la absorción del

TABLA -II- 3 - 9.

COMPARACION DOSIMETRIAS QUIMICAS U.V.		TASAS DE EXPOSICION EN ERGIOS $\text{mm}^{-2}\text{seg}^{-1}$			
λ_{nm}	L.V.M. (5-10%)	FERRIOX. (5-10%)	Ac. Uranilo (7-12%)	MEDIA	% error
300	22	20	20	20	5
280	12	12	10	12	10
260	6,4	6,8	6,7	6,6	3
Tiempo de irradiación	15-20 seg	1-30 min	1-5 horas		
Error en la determinación	1-2 %	2-10 %	1-3 %		

fotoproducto formado) comparada con la del acetato de uranilo (irradiación y valoración por permanganimetría) y sobre todo la del ferrioxalato (irradiación, reacción colorimétrica, medida del color desarrollado, y todo ello en la oscuridad) queda justificada la elección de la técnica de determinación dosimétrica por la que utiliza la leucobase de verde de malaquita como técnica de medida y comprobación rutinaria de la tasa de fluencia U.V. en nuestros sistemas de irradiación.

A partir de los estudios de la tasa de fluencia incidente se puede calcular la fluencia media incidente o exposición en una muestra de DNA que está siendo irradiada, al tener en cuenta por una parte el tiempo de irradiación y por otra el apantallamiento producido por unas moléculas - sobre otras y que viene condicionado por la absorción de la solución a la longitud de onda a la que estamos irradiando. En la Tabla-II-10 se especifica la absorción de la solución de DNA a cada longitud de onda del espectro U.V. así como la corrección de estas absorciones por la ponderación - realizada al considerar que para cada longitud de onda debido a la rendija utilizada en el monocromador (a excepción de 254nm) la composición del haz es tal que por cada unidad de intensidad de luz de la longitud de onda considerada existe además 0,5 unidades de esa longitud de onda ± 5 nm y 0,1 unidades de esa longitud de onda ± 10 nm.

Ya indicamos anteriormente (Apartado-II-3-5) como el número de fotones absorbidos (ΔN_{abs}) estaba relacionado con el de fotones incidentes (ΔN_i) por un factor de absorción $F_{abs} = (1 - e^{-2,30A})$ cuando el paso óptico es de 1 cm.

$$\Delta N_{abs} = \Delta N_i \quad F_{abs} = \Delta N_i (1 - e^{-2,30A}) = \Delta N_i (1 - \exp(-2,30A))$$

Esta ecuación nos dá el número de fotones absorbidos en la primera capa de fluido. Supongamos ahora que agitamos suficientemente la solución como para que cada molécula (n/cm^3) esté expuesta a la misma fluencia \bar{L} . Si el volumen del líquido es V y la sección eficaz de absorción σ_a , entonces el número total de fotones absorbidos por las nV moléculas será:

$$\Delta N_{abs} = \bar{L} \cdot nV \cdot \sigma_a$$

Usando la relación entre la σ_a y la A ya citada anteriormente $\sigma_a = 2,30A/n$

$$\Delta N_{abs} = \bar{L}(2,30) \cdot A/b \cdot V$$

Es decir, podemos poner

$$\Delta N_i \cdot F_{abs} = \bar{L} \cdot 2,30 \cdot A \cdot V$$

TABLA -II- 3 - 10

λ_{nm}	A	A \pm 10nm	Factor 1 : $\bar{L}=FxL$	% Luz Abs.	Factor 2: Factor 1 x % LA
300	0,07	0,10	0,89	20,2	0,18
280	0,82	0,82	0,44	84,9	0,37
260	1,50	1,46	0,29	96,4	0,28
254	1,48		0,29	96,7	0,28
240	0,96	0,98	0,40	89,5	0,36

A $\bar{\pm}$ 10 = 100% A $\bar{\pm}$ 0nm + 50% A $\bar{\pm}$ 5nm + 10% A $\bar{\pm}$ 10nm.

Factor 1 = Factor de conversión de la fluencia incidente en fluencia media. Tiene en cuenta el apantallamiento de las moléculas según la absorción.

$$F = (1 - \exp(-2,30A)) / 2,30A.$$

% de luz abs. = según A = $\log I_0/I$

Factor 2 = Factor de conversión de la fluencia incidente en dosis media abs.

Es decir

$$\bar{L} = (\Delta Ni/V) \cdot F_{abs}/2,30A = L \cdot F \quad \text{donde } F = F_{abs}/2,30A$$

Es decir que la fluencia fotonica media es igual a la fluencia incidente por un factor de absorción que tiene en cuenta el apantallamiento de las moléculas a lo largo de la cubeta de irradiación.

Los valores de este factor de transformación de la fluencia en fluencia media, calculados a partir de los valores de absorción ponderados para cada longitud de onda, aparecen en la Tabla-II-10.

El cálculo de la dosis media absorbida en función de la fluencia media o exposición se realiza teniendo en cuenta el % de luz que se absorbe para cada longitud de onda a lo largo del paso óptico de la cubeta, según la expresión $A = \log I_0/I$. Como se observa en la columna que especifica el % de luz absorbida y dado el espectro del DNA se obtiene un rendimiento superior al 85% en todas las longitudes de onda estudiadas a excepción de 300 nm, al poner la solución de DNA a una concentración de 1,5 U.O./ml. El factor de conversión de la fluencia incidente en dosis absorbida se obtiene al calcular el % de luz absorbida sobre la fluencia media incidente o exposición.

II-4.- Degradaciones controladas de DNA.

II-4-1.- Degradaciones haplotómicas.

La ausencia de roturas simples intracadena en los DNAs aislados si bien permiten obtener DNAs de alto peso molecular, pueden resultar a veces puntos de partida no adecuados en experiencias de seguimiento de degradaciones de DNA por mecanismos haplotómicos. (Es decir, por producción de roturas simples y fractura del DNA por coincidencia de estas en ambas cadenas). En estos casos y en los que se necesita muestras de DNA cuya distribución de pesos moleculares sea la que se obtiene por estos mecanismos degradativos se utilizaron DNAs de alto peso molecular a los que se trata previamente con DNasa-1, enzima que produce roturas simples intracadena hasta que se alcanza un peso molecular compatible con la densidad de roturas simples suministrada.

El seguimiento de la degradación se realiza en un viscosímetro

tipo Zimm-Crothes (Ver II-5-1) en el que se pone una mezcla de reacción de igual relación enzima/substrato que la solución de DNA que está tratándose. El solvente utilizado fue 0,05 M TRIS-HCl pH=7,5 0,005 M $MgCl_2$ y 0,15 M NaCl. Cuando la reacción ha llevado al DNA al peso molecular deseado, se para añadiendo al DNA un volumen igual de fenol recientemente destilado y saturado con solución 0,15 M NaCl 0,015 M citrato sódico más 1/10 del volumen de EDTA 1M. La emulsión se alcanza por agitación 10 min en frío; tras centrifugación la capa acuosa que contiene el DNA se dializa exhaustivamente para retirar el fenol. Los detalles de los ensayos de actividad DNAsica aparecen en el apartado II-7-2.

II-4-2.- Degradaciones diplotómicas.

Por degradaciones diplotómicas del DNA entendemos la fractura mecánica de ambas cadenas de DNA a la altura del mismo par de bases. Entre las causas principales de este tipo de degradación están, de un modo generalizado las fuerzas de zizalla. El paso de soluciones de DNA a través de orificios estrechos bajo presión produce estas fuerzas tangenciales que ocasionan la rotura mecánica del DNA. La agitación violenta con cuchillas u homogeneizadoras dá el mismo resultado. Por último los ultrasonidos producen también este efecto si bien hemos de considerar la posibilidad de que simultáneamente se estén produciendo también roturas simples intracadena.

De cualquier forma los tres procesos han sido utilizados en este trabajo en orden a obtener degradaciones controladas de DNA de modo diplotómico. Así se han utilizado jeringas con diferentes diámetros de salida, homogeneizadores de tipo VIRTIS y un equipo de ultrasonidos SONIFIER Mod. W-185-D. Normalmente se utilizó el paso a través de jeringas para las degradaciones hasta del orden de 8×10^6 daltons entre 8 y 4×10^6 daltons - se utilizó el homogeneizador VIRTIS y para pesos moleculares inferiores se utilizó el ultrasonido.

II-5.- Determinaciones fisicoquímicas del DNA.

II-5-1.- Viscosimetría.

Las medidas de viscosidad se han realizado en un viscosímetro tipo

Couette, el "Low Shear Viscometer" de Beckman. Consiste en esencia en dos tubos cilíndricos entre los que se coloca la muestra. El cilindro exterior fijo, está encamisado para su termostatación. El cilindro interior tiene en el fondo una pequeña pieza de acero y flota libremente permaneciendo centrado por la tensión superficial del menisco. Este cilindro interior es capaz de girar al aplicarle un momento magnético constante mediante un imán rotante exterior.

Este viscosímetro, semejante en todo al modelo A descrito por Zimm y Crothers (ZIMM, B.H. y CROTHERS, D.M.; 1962), abarca un rango de tensión tangencial desde 0,0001 a 0,3 dinas/cm² con lo que al trabajar a concentraciones bajas de DNA, entre 10 y 20 µg/ml se evitan las extrapolaciones a concentración y fuerza tangencial cero, por ser la viscosidad intrínseca en estas condiciones independiente de dichos parámetros experimentales.

A pesar de ello se ha utilizado la expresión de Huggins (HUGGINS, L.M.; 1942) para la corrección de la dependencia de la viscosidad específica medible en el viscosímetro con la concentración

$$\eta_{\text{esp}}/C = (\eta) - K' (\eta)^2 C \text{ siendo } K' = 0,5$$

η_{esp} = Viscosidad específica
 C = Concentración
 (η) = Viscosidad intrínseca.

Han sido propuestas una gran variedad de correlaciones empíricas entre (η) y peso molecular de DNA; entre las más utilizadas está la de CROTHERS y ZIMM (1965) que cubre un rango de peso molecular entre 1 y 130×10^6 daltons

$$0,665 \log M = 2,863 + \log ((\eta) + 5)$$

M = Peso Molecular
 (η) = Viscosidad intrínseca

Todas las medidas de determinación de peso molecular por viscosimetría fueron realizadas a 25°C en solución SSC. Tanto la solución de referencia como la del DNA se filtraron previamente. La limpieza del viscosímetro es esencial y crítica en cualquier determinación en este tipo de aparato. La concentración de las soluciones fué medida espectrofotométricamente en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP 700.

Cuando se realizaron seguimientos cinéticos de degradación de DNA por mecanismos haplotómicos (en nuestro caso por agentes enzimáticos) se utilizó un viscosímetro como el descrito pero equipado con un sistema auto

mático de medida de tiempos de revolución del cilindro interior (rotor) y de tiempo acumulado durante el transcurso de la cinética.

El tampón utilizado para el caso de la enzima DNasa-I, 0,015 M TRIS-HCl pH=7,5 0,010 M MgCl₂ 0,15 NaCl. En este solvente la correlación entre viscosidad intrínseca y peso molecular del DNA fué ya establecida anteriormente (ACUÑA, M.I., MINGOT, F. y DAVILA, C.A. 1976):

$$0,637 \log M = 2,717 + \log ((\eta) + 5)$$

La expresión de Huggins utilizada anteriormente en la correlación de la viscosidad específica con la concentración de la solución es sólo válida hasta concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$. Cuando en cinéticas viscosimétricas se utilizaron concentraciones más altas de DNA (en general del orden de 70 a 100 $\mu\text{g/ml}$) se utilizó la expresión de Crothés (CROTHERS, D.M. y ZIMM, B.H.; 1965) que es válida hasta concentraciones de 200 $\mu\text{g/ml}$:

$$\ln \eta_{\text{rel}} / C = (\eta)$$

η_{rel} = Viscosidad relativa
 C = Concentración
 (η) = Viscosidad intrínseca

Supuesto perfectamente limpio el viscosímetro y las soluciones - las fuentes de error en la medida experimental son: de una parte la determinación de la concentración del DNA y de otra la variación o el error cometido en la medida del tiempo de vuelta de una llenada a otra.

En cuanto a la determinación de la concentración el error cometido al hacer los espectros llenando varias veces la cubeta con la solución es del 0,2 %. El error de medida de los tiempos de vuelta se minimiza al encontrar las condiciones de trabajo (intensidad del campo magnético y volumen de llenado) a las que las variables experimentales, en concreto el volumen de muestra añadida juega el menor papel posible. Así el error cometido en varias llenadas diferentes fué del 0,6 % en la zona de volumen de menor dependencia. En definitiva, la determinación de la (η) se obtiene con un error del 1,4 %.

En cuanto a la estabilidad del viscosímetro automático, tras su calibración y puesta a punto, se aceptó una situación en la que muestreando uno de cada 10 valores de tiempo de vuelta obtenidos durante 16 h ininterrumpidas de funcionamiento se obtuvo un error del 0,6% para el solvente y de 0,1 % para una solución de DNA de η_{rel} de 3,70, es decir, de un tiempo de vuelta de 235 s.

II-5-2.- Sedimentación de DNA nativo y desnaturalado

La obtención de pesos moleculares de DNA nativo y desnaturalado se realizó mediante ultracentrifugación analítica por el método de velocidad de sedimentación en una ultracentrifuga analítica provista de un espectro fotometro U.V. y de un registrador electrónico. El modelo E de Beckman.

El coeficiente de sedimentación de las muestras se calculó a partir de la pendiente de la recta que ajusta los valores del logaritmo neperiano de la distancia en centímetros desde el eje de giro al punto medio del límite de sedimentación frente al tiempo de rodada en segundos, dividida por el cuadrado de la velocidad angular. Es decir:

$$S = (1/W^2) (d / dt (Lr))$$

S= Coeficiente de Sedimentación
 W= Velocidad angular
 t= tiempo
 r= radio de giro

La dependencia con la concentración de los DNAs nativos se corrigió extrapolando a concentración cero, para lo cual es necesario por tanto rodar muestras de diferentes concentraciones para cada DNA. En el DNA desnaturalado se hace innecesaria esta corrección por no existir tal dependencia.

La corrección a condiciones estandar, es decir, el valor que tendría el coeficiente de sedimentación si las moléculas sedimentan en agua a 20°C se hizo mediante la expresión:

$$S_{20,W} = S_{obs.} (\eta_T / \eta_{20^\circ C})_{H_2O} (\eta_{solv.} / \eta_{H_2O}) (1 - \bar{v} \rho_{20,W}) / (1 - \bar{v} \rho_{Tsolv})$$

donde: $S_{20,W}$ = Coeficiente de sedimentación corregido a condiciones estandar. agua a 20°C.

$\eta_T / \eta_{20^\circ C}$ = Viscosidad del agua a la temperatura de la rodada relativa a la de 20°C

$\eta_{solv.} / \eta_{H_2O}$ = Viscosidad relativa del solvente

\bar{v} = Volumen específico parcial.

$\rho_{20,W}$ = Densidad del agua a 20°C

$\rho_{Tsolv.}$ = Densidad del solvente a la temperatura rodada.

Las sedimentaciones de DNA nativo se realizaron en soluciones SSC y las de DNA desnaturalado en SSC al 2% en formaldehído. Las viscosidades relativas de estos solventes son 1.032 y 1,106 y las densidades relativas -- son de 1.013 y 1,015 para SSC y SSC al 2% formaldehído respectivamente. Como volumen específico parcial se utilizó en ambos el valor 0,55. (HEARST, J.E.

1962). Para la determinación del peso molecular del DNA nativo se ha uti

lizado la calibración de ZIMM y CROTHERS (1965) aceptada generalmente en toda la bibliografía y que nos dá buenos resultados cuando utilizamos - DNAs de pesos moleculares conocidos como calibración (DNA- λ y DNA-SPP1):

$$0,445 \log M = 1,819 + \log (S_{20,W}^0)^{-2,7} S_{20,W}^0 = S_{20W}^0 \text{ extrapolado a concentración cero.}$$

M= Peso molecular

Para la determinación de pesos moleculares de DNAs desnaturados se ha utilizado la expresión que dá cuenta de la calibración realizada anteriormente en este laboratorio (MINGOT, F., JORCANO, J.L., ACUÑA, M.I., DAVILA, C.A.; 1976)

$$0,386 \log M = \log S_{20,W}^0 - \log 0,059$$

El método de desnaturación utilizado fué el de Davison (DAVISON, P.F. y FREIFELDER, D.; 1964) que ha sido utilizado últimamente con gran - profusión en este campo; consiste en la adición de un volumen igual de -- NaOH 0,2 M al DNA. Tras 30 s a temperatura ambiente, se añade otro volumen igual de formaldehído al 35% que al reaccionar convalentemente con las bases del DNA desnaturado por el alcali evita la renaturación al neutralizar después con 0,179 volúmenes de KH_2PO_4 1 M. Tras la neutralización las muestras se dializan durante la noche frente a SSC al 2% en formaldehído.

II-5-3.- Sedimentación en gradiente de sacarosa

La centrifugación en gradiente de sacarosa es un método empleado para la determinación del coeficiente de sedimentación de una macromolécula. El método funciona perfectamente cuando se introduce un DNA de referencia. En nuestro caso se ha utilizado el método no como sistema para la determinación absoluta del coeficiente de sedimentación, sino como sistema - comparativo entre diferentes preparaciones. Esto es posible porque en las condiciones utilizadas el coeficiente de sedimentación es aproximadamente proporcional a la distancia sedimentada, como consecuencia de la compensación del aumento radial de la fuerza centrífuga y el aumento de la densidad de sacarosa. Las determinaciones absolutas se llevaron a cabo por ultracentrifuga analítica o por determinación de la viscosidad.

El método de sedimentación en gradiente de sacarosa es sin embargo particularmente aplicable al caso de la sedimentación de DNA marcado. - El gradiente se preforma artificialmente en el tubo antes de la centrifugación. Se utilizó para ello un formador de gradientes lineales de densidad SPINCO. Los gradientes utilizados fueron del 5 al 20% peso/volumen de sacaca

rosa en 0,14 M. cloruro sódico y 0,3 M. hidróxido sódico ajustando el pH a 12,3 con hidróxido sódico 1 M. para los gradientes alcalinos. Se utilizó un rotor oscilante, el SW-39.

La localización de las muestras tras la centrifugación en ultra centrifuga Spinco-L2 se realiza mediante recolección de fracciones por punción de la parte inferior del tubo y posterior elución bajo presión controlada. Alguna de las muestras se destina a refractometría con objeto de comprobar la linealidad del gradiente. La cuantización de las muestras se realiza por contaje en centelleo líquido. El medio de contaje ha sido ya descrito en el Apartado-II-2-7.

II-5-4.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de ácidos nucleicos ha sido ampliamente utilizada y con éxito en el estudio de RNAs (LOENING, V.E.; 1967) (BISHOP, D.H. et al. 1967), pero cuando se ha intentado aplicar al estudio de DNAs el gran tamaño de esta macromolécula ha dificultado enormemente su utilización. En este sentido Thorme (THORME, H.V.; 1966) (THORME, V.H.; 1967) ha separado DNA del virus del polio del de su célula huésped mediante electroforesis en gel de agar. Más recientemente, en un intento de correlación -- entre movilidad electroforética y peso molecular de DNA TAKAHASHI, M. et al. (1969) encuentran una relación inversa entre la movilidad electroforética y el coeficiente de sedimentación del DNA-³H de T₂ intacto y sonificado, trabajando en placas de 25 x 2,5 cm. Posteriormente y en placas similares (GARCÉS, F.; 1971) se realizó una primera correlación entre PM del -- DNA-³H de E. coli medido por cromatografía centrífuga en DEAE-Celulosa - (MINGOT, F. y DAVILA, C.A.; 1974) y movilidad electroforética encontrándose una dependencia lineal entre 5,5 y 1,0 x 10⁶ daltons. Pesos moleculares superiores no eran distinguibles.

En 1972, C. Aaig y P. Borst (AAIG, C. y BORST, P.; 1972) encuentran en la electroforesis un excelente método para la separación de DNAs circulares y DNAs lineales así como incluso, DNAs circulares abiertos y - DNAs circulares cerrados de muy alto peso molecular y trabajan con DNAs - fríos cargando y detectando 1 µg. de DNA por tinción con Bromuro de Etidio de los geles. Tras el destañido las bandas de DNA se hacen visibles al - fluorescer cuando se les ilumina en la oscuridad con luz U.V.

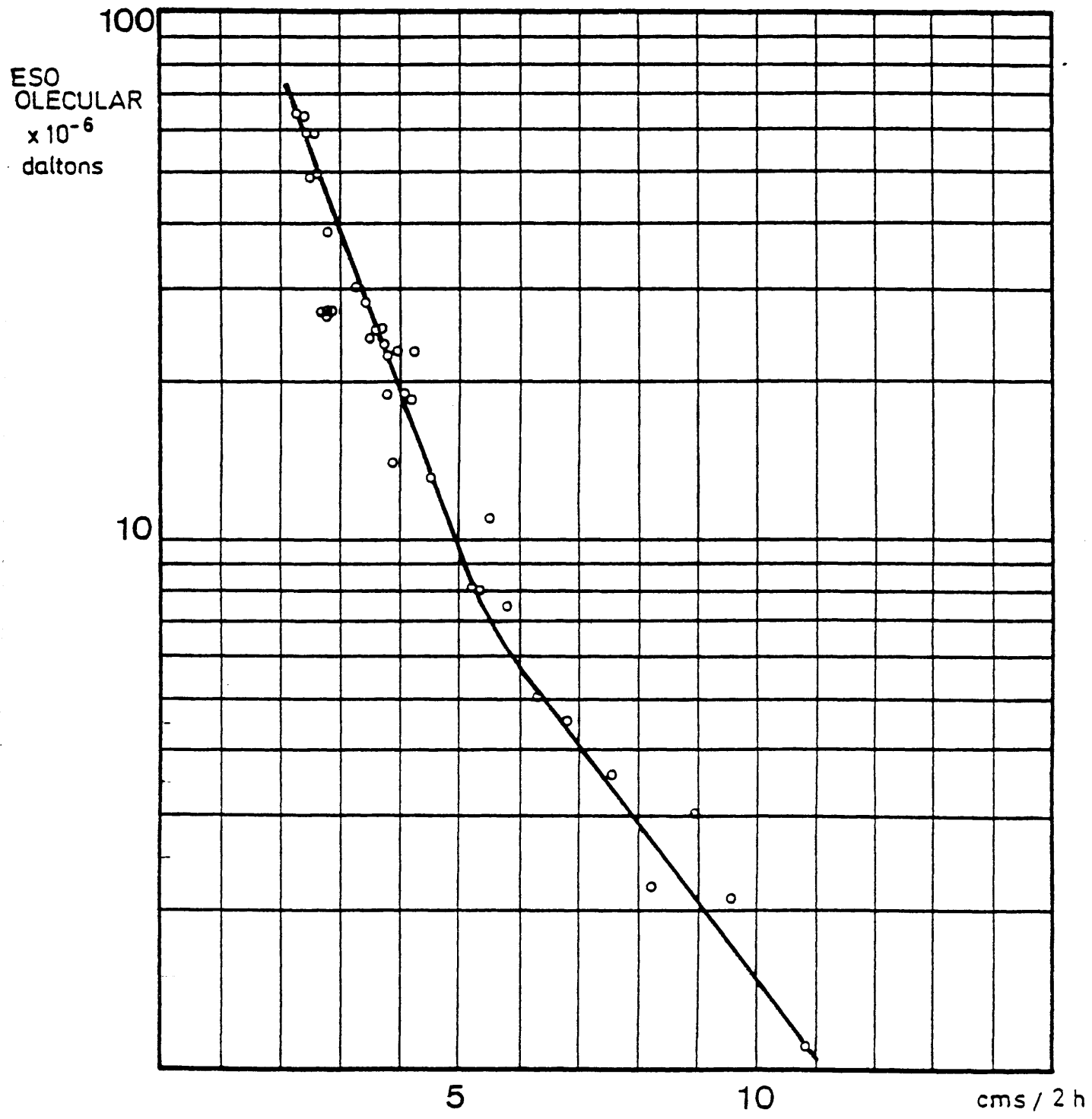


FIG. II-6.- MIGRACION ELECTROFORETICA DEL DNA EN FUNCION DEL P.M.

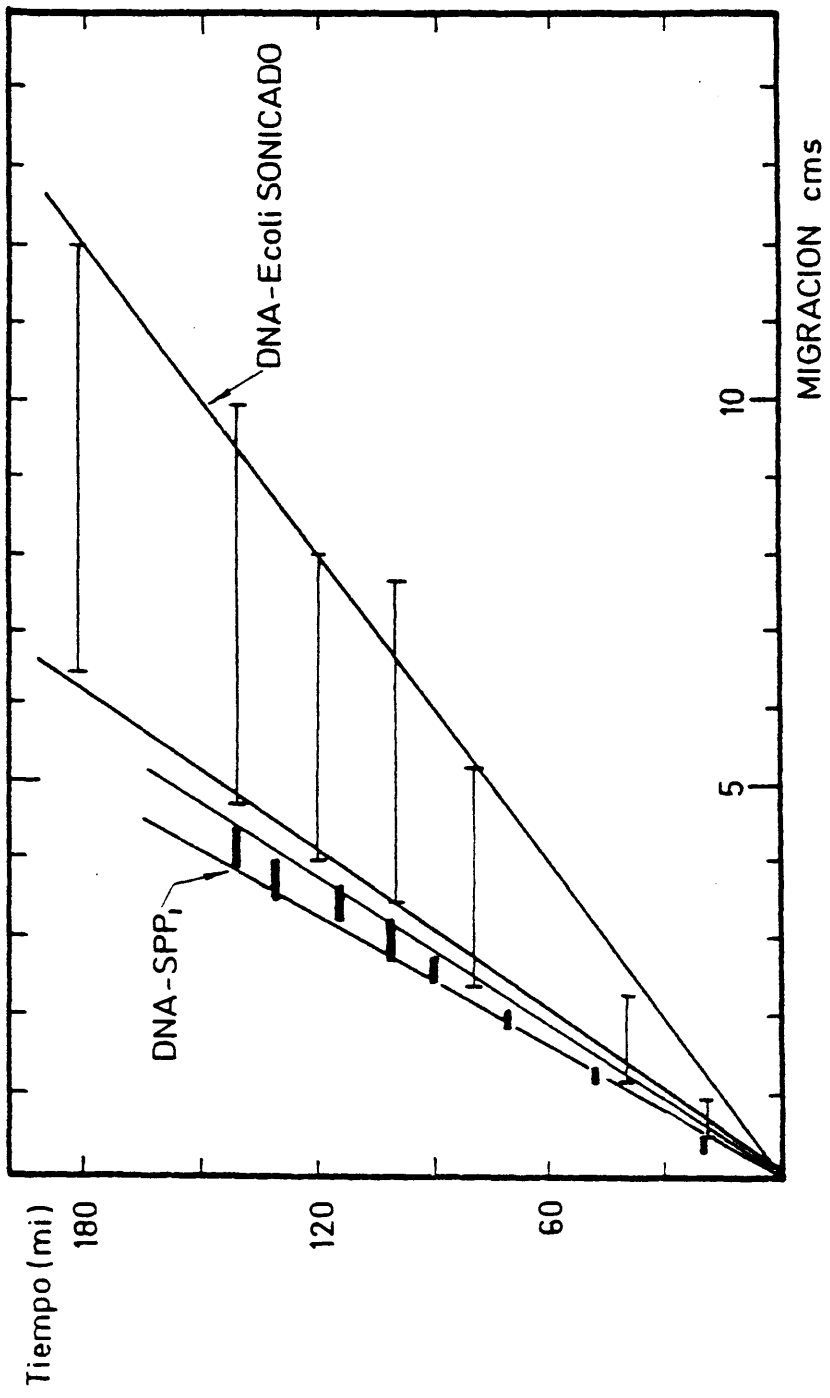


FIG. II-7.- MIGRACION ELECTROFORETICA DE DNA EN FUNCION DEL TIEMPO

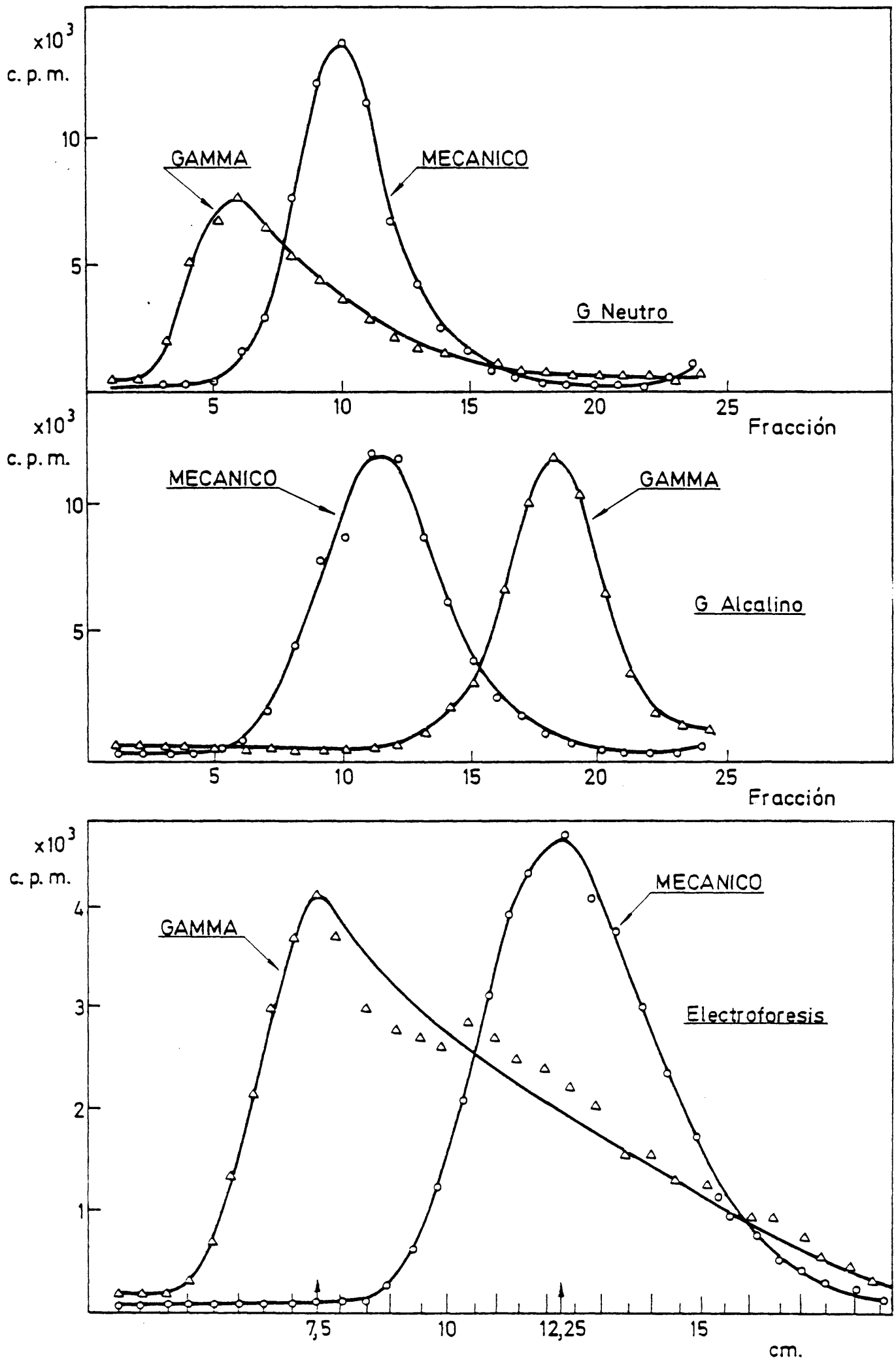


FIG. II-8.- CONSERVACION DE LA ESTRUCTURA NATIVA DEL DNA DURANTE LA ELECTROFORESIS

En 1973 AYWARD, H. y SMITHG., han encontrado la correlación - entre PM de DNA desnaturalado y movilidad electroforetica entre 35 y 2×10^6 daltons trabajando con DNAs-³²P de T₅ en geles de agarosa-acrilamida en tubos verticales.

Nosotros utilizando el sistema de detección de Aaig y Borst y en condiciones similares a las suyas, hemos encontrado una correlación - entre PM del DNA nativo y velocidades de migración en geles verticales - de agarosa entre 60 y 3×10^6 daltons (Ver Fig. II-6).

En nuestras condiciones la velocidad de migración de diversos DNAs permanece constante con el tiempo, aunque la banda de DNA se va ensanchando a medida que avanza. Este ensanchamiento está de acuerdo con la heterogeneidad de la muestra, así DNAs muy homogéneos como los de fagos apenas si se ensanchan y DNAs de timo sonicados llegan a ocupar varios centímetros del gel. Este hecho unido al de que la velocidad de migración permanezca constante con el tiempo ofrece la posibilidad de estudiar DNAs de gran heterogeneidad y bajo peso molecular ya que si tras 3 horas de migración presentan una banda de varios centímetros sólo es de algunos milímetros tras media hora de electroforesis, con lo que resulta perfectamente posible medir su posición. Fig-II-7.

La electroforesis de dos DNAs degradados por mecanismos diplo y haplotómico de tal forma que en estado nativo el segundo sea de mayor tamaño que el primero y en estado desnaturalado sea el primero el mayor nos sirve de comprobación de la conservación del DNA en estado doble helicoidal durante la electroforesis. Ver Fig-II-8.

Las bandas fluorescentes del complejo DNA-Br-Etidio pueden ser -- fotografiadas. Los detalles de la técnica desde la preparación del gel hasta la obtención de las fotografías aparecen en el Apéndice-II-5-1.

II-5-5.- Desnaturación térmica de DNA nativo

Los estudios de transición de la estructura nativa doble helicoidal del DNA a DNA desnaturalado de cadena simple, aparte de ser un valioso método de caracterización de DNA dada su diferente estabilidad con la composición a igualdad de fuerza iónica, es también un método de estudio de las perturbaciones creadas en el DNA por las radiolesiones. Especialmente

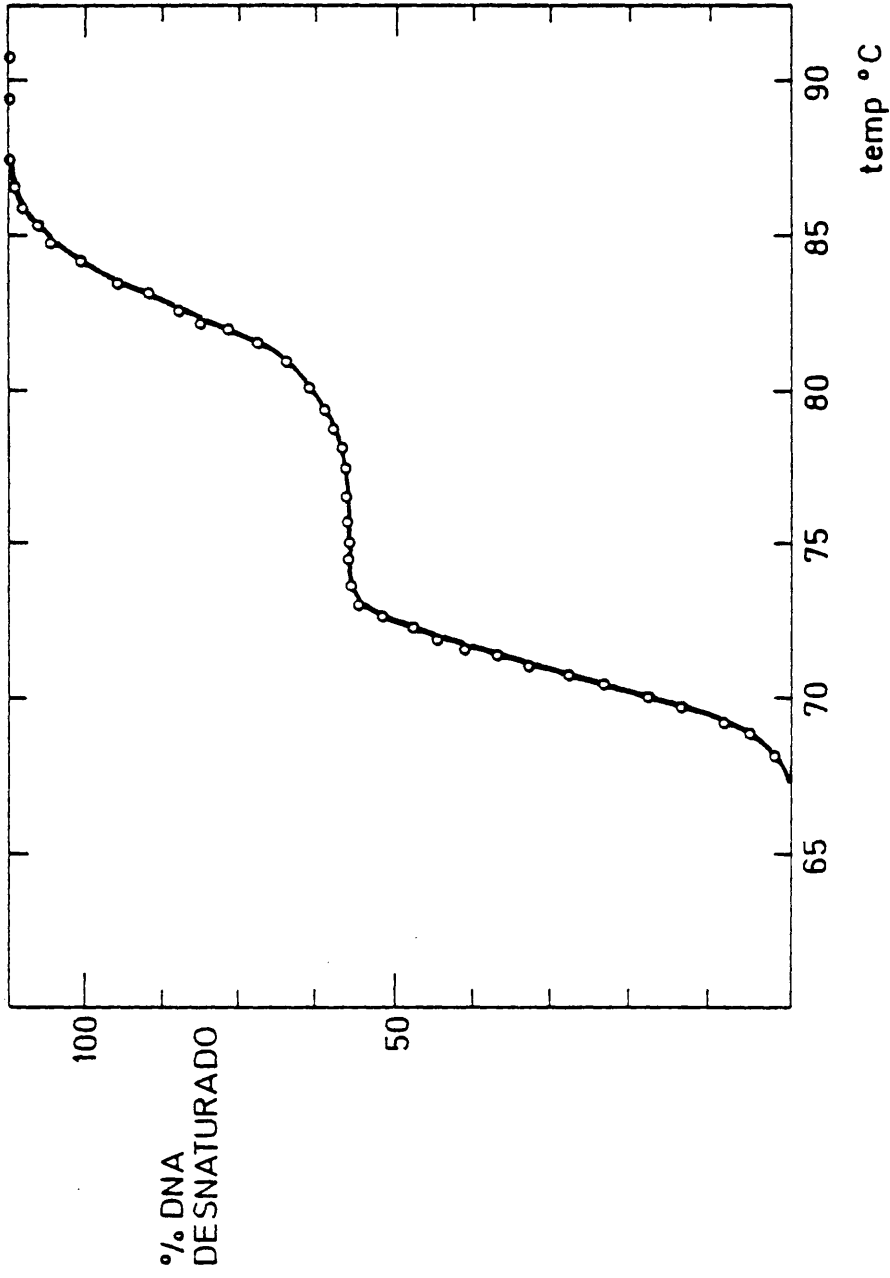


FIG. II-9.- DESNATURACION DE UNA MEZCLA DE DNA DE SPP1 Y M. LUTEUS EN SSC/10

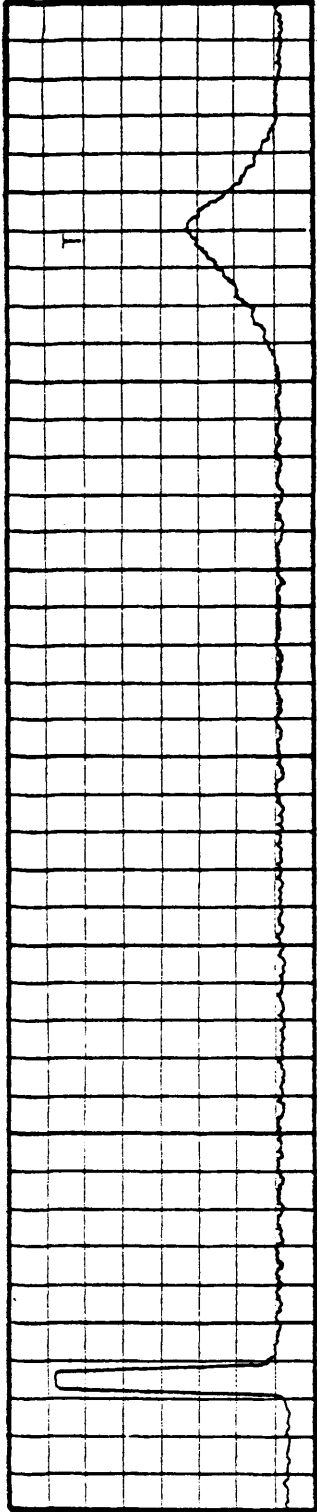
nos referimos a las lesiones U.V. pues los fotoproductos formados además de absorber diferentemente en la zona U.V. pueden afectar a las propiedades del biopolímero.

Este tipo de estudio se realizó en un espectrofotometro VARIAM equipado con un programador de lectura de espectros automático y un registrador HEWLETT-PACKAR con accesorio para el registro de la temperatura. - El sistema de termostatización está formado por un termostato COLORA y un portacubetas termostatizable. Al COLORA se le ha incorporado un VARIACK - que permite la subida gradual y lineal de temperatura entre muy amplios - márgenes de velocidad. La temperatura se toma directamente de la cubeta - merced a la inclusión en ella de la soldadura de un termopar calibrado. - En cada desnaturación se realizaron numerosos espectros entre 330 y 220nm. En las condiciones de trabajo utilizadas son perfectamente distinguibles dos DNAs de muy diferente composición en bases, como SPPl (48%) y M. Luteus (73%) de una mezcla a partes iguales de ambos. Ver FigII-9. Las muestras irradiadas con luz U.V. a diferentes λ y dosis fueron desnaturadas en - estas condiciones y tras la representación del % de variación del efecto hipercromico frente a la temperatura se estudió la variación de la temperatura media de transición térmica así como la forma de esta transición.

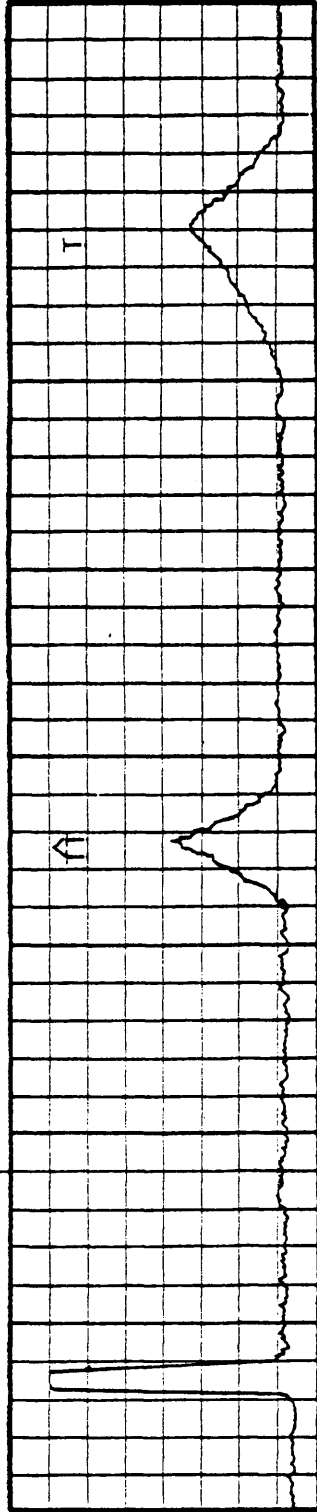
II-5-6.- Determinación de dímeros de Pirimidina en DNA irradiado

La determinación analítica y cuantitativa de los fotoproductos formados en el DNA tras la irradiación con luz U.V. ha sido estudiada ampliamente en los últimos 13 años en orden a tener a punto métodos de separación de los fotoproductos de las bases y de los fotoproductos entre sí. Existen en la actualidad dos métodos que ofrecen los mejores resultados, la cromatografía sobre papel o capa fina y la electroforesis. Las diversas condiciones en que han sido utilizados ambos están justificadas por la - variedad de intenciones y condicionamientos de los fotoproductos en estudio. Así cuando se trata de fotoproductos inestables cuya vida media a 0°C puede ser desde algunas horas a algunos minutos se ha utilizado la electroforesis de alta velocidad en papel - bajo presión y a temperatura próxima a 0°C. (TREEMAN, K.B. et al.; 1965) (JOHNS, H.E. et al. 1965). Recientemente la cromatografía en capa fina se ha utilizado mucho, particularmente en la separación de fotoproductos de ácidos nucleicos, en general se admite - que las placas posean mejor resolución entre dos fotoproductos que se sepa

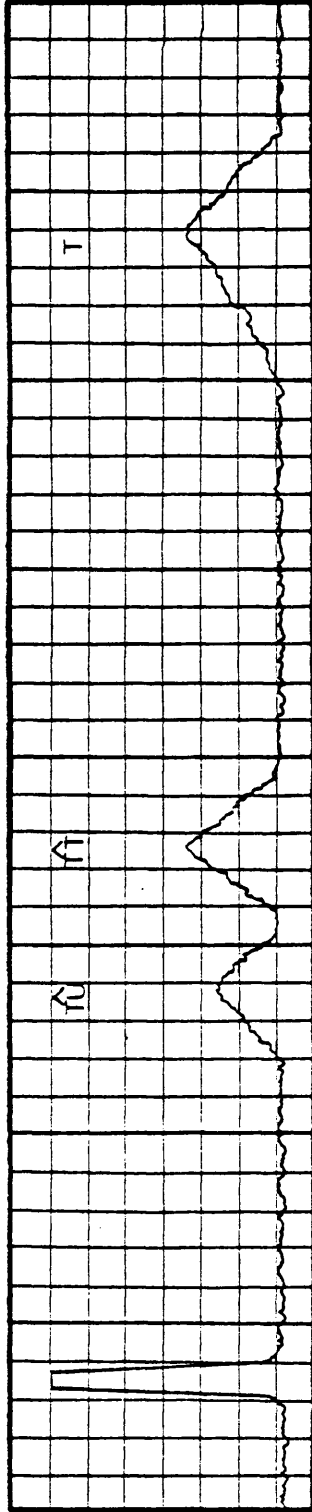
^3H -TIMINA



^3H -TIMINA
IRRADIADA
CONGELADA



^3H -TIMINA+
URACILO
CONGELADAS
IRRADIADAS



^3H -DNA IRRADIADO
E HIDROLIZADO

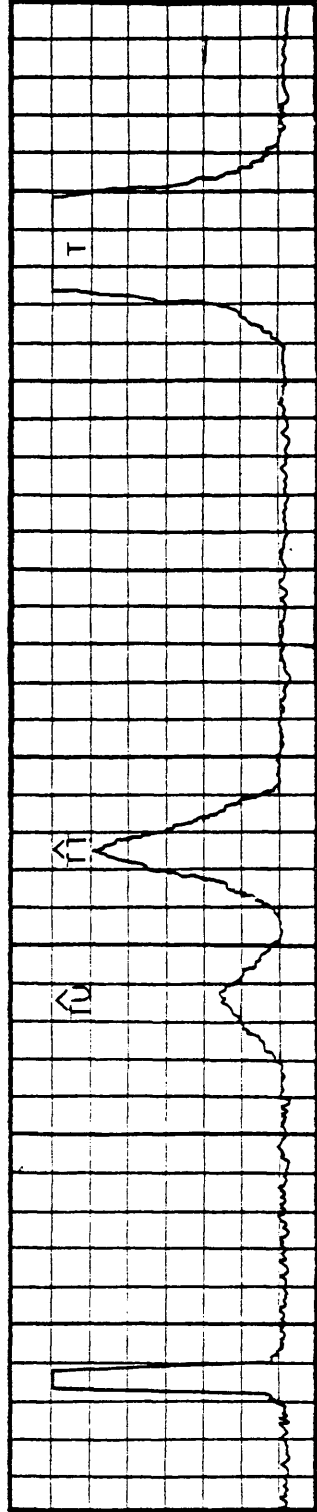


FIG. 11-10.- IDENTIFICACION DE DIMEROS DE \hat{T} Y DE \hat{C} T EN HIDROLIZADOS DE DNA IRRADIADO

ran mal que el correspondiente papel cromatográfico. El corto período de tiempo para el desarrollo de las placas así como el disponer de una gran variedad de Rfs para los fotoproductos de los ácidos nucleicos son también ventajas de este método. (VON WILUCKI, I. et al; 1967). Sin embargo la cromatografía en papel para el caso de fotoproductos estables sigue ofreciendo excelentes resultados. Numerosos son los sistemas que han sido desarrollados (WACKER, A.; 1963) (SMITH, K.C., 1963) (JOHNS, H.E. et al. 1964) - (SETLOW, R.B. et al. 1964) (VARGHESE, A.J.; 1970) (ZIEREMBERG, B.E. et al. 1971)... de entre ellos los más utilizados han sido los de A. WACKER (1963) H.E. JOHNS (1964), R.B. SETLOW et al. (1964) pero principalmente el de -- K.C. SMITH (1963). En nuestro trabajo hemos utilizado este último sistema que permite la separación de los dímeros de $\hat{T} \hat{T}$ de los de $\hat{T} \hat{C} + \hat{C} \hat{T}$ de la T.

El hidrolizado se realiza tras la precipitación y evaporación a sequedad del DNA-³H irradiado en ácido formico a 175°C. La detección de la posición de las manchas se realizó leyendo los cromatogramas en un contador proporcional PHILIPS. Los detalles desde la hidrolisis hasta la cuantización de las manchas por conteo en centelleo líquido aparecen especificados en el Apéndice-II-5-2.

