

# Über die oxidative Hauptkettenpaltung einiger Nukleinsäuren – Pulsradiolytische Untersuchungen

On the Oxidative Main-Chain Scission of Nucleic Acids – Pulse Radiolysis Studies

Otmar Denk und Wolfram Schnabel

Hahn-Meitner-Institut für Kernforschung Berlin GmbH, Bereich Strahlenchemie,  
Glienicker Str. 100, D-1000 Berlin 39, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. 37 c, 405 – 412 (1982); received February 1/March 16, 1982

Nucleic Acids, Main-Chain Scission, Peroxyl Radicals, Intra- and Intermolecular Reactions,  
Pulse Radiolysis

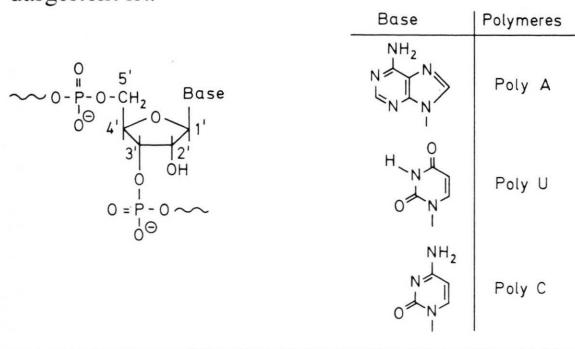
Polyriboadenylic acid, polyribocytidylic acid and polyribouridylic acid were irradiated with 16 MeV electrons in aqueous solution. Part of the OH radicals generated during the radiolysis of water reacted with the sugar moieties of the polynucleotides. Subsequently formed peroxy radicals reacted with each other thus forming oxyl radicals whose decay led to main-chain scissions with the consequence of a decrease of the light scattering intensity (LSI). In the case of single-stranded polynucleotides, the analysis of the LSI decay curves revealed the occurrence of two processes. The rapid mode was assigned to the intramolecular and the slow mode to the intermolecular reaction of peroxy radicals. For the rate constant of the rapid process (activation energy: 5 kcal/mol) a pronounced kinetic salt effect was observed.

In the case of double-stranded polynucleotides (polyA and polyC at pH 4, poly(A+U) at pH 8) the same effects were observed as with native calf thymus DNA in a former study [9]: The LSI decreased only after a critical dose was surpassed. A rapid process was followed by a slow one. The slow process is assigned to the melting of H-bridges located at bases between main-chain scissos in the double helix. The rapid process corresponds to the separation of fragments formed by two single strand breaks laying very close to each other on opposite sites in the double helix.

## Einleitung

### (a) Mechanistische Aspekte

Gegenstand der hier beschriebenen Untersuchungen sind Reaktionen des Sauerstoffs mit freien Nukleinsäureradikalen, die durch den Angriff von OH-Radikalen erzeugt werden. Die Versuche wurden mit Polyriboadenylylsäure (PolyA), Polyribocytidylsäure (PolyC) und Polyribouridylsäure (PolyU) durchgeführt, deren Struktur im folgenden dargestellt ist:



Reprint requests to Prof. Dr. W. Schnabel.

0341-0382/82/0500-0405 \$ 01.30/0

OH-Radikale können die Makromoleküle an verschiedenen Stellen angreifen: Sie können Wasserstoffatome der Zuckerbausteine abstrahieren oder sie können an die Basen addiert werden. Aufgrund der aus Versuchen mit Modellsubstanzen bekannten Reaktivitätsverhältnisse lässt sich abschätzen, daß die Wahrscheinlichkeit für die Addition eines OH-Radikals an der Base etwa 0,7 bis 0,8 beträgt.

In dieser Arbeit sollen nur Reaktionen, die zur Spaltung von Bindungen in den Hauptketten führen, behandelt werden, d. h. nur Reaktionen von Radikalen, die durch H-Abstraktion an den Zuckerbausteinen entstehen. Kinetik und Mechanismus der Reaktionen von Sauerstoff mit „Basenradikalen“, die durch OH-Addition entstehen, sind von Michaels und Hunt [1] vor einiger Zeit untersucht worden. Sie verursachen keine Hauptkettenpaltungen. Mit dem Mechanismus des oxidativen Hauptkettenabbaus haben sich von Sonntag und Schulte-Frohlinde [2] eingehend befaßt. Für Makroradikale, die durch H-Abstraktion am C-Atom in Position 5' entstehen, wurde für die DNS ein Mechanismus vorgeschlagen, der sich, auf den Fall von Ribonukleinsäuren übertragen, wie folgt darstellt:

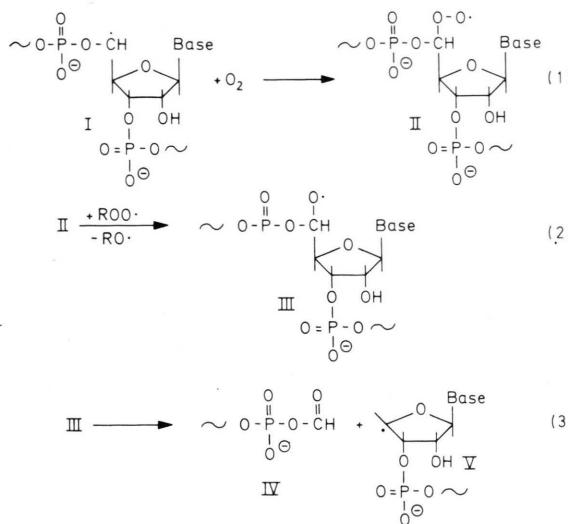


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

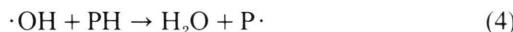
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

