

# Über den Einfluß der DNS-Makrostruktur auf die durch Röntgenstrahlen verursachten Extinktionsänderungen im Bereich zwischen 210 und 350 nm.\*

Von L. ROSSBERG

Aus dem Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt a. M.  
(Z. Naturforsch. 17 b, 548—552 [1962]; eingegangen am 3. Januar 1962)

Um die von RAJEWSKY und WOLF aufgeworfene Frage nach dem Einfluß der DNS-Struktur auf die radiationschemische Veränderung der Basen zu untersuchen, wurde die DNS-Spirale bei einem Teil der Untersuchungen in dest. Wasser aufgelöst und mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Es ergab sich eine Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit der Basen, vor allem zu Beginn der Bestrahlung auf den Wert, den man bei der Bestrahlung der Monomerlösungen beobachtet. Bei Bestrahlung in 0,1 und 1-n. NaCl gelöster DNS sind dagegen die Basen gegen die Einwirkung der im Wasser gebildeten Radikale geschützt, solange sie innerhalb der intakten Spirale gebunden sind. Dieser strukturbedingte Schutzeffekt besteht nicht gegenüber der direkten Strahlenwirkung von UV-Licht. Dieses Ergebnis ist von strahlenbiologischem Interesse, da das Optimum der Strahlenwirkung auf den Mitoseablauf nach Arbeiten von CARLSON und GRAY in der frühen Prophase liegt<sup>17</sup>, also ebenfalls in einem Stadium, in dem die DNS-Spirale (vor der Verdoppelung) völlig aufgelöst ist. (Vgl. auch BACQ-ALEXANDER und FRITZ-NIGGLI<sup>18</sup>.)

In einer Arbeit von RAJEWSKY und WOLF<sup>1</sup> wurde die Frage diskutiert, ob die Reaktions-Wahrscheinlichkeit der Purin- und Pyrimidinbasen mit dem durch die Bestrahlung wäßriger DNS-Lösungen erzeugten Wasserradikalen vom Polymerisationsgrad der DNS abhängig sein kann. Diese Frage ist, wie wir später noch sehen werden, von größter Bedeutung für die Strahlenbiologie.

Es wurden daher Monomere der in der DNS vorkommenden Purin- und Pyrimidinbasen sowie das Na-Salz einer hochmolekularen, auf schonendste Weise aus Forellenspermien<sup>19</sup> hergestellten DNS in 0,1- und 1-n. NaCl-Lösung sowie in dest. Wasser mit Röntgenstrahlen bestrahlt\*\*. In verdünnter wäßriger Lösung dissoziiert das Na-DNS-Salz, so daß die Coulomb-Kräfte der Phosphorsäure-Anionen längs der DNS-Helix nach ROWEN<sup>2</sup> eine Längsdehnung

des Moleküls um ca. 40% (Viskositätserhöhung) und damit den Bruch der Wasserstoffbrücken zwischen den Purin- und Pyrimidinbasen (Extinktions-erhöhung) und damit eine weitgehende Auflösung der Helixstruktur bewirken<sup>3-8</sup>. Eine eventuelle sterische Abschirmung der Basen gegenüber den Wasserradikalen durch die DNS-Helix müßte in diesen Lösungen wesentlich schwächer als in den NaCl-Lösungen sein. Die Veränderungen der Makrostruktur wurde durch Viskositätsmessungen, die der Basen durch UV-Extinktionsmessungen verfolgt.

## Methodik

Die Viskosität wurde mit einem Ostwald-Viskosimeter gemessen. Der mittlere Geschwindigkeitsgradient in der Meßkapillare betrug maximal 200/sec (dest. Wasser, 25 °C), so daß die Strukturviskosität der DNS

\* Gewidmet Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. B. RAJEWSKY zum 25-jährigen Bestehen des „Max Planck-Instituts für Biophysik“.

<sup>1</sup> B. RAJEWSKY, E. SIX u. I. WOLF, Proc. 1st Int. Photobiol. Congr., S. 347, Amsterdam 1954; I. WOLF, Dissertation, Frankfurt/Main 1954, unveröffentlicht.

<sup>2</sup> J. W. ROWEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **10**, 391 [1959].