Los dímeros que incluyen citosina no son detectados como tales, sino que durante la hidrolisis la citosina pierde su grupo amino para dar lugar a uracilo, es decir; en realidad lo que se detecta es además del dímero de $\hat{T} \hat{T}$ los de $\hat{T} \hat{U} + \hat{U} \hat{T}$. Por esta razón se utilizan como patrones de identificación estos mismos dímeros o mezclas de ellos obtenidos por irradiación de soluciones congeladas de timina-³H con uracilo. Estos patrones fueron siempre cromatografiados simultáneamente en cada grupo de muestras de DNA analizadas. Cada muestra se analizó por cuadruplicado o sextuplicado. Los Rfs de la timina y de los dímeros son: Rf-T = 1,00 Rf- $\hat{T} \hat{T}$ = 0,46 Rf- $\hat{T} \hat{U}$ = 0,31. (Ver Fig-II-9).

Como es lógico suponer con este sistema de marcado no se puede detectar la presencia de dímeros de $\hat{C} \hat{C}$ ya que el marcaje es específico - de la timina, sin embargo hemos de tener en cuenta que el rendimiento cuántico de la formación de este tipo de dímeros es mucho menor que el de los de $\hat{T} \hat{C}$ y el de estos menor también que el de $\hat{T} \hat{T}$. Sólo en caso de DNAs cuyo contenido en guanina-citosina es muy alto su nivel es importante. La cuantización de este tipo de dímero nos obligaría al marcaje inespecífico del

DNA con ^{14}C con las consiguientes complicaciones posteriores de separación de bases y de fotoproductos, o bien un marcaje específico pero doble, es decir, marcaje con timina- ^3H y citosina- ^{14}C . La gran cantidad de DNA - necesario para la realización de este trabajo, además de las anteriores - consideraciones nos han hecho desistir por el momento de esta posibilidad.

APENDICES DEL APARTADO 5

Apéndice II-5-1.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles se preparan disolviendo agarosa al 0,5% en el tampón utilizado como electrolito al hervirla durante 30 s; tras enfriar a 40°C la solución se añade a tubos de vidrio de 250 mm de longitud y que poseen un diametro interno de 8 mm; en el fondo del tubo se colocan unas piezas de gasa o nylon que se tapan con tapones de goma hasta que se completa la gelificación, después y tras retirar los tapones de goma, las piezas de gasa impiden que el gel se escurra. La superficie del gel se corta -- horizontalmente medio cm por debajo del borde superior del tubo en donde se coloca la muestra.

El tampón electrolito fué: 0,04 M TRIS pH= 7,7 , 2mM EDTA-Na - 0,02 M acetato-Na ajustando finalmente con ácido acetico a pH= 7,7. Las muestras de DNA contienen entre 1 y $2\mu\text{g}$ de DNA y 10% sacarosa (P/V) en el mismo tampón. La corriente aplicada constantemente a lo largo de la - electroforesis fué de 5 mA por tubo.

La tinción se realiza introduciendo los geles 2 horas en una - solución que contiene $100\mu\text{g}$ de bromuro de etidio/ml en 50 mM acetato sódico, ácido acetico pH= 4,5. El etidio que no se ha unido al DNA se retira realizando varios cambios de 2 horas en el mismo tampón de tinción pero sin bromuro de etidio.

La posición de las bandas de DNA en los geles se determina iluminando en la obscuridad con una lámpara germicida a 254 nm y los geles pueden ser así fotografiados utilizando un filtro que absorba luz U.V. - Nosotros hemos utilizado el G-3X LW-1,5 VOIGTLANDER.

Apéndice-II-5-2.- Determinación de dímeros de pirimidina

Las muestras de DNA- ^3H irradiadas procedentes del monocromador se separaron en 2 fracciones y las procedentes de las lámparas de baja - presión de Hg (PEN-RAY) en 3. A cada fracción, aproximadamente 1 ml, se le añade 50 μl de SAB a 5 mg/ml y se precipita con 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,6 N en frío. Se deja durante 10 min y se centrifuga 15 min a 300 rpm. El sobrenadante se tira y el sedimento se lava con 1 ml de PCA - 0,3 N. Tras la nueva centrifugación el sedimento se evapora a sequedad en evaporatubos.

Al precipitado seco se le añade 0,5 ml de ácido formico y los microtubos en los que se han realizado todas estas operaciones se cierran herméticamente en tubos de acero inoxidable. La hidrolisis se realiza en baño de aceite o arena a 175°C durante 60'. Una vez enfriados se evaporan

de nuevo a sequedad. El hidrolizado final seco se disuelve en 50 μ l de ClH 0,1 N para colocar después manchas de 20 μ l en cada cromatograma. - De esta forma se obtienen 4 ó 6 cromatogramas por cada muestra de DNA.

Se uso papel Watman N°1
La cromatografía descendente se realiza con butanol / acético / H₂O 80/ 12/ 30 durante 16 a 18 horas. Tras la elución se secan los cromatogramas y se recortan uniéndose por sus extremos para ser leídos en un contador proporcional de cromatogramas en dos escalas si es necesario - para poder observar bien tanto la timina como los dímeros, dada su diferencia cuantitativa.

Una vez localizados las manchas con los registros obtenidos, -- estas se recortan y se cuentan en centelleo líquido en medio de PPO al 7% en tolueno. El conteo de las manchas y el fondo se realiza varias veces y después se calcula el porcentaje de los dímeros de T^T y de los de T^C + C^T con respecto a la timina.

II-6- Transformación bacteriana.

II-6-1.- Introducción

Cualquier intento de evaluación biológica de las lesiones causadas por un agente, así como la de su reparación debe ser tal que mida la desaparición o recuperación de una actividad biológica de la molécula en estudio. En nuestro caso no es por tanto suficiente con las cuantización de las lesiones tras la irradiación, sino que es además necesario realizar experiencias conducentes a medir la actividad específica del DNA.

En este sentido, las experiencias de polimerización de DNA con DNA-Polimerasa utilizado el DNA en estudio como molde, sólo nos indicarían la conservación en su caso de la estructura bicatenaria del DNA, sin embargo las experiencias de transformación son capaces de medir las perturbaciones causadas en el contenido informativo del DNA, cuya conservación lleva ya implícita la restauración estructural del DNA.

Aparte de los condicionamientos propios de este tipo de experiencias en lo que a desarrollo de la competencia se refiere, existen otros - que derivan directamente del estado en que se encuentre el DNA que se suministra a las células. Así en nuestro sistema de transformación en el que - el DNA se integra en la célula como DNA monocatenario, la dependencia de - la eficiencia de la transformación con el tamaño del DNA es evidente. Por tanto el perfecto conocimiento de esta dependencia, dentro de lo que permiten las técnicas de recuento de viables en placa, es condición indispensable

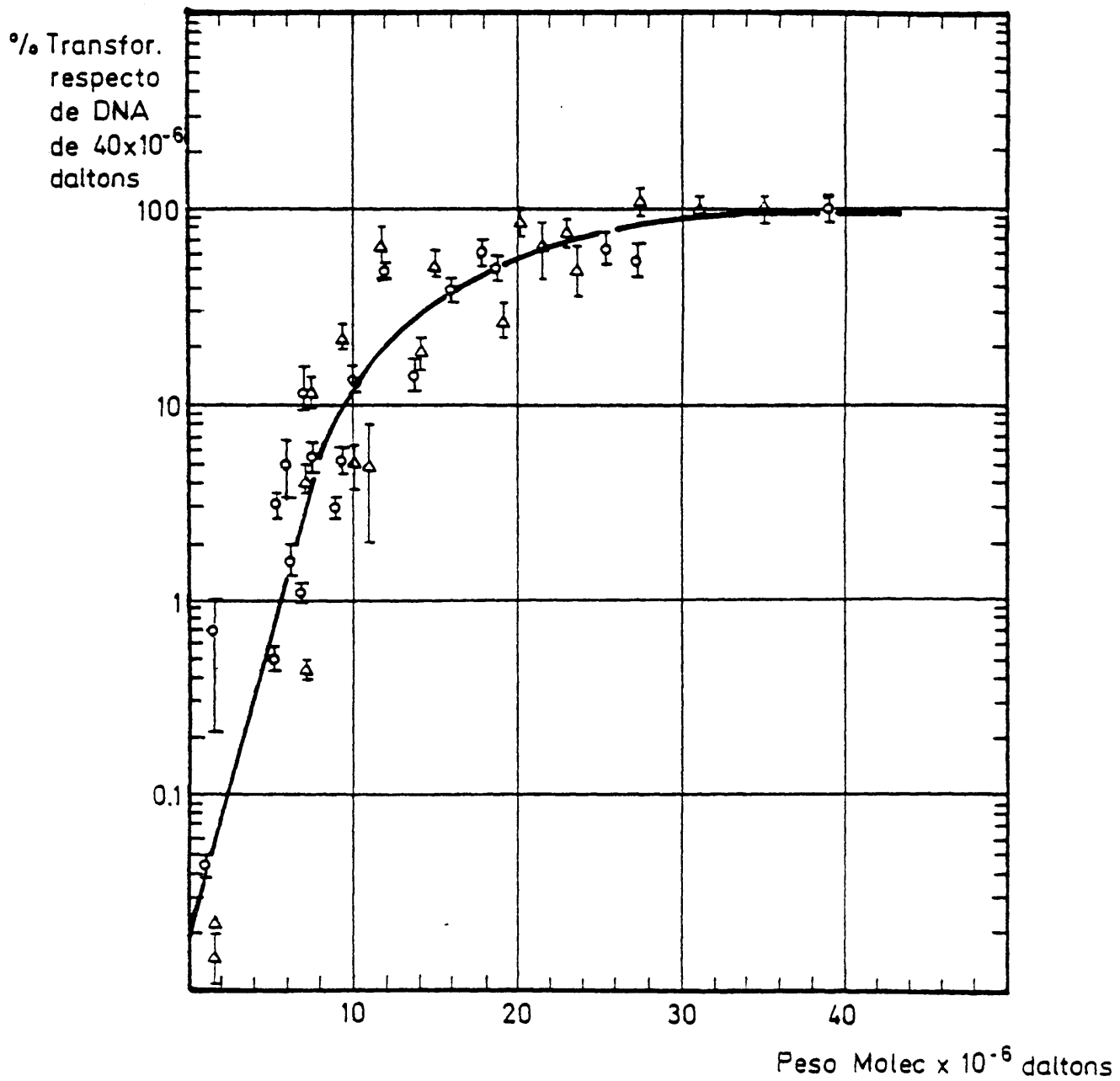


FIG. II-11.- EFICIENCIA DE LA TRANSFORMACION EN FUNCION DEL PESO MOLECULAR DEL DNA

- Δ DNA B.subtilis 168 prot en B.subtilis 168 $Ty^- Trp^-$
- \circ DNA B.subtilis 168 prot en B.subtilis 2G9 $uvr^- Trp^- Tir^-$

ble en cualquier intento de evaluación de actividad biológica del DNA. Por otra parte y en nuestro caso necesitamos como células competentes - unas que no sean capaces de reparar por sí mismas las lesiones que hemos causado; es decir, mutantes específicos incapaces de reparar las lesiones causadas por la luz U.V..

Se utilizaron pues dos sistemas de transformación: el sistema B.subtilis uvr^+ /DNA uvr^+ y el sistema B.subtilis uvr^- /DNA uvr^+ ó DNA uvr^- . En el primer caso se utilizó la cepa B.subtilis $Ty^- Trp^-$ y como DNA transformante el obtenido a partir de la cepa B.subtilis 168 prototrofica. - - (Ambas fueron donadas por el Dr. Portoles¹). Las condiciones de desarrollo de competencia y medios de cultivo aparecen detallados en el apéndice-II-6-1. En el segundo caso se utilizó la cepa B.subtilis $uvr^- Tir^- Trp^-$ (suministrada por el Dr. Venema²) el DNA utilizado fué el obtenido a partir de la cepa B.subtilis 168 prototrofica o de la cepa B.subtilis $uvr^- Tir^+ Trp^+$. El método de desarrollo de competencia (HANS-JOENJE) condiciones de la transformación y medios de cultivo aparecen en el Apéndice-II-6-2.

En la Fig-II-10 aparecen los resultados obtenidos en la determinación de la eficiencia de la transformación en función del peso molecular del DNA donador utilizando los dos sistemas de transformación antes descritos. En ambos sistemas el DNA utilizado fué el mismo, es decir, el obtenido a partir de la cepa B.subtilis 168 prototrofica. Las muestras de DNA de diferentes tamaños moleculares se obtuvieron mediante degradación diplotómica como ya ha quedado descrito en el Apartado-II-4-2. Como se observa en la Fig-II-10 no existen diferencias apreciables en la capacidad de transformación entre ambos sistemas en función del tamaño del DNA donador. Además podemos decir que existe muy poca dependencia en la eficiencia de la transformación para DNAs por encima de 30×10^6 d. que esta llega a ser tan sólo de un 10% con respecto a un DNA de 40×10^6 d. para un DNA de 10×10^6 d. y que la eficiencia de transformación cae por debajo del 0,1% para DNAs menores de 2×10^6 d. En la Tabla-II-11- aparecen detallados los resultados de la calibración

APENDICES DEL APARTADO II-6

II- 6-1.- Sistema de transformación B.subtilis uvr^+ /DNA- uvr^+

10 ml de medio GM1 se inoculan y se dejan crecer durante la noche

1.-

2.- GERARD VENEMA. Institute of Genetics, University of Groningen. The Netherlands

a 30°C sin agitación en el brazo de un matraz con brazo lateral. Al día siguiente la densidad óptica del cultivo es de aproximadamente 0,6 UO a 500 nm. Entonces se pone a crecer en el matraz a 37°C y a 250 rpm hasta que el cultivo alcanza el comienzo de la fase estacionaria, lo que sucede aproximadamente a las 2 horas y media. Entonces se incuba 90' más con lo que la densidad óptica final alcanza las 4 a 5 UO.

1 ml del cultivo así obtenido se diluye 10 veces en medio GM2, se incuba 1 hora a 37°C y a 250 rpm hasta que alcanza 0,8 UO/ml de crecimiento. Alicuotas de 1 ml de este cultivo a las que se les añade 10 μ g de DNA transformante se incuban 30 min a gran agitación.

El conteo de viables tras la transformación se realiza a partir de un tubo al que no se le ha añadido DNA. Las diluciones se realizan en solución salina esteril (0,15 M NaCl) y la siembra en placas de agar nutritivo.

El conteo de bacterias transformadas se realiza por el mismo procedimiento pero en placas de agar mínimo que ha sido suplementado con todos los requirientes de la cepa bacteriana a excepción de Trp. El grado de dilución para conseguir un buen recuento depende del tratamiento que se le ha realizado al DNA.

La cepa de bacterias utilizada en este sistema de transformación fué B.subtilis 168 Ty⁻ Trp⁻ y el DNA transformante fué el obtenido a partir de la estirpe prototrophica B.subtilis 168.

La composición de los medios GM1 y GM2 es la siguiente:

GM1: Para 1 litro de medio:

(NH ₄)SO ₄	2,0 g.
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	18,34 g.
KH ₂ PO ₄	6,0 g.
Citrato Sódico	1 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g.
Glucosa	5,0 g.
Ext. levadura	1,0 g.
Ac. Casaminico	0,2 g.
Timina	5 mg.
Triptofano	5 mg.

GM2 Está compuesto por el GM1 más: 10 ml. de CaCl₂, 0,05 M y 2,5 ml. MgCl₂ 0,1 M.

II.6.12.- Sistema de transformación B.subtilis uvr⁻/DNA-uvr⁺. o DNA-uvr⁻

A partir de una colonia de células crecida en placa de agar con ac. casamino, triptofano y tirosina se inocula un matraz con medio mínimo suplementado y se deja crecer durante la noche a 37°C y a 250 rpm. A la mañana siguiente está a 2 UO a 500 nm. El cultivo se diluye en medio Botti-Wilson hasta que queda a 0,12-0,17 UO después se agita durante 3 horas y media a 37°C a 300 rpm. Después se diluye de nuevo a mitad, esta vez con medio mínimo y se agita 2 horas y media a 300 rpm. Alicuotas de 0,9 ml a las que se añade 0,1 ml de DNA a aproximadamente 100 μ g/ml se incuban en tubos a 370 rpm durante 30', después se añade 0,1 ml de DNasa a 50 μ g/ml y se deja agitando 5' más.

Tras las diluciones pertinentes la siembra de las células se reali

za en agar nutritivo para el contaje de viables y en agar mínimo suplementado con todos los requirientes genéticos de la estirpe bacteriana utilizada a excepción del Trp.

La cepa bacteriana utilizada en este sistema de transformación fué: *B. subtilis* 2G9 Trp⁻ Tir⁻ uvr⁻. El DNA fué en su caso o bien DNA procedente de la cepa *B. subtilis* 168 prototrophica o de la cepa *B. subtilis* - OG2 (uvr⁻ prototrophica también).

Como medio de cultivo del inoculo de noche se utilizó un medio mínimo suplementado con ácido casamínico, tirosina y triptofano:

Medio de noche para 1000 ml:

Medio mínimo:

Glucosa	5 g.
MgCl ₂	0,005 mM.
K ₂ HPO ₄	14,0 g.
KH ₂ PO ₄	6,0 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g.
Citrato sódico	1,0 g.

Suplementos:

Ac. Casaminico	8 ml de 0,2 g. en 160 ml.
L. Tirosina	1 ml de 2,5 mg/ml
L. Triptofano	1 ml de 2,5 mg/ml.

El desarrollo de la competencia y la transformación se realizaron en medio Botti-Wilson; para preparar 50 ml se mezclan 40 ml de medio mínimo con 1 ml de cada uno de los siguientes aminoácidos a 2,5 mg/ml cada uno: valina, isisina, treonina, glicocola, argimina e histidina; 1 ml de aspártico y de metionina a 5 mg/ml cada uno; y por último 1 ml de tirosina y triptofano a 2,5 mg/ml cada uno.

II-7-1.- Actividad Óptica. Dicroísmo Circular de soluciones de DNA.

En el estudio de las propiedades ópticas de los ácidos nucleicos, los espectros de dicroísmo circular presentan ventajas informativas sobre los estudios de dispersión rotatoria óptica, aunque ambas esten perfectamente relacionadas, pues son manifestaciones de una misma propiedad.

En efecto, la actividad óptica refleja de una asimetría estructural que implica el giro del plano de polarización de la luz incidente, cuando se observa sobre la banda de absorción produce además la eliptización de la luz planopolarizada.

Si bien los monómeros del DNA ya presentan actividad óptica, dada la existencia de carbono asimétrico en la desoxipentosa, el dinucleótido presenta una desproporcionadamente mayor actividad óptica respecto de los componentes, indicando la presencia de una estructuración de orden superior, por supuesto también asimétrica; se trata de la aparición de la hélice. Este efecto en la actividad óptica producido por la hélice no depende del grado de polimerización, permaneciendo constante a partir de grados de polimeriza-

ción muy bajos.

La siguiente estructuración de orden superior que supone la doble hélice del DNA no va acompañada de modificaciones cuantitativas importantes en la actividad óptica, aunque sí de variaciones cualitativas de los espectros de dicroísmo circular.

Las diferentes variaciones geométricas admisibles dentro de la estructura doble helicoidal, presentan también variaciones cualitativas en los espectros de dicroísmo circular.

Todas estas variaciones cualitativas en la actividad óptica pueden ser por tanto un importante instrumento en la adquisición de información acerca de las repercusiones geométricas que tiene la presencia de alteraciones locales en la doble hélice como consecuencia de la aparición de dímeros de pirimidina.

La magnitud observable que hemos utilizado a la hora de cuantizar y comparar estos efectos ha sido la elipticidad Ψ ; relación entre los semi ejes menor y mayor de la elipse de polarización resultante. Esta magnitud - está relacionada con los coeficientes de absorción molar de la muestra para luces circularmente polarizadas a derechas e izquierdas.

En la práctica y en la zona de independencia de tamaño molecular (que se consigue por encima de la decena de nucleótidos) la magnitud habitual es la elipticidad molar por residuo (θ).

Se utilizó un espectrofotómetro CARY-60 con accesorio de dicroísmo circular que proporciona directamente el valor de la elipticidad, que se reduce a elipticidad molar por residuo dividiendo por el paso óptico de la cubeta utilizada en centímetros y por la molaridad en nucleótidos de la muestra de que se trate y multiplicando por un factor 100 que es necesario introducir debido a que la unidad de elipticidad se definió inicialmente para un decímetro de paso óptico:

$$(\theta) = 100(\Psi / l m)$$

(θ) = Elipticidad Molar por residuo
 Ψ = Elipticidad
 l = Paso óptico en centímetros
 m = Molaridad por residuo

La concentración de la muestra se determinó espectrofotométricamente; 1 U.O. de DNA por ml a 260 nm son 50 μ g de DNA por ml.

Además se ha utilizado, para la comparación de nuestros resultados

experimentales con otros de la bibliografía la magnitud, elipticidad específica (Ψ); es decir, la elipticidad referida a peso de substancia:

$$(\Psi) = \Psi / d c$$

(Ψ) = Elipticidad Específica
 Ψ = Elipticidad
 d = Paso Optico en decímetros
 c = Concentración en gramos por litro

Al utilizar valores relativos dentro de un mismo espectro, para su comparación con otros, se puede utilizar el cociente de los valores directos de Elipticidad, es decir, Ψ_{CD+} / Ψ_{CD-} .

II-7.- Metodologías enzimáticas

II-7-1.- Aislamiento purificación y ensayos de la UV-Endonucleasa

La U.V.-Endonucleasa ha sido aislada a partir de *M. luteus* de acuerdo con el procedimiento general utilizado por Grossman, (Grossman et al. (1968), Kaplan et al (1969), Kushner et al (1971 a y b)) que ha servido de base para casi todos los procedimientos descritos después para el aislamiento de esta enzima a partir de diversos materiales de partida.

Se parte de 250g. de pasta congelada de *M. luteus*, que se resuspenden en 1040 ml de 0,01 M fosfato potásico pH=7,5 y se ponen a 37°C durante 30' con 80 ml del mismo tampón en el que han añadido 360 mg de Lisozima. Tras la lisis celular, la solución tremendamente viscosa, se enfría lo más rápidamente posible hasta 4°C y se trata con ultrasonidos hasta que desaparece la viscosidad, sin dejar que la temperatura ascienda por encima de los 4°C. La solución así conseguida se centrifuga a 23.000 xg. durante 30'. El sobrenadante, entre 1000 y 1100 ml, constituye la fracción-I-, y como promedio de 20 aislamientos resulta a una concentración de 18 a 20 mg/ml. Alicuotas de 1 ml de esta fracción se guardan a -30°C para realizar después los ensayos de actividad. La actividad específica de esta fracción medida por liberación de ^{32}P por la acción simultánea de la enzima contenida en la fracción y la Fosfatasa alcalina sobre - - DNA- ^{32}P -Pi es de 50 U/mg siendo una unidad la cantidad necesaria de enzima para en las condiciones del ensayo liberar 10 $\mu\mu\text{moles}$ de ^{32}P . (Ver más adelante).

A 1100 ml de la fracción-I- se le añade 126 ml de dextrano T 500 al 20% en 0,01 fosfato potásico pH=7,5 peso/peso, 354 ml de polietilenglicol 6000 al 30% peso/peso en el mismo tampón y 185 g de NaCl. Tras 2 horas de agitación

la separación de las fases se consigue tras 15' de centrifugación a 5000 xg. La fase superior se dializa durante 15 horas (en lugar de 3 horas según - - Grossman) frente a 0,01 M fosfato potásico pH=7,5, 10% etilenglicol 1 mM - EDTA, 5 mM β -Mercapto-etanol (Grossman sólo pone el tampón y el etilenglicol). La dialisis se continúa durante otras 6 horas más (en lugar de 4 horas más - según Grossman) con otros 18 litros del mismo tampón.

Esta etapa de dialisis es ya bastante crítica, y a partir de ella - la enzima se muestra extraordinariamente inestable. Tras la dialisis la solución de la enzima está turbia, por lo que se centrifuga durante 10' a 30000xg. El sobrenadante, aproximadamente entre 1400 y 1500 ml, constituyen la fracción-II- y como promedio de 20 aislamientos resulta a una concentración de 6 a 8 - mg/ml y con una actividad por el mismo ensayo que la fracción-I de 80-100 U/mg. Alicuotas de 1 ml se conservan congeladas a -30°C.

Estas dos fracciones son las menos inestables a la congelación y des congelación permaneciendo con actividad muchos meses si se las conserva congeladas a -30°C sin necesidad de añadir DNA de Timo.

La Fracción-II- entre 1400 y 1500 ml se deja agitando ligeramente con fosfocelulosa P11 equilibrada previamente en tampón fosfato 0,005 M pH=7,5 - 10% etilenglicol, 1 mM EDTA, 5 mM β -Mercapto-etanol (Grossman sólo utiliza el tampón con el etilenglicol) durante la noche a 4°C. Después se compacta en una columna refrigerada a 4°C sobre la que tras lavar con 200 ml del mismo tampón pero 0,05M, se pasa un gradiente lineal de 1200 ml entre 0,05 y 0,5 M fosfato potásico pH=7,5 10% etilenglicol, 1 mM EDTA, 5 mM β -Mercapto-etanol. Se recogen fracciones de aproximadamente 12 a 15 ml en las que previamente se ha puesto DNA de Timo para que quede a una concentración final de 25 μ g/ml. La presencia del DNA a partir de este momento es estrictamente necesaria para la estabilidad de la enzima. La enzima eluye en la zona de 0,3 M del gradiente. Las fracciones de mas actividad se reúnen para dar del orden de 200 ml a 0,6mg/ml con una actividad con el mismo ensayo ya citado de 500 U/mg. Esta es la fracción-III-. A partir de este momento cualquier descenso de la fuerza ionica produce una precipitación que aunque es reversible no lo es la recuperación de la actividad que se pierde con la precipitación. La enzima obtenida así y concentrada 10 veces mediante dialisis frente al mismo tampón pero con 10% polietilenglicol, ha sido la utilizada hasta ahora en las experiencias de reconocimiento y liberación de dímeros de pirimidina en DNA-³H de E.coli con el concurso de - la DNA-Polimerasa de E.coli. Ver resultados en el apartado III-9.

Esta fracción así concentrada da un pico bastante simétrico por elu-

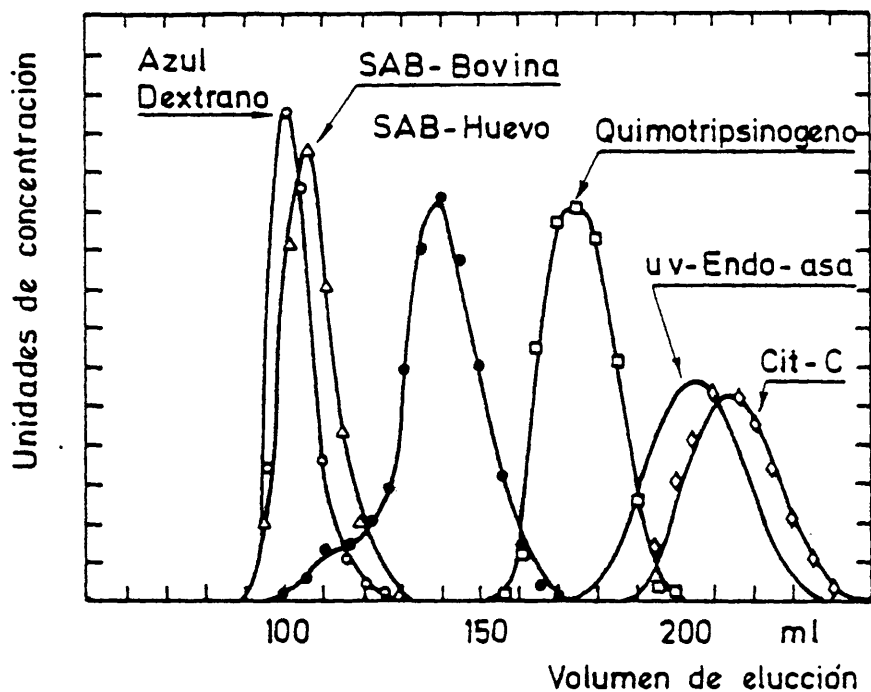


Fig. II-11- P.M. de la uv-Endonucleasa por filtración en Sephadex - G - 75

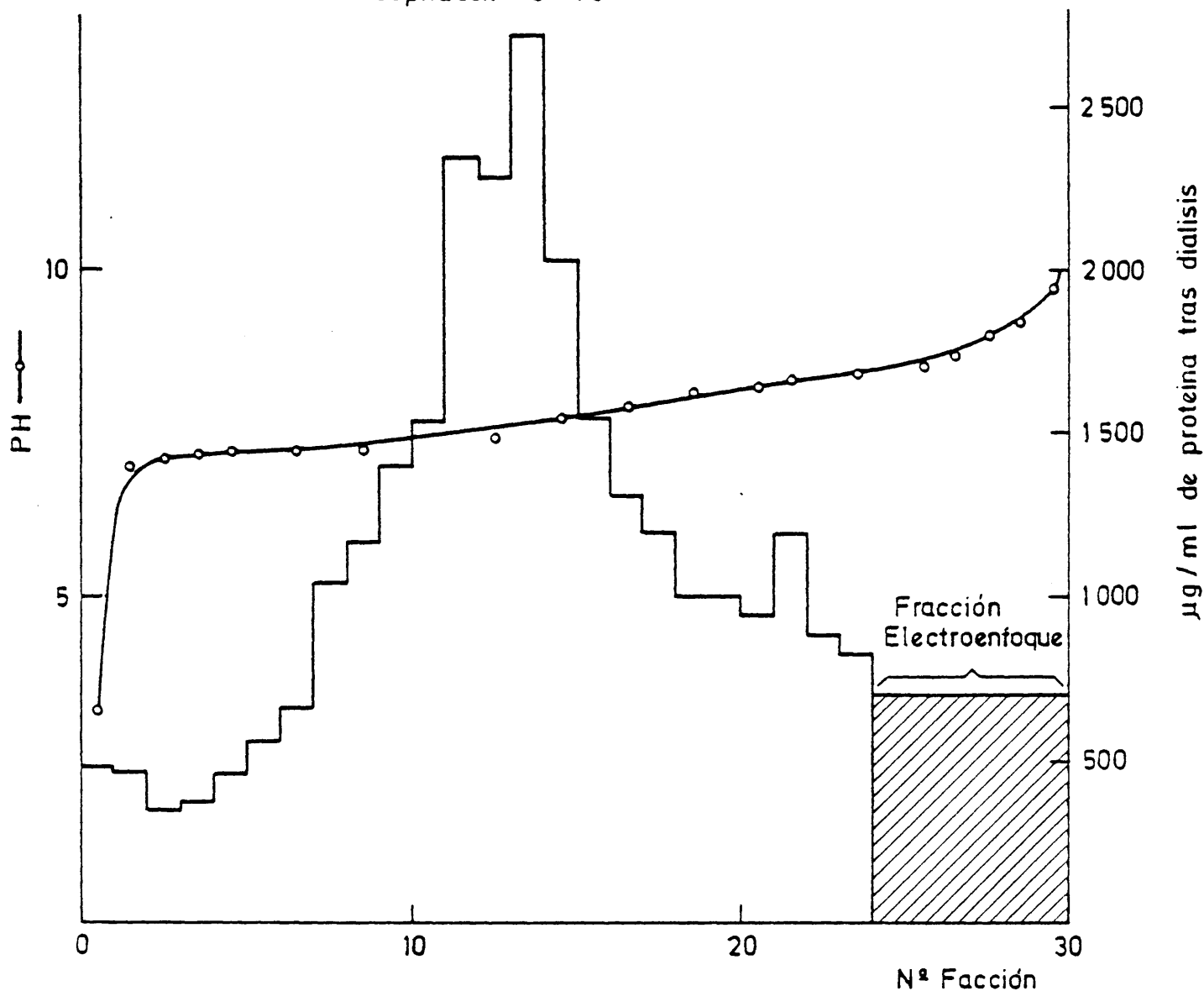


Fig. II-12 - Electroenfoque preparativo en placa de Sephadex - G - 75 superfino de la uv - Endonucleasa

ción en una columna K26/80 de Sephadex-G-75 equilibrada con el mismo tampón y calibrada con Azul Dextrano, Hemoglobina, SAB-bovina, SAB-huevo, Quimotrip sinogeno y Citocromo c (pesos moleculares de 64.500, 67.000, 45.000, 25.000 y 12.500 respectivamente para las proteínas), que se sitúa entre las dos últimas pero muy próxima al Citocromo c (Ver Fig-II-11-) es decir, de un peso molecular de aproximadamente 15.000 a 16.000 como el descrito para esta enzima por diversos autores.

Aunque el método descrito por Grossman utiliza a partir de la Fracción-III concentrada la acción simultanea de una columna de Sephadex-G-75 - como la descrita conectada al llegar a la elucción de la zona de peso molecular de la enzima a otra de DNA-PiPi-Celulosa, el tiempo necesario para llevar a cabo estas dos últimas etapas nos ha conducido siempre a recuperaciones muy bajas. Por eso nos hemos visto obligados a poner a punto otro método llegado este momento para purificar la enzima en el menor tiempo posible y con rendimientos compatibles con la experimentación que deseamos después realizar.

Así, en lugar de realizar un gradiente lineal continuo para la obtención de la fracción fosfocelulosa hemos optado por realizar extracciones sucesivas con 150 ml cada vez de 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 y 0,35 M. Fosfato potásico, 10% Etilenglicol, 1 mM EDTA, 5 mM β -Mercaptoetanol. Los sobrenadantes obtenidos de las fracciones 0,25, 0,30 y 0,35 M fosfato potásico se reúnen en aproximadamente 400 ml que suelen salir a 0,6 mg/ml a los que se les añade DNA de Timo hasta una concentración final de 25 μ g/ml y se les pone inmediatamente a dializar frente a 2000 ml del mismo tampón pero con 10% polietilenglicol, 10% etilenglicol y 1% glicina con dos cambios hasta que queda - aproximadamente entre 100 y 150ml. Después se realiza un cambio de dialisis - mas con 2000 ml de 1% glicina 10% etilenglicol.

La solución así obtenida, algo turbia, se homogeniza con un homogeneizador de embolo. 95 ml de esta solución se mezclan con 3,5 ml de Anpholitos pH=7-9, 1,5 ml de Anpholitos pH=9-11 y 0,5 ml de Anpholitos pH=3,5-10 y 5 g de Sephadex G-75 superfino preparado para electroenfoque preparativo en placa. El lecho del gel estendido sobre una placa de 25x12,5 cm con los anpholitos y la preparación enzimática se dejan evaporar en frío hasta que se pierden aproximadamente 30 g de peso. Después el electroenfoque se realiza en un equipo Multiphor al que se le incorpora un equipo Colora de refrigeración haciendo circular por la placa de refrigeración una solución de glicerina diluida a 4°C: Entre 13 y 24 horas son necesarios para que las proteínas se concentren alrededor de su punto isoeléctrico. Como anolito se utiliza anpholitos -

de pH=9-11 y como catolito ácido fosfórico 0,1 M. Como marcador se utiliza Citocromo c que se añade una vez formada la placa a lo largo de uno de los bordes.

La U.V.-Endonucleasa tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 9, las fracciones con ese pH y las próximas se eluyen conjuntamente, se reúnen y concentran mediante dialisis en 0,3 M fosfato potásico pH=7,5 10% etilenglicol, 1 mM EDTA 5 mM β -Mercapto-etanol con 10% polietilenglicol. El resto de las fracciones, hasta 30, en que se divide la placa, se eluyen y dializan con el mismo tampón pero sin polietilenglicol. La medida del pH del gradiente del electroenfoque se realizó en experiencias paralelas en las que la elución de las fracciones se realizó con agua destilada. A las fracciones dializadas se les determina la concentración de proteínas y como se observa en la Fig-II-12- la recuperación de proteínas de punto isoeléctrico próximo al de la U.V.-Endonucleasa es bastante pequeña. Como el DNA que tenía la fracción concentrada procedente de la extracción en fosfocelulosa P11 también se enfoca y por supuesto a pHs lo más ácido que permite el gradiente, es decir al otro extremo de la placa donde aparece la U.V.-Endonucleasa, es necesario en la elución de las fracciones del electroenfoque añadir DNA de Timo a una concentración final de 25 μ g/ml.

La fracción así obtenida se pone a -30°C sin congelar para lo que se le añade previamente un volumen igual de Glicerina al 98%. La enzima así preparada y conservada permanece con altos niveles de actividad mas de un mes. Esta fracción es la que se ha utilizado en las experiencias de reconocimiento de dímeros por medida de la densidad de roturas simples en DNA-SPPI irradiado con U.V. mediante estudios analíticos de sedimentación.

El aislamiento completo de la enzima hasta estos niveles dura aproximadamente entre 8 y 10 días.

El ensayo de actividad U.V.-Endonucleasa utilizado es el descrito por Grossman et al (Kaplan et al. 1969) que mide la liberación de ^{32}P de DNA- ^{32}P -PiPi por la acción simultánea de la U.V.-Endonucleasa y la Fosfatasa alcalina. El DNA se irradia con luz U.V. de 254 nm hasta la saturación de dímeros de pirimidina. El DNA ^{32}P utilizado debe de tener una actividad específica entre 10 y 100 c.p.p.m./ μ mol y ha de estar limpio de ^{32}P contaminante así como con el menor número de terminales fosfato intracadena. En ocasiones es necesario un tratamiento previo con Fosfatasa alcalina para liberarle de estos fosfatos terminales. La eliminación de la fosfatasa después se consigue por desproteinización con cloroformo-isoamílico, centrifugación y dialisis de la fase acuosa.

sa. La Fosfatasa alcalina debe de ser de la de grado-I, es decir, sin contaminantes fosfodiesterasicos; en nuestro caso hemos utilizado la suministrada por Boehringer and Mannheim aislada a partir de intestino de ternera y - de una actividad específica de 400 U/mg medida por liberación de fósforo - utilizando como substrato paranitrofenolfosfato.

La mezcla de reacción de 1 ml contiene: 0,15 ml de DNA-³²P- \hat{P} iPi a 75 Ug/ml, enzima y ajustado el volúmen a 1 ml de forma que quede 0,003 M TRIS-HCl pH=7,5, 0,010 M MgCl₂. La reacción se lleva a cabo durante 30 min. a 37°C. Después se precipita con 1 ml de ácido perclórico al 0,7% añadiendo antes 0,2 ml de DNA de Timo de ternera a 2,5 mg/ml para ayudar a la precipitación. Tras 10 min. en frio se centrifuga 15 min a 12.000 xg. El sobrenadante se tira y el sedimento se resuspende en 1,65 ml de NaOH 0,1 M. Tras la - resuspensión se lleva a pH=8,0 con 0,2 ml de TRIS-HCl 2,0 M pH=6,45. Tras la neutralización se añade de 1 a 2 unidades de fosfatasa alcalina y se incuba a 45°C durante 30 min. Tras la liberación de los fosfatos se precipita el DNA con ácido perclórico al 7% en frio. Grossman utiliza a continuación la centrifugación, pero nosotros hemos obtenido mejores resultados mediante filtración en Millipore de diametro de poro de 0,45 μ . Los filtrados se cuentan en medio de dioxano y se calcula los $\mu\mu$ moles de ³²P liberado en función de la actividad específica de la preparación de DNA en el momento del conteo.

Los problemas mas importantes derivados de esta marcha analítica de determinación de roturas simples proceden de las contaminaciones que se presentan bien en forma de ³²P libre, bien en forma de mononucleotidos u oligonucleotidos de cadena corta que no precipitan bien en la segunda precipitación. En efecto, la primera precipitación tras la actuación de la UV-Endonucleasa, es probablemente la mas segura aunque no llega a ser nunca mas del 95% del DNA para el DNA control, es decir para aquel DNA que al menos - teóricamente no ha sufrido ningún ataque enzimático. Además en esta precipitación lo que nos interesa, a fin de cuentas, es el precipitado, y por tanto, será suficiente con que el nivel de precipitación sea igual en el caso del control que en el caso de las muestras tratadas con la UV-Endonucleasa. La segunda precipitación en cambio se realiza sobre un DNA que ha sido desnaturado en mayor o menor grado en la resuspensión con NaOH 0,1 M; de hecho en la práctica, la velocidad de resuspensión después depende mucho de la - concentración de proteínas en la muestra y ésta, puede ser muy diferente de unas fracciones a otras del aislamiento. Tras la resuspensión y posterior - neutralización hasta pH=8,0, se realiza una incubación a 45°C. Por lo tanto, tras la precipitación, la separación por sedimentación de las fracciones so

TABLA-II-12-

cpm MUESTRAS (1)	cpm FILTRADO (2)	%cpm respecto de la muestra	cpm F. ORG. (3)	%cpm respecto del filtrado	cpm F. ACU. (3)	%cpm respecto del filtrado	cpm F. (OTA)	%cpm respecto del filtrado
³² P 37.850	37.183	98,24	35.652	95,88	1.677	4,51	37.324	100,40
DNA- ³ H 279.591	680	0,24	189	27,79	475	69,85	664	97,65
³ H=128.190	412	0,32	25	6,07	449	108,98	474	115,00
DNA- ³ H- ³² P ³² P=547.362	1.215	0,22	24	1,98	762	62,72	786	64,69

(1).- Todas las muestras por duplicado. Los contajes de ³²P en dioxano, los contajes de ³H en medio-2- (Ver apartado II-2-7). Las muestras con ³H y ³²P se contaron en ambos medios a los que se les añade: 0,5 ml de tampón acuoso en el dioxano donde se cuenta el ³²P y 0,5 ml de isobutanol-benceno (1/1) en el medio-2- donde se cuenta el ³H.

(2).- Tras la precipitación en ácido perclórico en frío la filtración se realiza en filtros Millipore de 0,45 U de diámetro de poro.

(3).- A cada 3 ml de filtrado se le añade 0,5 ml de molibdato amónico al 10%, se agita y se deja 10 min. Después se añade 5 ml de isobutanol-benceno (1/1), se agita y centrifuga para separar las fases. Alicuotas de 0,5 ml se cuentan en los medios apropiados y en las condiciones encontradas en las que se consigue un mínimo de solapamiento de los espectros del tritio y del ³²P. Aún así los contajes de tritio están corregidos en función de este solapamiento.

soluble e insoluble en ácido es ahora mas difícil, pues es necesario conseguir que sedimenten oligonucleotidos muy pequeños. La filtración, en lugar de la sedimentación, mejora esta separación aunque de nuevo los mononucleotidos y oligonucleotidos de cadena corta puedan también aqui aunque en menor grado, pasar el filtro.

Con objeto de evaluar hasta que punto estas críticas pueden obligar a tomar ciertas precauciones a la hora de cuantizar las roturas simples introducidas por la UV-Endonucleasa en DNAs irradiados con radiación U.V., hemos medido la eficacia de la filtración como sistema de separación de DNA macromolecular de fosfato libre. Así mismo en estas experiencias, que se presentan a continuación, se ha evaluado la eficacia de una extracción selectiva con molibdate amonico e isobutanol-benceno (1/1) del fosfato libre de los filtrados. En la Tabla-II-12 se reflejan los resultados obtenidos así como las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo la determinación.

Como se observa, cuando lo que se precipita y filtra es solamente ^{32}P , casi todo él pasa el filtro y mas del 95% del filtrado aparece después en la fase organica y sólo del orden del 4,5% aparece en la fase acuosa; la recuperación entre ambas fases es de aproximadamente del 100%.

Cuando lo que se precipita es DNA- ^3H , todo el DNA precipitado se retiene en el filtro, solo filtra el 0,24% y aquí la mayor parte del filtrado aparece en la fase acuosa. Por último, cuando lo que se precipita es DNA- ^3H - ^{32}P , de nuevo el 99% del DNA precipitado se retiene en el filtro, no aparece nada en la fase organica, ya sea contando ^{32}P o contando ^3H . El filtrado aparece en la fase acuosa. En definitiva pues la precipitación y filtración es bastante eficaz, mejor que el 95%, y la extracción selectiva del ^{32}P en la fase organica es también mejor que el 95%.

Cuando a un DNA- ^3H - ^{32}P se le añade cantidades crecientes de ^{32}P y se realiza la precipitación y extracción, se comprueba además que la extracción es cuantitativamente significativa. En efecto, en la Tabla-II-13 se encuentran expresados los resultados obtenidos de esta forma con un DNA- ^3H - ^{32}P al que se le ha añadido: 0, 354, 708, 1.416, y 2.832 cpm de ^{32}P . Tras la filtración, el contaje del tritio filtrado nos indica un nivel de filtración del 5,5% como promedio. Por su parte el contaje en ^{32}P nos indica que por encima de las 2.086 cpm del control aparecen en cada muestra las cpm añadidas como ^{32}P , es decir: 2.795 cpm frente a las 3.500 cpm esperadas en la muestra III, 3.304 cpm frente a las 3.500 cpm esperadas en la muestra IV 5.145 cpm frente a 4.910 cpm esperadas en la muestra Y y solo la muestra

TABLA-II-13-

cpm Muestras (1)	cpm ^{32}P añadidas	cpm Filtrado	cpm Fase Organica	cpm Fase Acuosa	cpm Ambas Fases
^3H 24.906 I-DNA ^{32}P 0		1.038 2.086	28 225	430 528	458 753
^3H 24.906 II-DNA ^{32}P 162.780	354	1.186 3.157	143 420	215 1.899	458 2.319
^3H 24.906 III-DNA ^{32}P 162.780	708	688 2.954	329 815	403 1.760	732 2.575
^3H 24.906 IV-DNA ^{32}P 162.780	1.416	744 3.304	580 2.310	259 1.296	839 2.148
^3H 24.906 V-DNA ^{32}P 162.780	2.832	1.876 5.145	1.001 2.940	366 2.148	1.367 5.088

(1).- Todas las muestras por duplicado. Los resultados presentados son los valores medios de los duplicados.

II se separa apreciablemente de lo esperado, 3.157 cpm frente a 2.450 cpm. Esto mismo sucede también tras la extracción del fósforo en la fase orgánica, apareciendo en cada muestra las cpm del control mas las añadidas en cada muestra, es decir: 229 cpm para el control, muestra I, 420 cpm, aproximadamente igual al control mas las 354 cpm añadidas, para la muestra II, - 815 cpm, aproximadamente igual al control mas las 708 cpm añadidas para la muestra III, 2.310 cpm aproximadamente igual al control mas las 1.410 cpm añadidas para la muestra IV y 2.940 cpm aproximadamente igual al control - mas las 2.830 cpm añadidas para la muestra V.

Los altos valores del contaje de ^{32}P en medio dioxano de la fase acuosa, indican la presencia de mononucleotidos u oligonucleotidos pequeños que no se extraen en la fase organica y que de no haber hecho la extracción se contabilizarían como ^{32}P libre. De hecho de las 2.086 cpm en ^{32}P que aparecen en el filtrado del control solo 225 son de ^{32}P libre. Por último, indicar que la suma de los contajes obtenidos en ambas fases rinden valores - próximos al 100% para casi todas las muestras y para ambos isotopos con respecto a los valores de los filtrados.

Cuando un DNA- ^3H - ^{32}P que lleva varios días disuelto en solución salina citrato (0,15 M NaCl, 0,015 M citrato sódico) y que por tanto posee algunas roturas simples producidas por autorradiolisis, se trata con fosfatasa alcalina y después se precipita y filtra, el filtrado presenta una relación tritio/fosforo de 1/2,6, en comparación con el valor de 1/1,7 que se obtiene en este DNA recién disuelto. El tanto por ciento de DNA no precipitable que pasa el filtro en el control es del 3,05% siendo el 4,68% en el DNA con roturas simples; según esto y de acuerdo con el método descrito por Grossman, tendríamos un 1,63% de fosfatos liberados por la fosfatasa - alcalina en la muestra respecto del control. Ver Tabla-II-14.