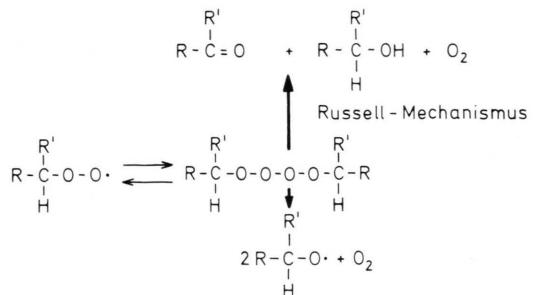


Prinzipiell ist denkbar, daß – ähnlich dem mit den Reaktionen (1)–(3) präsentierten Mechanismus – auch H-Abstraktionen an C-Atomen in anderen Positionen zu Hauptkettenspaltungen führen, jedoch wurden bisher Endprodukte, die auf derartige Mechanismen schließen lassen, nicht gefunden [2]. Dieser Aspekt soll hier nicht weiter vertieft werden, da im folgenden Molekülgrößenänderungen behandelt werden, die mit zeitaufgelösten Lichtstreuungsmessungen untersucht wurden. Diese Untersuchungen lieferten interessante Ergebnisse in bezug auf polymerspezifische kinetische Fragen, insbesondere hinsichtlich des Nachweises und des Ablaufs intramolekularer Reaktionen. Sie führten jedoch nicht zu neuen Erkenntnissen hinsichtlich der chemischen Natur der Hauptkettenspaltung. Für die formal-kinetische Behandlung der Hauptkettenspaltung soll daher weiterhin das nachfolgend dargestellte vereinfachte allgemeine Reaktionsschema dienen:



PH: intakte Makromoleköl, P·: Makroradikal,  $\text{PO}_2 \cdot$ : Peroxylradikal,  $\text{PO}\cdot$ : Oxyradikal,  $\text{F}_1$  und  $\text{F}_2$ : Makromolekölfragment bzw. Fragmentradikal.

Weitläufig verbreiteten Vorstellungen entsprechend [10] wird bei der Kombination von Peroxylradikalen ein Tetroxid als Zwischenprodukt gebildet, das – wie in Schema 1 dargestellt – über zwei

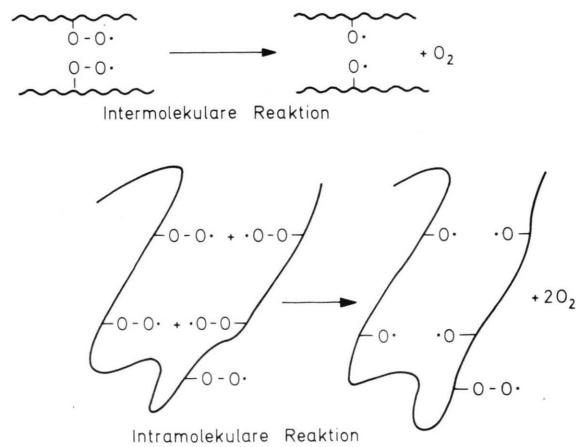


Schema 1. Reaktionen von Peroxylradikalen.

Routen zerfallen kann. Zu beachten ist, daß der Russell-Mechanismus nicht zur Hauptkettenspaltung führt.

Mit Hilfe der Pulsradiolyse-Methode lassen sich in einer verdünnten wäßrigen Polymer-Lösung leicht gleichzeitig, d. h. innerhalb eines 100 ns-Pulses, so viele  $\cdot\text{OH}$ -Radikale erzeugen, daß entsprechend Reaktion (4) mehrere Radikalstellen pro Makromoleköl (Radikalstellendichte  $Z_R > 1$ ) gebildet werden. Wie im Schema 2 gezeigt, können dann sowohl intra- als auch intermolekulare Radikal-Radikal-Reaktionen ablaufen. Bei einer mittleren Radikalstellendichte von  $Z_R = 1$  reagieren bereits 60% der Radikale intramolekular [3].

In einer früheren Arbeit [4] über die Kinetik des oxidativen Abbaus von Polyethylenoxid wurde gezeigt, daß der mit Hilfe zeitlich aufgelöster Lichtstreuungsmessungen erfaßbare Hauptkettenabbau gemäß dem allgemeinen Schema (Reaktion (4)–(7)) abläuft, daß Reaktion (6) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Reihe von Folgereak-



Schema 2. Inter- und intramolekulare Reaktion von Peroxylradikalen.

tionen ist, die zur Hauptkettenbspaltung führen und daß intramolekulare von intermolekularen Reaktionen unterschieden werden können. Analoge Ergebnisse erhielten wir bei der Untersuchung des oxidativen Hauptkettenabbaus der in dieser Arbeit behandelten Nukleinsäuren. Entsprechend dem Polyelektrolyt-Charakter dieser Nukleinsäuren führt die H-Abstraktion zur Bildung von Polyion-Makroradikalen, was sich dahin auswirkte, daß sich für die Geschwindigkeitskonstante der Peroxylradikal-Kombination ein signifikanter kinetischer Salzeffekt nachweisen ließ.

