

DNA, aber auch einfache Oligonucleotide bilden cholesterische Flüssigkristalle, deren Textur durch die Einwirkung von  $\gamma$ -Strahlen verändert wird. Über diesen Effekt, der die Grundlage für die Entwicklung eines Biosensors für  $\gamma$ -Strahlen sein könnte, berichten G. Gottarelli et al. auf den nächsten Seiten.



# Auf dem Weg zu einem Biosensor für $\gamma$ -Strahlen\*\*

Franciscus M. H. de Groot, Giovanni Gottarelli,\*  
Stefano Masiero, Gloria Proni, Gian Piero Spada und  
Nicoletta Dolci

Flüssigkristalle sind anisotrope Fluide, die einen gewissen Grad an Ordnung aufweisen. Auf dieser Eigenschaft basiert ihr Verhalten gegenüber schwachen äußeren Störungen und damit ihre Verwendung in vielen Display-Systemen. DNA<sup>[1]</sup> und Homoguanyl-Oligonucleotide<sup>[2]</sup> bilden in Wasser säulenartige cholesterische Flüssigkristalle. Die Ganghöhe der cholesterischen Strukturen kann direkt mit einem optischen Mikroskop aus den Abständen zwischen den Retardationslinien abgelesen werden, die in der sogenannten Fingerprinttextur auftreten.<sup>[3]</sup> Der Abstand zwischen zwei Linien beträgt die Hälfte der Ganghöhe. Somit können die Auswirkungen von Störungen, wie Temperaturänderungen und Zusatz von Ionen oder Farbstoffen,<sup>[4]</sup> auf die cholesterische Struktur leicht bestimmt werden, indem man direkt die Abstandsänderungen zwischen den Fingerprintlinien beobachtet.

Wir wollten nun prüfen, ob sich die Ganghöhe dieser „biologischen“ cholesterischen Flüssigkristalle als sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung erweist, da sich diese Phasen aus Molekülen zusammensetzen, von denen man annimmt, daß sie in lebenden Organismen die am stärksten strahlungssensitiven und die am meisten durch ionisierende Strahlung bedrohten Ziel-systeme sind. Außerdem scheint die cholesterische Struktur der DNA in den Chromosomen einiger primitiver Algen und selbst in Samenzellkernen vieler Spezies von Bedeutung zu sein.<sup>[5]</sup>

Die ersten Experimente wurden mit cholesterischen DNA-Strukturen durchgeführt, wobei die DNA eine mittlere Länge von  $100 \pm 20$  Basenpaare hatte. Die Proben wurden  $\gamma$ -Strahlung mit Dosen von 5 bis 200 kGy ausgesetzt. Die Ganghöhe vor der Bestrahlung betrug  $2.96 \pm 0.12 \mu\text{m}$ , und es konnte bis zu einer Dosis von 20 kGy keine signifikante Änderung beobachtet werden. Nach der Bestrahlung mit Dosen von 30 bis 100 kGy zeigte sich eine kleine Verringerung der Ganghöhe (ca. 8%). Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 200 kGy wurde die Lösung isotrop.

Diese Ergebnisse waren zwar entmutigend, wir nahmen aber an, daß die cholesterische Phase, die von 2'-Desoxyguanylyl-(3'  $\rightarrow$  5')-2'-desoxyguanosin [d(GpG)] gebildet wird, aus zwei einfachen Gründen gegenüber  $\gamma$ -Strahlung sensitiver sein könnte: Erstens sollte sich die Beschädigung eines Guanins im Dimer entscheidend auf den Selbstaggregationsprozeß auswirken und damit eventuell zur Bildung der cholesterischen Phase führen, und zweitens ist Guanin unter den vier Basen die sensitivste gegenüber strahlungsinduziertem oxidativen Streß.<sup>[6]</sup> Außerdem entsteht aus d(GpG)  $\cdot$  Na schon in niedriger Konzentration eine cholesterische Phase, und die Ganghöhe ist beträchtlich größer als bei DNA, so daß genauere Messungen möglich sind.

Der Effekt von  $\gamma$ -Strahlung auf die Ganghöhe ist in Abbildung 1 dargestellt, während Abbildung 2 die Fingerprint-Textur der Blindprobe und der Probe nach einer Dosis von 20 kGy zeigt.

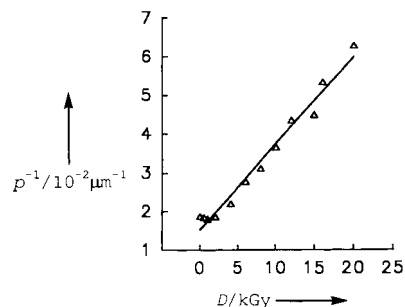


Abb. 1. Die inverse Ganghöhe  $p^{-1}$  der cholesterischen Phase von d(GpG) als Funktion der absorbierten Dosis  $D$  an  $\gamma$ -Strahlen. Der mittlere Fehler bei der Messung der Ganghöhe beträgt 9%.