<sup>10</sup> K. FELIX, H. FISCHER, A. KREKELS u. R. MOHR, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **287**, 224 [1951]; **289**, 10 [1951]; K. FELIX, H. FISCHER u. A. KREKELS, **289**, 127 [1951]; K. FELIX, I. JILKE u. R. K. ZAHN, **303**, 140 [1956].

<sup>3</sup> L. F. CAVALIERI u. B. H. ROSENBERG, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5352 [1957].

<sup>4</sup> M. DEHAUSSY, J. Chim. physique **52**, 150 [1955].

<sup>5</sup> C. F. EMANUEL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **42**, 91 [1960].

<sup>6</sup> R. B. INMAN u. D. O. JORDAN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **42**, 421 [1960]; **43**, 9 [1960].

<sup>7</sup> J. PAUYET, G. SCHIEBLING u. H. SCHWANDER, J. Chim. physique **47**, 716 [1950].

<sup>8</sup> R. THOMAS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **21**, 481 [1956].

\*\* Für die Überlassung des Präparates bin ich Herrn Dr. R. K. ZAHN (Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt/M.) sowie der Firma Mack-Ilertissen zu großem Dank verpflichtet.

auf jeden Fall erfaßt wurde<sup>9</sup>. Die Extinktion der Lösungen wurde mit einem Spektralphotometer (Deuteriumlampe) von Zeiss in 1-cm-Quarzküvetten zwischen 210 und 350 nm gegen die Extinktion des Lösungsmittels gemessen. Durch gesonderte Untersuchungen wurde festgestellt, daß weder die Lichtstreuung in der Probe noch das Streulicht des Monochromators als Korrektur berücksichtigt werden müssen.

Die Röntgenstrahlen wurden mit einer am Institut entwickelten Hochleistungsröhre erzeugt<sup>10</sup>.

#### Daten der Röhre

Betriebsspannung 70 kV. Anodenstrom 1000 mA. Eigenfilterung ca. 0,5 mm Al. Dosisleistung in ca. 57 mm Fokusabstand, gemessen in Luft, 156 kr pro Minute. HWS in Wasser ca. 1 cm.

Da die Höhe des bestrahlten Lösungsvolumens 1,6 mm betrug, wurden die Oberflächen-Dosiswerte für die Berechnung der Ionenausbeute mit dem Faktor 0,9 multipliziert. Die Dosierung erfolgte mit einer am Institut konstruierten Ionisationskammer. Die Konstanz der Dosisleistung während der Bestrahlung wurde durch eine Monitorkammer kontrolliert. Für jeweils eine größere Versuchsserie wurde eine relativ konzentrierte Stammlösung mit  $10^{-3}$  g DNS/ml in  $H_2O$ , 0,1- und 1-n. NaCl-Lösung angesetzt. Durch entsprechende Verdünnung wurden die Konzentrationen 1, 2, 5 und  $10 \cdot 10^{-5}$  g/ml 8 Stdn. vor der Bestrahlung hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung der Extinktion erfolgte 5–6 Stdn. nach der Bestrahlung, so daß die Nachwirkungen der Bestrahlung<sup>11,12</sup> schon soweit abgeklungen sind, daß sie die Messung nicht mehr stören. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf lufttrocken eingewogene DNS.

#### Definition des Dosiseffektes

Bei den Extinktionsmessungen wurde als Dosiseffekt die Änderung der Höhe des für die Extinktion der heterozyclischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen charakteristischen Extinktionsmaximums zwischen 250 und 270 nm gewertet. 100% Dosiseffekt liegt also vor, wenn die Spektren kein Maximum mehr erkennen lassen. In Abb. 1 ist dies nach Bestrahlung mit 300 kr der Fall. Die Höhe der Maxima wurde unter Berücksichtigung der gesamten zwischen 210 und 350 nm gemessenen Extinktionskurven durch graphische Interpolation gewonnen.