(b) Analyse der Lichtstreuungsdaten

Betrachtet man eine verdünnte Polymerlösung, in der die Makromoleküle separiert vorliegen, so kann grundsätzlich die Geschwindigkeit der durch die Hauptkettenbspaltung verursachten Abnahme der Lichtstreuungsintensität (nach der Einwirkung eines Lichtblitzes, Elektronenpulses o. ä.) der Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion (Fall (a)) oder der Geschwindigkeit der Separierung der Fragmente (Fall (b)) entsprechen [5]. Im folgenden wird der für diese Arbeit relevante Fall (a) unter der Maßgabe behandelt, daß die Geschwindigkeit der Änderung der Lichtstreuungsintensität der Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion 2. Ordnung entspricht. Im Falle des oben angeführten Reaktionsschemas wäre die Reaktion (6) als geschwindigkeitsbestimmend anzusehen. Für die allgemeine Behandlung des Falles (a) wird die Konzentration der Makroradikale am Beginn der Reaktion und zur Zeit  $t$  mit  $[R\cdot]_0$  und  $[R\cdot]_t$  bezeichnet. Geht man davon aus, daß

$$([R\cdot]_0 - [R\cdot]_t) \propto \alpha_t \quad (I)$$

und daß

$$[R\cdot]_0 \propto \alpha_\infty \quad (II)$$

( $\alpha$ : Zahl der gespaltenen Bindungen pro Grundeinheit des Homopolymeren), so ergibt sich für den Fall der Kinetik nach 2. Ordnung

$$\frac{[R\cdot]_t}{[R\cdot]_0} = \frac{\alpha_\infty - \alpha_t}{\alpha_\infty} = \frac{\tau_2}{t + \tau_2}, \quad (III)$$

$$\alpha_t = \frac{(\alpha_\infty - \alpha_t) t}{\tau_2}. \quad (IV)$$

$\tau_2$ : 1. Halbwertzeit

$$k_2 c_2 [R\cdot]_0 = 1$$

Ein Zusammenhang zwischen der Kinetik der Radikaldesaktivierung nach Reaktion (6) und der

Änderung der Lichtstreuungsintensität läßt sich mit Hilfe der Debye-Gleichung herstellen

$$\frac{K c I_P}{I_0} = \frac{1}{P_0 m n_w} + 2 A_2 c. \quad (V)$$

$K = (4\pi^2 n_0^2 / \lambda_0^4 N_L) (dn/dc)^2$ ,  $c$ : Polymerenkonzentration ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ),  $I_P$ : Intensität des Primärlichtes,  $I_0$ : Intensität des vom Polymeren gestreuten Lichtes,  $P_0$ : Streufunktion,  $m$ : Molekulargewicht der Grundeinheit,  $n_w$ : Polymerisationsgrad (Gewichtsmittel),  $A_2$ : 2. Virialkoeffizient,  $N_L$ : Loschmidttsche Zahl,  $\lambda_0$ : Wellenlänge des Analysenlichtes,  $\tilde{n}_0$ : Brechungsindex,  $dn/dc$ : Brechungsindexinkrement.

Für  $\theta = 90^\circ$  ergibt sich für eine anfängliche Poissonverteilung mit  $(n_w/n_n) = 2$  unter der Maßgabe, daß Änderungen von  $P_0$  und  $A_2$  vernachlässigbar sind und daß die mit Hilfe eines Photomultipliers gemessene Signalspannung  $U$  der Lichtstreuungsintensität proportional ist:

$$\alpha_t \propto \left( \frac{1}{U_t} - \frac{1}{U_0} \right) = \frac{U_0 - U_t}{U_0 \cdot U_t}. \quad (VI)$$

Unter Berücksichtigung von Gl. (III) ergibt sich

$$\frac{[R\cdot]_t}{[R\cdot]_0} = \frac{\tau_2}{t + \tau_2} = \frac{\frac{1}{U_\infty} - \frac{1}{U_t}}{\frac{1}{U_\infty} - \frac{1}{U_0}} = \frac{U_0(U_t - U_\infty)}{U_t(U_0 - U_\infty)}, \quad (VII)$$

Gl. (VII) kann wie folgt umgeformt werden:

$$\frac{U_0 - U_t}{U_0 t} = \frac{U_t}{\tau_2 U_\infty} - \frac{1}{\tau_2}. \quad (VIII)$$

