

## 7. Der Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch Ascorbinsäure: Die intermediäre Bildung von OH-Radikalen

von K. Berneis

(13. XI. 62)

Es ist bekannt, dass durch Ascorbinsäure in Gegenwart von molekularem Sauerstoff Viren<sup>1)</sup> und Bakteriophagen<sup>2)</sup> inaktiviert werden und dass diese Wirkung durch das Wasserstoffperoxid zerstörende Ferment Katalase inhibiert werden kann. Bei den hier beschriebenen Versuchen mit Desoxyribonucleinsäure als Versuchsmodell wird deren Abbau durch Viskositätsmessungen ihrer wässrigen Lösung verfolgt. Die Methodik entspricht im wesentlichen der von anderen Autoren zur Bestimmung des Effektes von Alkylierungsmitteln<sup>3)</sup> und von RÖNTGEN-Strahlen<sup>4)</sup> auf Desoxyribonucleinsäure verwendeten Versuchsanordnung.

Der Viskositätsabfall von Desoxyribonucleinsäure-Lösung nach Zusatz von Ascorbinsäure. Die Veränderung der Viskosität einer 0,1-proz. wässrigen Lösung von Na-Desoxyribonucleinat in 0,0005 M Ascorbinsäure-Lösung als Funktion der Zeit ist in Figur 1 wiedergegeben. Die Lagerung der Mischung erfolgte in geschlossenem Gefäß

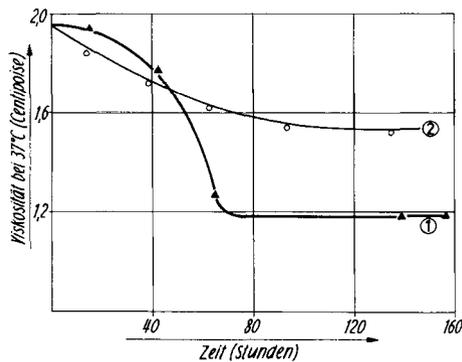


Fig. 1. Viskositätsabfall einer 0,1-proz. Na-Desoxyribonucleinat-Lösung bei 23°  
① in 0,0005 M Ascorbinsäure      ② in 0,0005 M Wasserstoffperoxid

in Gegenwart von Luft bei 23°. Die Figur lässt eine Induktionsperiode mit anschließendem raschen Viskositätsabfall auf einen stationären Wert erkennen. Im Verlauf dieses Viskositätsabfalles findet Autoxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure statt, wie durch Bestimmung des Absorptionsspektrums im ultravioletten Gebiet festgestellt werden kann.

<sup>1)</sup> M. KLEIN, *Science* 101, 587 (1945); siehe dort weitere Literaturangaben.

<sup>2)</sup> D. MAXWELL, «Organic Peroxides in Radiobiology», S. 96, Pergamon Press, London 1958. Siehe dort weitere Literaturangaben.

<sup>3)</sup> E. C. GJESSING & A. CHANUTIN, *Cancer Research* 6, 593 (1946).

<sup>4)</sup> A. H. SPARROW & F. M. ROSENFELD, *Science* 104, 245 (1946); B. TAYLOR, J. P. GREENSTEIN & A. HOLLÄNDER, *Biochem. Arch.* 16, 19 (1948); G. C. BUTLER, *Canadian J. Res.* B27, 972 (1949).

Zum Vergleich ist in Fig. 1 noch die Veränderung der Viskosität derselben Na-Desoxyribonucleinat-Lösung in 0,0005M Wasserstoffperoxid wiedergegeben. Dem Kurvenverlauf ist zu entnehmen, dass durch Wasserstoffperoxid ein viel geringerer Viskositätsabfall bewirkt wird als durch die äquimolare Menge Ascorbinsäure. Es ist bekannt, dass Wasserstoffperoxid in Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$  eine Verminderung der Viskosität von Desoxyribonucleinsäure-Lösungen verursachen kann<sup>5)</sup> 6).