#### Ergebnisse

Die Extinktionsmaxima der Monomerlösungen als auch die der in dest. Wasser gelösten DNS nehmen gleich zu Beginn der Bestrahlung eindeutig ab (Abb. 1, 2 sowie Abb. 3, Kurve 1) entsprechend

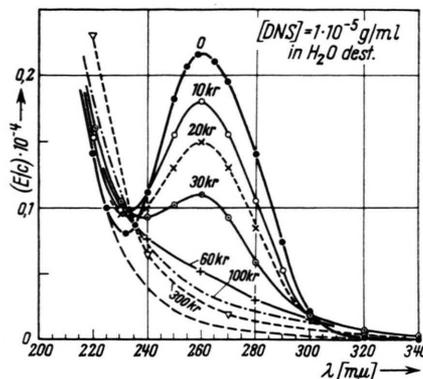


Abb. 1. DNS-Konzentration  $1 \cdot 10^{-5}$  g/ml in dest. Wasser. Die Extinktionsspektren vor und nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Die Dosen sind in kr an die Kurven angeschrieben.

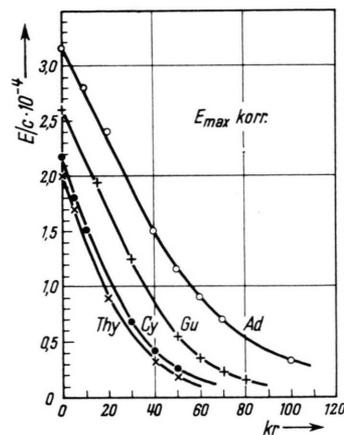


Abb. 2. Je  $2 \cdot 10^{-5}$  g/ml der Calciumsalze der Cytidylsäure, Thymidinsäure, Adenylsäure und Guanylsäure. Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der Röntgendosis. Die gleichen Dosiseffekturven erhält man bei Bestrahlung in 0,1-n. NaCl.

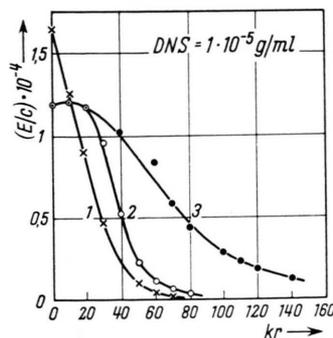


Abb. 3 a.  $1 \cdot 10^{-5}$  g DNS pro ml in:  $H_2O$  (Kurve 1), 0,1-n. NaCl (Kurve 2), 1-n. NaCl (Kurve 3). Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der Röntgendosis.

<sup>9</sup> R. K. ZAHN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **313**, 77 [1958].

<sup>10</sup> O. HEUSE, Z. angew. Physik **7**, 387 [1955].

<sup>11</sup> G. SCHOLES, STEIN u. J. WEISS, Nature [London] **164**, 709 [1949].

<sup>12</sup> B. TAYLOR, J. P. GREENSTEIN u. A. HOLLAENDER, Arch. Biochemistry **1**, 19 [1948].

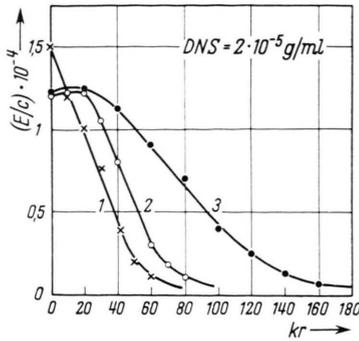


Abb. 3 b.  $2 \cdot 10^{-5}$  g DNS pro ml in:  $\text{H}_2\text{O}$  (1), 0,1-n. NaCl (2), 1-n. NaCl (3). Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der Röntgenstrahlendosis.

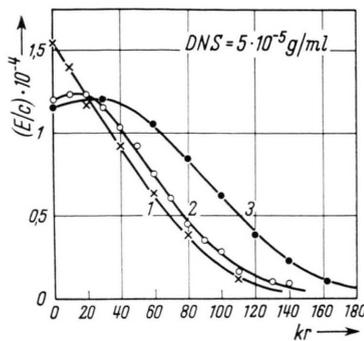


Abb. 3 c.  $5 \cdot 10^{-5}$  g DNS pro ml in:  $\text{H}_2\text{O}$  (1), 0,1-n. NaCl (2), 1-n. NaCl (3). Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der Röntgenstrahlendosis.

