

DER EINFLUSS VON COFFEIN AUF DAS SCHMELZVERHALTEN VON DNS

H. LANG

*Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie
der Wissenschaften zu Berlin, DDR-4325 Gatersleben*

Received 17 August 1971

The interaction of caffeine with DNA has been studied at several ionic strengths by heat denaturation. At 2 mM K^+ caffeine produces a stabilization, but at 20 mM K^+ or higher a destabilization of secondary structure of DNA occurs. There is a correlation between heterogeneity and destabilization of DNA in presence of caffeine. In the pre-melting region a hyperchromic effect can be observed. It is suggested that two binding processes exists in the DNA-caffeine interaction.

1. Einleitung

Seit längerem ist die inhibierende Wirkung des Coffeins auf die Dunkelreparatur UV-bestrahlter Bakterien bekannt [1–5]. Als Mechanismus wird vielfach eine Inaktivierung der Reperaturenzyme durch Coffein angenommen [3, 6–9]. Neuere Untersuchungen lassen aber vermuten, dass die Reparaturinhibierung auf eine aktive DNS-Coffein Wechselwirkung zurückzuführen ist [10, 11]. Dabei sollen die Coffeinmoleküle bevorzugt am Ort der photochemisch veränderten DNS gebunden und somit eine Blockierung der DNS-Reparatur verursacht werden. Zur Klärung der dabei stattfindenden Bindungsprozesse wurde daher die DNS-Coffein Wechselwirkung in vitro untersucht.

2. Experimentelles

Coffein (DAB 7) wurde 24 Std. bei 115° getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet. Gewinnung und Charakterisierung der verwendeten DNS-Proben sind bei Sarfert und Venner [12, 13] beschrieben. Die DNS-Lösungen wurden bei 4° gegen die entsprechenden Puffer-Lösungen dialysiert und in einem Uvispek-Spektralphotometer (Hilger und Watts, Ltd., London) mit Temperiereinrichtung [14] vermessen. Die DNS-Konzentrationen betrugen $0.5-1 \times 10^{-4}$ Mol P.

3. Ergebnisse

Abb. 1 zeigt den Einfluss des Coffeins auf das Schmelzverhalten von Kalbsthymus-DNS in 0,2 M K^+ - und 0,02 M K^+ -Lösung. Wie schon von Ts'o et al. [15] beobachtet, wird durch Coffein unter diesen ionalen Bedingungen eine Abnahme der thermischen Stabilität der DNS (Abnahme der T_m -Werte) verursacht. Die destabilisierende Wirkung des Coffeins nimmt mit steigender Coffeinkonzentration zu (inneres Bild). Darüberhinaus liess sich eine signifikante Hyperchromie im Vorschmelzbereich in Anwesenheit von Coffein feststellen, deren Konzentrationsabhängigkeit in Abb. 2 widergegeben ist. In 0,002 M K^+ -Lösung (Abb. 3) wird durch Coffein der entgegengesetzte Effekt hervorgerufen. Bis zu einem Phosphat/Coffein-Verhältnis (P/Cf) von 2–3 ist eine Stabilitätserhöhung der DNS (Zunahme der T_m -Werte) zu verzeichnen. Weitere Erhöhung der Coffeinkonzentration bewirkt dann ein Absinken der T_m -Werte wie im vorhergehenden Fall (inneres Bild). Die Untersuchungen mit DNS verschiedenen GC-Gehaltes liessen keine eindeutige GC-Abhängigkeit des Coffeineinflusses auf die thermische Denaturierung erkennen. Überraschenderweise ergab sich eine Korrelation zwischen der Heterogenität der nativen DNS und der T_m -Erniedrigung durch Coffein (Abb. 4).