*Einfluss von Katalase-Zusatz.* Fig. 2 zeigt, dass durch Zusatz von 1% Katalase-Lösung<sup>7)</sup> der Desoxyribonucleinsäure-Abbau durch 0,0005M Ascorbinsäure vollständig unterdrückt wird (Kurve 3). Zusatz von nur 0,1% Katalase-Lösung bewirkt eine Verlangsamung des Abbaues (Kurve 2). Bei Verwendung von Wasserstoffperoxid anstelle von Ascorbinsäure genügen 0,1% Katalase-Lösung bereits für eine vollständige Unterdrückung des Abbaues (Kurve 3, Kreise). Kurve 1 gibt den Kontrollversuch mit Ascorbinsäure ohne Katalase-Zusatz wieder. Diese Versuche wurden bei 37° durchgeführt. Durch Absorptionsmessungen im ultravioletten Gebiet kann gezeigt werden, dass die Autoxydation der Ascorbinsäure durch Katalase nicht beeinflusst wird.

*Einfluss von Peroxidase-Zusatz.* Auch Peroxidase verhindert den Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch 0,0005M Ascorbinsäure, wie den in Fig. 3 wieder-

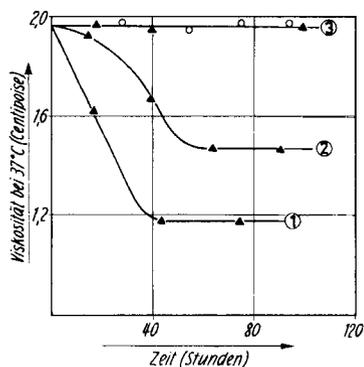


Fig. 2. Hemmung des Viskositätsabfalles einer 0,1-proz. Na-Desoxyribonucleinat-Lösung durch Katalase (Temperatur 37°)

- ① Viskositätsverlauf in 0,0005M Ascorbinsäure bei Abwesenheit von Katalase
- ② Viskositätsverlauf in 0,0005M Ascorbinsäure bei Gegenwart von 0,1% Katalase-Lösung
- ③ Dreiecke: Viskositätsverlauf in 0,0005M Ascorbinsäure bei Gegenwart von 1% Katalase-Lösung
- ③ Kreise: Viskositätsverlauf in 0,0005M Wasserstoffperoxid bei Gegenwart von 0,1% Katalase-Lösung

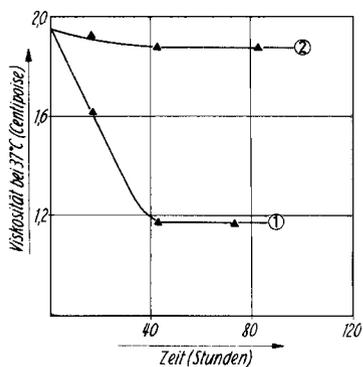


Fig. 3. Hemmung des Viskositätsabfalles einer 0,1-proz. Na-Desoxyribonucleinat-Lösung durch Peroxidase (Temperatur 37°)

- ① Viskositätsverlauf in 0,0005M Ascorbinsäure bei Abwesenheit von Peroxidase
- ② Viskositätsverlauf in 0,0005M Ascorbinsäure bei Gegenwart von 0,5% Peroxidase-Lösung

<sup>5)</sup> Das verwendete Na-desoxyribonucleinat ist eisenhaltig, siehe exper. Teil.

<sup>6)</sup> J. A. V. BUTLER & B. E. CONWAY, J. chem. Soc. 1950, 3418.

<sup>7)</sup> «KAT II» von BOEHRINGER, Mannheim (enthält ca. 10 mg Protein im ml).

gegebenen Versuchsergebnissen zu entnehmen ist. 0,5% Peroxidase-Lösung<sup>8)</sup> unterdrückt den Viskositätsabfall nahezu vollständig (Kurve 2). Kurve 1 gibt den Kontrollversuch ohne Peroxidase wieder. Die Mischungen wurden bei 37° gelagert.

*Diskussion.* Den Versuchsergebnissen ist zu entnehmen, dass Ascorbinsäure unter aeroben Bedingungen einen Abbau von Desoxyribonucleinsäure bewirkt und dass parallel mit diesem Abbau Autoxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure erfolgt. Ferner ist ersichtlich, dass durch die Ascorbinsäure ein stärkerer Abbau der Desoxyribonucleinsäure bewirkt wird als durch eine äquimolare Menge Wasserstoffperoxid. Ausserdem wird festgestellt, dass der Abbau der Desoxyribonucleinsäure durch Katalase und durch Peroxidase inhibiert werden kann, ohne dass durch diese Fermente die Autoxydation der Ascorbinsäure unterdrückt wird.

