

Efecto radioprotector (UV y gama) del triptófano y un modelo molecular basado en la interacción del triptófano con la molécula de NADH

Radioprotector effect (UV and Gamma) of Tryptophan and a molecular model based on its interaction with NADH

M. GREZ, M. GUTIERREZ, T. PALMA, J.C. TOHA, C. WINKLER

Biofísica, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
Comisión Chilena de Energía Nuclear.

(Recibido para publicación el 11 de octubre de 1973)

GREZ, M., GUTIÉRREZ, M., PALMA, T., TOHÁ, J.C., WINKLER, C. Efecto radioprotector (UV y gama) del triptófano y un modelo molecular basado en la interacción del triptófano con la molécula de NADH. (Radioprotector effect (UV and Gamma) of Tryptophan and a molecular model based on its interaction with NADH). Arch. Biol. Med. Exper. 11:61-67, 1978.

The high radiosensitivity to UV and Gamma radiation of erythrocytes is described, as well as, the high radioprotective activity of L-tryptophan. A "functional radiation damage" is postulated. Otherwise, based in the interaction of tryptophan with the NADH molecule and the enhancement in the photo-oxidation of this, a possible radioprotective mechanism of the former is discussed. Moreover the role of excited states of tryptophan in the cellular dehydrogenases is suggested.

TRYPTOPHAN RADIOPROTECTOR UV RADIATION GAMMA RADIATION NADH

En trabajos preliminares anteriores (1) hemos comunicado que los eritrocitos de conejo son muy sensibles a la irradiación UV o gama ($D_{37} = 2,2 \cdot 10^5$ erg/mm² y $3,5 \cdot 10^3$ rad, respectivamente), no obstante tratarse de células anucleadas (Figs. 1 y 2).

Por otra parte, la protección que ejerce el triptófano ($10^{-3} - 10^{-4}$ M) en ambiente de N₂, O₂, N₂O o aire, es muy alta sobre este efecto. Así, por ejemplo, el DRF obtenido para la irradiación en ambiente natural es de 500 y 235, respectivamente, para irradiación UV y Gama; ver (Fig. 3).

Ambos hallazgos permiten plantear la hipótesis de que el daño funcional (¿alteración en el transporte de protones y síntesis de ATP en la célula?) es debido a los radicales inducidos por la radiación, los que serían capaces de interactuar con los radicales naturales de las óxido-reducciones celulares. En favor de esta clase de daño funcional, está ade-

más el hecho mostrado en la Fig. 3b en que se observa el mayor daño que se produce cuando se irradia en ausencia de O₂ circunstancia en la cual la autorreparación está dificultada, aun en el caso de los glóbulos rojos, por la deficiencia de los procesos oxidativos.

Como la molécula de NADH aparece vinculada a los procesos respiratorios aeróbicos y anaeróbicos y como además se dispone de datos experimentales acerca de la interacción de triptófano con esta molécula (2-5) hemos estudiado un modelo molecular triptófano-NADH irradiado con UV o Radiación Gama, que pudiera dar cuenta, al menos en parte, de los resultados observados a nivel celular.

SISTEMA NADH-TRIPTOFANO IRRADIADO CON RADIACION GAMA

Los resultados resumidos en la Fig. 4 muestran que el NADH fue significativamente menos oxi-

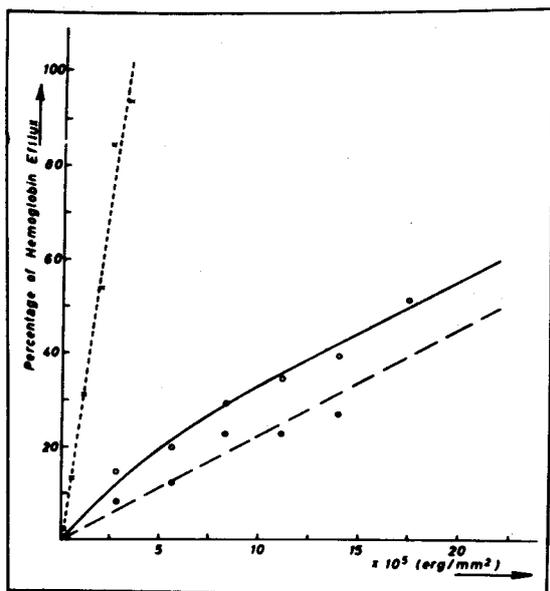


Fig. 1. Pérdida de hemoglobina en eritrocitos de conejo irradiados con radiación UV (G.E. Lamp, 30 W. G30T8-Velocidad de dosis 2.8×10^6 ergs/mm²/min).