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass sich bei der Wechselwirkung der Coffeinmoleküle mit der DNS zwei konzentrations-abhängige Bindungseffekte

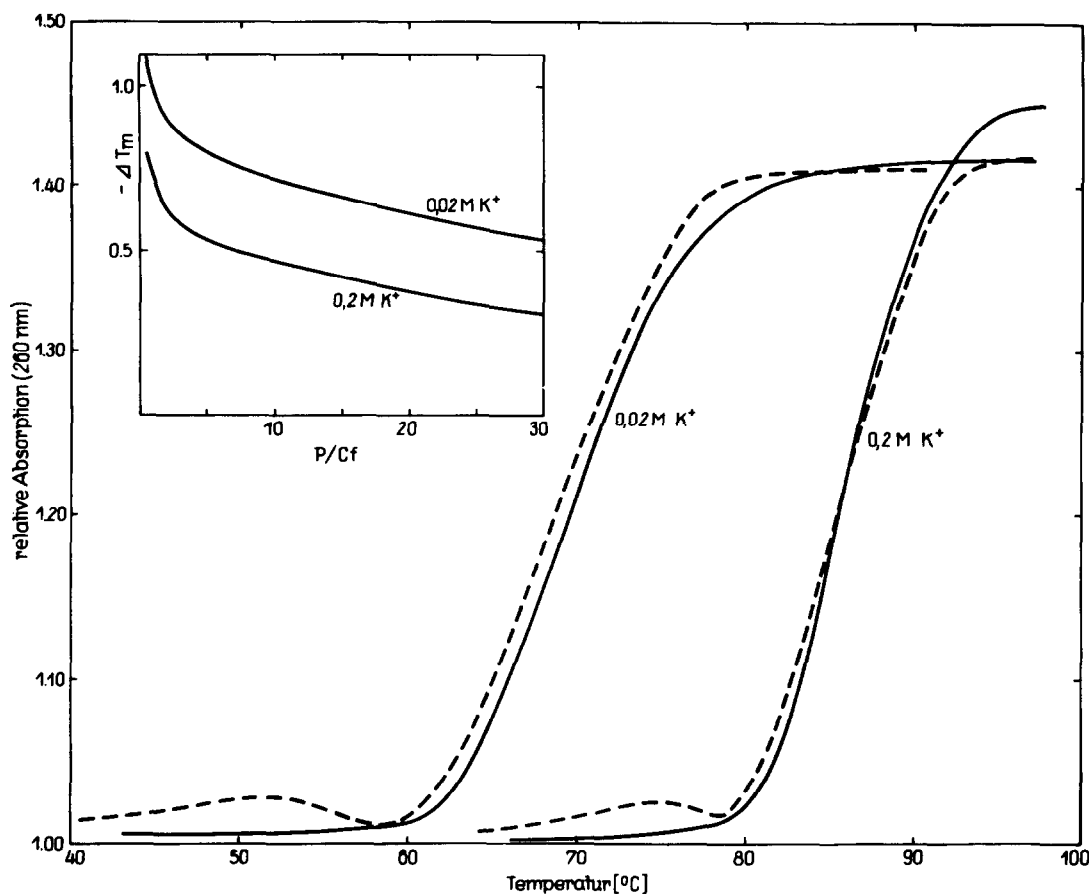


Abb. 1. Schmelzkurve von Kalbsthymus-DNS in Anwesenheit von Coffein in 0,016 M KCl + 0,001 M K₄EDTA und 0,196 M KCl + 0,001 M K₄EDTA, pH 7; (—) native; (----) Phosphate/Coffein-Verhältnis (P/Cf) = 1. Inneres Bild: Abhängigkeit des Schmelzpunktes (T_m) von der Coffeinkonzentration.

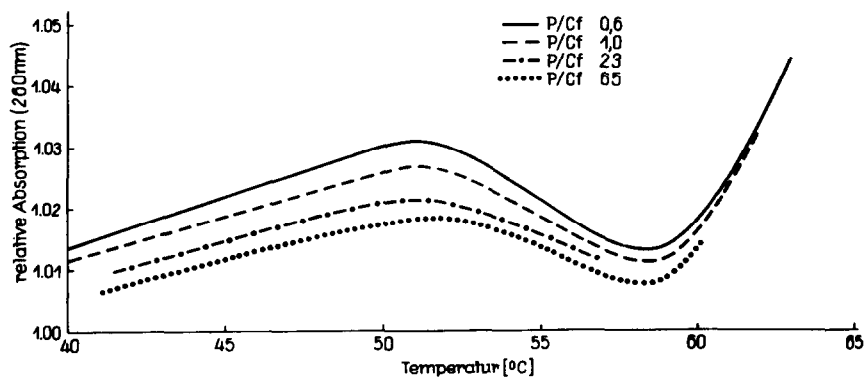


Abb. 2. Einfluss von Coffein auf die relative Absorption von Kalbsthymus-DNS in Vorschmelzbereich in 0,016 M KCl + 0,001 M K₄EDTA, pH 7.