Cuando esta misma experiencia la realizamos continuando con la extracción del ^{32}P filtrado, observamos que pasamos de una relación tritio/fosforo en el filtrado de 1/2,4 a 1/3,6 (muestra y control) a una relación 1/20,7 a 1/10,0 (muestra y control) en la fase organica; es decir, hemos purificado notablemente el ^{32}P libre del filtrado con respecto al tritio, es decir, con respecto a mononucleotidos y oligonucleotidos de cadena corta. En la fase acuosa sin embargo la relación tritio/fosforo tiene los mismos - valores que en el DNA original en el control, es decir, 1/1,6 a 1/1,7, e incluso valores inferiores en la muestra, es decir, 1/0,9. Con estos datos - ahora, la cantidad de fosforo liberado por la fosfatasa en la muestra con -

TABLA-II-14-

cpm MUESTRA (1)	$^3\text{H}/^{32}\text{P}$	cpm FILTRADO $^3\text{H}/^{32}\text{P}$		% ^{32}P respecto del DNA	cpm F.ORG. $^3\text{H}/^{32}\text{P}$ (4)	% ^{32}P respecto de la su <u>ma</u> de <u>am</u> bas fases	cpm F.ACU. $^3\text{H}/^{32}\text{P}$
		17.505	1/1,7				
$^3\text{H}= 623.687$ DNA-Control (2) $^{32}\text{P}=1.022.032$	1/1,6	31.196	1/1,7	3,05			
$^3\text{H}= 741.198$ DNA-Muestra (3) $^{32}\text{P}=1.120.845$	1/1,5	20,055 52.498	1/2,6	4,68			
$^3\text{H}= 868.861$ DNA-Control (2) $^{32}\text{P}=1.397.832$	1/1,6	6.179 22.693	1/3,6	1,62	480 4.480	1/10,0 44,27	3.055 5.644
$^3\text{H}= 840.395$ DNA-Muestra (3) $^{32}\text{P}=1.438.432$	1/1,7	12.487 30.874	1/2,4	2,14	337 7.033	1/20,7 54,85	6.183 5.763

(1).- Todas las muestras por triplicado

(2).- DNA marcado en tritio y en ^{32}P recién disuelto.

(3).- DNA marcado en tritio y en ^{32}P tras varios días en solución.

(4).- Alicuotas de aproximadamente la mitad del filtrado a las que se les realiza la extracción y separación de fases.

respecto al control será: el 54,85% del 2,14% del filtrado menos el 44,27% del 1,62% del filtrado, es decir el 0,45%. Ver Tabla-II-14.

En definitiva pues, siempre que exista cierta contaminación en el DNA que estamos estudiando de ^{32}P libre o formando parte de mononucleotidos u oligonucleotidos de cadena corta la determinación del fósforo liberado por la fosfatasa alcalina a nivel de filtrados, estará sobreestimando la cantidad de roturas simples introducidas en el DNA. Así determinaciones precisas de esta magnitud necesitarán de la extracción selectiva del ^{32}P . Hemos de indicar sin embargo que el ensayo tal y como lo describe Grossman puede ser utilizado eficientemente como ensayo rutinario de seguimiento de actividad UV-Endonucleasa, siempre que se trabaje con DNAs recién aislados y con una buena marca en ^{32}P . La determinación cuantitativa de roturas simples por este método debe de ser tomada sin embargo con gran prudencia.

II-8-2.- Otras enzimas utilizadas.

Además de las enzimas ya comentadas, se han utilizado la DNA-Endonucleasa-I- de pancreas suministrada por Boehringer and Mannheim, para diversos tratamientos. El ensayo de actividad utilizado está basado en el descrito por Kunitz, M. (1950). Consiste en la medida del incremento de absorción experimentado por una muestra de DNA cuando como consecuencia de una fuerte digestión enzimática los fragmentos de DNA se desnaturan. Una unidad para nosotros, es la cantidad de enzima que en las condiciones del ensayo, produce un efecto hipercrómico de 0,01 unidad de absorbencia por minuto sobre un DNA a 1 unidad de absorbencia a 260nm.

La mezcla de reacción contiene por ml 50 Ug de DNA de timo de ternera, enzima y ajustado todo ello a 0,015 M NaCl, 0,05 M TRIS-HCl pH=7,5 0,005M MgCl_2 . El seguimiento de la reacción se realiza en un espectrofotómetro de doble haz con portacubetas termostaticable y a 25°C.

La DNA-Polimerasa-I- utilizada es la suministrada por Boehringer and Mannheim, aislada a partir de E.coli con una actividad específica de 2.500 a 5.000 unidades por miligramo de acuerdo con el ensayo descrito por Richardson, C.C. et al (1964). Una unidad es la cantidad de enzima necesaria en las condiciones del ensayo para producir la incorporación de 10 mUmoles de dTTP- ^3H en Poli(dAT) utilizado como molde.

La mezcla de reacción contiene: 110 Ul de tampón fosfato pH=7,4 0,016 M, 50 Ul de MgCl_2 0,042 M, 50 Ul de β -Mercapto-etanol, 0,006 M, 20 Ul de dATP 1 mM, 20 Ul de dTTP- ^3H 1 mM, y 50 Ul de Poli(dAT) que contienen 6 mUmoles y 20 Ul de enzima. La incubación se realiza durante 30 min. a 37°C

La reacción se para añadiendo en frío 0,1 ml de DNA de timo de ternera a 2,5 mg/ml y 2,5 ml de ácido perclórico 1 N. Tras 10 min. en frío, se filtra en Millipore de 0,45 U de tamaño de poro y se lava después con 2,5ml del mismo ácido, cuatro veces. Los filtros secos se cuentan en medio-4- (Ver apartado-II-2-7-).

CAPITULO IIIEXPOSICION E INTERPRETACION DE RESULTADOSIII.1.- Determinación de la densidad de roturas simples en DNA de E.coli irradiado a diferentes longitudes de onda y exposiciones.

La densidad de roturas simples por nucleotido en DNAs que habían sido irradiados a diferentes longitudes de onda y dosis, se obtuvo del estudio de los límites de sedimentación de estos DNAs tras desnaturación y sedimentación en ultracentrifuga analítica. (II.5.2.).

Se estudiaron cinco longitudes de onda: 300^{+10} nm, 280^{+10} nm, - - 260^{+10} nm, 254 nm y 240^{+10} nm. Los resultados obtenidos en el análisis aparecen reflejados en la Tabla-III-1 y están representados en la Fig-III-1. - Estos valores son los resultados medios obtenidos en la determinación de la densidad de roturas simples y sus desviaciones típicas. En la Tabla-III-1 - aparecen también los valores máximos de las pendientes para cada serie de - determinaciones, calculados a partir de la desviación de la media de los - valores de cada serie y del intervalo de dosis estudiado.

Es necesario hacer hincapie en que, a excepción de la preparación - de DNA utilizada en la serie de irradiaciones a 240^{+10} nm, cuya densidad - de roturas simples inicial era de $(1,37^{+0,14}) \times 10^{-4}$ roturas simples/nucleo - tido, todas las demás preparaciones tenían de 2 a 4×10^{-5} r.s./n.. Es decir, un peso molecular medio de los fragmentos de DNA desnaturado entre 8 y 16×10^6 daltons; lo que supone de 1 a 5 roturas simples por molécula de DNA nativo. En definitiva pues, se ha trabajado con preparaciones de DNA que a pesar de proceder de una bacteria (E.coli), merced al método de aislamiento utilizado (II.2.2.) apenas poseen roturas simples intracadena, lo que permite trabajar en condiciones de gran sensibilidad a la hora de determinar la aparición de nuevas roturas simples.

Como conclusión podemos decir. pues, que en las condiciones de irradiación utilizadas (soluciones de DNA en 0,15 M. NaCl, 0,015 M. citrato sódico y en ausencia de oxígeno y en atmósfera de nitrógeno) la irradiación con dosis crecientes de radiación U.V. de soluciones de DNA de E.coli y en el rango del espectro estudiado (300 nm a 240 nm) no se producen incrementos en la densidad de roturas simples detectables por el método de determinación

DETERM. DE LA DENSIDAD DE ROTURAS SIMPLES EN FUNCION DE LA LONGITUD DE ONDA Y DOSIS EN DNA DE E. coli

Longitud de onda en nm.	Fluencia energética media (\bar{L}) φ_n : (Ergios/mm ²) x 10 ⁻⁴ (1)	Coefficiente de sedimentación (50%) S ^o 20W Desnaturado (2)	Peso molecular media en número (Mn) x 10 ⁻⁶	Densidad de roturas simples d.r.s x 10 ⁵	Valor máximo de la pendiente en el rango de \bar{L} (3)
300 ⁺ -10	0	34,3	11,0 ⁺ -1,7	2,9 ⁺ -0,5	
"	10,5	32,6	8,2 ⁺ -0,9	3,9 ⁺ -0,5	6,1 x 10 ⁻⁷
"	18,9	33,5	9,4 ⁺ -0,7	3,3 ⁺ -0,3	
"	25,2	35,2	10,4 ⁺ -0,9	3,0 ⁺ -0,3	
"	37,8	33,8	7,7 ⁺ -1,0	4,1 ⁺ -0,4	
280 ⁺ -10	0	33,3	11,0 ⁺ -1,1	2,9 ⁺ -0,3	
"	3,6	29,0	7,3 ⁺ -0,7	4,3 ⁺ -0,5	
"	7,2	30,7	8,4 ⁺ -0,1	3,7 ⁺ -0,1	1,7 x 10 ⁻⁷
"	10,8	32,6	9,8 ⁺ -0,9	3,2 ⁺ -0,3	
"	14,4	30,0	8,2 ⁺ -0,4	3,8 ⁺ -0,2	
260 ⁺ -10	0	38,5	14,6 ⁺ -0,8	2,1 ⁺ -0,1	
"	1,8	38,8	16,0 ⁺ -1,6	1,9 ⁺ -0,2	
"	4,3	38,8	11,8 ⁺ -0,8	2,6 ⁺ -0,2	9,2 x 10 ⁻⁷
"	9,0	38,7	13,2 ⁺ -1,3	2,4 ⁺ -0,2	
"	13,3	38,6	14,0 ⁺ -1,4	2,3 ⁺ -0,2	
254	0	30,2	8,5 ⁺ -0,4	3,7 ⁺ -0,2	
"	4,1	31,2	8,8 ⁺ -0,2	3,6 ⁺ -0,1	1,4 x 10 ⁻⁷
"	8,1	30,7	8,9 ⁺ -0,1	3,5 ⁺ -0,1	
"	14,4	31,1	7,2 ⁺ -0,5	4,4 ⁺ -0,3	
240 ⁺ -10	0	19,5	2,3 ⁺ -0,3	13,7 ⁺ -0,2	
"	5,4	19,5	2,4 ⁺ -0,2	13,0 ⁺ -0,2	6,4 x 10 ⁻⁷
"	13,5	19,8	2,3 ⁺ -0,1	13,3 ⁺ -0,1	
"	22,6	20,3	2,3 ⁺ -0,3	13,4 ⁺ -0,2	

(1) Error menor del 3%

(2) Error menor del 3%

(3) Nivel de confianza del 99%

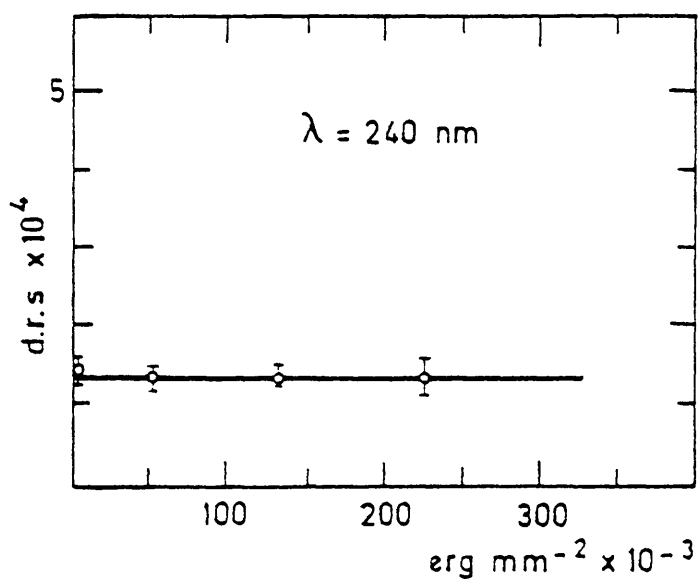
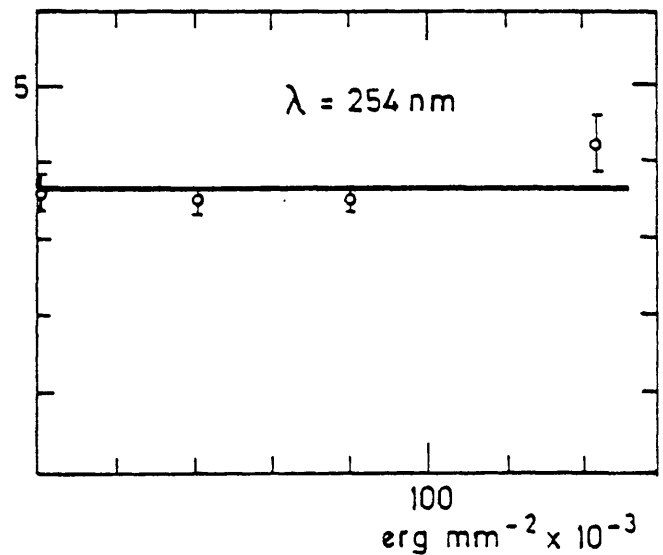
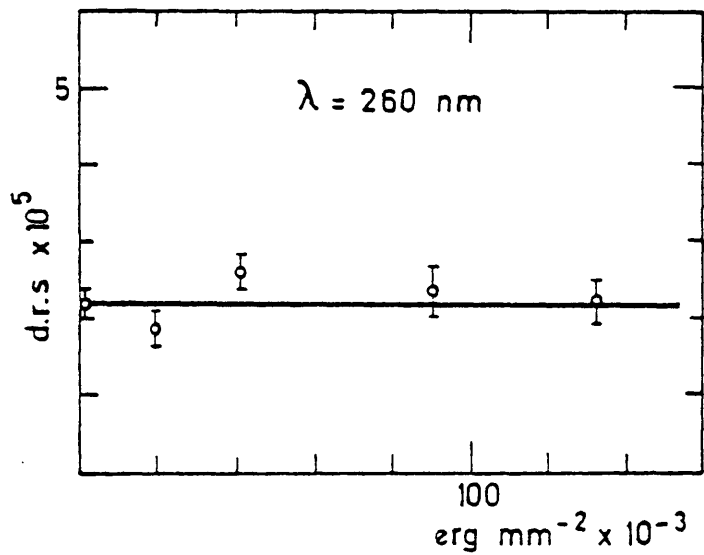
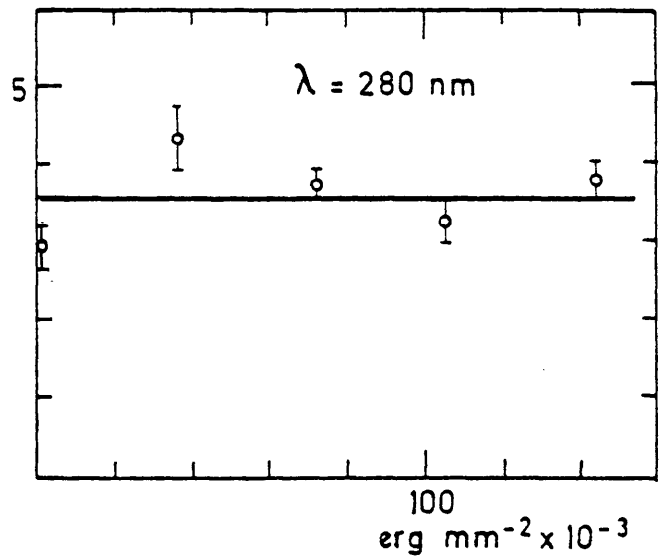
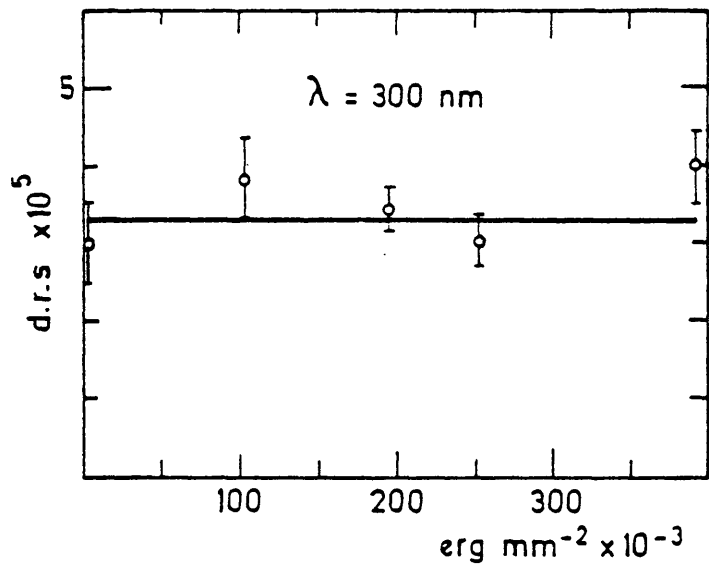


Fig. III.1.- Determinación de la densidad de roturas simples en DNA de E.Coli irradiado con radiaciones U.V.

En ordenadas la densidad de roturas simples por nucleótido de DNA, en abscisas la fluencia energética incidente en ergios/mm^2 .

empleado. Teniendo en cuenta el error de las determinaciones se puede decir entonces que de producirse algún incremento en la densidad de roturas simples éste es siempre menor de $(0,1 \text{ a } 0,9) \times 10^{-5}$ roturas simples por nucleotido de DNA por cada 10^6 ergios/mm², en cualquiera de las longitudes de onda estudiadas, sin que se observe ninguna tendencia, en este margen, en función de la energía de la radiación.

III.2.- Estudio del proceso de formación de dímeros en DNA de E.coli irradiados con radiación U.V. a diferentes longitudes de onda, mediante determinación química de la formación de dímeros.

III.2.1.- Determinación de dímeros de pirimidina ($\hat{T}\hat{T}$ y $\hat{C}\hat{T}$) en DNA-³H de E.coli irradiado a diferentes longitudes de onda del espectro U.V. Determinación de las secciones eficaces del proceso de dimerización y monomerización.

Las soluciones de DNA-³H de E.coli en 0,15 M. NaCl, 0,015 M. citrato sódico y en atmosfera saturada de nitrógeno se irradiaron con dispositivos apropiados que permitieron la irradiación a diferentes longitudes de onda, con una agitación adecuada y un posicionado reproducible. (II.3.1.).

Las dosimetrías de las irradiaciones se llevaron a cabo mediante actinometrias de diversos tipos. (II.3.2.3.4.)

En las Fig.-III-2 a 6, se presentan los resultados obtenidos en la determinación del porcentaje de dímeros de timina-timina ($\hat{T}\hat{T}$) y de timina-citosina ($\hat{C}\hat{T}$) con respecto a timinas totales para diferentes longitudes de onda: 300 ± 10 nm, 280 ± 10 nm, 260 ± 10 nm, 254 nm y 240 ± 10 nm, y exposiciones. La fluencia energética media o exposición se ha expresado en unidades de Einstein por metro cuadrado (E/m^2). Cada valor representado es el resultado de la media de 4 a 6 determinaciones, tan sólo algunos son el resultado de la media de menos de 4 o más de 6 determinaciones. Las bandas representadas arriba y abajo de los valores son los errores estimados en el proceso total de la determinación cromatográfica utilizada, en función del porcentaje de dímeros respecto de timina que se detecta. Las curvas representadas son el resultado del ajuste de los datos experimentales a una función 1-Exponencial, utilizando el programa MINUIT en el centro de Cálculo de la J.E.N.

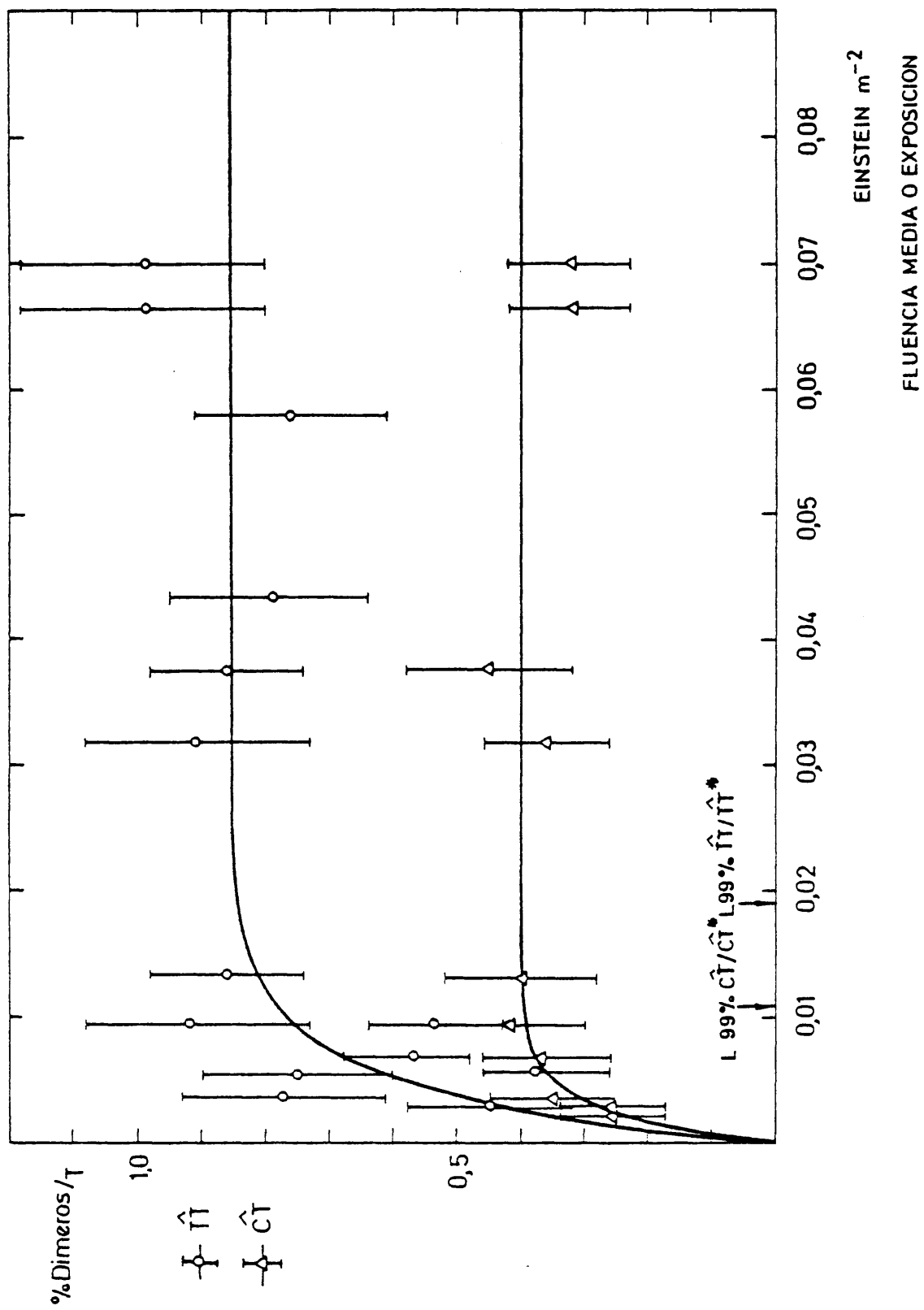


Fig.III-2... DIMEROS DE $\hat{T}T$ Y $\hat{C}T$ EN DNA-E.COLI A 240 ± 10 nm

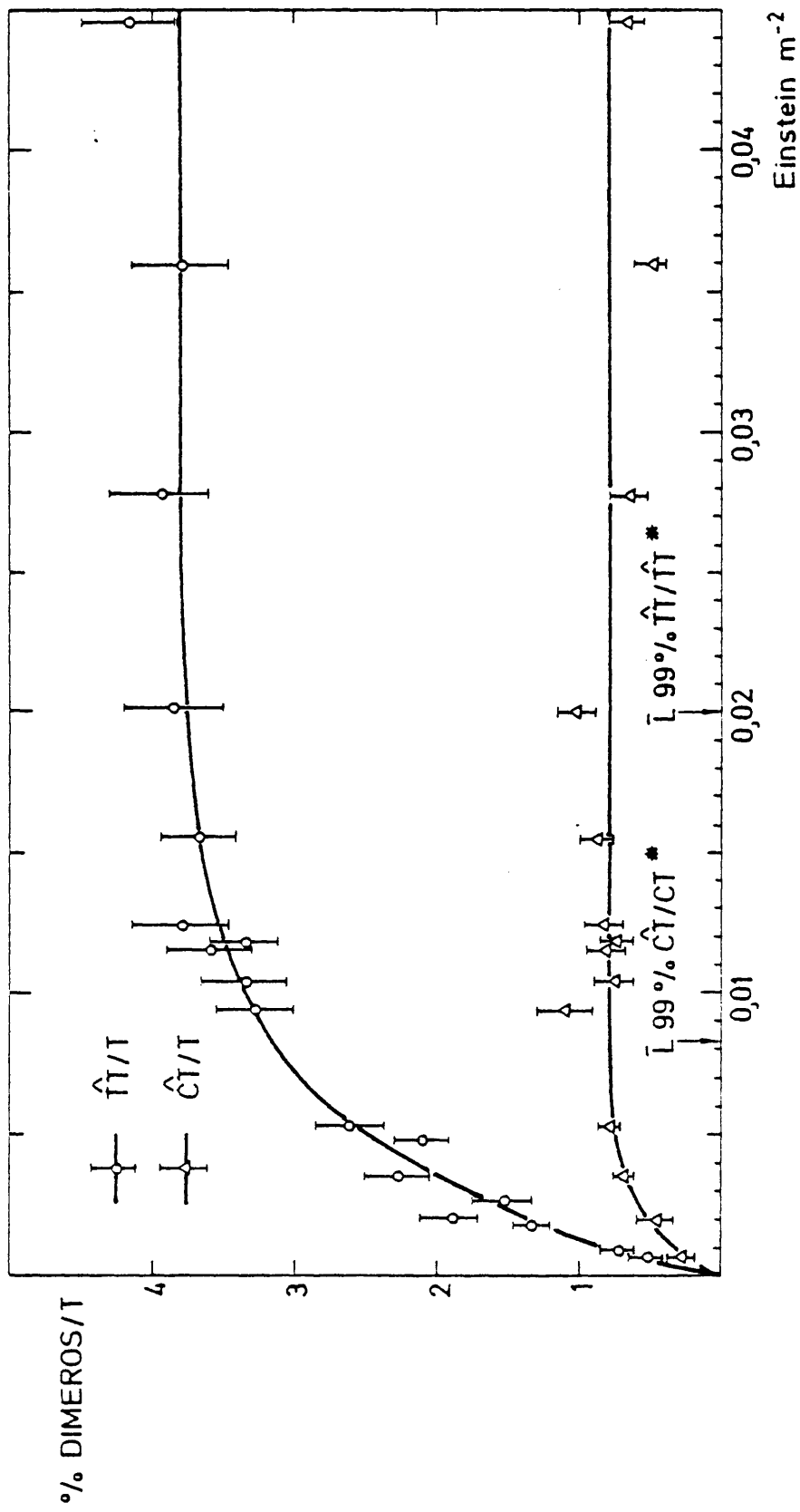
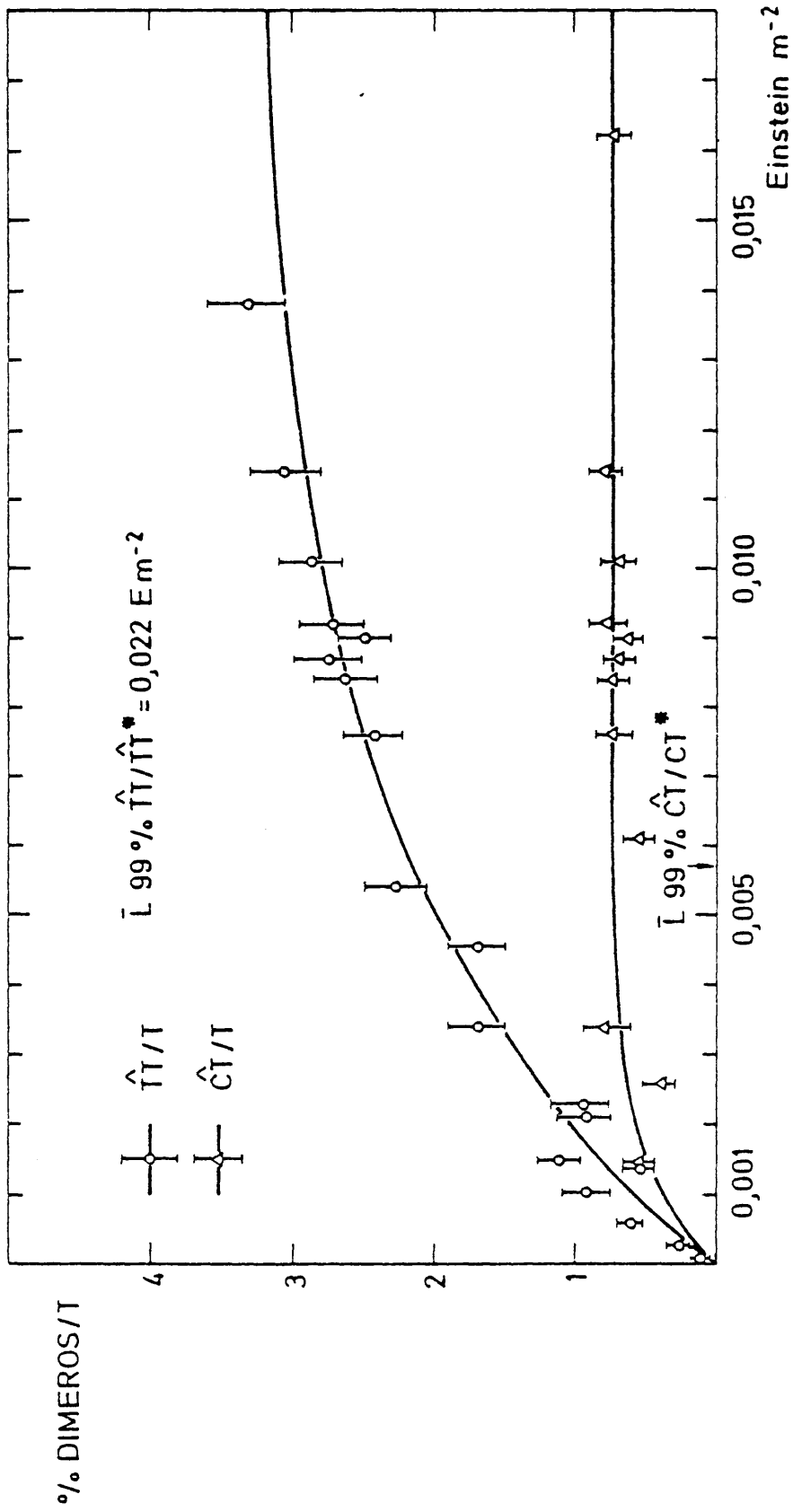


FIG.III-3.- DIMEROS DE $\hat{T}\hat{T}$ Y $\hat{C}\hat{T}$ EN DNA - E. coli A 254 nm



FLUENCIA MEDIA Ó EXPOSION

FIG. III-4.- DIMEROS DE $\hat{T}\hat{T}$ Y $\hat{C}\hat{T}$ EN DNA - E. coli A $260 \pm 10 \text{ nm}$

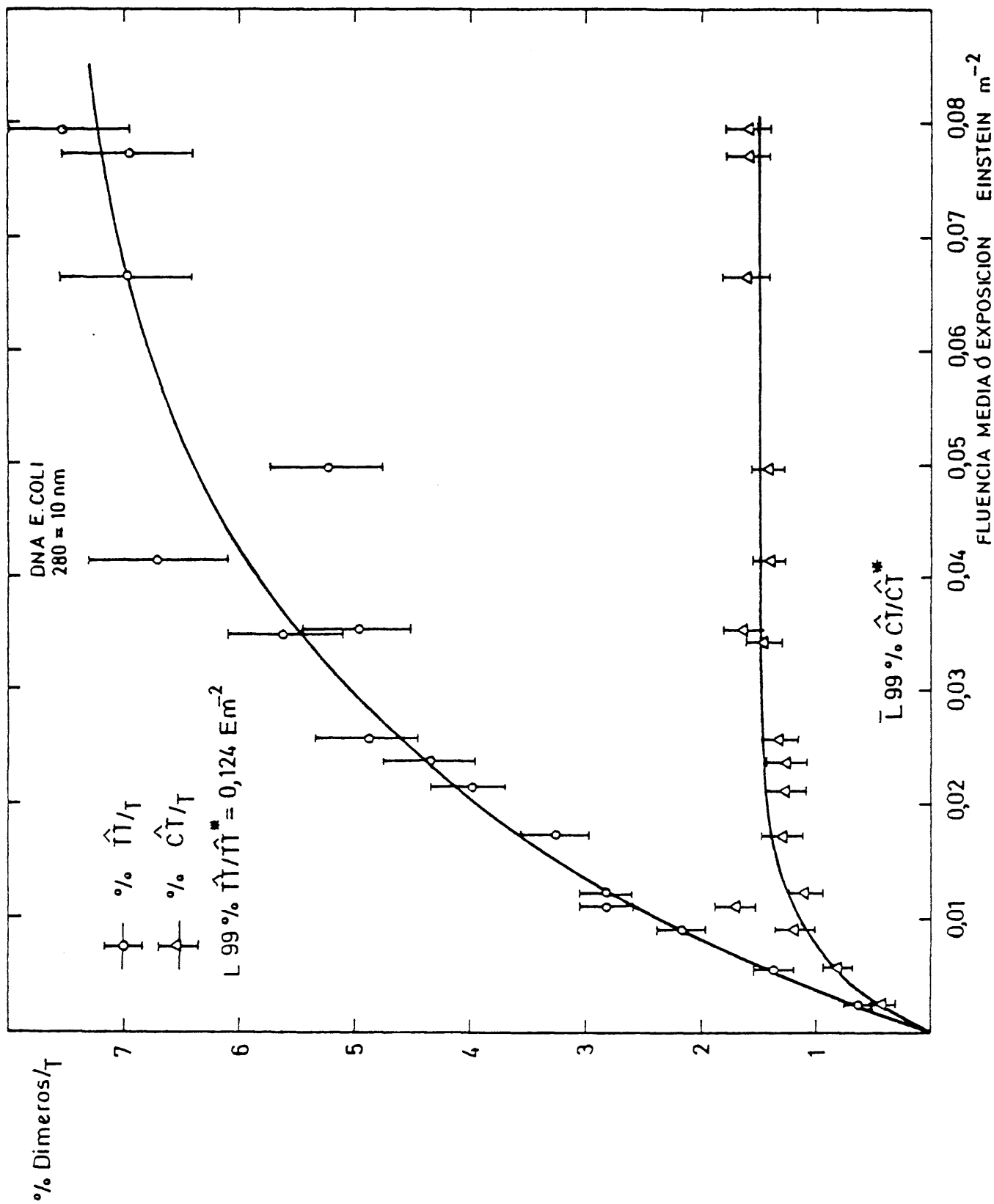


Fig. III - 5. - DIMEROS DE \hat{T} y \hat{C} EN DNA E. COLI A 280 ± 10 nm

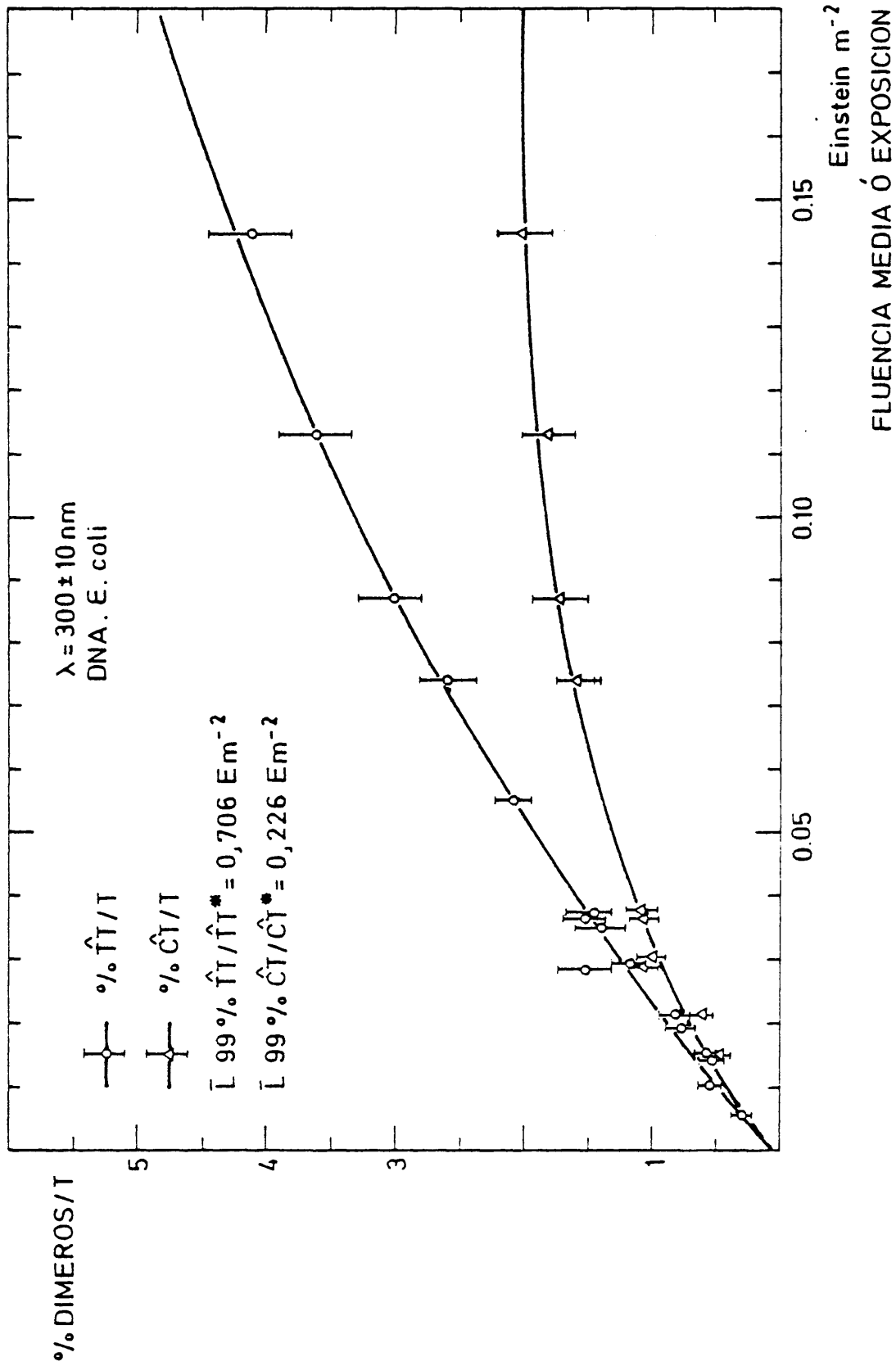


FIG. III-6.- DIMEROS DE \hat{T} Y \hat{C} EN DNA - E. coli A $300 \pm 10 \text{ nm}$

Esta función utilizada, $D=kP_0/(k+r) (1-e^{-(k+r)\bar{L}})$, es la que resulta de la consideración del fenómeno estudiado, formación y deformación de dímeros, tras una serie de simplificaciones que han sido ya discutidas en la introducción de esta memoria. (I.7.2).

Tras el ajuste de los datos experimentales a esta función, se han obtenido los valores de saturación de porcentaje de dímeros ($D^*=kP_0/(k+r)$) y los valores de las pendientes, es decir, los valores de las secciones eficaces de la reacción global de dimerización y monomerización ($k+r$) para cada longitud de onda y tipo de dímero considerado. Estos valores aparecen reflejados en la Tabla-III-2. A partir de ellos y conociendo el valor de P_0 , es decir, el valor de la frecuencia dinucleotídica del DNA en cuestión, se puede calcular el valor de k y de r ; es decir, el valor de las secciones eficaces del proceso de monomerización (r) y de dimerización (k). Estos valores así calculados con datos de P_0 obtenidos de la bibliografía aparecen también en la Tabla-III-2, donde se indican los errores evaluados en la determinación de todos estos parámetros. La discusión de estos resultados se hará conjuntamente con la de los valores del rendimiento cuántico calculado a partir de ellos, más adelante.

Volviendo de nuevo ahora a las gráficas de las Fig-III-2 a 6, observamos que el porcentaje de $\hat{T}\hat{T}$ respecto de T es siempre superior al de $\hat{C}\hat{T}$ para una exposición dada. La relación entre el porcentaje de los dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ y los de $\hat{C}\hat{T}$ aparece en la Fig-III-7, donde podemos observar que en el límite tendiendo a cero de exposición esta relación tiende a uno, lo que puede interpretarse como que al comienzo de la irradiación la probabilidad de formación de un dímero de $\hat{T}\hat{T}$ y de $\hat{C}\hat{T}$ tras la absorción de un fotón U.V. es la misma, aunque después la probabilidad de monomerización de los dímeros es mayor en los dímeros de $\hat{C}\hat{T}$ que en los de $\hat{T}\hat{T}$. (Ver valores de las Secciones Eficaces de monomerización y dimerización en la Tabla-III-2). En la Tabla-III-3 se han expresado el valor del porcentaje de dímeros que supone un 99% del valor de saturación así como, la exposición a la que se alcanza ese valor para cada longitud de onda y en cada tipo de dímero. Así mismo se indican estos dos mismos valores para la relación de los dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ y de $\hat{C}\hat{T}$, es decir, los valores del 99% de la relación $\hat{T}\hat{T}/\hat{C}\hat{T}$ y la exposición a la que se alcanza.

Como se observa, la saturación de la formación de dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ se alcanza a valores de exposición mayores cuanto mayor es la longitud de onda, aunque -

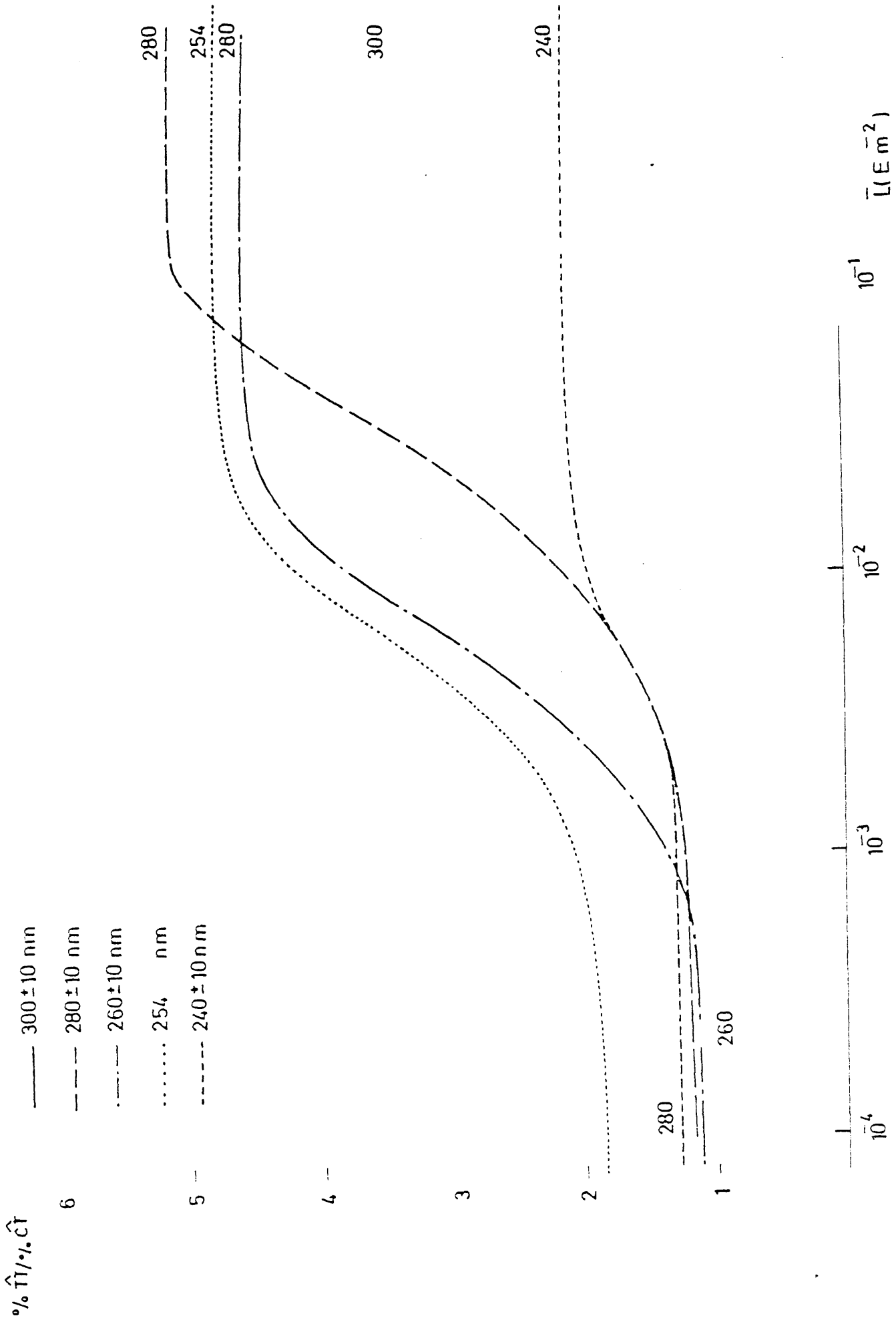


Fig. III-7... EVOLUCION DE LA RELACION \hat{T}/\hat{C} EN DNA - E. COLI

TABLA-III-3. -EXPOSICIONES A SATURACION DE DIMEROS DE \hat{TT} ; \hat{CT} ; Y DE LA RELACION \hat{TT}/\hat{CT}

λ_{nm}	$99\%(D_{TT}^*)$	$\bar{L}(99\%(D_{TT}^*))$	$99\%(D_{CT}^*)$	$\bar{L}(99\%(D_{CT}^*))$	$99\%(\hat{TT}/\hat{CT})$	$\bar{L}(99\%(\hat{TT}/\hat{CT}))$
300 ⁺ -10	7,0	$70,0 \times 10^{-2}$	2,1	$23,0 \times 10^{-2}$	3,3	$70,0 \times 10^{-2}$
280 ⁺ -10	7,5	$12,0 \times 10^{-2}$	1,48	$3,2 \times 10^{-2}$	5,0	$9,7 \times 10^{-2}$
260 ⁺ -10	3,2	$2,2 \times 10^{-2}$	0,72	$0,6 \times 10^{-2}$	4,4	$2,5 \times 10^{-2}$
254	3,80	$2,0 \times 10^{-2}$	0,80	$0,8 \times 10^{-2}$	4,75	$2,3 \times 10^{-2}$
240 ⁺ -10	0,85	$1,9 \times 10^{-2}$	0,39	$1,1 \times 10^{-2}$	2,18	$2,0 \times 10^{-2}$

son muy parecidos por debajo de 260 ± 10 nm. Parecida situación se produce con el dímero de \hat{CT} sobre todo en la clara diferenciación entre longitudes de onda por debajo y por encima de 260 ± 10 nm. Además dado que la exposición de saturación de los dímeros de \hat{TT} es siempre mayor que la de los de \hat{CT} los valores de exposición de saturación de la relación de \hat{TT} y \hat{CT} es muy parecida a la de \hat{TT} .

III.2.2.- Espectros de acción y rendimientos cuánticos de los procesos de dimerización y monomerización.

El espectro de acción muestra la dependencia espectral dentro de un rango concreto del espectro, de la eficiencia monocromática relativa de la radiación con respecto a un efecto considerado. En este caso frente a la formación de dímeros a partir de sus monómeros de pirimidina en el DNA, así como a la monomerización de éstos.

En las Fig-III-8 y 9, se han representado los valores de las secciones eficaces, calculadas a partir del análisis químico de la formación de dímeros, en función de la longitud de onda, para los procesos de dimerización y monomerización. Junto a ellas se han representado los espectros de absorción del DNA, timina, citosina y dímeros de \hat{TT} . (No se dispone del espectro del dímero CT).

De la Fig-III-8-, se desprende que los espectros de acción de la formación de dímeros de \hat{TT} y de \hat{CT} son cualitativamente, y dentro del error experimental, cuantitativamente también, iguales. Además, el espectro de acción así obtenido identifica al DNA o si acaso a la timina (no a la citosina) como moléculas responsables de la absorción de los fotones U.V. que dan lugar después a la reacción fotoquímica.