Sin proteger x-----x
 Protegidos con etanol (10^{-1} M) + (L)-triptófano (5×10^{-3} M) o-----o
 Protegidos con (L)-triptófano (5×10^{-3} M) .-----.

La sangre de conejo se extrajo con anticoagulante (oxalato de amonio 1,2% y oxalato de potasio 0,8% suspendida en NaCl 0,9%), se centrifugó a 3.000 rev/min. Se lavó con ClNa 0,9% y se resuspendió en dicha solución salina. La irradiación se practicó en una placa de Petri sobre una suspensión de eritrocitos de 1,6 mm de altura. La pérdida de hemoglobina, a partir de los glóbulos rojos irradiados, se determinó leyendo en un espectrofotómetro Beckman DU a 540 nm, la densidad óptica del sobrenadante de las suspensiones de eritrocitos irradiados contra los respectivos controles no irradiados.

dado, cuando se irradió en presencia de triptófano, pues los valores de densidad óptica fueron más altos en la zona de 340 nm, en la cual absorbe el NADH reducido. En esta figura se muestran las diferencias entre el sistema NADH-triptófano irradiado en distintos ambientes y los valores teóricos, obtenidos éstos por suma del efecto producido sobre el triptófano y sobre el NADH irradiados separadamente, y en distintos ambientes.

Como puede apreciarse, la mayor oxidación del NADH se observó en el ambiente de N_2O , en el cual la protección que ejerce el triptófano es también mayor. Este hecho está de acuerdo con las constantes más altas de atrapa-

miento de OH que de H descritas para el triptófano ($1,25 \times 10^{10} m^{-1} s^{-1}$ y $7,4 \times 10^9 m^{-1} s^{-1}$, respectivamente, según datos publicados por Swallow (6).

En ambiente de N_2 , aire y O_2 la oxidación del NADH así como la protección por el triptófano fueron comparables; no obstante que en ambiente de N_2 y de aire, además de un rendimiento semejante de radicales OH, hay además radicales hidrógeno y electrones solvatados. Sin embargo, si bien estos últimos podrían aumentar el daño por radiación, pueden también generar radicales de triptófano, capaces de reconstituir por su interacción la molécula original del aminoácido.

SISTEMA NADH-TRIPTOFANO IRRADIADO CON RADIACION UV

En el caso de la radiación UV ocurrió el efecto contrario: el NADH fue oxidado más rápidamente en presencia de triptófano (Fig. 5). Este fenómeno fue reversible y ocurrió aun cuando la molécula de triptófano no había sufrido alteración. La oxidación de NADH de-

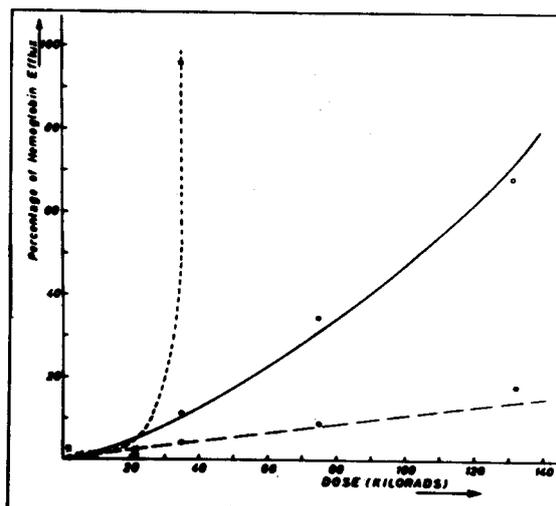


Fig. 2. Pérdida de hemoglobina de eritrocitos de conejo irradiados con radiación gamma (Cs^{137} de 108 Ci. Velocidad de dosis: 235 rads/min a 2.174 rads/min).

Sin proteger x-----x
 Protegidos con etanol (10^{-1} M) + (L)-triptófano (5×10^{-3} M) o-----o
 Protegidos con (L)-triptófano (5×10^{-3} M) .-----.

La medida de la pérdida de hemoglobina se practicó como en Fig. 1.