Sofern  $U_0$  eindeutig bestimmbar ist, lassen sich durch Auftragen von  $(U_0 - U_t)/U_0 t$  als Funktion von  $U_t$  Werte für  $\tau_2$  und  $U_\infty$  ermitteln. Wenn die durch einen bestimmten Prozeß verursachte Änderung der Lichtstreuungsintensität durch vorgesetzte oder nachfolgende Vorgänge überlagert ist, so sind  $U_0$  und  $U_\infty$  nicht eindeutig bestimmbar.  $\tau_2$  kann in einem derartigen Fall ermittelt werden, indem  $U_t$ ,  $U_{t+\Delta t}$ -Wertepaare bestimmt werden.  $\Delta t$  ist ein konstanter Zeitbetrag, der klein ist gegenüber dem Zeitbereich, in dem der zu untersuchende Prozeß abläuft. Es gilt dann entsprechend Gl. (IV)

$$\alpha_{t+\Delta t} = \frac{(\alpha_\infty - \alpha_{t+\Delta t})(t + \Delta t)}{\tau_2}. \quad (IX)$$

Subtrahiert man Gl. (IX) von Gl. (IV), so ergibt sich:

$$\alpha_t - \alpha_{t+\Delta t} = \frac{1}{\tau_2} \left[ \Delta t \alpha_{t+\Delta t} + t(\alpha_{t+\Delta t} - \alpha_t) \right] - \frac{\Delta t \alpha_\infty}{\tau_2}. \quad (X)$$

Unter Berücksichtigung von Gl. (VI) erhält man:

$$\frac{1}{U_t} - \frac{1}{U_{t+\Delta t}} = \frac{1}{\tau_2} \left[ \frac{\Delta t}{U_{t+\Delta t}} + t \left( \frac{1}{U_{t+\Delta t}} - \frac{1}{U_t} \right) \right] - \frac{\Delta t}{\tau_2 U_\infty}. \quad (\text{XI})$$

Mit

$$(1/U_t) - (1/U_{t+\Delta t}) = Y$$

und

$$(\Delta t/U_{t+\Delta t}) + (t/U_{t+\Delta t} - t/U_t) = X$$

wird aus Gl. (XI):

$$Y = \frac{X}{\tau_2} - \frac{\Delta t}{\tau_2 U_\infty}. \quad (\text{XI}')$$

Die Auftragung  $Y=f(X)$  ergibt im Falle einer Reaktion 2. Ordnung eine Gerade mit der Steigung  $1/\tau_2$ .

## Experimenteller Teil

### (a) Polynukleotide und Herstellung der Lösungen

PolyA ( $M_w = 300\,000$ , Boehringer), PolyC ( $M_w = 500\,000$ , Sigma) und PolyU ( $M_w = 280\,000$ , Boehringer) wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Als Lösungsmittel für die Messungen bei pH 8 wurde wäßrige Phosphatpufferlösung benutzt. Zur Einstellung der Gesamtionenstärke wurde  $\text{NaClO}_4$  verwendet. Als Lösungsmittel für die Messungen bei pH 4 dienten  $\text{NaClO}_4$ -Lösungen, denen  $\text{HClO}_4$  zugesetzt wurde. Die Lösungsmittel wurden durch Membranfilter (Sartorius, Porenweite  $0,2\ \mu\text{m}$ ) filtriert. Zur Auflösung wurden die Polymeren über Nacht im Lösungsmittel stehengelassen und danach eine Stunde geschüttelt. Dann wurden die Lösungen durch Membranfilter (Porenweite  $0,45\ \mu\text{m}$ ) filtriert. Im Falle der Messungen bei pH 4 wurden die Lösungen vor dem Ansäuern filtriert. Vor der Bestrahlung wurden die Lösungen 20 min lang mit  $\text{O}_2$  oder mit  $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  (4:1)-Mischungen begast.

### (b) Bestrahlung der Lösungen

Die Lösungen wurden mit 50, 100 oder 200 ns Einzelpulsen von 16 MeV-Elektronen, die mit einem L-Band-Linearbeschleuniger (Vickers) erzeugt wurden, in einer Quarzzelle, die Teil eines Fließsystems war, bestrahlt. Als Quelle für das Analysenlicht ( $\lambda_0 = 514\ \text{nm}$ ) für die Lichtstreuungsmessungen

wurde ein Argon-Ionen-Laser (Modell 165) der Firma Spectra Physics benutzt. Weitere Einzelheiten sind bereits früher mitgeteilt worden [5].

## Ergebnisse und Diskussion

### (a) Einzelsträngige Polynukleotide

#### (a-1) Phänomenologisches

Die Bestrahlung der drei Polynukleotide in  $\text{O}_2$ -gesättigter wäßriger Lösung bei pH 8 ergab prinzipiell gleichartige Ergebnisse. In allen drei Fällen wurde eine Erniedrigung der LSI nach dem Puls infolge Hauptkettenabbaus festgestellt. Wenn die  $\cdot\text{OH}$ -Radikale durch Isopropanol (0,1 mol/l) abgefangen wurden, erfolgte kein Hauptkettenabbau. Ein typisches Resultat zeigt die Abb. 1, in der zwei Oszillographenbilder die Abnahme der LSI von PolyA in verschiedenen Zeitbereichen wiedergeben. Ferner ist in der Abb. 1 die der LSI proportionale Signalspannung gegen den Logarithmus der Zeit aufgetragen. Man erkennt, daß der Abfall der LSI den Ablauf mehrerer Vorgänge widerspiegelt. Eine typische Auftragung nach 2. Ordnung entsprechend Gl. (VIII) in Abb. 2 zeigt, daß die Abnahme der LSI im wesentlichen zwei Vorgängen zuzuordnen ist, die im ms- bzw. im s-Bereich ablaufen. Der schnelle Vorgang überwiegt.