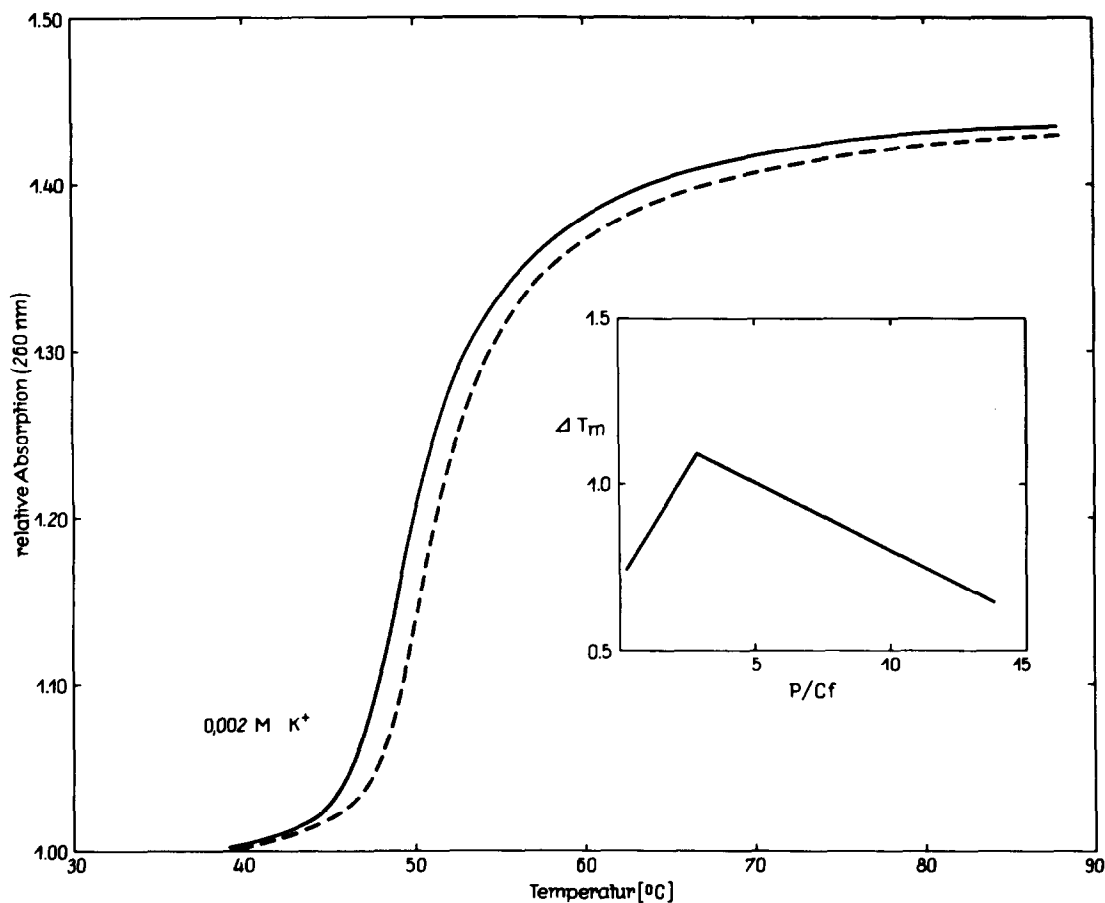


Abb. 3. Schmelzkurve von Kalbsthymus-DNS in Anwesenheit von Coffein in 0,0016 M KCl + 0,0001 M K₄EDTA, pH 7; (—) native; (---) P/Cf = 1. Inneres Bild: Abhängigkeit des Schmelzpunktes (T_m) von der Coffeinkonzentration.