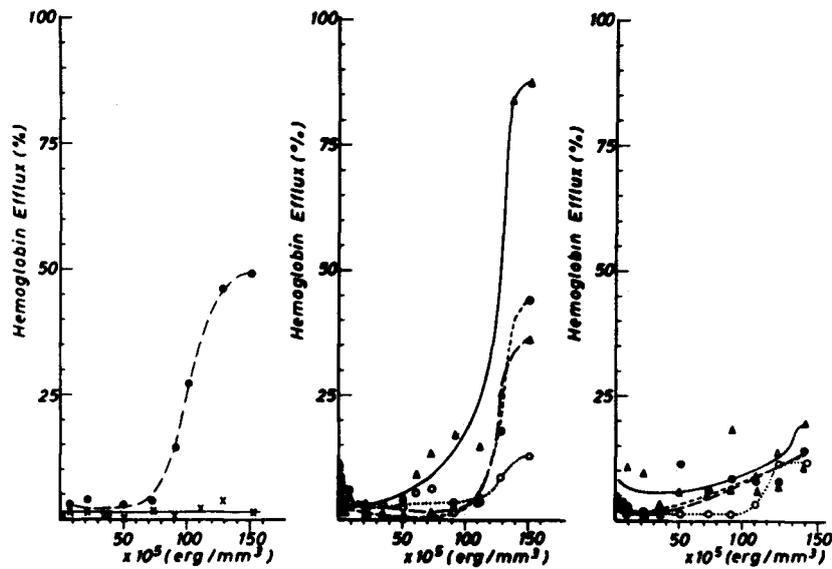


Fig. 3. Hemólisis de eritrocitos de conejo ocasionada por radiación gama (Cs^{137} ; 108 Ci) en distintos ambientes (aire, O_2N_2 y N_2O) y su protección por (L)-triptófano ($0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

- a) Eritrocitos irradiados y mantenidos en ambiente natural:
 - en presencia de (L)-triptófano x — x
 - en ausencia de (L)-triptófano - - - - -
- b) Eritrocitos irradiados en N_2 y mantenidos en N_2 —
- Eritrocitos irradiados en N_2 y mantenidos en O_2 - - - - -
- Eritrocitos irradiados en O_2 y mantenidos en N_2 —
- Eritrocitos irradiados en O_2 y mantenidos en O_2 o o
- c) Igual a b) pero habiendo agregado L-triptófano 10^{-4} M .

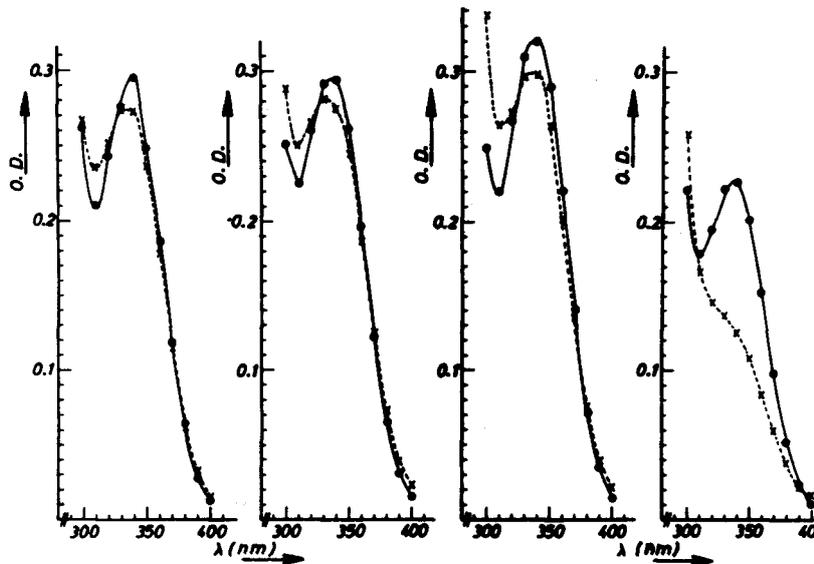


Fig. 4. Oxidación de NADH ($0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) por radiación gama. Dosis total: 10^4 Rads; velocidad de dosis: Rads min en presencia: — y en ausencia de (L)-triptófano ($0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) x - - - x
 a) Irradiado en aire; b) en ambiente de O_2 ; c) de N_2 y d) de N_2O NADH, Nicotinamida dinucleótido reducido (Schwartz).