En la Fig-III-9- se observa cierta similitud entre los espectros de acción de la monomerización de los dímeros de \hat{TT} y de \hat{CT} pero son cuantitativamente diferentes. En cuanto al espectro de acción del dímero de \hat{TT} , se observa cierta correspondencia con el espectro de absorción del dímero de \hat{TT} a longitudes de onda por encima de 260 nm. Longitudes de onda mas bajas ya no ajustan bien.

A partir de las secciones eficaces de formación de dímeros y de su monomerización, se puede calcular el valor de los rendimientos cuánticos pa

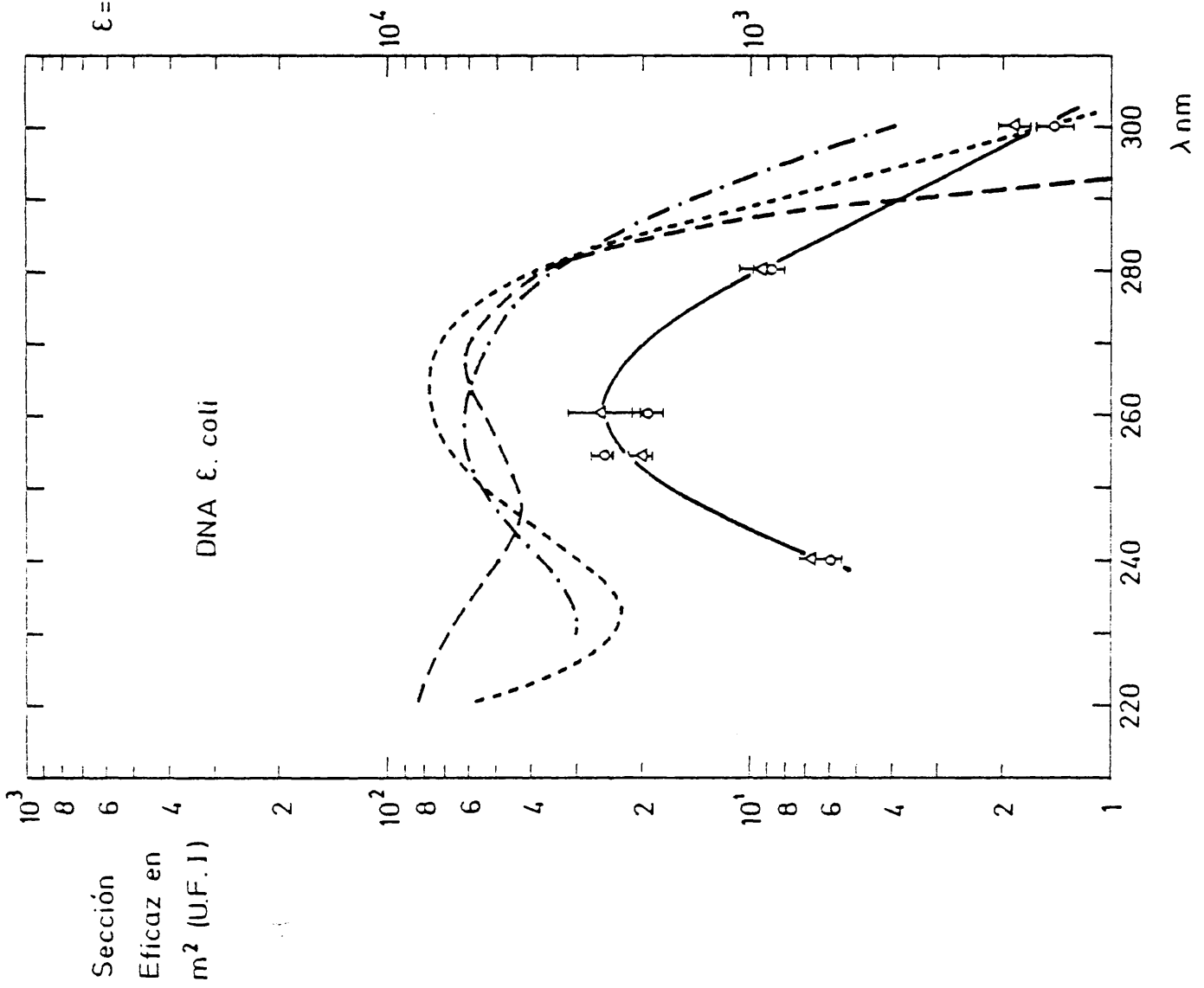


FIG. III-8.-ESPECTRO DE ACCION DE FORMACION DE DIMEROS DE $\hat{T}\hat{T}$ Y $\hat{C}\hat{C}$

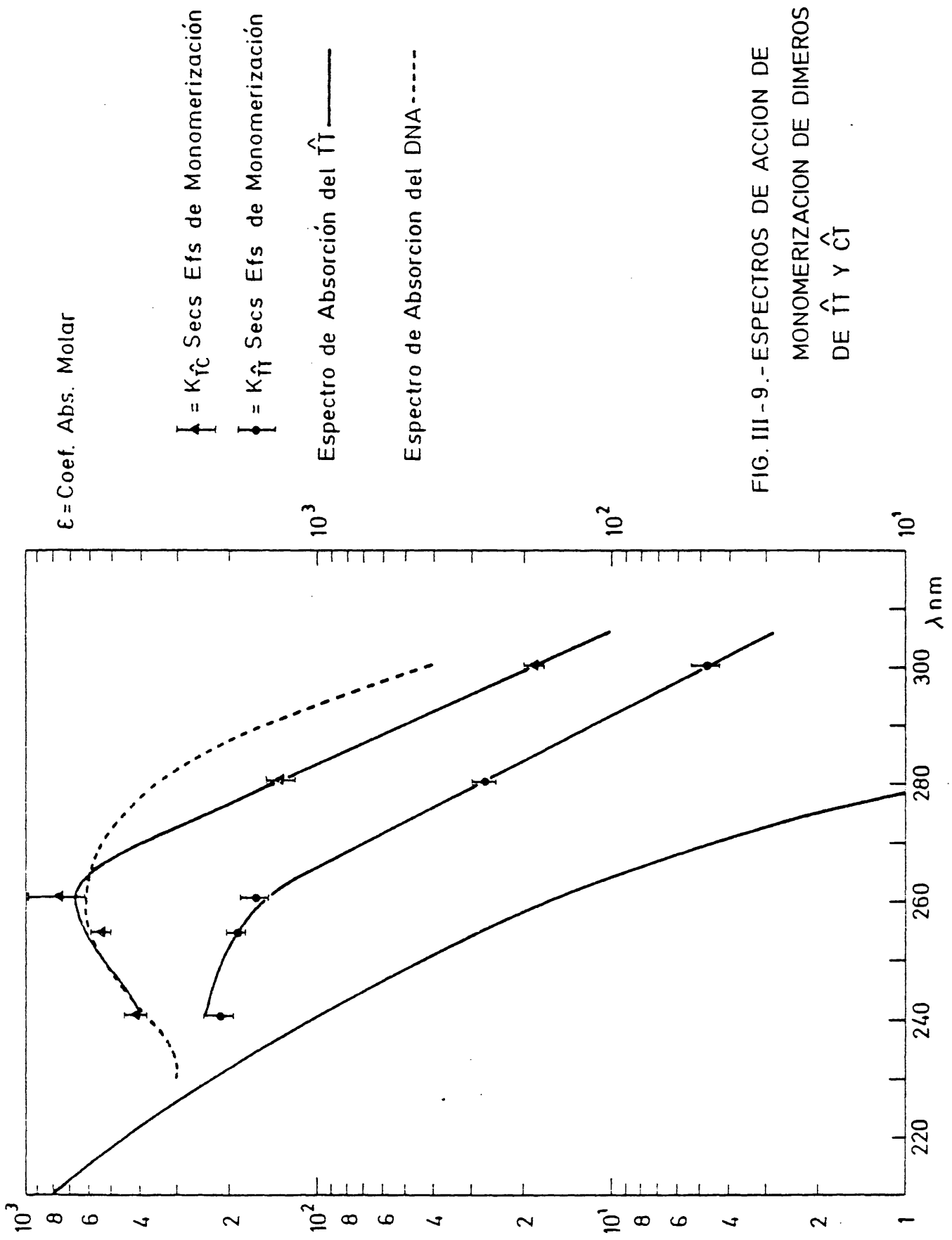


FIG. III - 9. - ESPECTROS DE ACCION DE
 MONOMERIZACION DE DIMEROS
 DE \hat{t} Y \hat{c}

ra cada longitud de onda, si conocemos el coeficiente de absorción molar y por tanto la sección eficaz de absorción, de las moléculas implicadas en la transformación considerada.

Así, para el cálculo de los rendimientos cuánticos de la formación de dímeros, hemos utilizado tanto las secciones eficaces de absorción del DNA como de la timina. En la Tabla III-4 aparecen detallados los valores de las - secciones eficaces del proceso de dimerización para ambos tipos de dímeros - ($\hat{T}T$ y $\hat{C}T$) en $m^2/\text{fotón}$, así como los valores de los coeficientes de absorción molar del DNA, a las distintas longitudes de onda en estudio, que han sido - calculadas experimentalmente mediante análisis espectral y determinación colorimétrica de fósforo. También se presentan los valores de las secciones eficaces calculadas a partir de ellos. Los mismos valores se presentan para la - timina a partir del análisis espectral realizado por nosotros y el valor del coeficiente de absorción molar en el máximo ($E_{264nm}=7.900$) tomado del Handbook of Biochemistry. A partir de ambos valores: secciones eficaces de formación - de dímeros y secciones eficaces de absorción se han calculado los rendimien- tos cuánticos, que aparecen en las columnas 5 y 8 de la Tabla. En todo momen- to se han tenido en cuenta los errores correspondientes a las determinaciones.

Como se observa claramente de la comparación de los resultados del cálculo de los rendimientos cuánticos a partir de los datos espectrales del DNA, tanto para el dímero de $\hat{T}T$ como el de $\hat{C}T$, los valores de los rendimientos cuánticos son muy parecidos a las diferentes longitudes de onda, solo algo más bajos a $240^{+10}nm$. El valor medio así obtenido, incluyendo los valores de $240^{+10}nm$ es de $0,13^{+0,004}$ para la dimerización del $\hat{T}T$ y de $0,015^{+0,005}$ para la dimeriza- ción del $\hat{C}T$.

Por el contrario cuando se utilizan los datos espectrales de la timina en el cálculo de los rendimientos cuánticos, los valores obtenidos a $300^{+10}nm$ son muy superiores al resto de las longitudes de onda en tanto que los valores a estas últimas son muy parecidos a los obtenidos con el espectro del DNA. Así los valores medios obtenidos con el espectro de la timina son: $0,017^{+0,013}$ y $0,020^{+0,017}$ para la dimerización del $\hat{T}T$ y del $\hat{C}T$ respectivamente.

En conclusión, los valores de las secciones eficaces de formación de dímeros de $\hat{T}T$ y el rendimiento cuántico obtenido en todo el rango del espectro - estudiado son del mismo orden de magnitud a los determinados por otros autores en DNA (Patrick M.H. 1977) no así las secciones eficaces de formación de dímeros de $\hat{C}T$ y sus rendimientos cuánticos.

Tabla-III-4.- RENDIMIENTOS CUANTICOS DE LA FORMACION DE DIMEROS DE TT Y DE CT

λ_{nm}	$K_{TT}^{\Delta} \times 10^{23}$ (1)	E(DNA) (2)	$\sigma_{DNA}^2 \times 10^{23}$ (1)	$\phi_{TT}^{\Delta} = K_{TT}^{\Delta} / \sigma_{DNA}^2 \times 10^3$	E(T) (3)	$\sigma_{aT}^2 \times 10^{23}$ (1)	$\phi_{CT}^{\Delta} = K_{CT}^{\Delta} / \sigma_{aT}^2 \times 10^3$
300^{+10}	$0,24^{+0,03}$	410^{+12}	$15,5^{+0,5}$	$15,0^{+1,9}$	160^{+5}	$6,08^{+0,02}$	$39,0^{+5,0}$
280^{+10}	$1,47^{+0,09}$	3420^{+100}	$130,0^{+3,9}$	$11,0^{+0,7}$	4000^{+120}	$150,0^{+4,5}$	$9,8^{+0,7}$
260^{+10}	$3,2^{+0,3}$	6100^{+180}	$230,0^{+6,9}$	$14,0^{+1,6}$	7700^{+230}	$290,0^{+8,7}$	$11,0^{+1,2}$
254	$4,3^{+0,3}$	6200^{+180}	$240,0^{+7,0}$	$18,4^{+1,3}$	6500^{+200}	$250,0^{+7,2}$	$17,0^{+1,2}$
240^{+10}	$1,0^{+0,1}$	4100^{+120}	$160,0^{+4,6}$	$6,6^{+0,8}$	3000^{+92}	$115,0^{+3,4}$	$9,8^{+1,1}$
λ_{nm}	$K_{CT}^{\Delta} \times 10^{23}$ (1)	E(DNA) (2)	$\sigma_{DNA}^2 \times 10^{23}$ (1)	$\phi_{TT}^{\Delta} = K_{CT}^{\Delta} / \sigma_{DNA}^2 \times 10^3$	E(T) (3)	$\sigma_{aT}^2 \times 10^{23}$ (1)	$\phi_{CT}^{\Delta} = K_{CT}^{\Delta} / \sigma_{aT}^2 \times 10^3$
300^{+10}	$0,31^{+0,04}$	410^{+12}	$15,5^{+0,5}$	$20,0^{+2,6}$	160^{+5}	$6,08^{+0,02}$	$51,0^{+6,8}$
280^{+10}	$1,6^{+0,2}$	3420^{+100}	$130,0^{+3,9}$	$12,0^{+1,5}$	4000^{+120}	$150,0^{+4,5}$	$11,0^{+1,3}$
260^{+10}	$4,3^{+1,1}$	6100^{+180}	$230,0^{+6,9}$	$18,0^{+4,7}$	7700^{+230}	$290,0^{+8,7}$	$15,0^{+3,7}$
254	$3,3^{+0,2}$	6200^{+180}	$240,0^{+7,0}$	$14,0^{+0,9}$	6500^{+200}	$250,0^{+7,2}$	$13,2^{+0,8}$
240^{+10}	$1,2^{+0,1}$	4100^{+120}	$160,0^{+4,6}$	$8,0^{+0,8}$	3000^{+92}	$115,0^{+3,4}$	$10,0^{+1,0}$

(1).- Secciones eficaces por fotón de la longitud de onda considerada

(2).- El valor del coeficiente de absorción molar ha sido determinado experimentalmente por nosotros mismos mediante determinación de fósforo y espectrofotometría U.V. El error en la determinación es inferior al 3%.

(3).- El valor de los coeficientes de absorción molar de la timina ha sido calculado a partir del valor a 264,5nm tomado del Handbook de Bioquímica y del espectro realizado por nosotros mismos. El error estimado en estos valores así calculados ha sido también del 3%.

(4).- El cálculo de la sección eficaz de absorción se ha realizado según la fórmula: $\sigma_a = 3,8 \times 10^{-25} \text{ E m}^2 / \text{molec.}$

III-3.- Determinación de dímeros de timina-timina en DNA-³H de B. subtilis B. cereus y SPP-1. Determinación de la sección eficaz del proceso total.

En un intento de ampliar los conocimientos del proceso de formación de dímeros en DNA se han marcado diversos DNAs de diferente composición con timina-³H para la determinación cromatográfica de los dímeros de $\overset{\wedge}{TT}$ producidos tras irradiación a diversas longitudes de onda y dosis del espectro U.V. Se estudiaron los dímeros producidos por la luz U.V. de 300^{+10} nm 280^{+10} nm y 260^{+10} nm en el caso de los DNAs de B. subtilis y B. cereus, así como estas tres longitudes de onda y también 254 nm para el caso del DNA de SPP-1.

El tratamiento de los datos fue en todo semejante al anterior. La determinación de la sección eficaz del proceso se realizó tras encontrar el valor de los dímeros a saturación que mejor ajustaban la recta obtenida al representar el $\log(D^*-D)/D^*$ frente a la dosis.

Los resultados obtenidos aparecen en la Fig-III-11, 12, y 13 para los DNAs de B. subtilis, B. cereus y SPP1 respectivamente. Las curvas representadas son las resultantes con los valores de la sección eficaz y de saturación obtenidos en el ajuste realizado para cada longitud de onda. Estos valores de las secciones eficaces y de los porcentajes de dímeros a saturación aparecen en la Tabla-III-6 junto a los obtenidos en el caso del DNA de E. coli para su comparación.

En la Fig-III-14- se han representado los valores de estas secciones eficaces del proceso de formación de dímeros de $\overset{\wedge}{TT}$ junto con las obtenidas en el estudio del DNA de E. coli, y como se ve en el espectro obtenido al enfrentarlas en función de la longitud de onda es muy parecido en todos los casos a pesar de ser DNAs de diferente composición en GC. Es necesario destacar en este sentido que si bien a priori parece lógico esperar una mayor producción de dímeros en el caso del DNA de B. cereus cuyo contenido en GC es mucho menor que el de E. coli no lo sería sobre esta misma base esperarlo de los DNAs de B. subtilis o SPP-1 cuyo contenido es muy semejante en el caso del primero y solo algo inferior en caso del segundo; sin embargo los resultados experimentales indican también en estos dos casos una mayor producción de dímeros poniendo de manifiesto la importancia que la frecuencia dinucleotídica de los DNAs tiene en el rendimiento final de dímeros, por encima de la composición en GC. Sólo en situaciones en las que la composición de los DNAs se refleje de un modo alea

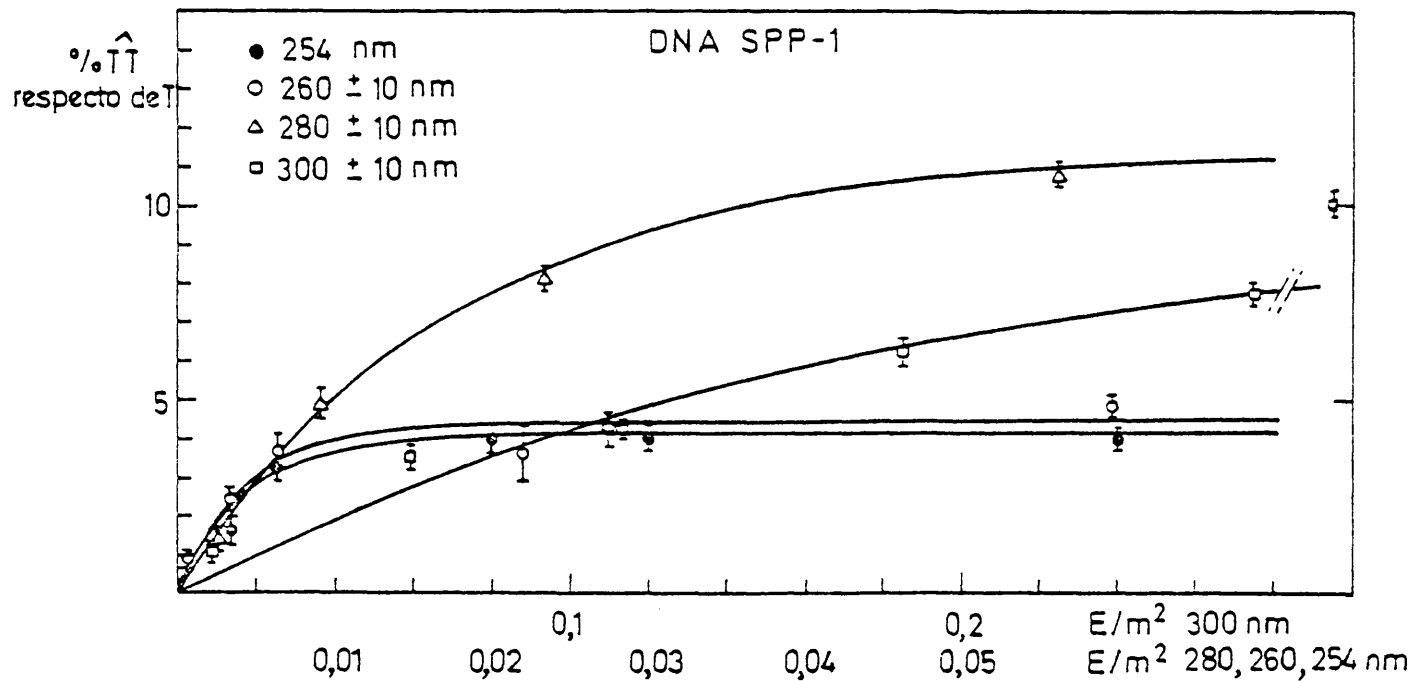
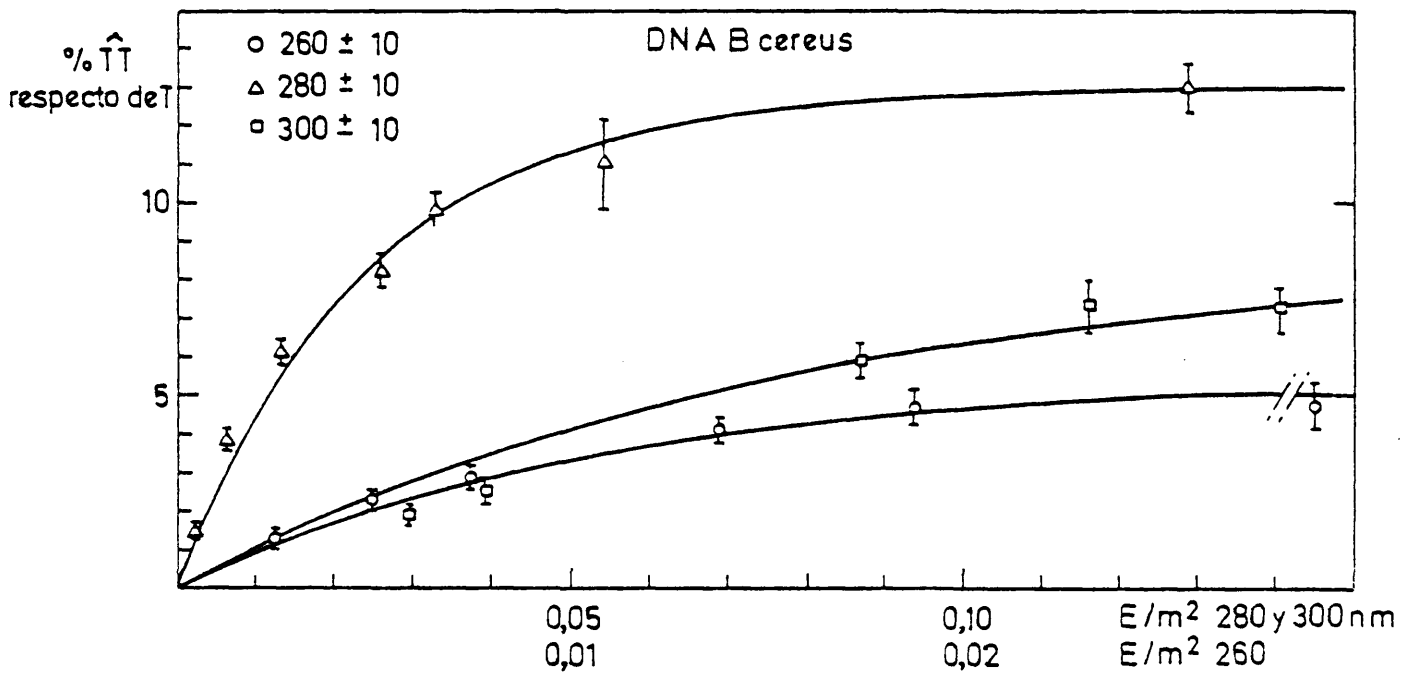
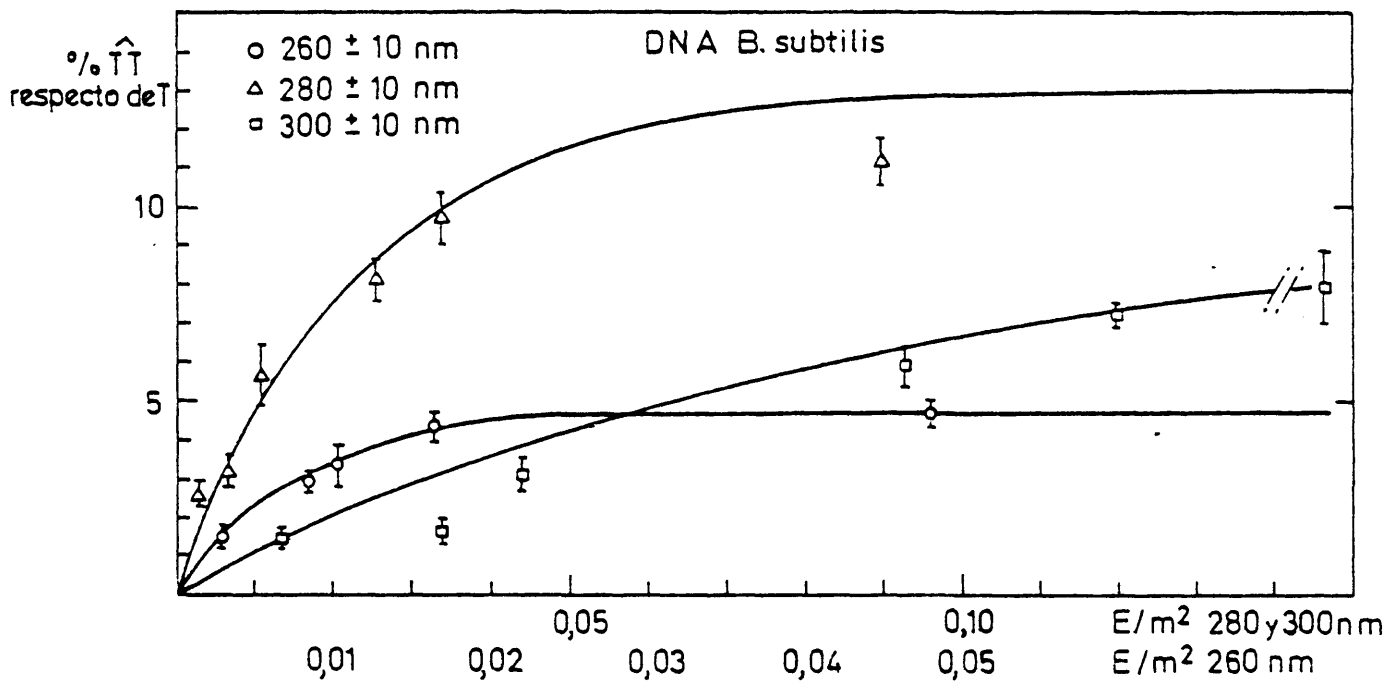


Fig. III-11-12-13. - TANTO POR CIENTO DE DIMEROS DE $\hat{T}\hat{T}$ RESPECTO DE T EN DIFERENTES DNAS

TABLA-III-6-- SECCIONES EFICACES Y VALOR A SATURACION DE LA FORMACION DE DIMEROS DE \hat{T}

ORIGEN DEL DNA	% GC	λ_{nm}	$D^* = kPo/(k+r)$; % \hat{T}	$n = (k+r)$; m^2 (U.F.I.)
E. coli	51,1	300 ⁺ -10	7,1 \pm 0,8	6,3 \pm 0,14
"	"	280 ⁺ -10	7,6 \pm 0,1	37,0 \pm 1,4
"	"	260 ⁺ -10	3,3 \pm 0,1	190 \pm 20
"	"	254	3,84 \pm 0,01	215,0 \pm 7,5
"	"	240 ⁺ -10	0,86 \pm 0,01	227 \pm 24
<hr/>				
B. subtilis	44,0	300 ⁺ -10	9,0 \pm 0,8	12,5 \pm 1,2
"	"	280 ⁺ -10	13,0 \pm 1,0	41,6 \pm 3,1
"	"	254	5,5 \pm 0,7	90 \pm 12
<hr/>				
B. cereus	35,30	300 ⁺ -10	10,0 \pm 0,4	11,1 \pm 0,5
"	"	280 ⁺ -10	13,0 \pm 1,2	43,0 \pm 3,9
"	"	254	4,7 \pm 0,4	140 \pm 13
<hr/>				
SPP1	43,00	300 ⁺ -10	10,0 \pm 0,1	5,6 \pm 0,6
"	"	280 ⁺ -10	11,5 \pm 1,0	58,0 \pm 5,2
"	"	260 ⁺ -10	4,3 \pm 0,4	230 \pm 20
"	"	254	4,1 \pm 0,4	230 \pm 23

1.- Tanto por ciento de dímeros de \hat{T} respecto de T.

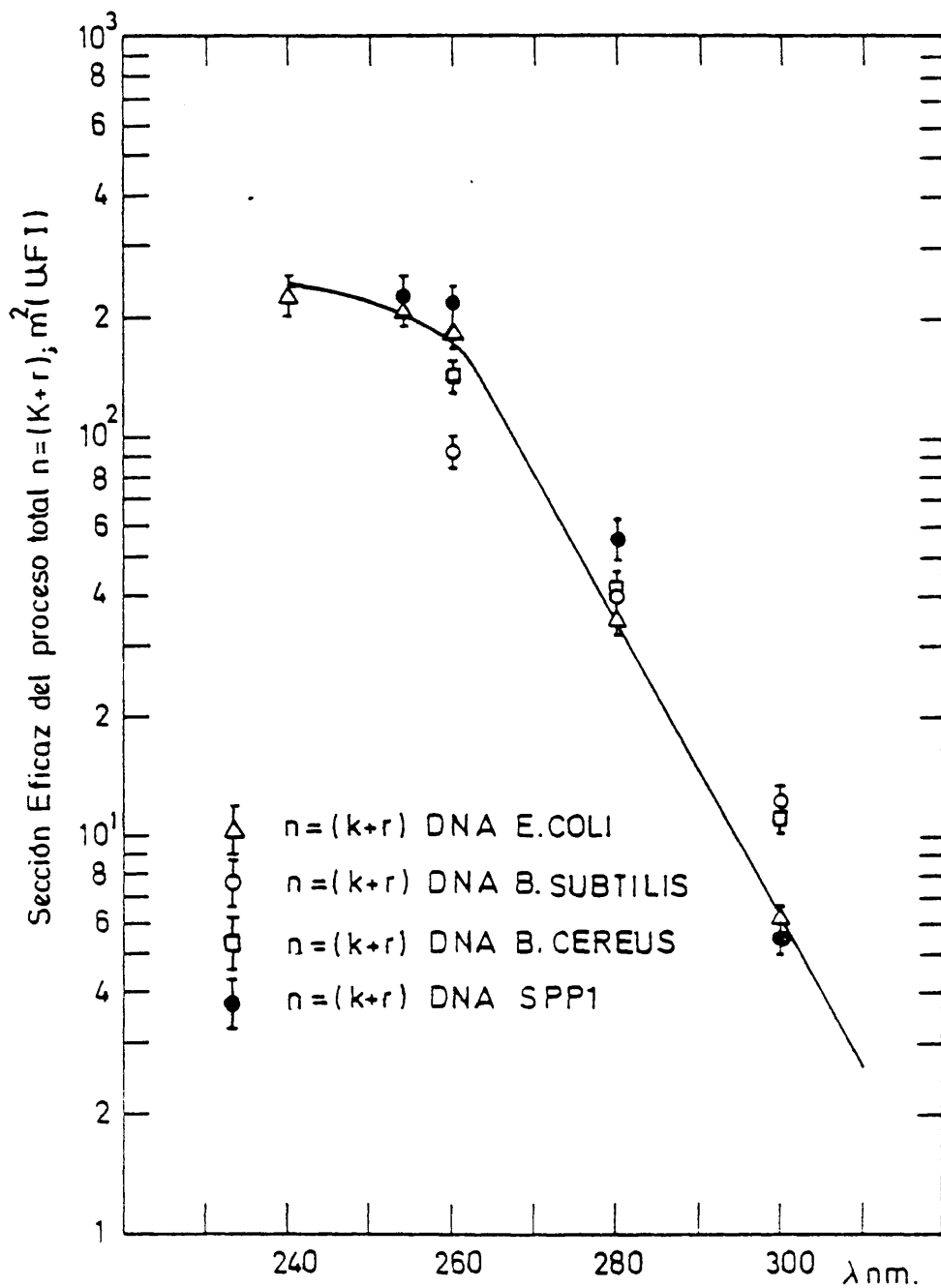


Fig. III.14. COMPARACION DE LAS SEC. EFIC. DEL PROCESO TOTAL DE FORMACION DE DIMEROS DE $\hat{T}T$.

LA LINEA UNE LOS VALORES DE LAS SECCIONES EFICAZES A DIFERENTES λ_s OBTENIDAS CON DNA DE E. COLI.

torio en su frecuencia dinucleotídica se podrá correlacionar directamente el nivel de dímeros alcanzado a cada longitud de onda con el contenido en GC. Por tanto un tratamiento exhaustivo en la determinación de dímeros en todos los DNAs posibles de diferentes composiciones en GC, de diferentes orígenes para un mismo GC etc. lograra informarnos acerca de esta dependencia composicional para la determinación del nivel de dimerización de los distintos DNAs a cada longitud de onda.

III.4.- Determinación de la variación de la temperatura media de fusión (ΔT_m) del DNA de E.coli irradiado a diferentes dosis y longitudes de onda. Correlación entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros de ($\hat{T}T + \hat{C}T$).

Los estudios de la transición térmica de la estructura bihelicoidal (Watson-Crick) o nativa a la de ovillo estadístico o desnaturalada del DNA, se realizaron sobre 31 muestras de DNA de E.coli irradiadas a diferentes dosis y longitudes de onda del espectro U.V. en las condiciones ya descritas que evitan la producción de roturas simples intracadena en el DNA. En estas condiciones los efectos observados en las propiedades ópticas del DNA y por tanto en su fusión son sólo achacables a la presencia de los dímeros de pirimidina, productos primarios del efecto de la absorción de fotones U.V. por el DNA.

El efecto principalmente estudiado al comparar las curvas de fusión de las muestras de DNA irradiado ha sido la variación de la T_m de transición helice-ovillo. En la Fig-III-15- se presenta un ejemplo típico de la experiencia, en la que se observa como a medida que aumenta la dosis de irradiación, (y como consecuencia el porcentaje de dímeros de pirimidina) disminuye la temperatura media de fusión. Es decir, se observa un debilitamiento de la estructura nativa frente a la temperatura como consecuencia de la presencia de los dímeros.

Cuatro fueron las longitudes de onda estudiadas: 254 nm, 260^{+10} nm 280^{+10} nm y 300^{+10} nm, con 11, 2, 10 y 8 muestras respectivamente. En la Tabla III-7- aparecen detallados los datos relativos al estudio de estas muestras, así como los valores correspondientes de dímeros de $\hat{T}T$ y de $\hat{C}T$ para cada longitud de onda y exposición.

En un intento de descripción de la evolución de la variación de la T_m en función de la cantidad de dímeros en el DNA vamos a tratar de explicar el fenómeno con un modelo que implica las siguientes simplificaciones:

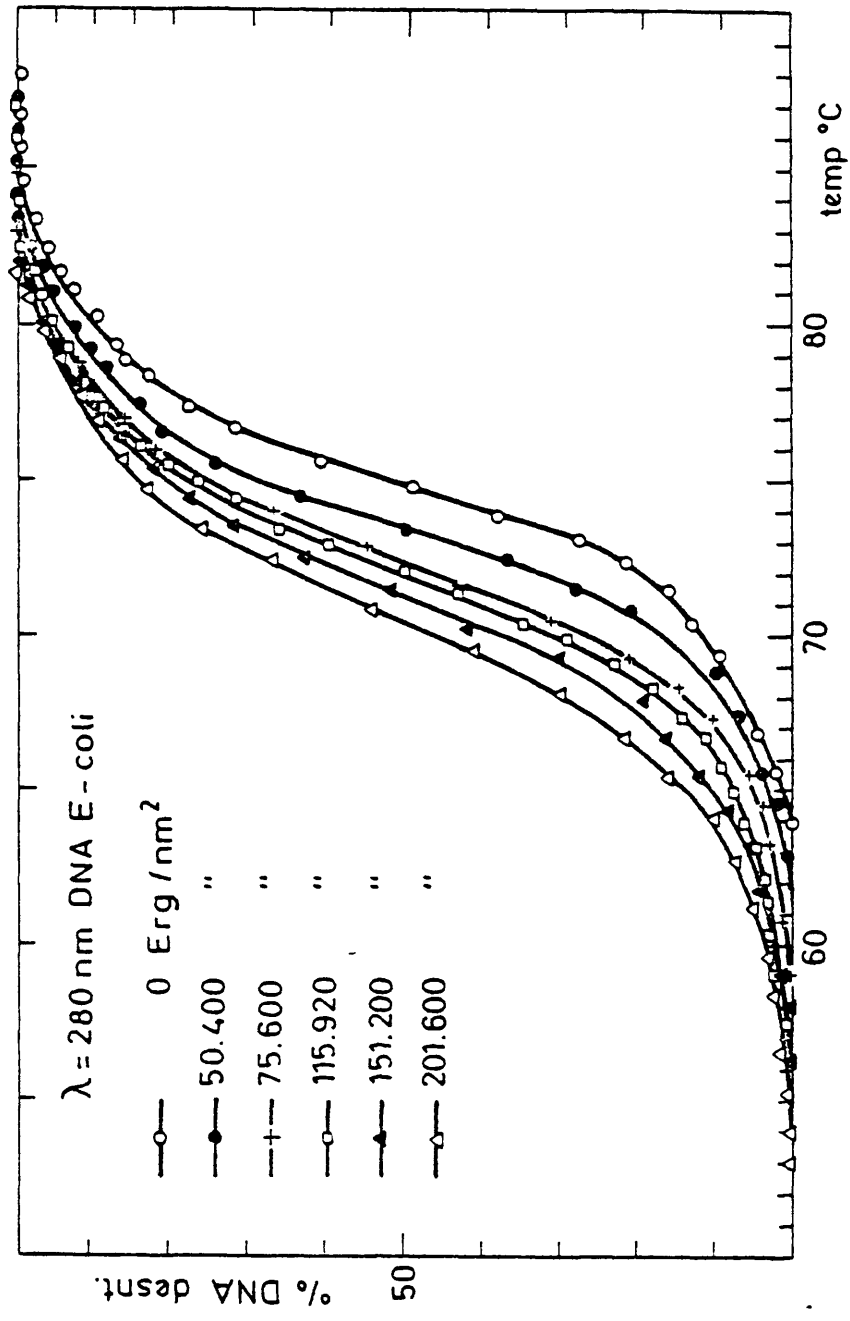


Fig. III - 15. - CURVAS DE TRANSICION TERMICA DE DNA IRRADIADO CON U.V.

1°).- Supongamos que el efecto producido por la presencia de un dímero de pirimidina, sea cual sea, es el mismo en cuanto a la variación de la T_m observada. Es decir, por tanto, que el efecto producido en la variación de la T_m por un dímero de \hat{TT} o de \hat{CT} o de \hat{CC} es aditiva y del mismo valor.

2°).- Despreciaremos la contribución de los dímeros de \hat{CC} a la variación de la T_m observada, pues como ya hemos discutido en la introducción de esta memoria se producen con mucha menor eficacia que los de \hat{CT} , y ya hemos medido como estos últimos se producen también en mucha menor cantidad que los de \hat{TT} .

En definitiva, lo que estamos postulando es que existe una correlación lineal entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros de $(\hat{TT}+\hat{CT})$.

Si esta correlación existe, parece obvio que, la evolución de los valores de la variación de la T_m en función de la exposición a cada longitud de onda, debe coincidir en primera aproximación, con una curva que sea la resultante de la suma de la que describa esta evolución para la formación de dímeros de \hat{TT} y de la que describa la evolución de la formación de dímeros de \hat{CT} en función de la exposición.

Es decir, de la fórmula general ya comentada:

$D = kPo / (k+r) (1 - e^{-(k+r)\bar{L}})$ donde $kPo / (k+r) = D^*$ y $(k+r) = n$ tenemos las correspondientes a cada tipo de dímeros:

$$\% \hat{TT} = \% \hat{TT}^* (1 - e^{-n \hat{TT} \bar{L}}) \text{ y } \% \hat{CT} = \% \hat{CT}^* (1 - e^{-n \hat{CT} \bar{L}})$$

que sumadas rinden:

$$\% (\hat{TT} + \hat{CT}) = \% (\hat{TT} + \hat{CT})^* - (\% \hat{TT}^* e^{-n \hat{TT} \bar{L}} + \% \hat{CT}^* e^{-n \hat{CT} \bar{L}})$$

y si conocemos la correlación lineal entre la variación de la T_m y el tanto por ciento de los dímeros la podemos transformar en:

$$\Delta T_m = \Delta T_m^* - (\Delta T_m(\hat{TT})^* e^{-n \hat{TT} \bar{L}} + \Delta T_m(\hat{CT})^* e^{-n \hat{CT} \bar{L}})$$

Ecuación general que describirá la variación de la T_m en función de la exposición para cada longitud de onda y de la que conocemos todos los parámetros que la definen, pues n es el valor de la pendiente de la curva de formación de dímeros ya descritas en el apartado III.2. y el resto de los parámetros vendrán dados por la correlación entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros de $(\hat{TT} + \hat{CT})$. Veamos pues si se cumple esta correlación.

El ajuste de los datos experimentales de variación de la T_m y porcentaje de dímeros de $(\hat{TT} + \hat{CT})$ a la ecuación general de una recta $y = ax + b$, dado el

λ_{nm}	$\bar{L}(\text{Ergios/mm}^2) \times 10^{-4}$ (4)	$\bar{L}(\text{Einstein/m}^2) \times 10^4$ (4)	Δ T.m.	$\frac{\Delta}{TT}$ (1)	$\frac{\Delta}{CT}$ (2)	$\frac{\Delta}{(TT+CT)}$ (3)
254	0,82	17,0	1,4	1,20	0,45	1,65
254	1,60	35,0	1,4	2,00	0,75	2,75
254	1,80	39,0	2,5	2,20	0,77	2,97
254	2,50	52,0	2,3	2,55	0,80	3,35
254	2,50	53,0	2,5	2,55	0,80	3,35
254	3,80	80,0	2,8	3,15	0,80	3,95
254	4,90	100	3,5	3,40	0,80	4,20
254	4,90	100	3,2	3,40	0,80	4,20
254	6,60	140	4,1	3,65	0,80	4,45
254	6,90	150	3,8	3,70	0,80	4,50
254	8,20	170	4,1	3,75	0,80	4,75
280 ⁺ 10	2,20	51,0	1,4	1,30	0,70	2,00
280 ⁺ 10	2,60	61,0	1,5	1,50	0,80	2,30
280 ⁺ 10	3,30	77,0	2,6	1,85	1,00	2,85
280 ⁺ 10	5,00	110	2,9	2,50	1,10	3,60
280 ⁺ 10	6,60	150	3,6	3,25	1,30	4,55
280 ⁺ 10	8,70	200	4,2	4,00	1,35	5,35
280 ⁺ 10	8,80	200	4,4	4,00	1,35	5,35
280 ⁺ 10	12,2	280	5,2	4,80	1,40	6,20
280 ⁺ 10	17,0	400	6,1	5,85	1,40	7,25
280 ⁺ 10	21,8	510	6,7	6,40	1,40	7,80
300 ⁺ 10	5,23	130	0,8	0,60	0,40	1,00
300 ⁺ 10	17,9	450	1,5	1,80	1,30	3,10
300 ⁺ 10	19,7	450	3,0	1,90	1,35	3,25
300 ⁺ 10	26,8	670	2,3	2,45	1,60	4,05
300 ⁺ 10	31,4	790	3,3	2,80	1,70	4,50
300 ⁺ 10	38,4	960	3,3	3,25	1,80	5,05
300 ⁺ 10	62,0	1550	4,5	4,51	2,00	6,51
300 ⁺ 10	52,0	1300	4,0	4,00	1,95	5,95
260 ⁺ 10	2,28	50,0	2,2	2,05	0,70	2,75
260 ⁺ 10	4,60	99,0	3,3	2,82	0,70	3,52

(1) - Tanto por ciento de $\frac{\Delta}{TT}$ respecto de T
(2) - " " de $\frac{\Delta}{CT}$ " " T
(3) - " " de $\frac{\Delta}{(TT+CT)}$ respecto de T
(4) - Error inferior al 3%

L = Fluencia energética
 \bar{L} = Fluencia energética media

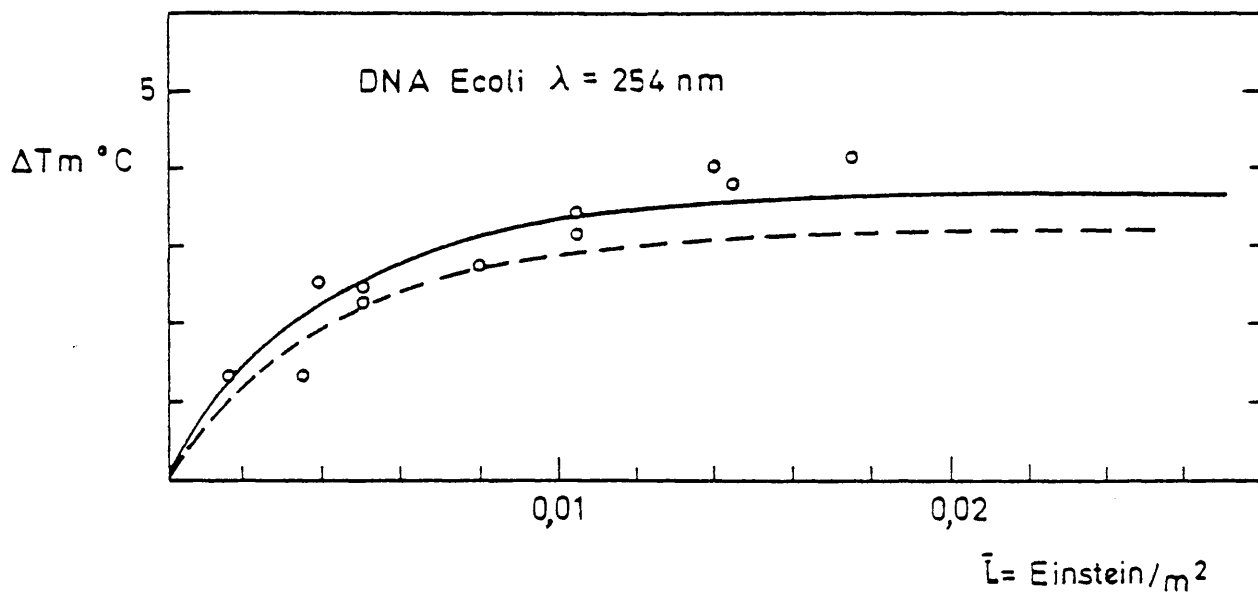
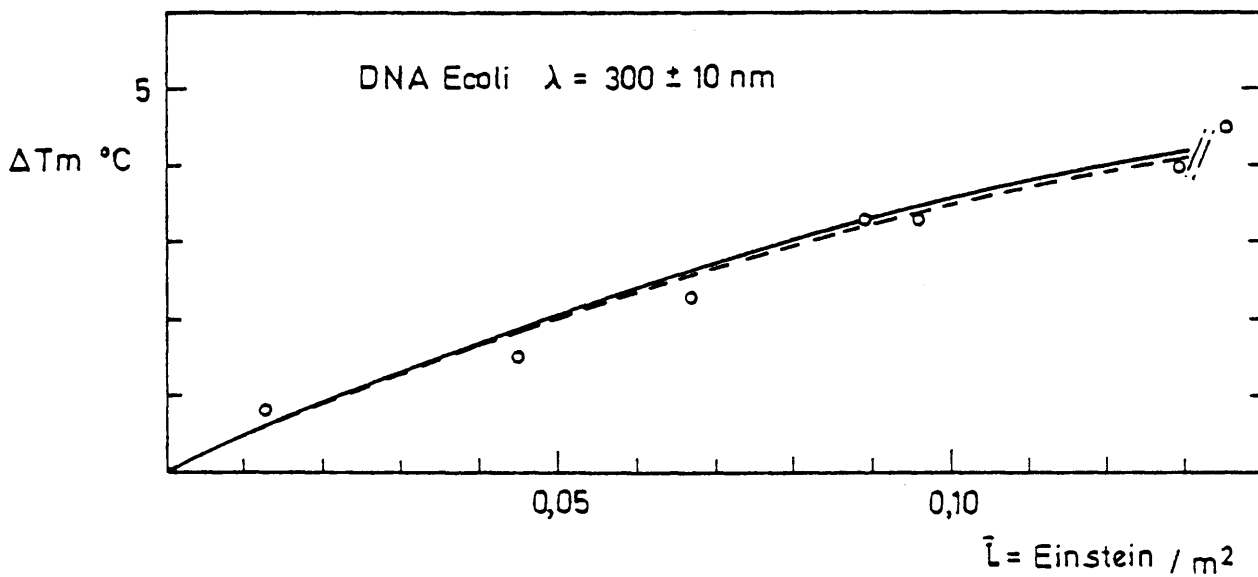
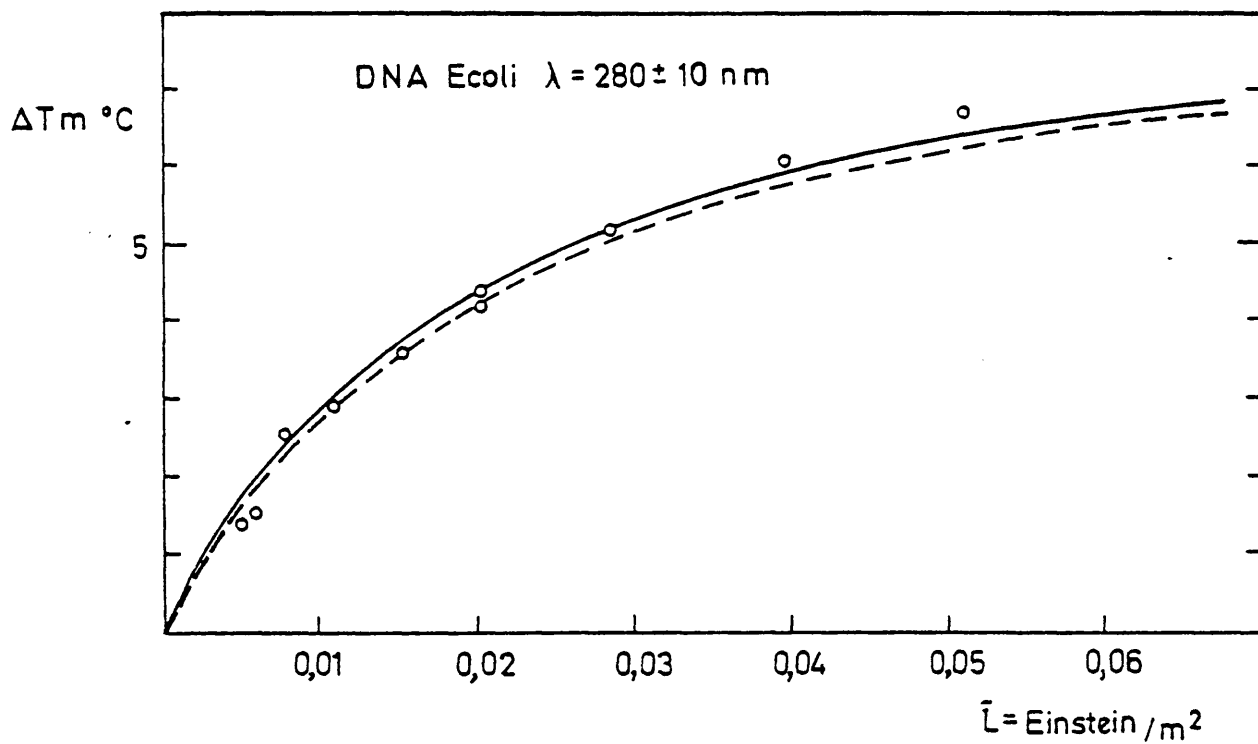


Fig. III - 17. - VARIACION DE LA TEMP. MEDIA DE LA TRANSICION EN FUNCION DE LA EXPOSICION U.V. A DIFERENTE LONG. DE ONDA

error experimental con el que se han determinado las variaciones de la T_m y el porcentaje de dímeros da una pendiente de $1,096 \%(\hat{T}_T + \hat{C}_T) / ^\circ C \Delta T_m$, una ordenada en el origen de $0,612 \%(\hat{T}_T + \hat{C}_T)$ y un resto cuadrático medio de $0,51$. Si con esta correlación hacemos el cambio de variables anunciado anteriormente, para la obtención de la ecuación general que describe la evolución de la variación de la T_m en función de la exposición, para cada longitud de onda, y representamos esta función para cada longitud de onda, junto con los valores experimentales de variación de la T_m , observamos una buena coincidencia a 300^{+10} nm y a 280^{+10} nm, no así sin embargo a 254 nm. (Ver Fig-III-171 líneas de trazos). La razón de esta falta de coincidencia a 254 nm puede - - ser debida, además de la importancia que tengan las simplificaciones introducidas en el modelo, en que a 254 nm, la cantidad de dímeros de \hat{C}_T es muy pequeña, llega a ser a saturación sólo de $0,81$, entonces, al hacer la transformación con esta correlación a variación de la T_m , la ordenada en el origen tiene una influencia mucho mayor aquí que a otras longitudes de onda donde se producen más cantidad de dímeros de \hat{C}_T y por supuesto que en el caso de los dímeros de \hat{T}_T a cualquiera de ellas.