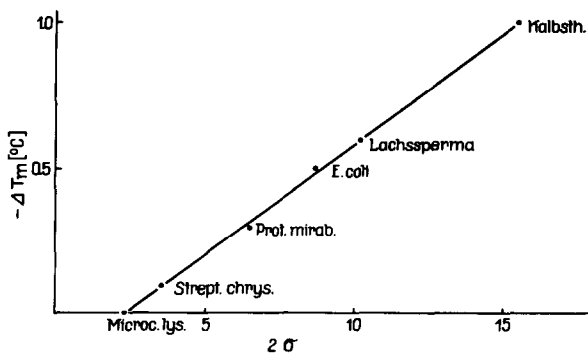


Abb. 4. Abhängigkeit der T_m -Erniedrigung durch Coffein von der Heterogenität der nativen DNS in 0.016 M KCl + 0,001 M K₄EDTA, pH 7; P/Cf = 1.

überlagern. Der destabilisierende Einfluss des Coffeins tritt dabei bevorzugt bei höheren Coffeinkonzentrationen und mittleren Ionenstärken auf (Abb. 1). Das Auftreten einer Hyperchromie vor Beginn des Helix-Knäuel-Überganges kann auf eine unterschiedliche Bindungsaffinität der Coffeinmoleküle zum AT- und GC-Basenpaar zurückgeführt werden und steht offensichtlich in Zusammenhang mit der Heterogenität der DNS [16]. Bekanntlich nimmt mit steigender Heterogenität der DNS-Moleküle die Anzahl AT-reicher Spezies in einer DNS-Population zu [17]. Durch Coffeinmoleküle würde dann der als Keimbildung diskutierte Prozess (Nucleation) [18, 19] bei der Denaturierung in diesen Zentren noch verstärkt und grössere Molekülabschnitte umorientiert werden. ORD- und CD-Messungen bestätigen diese Annahme. Über diese und weitere Resultate wird an anderer Stelle berichtet.

Danksagung

Für die Isolierung der DNS-Proben bin ich Frl. Chem.-Ing. E. Sarfert zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. Ch. Zimmer danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Literatur

- [1] E.M. Witkin, X. Intern. Congr. Genet. 1 (1958) 280.
- [2] M. Lieb, Z. Vererbungstl. 92 (1961) 416.
- [3] W. Sauerbier, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14 (1964) 340.
- [4] K. Metzger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 101.
- [5] H. Böhme, Studia Biophysica 19 (1970) 159.
- [6] K. Shimada und Y. Takagi, Biochim. Biophys. Acta 145 (1967) 763.
- [7] A.S. Sideropolus und D.M. Shankel, J. Bacteriol. 96 (1968) 198.
- [8] C.H. Clarke, Mutation Res. 8 (1969) 35.
- [9] D. Roulland-Dussoix, Mutation Res. 4 (1967) 241.
- [10] G.W. Grigg, Mol. Gen. Genet. 102 (1968) 316.
- [11] W. Witte, Diplomarbeit, Halle (1969).
- [12] E. Sarfert und H. Venner, Z. Physiol. Chem. 340 (1965) 157.
- [13] E. Sarfert und H. Venner, Z. Allg. Mikrobiol. 9 (1969) 153.
- [14] Ch. Zimmer und H. Venner, Z. Physiol. Chem. 355 (1964) 139.
- [15] P.O.P.Ts'o, G.K. Helmkamp und C. Sander, Proc. Natl. Acad. Sci. 48 (1962) 686.
- [16] H. Land, in Vorbereitung.
- [17] J. Šponar, L. Pivec und Z. Šormova, Coll. Czech. Chem. Commun. 29 (1968) 2077.
- [18] D.M. Crother, Biopolymers 6 (1968) 139.
- [19] H. Berg, Ju.M. Jewdokimov und Ja.M. Warschawsky, Studia Biophysica 13 (1969) 135.