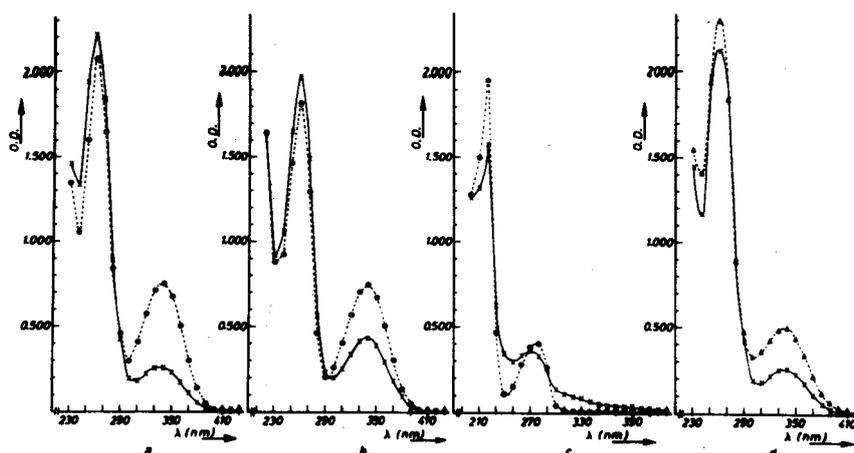


Fig. 5. Densidad óptica de mezclas de NADH (10^{-5} M)-L-triptófano (10^{-4} M), irradiados con radiación UV. Dosis total: $6,25 \times 10^5$ erg/mm². Velocidad de dosis: 5×10^4 erg/mm²/min. A pH neutro: (NaCl 0,01 M + CH₃COONa 0,001 M).

- | | |
|---|---------|
| a) NADH + L-triptófano no irradiado | ----- |
| a) NADH + L-triptófano irradiado | x ——— x |
| b) NADH no irradiado | ----- |
| b) NADH | x ——— x |
| c) (L)-Triptófano no irradiado | ----- |
| c) (L)-Triptófano | x ——— x |
| d) NADH irradiado + L-triptófano irradiado
(Curva teórica) | ----- |
| d) NADH + L-triptófano mezcla irradiada
(Curva experimental) | x ——— x |

pende, en primer lugar, de la interacción de ambas moléculas, evidenciadas por estudios de dicroísmo circular; así, en la Fig. 6a se muestran las diferencias de las medidas de dicroísmo circular del sistema NADH-triptófano y de los valores teóricos que resultan de la suma del dicroísmo del NADH más el del triptófano solo. En segundo lugar, no parece necesaria la presencia del nucleótido de adenina para que se produzca la interacción, pues también se ven diferencias en el dicroísmo del sistema NMNH-triptófano (Fig. 6b). Este último se oxidó aún más rápidamente que el NADH cuando se irradió en presencia de triptófano, como se puede ver en las Figs. 7a y 7b. En tercer lugar, este fenómeno de mayor oxidación del NADH en presencia de triptófano no ocurrió con irradiaciones de longitudes de ondas mayores que 280 nm y fue más rápido a pH ácido (Figs. 8a y 8b). En cuarto lugar, experimentos hechos a bajas temperaturas (-196°C) en los cuales se irradió sólo el triptófano y des-

pués se mezcló con el NADH, condujeron a una mayor oxidación de este último (Fig. 9). Si antes de mezclar se descongela el triptófano que ha sido irradiado en estado de congelación, no se produce la oxidación del NADH, como se aprecia en la Fig. 9. A su vez, cuando se irradió el NADH congelado solo y posteriormente se mezcló con el triptófano, se produjo oxidación del primero aun cuando se descongelara antes de mezclar, como se aprecia en los datos resumidos en las Figs. 10a y 10b.

Finalmente, cuando el sistema se irradió en ambiente de oxígeno, que es capaz de anular el estado excitado de triplete del triptófano, no se produjo oxidación del NADH.

Estos hechos permiten plantear un mecanismo hipotético de oxidación de NADH irradiado con UV en presencia de triptófano, para el cual se requeriría un radical neutro triptófilo y/o estados excitados del sistema NADH-triptófano. El radical neutro triptófilo se for-

maría a partir de un estado de triplete que pasa a radical catión y que por ruptura del N-H, termina en un radical neutro (7, 8). Cálculos teóricos (6, 7) muestran la posibilidad de una transferencia de carga desde el NADH al radical triptófano y, por otra parte, desde el NADH excitado al triptófano en su nivel energético más bajo (8).