Wie die Abb. 3 zeigt, nimmt das Ausmaß des Gesamtabfalls mit steigender absorbierte Dosis pro Puls zunächst zu, um bei höheren Dosen einem

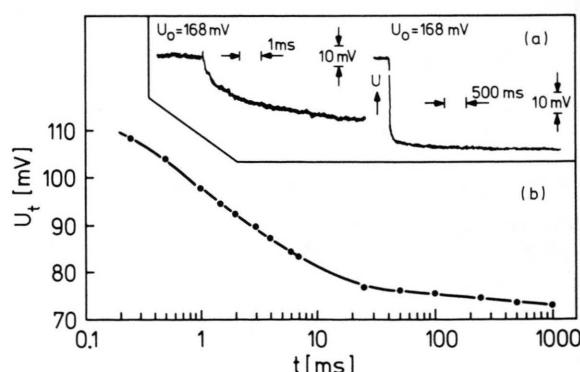


Abb. 1. Hauptkettenabbau einzelsträngiger PolyA (0,2 g/l) in  $\text{O}_2$ -gesättigter Phosphatpuffer-Lösung (pH 8, Ionenstärke: 0,1 mol/l) bei Raumtemperatur. Absorbierter Dosis pro Puls: 5,6 krad, Pulsdauer: 50 ns. (a) Oszillographenbilder, die die Abnahme der LSI nach dem Puls darstellen, (b) die Photomultiplier-Signalspannung als Funktion der Zeit.

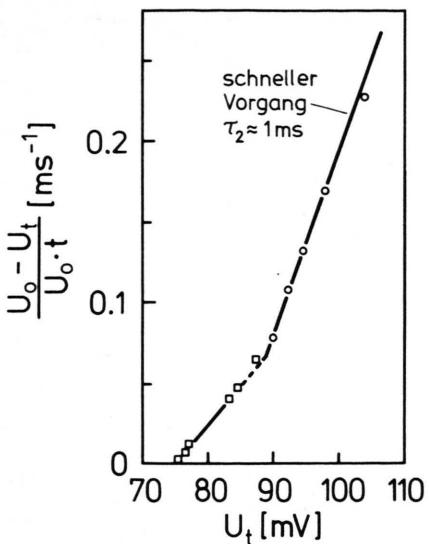


Abb. 2. Auftragung entsprechend Gl. (VIII) zur Ermittlung der ersten Halbwertszeit 2. Ordnung. PolyA (0,2 g/l) in  $O_2$ -gesättigter Phosphatpuffer-Lösung (pH 8, Ionenstärke: 0,1 mol/l) bei Raumtemperatur. Absorbierte Dosis pro Puls: 5,6 krad.

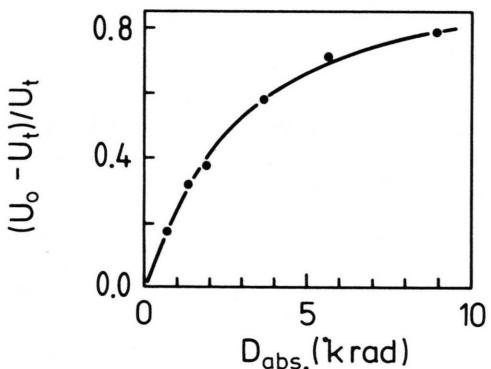


Abb. 3. Hauptkettenabbau einzelsträngiger PolyA (0,2 g/l) in  $O_2$ -gesättigter Phosphatpuffer-Lösung (pH 8, Ionenstärke: 0,1 mol/l) bei Raumtemperatur. Der relative Abbaugrad als Funktion der absorbierten Dosis pro Puls.  $U_t$  wurde bei  $t = 4$  s abgelesen.

Sättigungswert zuzustreben. Ursache dafür ist die Tatsache, daß Änderungen von  $A_2$  und  $P_3$  nicht mehr vernachlässigbar sind, so daß bei höheren absorbierten Dosen das Verhältnis  $(U_0 - U_\infty)/U_\infty$  nicht mehr dem Abbaugrad  $\alpha_\infty$  proportional ist. Dies ist jedoch ohne Einfluß auf die Kinetik des Abfalls der Lichtstreuungsintensität, wenn deren Änderung lediglich durch Hauptkettenbspaltungen, d. h. durch eine Erniedrigung des mittleren Moleku-

largewichts verursacht wird. Diese Bedingung ist beim hier untersuchten oxidativen Abbau von PolyA, PolyC und PolyU erfüllt. Bei allen Versuchen, d. h. im Dosisbereich von 0,5 bis 17 krad pro Puls, wurde ein Verhalten beobachtet, wie es in den Abb. 1 und 2 dargestellt ist. In allen Fällen setzte sich der Abfall der LSI, unabhängig von der absorbierten Dosis, aus zwei Anteilen zusammen.