Die Beobachtung, dass Katalase und Peroxidase die Desoxyribonucleinsäure vor dem Abbau durch die Ascorbinsäure schützt, spricht für die von verschiedenen Autoren<sup>1) 2) 9)</sup> vertretene Auffassung, wonach bei der Autoxydation von Ascorbinsäure in wässriger Lösung Wasserstoffperoxid gebildet wird. Figur 1 ist indessen zu entnehmen, dass durch die Ascorbinsäure ein bedeutend stärkerer Abbau der Desoxyribonucleinsäure bewirkt wird als durch diejenige Menge Wasserstoffperoxid, welche bei ihrer Autoxydation entstehen sollte. Die Autoxydation der Ascorbinsäure kann nämlich höchstens die äquimolare Menge Wasserstoffperoxid liefern. Die Feststellung, dass die Ascorbinsäure trotzdem die Desoxyribonucleinsäure viel stärker abbaut, ist dadurch zu erklären, dass aus Wasserstoffperoxid durch Reduktionsmittel OH-Radikale gebildet werden<sup>10)</sup>. Diese weisen aber viel höhere Reaktionsfähigkeit auf als Wasserstoffperoxid. Im vorliegenden System wirkt die Ascorbinsäure selbst als Reduktionsmittel.

Es kann daher geschlossen werden, dass der unter aeroben Bedingungen bei Anwesenheit von Ascorbinsäure stattfindende Abbau von Desoxyribonucleinsäure durch OH-Radikale bewirkt wird, welche durch Reduktion des intermediär gebildeten Wasserstoffperoxids gebildet werden. Es liegt hierin eine Analogie zum indirekten Effekt von RÖNTGEN-Strahlen in wässrigen Lösungen, welcher bekanntlich ebenfalls auf die Wirkung von OH-Radikalen zurückzuführen ist<sup>11)</sup>.

**Experimentelles.** – Das verwendete Natriumdesoxyribonucleinat wurde von der Firma FLUKA in Buchs bezogen und wies gemäss Angabe des Lieferanten ein mittleres Molekulargewicht von 1,4 Millionen auf. Mittels Emissionsspektralanalyse wurde der Eisengehalt zu etwa 10/100 bestimmt, während der Kupfergehalt weniger als 2 ppm ausmachte. Die Bereitung einer 0,2-proz. Lösung erfolgte durch mehrtägiges Stehenlassen des Präparates in 10-proz. Kochsalz-Lösung. Der Kochsalz-Zusatz diente zur Stabilisierung der Lösung gegen Denaturierung<sup>12)</sup>. Anschliessend wurden die in der Lösung suspendierten Partikel durch einstündiges Zentrifugieren mit 6000 U./Min. bei 0° entfernt. Die den Abbau auslösenden Substanzen – L(+)-Ascorbinsäure bzw. Wasserstoffperoxid in Form einer 30-proz. Lösung – wurden zu 0,001m in 1/15m Phosphatpuffer MERCK vom pH 7,0 gelöst, welcher unter Verwendung von bidestilliertem Wasser mit Zusatz von 10% Kochsalz bereitet wurde. Es wurden je 1 ml der Desoxyribonucleinsäure-Lösung und der

<sup>8)</sup> 0,2-proz. Lösung von Peroxydase aus Meerrettich von BOEHRINGER, Mannheim.

<sup>9)</sup> G. CALCUTT, *Experientia* 7, 2 (1951).

<sup>10)</sup> F. HABER & J. WEISS, *Proc. Roy. Soc. A* 147, 332 (1934); siehe auch H. KAUFMANN, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 4311 (1951); S. UDENFRIEND *et al.*, *J. biol. Chemistry* 208, 731 (1954); sowie L. CHAPON *et al.*, *Bull. Soc. chim. France* 1959, 81.