Si, por el contrario, el ajuste de los datos experimentales de la variación de la T_m y porcentaje de dímeros de $(\hat{T}_T + \hat{C}_T)$, se realiza a la ecuación de una recta que pasa por el origen, de acuerdo con las hipótesis de partida del modelo, es decir a: $y=ax$ (cuyo significado físico no es "a priori" ilógico), la pendiente obtenida así, es ligeramente diferente, $1,260 \%(\hat{T}_T - \hat{C}_T) / ^\circ C \Delta T_m$ y arroja un resto cuadrático medio de $0,569$. Esta recta entra perfectamente dentro de las bandas de error del anterior ajuste en el intervalo de variación de T_m estudiado. Pues bien el ajuste de los datos experimentales de variación de la T_m en función de la exposición a cada longitud de onda con las curvas obtenidas ahora, al hacer el cambio de variables con esta correlación, es mejor a todas las longitudes de onda estudiadas pero sobre todo mejora mucho la de 254 nm. (Ver Fig-III-17-Líneas continuas).

En la Fig-III-15- se han representado esta última correlación y en la Tabla-III-8- se detallan los valores de los parámetros utilizados para la obtención de las funciones que describen la evolución de la variación de la T_m en función de la exposición tras el cambio de variable con ambas correlaciones.

Esta correlación entre la variación de la T_m de transición y el porcentaje de dímeros de $(\hat{T}_T + \hat{C}_T)$, además de habernos permitido estudiar, con cierta coherencia, la evolución de la variación de la T_m de transición con la exposi

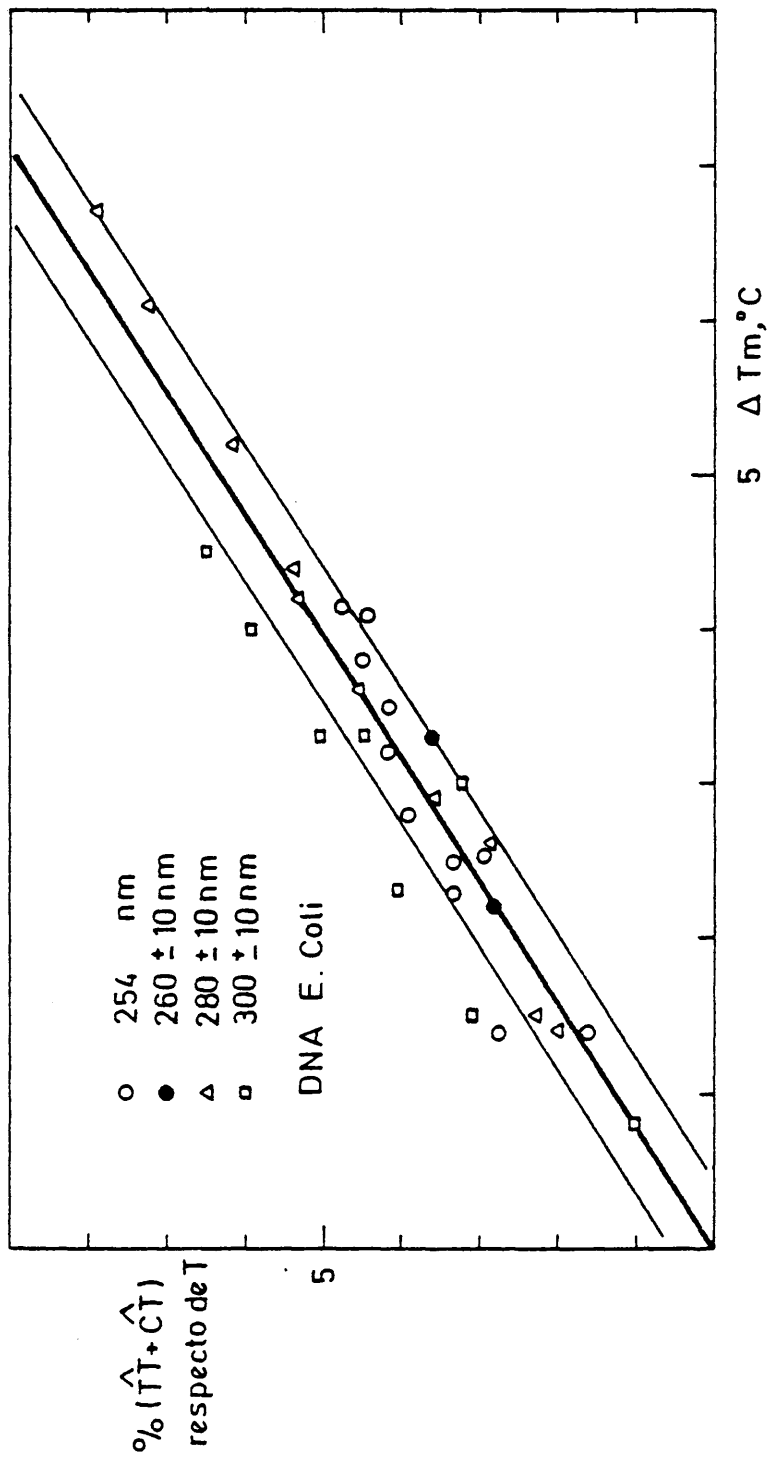


Fig. III - 16 - CORRELACION ENTRE LA VARIACION DE LA TEMP. MEDIA DE TRANSICION (ΔT_m) Y EL TANTO POR CIENTO DE ($\hat{T}_m + \hat{C}_T$) RESPECTO DE T

TABLA-III-8- PARAMETROS DE LA FUNCION $\Delta T_m = f(\bar{L})$ EN DNA DE E.coli

CON LA CORRELACION $\%(\hat{TT}+\hat{CT})/T = 1,096 \Delta T_m + 0,620$					
λ_{nm}	$n_m^2 \hat{TT}$ (1)	$n_m^2 \hat{CT}$ (1)	$\Delta T_m(\hat{TT})^*$ °C	$\Delta T_m(\hat{CT})^*$ °C	ΔT_m^* °C
$300^{\pm 10}$	6,3	20,0	5,9	1,3	7,2
$280^{\pm 10}$	37,0	145,0	6,3	0,8	7,1
254	215,0	561,0	2,9	0,2	3,1
CON LA CORRELACION $\%(\hat{TT}+\hat{CT})/T = 1,260 \Delta T_m$					
λ_{nm}	$n_m^2 \hat{TT}$ (1)	$n_m^2 \hat{CT}$ (1)	$\Delta T_m(\hat{TT})^*$ °C	$\Delta T_m(\hat{CT})^*$ °C	ΔT_m^* °C
$300^{\pm 10}$	6,3	20,0	5,6	1,7	7,3
$280^{\pm 10}$	37,0	145,0	6,0	1,2	7,2
254	215,0	561,0	3,0	0,6	3,7

(1) Secciones eficaces en m^2 calculadas a partir de dosis en E/m^2

ción a diferentes longitudes de onda, nos permite en el orden práctico, la posibilidad, en el futuro, de independizarnos de la necesidad de trabajar con DNA de E.coli marcado, en experiencias en las que necesitamos conocer el porcentaje de dímeros de $(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ de las muestras en estudio, pues la sola determinación de la variación de la T_m de transición respecto de un control, de una parte alícuota de la muestra será suficiente. La simplificación metodológica que supone, no es lo único importante, sino que además al poder trabajar con DNAs no marcados, éstos pueden ser de alto paso molecular y sin apenas roturas simples, situación ésta, que no siempre se alcanza con DNAs marcados con actividad suficiente para la determinación de dímeros de pirimidina por las técnicas habituales.

En el orden teórico, este efecto desestabilizante frente a temperatura en el DNA irradiado con radiación U.V., aunque ya había sido detectado anteriormente, no había sido cuantizado mediante una correlación de esta forma. Pues bien, la correlación realizada en este trabajo y para este DNA permite hacer una estimación del efecto secundario producido por la presencia de los dímeros en la estructura del DNA.

Esta desestabilización frente a temperatura, ya había sido interpretada suponiendo que la presencia de los dímeros producía una zona desnaturada en torno al dímero (H.Moroson and P.Alexander 1960, 1961. P.Alexander and H.Moroson 1960. J.Marmur and L.Grossman 1961. L.Grossman 1961. V.M.Zhilt sara et al 1965. K.C.Smith 1966). Esta suposición está sustentada por la evidencia de que, la estructura en anillo ciclobutano de los dímeros de pirimidina, no permite el mantenimiento de la rotación de 35°C de una base con respecto a la otra, sino que obliga a una disposición coplanaria estricta, y esto determina la desaparición de al menos los enlaces de hidrógeno de las bases implicadas en la formación del dímero y sus complementarias.

A partir de la correlación realizada en este trabajo se puede obtener una idea acerca de la perturbación producida por la presencia de los dímeros en el DNA. En efecto, la temperatura media de fusión de un DNA depende de su contenido en guanina-citosina a igualdad de condiciones de solvente, de tal forma que, existe una correlación lineal entre ambos parámetros y que para el caso de DNA en 0,015 M cloruro sódico, 0,0015 M citrato sódico es:

$$\% \text{ GC} = (T_m - 48,7) 1,93$$

Utilizaremos la comparación de esta ecuación con la correlación obtenida entre

el porcentaje de dímeros de $(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ respecto de T y la variación de la T_m de fusión, únicamente para razonar en el sentido de que, la presencia de un determinado porcentaje de dímeros en el DNA produce una variación en la T_m semejante a la producida por una variación determinada en el contenido en GC.

Teniendo en cuenta que el porcentaje de Timinas respecto de nucleótidos totales en el DNA que nos ocupa, es decir, en el DNA de E.coli, es de aproximadamente el 25%, la ecuación obtenida en la correlación entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros quedará:

$$\% (\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T}) = 0,315 \Delta T_m$$

Es decir, que para un 1% de dímeros de $(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ respecto de N se produce una variación de la temperatura media de fusión de $3,17^\circ\text{C}$. Una variación así, supone un cambio equivalente en el contenido en GC de un 6,13%. Es decir que la presencia de un dímero por cada 100 nucleótidos en el DNA produce una perturbación de su comportamiento térmico equivalente a la que supone una diferencia de 6,13 % en el contenido en GC.

Si la variación en un 6,13 % de GC se pudiese interpretar desde un punto de vista de estabilidad estructural, sólo en términos de la interacción de enlaces de hidrógeno, entonces, la sustitución de 6 pares GC por 6 pares AT supondría la pérdida de 6 enlaces de hidrógeno.

III:5.- Ampliación de la correlación entre la ΔT_m y el $\%(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ respecto de T a otros DNAs.

La posibilidad, ya indicada al hablar de la determinación de dímeros, de marcar otros DNAs de orígenes diferentes, para el estudio de los niveles de dimerización en función de la composición del DNA, supone también la posibilidad de ampliar la correlación entre la variación de la T_m y el porcentaje de dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ mas $\hat{C}\hat{T}$. Así han sido estudiadas un total de 15 muestras de DNA de B.cereus (35,3% GC) irradiadas a exposiciones y longitudes de onda diferentes, y 15 muestras de DNA de SPP1 (48% GC) de la misma forma. En la Tabla III-9- aparecen detallados las longitudes de onda, exposiciones, variaciones de la T_m encontradas y el $\%(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ respecto de T correspondiente. En la Fig-III-18- aparecen las representaciones de la relación entre la variación de la T_m y el $\%(\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T})$ respecto de T para cada DNA. El ajuste de estos valores a una recta rinde una pendiente de 1,363 y 1,522 para DNA B.cereus y DNA SPP1

DNA	λ_{nm}	$\bar{I}(\text{Ergios/mm}^2) \times 10^{-3}$ (2)	$\bar{I}(\text{Einstein/m}^2) \times 10^4$ (2)	Δ T.M.	$\%(\hat{T}+\hat{CT})$ (1)
B. cereus	254	13,3	28,0	0,8	1,5
"	"	27,9	59,0	1,9	2,5
"	280 [±] 10	17,9	42,0	1,1	2,5
"	"	21,7	50,0	3,1	3,2
"	"	47,0	110	4,7	6,0
"	"	118	270	7,6	10,4
"	"	202	470	9,9	12,7
"	300 [±] 10	111	280	2,9	3,4
"	"	111	280	1,6	3,4
"	"	205	510	3,2	5,1
"	"	205	510	3,2	5,1
"	"	308	770	5,3	6,6
"	"	308	770	3,8	6,6
"	"	514	1290	5,7	8,4
"	"	616	1550	6,7	9,0
S.P.P.1.	300 [±] 10	43,6	110	1,8	1,3
"	"	170	430	2,1	3,7
"	"	313	780	3,6	5,2
"	"	398	1000	3,6	6,0
"	"	569	1430	4,5	7,2
"	"	825	2100	5,9	8,6
"	"	108	2710	6,3	9,5
"	280 [±] 10	45,0	100	4,1	5,8
"	"	54,5	130	4,1	6,8
"	"	71,8	170	5,2	8,0
"	"	144	340	7,3	11,4
"	"	198	640	8,1	12,2
"	260 [±] 10	5,33	12,0	1,0	1,2
"	"	29,7	66,0	2,4	4,0
"	"	70,8	150	3,2	5,3

(1) = % de dímeros de $(\hat{T}+\hat{CT})$ respecto de T calculado en función de las secciones eficaces de formación de dímeros de \hat{T} a cada λ y DNA considerado y las secciones eficaces de formación de dímeros de \hat{CT} de E.coli a cada .

(2) = Error inferior al 3%.

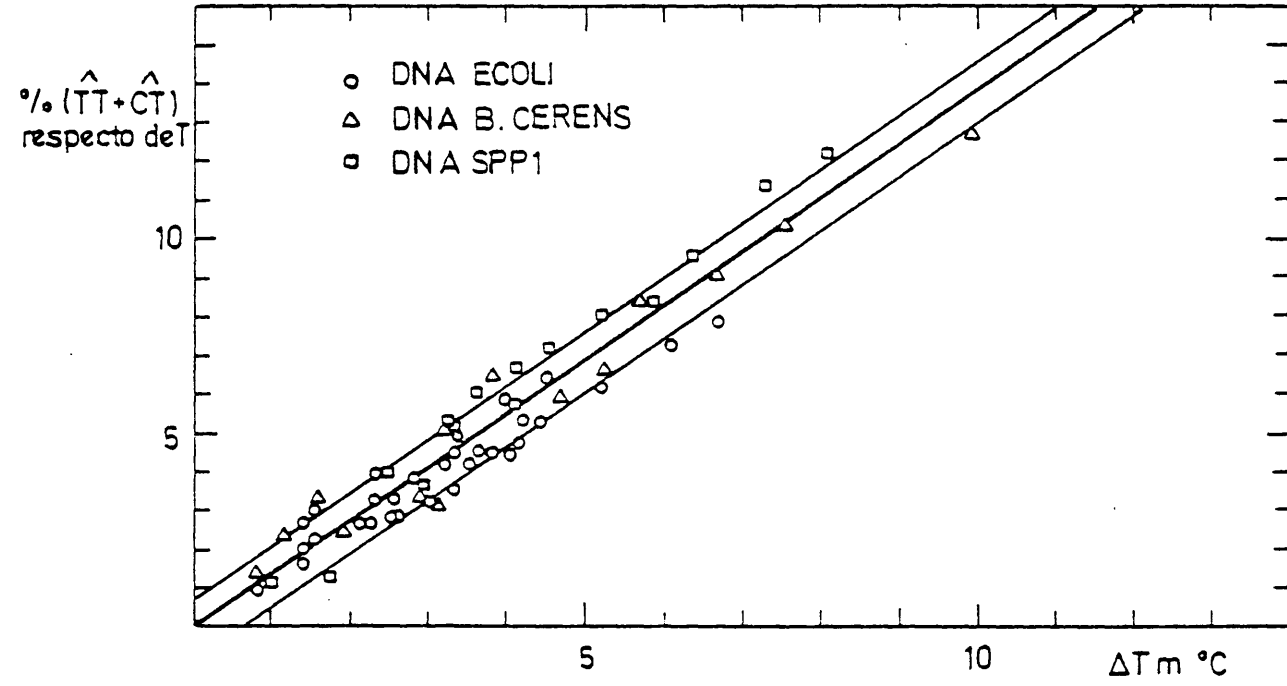
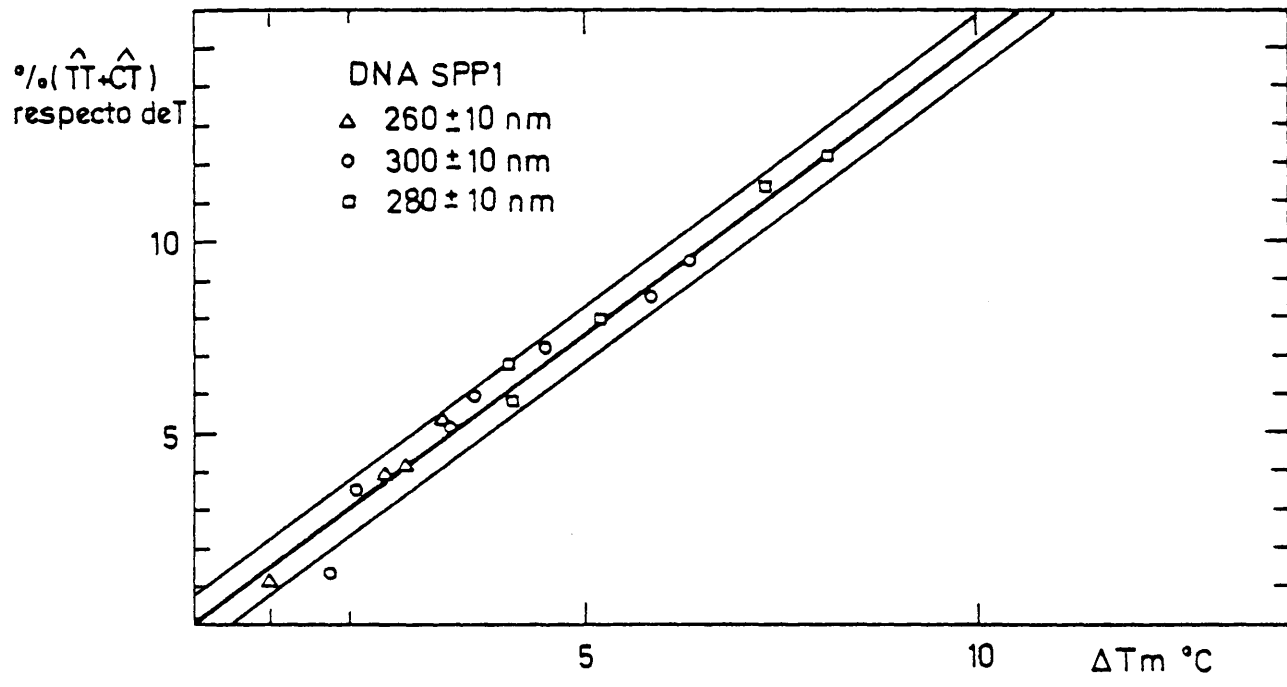
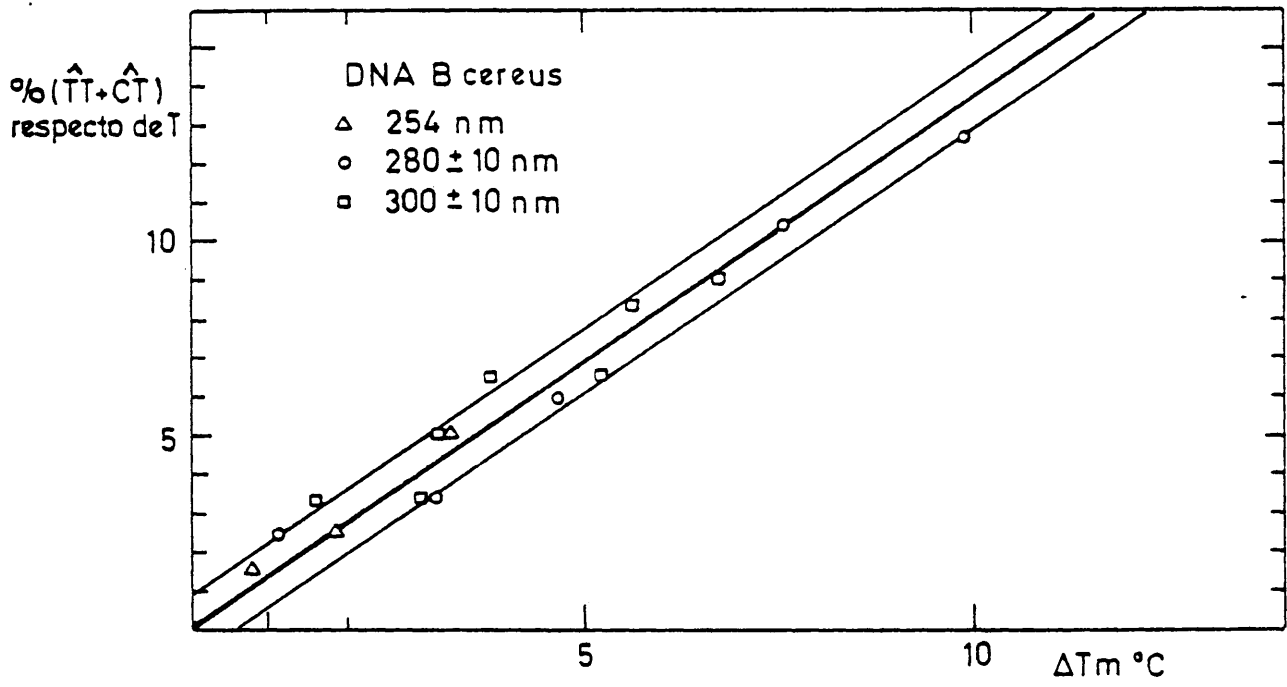


Fig. III -18. CORRELACION ENTRE LA VARIACION DE LA TEMP. MEDIA DE

respectivamente. Rindiendo un resto cuadrático medio de 0,826 y 0,507 respectivamente.

Dada la sensibilidad con que se han determinado todos estos valores de variación de la T_m no podemos afirmar que estas correlaciones y la del DNA de E.coli sean diferentes pues si intentamos comparar estas correlaciones representando conjuntamente todos los valores de los tres DNAs obtenemos una recta en el ajuste, cuya pendiente es de 1,383 y cuyo resto medio cuadrático, 0,729, valor este que si es mayor que el resto de las correlaciones de los DNAs de E.coli y de SPPl no lo es del de B.cereus.

En conclusión podemos decir que, no se puede afirmar que exista una dependencia entre la variación de la T_m y el $\%(\hat{T}\hat{T} + \hat{C}\hat{T})$ respecto de T con la longitud de onda de la radiación U.V. (entre 300 nm y 254 nm) ni con la composición en GC de los DNAs (entre 51 y 35,3%). Sin embargo parece observarse alguna dependencia que solo podrá demostrarse mejorando ostensiblemente el nivel de sensibilidad experimental. Por otra parte además, dada la diferencia de producción de dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ y $\hat{C}\hat{T}$ será necesario intentar comparar estudios de variación de la T_m entre DNAs cuyo contenido en GC sea tan diferente que, en uno de ellos esté favorecida la formación en mayor grado del dímero de $\hat{T}\hat{T}$ mientras que en el otro la de $\hat{C}\hat{T}$; situación esta última que sólo se conseguirá con ciertos DNAs cuya composición en GC sea muy alto, para compensar el mayor rendimiento de dímeros de $\hat{T}\hat{T}$. El marcado de este tipo de DNAs, como el de M.luteus, plantea algunos problemas.

Por último con los valores de las pendientes calculadas en estos ajustes, la presencia de un dímero por cada 100 nucleotidos en el DNA produce una perturbación de su comportamiento térmico equivalente numéricamente a la que supone una disminución de 6,13 a 4,38% en el contenido en GC. Si la variación en un 6,13 a 4,38% de GC se pudiese interpretar desde un punto de vista de estabilidad estructural, sólo en términos de la interacción de enlaces de hidrógeno, entonces la presencia de un dímero cada 100 nucleotidos supondría la pérdida de 6 a 4 enlaces de hidrógeno.

III.6.- Determinación de la viscosidad intrínseca y de la migración electroforetica en gel de agarosa en muestras de DNA de E.coli de diferentes tamaños moleculares y con diferentes proporciones de dímeros de pirimidina.

Los DNAs de diferentes tamaños moleculares se obtuvieron por degrada

ción diplotómica, (II.2.4.).

Las determinaciones de viscosidad a partir de estas soluciones así preparadas y de las que se obtienen de irradiar estas con luz U.V. en un espectrofotómetro a 280 ± 10 nm o en las lámparas de Mercurio PEN-RAY a 254 nm a dosis que permitieron la obtención de una gradación de porcentaje de dímeros para cada tamaño de DNA, se realizaron en un viscosímetro tipo Couette (II.5.1.). La concentración de las soluciones se midió por espectrofotometría U.V.

Se midieron cinco series de DNAs de pesos moleculares entre 1 y 40 millones de daltons lo que daba viscosidades intrínsecas de valores entre 10 y 150 dl/g. que habían sido irradiadas a 254 nm hasta un máximo de $0,0181 \text{ E/m}^2$ con lo que se conseguía hasta un 4,8% de $(\hat{T}+\hat{CT})$ respecto de T y hasta un máximo de $0,0357 \text{ E/m}^2$ a 280 nm con lo que se conseguía hasta un 7,60% de dímeros de $(\hat{T}+\hat{CT})$ respecto de T. Los resultados obtenidos están detallados en la Tabla-III-10 y se encuentran representados en la Fig.III.-19.

Los datos experimentales obtenidos no muestran ninguna tendencia de variación de la viscosidad en función del aumento del % de dímeros de $(\hat{T}+\hat{CT})$ respecto de T ni siquiera a pesos moleculares muy bajos. El ajuste de los datos de cada serie a una recta proporciona las pendientes del ajuste así como el resto cuadrático medio. Como se ve en la Fig.III-19. las pendientes obtenidas son muy pequeñas, próximas a cero y teniendo en cuenta el resto cuadrático medio se pueden trazar en el intervalo de dímeros estudiado para cada serie una recta paralela al eje de abscisas. En la Tabla.III-10. se detallan además el valor máximo de la pendiente para cada serie en el intervalo de dímeros estudiado calculada a partir de la desviación media de los valores de cada serie y el intervalo de dímeros de cada serie.

El estudio de la migración electroforética de estos DNAs utilizados anteriormente en la determinación de viscosidad en función del tamaño y de la cantidad de dímeros conduce a resultados semejantes. Es decir, en cada serie las migraciones de las muestras de DNA fueron semejantes no detectándose ninguna reducción del tamaño global de la molécula que se hubiera traducido en una migración mayor. En la fotografía de la Fig.III-20. se presenta el resultado de la migración electroforética de una de las series estudiadas. Los detalles experimentales del desarrollo de la electroforesis y de la detección de la posición de las muestras está detallado en el apartado II-5-4. Ya habíamos citado en el desarrollo de la Introducción de esta memoria como

Determinación de la Viscosidad de DNAs de diferentes tamaños moleculares, irradiados con radiación U.Y.

Longitud de onda en n.m.	Fluencia energética en: $\text{Ergios/mm}^2 \times 10^{-3}$ (1)	Viscosidad intrínseca en: dl/g (2)	Peso Molecular en: daltons $\times 10^{-6}$ (3)	% de dímeros de $(\overline{fT+\overline{cT}})$ respecto de T(4)	Valor máximo de la pendiente del ajuste: $\frac{\overline{\Delta}}{\%(\overline{fT+\overline{cT}})}$: (η)
254	0,0	140	36,3	0,00	
254	82,2	150	38,6	3,35	
254	149	140	37,1	4,00	$4,2 \times 10^{-6}$
254	234	150	38,2	4,50	
254	299	140	36,3	4,78	
⁺ 280-10	0,0	140	35,7	0,00	
280 "	35,5	130	28,0	1,50	
280 "	62,1	130	31,2	2,30	
280 "	124	140	35,1	3,90	$1,4 \times 10^{-6}$
280 "	143	130	33,2	4,20	
280 "	186	140	37,7	4,90	
280 "	225	140	35,1	5,70	
254	0,0	110	25,1	0,00	
254	39,6	110	26,5	2,20	
254	79,2	105	23,7	3,25	
254	119	110	27,0	3,65	$7,1 \times 10^{-6}$
254	198	110	27,1	4,35	
254	158	120	30,0	4,10	
254	238	110	25,8	4,50	
254	277	110	25,3	4,70	
⁺ 280-10	0,0	90	13,4	0,00	
280 "	35,5	80	15,1	1,70	
280 "	62,0	80	15,7	2,40	
280 "	96,0	80	15,2	3,25	$8,7 \times 10^{-6}$
280 "	126	80	17,2	3,95	
280 "	155	80	16,5	4,55	
280 "	220	70	14,2	5,60	

TABLA-III-10. (Cont.)

Longitud de onda en nm.	Fluencia energética en : $2 \text{ Ergios/mm}^2 (1)$	Viscosidad intrínseca en : dl/g.	Peso molecular en : daltons $\times 10^{-6}$	% de dímeros de $(\hat{T} + \hat{CT})$ respecto de T	Valor máximo de la pendiente del ajuste : $\%(\hat{T} + \hat{CT}) : (\eta)$
280 ⁺ 10	0	16,7	3,0	0,00	
280 "	36,4	7,7	0,9	1,80	
280 "	73,8	5,1	0,6	2,85	
280 "	181	4,9	0,6	4,85	$4,4 \times 10^{-6}$
280 "	253	9,2	1,1	5,80	
280 "	434	9,9	1,2	7,60	

(1) - Error inferior al 3%

(2) - Error inferior al 5%

(3) - Según la expresión $0,665 \log M = 2,863 + \log ([\eta] + 5)$

(4) - Calculado a partir de las secciones eficaces de formación de dímeros de \hat{T} y de \hat{CT} y del valor de saturación de dímeros a cada λ en E.coli.

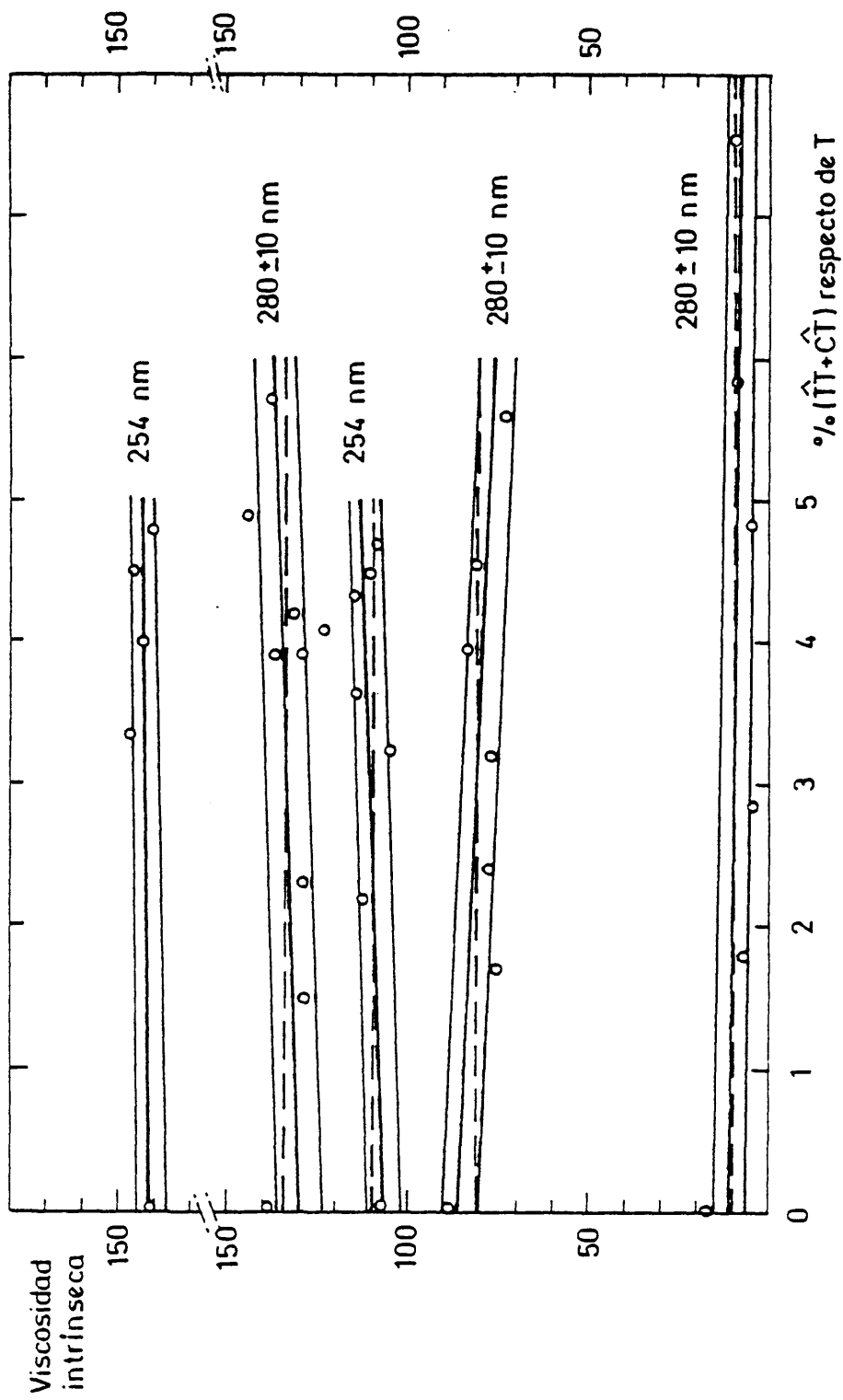


Fig. III - 19. — DETERMINACIONES DE VISCOSIDAD EN FUNCION DEL CONTENIDO EN DIMEROS DE (T̂+ĈT) RESPECTO DE T, EN DNAs DE DIFERENTES TAMAÑOS

algunos autores habían creído detectar por medios hidrodinámicos, como sedimentación y viscosidad, cambios conformacionales en el DNA irradiado con luz U.V.. Así en los primeros trabajos al respecto, varios autores han encontrado un descenso en la viscosidad de las soluciones de DNA que habían sido irradiadas (Moroson and Alexander 1960, 1961, Alexander and Moroson 1961, Marmur et al 1961) e interpretan estas variaciones como una mayor flexibilidad del DNA como consecuencia de los dímeros, ya que afirman también que a no ser a muy altas dosis no sucede ningún descenso en el peso molecular de las preparaciones. En el trabajo de Bagchi et al 1969, más reciente, si bien se detectan por medio de medidas de sedimentación un aumento del coeficiente de sedimentación a dosis bajas, reconocen la presencia posterior de una degradación del DNA, en función de la dosis. Por último Zieremberg et al, en 1971, al estudiar el DNA irradiado con luz U.V. a 300 nm en presencia y ausencia de acetofenona como sensibilizador, por métodos hidrodinámicos como viscosidad y sedimentación y métodos ópticos como dispersión de luz y desnaturalización térmica, concluyen que aún a dosis a las que se produce 1 dímero por cada 2 pasos de hélice, las microalteraciones estructurales producidas no afectan a las propiedades macromoleculares del DNA y que las pequeñas variaciones observadas en las medidas hidrodinámicas responden a la pequeña degradación observada. No pudiendo por tanto concluir ninguna evidencia de un aumento de flexibilidad en el DNA con dímeros de pirimidina. El DNA utilizado en este trabajo poseía un peso molecular inicial de 18×10^6 daltons.

Según nuestros resultados y en nuestras condiciones de trabajo, que nos permiten considerar el problema sin el confusionismo aportado por la presencia simultánea de otro fenómeno como el de la degradación del DNA por el aumento de la densidad de roturas simples, no se detecta por métodos hidrodinámicos como la viscosidad y en DNAs de toda una gradación de pesos moleculares ningún cambio apreciable de conformación. En definitiva pues con los datos experimentales obtenidos no hemos detectado el supuesto efecto de la flexibilización de la molécula de DNA como consecuencia de la aparición de dímeros de pirimidina por encima de un peso molecular del DNA de 1×10^6 daltons y con un porcentaje de dímeros por debajo de 7% ($\hat{T} + \hat{C}$) respecto de T. Es decir, que en el caso extremo estudiado, de un DNA de 1×10^6 daltons que es el tamaño más pequeño de DNA que hemos podido obtener por degradación diploómica de una manera controlada, su tamaño es tal que dada la longitud de persistencia del DNA (de 550 a 600 A según cálculos teóricos) esta molécula puede aún ser considerada como un ovillo en solución.

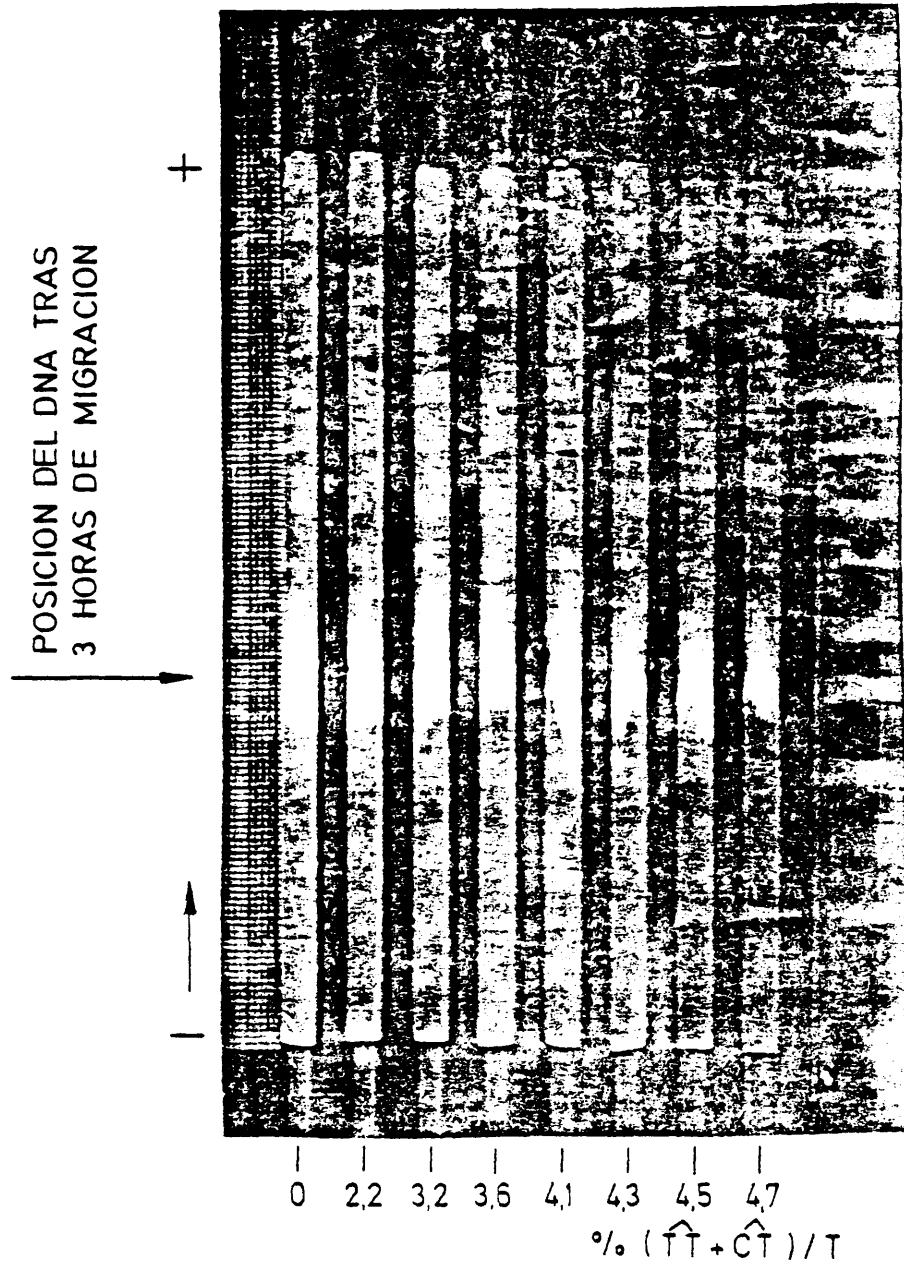


Fig. III-20.- MIGRACION ELECTROFORETICA DE
DNA (25×10^6 d) IRRADIADO CON LUZ
U.V. DE 254 n.m. A DIFERENTES DOSIS

Pues bien la presencia de un 7% ($\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T}$) respecto de T, o sea un 1,75% ($\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T}$) respecto de N, lo que supone aproximadamente 6 dímeros por cada unidad de longitud de persistencia, (en definitiva y suponiendo la aparición de un punto de flexibilización por cada dímero en la cadena de DNA habríamos pasado de 10 a 60 puntos de flexibilización) no puede ser detectada viscosimétricamente.

Resulta evidente que la situación ideal para la observación de la aparición de nuevos puntos de flexibilización en el DNA, sería la de disponer de moléculas de DNA cuyo tamaño fuese igual a su longitud de persistencia en cuyo caso estaríamos ante la posibilidad de observar el paso de una situación de ausencia de puntos de flexibilización a otra en la que quedarían de manifiesto la presencia de los mismos.

Aún no habiendo alcanzado esta situación experimental ideal, los resultados obtenidos demuestran como, en ausencia de roturas simples - producidas simultáneamente con la irradiación no se detecta ningún cambio en la viscosidad intrínseca de preparaciones de DNA entre amplios tamaños moleculares y porcentajes de dímeros. Lo que está de acuerdo con la medida realizada en este sentido por Zieremberg et al (1971) y en contra de casi el resto de las determinaciones en las que se ha querido detectar un cambio conformacional por la presencia de los dímeros de pirimidina, en presencia también de roturas simples.

III.7.- Estudios de dicroísmo circular en DNA irradiado con luz U.V. a diferentes longitudes de onda y dosis.

Se estudiaron los espectros de dicroísmo circular de 35 muestras de DNA de origen virásico (SPP-1), bacteriano (E.coli) y Eucariote (Timo de ternera) irradiadas a diferentes longitudes de onda y exposiciones así como algunas de ellas con una densidad de roturas simples semejante a la densidad de dímeros obtenida por irradiación. Por último se estudió también el espectro de dicroísmo circular del DNA desnaturado. En el Apartado II-5-7 se han especificado oportunamente los detalles metodológicos y del equipo espectro polarimétrico empleado.