Wie aus Abb. 4 hervorgeht, ist die reziproke erste Halbwertszeit zweiter Ordnung des schnellen Vorgangs, ermittelt nach Gl. (VIII), der absorbierten Dosis pro Puls proportional. Eine derartige Abhängigkeit erwartet man, sofern die Geschwindigkeit des Abfalls der LSI der Geschwindigkeit der Reaktion (6) entspricht. Denn es gilt unter Berücksichtigung der Kinetik 2. Ordnung  $(\tau_2)^{-1} = k_2 [PO_2]_0 \propto k_2 D_{abs}$ . Die Aktivierungsenergie der Konstanten  $k_2$  wurde zu 5 kcal/mol bestimmt. Versuche mit PolyA-Lösungen, die mit  $N_2O/O_2$ -Mischungen (4:1) gesättigt worden waren, ergaben prinzipiell gleichartige Ergebnisse wie Versuche mit  $O_2$ -gesättigten Lösungen. Da in letzteren die hydratisierten Elektronen durch  $O_2$  abgefangen werden ( $e^-_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^-$ ), besteht die Möglichkeit, daß Makroradikale vom Typ  $P\cdot$ ,  $PO_2\cdot$  oder  $PO\cdot$  mit  $O_2^-$  reagieren, und daß dadurch der Hauptkettenabbau beeinflußt wird. Diese Möglichkeit kann aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

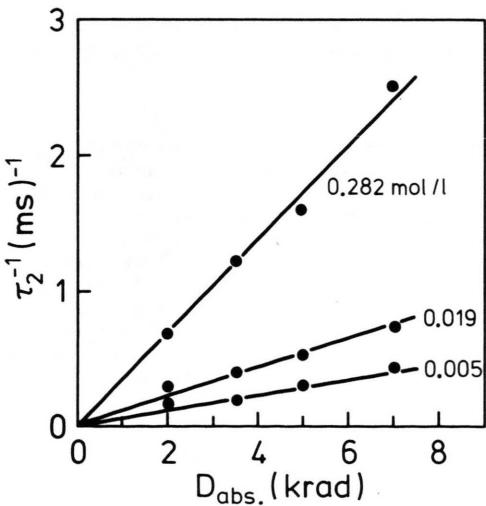


Abb. 4. Die reziproke Halbwertszeit des schnellen LSI-Abfalls als Funktion der absorbierten Dosis pro Puls für Lösungen unterschiedlicher Ionenstärke (Zahlenwerte an den Geraden) PolyA (0,1 g/l) in  $O_2$ -gesättigter  $NaClO_4$ -Lösung.

### (a-2) Intramolekulare Radikal-Radikal-Reaktionen

Die Ergebnisse lassen auf zweifache Weise erkennen, daß ein beachtlicher Anteil der Peroxylradikale intramolekular entsprechend Reaktion (6) reagiert, sofern die absorbierte Dosis genug ist:

1) Der Anteil des schnellen LSI-Abfalls am Gesamtabfall nimmt bei konstanter Polymerenkonzentration mit steigender absorbierte Dosis pro Puls zu, wie aus Tab. I hervorgeht. Mit steigender absorbierte Dosis pro Puls wird  $Z_R$ , die mittlere Zahl der Radikalstellen pro Makromolek, größer und damit nimmt in verdünnter Lösung die Wahrscheinlichkeit für intramolekulare Radikal-Radikal-Reaktionen zu. Für  $D_{\text{abs}} = 1 \text{ krad}$ ,  $G(\text{OH}) = 2.6 \text{ Radikale}/100 \text{ eV}$ ,  $c = 0.2 \text{ g/l}$  und  $\bar{M}_n = 1.5 \times 10^5$  ist  $Z_R \approx 2$ , so daß – wie aus Abb. 5 hervorgeht – die Mehrzahl der Peroxylradikale intramolekular reagieren sollte.

2) Bei konstanter absorbierte Dosis pro Puls nimmt  $Z_R$  mit steigender Polymerenkonzentration ab. Es ist anzunehmen, daß bei nicht zu hohen Werten von  $Z_R$  die Geschwindigkeit der intramolekularen Radikal-Radikal-Reaktionen mit sinkendem  $Z_R$  abnimmt. Wie die Abb. 6 für den Fall von PolyA zeigt, nimmt die Halbwertszeit des schnellen Vorgangs mit steigender Polymerenkonzentration zu, d. h. die Geschwindigkeit nimmt, wie erwartet, ab.

### (a-3) Kinetischer Salzeffekt

Die Reaktionen von Polyionmakroradikalen werden durch in der Lösung vorhandene niedermoleku-

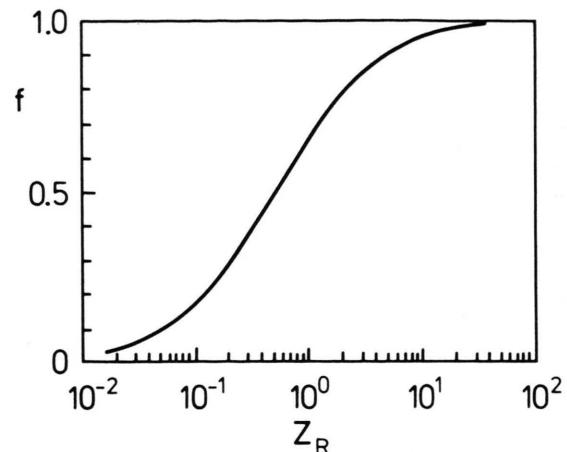


Abb. 5. Der Bruchteil  $f$  der Radikale, die durch intramolekulare Prozesse deaktiviert werden, als Funktion von  $Z_R$ , der anfänglichen mittleren Zahl von Radikalstellen pro Makromolek für eine anfängliche statische Molekulargewichtsverteilung ( $\bar{M}_w = 2 \bar{M}_n$ ), (nach Raap [3]).