<sup>11)</sup> J. WEISS, *Nature* 153, 748 (1944).

<sup>12)</sup> R. SIGNER & H. SCHWANDER, *Helv.* 32, 853 (1948).

Wirkstofflösung gemischt. Die Mischung enthielt 0,1% Desoxyribonucleinsäure, 10% Kochsalz; sie war 0,0005 M hinsichtlich Wirkstoff und 1/30 M hinsichtlich Phosphatpuffer. Während der Versuche sank der pH-Wert der Lösungen niemals unter etwa 6,3. Die Mischungen wurden in 5 ml Rundkolben mit Schlißzapfen unter Luftatmosphäre aufbewahrt; die Viskosität wurde in bestimmten Zeitintervallen gemessen.

Die Viskositätsmessungen erfolgten in einem OSTWALD-Viskosimeter mit einer Kapillare von 6,5 cm Länge und 0,023 cm Durchmesser. Die obere Kugel fasste 0,080 ml; für die Messungen wurde jeweils 1 ml der Lösungen verwendet. Auslaufzeiten: 70 bis 150 Sek. Eichflüssigkeit: Wasser. Der mittlere Strömungsgradient errechnet sich gemäss der Formel von KROEPELIN<sup>13)</sup> ungefähr zu 300 bis 600 s<sup>-1</sup>. Die Viskositäten wurden in einem thermostatisierten Wasserbad von 37° ± 0,1° bestimmt.

#### SUMMARY

Ascorbic acid in aqueous solution in the presence of molecular oxygen causes a degradation of deoxyribonucleic acid (DNA). This degradation can be completely suppressed by the addition of catalase or of peroxidase. It is concluded that the degradation of the DNA is due to the formation of hydrogen peroxide during the autoxidation of the ascorbic acid. Hydrogen peroxide itself is not very efficient in degrading DNA, but it is reduced by ascorbic acid to OH radicals which degrade the DNA.

Chemische Forschungsabteilung der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG., Basel

<sup>13)</sup> H. KROEPELIN, Kolloid-Z. 47, 294 (1929).

## 8. Welkstoffe und Antibiotika

### 24. Mitteilung<sup>1)</sup>

#### Die Konstitution des Lycomarasmins<sup>2)</sup>

von E. HARDEGGER, P. LIECHTI<sup>3)</sup>, L. M. JACKMAN<sup>4)</sup>, A. BOLLER<sup>5)</sup> und PL. A. PLATTNER

(14. XI. 62)

Aus Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* SACC., dem Erreger der infektiösen Tomatenwelke, isolierten vor längerer Zeit PLATTNER & CLAUSON-KAAS<sup>6)</sup> eine welkaktive Verbindung, die Lycomarasmin genannt wurde<sup>7)</sup>. Die Kulturfiltrate enthielten auch stets eine dem Lycomarasmin sehr nahe stehende, biologisch inaktive

<sup>1)</sup> 23. Mitt.: Helv. 43, 2096 (1960).

<sup>2)</sup> Vorgetragen von E. HARDEGGER im Mai 1962 im Institut für Chemie der Naturstoffe, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, in Moskau.

<sup>3)</sup> Vgl. P. LIECHTI, Dissertation ETH, Zürich 1958, Prom.-Nr. 2789.

<sup>4)</sup> Z. Z. University of Melbourne, Victoria, Australia.

<sup>5)</sup> Vgl. A. BOLLER, Dissertation ETH, Zürich 1951, Prom.-Nr. 2047.

<sup>6)</sup> N. CLAUSON-KAAS, PL. A. PLATTNER & E. GÄUMANN, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 54, 523 (1944); PL. A. PLATTNER & N. CLAUSON-KAAS, Helv. 28, 188 (1945); Experientia 1, 195 (1945).

<sup>7)</sup> Die Wirkungsweise des Lycomarasmins in der Tomatenpflanze ist eingehend untersucht worden; vgl. dazu E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH & G. MIESCHER, Phytopath. Z. 16, 257 (1950), E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH & H. KERN, Phytopath. Z. 24, 373 (1955), E. GÄUMANN & ST. NAEF-ROTH, Phytopath. Z. 25, 418 (1956), dort auch weitere Literatur.