Eventualmente, una cierta proporción del NAD oxidado en las células irradiadas con UV en presencia de triptófano, podría favorecer la formación de ácido 1,3-difosfoglicérico a partir del gliceraldehído-3-fosfato y la posterior síntesis de ATP. En el caso de la radiación gama, el fenómeno opuesto, de relativa protección de la oxidación total del sistema NAD/NADH, podría operar de una manera semejante.

Por otra parte, la mayor oxidación reversible, del NADH que se observa cuando se irradia con UV en presencia de triptófano, plantea un posible mecanismo de acción de las deshidrogenasas, pues el triptófano es uno de los aminoácidos que interactúan con el NADH en estas enzimas. Desde otro punto de vista es razonable plantear la posibilidad del empleo de esta pila fotoquímica.

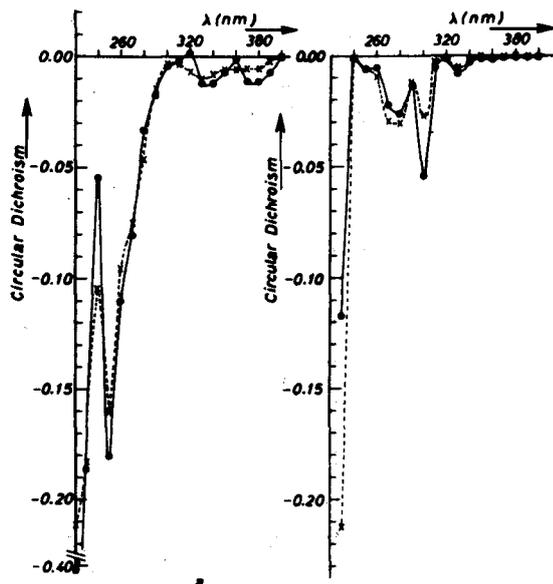


Fig. 6. Dicroísmo circular de mezclas de: a) NADH ($0,5 \times 10^{-3}M$) + L-triptófano ($0,5 \times 10^{-3}M$); y b) NMNH ($0,5 \times 10^{-3}M$)-L-triptófano ($0,5 \times 10^{-3}M$).

- a) /NADH-(L)-Tryptófano/, curva experimental x - - - x
- a) NADH + (L)-Tryptófano, curva teórica · ———·
- b) /NMNH-(L)-Tryptófano/, curva experimental x - - - x
- b) NMNH + (L)-Tryptófano, curva teórica · ———·

El dicroísmo circular se midió en un espectrómetro Shimadzu QV50.

NMNH: Nicotinamia Mononucleótido reducido (Sigma).

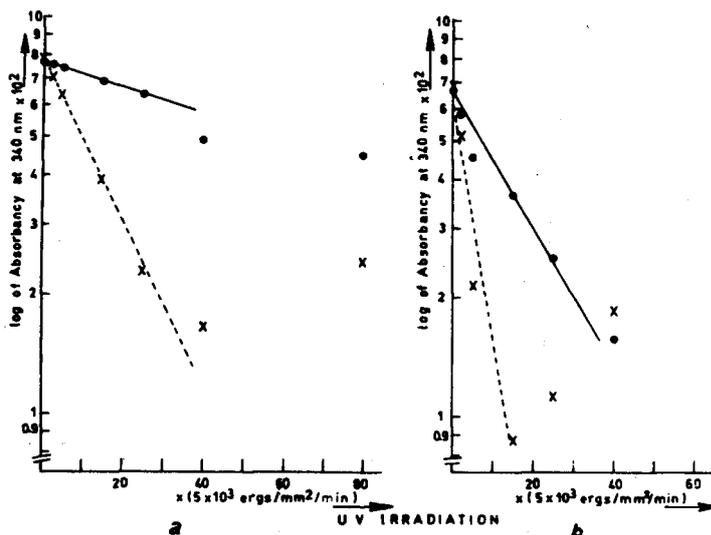


Fig. 7. a) Velocidad de la oxidación del NADH ($0,5 \times 10^{-3}M$) irradiado con radiación UV en presencia (x---x) o en ausencia de (L)-Tryptófano ($0,5 \times 10^{-3}M$): (·—·—·).