Quizás convenga en primer lugar observar las características y diferencias de los espectros de dicroísmo circular del DNA nativo y desnaturado. En la Fig.III-21. se presentan los espectros de un DNA de SPP1 en estado na

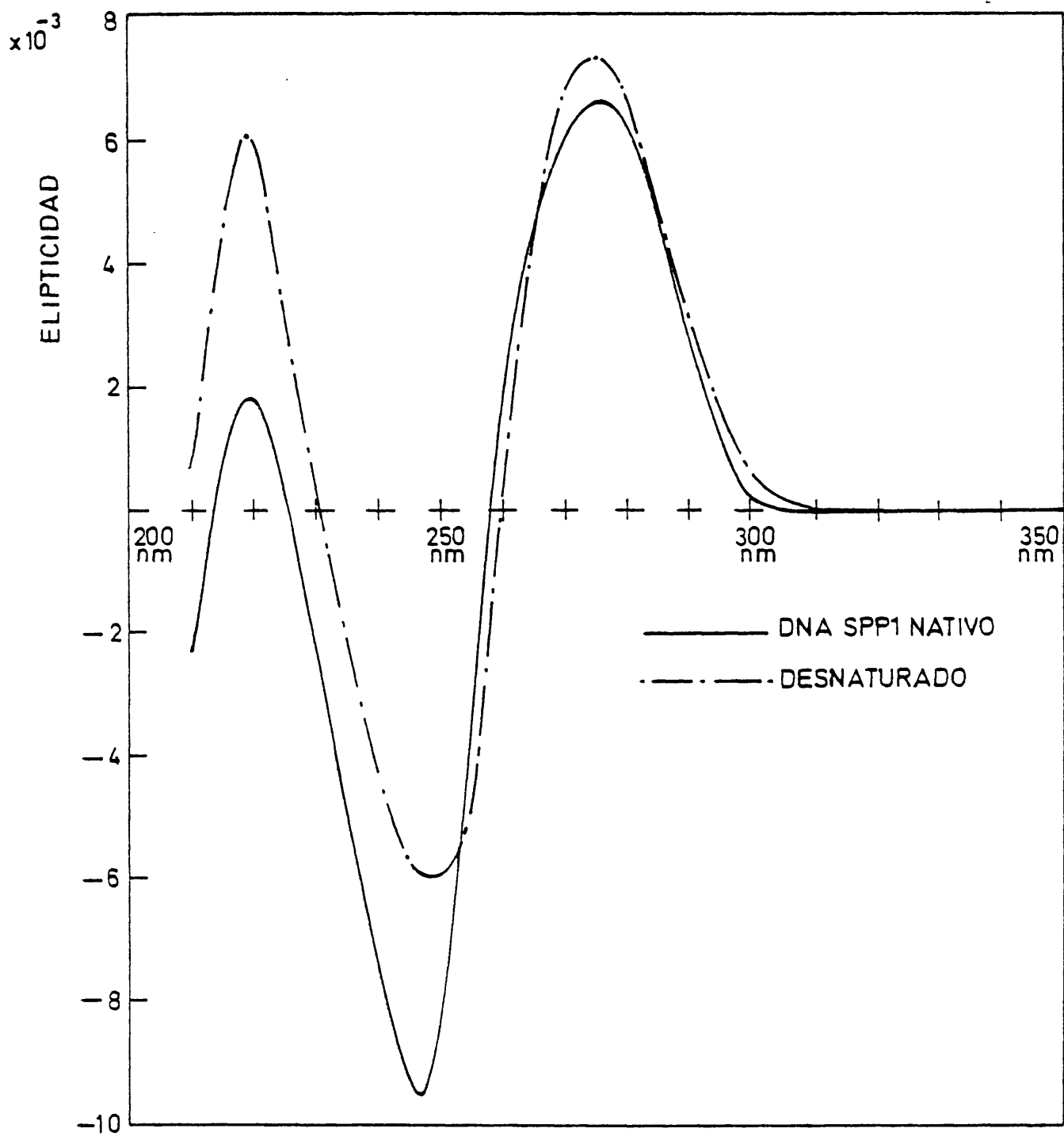


Fig.III-21._ ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR DE DNA NATIVO Y DESNATURADO

λ nm	Exposición (Erg/mm ²) x10 ⁻³	Δ Im	S ^o _{20W}	50% Desn.	CD+(1)	CD+(2)	CD-(1)	CD-(2)	Cdt(1)/CD-(1)	Origen DNA
254	Control	0,0	27,5	7,400	2,400	9,100	2,900	0,82	SPP1	
"	13,2	1,4	28,6	6,800	2,200	9,900	3,200	0,69	SPP1	
"	26,4	1,6	27,1	7,200	2,300	9,600	3,100	0,75	SPP1	
"	52,9	1,9	29,5	7,200	2,300	9,400	3,000	0,78	SPP1	
"	88,2	2,7	28,5	8,000	2,500	8,600	2,800	0,93	SPP1	
"	167	3,9	28,1	7,800	2,500	9,200	2,900	0,86	SPP1	
"	264	6,1	27,4	7,700	2,500	9,000	2,900	0,86	SPP1	
"	317	5,7	28,9	8,700	2,800	8,200	2,600	1,10	SPP1	
"	930	12,4	16,8	8,000	2,600	7,800	2,500	1,00	SPP1	
260	Control	0,0	7,100	2,300	9,100	2,900	0,79	SPP1		
"	18,4	1,0	7,100	2,300	8,400	2,700	0,85	SPP1		
"	102	2,4	8,000	2,500	9,300	3,000	0,96	SPP1		
"	176	3,2	8,000	2,500	9,300	3,000	0,96	SPP1		
"	245	4,3	7,000	2,200	8,600	2,800	0,86	SPP1		
280	124	4,1	7,400	2,400	8,200	2,600	0,91	SPP1		
"	165	5,2	8,300	2,600	8,100	2,600	1,03	SPP1		
"	690	9,7	8,500	2,700	8,700	2,800	0,98	SPP1		
"	790	---	8,200	2,600	8,400	2,700	0,99	SPP1		
280	Control	0,0	6,300	2,000	8,200	2,600	0,76	Timo		
"	78,8	2,2	6,600	2,100	7,800	2,500	0,84	Timo		
"	335	7,0	7,300	2,300	7,600	2,400	0,96	Timo		
"	500	9,0	7,100	2,300	7,400	2,400	0,97	Timo		
"	Control	0,0	6,200	2,000	8,000	2,600	0,79	Timo		
"	56,1	2,1	6,700	2,100	8,000	2,600	0,84	Timo		
"	355	4,0	7,100	2,200	7,500	2,400	0,94	Timo		
"	510	4,0	6,300	2,000	6,500	2,100	0,97	Timo		
254	Control	0,0	6,500	2,100	8,000	2,000	0,72	E.coli		
"	108	1,2	6,900	2,200	7,700	2,400	0,90	E.coli		
"	162	2,5	6,900	2,200	7,800	2,500	0,98	E.coli		
"	650	3,8	6,300	2,200	7,500	2,400	0,84	E.coli		
DNasa	d.r.s.	0,0	7,200	2,300	11,200	3,600	0,65	B.cereus		
"	1x10 ⁻⁴	0,0	6,800	2,200	9,900	3,200	0,65	B.cereus		
"	1x10 ⁻²	0,0	6,400	2,000	9,500	3,000	0,67	B.cereus		
"	2x10 ⁻²	0,0	6,200	2,000	9,100	2,900	0,68	B.cereus		
"	2,6x10 ⁻²	0,0	6,000	2,000	9,500	3,000	0,71	B.cereus		
"	3,2x10 ⁻²	0,0	6,000	2,000	9,500	3,000	0,71	B.cereus		

(1) - Error inferior al 3%

tivo y tras desnaturación; tres tipos de diferencias más acusadas se pueden observar: de una parte los puntos de cruce de los dos efectos Cotton observados cambian de modo apreciable, de 257 nm para el nativo en el primer efecto a 260 nm y de 225 nm a 230 nm en el segundo. De otra parte el máximo positivo del primer efecto aumenta al desnaturar y el máximo negativo disminuye ostensiblemente, de tal forma que la relación Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} pasa de ser 0,750 - en el nativo a 1,205. Por último, el efecto más espectacular es la gran subida del máximo positivo del segundo efecto Cotton que llega a alcanzar valores prácticamente iguales que los del primer efecto. En la Tabla.III-11- se especifican todos estos datos.

En los DNAs irradiados con luz U.V. (Ver Fig.III-22-), e independientemente de la longitud de onda con la que lo hayan sido, se aprecia únicamente un aumento paulatino del valor del máximo positivo y un descenso del máximo negativo en el primer efecto Cotton estabilizándose el cambio con la dosis a cada longitud de onda de tal forma que posteriores irradiaciones o dosis más fuertes no conducen a cambios apreciables de la situación alcanzada. Este cambio es pues similar cualitativamente al observado al desnaturar, aunque cuantitativamente es muy inferior pues alcanza un valor máximo en la relación Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} de 1,000 y no de 1,200 como en el caso de la desnaturación. La variación del punto de cruce es mucho menos ostensible, pero y sobre todo el segundo efecto Cotton situado sobre 210nm no sufre variación - apreciable alguna contrariamente a lo que hemos visto sucede al desnaturar.

Para cuantizar este efecto inducido por la radiación U.V. hemos utilizado la relación Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} del primer efecto Cotton. De una parte en la Fig.III-23 se ha representado este efecto frente la exposición U.V. y de otra frente a la variación de la T_m observada en estas muestras. En efecto, todas las muestras tras la irradiación, fueron estudiadas por desnaturación térmica y fue así determinada su variación de la T_m que, como ya hemos estudiado, es un fiel reflejo del contenido en dímeros de pirimidina. Pues bien, esta representación presenta dentro de la dispersión de los datos experimentales de ambas determinaciones una variación muy acusada de la relación - - Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} por debajo de una variación de la T_m de aproximadamente 5°C , es decir, por debajo de aproximadamente un 6 % de dímeros de Pirimidina respecto de la T_m , es decir, por debajo del 1 al 2 % de dímeros de Pirimidina respecto de nucleótidos en los DNAs considerados. Un aumento posterior considerable en la variación de la T_m , es decir, en el porcentaje de dímeros, incluso del doble no produce un aumento concomitante de la variación - del valor Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} considerado. Este efecto por último es independiente

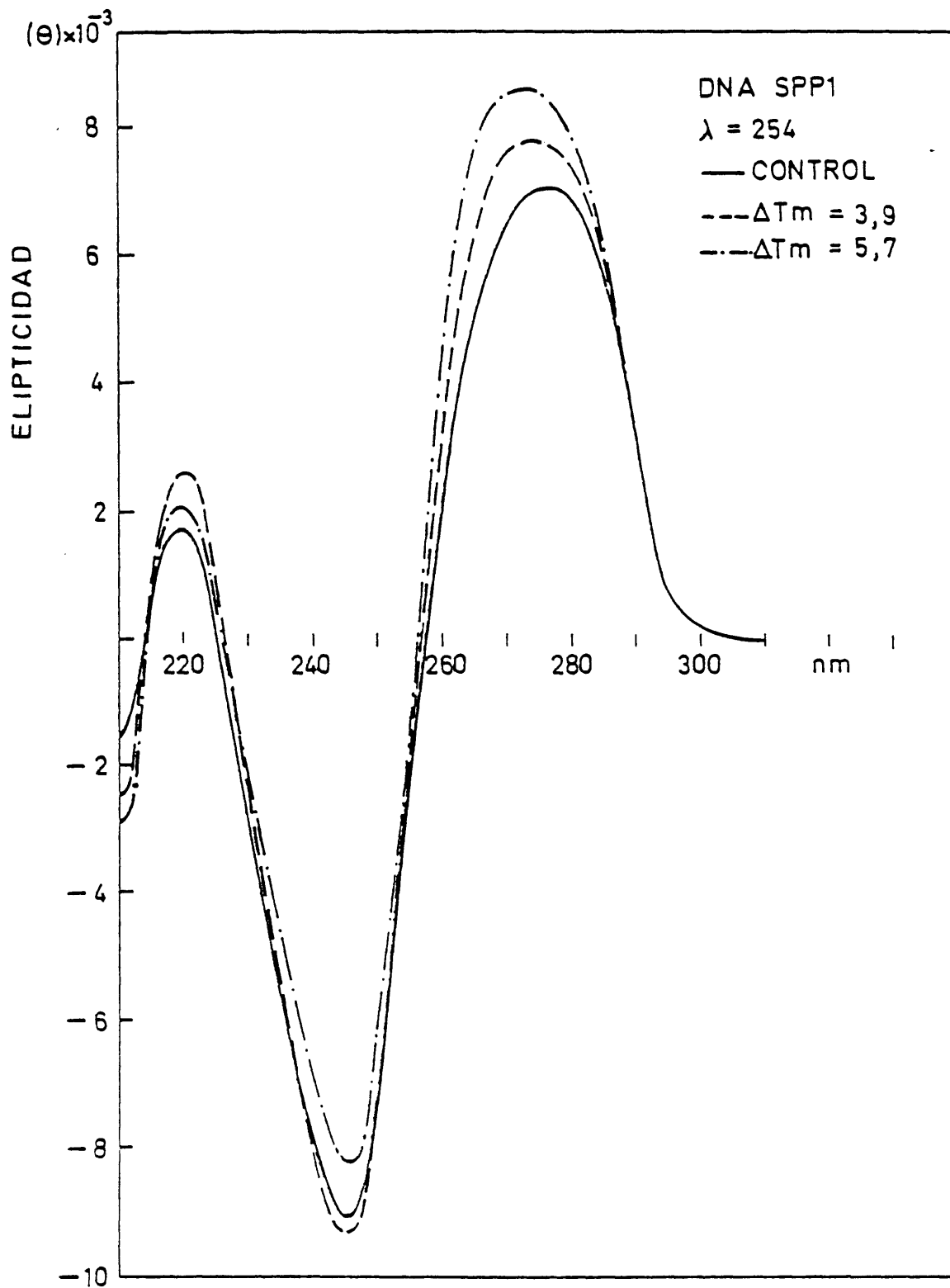


Fig. III-22. _ ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR DE DNAs IRRADIADOS CON RADIACION U.V A 254 nm.

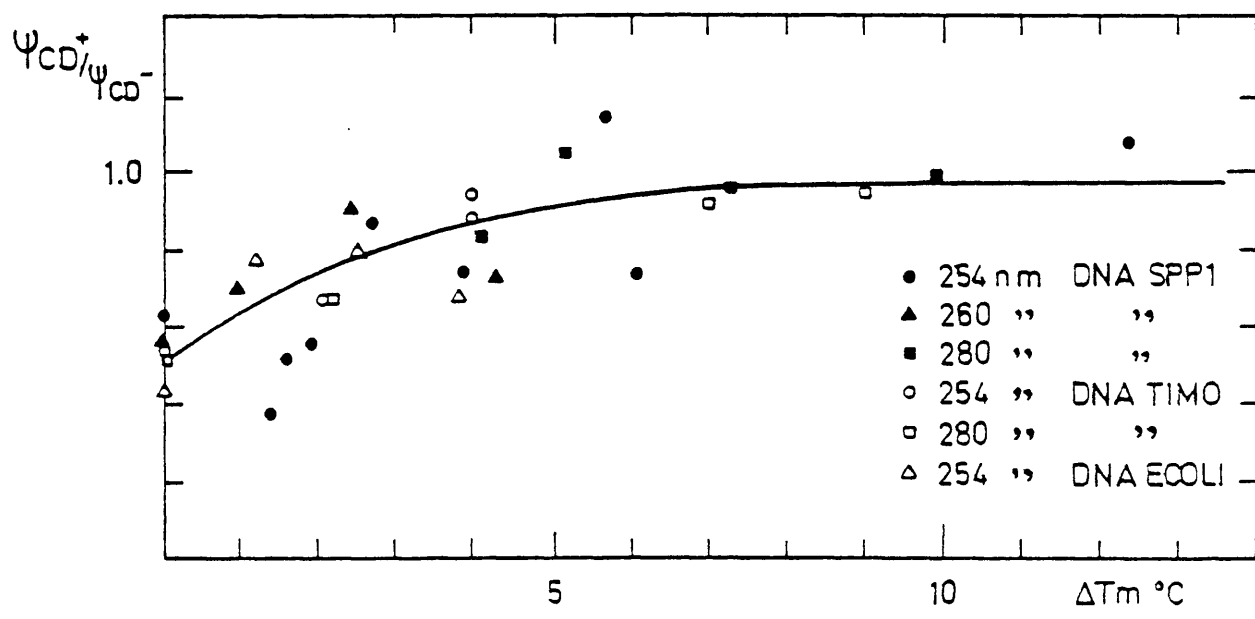
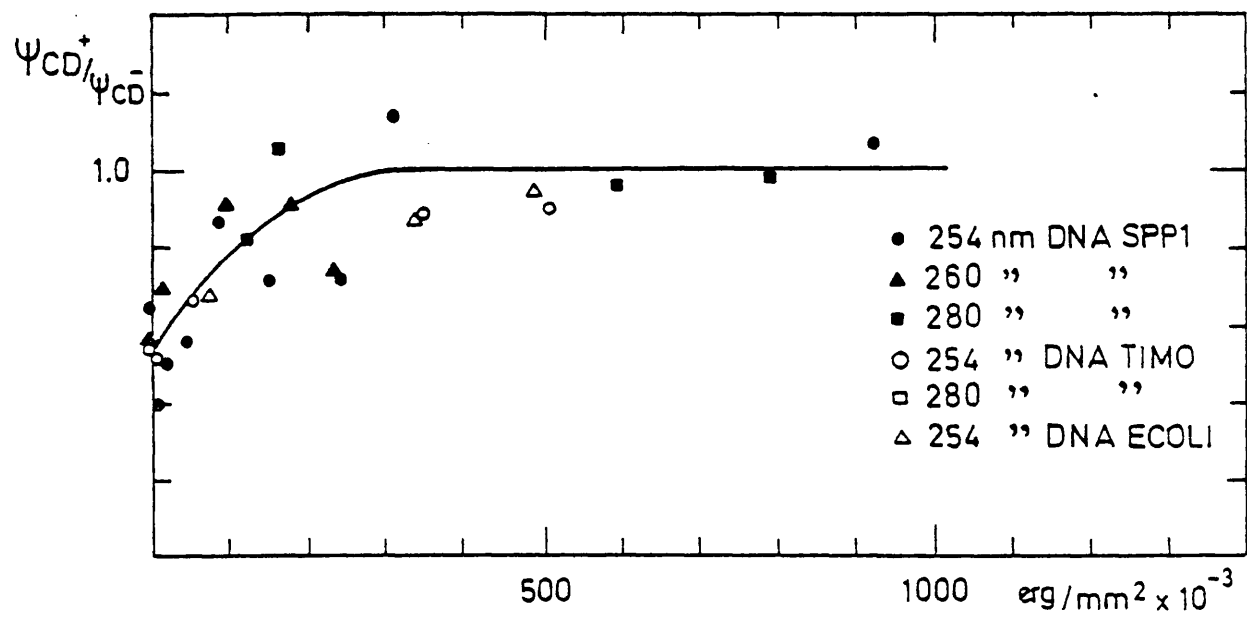


Fig. III-23. - Ψ_{CD^+}/Ψ_{CD^-} - FRENTE EXPOSICION ó ΔT_m EN DNAS IRRADIADOS CON U.V

dentro de los errores experimentales de las determinaciones realizadas, de los DNAs utilizados y de la longitud de onda de entre las utilizadas, siendo dependiente exclusivamente de los efectos primarios de la radiación U.V., es decir, de los dímeros de pirimidina.

A pesar de que como ya quedó demostrado al estudiar la variación de la densidad de roturas simples en los DNAs por irradiación con luz U.V., - ésta no produce roturas simples si se irradia en condiciones anoxicas y en presencia de una atmósfera saturada de N_2 . Se comprobó en una de las series estudiadas por dicroísmo la densidad de roturas simples de las muestras irradiadas, los resultados así como los resultados del estudio de los espectros de dicroísmo y de la variación de la T_m aparecen en la Tabla III-11-. Como se observa no se produce ningún incremento en la densidad de roturas simples como consecuencia de la irradiación, queda por tanto suprimida esta variable en el estudio de dicroísmo realizado.

Esto es importante pues el incremento de la densidad de roturas simples produce un efecto totalmente contrario al que hemos observado por la irradiación con luz U.V.. En efecto en la Fig-III-24- aparecen los espectros de dicroísmo circular de varias muestras de DNA a las que se les ha introducido un fuerte número de roturas simples hasta llevarlas a una densidad por nucleotido semejante a las densidades de dímeros por nucleotidos obtenidas por irradiación, es decir entre 1 y 3% de roturas simples por nucleotido. Como se ve el efecto producido en el primer efecto Cotton es el de un descenso paulatino tanto del máximo negativo como del máximo positivo sin cambiar los puntos de cruce de los dos efectos Cotton ni cambiar apreciablemente el valor del máximo positivo del segundo efecto Cotton.

En la Fig-III-25- se encuentran reflejados estos resultados pero se ha representado aquí no la relación Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} pues apenas varía respecto de un DNA control (Ver Tabla-III-11-) sino el descenso del valor de la (Ψ) para su comparación con los resultados de G.LUCK (1972). Para ello se ha representado junto a los valores del (Ψ) $CD+$ de las series de DNA de SPPI irradiado con luz U.V. a diferentes longitudes de onda y dosis los resultados de G. LUCK (1972) en un estudio similar con 4 muestras y un control de DNA de -Timo irradiadas a 254 nm. Como se observa este autor encuentra también un aumento del valor de la (Ψ) $CD+$ a dosis relativamente bajas para después al aumentar la dosis observar un descenso de estos valores incluso por debajo de los niveles iniciales como sucede cuando el DNA posee densidades de roturas simples suficientemente altas.

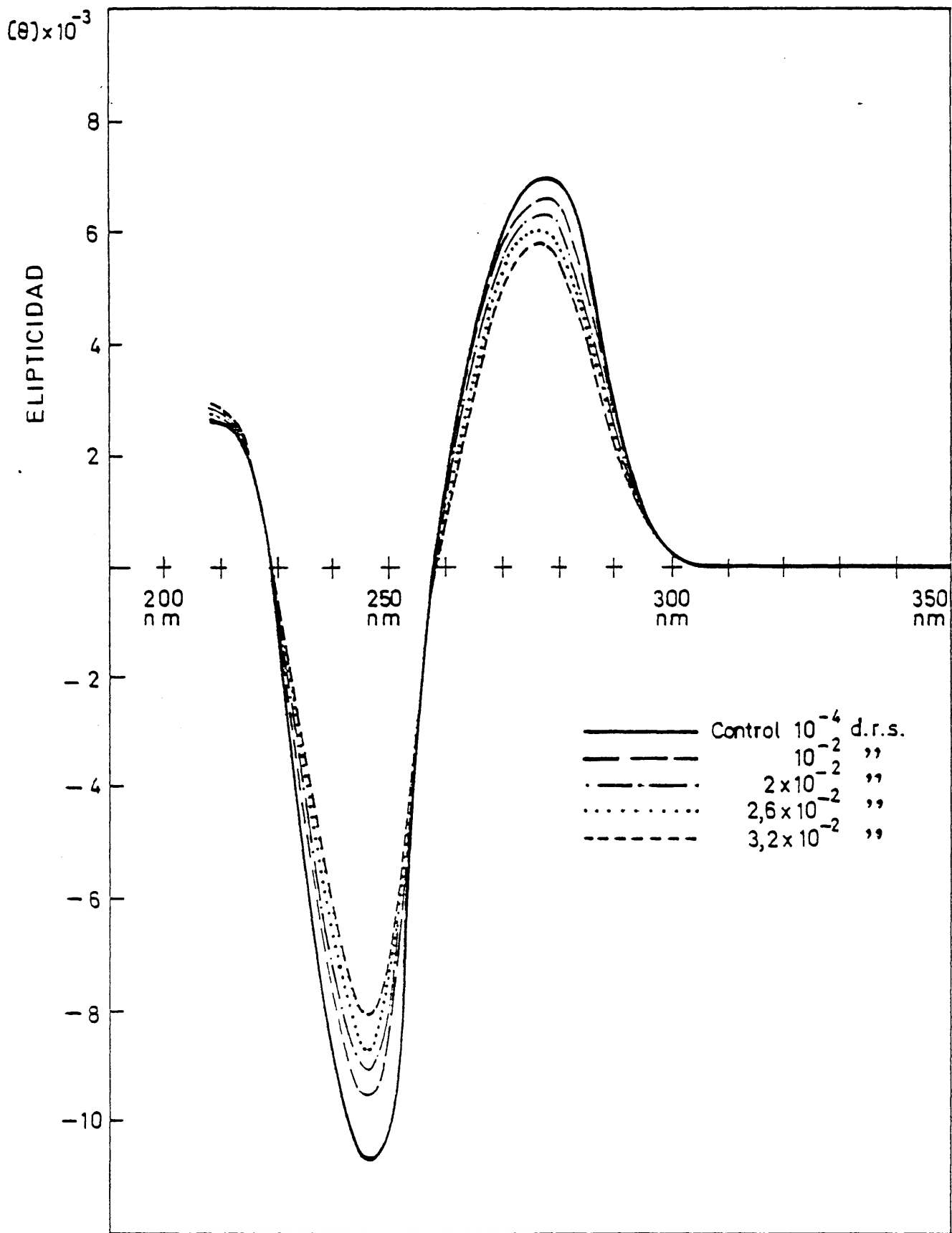


Fig. III - 24. ESPECTROS DE DICROISMO CIRCULAR EN DNA, DE DIFERENTES DENSIDADES DE ROTURAS SIMPLES.

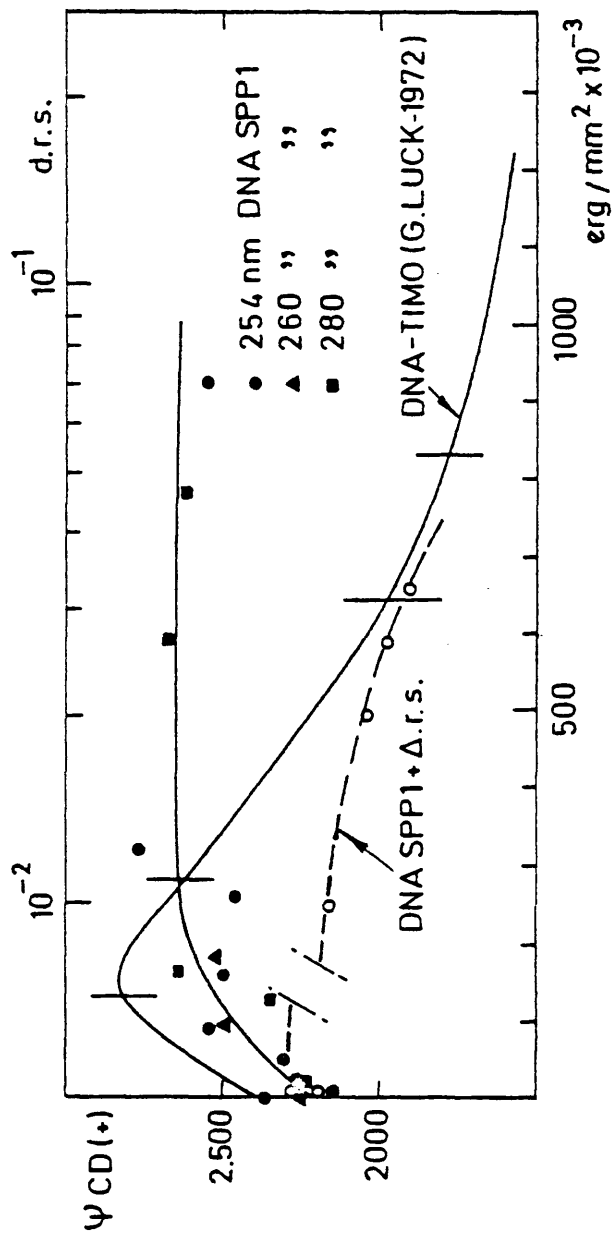


Fig. III - 25. - CD + FRENTE A EXPOSICION ó D.R.S EN DNA DE SPP1. COMPARACION CON LOS DATOS DE G.LUCK.

En definitiva pues de nuestros resultados se puede concluir:

- 1°) En nuestras condiciones de trabajo se puede estudiar el efecto producido por los dímeros de pirimidina en el espectro de dicroísmo circular del DNA pues no se producen simultáneamente ningún aumento en la densidad de roturas simples cuyo efecto en dicroísmo, contrario al de los dímeros, entorpece el estudio e interpretación de los resultados obtenidos.
- 2°) De la comparación de los espectros del DNA nativo, desnaturado e irradiado con luz U.V. se puede concluir que la evolución de los espectros de dicroísmo circular con la dosis U.V. no es hacia una desnaturación sino que son fenómenos distintos, como lo demuestra la no aparición de la característica subida del valor de la (θ) CD+ del segundo efecto Cotton así como el que los DNAs irradiados desnaturen normalmente aunque cambie su Tm pero apenas lo haga su efecto hipercromico.
- 3°) De la comparación del efecto producido en el espectro de Dicroísmo con el porcentaje de dímeros de pirimidina obtenido a través del estudio de la variación de la Tm se puede concluir que se observa un cambio en la relación ψ_{CD+}/ψ_{CD-} al aumentar la proporción de dímeros desde 0% a aproximadamente 2% de dímeros respecto de nucleotidos en el DNA. Que alcanzando este nivel de dímeros la relación ψ_{CD+}/ψ_{CD-} es estable aunque aumentemos la proporción de dímeros del orden de 2 veces más. Que este efecto observado no es el mismo efecto observado en la debilitación de la estructura del DNA frente a la temperatura medido por la variación de la Tm, pues ésta varía continuamente en función de los dímeros, aunque ambos efectos estén producidos por la misma causa, es decir, la producción de dímeros de pirimidina por la luz U.V.

III-8.- Estudio de la formación de dímeros de pirimidina en DNA de B.subtilis, irradiado con radiación U.V. a diferentes longitudes de onda, por determinación de la capacidad transformante.

Se irradiaron diversas muestras de DNA-B.subtilis OG-2-ptot. (u.v.r.⁻) con radiación U.V. a 240^{+10} nm, 254 nm, 280^{+10} nm y 300^{+10} nm en las condiciones de solvente etc. ya comentadas. El DNA así irradiado fue utilizado en experimentos de transformación bacteriana con la cepa B.subtilis 2G-9 (u.v.r.⁻, Tir⁻,

TABLA-III-12.-CAPACIDAD TRANSFORMANTE EN DNA IRRADIADO CON U.V.A DIFERENTES LONG. DE ONDA Y EXPOSICIONES

λ nm	(1) Fluencia Energé tica media: Ergios/mm ²	(1) Fluencia Energé tica media: ² (Einstein/m ²)x10 ¹⁸	% Capacidad Trans formante respecto del control. Nx	% Pérdida Capacidad Transformante respec to del Control (No-Nx)-	$\frac{\Delta}{(TT+CT)}$ respecto de T.	(No/Nx) ^{1/2}
240 ⁺ 10	0	0,00	100	0,0	--	1,00
" "	96	1,90	91,0 ⁺ 6,5	19,2 ⁺ 1	--	1,05
" "	240	4,80	75,0 ⁺ 15,0	24,6 ⁺ 4	--	1,15
" "	480	9,70	55,0 ⁺ 13,0	44,6 ⁺ 10	--	1,34
" "	720	14,5	60,0 ⁺ 10,0	39,5 ⁺ 7	--	1,29
" "	1920	38,6	16,0 ⁺ 2,1	83,7 ⁺ 11	--	1,48
" "	3360	67,6	14,0 ⁺ 0,2	86,0 ⁺ 1	--	1,67
" "	5200	101	15,0 ⁺ 0,3	94,6 ⁺ 5	--	1,30
" "	5700	115	7,0 ⁺ 1,8	93,0 ⁺ 24	--	3,78
254	0	0,00	100	0,0	0,00	1,00
" "	246	5,20	68,0 ⁺ 14,0	32,2 ⁺ 7	0,05	1,21
" "	490	10,5	29,0 ⁺ 8,0	71,1 ⁺ 20	0,09	1,86
" "	730	15,7	14,0 ⁺ 0,8	85,8 ⁺ 5	0,14	1,65
" "	980	20,9	14,0 ⁺ 3,1	86,0 ⁺ 19	0,19	1,67
" "	1230	26,1	9,4 ⁺ 0,1	90,6 ⁺ 2	0,24	3,26
" "	2460	52,3	3,3 ⁺ 0,6	96,7 ⁺ 19	0,46	5,50
" "	2460	52,3	1,6 ⁺ 0,3	98,4 ⁺ 16	0,46	7,95
" "	3690	78,4	0,7 ⁺ 0,1	99,2 ⁺ 13	0,67	11,70
" "	5100	109	0,4 ⁺ 0,1	99,5 ⁺ 13	0,90	15,49
280 ⁺ 10	0	0,00	100	0,0	0,00	1,00
" "	610	14,3	37,0 ⁺ 3,0	62,5 ⁺ 5	0,11	1,63
" "	1040	24,5	26,0 ⁺ 3,8	74,4 ⁺ 11	0,18	0,25
" "	3050	71,5	6,8 ⁺ 0,6	93,2 ⁺ 8	0,53	3,83
" "	4800	114	4,2 ⁺ 1,9	95,8 ⁺ 44	0,83	4,88
" "	7300	171	3,5 ⁺ 0,7	96,5 ⁺ 19	1,22	5,34
300 ⁺ 10	0	0,00	100	0,0	0,00	1,00
" "	1890	47,6	50,0 ⁺ 8,0	50,0 ⁺ 8	0,07	1,41
" "	1890	47,6	67,0 ⁺ 2,0	32,5 ⁺ 1	0,07	1,22
" "	3790	95,2	32,0 ⁺ 9,0	63,0 ⁺ 15	0,14	1,64
" "	11300	285	9,0 ⁺ 2,6	90,6 ⁺ 25	0,44	3,26
" "	13200	333	9,0 ⁺ 2,0	90,6 ⁺ 13	0,50	3,26
" "	17000	428	8,0 ⁺ 1,5	92,2 ⁺ 18	0,61	3,58

(1) - Error inferior al 3%

Trp⁻). Esta cepa como ya quedó puesto de manifiesto (II-6) es un mutante - incapaz de realizar la reparación de los dímeros de pirimidina por el mecanismo de escisión-resíntesis por lo que supone la posibilidad de utilizar a la célula bacteriana como equipo de medida del nivel de dímeros de las moléculas del DNA que incorpora al poder intentar correlacionar la pérdida de información con la cantidad de dímeros sin la confusión que supone tratar de observarlo en un sistema celular en el que los procesos de reparación - estén funcionando simultáneamente. En la cepa de *B. subtilis* utilizada tan sólo cabe la posibilidad de reparación por mecanismos de recombinación genética, que como ya hemos discutido es mucho menos eficaz que el proceso de reparación por escisión-resíntesis. El mecanismo de fotorreactivación se - inhibe al realizar la incubación en la oscuridad.

Los resultados obtenidos están reflejados en la Tabla-III-12 donde se expresan para cada longitud de onda los valores de exposición, tanto por - ciento de capacidad transformante respecto de un control no irradiado, el tanto por ciento de pérdida de esta capacidad y el porcentaje de dímeros de ($\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT}$) respecto de T. Todos los valores de capacidad transformante se corrigieron, cuando así fue preciso, en función del tamaño molecular del DNA donador de acuerdo con la calibración previamente realizada (II-6-1). Los valores del porcentaje de dímeros se calcularon a partir de los valores de la sección eficaz de formación de dímeros y niveles de saturación para el dímero de $\overset{\wedge}{TT}$ obtenidos en el estudio realizado previamente en este DNA (III-3-). Se tuvieron en cuenta los valores de las secciones eficaces de formación de dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$ en DNA de *E. coli*, pues aunque no se habían determinado con exactitud para el DNA de *B. subtilis* hemos supuesto que al igual que en los dímeros de $\overset{\wedge}{TT}$ estos valores son muy parecidos. Los niveles de saturación de dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$, aunque pueden ser diferentes que los de DNA de *E. coli* en *B. subtilis* son tan bajos que introducen un error muy pequeño al conjunto de - la determinación de dímeros de ($\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT}$) respecto de T. Aún así se ha considerado que el error final en esta determinación de dímeros así realizada sea de hasta un 20%.

En la Fig-III-26- se han representado los resultados obtenidos en la capacidad transformante de los DNAs irradiados a diferentes exposiciones - para cada longitud de onda. Como se observa en la figura la capacidad transformante se pierde más rápidamente a longitudes de onda a las que la sección eficaz del proceso de dimerización es mayor. Es decir y por este orden: 254, 280, 240, y 300 nm.

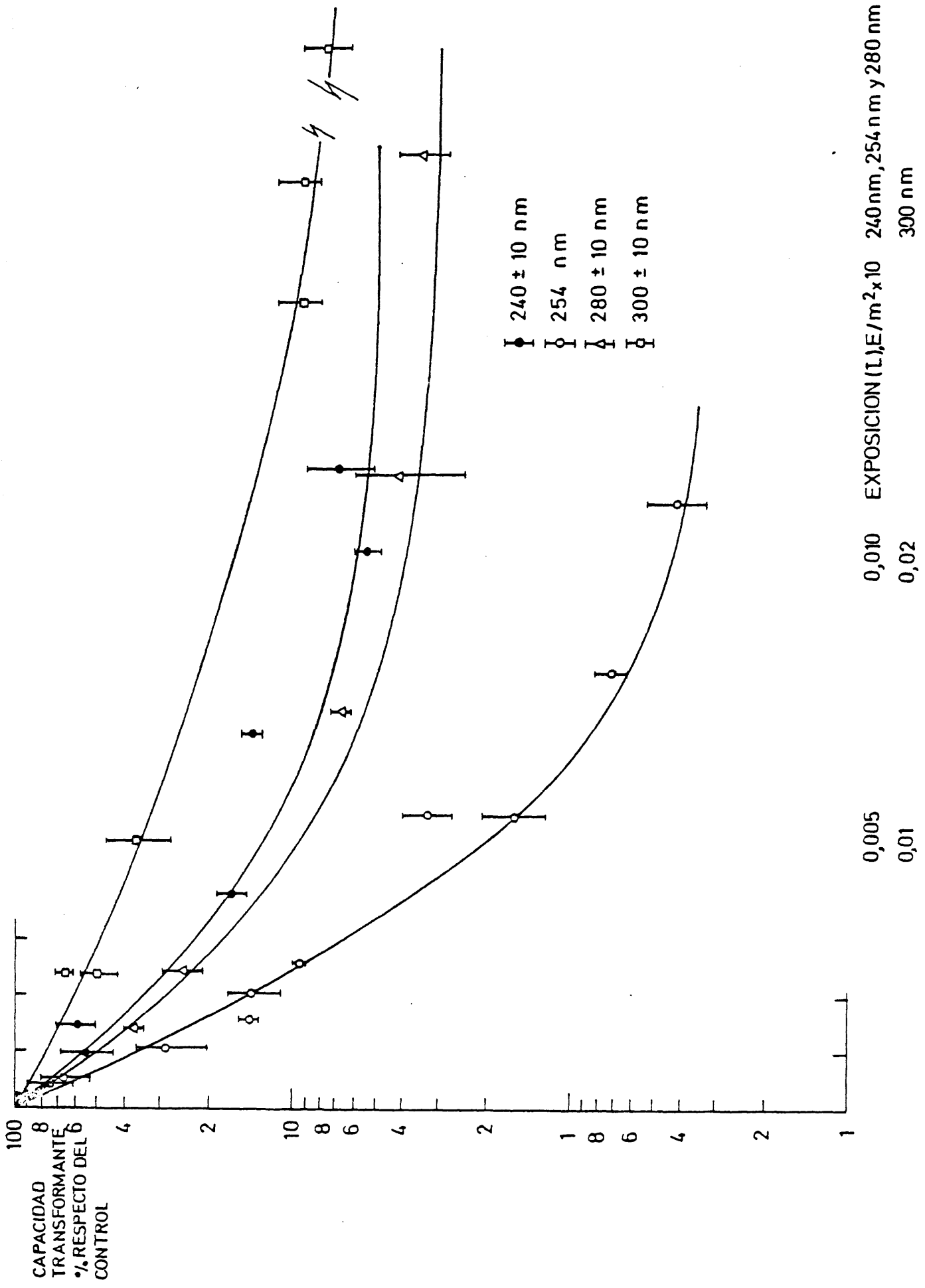


Fig. III.-26.- CAPACIDAD TRANSFORMANTE DE DNA B. SUBTILIS IRRADIADO CON U.V A DIFERENTES LONG. DE ONDA

En estas curvas se observa como a partir de una determinada exposición la actividad transformante no se modifica profundamente aunque el incremento de dímeros sea muy parecido al de otros incrementos de exposición anteriores. Este hecho ha sido interpretado por numerosos autores dentro de la teoría del blanco al suponer que el blanco de la inactivación es un segmento concreto del DNA, el cual constituye el marcador seleccionado (en nuestro caso la tirosina) por lo tanto una vez dañado este marcador, quedaría inactivo para la transformación, no modificándose apenas la capacidad transformante al aumentar el número de impactos posteriores.

Sin embargo, Rupert y Goodgal (1960) encontraron una relación empírica entre ambos parámetros, capacidad transformante y exposición que transforma estas curvas en rectas, se trata de la relación entre la raíz cuadrada del recíproco de la actividad transformante residual y la exposición. Desde entonces se ha utilizado con mucha profusión este tipo de representaciones pues en la mayoría de los casos estas cinéticas se transforman así en rectas.

Efectivamente utilizando esta expresión empírica: $(N_0/N_x)^{1/2} = c\bar{L} - 1$ donde N_0 es la actividad transformante inicial, N_x es la actividad transformante residual después de exponer el DNA a una exposición \bar{L} y c es una constante que si el autor utiliza como medida de sensibilidad a la radiación U.V. para los distintos marcadores genéticos, nosotros la utilizaremos como medida de la sensibilidad a las diferentes longitudes de onda.

En un intento por encontrar el espectro de acción de la formación de dímeros en el DNA irradiado con radiación U.V. se ha representado el valor de las pendientes así obtenidas en función de la longitud de onda. En la Fig-III-28 se han representado estos valores junto con los obtenidos en el estudio de formación de dímeros por métodos químicos y junto a los espectros de DNA y timina. Como se observa la coincidencia de los espectros de acción es suficientemente buena y refleja, una medida proporcional a las secciones eficaces de dimerización encontradas en el estudio químico de la formación de dímeros y no del proceso total de formación de dímeros que entraña la dimerización y monomerización.

En la Fig-III-27 se han representado los valores de la pérdida de ca

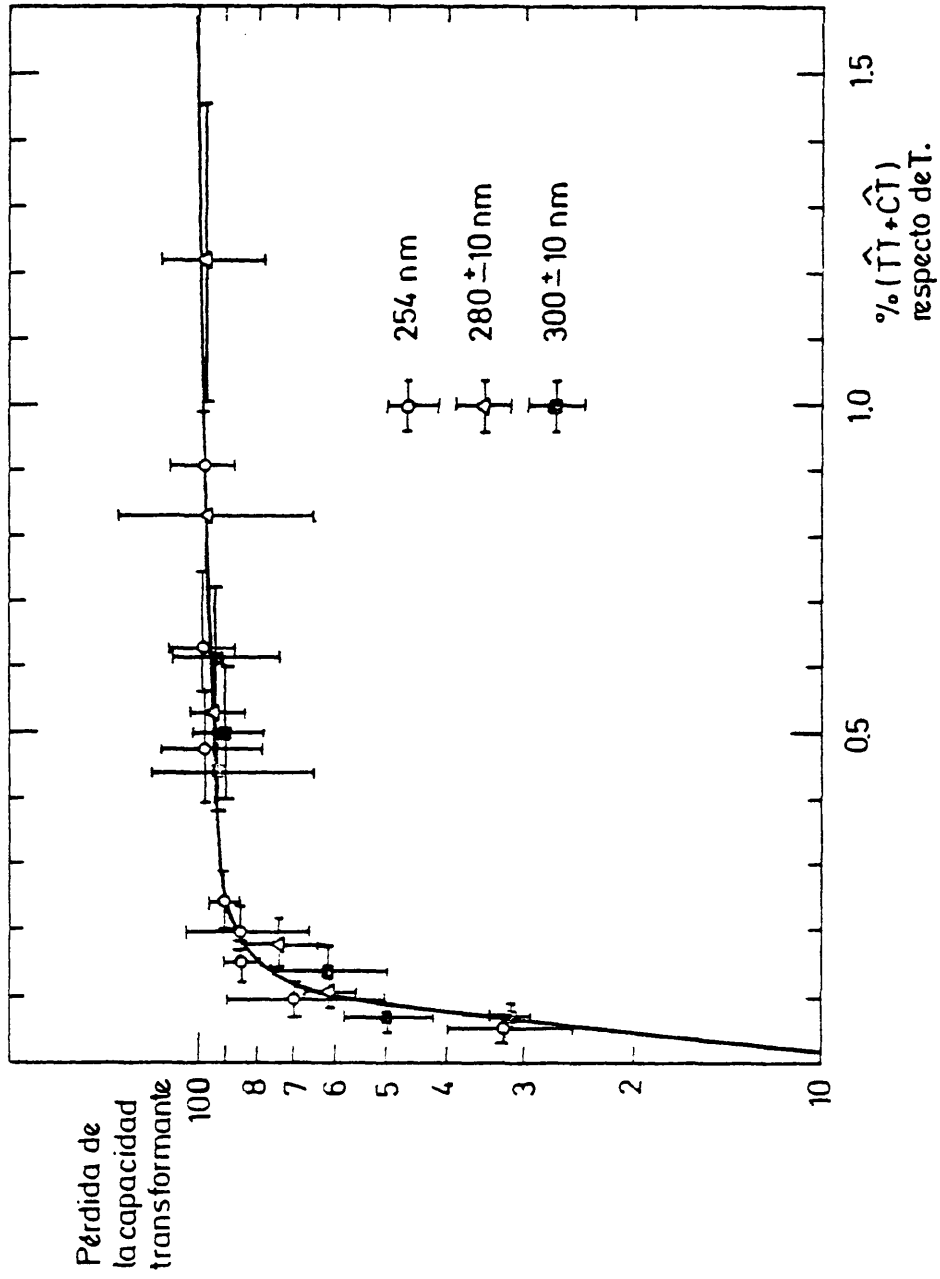


Fig. III -27.- PERDIDA DE LA CAPACIDAD TRANSFORMANTE DE DNA B.SUBTILIS IRRADIADO CON U.V. A DIFERENTES LONG. ONDA EN FUNCION DE LA CANTIDAD DE DIMEROS

pacidad transformante en función del nivel de dímeros alcanzado, para cada longitud de onda. Además del error en la medida de la pérdida de la capacidad transformante se han representado los valores estimados en el error del cálculo de la cantidad de dímeros. Como se observa en la figura existe una relación estricta entre la cantidad de dímeros y la pérdida de la capacidad transformante que es independiente de la longitud de onda de la radiación, dentro del rango de longitud de onda estudiado y dentro del error experimental con que se han obtenido los datos.

La relación que une estos dos parámetros, porcentaje de dímeros de $(\hat{TT} + \hat{CT})$ respecto de T y pérdida de la capacidad transformante es muy compleja y desconocida a pesar de haber intentado evitar en lo posible la complejidad de respuesta celular en la transformación al estar presentes los mecanismos de reparación enzimática. Además la capacidad de medida de la célula por este sistema queda limitada a niveles muy bajos de dímeros pues la presencia de un 0,1% de dímeros de $(\hat{TT} + \hat{CT})$ respecto de T produce una pérdida - ya del 60% de la capacidad transformante. Es decir, la presencia de un dímero de \hat{TT} ó de \hat{CT} cada 4000 nucleotidos de DNA produce una lesión irrecuperable en el gen que estamos observando con un 60% de probabilidad. Desde luego niveles por encima del 1% de dímeros de $(\hat{TT} + \hat{CT})$ respecto de T no tienen ya ninguna significación biológica en este sistema celular incapaz de reparar estas lesiones por el mecanismo de escisión resíntesis.

Complementariamente a esto, si utilizando el tipo de expresión empírica antes citado relacionamos la raíz cuadrada del recíproco de la actividad transformante residual con el porcentaje de dímeros y ajustamos a una recta, tampoco encontramos, en primera aproximación, ninguna dependencia con la longitud de onda. La recta así obtenida: $(N_o/N_x)^{1/2} = 4,0x\% (\hat{TT} + \hat{CT}) + 1,77$ tiene un resto cuadrático medio de 1,32 y ajusta bien con respecto a la representación de la pérdida de la capacidad transformante en función del tanto por ciento de dímeros para valores superiores al 0,2 %. Para valores inferiores la coincidencia no es buena.

En definitiva pues, este tipo de correlaciones entre el porcentaje de dímeros y las medidas de transformación bacteriana constituyen, potencialmente, un método de determinación de dímeros a muy bajos niveles dada la extrema sensibilidad de la célula como sistema de medida. Sensibilidad esta que no se consigue fácilmente a esos niveles por métodos químicos.