lare Salze beeinflußt. Die hier untersuchten Polynukleotide besitzen bei pH 8 negativ geladene Phosphatgruppen (Ionisierungsgrad  $\approx 1$ ), so daß die zur Reaktion der Radikale erforderliche Annäherung durch elektrostatische Abstoßung der Phosphatgruppen behindert wird. Die abstoßend wirkenden Kräfte können durch niedermolekulare Elektrolyte teilweise abgeschirmt werden. Ein entsprechender kinetischer Salzeffekt wurde mit den hier unter-

Tab. I. Der dem schnellen Vorgang entsprechende Anteil des Ausmaßes der Abnahme der LSI als Funktion der absorbierten Dosis. PolyA in  $\text{O}_2$ -gesättigter Phosphatpufferlösung (pH 8 bei Raumtemperatur).

Absorbierter Dosis pro Puls [krad]	$f'$ <sup>a</sup>	Polymeren-Konzentration [g/l]
2,8	0,50	
6,5	0,61	
8,2	0,68	0,50
17,0	0,75	
3,0	0,72	
6,0	0,83	0,25
9,0	0,91	

<sup>a</sup>  $f = \Delta U_{\text{schnell}} / \Delta U_{\text{total}}$ ;  $\Delta U_{\text{schnell}}$ : durch den schnellen Vorgang verursachte Abnahme der Photomultiplier-Signalspannung;  $\Delta U_{\text{total}}$ : Gesamtänderung der Photomultiplier-Signalspannung.

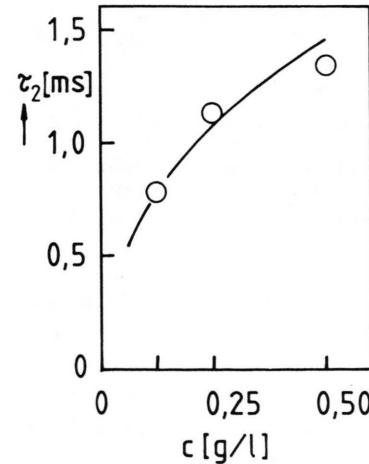


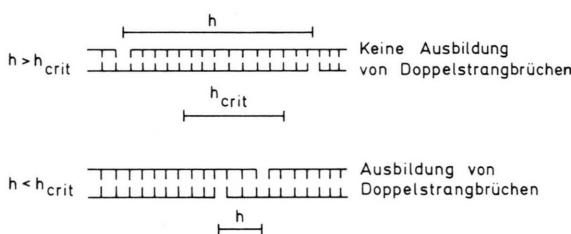
Abb. 6. Die Halbwertszeit des schnellen LSI-Abfalls bei konstanter absorbierte Dosis pro Puls (5 krad) als Funktion der Polymerenkonzentration. PolyA in  $\text{O}_2$ -gesättigter Phosphatpufferlösung (pH 8). Ionenstärke 0,1 mol/l.

suchten Polynukleotiden beobachtet: Mit steigender Ionenstärke nahm die reziproke Halbwertszeit des schnellen Vorgangs zu, d. h. die Reaktion verlief schneller. Typische Ergebnisse enthält die Abb. 4.

(b) *Mehrsträngige Polynukleotide*

(b-1) Bestrahlung von Polynukleotiden bei pH 4

Der Literatur [6–8] ist zu entnehmen, daß PolyA und PolyC in saurem Medium (pH 2 bis pH 6) Komplexe bilden, wobei der Großteil der Makromoleküle in Form von Doppelsträngen vorliegen soll. Es ist daher zu erwarten, daß Hauptkettenpaltungen nur dann eine Abnahme der Lichtstreuungssintensität bewirken, wenn in nennenswertem Ausmaß ein gewisser kritischer Abstand  $h_{\text{crit}}$  zwischen Brüchen in Einzelsträngen der Doppelhelices unterschritten wird. Wie der folgenden schematischen Darstellung zu entnehmen ist, kommt es nicht zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen (mit Trennung der Fragmente), wenn  $h > h_{\text{crit}}$ .



Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Einzelstrangbrüche statistisch über alle Makromoleküle und über alle Grundeinheiten verteilt sind. Dies bedeutet, daß man bei der Erzeugung von Einzelstrangbrüchen durch strahlenerzeugte OH-Radikale relativ hohe absorbierte Dosen applizieren müssen sollte, um eine Abnahme der Lichtstreuungssintensität infolge von Doppelstrangbrüchen nachweisen zu können.