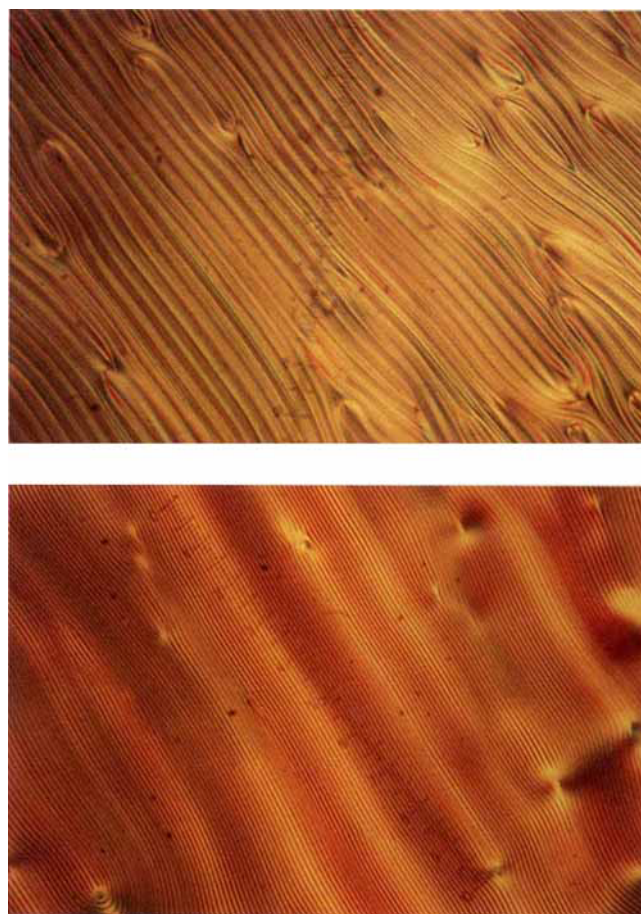


Abb. 2. Fingerprinttextur der cholesterischen Phase von d(GpG)  $\cdot$  Na. Oben: Unbestrahlte Referenzprobe (Originalvergrößerung 100  $\times$ ). Unten: Probe nach einer Strahlungsdosis von 20 kGy (Originalvergrößerung 100  $\times$ ).

Man erkennt zwischen 0 und 20 kGy eine lineare Abhängigkeit der inversen Ganghöhe (Twist) von der verwendeten Dosis. Erwähnenswerte Veränderungen treten ab 4 kGy auf, und die Verdrillung ändert sich von 0 bis 20 kGy um ungefähr 330%. Bei höheren Dosen konnte ein Übergang in die isotrope Phase beobachtet werden. Wir haben auch die optische Dichte der Proben bei 252 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  der Guanin-Absorption) gemessen und eine kleine linear verlaufende Erniedrigung festgestellt. Von 4

[\*] Prof. G. Gottarelli, Dr. S. Masiero, Dr. G. Proni, Prof. G. P. Spada, Dr. N. Dolci  
Dipartimento di Chimica Organica  
Università di Bologna  
via S. Donato, 15, I-40127 Bologna (Italien)  
Telefax: Int. + 51/244064  
E-mail: gottarel@alma.unibo.it (G. Gottarelli)  
F. M. H. de Groot  
Department of Organic Chemistry  
University of Nijmegen  
NSR-Center, Toernooiveld, 6525 ED, Nijmegen (Niederlande)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom CNR und MURST gefördert. Wir danken Dr. M. Tamba und Frau L. Vitali (CNR, Bologna) für die Durchführung der Strahlungsexperimente; F. M. H. de G. dankt für ein Stipendium im Rahmen des Erasmus-Programms (ICP-95-NL-1007/13).