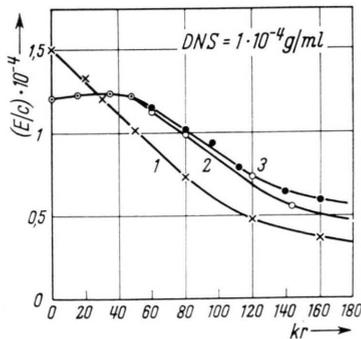


Abb. 3 d.  $1 \cdot 10^{-4}$  g DNS pro ml in:  $\text{H}_2\text{O}$  (1), 0,1-n. NaCl (2), 1-n. NaCl (3). Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der Röntgenstrahlendosis.

den schon früher an unserem Institut erhaltenen Ergebnissen mit stark denaturierten DSN-Lösungen<sup>1</sup>. Dagegen beobachtet man bei der in 0,1 und 1-n. NaCl gelösten DNS zu Beginn der Bestrahlung zunächst eine geringe Zunahme der Extinktion, was auf einen Bruch der Wasserstoffbrücken infolge der Depolymerisation hinweist (Abb. 3, Kurven 2 und 3). Erst bei höheren Dosen nimmt die Extinktion

ab, jedoch liegen die Extinktionswerte über denen der mit gleichen Dosen in dest. Wasser bestrahlten Lösung; die Kurven 2 und 3 sind in Richtung höherer Dosen gegenüber der Kurve 1 verschoben. Dieser Effekt ist jedoch *nicht* durch den höheren Extinktionskoeffizienten der durch die Depolymerisation frei werdenden Basen erklärbar, sondern man muß zusätzlich annehmen, daß die Strahlenempfindlichkeit der in der geschlossenen Helix gebundenen Basen (Bestrahlung in NaCl-Lösung) wesentlich geringer ist, als die der freien Basen. Wäre sie gleich, oder nur wenig verschieden, wie es z. B. bei Bestrahlung mit UV der Fall ist, würden die Kurven 1, 2 und 3 mit zunehmender Dosis asymptotisch ineinander übergehen (Abb. 4). Das Überschneiden der bei Anwendung von Röntgenstrahlen erhaltenen Dosis-effektkurven beweist somit, daß die innerhalb der

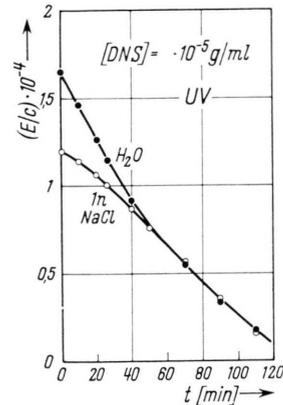


Abb. 4.  $1 \cdot 10^{-5}$  g/DNS pro ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 1-n. NaCl-Lösung. Die Höhe der Extinktionsmaxima als Funktion der UV-Bestrahlungszeit.

Helix lokalisierten Basen gegen die indirekte Strahlenwirkung geschützt sind. Hier müssen die Untersuchungen von LATARJET und Mitarb.<sup>13</sup> erwähnt werden, die fanden, daß die der unbestrahlten DNS eigene Erbinformation (Transforming principle) auch noch nach teilweiser Depolymerisation durch Röntgenbestrahlung vorhanden ist. Zweifellos müssen die noch „aktiven“ DNS-Bruchstücke noch alle für die Information wichtigen Basen unverändert enthalten.

Für die analytische Darstellung der Dosis-effekt-kurven wurde daher ein 100-proz. Schutzeffekt der DNS-Helix angenommen. Nach dem Ansatz für die Depolymerisation einer Doppelhelix von Cox und

<sup>13</sup> RAYMOND LATARJET, Strahlentherapie **110**, 3 [1959].

Mitarbb.<sup>14</sup> sowie BUTLER und CONWAY<sup>15</sup> wurde für die Bildung freier Basen  $B^x$  an den Bruchstellen eine quadratische Dosisabhängigkeit eingeführt.

Wir haben also den folgenden Reaktionsablauf



wobei zu  $B$  der Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$ , zu  $B^x \rightarrow \varepsilon^x$  ( $\varepsilon^x = k \cdot \varepsilon$ ) und zu  $X \rightarrow \varepsilon = 0$  gehört.