Wie die Abb. 7 zeigt, entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen. Eine Abnahme der LSI wurde erst bei absorbierten Dosen oberhalb von 100 krad pro Puls festgestellt. Die LSI-Abnahme erfolgte im Sekundenbereich, also recht langsam. Ihre Geschwindigkeit entspricht vermutlich der Geschwindigkeit der Auflösung von H-Brücken zwischen Grundeinheiten, die sich zwischen zwei Einzelstrangbrüchen befinden. Als die Lösung nachfolgend mit weiteren Pulsen gleicher Dosis bestrahlt wurde, nahm das Ausmaß der LSI-Abnahme zu,

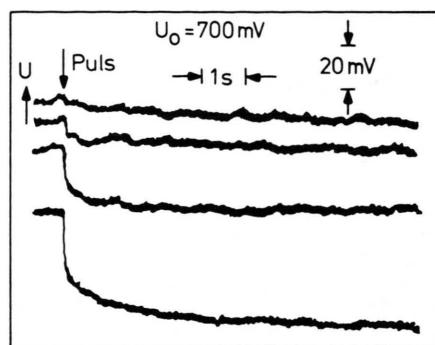


Abb. 7. Hauptkettenabbau doppelsträngiger PolyA bei pH 4 in 0,1 molarer  $\text{NaClO}_4$ -Lösung bei Raumtemperatur,  $[\text{PolyA}] = 0,2 \text{ g/l}$ . Die Oszillrogrammbilder zeigen die Abnahme der LSI nach dem Puls. Die Lösung wurde in Abständen von 10 s mit 200 ns-Pulsen (120 krad pro Puls) bestrahlt.

und es machte sich zusätzlich ein schneller Prozeß bemerkbar. Dieser ist vermutlich der Separierung derjenigen Fragmente zuzuordnen, die aus Doppelstrangbrüchen stammen, bei denen  $h$  wesentlich kleiner als  $h_{\text{crit}}$  war. Die Wahrscheinlichkeit für derartige Doppelstrangbrüche ist relativ klein, so daß sie erst bei hohen absorbierten Dosen beobachtet werden können.

(b-2) Bestrahlungen von Poly(A + U)

Ähnliche Ergebnisse wie bei der Bestrahlung von PolyA bei pH 4 wurden auch mit dem System Poly(A + U) erhalten. Mischt man PolyA und PolyU im Molverhältnis 1:1, so bilden sich Doppelhelices aus, so daß man Poly(A + U) als makromolekulares Modell für doppelsträngige DNA betrachten kann und somit ähnliche Ergebnisse wie im Fall der nativen DNA erwartet. Diese Erwartungen wurden bestätigt. Die Bestrahlung von Poly(A + U) in  $\text{O}_2$ -gesättigter Phosphatpuffer-Lösung (pH 8, Ionenstärke 0,1 mol/l, Polymerenkonzentration: 0,2 g/l) ergab folgendes: Die LSI nahm erst bei relativ hohen absorbierten Dosen ( $> 50 \text{ krad pro Puls}$ ) ab, und zwar ließen sich zwei Vorgänge wie im Falle der DNA erkennen [9].

Abschließend sei bemerkt, daß die in den Abschnitten (b-1) und (b-2) beschriebenen Ergebnisse in vollem Einklang mit den mit nativer Kalbs-thymus-DNA erhaltenen stehen, und daß damit das oben erwähnte früher entwickelte [9] Modell für die Hauptkettenpaltung in doppelsträngigen Nukleinsäuren bestätigt wird.

*Danksagung*

Diese Untersuchungen wurden finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert, was hiermit dankend anerkannt wird.

Herrn Dr. Beck und Herrn M. Wilhelm danken wir für die Hilfe bei der Bedienung des Linearbeschleunigers, Herrn Dr. J. Lilie für die Unterstützung und Beratung bei der Benutzung der Rechenanlage.

- [1] H. B. Michaels u. J. W. Hunt, Rad. Res. **56**, 57 (1973); **72**, 18 (1977) und **72**, 32 (1977).
- [2] C. von Sonntag u. D. Schulte-Frohlinde, Radiation-induced degradation of the sugar in model compounds and in DNA, in: (A. J. Bertinchamps, ed.), Effects of Ionizing Radiation on DNA, Springer-Verlag, Berlin 1978.
- [3] I. A. Raap, Veröffentlichung in Vorbereitung.
- [4] U. Gröllmann u. W. Schnabel, Makromol. Chem. **181**, 1215 (1980).
- [5] W. Schnabel, Application of the light scattering detection method to problems of polymer degradation, in: (N. Grassie, ed.), p.35, Developments in Polymer Degradation-2, Appl. Science Publ., London 1979.
- [6] J. R. Fresco, J. Mol. Biol. **1**, 106 (1959).
- [7] R. Langridge u. A. Rich, Nature **25**, 725 (1963).
- [8] K. A. Hartmann u. R. Rich, J. Am. Chem. Soc. **87**, 2033 (1965).
- [9] D. Lindenau, U. Hagen, u. W. Schnabel, Z. Naturforsch. **31 c**, 484 (1976); Rad. and Environm. Biophys. **13**, 287 (1976).
- [10] D. Lindsay, J. A. Howard, E. C. Horswill, L. Iton, K. U. Ingold, T. Cobbley u. A. Li, Can. J. Chem. **51**, 870 (1973).