bis 60 kGy tritt eine Konzentrationserniedrigung um 8% auf, was den Wegfall des Guaninchromophors kennzeichnet. Die Verringerung der Ganghöhe ist definitiv nicht auf die Konzentrationserniedrigung von d(GpG) zurückzuführen, die im Gegenteil zu längeren Ganghöhen führen sollte,<sup>[7]</sup> sondern auf die Bildung von Produkten mit höherem Verdrillungsbestreben: Beispielsweise ist das Verdrillungsbestreben von 2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat [5'(pG)], einem der möglichen Abbauprodukte, ca. doppelt so groß wie das von d(GpG) bei gleicher Chiralität.<sup>[7,8]</sup> Obwohl die Spaltung der Phosphodiestergruppe ein möglicher Abbaupfad ist, der zu Guanodin-Monomeren führt, handelt es sich dabei wahrscheinlich nicht um den Hauptabbaupfad.<sup>[9]</sup> Andere Abbauprodukte erhält man dagegen durch Angriff von OH-Radikalen auf die heterocyclische Base.<sup>[10]</sup> Die oben beschriebenen Experimente weisen auf eine geringere Sensitivität hin, als sie von klassischen chemischen Referenzmethoden (Fricke) bekannt ist.<sup>[11]</sup> Leider sind die Dosen, die zum direkten Ablesen unseres Displays nötig sind, sehr viel höher als die, die eine biologische Antwort in lebenden Organismen auslösen.

Die Sensitivität der Methode könnte verbessert werden, wobei sich verschiedene Möglichkeiten anbieten: Zugabe von Sensibilisatoren;<sup>[12]</sup> die Verwendung anderer Oligonucleotide; Experimente mit Flüssigkristallen in Gegenwart von Additiven wie Polyaminen oder basischen Polypeptiden, die die Bildung der cholesterischen Phase nicht inhibieren und die Situation in einer lebenden Zelle besser simulieren.<sup>[13]</sup> Ein alkalisches Medium fördert die Spaltung des Zucker-Phosphat-Rückgrats, sobald die Base zerstört worden ist,<sup>[12]</sup> und auch dieser Effekt könnte ausgenutzt werden. Berücksichtigt man, daß die Ganghöhe vor einer Bestrahlung ca. 58 µm beträgt, könnte die Probenzelle auf annähernd 300 µm verkleinert werden; diese Länge reicht aus, um fünf Fingerprintlinien zu lesen.

Nach unserer Kenntnis wurde die Wirkung ionisierender Strahlung auf Flüssigkristalle von DNA und Guanosin-Analoga bisher nicht untersucht. Man findet auch keine Angaben über die Abhängigkeit der cholesterischen Ganghöhe von einer Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen. Es gibt jedoch Daten, die die Änderung thermodynamischer und dielektrischer Eigenschaften nach Bestrahlung cholesterischer Strukturen, die aus Cholesterinderivaten aufgebaut sind, betreffen.<sup>[14]</sup>

### Experimentelles

Kalbthymus-DNA (Sigma) wurde wie in Lit. [4] beschrieben mit Ultraschall behandelt. Die DNA-Proben (32 Gew.-% in Wasser) wurden folgendermaßen hergestellt: ein Tropfen der Lösung wurde zwischen zwei Objektträgergläsern mit Hilfe des kommerziell erhältlichen SureSeal-Systems (Dicke 0.2 mm) als Spacer versiegelt. Pro Dosis wurden zwei Proben der Bestrahlung ausgesetzt, der Blindwert der Ganghöhe wurde mit zwölf Proben bestimmt. Das Dimer d(GpG) · Na wurde nach einer früher beschriebenen Methode synthetisiert und gereinigt [7]. Proben der cholesterischen Phase von d(GpG) (4.8 Gew.-% in Wasser) wurden hergestellt, in flachen Mikroobjektträgergläsern (Vitro Dynamics; Dicke 0.3 mm) versiegelt und einer Dosis von 1 bis 20 kGy verschieden lang (für jede Bestrahlungszeit wurden drei Gläser verwendet und die Experimente doppelt ausgeführt)  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt (<sup>60</sup>Co-Quelle; Dosisrate 38 Gy min<sup>-1</sup>). Damit sich die Fingerprintlinien bilden konnten, wurden die Mikrogläser in einem Magnetfeld (0.8 T) 4 h vorbehandelt [3b]. Zur Bestimmung der Ganghöhe wurde ein Zeiss-Mikroskop (Standard 16) verwendet.

Eingegangen am 12. Dezember 1996 [Z 9882]