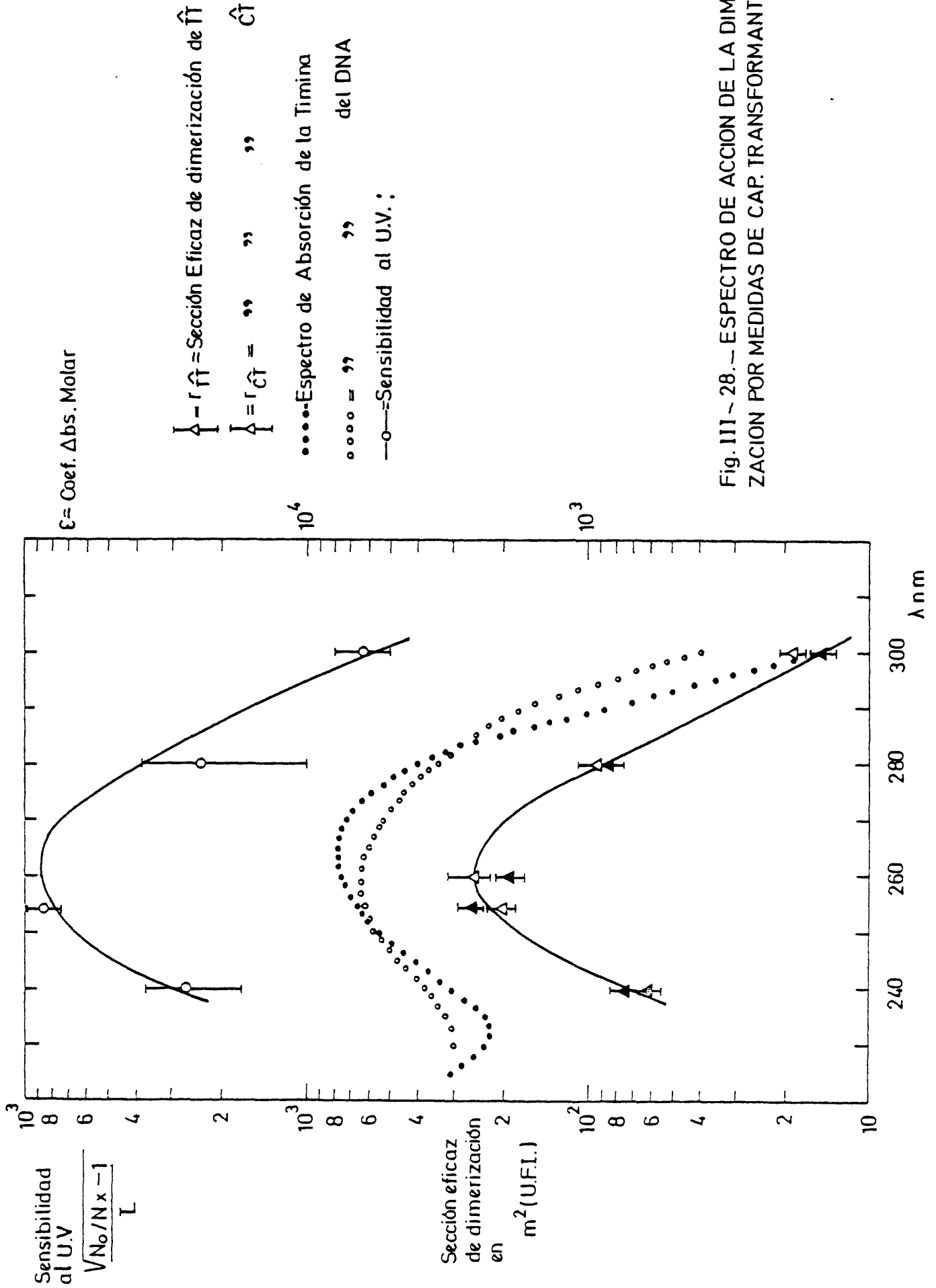


Fig. III - 28. - ESPECTRO DE ACCION DE LA DIMERIZACION POR MEDIDAS DE CAP. TRANSFORMANTE

III.9.- Reconocimiento y liberación de dímeros de Pirimidina en DNA de SPPI por la acción de la U.V.-Endonucleasa y la DNA-Polimerasa

La DNA-U.V.-Endonucleasa de *M. luteus*, reconoce selectivamente dímeros de pirimidina en su acción produciendo una rotura simple al lado 5' del dímero. La capacidad de reconocimiento depende de la concentración de dímeros; algunos autores han determinado la relación entre la concentración de dímeros de $\overset{\wedge}{TT}$ y roturas simples introducidas por la U.V.-Endonucleasa. Así Kaplan et al. (1969) mediante ensayos de liberación de P^{32} por acción simultánea de la U.V.-Endonucleasa y la Fosfatasa alcalina encuentran que esta relación es de aproximadamente uno entre 10^4 y 10^5 ergios/mm² en DNA de *E.coli*, Nakayama et al. (1970) mediante cálculo de la densidad de roturas simples por análisis de sedimentación en gradiente de sacarosa encuentran también una relación de - aproximadamente una rotura simple por cada dímero de pirimidina entre 10^2 y 10^4 ergios/mm² a 254 nm en DNA de *E.coli*. Es decir, hasta aproximadamente un 2% de dímeros respecto de Timina.

En la Tabla.-III-14 se presentan los resultados obtenidos en la medida de la densidad de roturas simples introducidas por la U.V.-Endonucleasa aislada por nosotros hasta fracción Electroenfoque (Ver II-8-1) en DNA de - SPPI irradiado con diferentes dosis de U.V. a 254 nm y para diferentes cantidades de enzima hasta asegurar la saturación de la acción enzimática. La medida de la densidad de roturas simples se realizó por estudios de sedimentación del DNA desnaturado en ultracentrifuga analítica. (Ver II-5-2).

En la Fig-III-29. se han representado todos estos valores y como se observa el nivel de roturas simples conseguido aumenta con el porcentaje de - dímeros, aunque a partir de cierto valor la densidad de roturas simples conseguida sea semejante.

El DNA control, es decir, no irradiado, presenta un ligero ataque sólo explicable por contaminación endonucleasica no específica de la preparación de U.V.-Endonucleasa. El número de roturas simples introducidas por molécula de - DNA nativo en este DNA control es como máximo del orden de 6 en comparación con las 34 que se producen para el caso del DNA menos irradiado de los estudiados - con un 0,022% de $(\overset{\wedge}{TT}+\overset{\wedge}{CT})/N$ ó las 130 roturas simples por molécula introducidas en el DNA a valores por enzima de 0,200% de $(\overset{\wedge}{TT}+\overset{\wedge}{CT})/N$. Ver Tabla III-16.

En la Tabla III-15 se han transformado los valores de dosis y densidad de roturas simples en cada caso en $\mu\mu$ moles de dímero de $(\overset{\wedge}{TT}+\overset{\wedge}{CT})$ y en - - $\mu\mu$ moles de roturas simples. En el cálculo de los $\mu\mu$ moles de dímeros se ha in

TABLA-III-14*

Densidad de roturas simples producidas por la U.V.-Endonucleasa en función de la concentración de dímeros en DNA de SPPI.

$\lambda = 254 \text{ nm}$ $\bar{L} = E/m^2 \cdot 10^4$	$(\hat{T} + \hat{C})/N$ % (1)	Concent. U.V.-En. μg	$S_{20}^{50\%}$ desnt.	P.M.50% $\times 10^{-6}$ (2)	P.M.m.n. $\times 10^{-6}$ (3)	d.r.s. $\times 10^5$ (4)
0,00	0,00	11	36,1	16,7	9,90	3,10
		15	35,1	15,9	9,50	3,30
		28	35,1	15,4	9,20	3,30
		38	34,9	15,2	9,00	3,40
		55	27,0	7,80	4,60	6,60
		77	26,8	7,60	4,60	6,70
		110	24,8	6,30	3,70	8,20
		150	26,2	7,20	4,30	7,10
		220	24,1	5,80	3,40	8,90
		310	23,6	5,30	3,10	9,80
0,57	0,022	11	25,5	6,70	4,00	7,70
		15	31,0	11,20	6,70	4,60
		28	18,1	2,80	1,60	18,6
		38	20,2	3,70	2,10	14,0
		55	14,8	1,60	1,00	31,4
		77	12,5	1,10	0,63	48,4
		110	12,9	1,20	0,69	44,6
		150	13,2	1,20	0,72	42,3
		220	12,2	1,00	0,59	52,1
		310	13,1	1,20	0,71	43,2
1,14-1,28	0,047	11	27,8	8,40	5,00	6,10
		15	27,2	8,00	4,70	6,50
		28	19,2	3,20	1,90	16,0
		38	16,1	2,00	1,20	25,4
		55	13,9	1,40	0,84	36,7
		77	11,4	0,83	0,49	61,9
		110	11,6	0,88	0,52	58,8
		150	11,0	0,77	0,46	67,0
		220	9,4	0,49	0,29	105
		310	11,7	0,90	0,53	57,4
2,29	0,087	11	26,9	7,70	4,50	6,70
		15	23,4	5,40	3,20	9,60
		28	23,8	5,60	3,30	9,20
		38	13,1	1,20	0,71	43,4
		55	13,0	1,20	0,70	43,6

TABLA-III-14- (Cont.)

$\lambda = 254 \text{ nm}$ $\bar{L} = \frac{E}{m^2} \times 10^4$	$\frac{\hat{T} + \hat{C}T}{N} \%$ (1)	Concent. U.V.-En. μg	$S_{20W}^{50\%}$ desnt.	P.M.50% $\times 10^{-6}$ (2)	P.M.m.n. $\times 10^{-6}$ (3)	d.r.s. $\times 10^5$ (4)
2,29	0,087	77	9,40	0,51	0,30	100
		110	10,4	0,66	0,39	78,0
		150	9,10	0,47	0,28	110
		220	7,80	0,31	0,18	160
		310	9,70	0,55	0,32	94,0
3,44	0,190	11	26,7	7,60	4,50	6,80
		28	19,6	3,40	2,00	15,0
		55	12,5	1,10	0,63	49,0
		110	10,5	0,67	0,40	76,0
		220	9,60	0,53	0,31	97,0
4,58	0,169	15	22,4	4,80	2,90	11,0
		38	11,2	0,81	0,48	64,0
		77	7,60	0,29	0,17	180
		150	7,30	0,27	0,16	190
		310	8,60	0,41	0,24	120
9,16	0,315	11	27,9	8,50	5,10	6,07
		15	14,2	1,50	0,88	35,0
		28	23,0	5,20	3,10	10,0
		38	9,70	0,55	0,32	93,0
		55	11,5	0,87	0,52	59,0
		77	7,70	0,30	0,18	168
		110	10,5	0,62	0,36	83,0
		150	6,40	0,19	0,11	270
		220	8,00	0,33	0,19	150
		310	8,00	0,33	0,19	160
19,47	0,577	11	26,6	7,50	4,50	6,90
		28	22,0	4,60	2,80	11,0
		55	14,8	1,60	0,97	32,0
		110	9,30	0,49	0,29	100
		220	8,20	0,36	0,21	140
51,55	1,032	11	28,1	8,70	5,20	5,90
		28	21,6	4,40	2,60	12,0
		55	7,10	0,24	0,14	210
		110	7,10	0,24	0,14	210
		220	7,10	0,24	0,14	210

TABLA-III-14-(Cont.)

$\lambda = 254\text{nm}$ $\bar{L} = E/m^2 \times 10^4$	$\frac{\hat{T}T + \hat{C}T}{N}$ % (1)	Concent. U.V.-En. μg	$S_{20}^{\circ} 50\%$ desnt.	P.M.50% $\times 10^{-6}$ (2)	P.M.m.n. $\times 10^{-6}$ (3)	d.r.s. $\times 10^5$ (4)
		15	14,9	1,70	1,00	31,0
		38	11,2	0,80	0,47	64,0
171,84	1,344	77	8,20	0,35	0,21	150
		150	7,40	0,27	0,16	190
		310	7,90	0,32	0,19	160

(1).- Ver modo de cálculo en la TABLA-III-15.

(2).- Según la calibración $\% 0,386 \log P.M. = \log S_{20}^{\circ} - \log 0,59$. Mingot, F. et al (1976)

(3).- Según la expresión: $P.M.m.n. = P.M. 50\% \times 0,596$

(4).- Según la expresión: $d.r.s. = 309/P.M.m.n.$

*.- La mezcla de reacción de 1 ml. contiene: 0,5 ml. de DNA-SPP1 a 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ irradiado a diferentes dosis con radiación U.V. de 254 nm a los que se les añaden de diferentes cantidades de enzima U.V.-Endonucleasa fracción electroenfoque. El volumen final se ajusta a 1 ml con tampón 30mM TRIS-HCl pH= 7,5 10mM MgCl_2 y agua destilada de manera que finalmente quede a concentración de TRIS y de magnesio 10 veces menor. La reacción se realiza durante 30' a 37°C. La desnaturación de las muestras y su preparación para llevar a cabo la sedimentación del DNA desnaturado se realiza según el método ya descrito en el Apartado-II-5-2.

Dado que para el mantenimiento de la estabilidad enzimática de la U.V.-Endonucleasa es necesario tenerla en presencia de DNA de Timo, que se mezclaría en la sedimentación con el DNA de SPP1 que queremos estudiar, es necesario en estas experiencias de determinación de roturas simples introducidas por la U.V.-Endonucleasa en DNA irradiado con U.V. mediante centrifugación analítica, quitar previamente este DNA de Timo de la preparación enzimática que se va a utilizar. Con este fin se filtra la preparación de enzima bajo presión controlada de nitrógeno a través de un filtro que retiene moléculas de tamaño superior a 100.000 d.. Las diferencias en las determinaciones realizadas en experiencias independientes para DNAs con la misma dosis y por tratamiento con diferentes preparaciones de enzima, (caso de las muestras que se presentan tratadas con 10 diferentes concentraciones de enzima) debidas a la mayor o menor contaminación con DNA de Timo, o debidas a diferencias en la actividad específica de la enzima, son suficientemente pequeñas como para que sólo sean importantes en algún caso para concentraciones pequeñas de enzima.

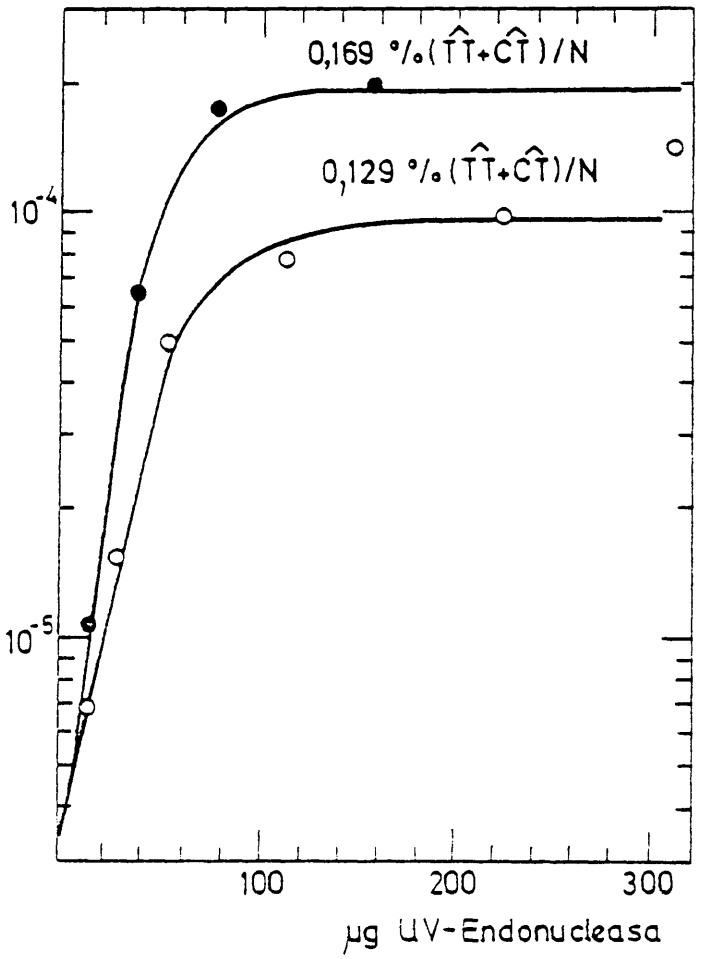
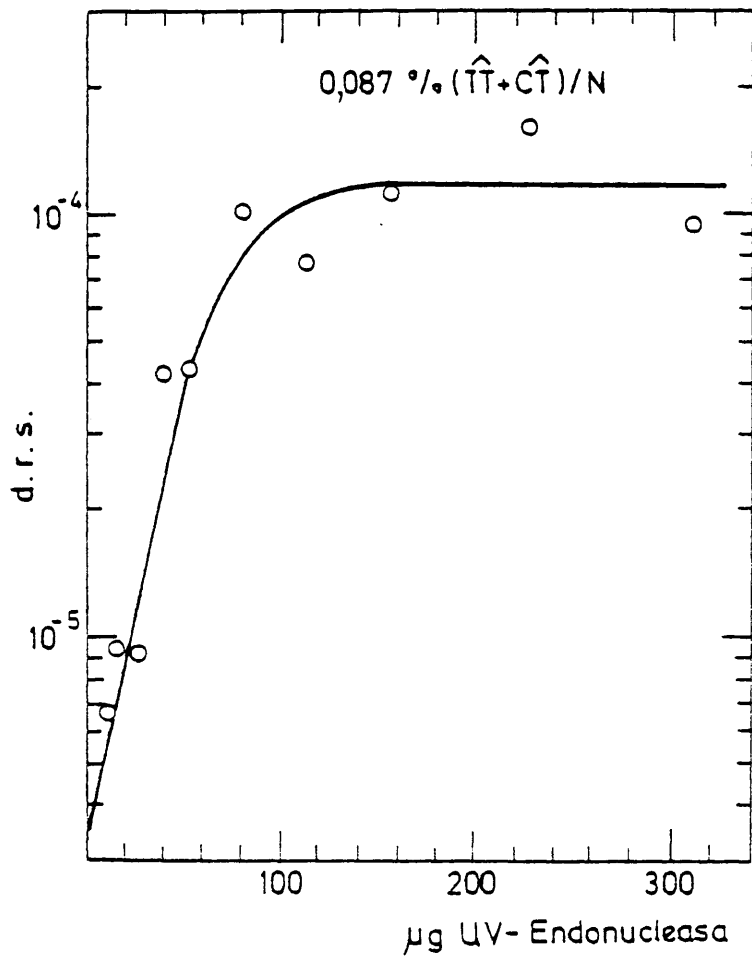
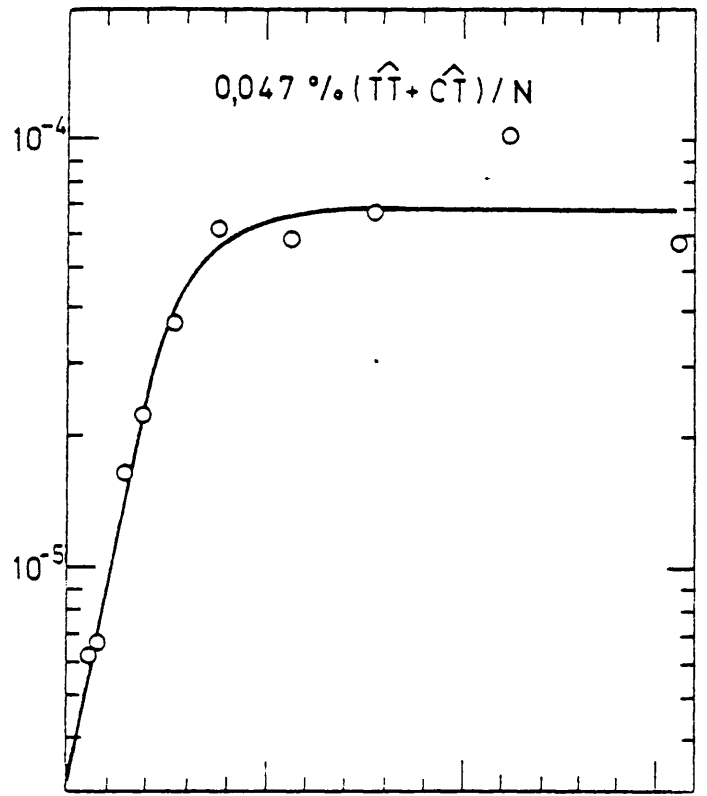
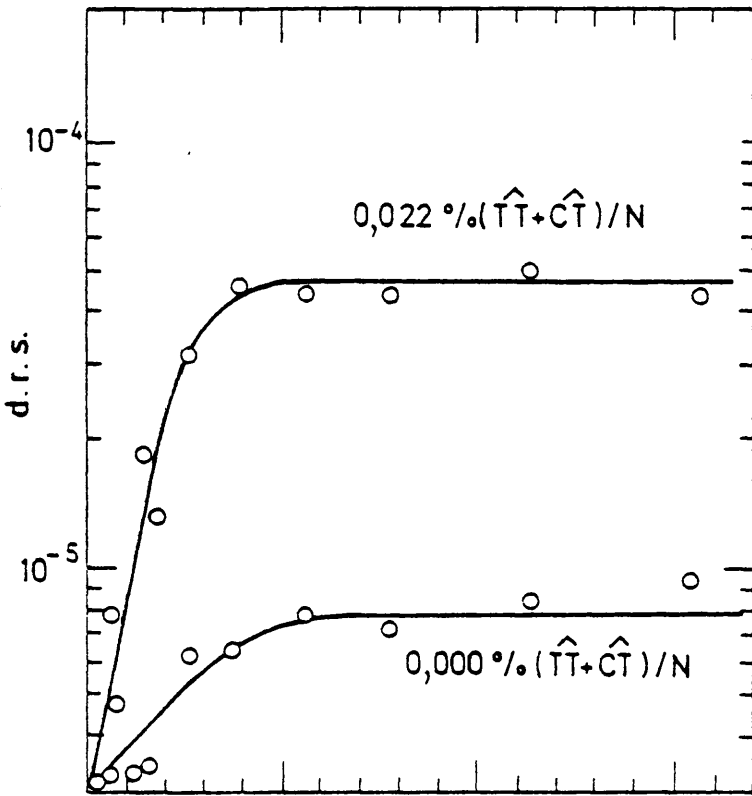


Fig. III-29.- Densidad de roturas simples producidas por la U.V.-Endonucleasa en función de la concentración de dímeros en DNA de SPP1

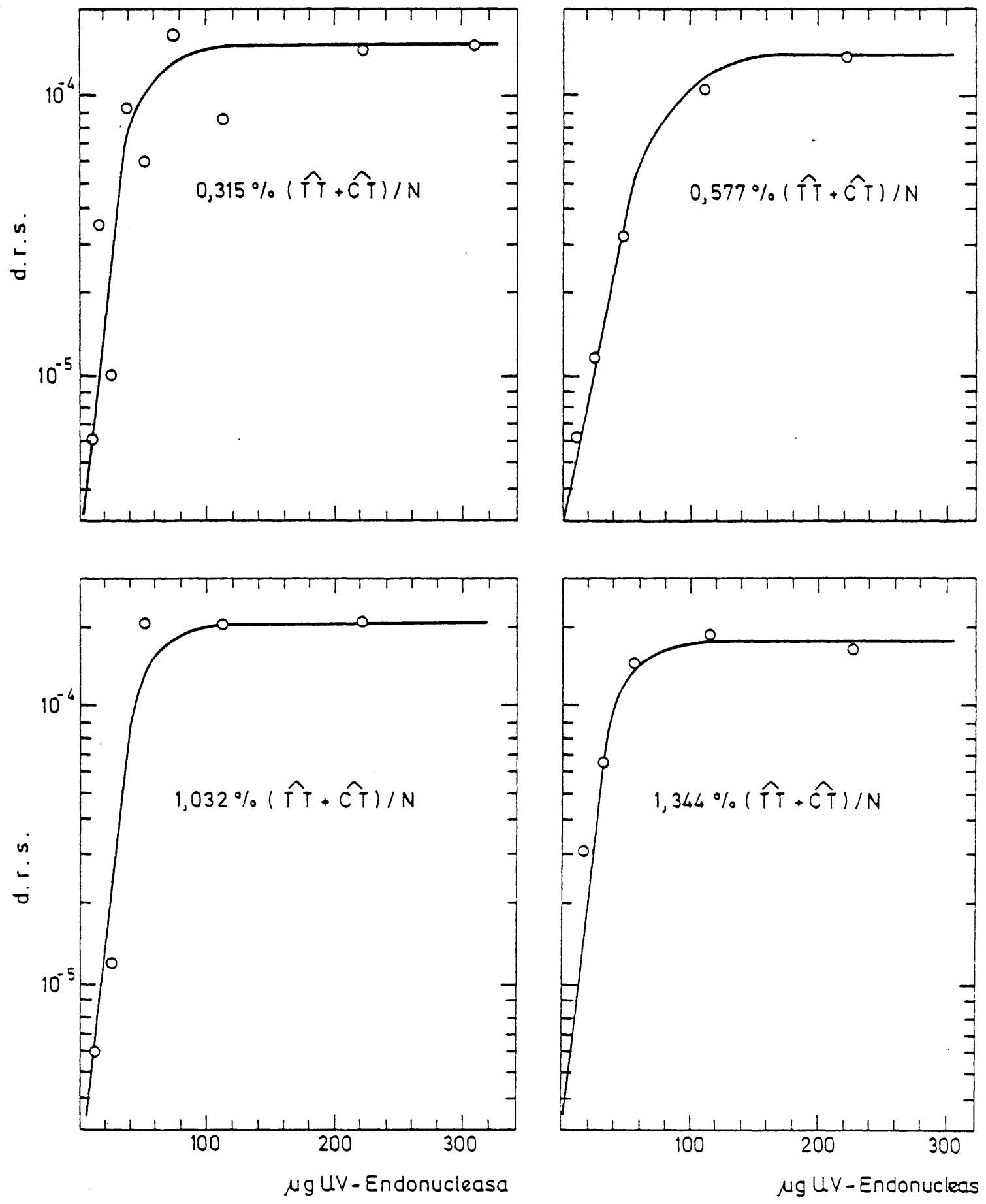


Fig. III-29

TABLA III-15.- ROTURAS SIMPLES PRODUCIDAS POR LA UV-ENDONUCLEASA A SATURACION EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE DIMEROS EN DNA DE SPPI

$\lambda = 254 \text{ nm}$ $E/m^2 \times 10^4$	$\hat{f}T/T$ (1)	$\hat{f}T/N$ (2)	$\mu\text{moles de } \hat{f}T$ (3)	$\hat{c}T/T$ (4)	$\hat{c}T/N$ (2)	$\mu\text{moles de } \hat{c}T$ (3)	$\mu\text{moles de } \hat{f}T + \hat{c}T$ (3)	$1/ s \times 10^3$	d.r.s.a Satura- ción ⁵ $\times 10^5$	$\hat{r}.s./N$ (5)	$\mu\text{moles de } \hat{r}.s.$ (3)	$1/V \times 10^3$	$\mu\text{moles de } \hat{r}.s./$ $\mu\text{moles de } \hat{f}T$	
0,57	0,053	0,015	18,1	0,025	0,007	8,5	26,6	37,59	46	0,046	0,041	49,2	20,32	1,84
0,57	0,053	0,015	18,1	0,025	0,007	8,5	26,6	37,59	49	0,049	0,044	52,8	18,93	1,98
1,14	0,107	0,030	36,6	0,050	0,014	17,1	53,7	18,62	67	0,067	0,062	74,4	13,44	1,38
1,28	0,120	0,034	41,0	0,056	0,016	19,1	60,1	16,64	70	0,070	0,065	78,0	12,82	1,29
2,29	0,212	0,060	72,5	0,097	0,027	33,2	105,7	9,46	109	0,109	0,104	124,8	8,01	1,18
2,29	0,212	0,060	72,5	0,097	0,027	33,2	105,7	9,46	120	0,120	0,115	138,0	7,24	1,30
3,44	0,314	0,089	107,3	0,142	0,040	48,6	155,9	6,41	96	0,096	0,091	109,2	9,15	0,70
4,58	0,413	0,117	141,2	0,183	0,052	62,6	245,6	4,07	191	0,191	0,191	229,2	4,36	0,93
9,16	0,785	0,223	268,4	0,325	0,093	111,1	379,5	2,64	168	0,168	0,163	195,6	5,11	0,51
9,16	0,785	0,223	268,4	0,325	0,093	111,1	379,5	2,64	165	0,165	0,160	192,0	5,20	0,50
19,47	1,490	0,424	509,6	0,537	0,153	183,6	693,2	1,44	165	0,165	0,160	192,0	5,20	0,28
51,55	2,860	0,815	978,1	0,764	0,217	261,3	1239,4	0,81	165	0,165	0,160	192,0	5,20	0,15
171,84	4,024	1,114	1376,2	0,809	0,230	276,7	1652,9	0,60	186	0,186	0,181	217,2	4,60	0,13

(1) Según la expresión $\ln(D^* - D) = \ln K P_0 / (K + r) - (K + r) \hat{L}$ donde para DNA-SPP1 a 254 nm $D^* = 4.10$ y $(K + r) = 232$ para $\hat{f}T$

(2) DNA-SPP1 $\%GC = 43$; $\%T = 28,5$; $(\hat{f}T/T) / (100/28,5) = \hat{f}T/N$

(3) En 1,0 ml de mezcla de reacción hay 0,5 ml x 75 $\mu\text{g DNA/ml} \times 1/309 \mu\text{moles}/\mu\text{g} = 0,12 \mu\text{moles}$; $\hat{f}T/N \times 0,12 \mu\text{moles}/100 \times 10^4 \mu\text{moles}/\mu\text{mol} = \hat{f}T/N \times 0,12 \times 10^4 \mu\text{moles de } \hat{f}T$

(4) Según la expresión $\ln(D^* - D) = \ln K P_0 / (K + r) - (K + r) \hat{L}$ donde para DNA de E coli a 254 nm $D^* = 0,81$ y $(K + r) = 560$ para $\hat{c}T$

(5) Restando a cada valor de $\hat{r}.s./N$ el del control sin $\hat{f}T$ cuadrar incubado en las mismas condiciones.

troducido el valor calculado para cada dosis en función del estudio previo de la formación de dímeros de $\overset{\wedge}{TT}$ realizada a 254 nm en DNA-H³ de SPPl y el valor calculado para cada dosis en función del estudio previo de la formación de dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$ a 254 nm realizado en DNA-H³ de E.coli. El error introducido al hacer esto, ya que no se dispone del estudio de la formación de dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$ para DNA de SPPl, produce una ligerísima subestimación del valor total de dímeros de $\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT}$, ya que aunque las secciones eficaces son presumiblemente muy parecidas para ambos DNAs (ver Tabla-III-6) el valor de saturación de dímeros es algo mayor en el DNA de SPPl. Sin embargo este nivel de dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$ es en cualquier caso mucho menor que el de $\overset{\wedge}{TT}$. Por último en ningún momento se ha incluido el valor de los dímeros de $\overset{\wedge}{CC}$ pues como ya ha quedado puesto de manifiesto en varias ocasiones, la marca introducida no permite computarlo y además la proporción de dímeros de $\overset{\wedge}{CC}$ es menor aún que la de los dímeros de $\overset{\wedge}{CT}$.

La representación de estos valores en la Fig-III-30 presenta una primera parte en la que existe una relación aproximadamente lineal de 1,1 entre roturas simples y dímeros de $(\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT})$ hasta alcanzar un valor equivalente a aproximadamente 0,5% de dímeros de $(\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT})$ respecto de Timina. Este valor es aproximadamente 2 veces menor que el valor obtenido por Kaplan et al (1969) y 4 veces menor que el obtenido por Nakayama et al (1970).

A partir de aquí el número de roturas simples es paulatinamente menor que el número de dímeros hasta que a partir de un 0,7 a un 0,8% de $(\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT})T$ - el número de roturas simples permanece constante hasta valores tan altos como del orden de un 4% de $(\overset{\wedge}{TT} + \overset{\wedge}{CT})/N$.

La relación entre el número de dímeros y el número de roturas simples introducidas tiende hacia 6 a 8 valor semejante al determinado por Shafranovskaya et al (1973) para las zonas de acumulación de dímeros, obtenido por medio de estudios cinéticos con formaldehído.

En la Fig-III-31 se ha calculado la constante de Michaelis de la U.V. Endonucleasa pero teniendo en cuenta de que al contrario de lo que hace Kushner et al (1971a) no se ha considerado como aumento de la concentración de substrato el aumento de la concentración de DNA con la misma cantidad de dímeros por molécula, sino que lo que hemos aumentado es la concentración de dímeros en el DNA que son en definitiva el substrato de la enzima. Así el valor que se obtiene es dos órdenes de magnitud mayor al obtenido por estos autores.

En la Tabla-III-16 se reflejan los valores obtenidos en el estudio de sedimentación del DNA de SPPl nativo tras irradiación a diferentes dosis -

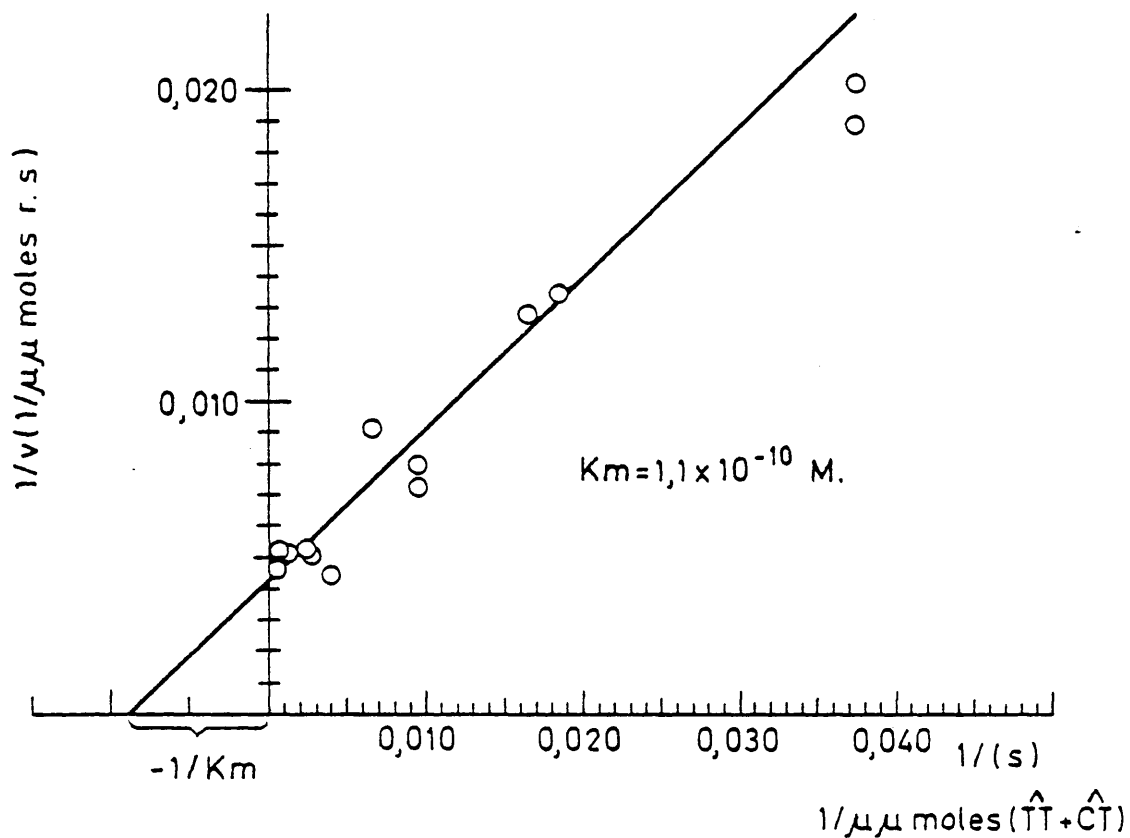


Fig. III-31.- Constante de Michaelis de la U.V. - Endonucleasa.

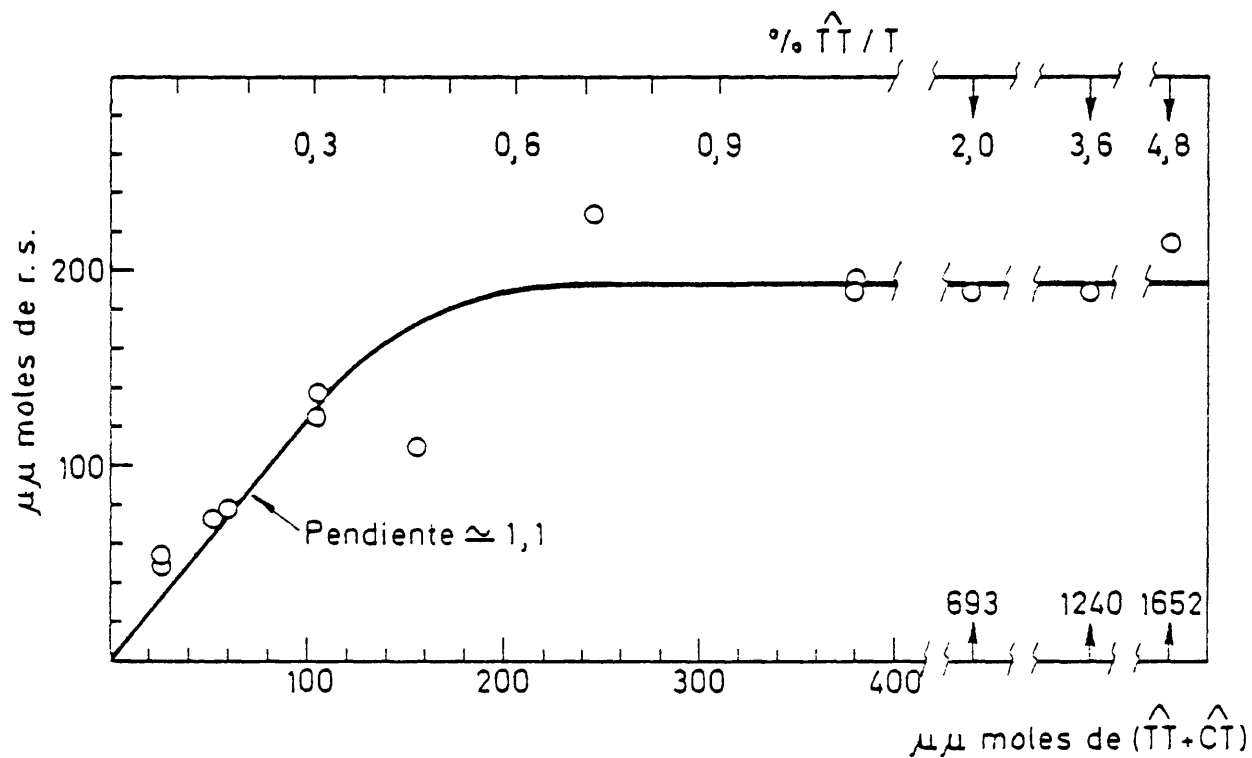


Fig. III-30.- Roturas simples producidas por la U.V. - Endonucleasa en función de la concentración de dímeros en el DNA

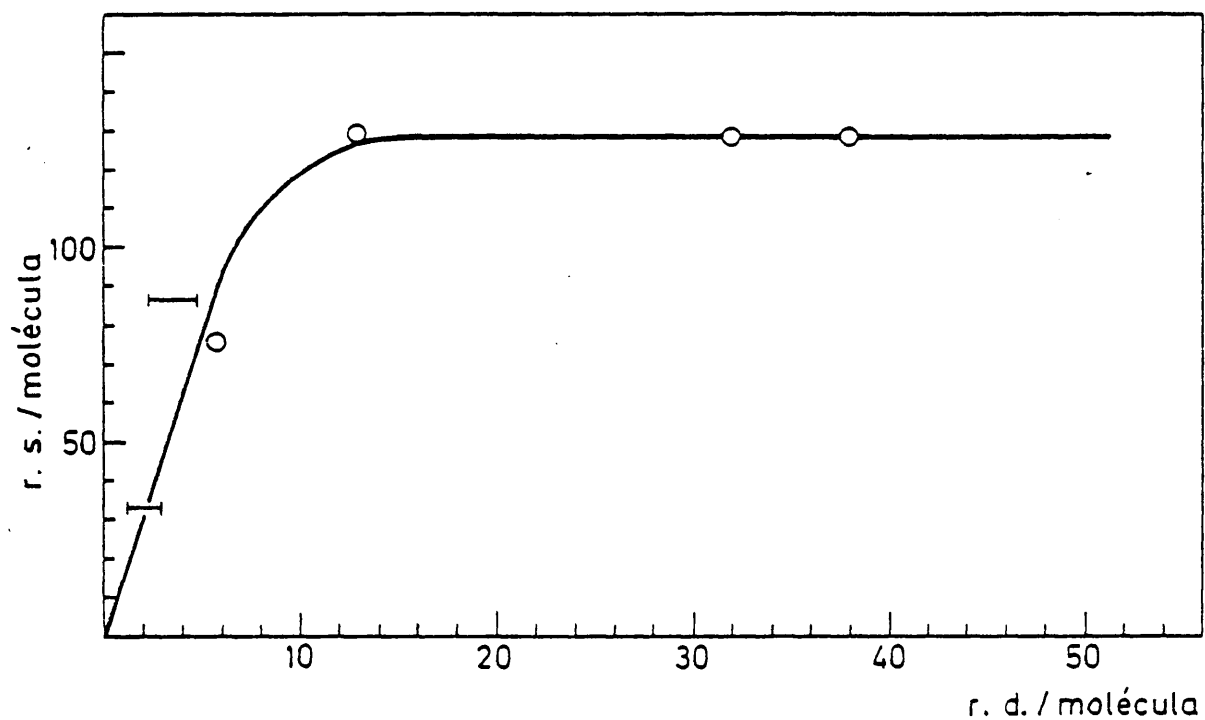


Fig. III-32.- Roturas dobles en función de roturas simples.

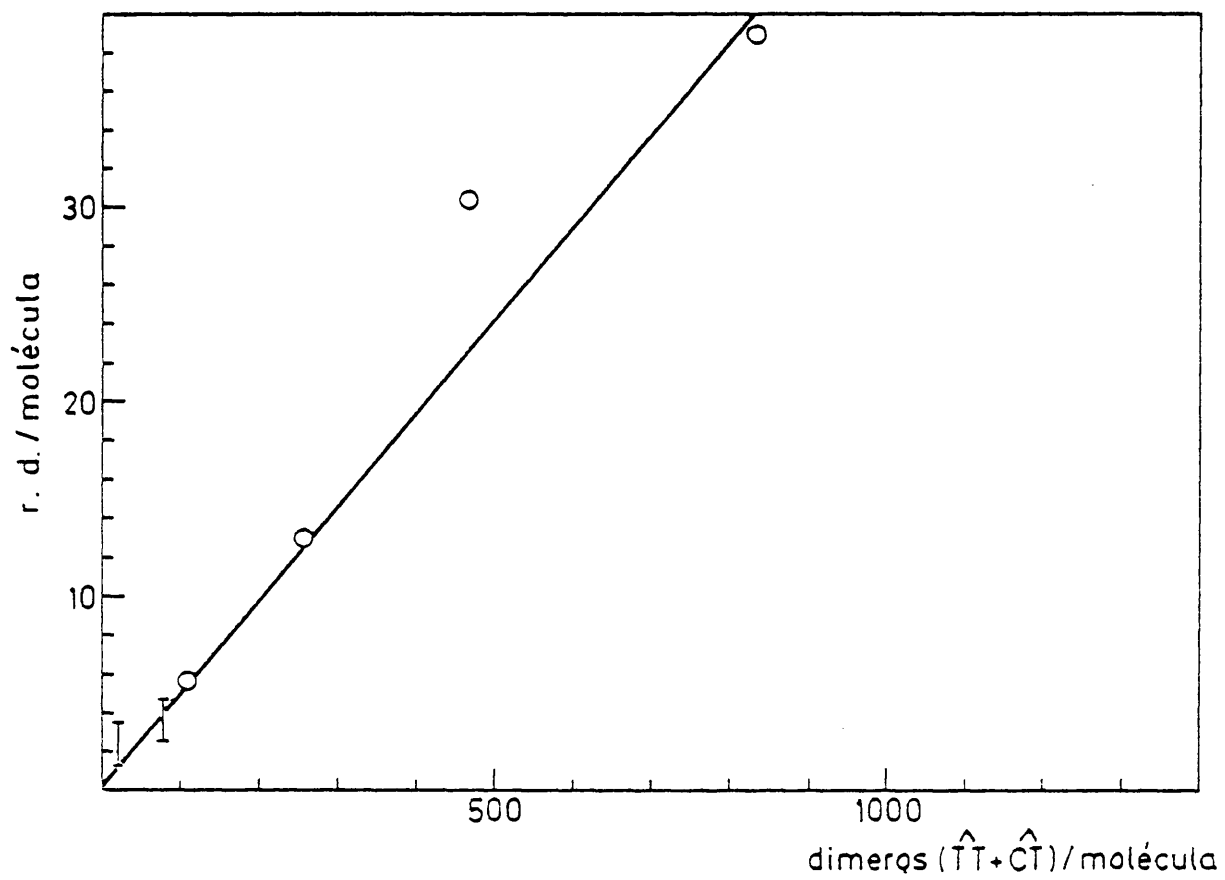


Fig. III-33.- Roturas dobles en función de dimeros

y tratamientos a saturación de roturas simples con U.V.-Endonucleasa. Como se observa el DNA nativo se degrada en función de las roturas simples introducidas por la U.V.-Endonucleasa. Tras el cálculo del número de dímeros por molécula de DNA de SPPI, del número de roturas simples por molécula y del número de roturas dobles por molécula, en la Fig-III-32 se observa como a pesar de no incrementarse el número de roturas simples por molécula a partir de ciertas dosis, por la acción de la U.V.-Endonucleasa, la presencia de un mayor número de dímeros hace que el número de roturas dobles continúe aumentando. La responsabilidad de esta desestabilización hacia la presencia de un número creciente de dímeros queda clara en la Fig-III-33 donde se observa que el número de roturas dobles en el DNA saturado de roturas simples con U.V.-Endonucleasa crece linealmente con el número de dímeros. En definitiva pues el acumulo de dímeros en regiones concretas de la molécula de DNA le hace más inestable a la rotura doble por la presencia de roturas simples con U.V.-Endonucleasa, es decir muy próximas a la región de dímeros.

La evaluación y cuantización de esta perturbación en función de la concentración de dímeros será objeto de estudio en el futuro en el Grupo de Biofísica. La U.V.-Endonucleasa, y su modo de acción, cobra especial importancia, no sólomente ya desde el punto de vista estrictamente biológico, (no olvidemos que una rotura doble en el DNA es siempre un efecto letal para la célula), sino también como una poderosa herramienta de trabajo para conocer la estructura del DNA irradiado con luz U.V.

Existe cierta controversia en los resultados experimentales en cuanto a la naturaleza de la incisión producida por las enzimas de reconocimiento de las lesiones U.V. en DNA. En concreto en la incisión producida en el reconocimiento de los dímeros de pirimidina del tipo ciclobutano cis-sin, en el mecanismo de reparación por escisión-resíntesis. A pesar de que en los últimos años han sido detectadas actividades de este tipo en numerosos organismos vivos, y aisladas enzimas que muestran esta actividad, a las que genericamente se les ha denominado, Correndonucleasas, y a las que se les asigna la acción de reconocimiento y producción de una rotura simple del tipo 3'OH 5'P en el lado 5' del dímero; las experiencias de Kushner, Kaplan y Grossman (1969-1971) en las que se concluye que la rotura simple producida por la U.V.-Endonucleasa de *M.luteus* es del tipo 3'P 5'OH al lado 5' del dímero no han encontrado aún contrapartida. Es más, incluso se ha purificado y estudiado una Endonucleasa de reparación, en mamíferos, en la que se ha podido demostrar al parecer inequívocamente, que produce roturas simples del tipo de las 3'P 5'OH en expe

Roturas dobles (r.d.) producidas por roturas simples a saturación en función de la cantidad de dímeros

$\lambda = 254\text{nm}$ $\bar{L} = E/m^2 \times 10^4$	dímeros por molec. (1)	r.s. por molec. (1)	S_{20}^{50} nativo a sa- turación de (2)	P.M. 50% $\times 10^{-6}$ (2)	P.M.m.n. $\times 10^{-6}$ (3)	roturas dobles por molé- cula (4)	dim./molec r.d./molec	r.s./molec r.d./molec
0,00	0,00	6,00	$32,7 \pm 0,6$	25,5	25,5	0,00	--	--
0,57	18,0	34,0	$23,2 \pm 1,2$	11,0	6,50	1,30	13,3-6,10	25,5-11,7
2,30	70,0	89,0	$20,1 \pm 0,5$	7,60	4,50	2,40	29,7-15,0	37,5-19,1
3,40	104	74,0	$19,0 \pm 1,1$	6,20	3,70	5,80	17,9	12,6
9,10	254	130	$14,0 \pm 1,5$	3,00	1,80	13,1	19,5	9,90
19,0	466	130	$11,0 \pm 1,1$	1,30	0,77	32,1	14,50	4,00
51,0	834	130	$10,0 \pm 0,4$	1,10	0,64	38,8	21,5	3,30

(1).- Teniendo en cuenta que el DNA de SPP1 es un DNA homogéneo de 25×10^6 d..