(Pendiente: $-0,0208 \pm 0,5\%$ y $-0,00311 \pm 0\%$, respectivamente).

b) Velocidad de oxidación de NMNH ($10^{-4}M$) irradiado con radiación UV en presencia (x---x) o en ausencia de (L)-Tryptófano: (·—·—·).

(Pendiente: $-0,1215 \pm 15\%$ y $-0,0341 \pm 0\%$, respectivamente).

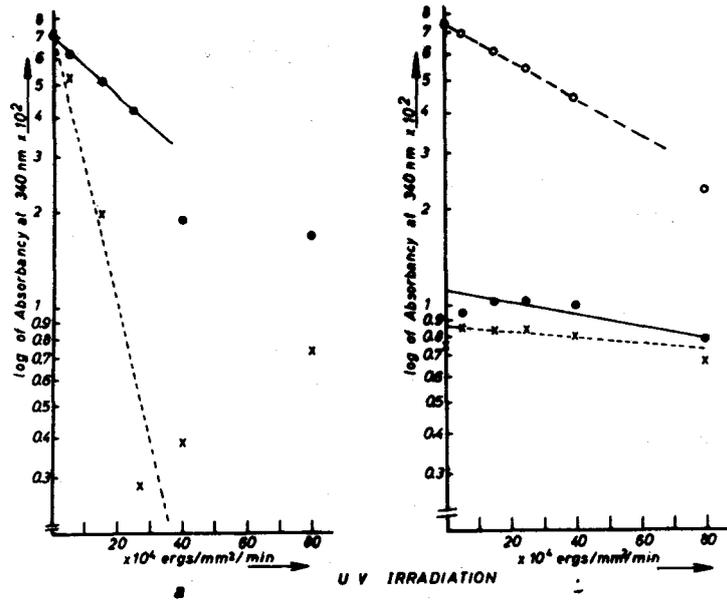


Fig. 8. Velocidad de oxidación de NADH irradiado en presencia de triptófano ($0,5 \times 10^{-3}M$) a diferente pH.

- a) pH: 5,6 (Buffer: Ac. acético-acetato)
 - NADH irradiado • ———•
 - NADH + (L)-Triptófano irradiado x-----x
 - Pendiente: $0,09691 \pm 11\%$ y $0,01889 \pm 0\%$
- b) pH: 10,4 (Buffer: Glicina-NaOH)
 - arriba: NADH irradiado o ---- o
 - abajo: (NADH-(L)-Triptófano), curva experimental
 - NADH + (L)-Triptófano, curva teórica x-----x

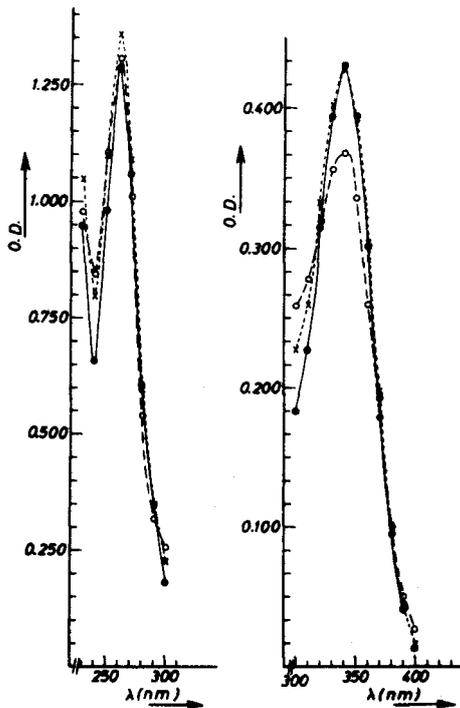


Fig. 9. (L)-Triptófano, congelado ($-196^{\circ}C$) e irradiado con radiación UV y mezclado posteriormente con NADH (no irradiado).