**Stichworte:** Biosensoren · Desoxyguanosin · DNA-Strukturen ·  $\gamma$ -Strahlung

- [3] a) F. Livolant, *J. Phys.* **1986**, *47*, 1605–1616; b) R. Brandes, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5890–5895.
- [4] G. Gottarelli, G. P. Spada, P. Mariani, M. M. De Morais, *Chirality* **1991**, *3*, 227–232.
- [5] M. M. Giraud-Guille, *Int. Rev. Cytol.* **1996**, *166*, 59–101.
- [6] a) L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 699–704; b) T. Melvin, S. W. Botchway, A. W. Parker, P. O'Neill, *ibid.* **1996**, *118*, 10031–10036.
- [7] S. Bonazzi, M. Capobianco, M. M. De Morais, A. Garbesi, G. Gottarelli, P. Mariani, M. G. Ponzi Bossi, G. P. Spada, L. Tondelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5809–5816.
- [8] Tatsächlich verringerte sich die Ganghöhe in der cholesterischen Phase von  $45 \pm 6 \mu\text{m}$  auf  $17 \pm 1 \mu\text{m}$ , wenn man zu einer Lösung von d(GpG) · Na (6.8 Gew.-% in Wasser) 5'(pG) · Na (0.9 Gew.-%) zusetzte.
- [9] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 503–520.
- [10] a) S. Raoul, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Joshi, B. Morin, M. Weinfeld, J. Cadet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 371–381, zit. Lit.; b) M. Dizdargolu, *Biochemistry* **1985**, *24*, 4476–4481.
- [11] A. Dutreix, A. Bridier in *The Dosimetry of Ionizing Radiation*, Vol. 1 (Hrsg.: K. R. Kase, B. E. Bjärngard, F. H. Attix), Academic Press, Orlando, **1985**, S. 163–169.
- [12] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, *31*, 11 620–11 625.
- [13] J. Pelta, D. Durand, J. Doucet, F. Livolant, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 48–63.
- [14] a) S. J. Klosowicz, Z. B. Alfassi, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, *239*, 181–193; b) S. L. Srivastava, R. Dhar, *Radiat. Phys. Chem.* **1996**, *47*, 287–293.

## Die In-situ-Beobachtung des Wachsens und Lösens organischer Kristalle: ein erster Schritt zur Bestimmung der Aufbaulemente\*\*

David Gidalevitz, Robert Feidenhans'l,\* Sophie Matlis, Detlef-M. Smilgies, Morten J. Christensen und Leslie Leiserowitz\*

Das Wachstum von organischen Kristallen in einer Lösung findet an der Kristall-Flüssigkeits-Grenzfläche statt, deren lokale Struktur daher für die Zusammensetzung der Elementarzelle, den Wachstumsmechanismus und den Kristallhabitus entscheidend ist. Bisher sind zur In-situ-Untersuchung des Wachstums hauptsächlich optische Methoden herangezogen worden, die nicht nur im µm-Bereich Informationen lieferten,<sup>[1]</sup> sondern sogar über monomolekulare Stufen.<sup>[2,3]</sup> Mit der Entwicklung der Kraftmikroskopie<sup>[4]</sup> (Atomic Force Microscopy, AFM) wurde es möglich, die Kristall-Lösungsmittel-Grenzfläche auf der Subnanometer-Skala abzubilden.<sup>[5–8]</sup>

[\*] Prof. Dr. L. Leiserowitz, Dr. D. Gidalevitz,<sup>[+]</sup> Dr. S. Matlis  
Department of Materials and Interfaces, The Weizmann Institute of Science  
76100 Rehovot (Israel)  
Telefax: Int. + 8/9344138  
E-mail: csles@weizmann.weizmann.ac.il

Prof. R. Feidenhans'l, Dr. D.-M. Smilgies,<sup>[++]</sup> Dr. M. J. Christensen  
Department of Solid State Physics, Risø National Laboratory  
DK-4000 Roskilde (Dänemark)  
Telefax: Int. + 42/370115  
E-mail: robert@risoe.dk

[\*] Neue Adresse: Physics Department, University of Pennsylvania  
209 South 33 Street, Philadelphia, PA 19104 (USA)

[++] Neue Adresse: Experiments Division, European Synchrotron Radiation Facility  
F-38043 Grenoble Cedex (Frankreich)

[\*\*] Wir danken Ada Yonath und ihrer Gruppe am Max-Planck-Institut für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg, für die zur Verfügung gestellten Labor-einrichtungen und der HASYLAB-Belegschaft für ihre Hilfe sowie Meir Lahav, Isabelle Weissbuch und Ivan Kuzmenko für Diskussionen. Thomas Bräuniger, Weizmann Institute, sei für eine kritische Durchsicht des deutschen Manuskripts gedankt. Diese Arbeiten wurden von der Minerva-Stiftung, dem dänischen nationalen Forschungsrat und dem Fund for Basic Research der Israel Academy of Sciences and Humanities gefördert.

[1] C. Robinson, *Tetrahedron* **1961**, *13*, 219–234.

[2] G. Gottarelli, G. P. Spada, A. Garbesi in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 9 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn, J.-P. Sauvage, M. W. Hosseini), 1. Aufl., Elsevier, Oxford, **1996**, S. 483–506.