(2).- Según la expresión: $\log P.M.50\% = (1,819 + \log(S_{20}^{50} - 2,7)) / 0.445$. Crothers and Zimm (1965).

(3).- Según la expresión: $P.M.m.n. = 0,596 P.M.50\%$. Esta expresión es válida a partir de cuatro roturas por molécula de DNA homogéneo, por eso se ha calculado el número de roturas dobles para el segundo y tercer caso con ambos valores de P.M.50% y P.M.m.n.. Para un DNA perfectamente homogéneo como es el caso del DNA control el valor del P.M.50% coincide con el del P.M.m.n..

(4).- Según la expresión: $(P.M.m.n. \text{ control} / P.M.m.n.)_i - 1 = \text{rotura doble/molécula}$.

riencias en las que se estudia la liberación de DNA como ácido soluble por la acción consecutiva de la Endonucleasa de reparación y la actividad exonucleasica de la DNA-Polimerasa. La liberación de las zonas lesionadas se realiza solamente si al DNA tratado con la Endonucleasa de reparación se le trata con la enzima Fosfatasa alcalina antes del tratamiento con la DNA-Polimerasa. (Lancker and Tomura, 1974).

A partir de preparaciones de U.V.-Endonucleasa de *M.luteus*, Fracción Fosfocelulosa concentrada 10 veces purificadas por nosotros mismos, y de DNA-Polimerasa de *E.coli* comercial, hemos intentado comprobar la eficacia de ambas enzimas en el reconocimiento y liberación de los dímeros de pirimidina inducidos por las radiaciones U.V.. Lo que estaría indicando la presencia de roturas simples 3'OH 5'P inducidas por la U.V.-Endonucleasa.

En la Tabla-III-17, se presentan los resultados obtenidos, así como una descripción de las condiciones de trabajo en estas experiencias. En esencia se trata de determinaciones de DNA-³H en forma de ácido soluble, tras el tratamiento del DNA-³H irradiado o no, con las enzimas U.V.-Endonucleasa, ó DNA-Polimerasa por separado, ó tras el tratamiento del DNA con ambas consecutivamente. Como se observa en los resultados, se puede afirmar que existe una contaminación exonucleasica en la preparación de la U.V.-Endonucleasa utilizada, por cuanto se observa un incremento significativo en la cantidad de ácido soluble liberado tras el tratamiento del DNA irradiado ó no con la enzima. - (Columna 2). Esta actividad es, sin embargo, indistinguible de la actividad exonucleasica propia de la DNA-Polimerasa, actuando sobre roturas simples que posee ya de partida el DNA y que produce, en algunos casos, incrementos de hasta 10 veces en el ácido soluble que en el control.

De cualquier forma resulta evidente el aumento de ácido soluble cuando actúan ambas conjuntamente, y por supuesto el reconocimiento de los dímeros pues esta liberación de ácido soluble es mucho mayor en el DNA irradiado que en el DNA sin irradiar. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que las roturas simples producidas por la U.V.-Endonucleasa son en su mayor parte roturas simples del tipo 3'OH 5'P, pues de lo contrario no serían reconocidas como molde por la DNA-Polimerasa.

Se realizó entonces una experiencia (Experiencia 6) con una preparación de DNA-³H recientemente aislado habiendo puesto en su aislamiento especial énfasis, para evitar en lo posible la presencia de roturas simples de partida. Con esta preparación se consiguió rebajar cuatro veces la cantidad de ácido soluble que se obtiene por el tratamiento del DNA con la DNA-Polimerasa sola, lo

% DNA como ácido soluble*	Sin enzimas		U.V.-Endonucleasa		DNA-Polimerasa		U.V.-En. + DNA-Pol.	
	DNA- ³ H	DNA- ³ H-PiPi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-PiPi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-PiPi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-PiPi
Experiencia 1	0,29	0,52	--	1,15	--	3,44	10,24	15,13
Experiencia 2	0,20	0,23	2,53	3,15	--	2,76	11,50	24,44
Experiencia 3	0,20	0,23	4,50	7,60	--	2,76	14,70	24,56
Experiencia 4	0,32	0,32	--	2,72	--	2,88	14,97	23,06
Experiencia 5	0,29	0,52	--	3,91	--	3,44	12,02	22,09

*.- DNA-³H irradiado con 0,006 E/m² a 254 nm a 75 µg/ml. en TRIS-HCl 0,005 M pH=8.0, lo que proporciona aproximadamente un 6% de c.p.m. de (TT+CT) respecto de c.p.m. totales de timina; y DNA-³H sin irradiar, se tratan sin enzimas o con U.V.-Endonucleasa durante 30' a 37°C. Alicuotas de estas muestras se precipitan en frío con ácido perclórico a una concentración final de 0,5 M, añadiendo DNA de E.coli como precipitante. Se filtran en millipore de 0,45 µ y se cuentan los filtrados. A otras muestras de 100 µl de DNA-³H irradiado y sin irradiar se les añade 10 µl de β-mercapto-etanol 5 mM, 10 µl de dXTP 0,4 mM, y DNA-Polimerasa, aproximadamente 4 unidades; después se incuba a 37°C durante 45'. Se precipita en frío con ácido perclórico a una concentración final de 0,5 M, filtración y contaje de los filtrados. Por último, muestras de DNA-³H irradiado y sin irradiar se someten sucesivamente a ambos tratamientos: 30' a 37°C con U.V.-Endonucleasa, añadir β-mercapto-etanol, cloruro magnésico, trifosfatos, 45' a 37°C con DNA-Polimerasa, enfriar, precipitar, filtrar y contar los filtrados.

TABLA-III-18-

% DNA ácido soluble**	Sin enzimas		U.V.-Endonucleasa		DNA-Polimerasa		-En. + DNA-Pol.	
	DNA- ³ H	DNA- ³ H-Pi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-Pi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-Pi	DNA- ³ H	DNA- ³ H-Pi
Experiencia 6	0,29	0,31	--	--	0,74	0,70	1,37	16,70
Experiencia 6 % PiPi en la fracción solu <u>ble</u> en ácido	0,00	1,12	--	--	--	--	0,00	21,90
Experiencia 6 % PiPi en la fracción inso <u>luble</u> en ácido	0,00	6,11	--	6,10	--	--	--	5,50

**.- La marcha experimental es la misma que la detallada en la TABLA-III-17- pero además partes alicuotas de la fracción ácido-soluble así como la fracción insoluble en ácido, es decir el DNA macromolecular no escindido, se procesaron según el metodo ya descrito de determinación de dímeros de pirimidina por hidrolisis ácida y cromatografía en papel en el apartado II-5-7. La única diferencia de esta experiencia con las anteriores procede del DNA-³H utilizado, pues se puso especial cuidado en su aislamiento y purificación; Ver explicaciones en el texto.

que se tradujo en una liberación mucho más específica de dímeros en el tratamiento simultáneo con ambas enzimas, U.V.-Endonucleasa y DNA-Polimerasa. Y algo que es también muy importante, la desaparición del ataque exonucleasico sobre el DNA irradiado, lo que parece indicar la importancia de las roturas simples iniciales en el DNA tienen para el buen funcionamiento del reconocimiento y liberación de dímeros. Pudiendo incluso haber sido la causa de los altos valores de ácido soluble observados en el DNA no irradiado y tratado con ambas enzimas, y no la falta de especificidad de las preparaciones de U.V.-Endonucleasa utilizadas.

Por último y en esta misma experiencia se determinaron la cantidad de dímeros liberados en el DNA así como la proporción de ellos liberada como ácido soluble. Como se detalla en la Tabla-III-18 de un 6,10% de dímeros en el DNA irradiado se pasa a un 5,5% tras la actuación de ambas enzimas, mientras que en la fracción ácido soluble se pasa de 1% de fondo en el caso de ningún tratamiento enzimático a la presencia de un 21,9% de dímeros en la fracción ácido soluble liberada por la actuación de ambas enzimas.

CONCLUSIONES.Efectos Primarios:

- En las condiciones de irradiación utilizadas, (soluciones de DNA en 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato sódico, en ausencia de oxígeno y en atmósfera saturada de nitrógeno) la radiación U.V. entre 240 y 300 nm, no produce roturas simples intracadena en el DNA, detectables por análisis de sedimentación en ultracentrifuga analítica. En todo caso el número de roturas simples producidas es siempre inferior a 0,1-0,9 por cada 10^5 nucleotidos y por cada 10^6 ergios/mm².

- El efecto primario más relevante ha sido la producción de dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano entre pirimidinas contiguas en la misma cadena.

- Se han calculado las secciones eficaces del proceso total de formación de dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ y de $\hat{C}\hat{T}$ ajustando los resultados experimentales de porcentaje de dímeros respecto de timina y dosis al modelo propuesto en la introducción de la memoria:

$$D = kPo / (k+r) (1 - e^{-(k+r)L})$$

Este cálculo se realizó para cinco longitudes de onda del espectro U.V. en DNA de E.coli, en cuatro longitudes de onda para el dímero de TT en DNA de SPPI, en tres para el dímero de $\hat{T}\hat{T}$ en DNA de B.subtilis y B.cereus:

λ nm	DNA-E.coli Sec.Ef. $\hat{C}\hat{T}$ $n_{\hat{C}\hat{T}} = \frac{2}{m}(k+r)$	DNA-E.coli Sec.Ef. $\hat{T}\hat{T}$ $n_{\hat{T}\hat{T}} = \frac{2}{m}(k+r)$	DNA-SPPI Sec.Ef. $\hat{T}\hat{T}$ $n_{\hat{T}\hat{T}} = \frac{2}{m}(k+r)$	DNA-B.Cereus Sec.Ef. $\hat{T}\hat{T}$ $n_{\hat{T}\hat{T}} = \frac{2}{m}(k+r)$	DNA-B.subt. Sec.Ef. $\hat{T}\hat{T}$ $n_{\hat{T}\hat{T}} = \frac{2}{m}(k+r)$
300 ⁺¹⁰	20,0 ^{+2,3}	6,3 ^{+0,1}	5,6 ^{+0,5}	11,1 ^{+0,5}	12,5 ^{+1,2}
280 ⁺¹⁰	145 ⁺¹⁶	37,0 ^{+1,4}	58,0 ^{+5,2}	43,0 ^{+3,9}	41,6 ^{+3,1}
260 ⁻¹⁰	810 ⁺¹⁷⁰	190 ⁺²⁰	230 ⁺²⁰	---	---
254	561 ^{+1,1}	215,0 ^{+7,5}	230 ⁺²³	140 ⁺¹³	90 ⁺¹²
240 ⁻¹⁰	420 ⁻⁹⁷	227 ⁻²⁴	---	---	---

- Se han calculado las secciones eficaces de dimerización y monomerización para los dímeros de $\hat{T}\hat{T}$ y de $\hat{C}\hat{T}$ para cinco longitudes de onda del espectro U.V. en DNA de E.coli así como los rendimientos cuánticos de dimerización, utilizando las secciones eficaces de absorción del DNA y de la timina, ya que para ambos dímeros el espectro de acción de dimerización identifica al DNA o a la ti

mina, no a la citosina, como molécula responsable de la absorción del fotón U.V. y de la posterior reacción fotoquímica. El alto valor del rendimiento - cuántico de dimerización a 300 ± 10 nm cuando se utiliza para el cálculo la sección eficaz de absorción de la timina con respecto al obtenido cuando se utiliza la sección eficaz del DNA, más semejante a los obtenidos a otras longitudes de onda, pone de manifiesto la importancia que los mecanismos de transferencia de energía desde otras bases del DNA a la timina tienen en el proceso.

λ_{nm}	Sec. Ef. de monomeriza. $r\hat{T}_2$ m	Sec. Ef. de dimerización $k\hat{T}_2$ m	Rendimiento cuántico de dimerización con: $\sqrt{a_{DNA}} \times 10^3$	Rendimiento cuántico de dimerización con: $\sqrt{a_T} \times 10^3$
300 ± 10	$4,9 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,5$	$39,0 \pm 5,0$
280 ± 10	$28 \pm 1,8$	$8,9 \pm 0,6$	$11,0 \pm 0,7$	$9,8 \pm 0,7$
260 ± 10	170 ± 18	$19,0 \pm 2,2$	$14,0 \pm 1,6$	$11,0 \pm 1,2$
254	190 ± 12	$26,0 \pm 1,6$	$18,4 \pm 1,3$	$17,0 \pm 1,2$
240 ± 10	220 ± 26	$6,1 \pm 0,7$	$6,6 \pm 0,8$	$9,8 \pm 1,1$

λ_{nm}	Sec. Ef. de monomeriza. $r\hat{CT}_2$ m	Sec. Ef. de dimerización $k\hat{CT}_2$ m	Rendimiento cuántico de dimerización con: $\sqrt{a_{DNA}} \times 10^3$	Rendimiento cuántico de dimerización con: $\sqrt{a_T} \times 10^3$
300 ± 10	$18 \pm 2,6$	$1,9 \pm 0,3$	$20,0 \pm 2,6$	$51,0 \pm 6,8$
280 ± 10	135 ± 17	$10,0 \pm 1,2$	$12,0 \pm 1,5$	$11,0 \pm 1,3$
260 ± 10	780 ± 190	$26,0 \pm 6,5$	$18,0 \pm 4,7$	$15,0 \pm 3,7$
254	540 ± 30	$20,0 \pm 1,1$	$14,0 \pm 0,9$	$13,2 \pm 0,8$
240 ± 10	410 ± 40	$7,4 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,8$	$10,0 \pm 1,0$

Repercusiones estructurales de la presencia de los dímeros en el DNA

- La presencia de los dímeros de pirimidina en el DNA produce una desestabilización de la estructura doble helicoidal frente a la temperatura. Mediante estudios de transición térmica se ha podido medir la variación de la temperatura media de la transición (ΔT_m) en función del porcentaje de dímeros, para diversas longitudes de onda y para DNAs de diferente composición en bases: DNA de E.coli, 51% de GC, DNA de SPPl, 43% de GC y DNA de B. cereus, 35% de GC. Con el margen de error de los resultados experimentales, no se puede afirmar que la variación de la T_m en función del porcentaje de dímeros dependa ni de la longitud de onda ni del contenido en GC entre 51 y 35%. Además la relación entre ambos parámetros, porcentaje de dímeros y variación de la T_m , es lineal. El ajuste de todas las determinaciones realizadas en todos los DNAs a una recta rinden una pendiente de $1,383(\hat{T} + \hat{C}T) / ^\circ C T_m$, con un resto cuadrático medio de $0,729^\circ C$.

Esta correlación empírica permite, de una parte, calcular el porcenta

je de dímeros en DNAs no marcados isotópicamente, y de otra al compararla con la expresión que liga la T_m con el contenido en GC hacerse una idea de la perturbación introducida en el DNA por la presencia de los dímeros. Así la presencia de 1 dímero cada 100 nucleótidos en el DNA produce una perturbación en su comportamiento térmico equivalente numéricamente a la que supone una disminución del 4,38 a 6,13% en el contenido en GC. Si esta variación se pudiese interpretar desde un punto de vista de estabilidad estructural sólo en términos de la interacción de enlaces de hidrógeno, entonces, la presencia de un dímero cada 100 nucleótidos supondría la pérdida de 4 a 6 enlaces de hidrógeno.

- En condiciones de irradiación que garantizan la ausencia de roturas simples producidas por la irradiación con luz U.V., la presencia de los dímeros de pirimidina, no produce ningún cambio en las propiedades hidrodinámicas del DNA en solución, observable por estudios viscosimétricos o electroforéticos para DNAs irradiados hasta conseguir un 7,6% de dímeros de ($\hat{T}\hat{T}+\hat{C}\hat{T}$) respecto de T y para DNAs de pesos moleculares entre 1 y 40×10^6 d.

- En las condiciones de irradiación empleadas se puede estudiar el efecto de la presencia de los dímeros en los espectros de dicroísmo circular (DC) sin la confusión aportada por la presencia de roturas simples, cuyo efecto es contrario al de los dímeros.

La evolución de los espectros del DNA en función de la dosis U.V. - no es hacia una desnaturación, sino que es un fenómeno distinto, ya que no aparece la subida del valor de la elipticidad molar positiva del segundo efecto Cotton, característico de las desnaturaciones, además de que los DNAs con dímeros de pirimidina desnaturan normalmente aunque cambie su T_m pero apenas lo haga su efecto hipercrómico.

En el DNA irradiado con luz U.V. se observa un cambio de la relación Ψ_{CD+}/Ψ_{CD-} al aumentar la proporción de dímeros hasta aproximadamente un 2% de dímeros de pirimidina respecto de nucleótidos totales en el DNA. Alcanzado este nivel, este valor se mantiene aunque aumentemos la proporción de dímeros en el DNA al doble. Además, este efecto no es el mismo que el observado en la debilitación de la estructura del DNA frente a la temperatura media por la variación de la T_m pues esta varía continuamente con la proporción de dímeros, aunque ambos efectos estén producidos por la misma causa: la presencia de dímeros de pirimidina en el DNA.

Repercusiones biológicas de la presencia de los dímeros en el DNA

- Se ha realizado un espectro de acción por medida de la pérdida de

la capacidad transformante de DNA de *B. subtilis* OG-2(u.v.r.⁻) irradiado a diversas dosis a cuatro longitudes de onda del espectro U.V., en células de *B. subtilis* 2G-9(u.v.r.⁻ Tir⁻ Trp⁻). El espectro de acción conseguido es congruente con el espectro de acción encontrado para el proceso de dimerización por determinación química de dímeros de pirimidina.

La pérdida de la capacidad transformante depende exclusivamente del porcentaje de dímeros obtenido y en este, extraordinariamente sensible, sistema de transformación, incapaz de realizar la reparación por escisión-re-síntesis, se produce la pérdida de más del 90% de la capacidad transformante a partir de un 0,2% de dímeros de pirimidina respecto de timina; niveles por encima del 0,5 al 1% de dímeros carecen ya de cualquier significado biológico.

- El reconocimiento de los dímeros de pirimidina por la enzima U.V. Endonucleasa es extraordinariamente eficaz por debajo del orden de 0,5% de $(TT+CT)/T$ en DNA de SPPI, produciéndose una rotura simple por cada dímero. A valores superiores de dímeros el número de roturas simples por dímero de crece, tendiendo hacia valores semejantes a los valores acumulos de dímeros determinados por estudios cinéticos con formaldehído.

Un aspecto muy importante puesto de manifiesto en el estudio de la acción de la U.V.-Endonucleasa es que la probabilidad de rotura doble del DNA aumenta, para una misma cantidad de roturas simples, con la cantidad de dímeros.

Por último resaltar que con los niveles de purificación conseguidos por nosotros en el aislamiento de la U.V.-Endonucleasa, las roturas simples introducidas por la U.V.-Endonucleasa son reconocidas eficazmente por la DNA-Polimerasa-I de *E. coli* para la escisión selectiva de los dímeros de pirimidina.

Estas experiencias con ambas enzimas sientan las bases iniciales para el estudio "in vitro" del mecanismo de reparación por escisión y resíntesis que nos proponemos llevar a cabo en un futuro próximo desde tres vertientes: mediante estudios físico-químicos y estructurales del DNA alterado con radiación U.V. y tratado con las enzimas de reparación implicadas en este mecanismo, mediante estudios cinéticos de reconocimiento, y liberación de los dímeros de pirimidina y mediante estudios de transformación para la medida de la recuperación de la información dañada en el DNA.

BIBLIOGRAFIA

- AAIG, C. and BORST, P. *Biochem. Biophys. Acta.* 269(1972)192
- ACUÑA, M. I.; MINGOT, F. and DAVILA, C. A. Report. J. E. N. nº327(1976)
Junta de Energía Nuclear. Madrid.
- ADAMS, M. H.; En "Bacteriophages" (1959). Interscience Publishers.
Inc. New York.
- ALEXANDER, P. and MOROSON, H. *Nature* 185(1960)678
- ANRAKU, N. and LEHRMAN, I. B.; *J. molec. Biol.* 46(1969)467-479
- BACHETTI, S.; VANDERPLAS, A. and VELDHUISEN, G.; *Biochem. biophys. Res. Commun.* 48(1972)662-669.
- BAGCHI, B.; BASU, S.; MISRA, D. N.; DAS GUPTA, N. N.; *Int. J. Radiat. Biol.*
vol 16 nº4 (1969)301-310
- BENDICH, A.; Methods for characterization of nucleic acids by base
composition. En "Method in Enzimology" Vol III (1957)715. Edited
by S. P. Colowick and O. K. Nathan. Academic Press. New York & London.
- BERESTETSKAYA, I. V.; KOSAGANOV, Yu. N.; LAZURKIN, Yu. S.; TRIFONOV, E.
N.; FRANK-KAMENETSKI, D. M.; *Mol. Biol.* 4(1970)137
- BERKNER, L. V. & MARSHALL, L. C.; *J. Atmos. Sci.* 22(1965)225-261
- BILLEN, D.; HEWITT, R. R.; LAPHISTOPHON, T.; and ACHEY, P. M.; *J. Bacteriol*
94(1967)1538-45
- BISHOP, D. H.; CAYBROOK, J. R. and SPIEGELMAN, S.; *J. Mol. Biol.* 26(1967)373
- BISHOP, M. J.; LOHRMANN, R.; and ORGEL, L. E. *Nature. Lond.* 237(1972)162-64
- BLANCO, M and DEVORET, R.; *Mutat. Res.* 17(1973)293-305
- BOYCE, R. P.; and HOWARD-FLANDERS, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 51(1964)
293-300
- BOYLE, J. M.; PATTERSON, M. C.; and SETLOW, R. B.; *Nature* 226(1970)708-710
- BRACKETT, F. P. Jr and FORBES, G. S.; *J. Amer. Chem. Soc.* 1933
- BUGGS, C. E.; THOMAS, J. M.; SUNDARALIJAM, m.; and RAO, S. T.; *Biopolimers*
10(1961) 175-219

- BUHL, S.N.; SETLOW, R.B.; and REAGAN, J.D.; *Int. J. Radiat. Biol.* 22 (1972) 417-424
- BURTON, K.; *Biochem. J.* 62 (1956) 315-326.
- CALVERT, J.G. and RECHEN, H.J.L.; *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 2101
- CALVIN, M.; En "Chemical Evolution" Clarendon Press, Oxford, 1959
- CHANG, S.; FLORES, J.; and PONNAMPERUMA, C.; *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.* 64 (1971) 1011
- CLEAVER, J.E.; *Int. J. Radiat. Biol.* 18 (1970) 166-169.
- CORDONE, R.; and RADMAN, M.; *Virology* 41 (1970) 166-169
- COOPER, P.K.; HANAWALT, P.C.; *Proc. ntn. Acad. Sci. U.S.A.* 58 (1972) 1156-60
- CREMONESE, M.; *Biophys. J.* 8 (1968) 153
- CROTHERS, D.M. and ZIMM, B.H.; *J. Mol. Biol.* 12 (1965) 525-536
- CZECALA de, A.; LUK, D. and BARTL, P.; *App. Microbiol.* 23 (1972) 791.
- DAVIDSON, P.F. and FREIFELDER, D.; *J. Mol. Biol.* 8 (1964) 1-10
- DAVILA, C.A.; "Naturaleza Molecular del Fenómeno Radiobiológico". *Energía Nuclear* 14 (1970) 31-39 .
- DEAN, C.; and PAULING, C.; *J. Bacteriol.* 102 (1970) 588-589.
- DEERING and SETLOW. *Biochem. Biophys. Acta* 41 (1960) 550.
- DE LUCIA, P.; CAIRNS, J.; *Nature* 224 (1969) 1164-1166.
- DEVORET, R et al.; En "Molecular mechanisms for Repair of DNA". Vol. A 1975. Edited by: Philip C. Hanawalt and Richard B. Setlow. Plenum Press New York and London.
- DIAZ PEÑA, M.; ROIG MUNTANER, A.; "Química Física". Vol I. Alhambra. 1972. Madrid.
- DISHE, Z.; *Microchemie* 8 (1930) 4
- DOUDNEY, D.O.; En "Molecular Mechanisms for repair of DNA". Vol. A 1975. Edited by: Philip C. Hanawalt and Richard B. Setlow. Plenum Press New York & London.
- EDENBERG, H.; and HANAWALT, P.; *Biochem. Biophys. Acta* 272 (1972) 361-372

- ELSWORTH, R.; MILLER, G.A.; WHITAKAR, A.R.; KITCHING, D.; and SAYER, P.D.;
J. appl. Chem. 17. Junio 1968 157-65.
- EPSTEIN, H.T.; Nature 171 (1953) 394-395
- FABRE, F.; and MOUSTACCHI, ; Molec. Gen. Genet. 117 (1972a) 153-166
- FABRE, F.; and MOUSTACCHI, ; Photoche. Photobiol 15 (1972b) 367-373.
- FANGMEN, W.L.; and RUSSEL, M.; Molec. Gen. Genet. 110 (1971) 332-347
- FELSENFELD, G.; and HIRSCHMAN, S.Z.; J. Mol. Biol. 13 (1965) 407.
- FERRIS, J.P.; SANCHEZ, R.A. and ORGEL, L.E.; J. Molec. Biol. 33 (1968) 693-704.
- FISHER, G.J.; LEBLANC, J.C. and JOHNS, H.E.; Photochem. Photobiol. 6 (1967) 757.
- FISHER, C.J.; and JOHNS, H.E.; Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. Vol I. Chemistry. Cap 4 and 5. Academic Press. New York. San Francisco. London 1976.
- FORBES, G.S.; and HEIDT, L.T.; J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 2363.
- FORNILI, S.L.; CORDONE, L.; and RADMAN, M.; Virology. 43 (1971) 422-426
- FORTUIN, J.H.; Mutat. Res. 11 (1971) 265-277.
- FOX, S.W.; Nature. Lond. 201 (1964) 336
- FREIDBERG, E.C.; and KING, J.J.; J. Bacteriol. 106 (1971) 500-507
- FREIFELDER, D.; J. Mol. Biol. 35 (1968) 95-102.
- FRUTON, S.; and SIMONDS, S.; "Bioquímica General", Ed Omega. S.A. Barna 1961.
- FUJIWARA, Y.; and KONDO, T.; Biochem Biophys. Res. Commun. 47 (1972) 557-564
- GARCÉS, F.; "Estimación del peso molecular del DNA por electroforesis en gel." Memoria de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Univ. Complutense. Madrid, 1971
- GARCIA-Bellido, A.; Molec. Gen. Genet. 115 (1972) 54-72
- GEFTER, M.L.; HIROTA, Y.; KORNBERG, T.; WECHLER, J.A.; and BARNOUX, C.;

Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A.68(1971)3150-53

GELLERT,M.;En "Procedures in Nucleic Acids Research".Ed.Cantoni
G.L.and Davis,D.R.Harper and Row.New York.Vol 2 pag 875-888(1971)

GELLERT,M.;and BOLLUCK,M.;Proc.natn.Acad.Sci.U.S.A.67(1970)1580-1587

GREGORI,S.;TAVERNA,Cand BERTINCHAMPS,A.;Int.J.Radiat.biol.18(1970)
577-585.

GRISWOLD,B.;HUMOLLER,F.L.;and McINTYRE,A.;Anal.Chem.23(1951)192-
194

GROSS,J.;and GROSS,M.;Nature.Lon.244(1969)1166-1168

GROSS,J.;GRUNSTEIN,J.;and WITKING,E.;J.molecBiol.58(1971)631-634

GROSSMAN,L.;and MOLDAVE,K.;Characterization of Nucleic Acid.En
"Methods in Enzimology".Vol XII B.Academic Press.New York & Lon-
don.1968

GROSSMAN ,L.;and MOLDAVE,K.;Isolation of total Nucleic Acids.En
"Methods in Enzimology".VolXII B.Academic Press.New York & London.
1968.

HANAWALT,P.C.;HAYNES,R.M.;Biochem.Biophys.Res.Commun.19(1965)462-
467.

HANAWALT,P.;PETTIJOHN,D.E.;PAULING,E.C.;BRUNK,C.F.;SMITH,A.W.;
KANNER,L.C.;and COUCH,J.L.;Cold.Sprin.Harbor.Symp.Quant.Biol.
33(1968)187-194.

HARM,W.;HARM,H.;and RUPERT,C.S.;Mutat.Res.6(1968)371-385.

HARM,W.;Mutat.res.8(1969a)411-415.

HARM,W.;Mutat.Res.39(1969b)517

HARRIOT,R.M.;and BARLOW,J.L.;J.Gen.Physiol.36(1952)17-21

HATCHARD.C.G.;and PARKER,C.A.;Proc.Roy,Soc.A.235(1956)518-536

HAYES,F.N.;WILLIAMS,D.LL.;PATLIFF,R.L.;VARGHESE,A.J.;and RUPERT,
C.S.;J.Am.Soc.93(1971)4940-4942

HAYNES,R.H;Radiat.Res.16(1962)562-563

- HAYNES, R.H.; Photochem. Photobiol. 3 (1964) 429
- HEARST; J.E.; J. Mol Biol. 4 (1962) 415
- HELENE, C.; and CHARLIER, M.; Biochimie. 53 (1971) 1175-1180
- HERBERT, D.; ELSWORTH, P.; and TELLING, C.; J. Gen. Microbiol. 14 (1956) 601-622.
- HIDALGO SALVATIERRA, O. and McLAREN, A.D.; Photochem. Photobiol. 9 (1969) 417-426
- HIRSCHMAN, S.Z.; and FELSENFELD, G.; J. Mol Biol. 13 (1965) 407
- HOLLIDAY, R.; Nature. New Biol. 232 (1971) 233-236
- HOWARD-FLANDERS, P.; Ann. Rev. Biochem. 37 (1968) 175-200
- HUGGINS, L.M.; J. Amer. Chem. Soc. 64 (1942) 2716
- HUTCHINSON, G.E.; En "The Biochemistry of the Terrestrial Atmosphere". En G.P. Kuiper Ed. The solar System Vol II The Earth as a Planet. pp 371-433. Chicago. University Press. 1954.
- IBAÑEZ, J.; KIMBALL, A.P.; and ORO, J.; En "Chemical Evolution and the Origin of Life" Eds. Buret, R & Ponaamperuna, C. Elsevier. North Holland. Amsterdam. 1971. pp 171-179.
- IKENAYA, M.; PATRICK, M.H.; and JAGGER, J.; Photochem. Photobiol. 11 (1970) 487-494
- JACOB, F.; and WOLMAN, E.L.; Annls. Inst. Pasteur. Paris. 88 (1955) 724-749
- JAGGER, J.; Potassium Ferrioxalate Actinometry. En "Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology". pp 137-139
- JAGGER, and STAFFORD, R.S.; Biophys. J. 5 (1965) 75-88
- JACOBS, A.; BOPP, A. and HAGEN, U.; Int. J. Radiat. Biol. 22 (1972) 431-435
- JAGGER, J.; TABEKE, and SNOW, J.M.; Photochem. Photobiol. 12 (1970) 185-196
- JANSEN, G.J.O.; Mutat. Res. 10 (1970) 21-32
- JOHNS, H.E.; et al.; J. Mol. Biol. 4 (1962) 104-114
- JOHNS, H.E.; PEARSON, M.L.; LEBLANC, J.C.; and HELLEINER, C.W.; J. Mol. Biol. 9 (1964) 503

- JOHNS, H.E.; LEBLANC, J.C.; and FREEMAN, K.B.; *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 849
- JOHNS, H.E.; Photochemical Reaction in Nucleic Acids. En "Methods in Enzymology". Vol XVI (1969) 253-317
- KANNER, L.; and HANAWALT, P.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970) 149-155.
- KAPLAN, H.S.; and ZAVARINE, R.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8 (1962) 432-436
- KAPLAN, H.S. and MOSSES, L.E.; *Science.* 145 (1964) 21-25
- KAPLAN, J.C.; KUSHNER, S.R.; and GROSSMAN, L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 63 (1969) 144-151.
- KAUFMAN, G.E.; and MILLER, M.W.; *Radiat. Res.* 42 (1970) 21-25
- KAY, E.R.; SIMONS, N.S.; and DOUNCE, A.L.; *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1724
- KELLY, R.B.; ATKINSON, M.R.; HUBERMAN, J.; and KORNBERG, A.; *Nature. Lond.* 224 (1969) 495-501.
- KELLY, R.; COZZARELLI, N.; DEUTSCHER, M.; LEHMAN, I.; and KORNBERG, A.; *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 39-45.
- KOFMAN-ALFARO, S.; and CHANDLEY, A.C.; *Expl. Cell. Res.* 69 (1971) 33-34.
- KUNITZ, M.J. *Gen. Physiol.* 33 (1950) 363-372
- KUSHNER, S.R.; KAPLAN, J.C.; ONO, H.; and GROSSMAN, L.; *Biochemistry.* 10 (1971) 3325.
- LANG, H.; and LUCK, G.; *Photochemistry and Photobiology* 17 (1973) 387-390
- LAWLENCE, C.W.; *Mutat. Res.* 10 (1970) 557-566
- LEA, D.E.; *Nature* 146 (1940) 137-138
- LEHMANN, A.R.; *J. Molec. Biol.* 66 (1972) 319-337
- LEIGHTON, W.G.; and FORBES, G.S.; *J. Amer. Chem. Soc.* 52 (1930) 3139-3152
- LESCK, A.M.; *J. Theor. Biol.* 22 (1969) 537-540
- LEY, R.D.; and SETLOW, R.B.; *Biophys. J.* 12 (1972) 420-431
- LOERING, V.E.; *Biochem. J.* 102 (1967) 251.
- LOWRY, D.; ROSENBERG, N.; FARR, A.; and RANDALL, R.S.; *J. Biol. Chem.* 193

(1951)265-275.

LURIA, D. E.; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 33 (1947) 253.

LURIA, S. E.; J. Cell. Comp. Physiol. 39 (1952) 119-123

MANDEL, M.; and MARMUR, J.; En "Methods in Enzimology" Vol XII B (1968) 195.

MANNEY, T. R.; and MORTIMER, K.; Science. Washington. 143 (1964) 581-582

MARMUR, J.; and DOTY, P.; Nature 183 (1959) 1427-1429

MARMUR, J.; J. Mol. Biol. 3 (1961) 208-218

MILLER, S. L.; J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 2351-60

MILLER, S. L.; and UREY, H. C.; Science. N. Y. 180 (1973) 916-927

MINATO, S.; and WERBIN, H.; Biochemistry 10 (1971) 4503-08

MINGOT, F.; and DAVILA, C. A.; J. Chromatogra. 94 (1974) 75-83

MINGOT, F.; JORCANO, J.; ACUÑA, M. I.; and DAVILA, C. A.; Biochem. Biophys. Acta. 418 (1976) 315-320

MINGOT, F.; JORCANO, J.; and DAVILA, C. A.; Biochem. Biophys. Acta 520 (1978) 1-10

MIURA, K. I.; Biochem. Biophys. Acta. 72 (1963) 619-629

MONOD, J.; Ann. Inst. Pasteur. 79 (1950) 390

MOROSON, H.; and ALEXANDER, P.; Radiat. Res. 14 (1961) 29

MOROSON, H.; and ALEXANDER, P.; Proc. Third. Int. Congress of Photobiology. p. 604. Copenhagen (1960)

MOSELEY, B. E. B.; and SCHEIN, A.; Nature. 203 (1964) 1298-1299

MUNRO, H. N.; and FLECK, A.; En "Method of Biochemical Analysis". Interscience Publishers. Vol 14 (1966) 159

MURPHY, T.; and GORDON, M. P.; Photochem. Photobiol. 13 (1971a) 45-55

MURPHY, T. M.; and GORDON, M. P.; Photochem. Photobiol. 14 (1971b) 721

NEWMAN, M. W.; NEWMAN, W. T.; and LANE, K.; Curr. Mod. Biol. 3 (1970) 253-59. 277-83

- OSHIKAMA, S. ;and SEKIBUSHI, M. ;Biochem. Biophys. res. Commun. 47(1972) 1126-32
- ORO, J. ;En "The Origins of Prebiological Systems and their Molecular Matrices". Ed Fox, S.W. Academic Press. New York and London. 1965.
- PAECHT-HOROWITZ, M. ;BERGER, J. ;and KATCHALSKY, A. ;Nature. Lond. 228 (1970) 636-39
- PAINTER, R. B. ;Curr. Trop. Radiat. Res. 7(1970) 45-70
- PARKER, C. A. ;Proc. Roy. Soc. A. 220(1953) 104-116
- PARKER, C. A. ;Trans. Faraday. Soc. 50(1954) 1213-1221
- PAULING, G. ;and HANAWALT, P. C. ;Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 54(1965) 1728-1734.
- PAULING, C. ;and HAMM, L. ;Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 60(1968) 1495-1502
- PETTIJOHN, D. ;and HANAWALT, P. ;J. Molec. Biol. 9(1964) 395-410
- PHIL, A. ;and SANNER, T. ;Radiat. Res. 28(1966) 96-108
- PONNAMPERUMA, C. ;SAGAN, C. ;and MARINER, R. ;Nature. London. 199(1963) 222-226
- PONNAMPERUMA, C. ;En "The Origins of Prebiological Systems and their Molecular Matrices". Ed Fox, S.W. ;Academic Press. New York and London 1965, pp 221-242.
- PONNAMPERUMA, C. ;WOELLER, F. ;FLORES, J. ;ROMIEZ, M. ;and ALLEN, W. V. ;Adv. in Chem. Ser. 80(1969) 280-288
- PONNAMPERUMA, C. ;Quarterly Reviews of Biophysics. 4(1971) 84
- PROUST, J. ;Mutat. Res. 4(1967) 837-63
- PRUDHOMMEAU, C. ;and PROUST, J. ;Mutat. Res. 8(1969) 317-326
- PUCK, T. T. ;Rev. Mod. Phys. 31(1959) 433-448
- RADMAN, M. ;CORDONE, I. ;KRASMANOVIC-SIMIC, D. ;ERRERA, M. ;J. Molec. Biol. 49(1970) 203-212
- RADMAN, M. ;En "Molecular Mechanisms for Repair of DNA". Vol A. 1975. Edited by Philip C. Hanawalt and Richard B. Setlow. Plenum Press. New York & London.

- RADMAN, M.; and EPRERA, M. *Mutat. Res.* 9(1970)553-560
- RAVINOWITZ, J.; CHANG, S.; PONNAMPERUMA, C.; En "Prebiotic and Biochemical Evolution". Ed. Kimball, A.P. and Oro, J. Elsevier North Holland. Amsterdam 1971. pp 70-77
- REAGAN, J.D.; TROSKO, J.E.; and CARRIER, W.L.; *Biophys. J.* 8(1968)319-325
- REITER, H.; and STRAUSS, B.; *J. Mol. Biol.* 14(1965)179-194
- RENZ, M.; LOHRMANN, R.; and ORGEL, L.E.; *Biochem. Biophys. Acta.* 240(1971) 463-471
- RIVA, S.; POLSINELLI, M.; and FALASHI, A.; *J. Mol. Biol.* 35(1968)347-353
- ROMAN, H.; and JACOB, F.; *Cold. Spring. Harb. Simp. quant. Biol.* 23(1958) 155-160
- RUPERT, C.S.; and GOODGAL, S.; *Nature. London.* 185(1960)556-557
- RUPP, W.D.; and HOWARD-FLANDERS, P.; *J. molec. Biol.* 31(1968)291-304
- RUPP, W.D.; WILDE III, C.E.; RENO, D.L.; and HOWARD-FLANDERS, P.; *J. molec. Biol.* 61(1971)25-44
- SAEZ, R.M.; and DAVILA, C.A.; Report J.E.N. n°283(1974). Junta de Energía Nuclear. Madrid.
- SAGAN, C.; En "The Origins of Prebiological Systems and their Molecular Matrices" Ed. Fox, S.W. Academic Press. New York and London. 1965. pp 207-219.
- SAGAN, C.; and HARE, B.N.; *Science. Washington* 173(1971)417-420
- SANCHEZ, R.A.; FERRIS, J.P.; and ORGEL, L.E.; *Science. Washington* 154(1966) 784-85
- SCHNEIDER-BERNLOEHR, H.; LOHRMANN, R.; SULTON, J.; WEIMANN, B.; ORGEL, L.E. and MILLER, H.T.; *J. molec. Biol.* 37(1968)151-155
- SCHMIDT-THANHAUSER.; "Methods of Biochemical Analysis". Interscience Publishers. Vol 14 (1966)159
- SETLOW, R.; *Biochem. Biophys. Acta. Preliminary Notes.* (1961)237-238
- SETLOW, R.B.; and SETLOW, J.K.; *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 48(1962)1250-1257.

Setlow, R. B.; and Setlow, J. K. ; Effects of Radiation on Polynucleotides
Annual Review of Biophysics and Bioengineering . Vol-1 - 1972

- SETLOW, R. B.; SWENSON, P. A.; and CARRIER, W. L.; Science 142 (1963) 1464-1466
- SETLOW, R. B.; CARRIER, L.; and BOLLUM, F. J.; Biochem. Biophys. Acta 91 (1964) 446.
- SETLOW, R. B.; and SETLOW, J. K.; Photochem, Photobiol. 4 (1965) 939
- SETLOW, J. K.; and BOLLUM, F. J.; Biochim. Biophys. Acta. 157 (1968) 133-237
- SETLOW, R. B.; "The Photochemistry, Photobiology and Repair of Polynucleotides" ~~Annual Review of Biophysics and Bioengineering, Vol. I 1972.~~ *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology Vol-VIII. Acad. Press. 1968*
- SHAFRANOSKAYA, N. N.; TRIFONOW, E. N.; LAZURKIN, Yu. S.; FRANK-KAMENETSKY, M. D.; Nature. New Biology. 241 (1973) 58-60
- SHANFIELD, B.; and KAUFER, E.; Genetics. 67 (1971) 209-219
- SHARP, J. P.; and FREIFELDER, D.; 1970. IVth Int. Congress. Radiat. Res. Evian 771.
- SHWARTZ, A.; and PONNAMPERUMA, C.; En "Prebiotic and Biochemical Evolution" Ed. Kimball, A. P and Oro, J. Elsevier North Holland. Amsterdam. 1971. pp 78-82
- SMITH, K. C.; Photochem. Photobiol. 2 (1963) 503
- SMITH, K. C.; and HANAWALT, P. C.; Photochemistry of the Nucleic Acids". Molecular Photobiology. Academic Press. 1969
- SMITH, K. C.; and MEUM, D. H.; J. Molec. biol. 51 (1970) 459-472
- SPARROW, A. H.; UNDERBRINK, A. G.; and SPARROW, R. C.; Radiat. Res. 32 (1967) 915-945
- SPARROW, A. H.; SCHAIRER, L. A.; and SPARROW, R. C.; Science 141 (1963) 163-166.
- SPIEGELMAN, S.; Quart. Rev. Biophys. 4 (1971) 213-253.
- SPRINGATE, C. F.; and LOEB, L. A.; Proc. ntn. Acad. Sci. U. S. A. 70 (1973) 245-249.
- STEINMAN, G.; SMITH, A. E.; and SILVER, J. J.; Science. Washington. 1959 (1968) 1108-9

- STEPHEN-SHERWOOD, E.; ORO, J.; and KIMBALL, A. P.; Science. Washington. 173(1971)446-447
- STERN, H.; Science. New York. 121(1951)144-145
- SUGINO, A.; and OKAZAKI, R.; J. Molec. Biol. 64(1972)61-85
- SULSTON, J.; LOHRMANN, K.; and ORGEL, L. E.; et al; J. molec. Biol. 40(1969) 227
- SUTHERLAND; B. M.; SUTHERLAND, J. C.; and CHAMBERLIN, M. J.; J. Biol. Chem. 284(1973b)4200-05
- SUTHERLAND; B. M.; COURT, D.; and CHAMBERLIN, M. J.; Virology 48(1973a) 87-93
- SUTHERLAND, B. M.; and SUTHERLAND, J. C.; Biophys. J. 9(1969)292-302. y 1045-1055
- SWENSON, P. A.; and SETLOW, R. B.; J. Mol. Biol. 15(1966)201-209
- TAKAHASHI, M.; OGING, T.; and BABA, K.; Biochem. Biophys. Acta. 174(1969)183
- TAPIERE, C. M.; NAGIBARY, J.; Nature. Lond. 231(1971)42-43
- TERZI, M.; Nature 191(1961)461-463
- TERZI, M.; J. Theor. biol. 8(1965)233-34
- THOMAS, C. A. jr.; and ABELSON, J.; En "Procedures in Nucleic Acids Researche". Vol I Eds. Cantoni y Davis. 1966
- THORNE, H.; Virology 29(1966)234
- THORNE, H.; J. Mol. Biol. 24(1967)203
- TREEMAN, K. B.; HARIHAN, P. U.; and JOHNS, H. E.; J. Mol. Biol. 13(1965)833
- TUNG YUE WANG. Isolation of mamalian Nucleic Acids. En "Methods in Enzymology" Vol. XII B. Ed. Grossman and Moldave. Academic Press. New York and London. 1968
- UNDERBRINK, A. G.; and SPARROW, A. H.; Radiat Res. 35(1968)311-317
- UNRAU, P.; WHEATERPROFF, R.; COX, B. S.; Molec. Gen. Genetics. 113(1971)359-362

UREY, H.; Bull, Geol. Soc. Am. 67(1956)1125-1128

VARGHESE, A. J.; BIOCHEM. and Biophys. Research. Comm. Vol 38 n#3(197)484

VON WILUCKI, I.; MATTHAUS, M. and KRAUCH, C. M.; Photochem, Photobiol. 6
(1967)497

WACKER, A.; Prog. Nucleic Acids. Res. 1(1963)369

WATSON, J. D.; Molecular Biology of the gen". W. A. Benjamin. Inc. New
York. Amsterdam. 1965 pag85

WEISS, B.; and RICHARDSON, C. C.; Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 57(1967)
1021-1028

WERBIN, H.; and RUPERT, C. S.; Photochem. Photobiol. 7(1968)225-230

WILLIAMS, D. L.; HAYES, F. N.; VARGHESE, J.; and RUPERT, C. S.; Biophys.
Soc. Abstr. 11(1971)191 a

WITKIN, E. M.; En "Molecular Mechanisms for Repair of DNA" Vol 1975
Edited by Philip C. Hanawalt and R. B. Setlow. Plenum Press. New York
and London.

WITKIN, E. M.; A. Rev. Microbiol. 23(1969a)487-514

WITKIN, E. M.; Mutat. res. 8(1969)9-14

WITKIN, E. M.; Ann. Rev. Microbiol. 23(1969)487-514

WOOD, S.; KAUFER, E.; Genetics 62(1969)507-518

WULFF, D. L.; Biophys. J. 3(1963)355-362

WULFF, D. L.; and RUPERT, C. S.; Biochem. Biophys, Res. Commun. 7(1962)237-
240

YOUNG, D. A.; and SMITH, K. C.; Bacteriol. 116(1973)175-182

ZIERENBERG, B. E.; KRAMER, D. M.; GEISERT, M.; and RIRSTE, R. G.; Photochem.
Photobiol. 14(1971)515

ZIMM, B.; ; and CROTHERS, D. M.; Proc, Natl. Acad. Sci. U. S. A. 48(1962)1905