- (L)-Triptófano congelado e irradiado mezclado posteriormente con NADH (no irradiado) o ---- o
- (L)-Triptófano congelado, irradiado, descongelado y mezclado después con NADH (no irradiado) x-----x
- (L)-Triptófano más NADH no irradiado (Control) • ———•

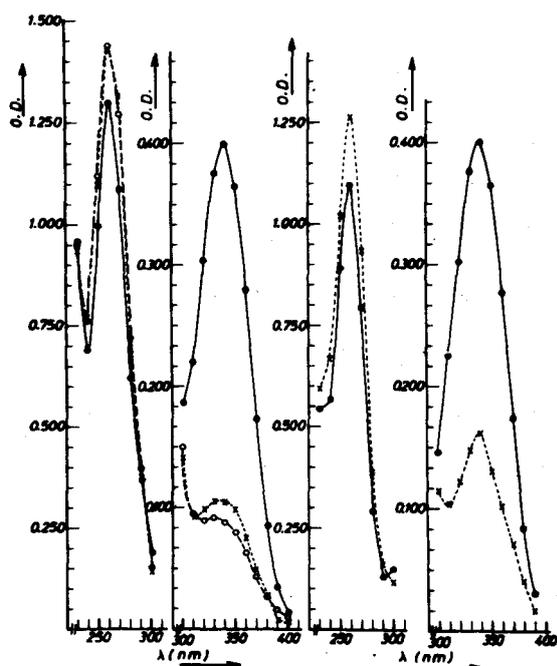


Fig. 19. NADH congelado (-196°C) e irradiado con radiación UV y mezclado posteriormente con (L)-Triptófano: a) y Control; b)

- | | |
|--|-------------|
| a) NADH congelado e irradiado mezclado posteriormente con (L)-Triptófano (no irradiado) | o ——— o |
| a) NADH congelado, irradiado, descongelado y mezclado posteriormente con (L)-Triptófano (no irradiado) | x - - - - x |
| NADH más (L)-Triptófano, no irradiado | · ——— · |
| b) Control. NADH congelado e irradiado | x - - - - x |
| b) NADH no irradiado | · ——— · |

SUMMARY

Based on the high sensitivity to UV and Gamma rays of mammalian erythrocyte, and the high radio-protective activity of (L)-tryptophan (Figs. 1 and 2) as well as the greater damage of red cells irradiated with Gamma rays in N_2 atmosphere (Fig. 3), a "functional radiation damage" is postulated and a molecular model is studied.

The model considers the interaction of (L)-tryptophan with NADH, revealed through

circular dichroism studies (Fig. 6) for which the adenylic component of the molecule seems not to be necessary, since the same is observed with NMNH (Fig. 7).

Results showed the NADH irradiated with Gamma rays was less oxidized in the presence of (L)-tryptophan, and damage as well as its protection were greater when irradiation is performed in N_2O atmosphere, where OH radicals dominate (Fig. 4).

On the contrary, NADH or NMNH, UV irradiated in the presence of (L)-tryptophan were more easily oxidized (Fig. 5) the oxidation occurred preferentially at acid pH: in N_2 atmosphere $>$ air $>$ O_2 . (Fig. 8). In accordance with low temperature irradiation studies (Figs. 9 and 10) and the negative results observed after irradiation with light of wavelength longer than 280 nm, a hypothetical mechanism is postulated, which considers the induction of a free Tryptophyl radical and/or excited state of the nucleotideaminoacid system.

The discussion is extended to enzymic hydrogen transfer mechanisms.

REFERENCIAS

- GREZ, M., GUTIÉRREZ, M., WINCKLER, C., SOTO, A., DÍAZ, F., TOHÁ, J.C., 1^{er} Simposio Latino-Americano de Fuente de Irradiación de Alta Intensidad. Santiago, junio 1973.
- PIEBER, M., ROMERO, C., TOHÁ, J.C., TIRAPÉGUI, C. Z., *Naturforsch*, 24b:508, 1969.
- ARCAYA, G., PANTOJA, M.E., PIEBER, M., ROMERO, C., TOHÁ, J.C.Z., *Naturforsch* 26b:1026, 1971.
- SÁNCHEZ, G., HASBÓN, S., DÍAZ, E., GREZ, M., LYON, F., PIEBER, M., ROMERO, C., y TOHÁ, J.C.Z., *Naturforsch*, 27b:544, 1972.
- MONTENAY-GARERTIER, T., HÉLENE, C., *Biochemistry* 1:1300, 1971.
- AMSTRONG, R.C., SWALLOW, A.J., *Radiation Res.* 49: 563, 1969.
- PAILTHORPE, M.T., NICHOLLS, C.N., *Photochem. Photobiol.* 14:135, 1971.
- PAILTHORPE, M.T., BONTOUR, J.D., NICHOLLS, C.N., *Photochem. Photobiol* 17:209, 1973.
- PULLMAN, B., PULLMAN, A., *Quantum Biochemistry* Interscience, New York, 1963, p. 322 y 518.