Die Abnahme der gebundenen Basen durch die Depolymerisation erfolgt nach

$$B = B_0 [1 - (1 - e^{-aD})^2], \quad (2)$$

während die dosisabhängige Konzentration der freien  $B^x$  durch

$$B^* = B_0 (1 - e^{-aD})^2 e^{-\beta D} \quad (3)$$

beschrieben wird. Wir erhalten schließlich den Verlauf der Dosiseffektkurve (dosisabhängige Änderung des Extinktionsmaximums entsprechend der oben angegebenen Definition) wie folgt

$$E = 2 B_0 [e^{-aD} (\varepsilon - \varepsilon^* a) + e^{-2aD} (\varepsilon^* b - \varepsilon/2) + \varepsilon^* e^{-\beta D} (a - b)]. \quad (4)$$

$\alpha$  und  $\beta$  sind die Wirkungskoeffizienten für strahleninduzierte Kettenbrüche und für die strahlenchemische Reaktion, die zum Verschwinden des charakteristischen Absorptionsmaximums der Basen bei 260 nm führt. Aus den Viskositätsmessungen folgt, daß  $\alpha > \beta$  sein muß, so daß Gl. (4) für große Dosen in den Ausdruck

$$\varepsilon' = E'/B_0 = \varepsilon^* 2(a - b) e^{-\beta D} \quad (5)$$

übergeht. Dies ist die mit dem Faktor

$$2(a - b) \quad (6)$$

bzw.

$$2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - \beta} - \frac{\alpha}{2\alpha - \beta} \right)$$

multiplizierte Dosiseffektkurve der freien Basen (Kurven 1), aus deren Anfangssteigung  $\beta$  entnommen werden kann. Allerdings nimmt bei niedrigen DNS-Konzentrationen die maximale Kurvenneigung mit steigender NaCl-Konzentration ab. Dies liegt daran, daß die Cl-Ionen einen Teil der  $H_2O$ -Radikale abfangen, ehe sie mit der DNS reagieren können<sup>16</sup>. In diesem Fall muß der kleinere Wert  $\beta'$  der Kurven 2 und 3 gesondert aus dem steilsten Teil der Dosiseffektkurven ermittelt werden.  $\alpha$  ergibt sich aus dem Faktor [Gl. (6)], der durch Extrapolation der Gl. (5) nach  $D = 0$  gewonnen wird (Abb. 5). In

Abb. 6 ist eine nach diesem Verfahren berechnete Dosiseffektkurve aufgetragen (Tab. 1). Die mit eingezeichneten Meßpunkte der Kurve 3, Abb. 4, lassen

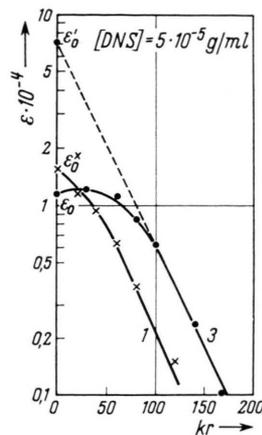


Abb. 5. Die Dosiseffektkurven 1 und 3 der Abb. 3 c in halblogarithmischer Darstellung. Die für die Auswertung wichtigen Werte sind eingezeichnet.

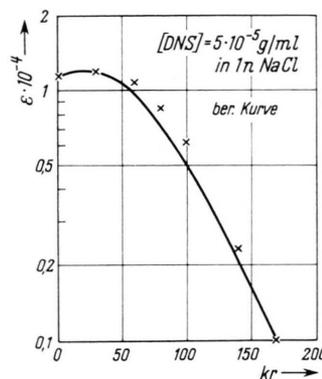


Abb. 6. Mit den aus Abb. 5 entnommenen Werten der Tab. 1 berechnete Dosiseffektkurve. Die Meßpunkte der Kurve 3, Abb. 5, sind mit eingezeichnet.

$\varepsilon' = 7$	} $\cdot 10^4$	$\alpha = 3,5 \cdot 10^{-2}$	} $kr^{-1}$
$\varepsilon^x = 1,6$		$\beta = 2,3 \cdot 10^{-2}$	
$\varepsilon_0 = 1,15$		$a = 2,92$	
$\frac{1}{2} \left( \frac{\varepsilon'}{\varepsilon^x} \right)_0 = a - b = 2,18$		$b = 0,74$	

Tab. 1. Die aus Abb. 5 entnommenen und mittels Gl. (5) und (6) berechneten Werte.

eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erkennen. Der für die Schutzwirkung

<sup>14</sup> R. COX, W. G. OVEREND, A. R. PEACOCKE u. S. WILSON, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **149**, 511 [1958].

<sup>15</sup> J. A. V. BUTLER u. B. E. CONWAY, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. B **141**, 562 [1953].

<sup>16</sup> L. AUGENSTINE, Radiat. Res. **10**, 89 [1950].

<sup>20</sup> A. KLEINSCHMIDT, D. LANG u. R. K. ZAHN, Naturwissenschaften **1**, 16 [1960]; L. ROSSBERG, Dissertation, Frankfurt/M., 1961, unveröffentlicht.

der DNS-Helix charakteristische Teil der Dosis-effektkurven liegt zwischen 0 und 20 kr (Abb. 3 c), bzw. 0 und 50 kr (Abb. 3 d). Viskositätsmessungen und besonders elektronenmikroskopische Aufnahmen bestrahlter DNS zeigten<sup>20</sup>, daß die mittlere Kettenlänge in diesem Dosisbereich um 3 Zehnerpotenzen abnimmt, also von ca. 40 000 Å auf 40 Å, entsprechend ca. 12 Monomerpaaren/Bruchstück (bei 3,4 Å Abstand zwischen den Monomeren). Nehmen wir an, daß pro Kettenbruch an jedem Kettenende 3 Monomerpaare frei werden<sup>14</sup>, so sind in diesem Stadium ca. 50% der gebundenen Basen aus dem DNS-Molekül herausgelöst. Setzen wir in unserem Ausdruck

$$B^* = B_0(1 - e^{-\alpha D})^2$$

für  $B^*/B_0 = 0,5$ , so erhalten wir  $\alpha D = 1,2$ .

Für  $D$  zwischen 20 und 50 kr folgt daraus  $\alpha$  zwischen 5 und  $2 \cdot 10^{-2} \text{ kr}^{-1}$  in guter Übereinstimmung zu den mittels Gl. (6) berechneten Werten.

Die mit den  $\beta$ -Werten berechnete Ionenausbeute gibt an, wieviele Radikale notwendig sind, um die beobachtete Extinktionsabnahme durch Reaktion mit einer Base auszulösen. Da mit abnehmender DNS-Konzentration, besonders bei Anwesenheit von NaCl, ein Teil der in Wasser gebildeten Radikale anderweitig reagiert (z. B. mit den Cl-Ionen), wurde nach AUGENSTINE und HUTCHINSON<sup>16</sup> die reziproke Ionenausbeute gegen die reziproke DNS-Konzentration aufgetragen (Abb. 7). Man erhält Geraden, die gegen  $1/c_0 = 0$  extrapoliert, die reziproke Ionenaus-

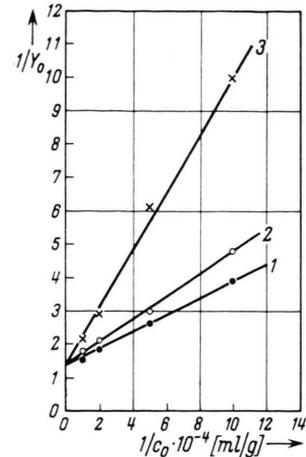


Abb. 7. Aus Extinktionsmessungen ermittelte Ionenausbeuten. Reziproke Ionenausbeute als Funktion der reziproken DNS-Konzentration  $1/c_0$ , Kurve 1: in dest. Wasser, Kurve 2: in 0,1-n. NaCl, Kurve 3: in 1-n. NaCl.

beute für unendlich hohe DNS-Konzentrationen ergeben und deren Steigung ein Maß für die Konzentration der Stoffe ist, die außer der DNS noch mit den Radikalen reagieren. Der Wert der Ionenausbeute ist demnach für alle DNS-Lösungen gleich 0,7. Berücksichtigt man den Feuchtigkeitsgehalt der lufttrocken eingewogenen DNS mit 20%, ergibt sich als endgültiger Wert 0,5, d. h. von je zwei gebildeten Radikalen löst nur eines den beobachteten Effekt, nämlich die Extinktionsabnahme durch Reaktion mit einer Base aus, während das andere wahrscheinlich mit dem verbleibenden Desoxyribosegerüst reagiert.

<sup>17</sup> J. G. CARLSON, J. Morph. **71**, 449 [1942].

<sup>18</sup> A. FRITZ-NIGGLI, Strahlenbiologie **1959**, 179.