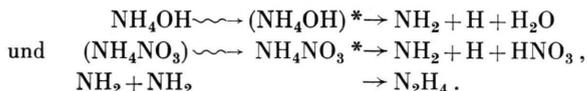


Der Reaktionsmechanismus der Hydrazinbildung in wässriger Lösung unter der Einwirkung von UV-Licht ist noch nicht bekannt. Offenbar führt das angeregte Ammonium- bzw. Ammoniumnitrat-Molekül zur Bildung von NH_2 -Radikalen, die hierauf zu Hydrazin kombinieren, etwa nach:



Weitere Untersuchungen, die diesen Sachverhalt klären sollen, sind geplant.

Es ist außerdem interessant zu erwähnen, daß bei der ^{60}Co -Gamma-Bestrahlung wässriger Lösungen

von Ammoniumnitrat bzw. -sulfat ($p_{\text{H}} = 9,5$) ebenfalls Hydrazin gebildet wird. Bei der Radiolyse einer 10^{-2}-m . NH_4NO_3 -Lösung, die mittels Ammoniakgas auf $p_{\text{H}} = 9,5$ gebracht wurde, konnte für das gebildete Hydrazin ein G -Wert von 0,06 festgestellt werden*. Die Untersuchungen in dieser Richtung sind noch nicht abgeschlossen und es wird später darüber ausführlich berichtet.

Für das rege Interesse an dieser Arbeit möchte ich Frau Prof. Dr. B. KARLIK herzlich danken.

Besonderer Dank gebührt auch dem Bundeskanzleramt der Republik Österreich, Sektion IV, Verstaatlichte Betriebe, für die finanzielle Unterstützung beim Ankauf von Geräten.

²⁴ G. W. WATT u. J. D. CHRISP, *Analytic. Chem.* **24**, 2006 [1952].

* Diese vorläufigen Versuche wurden am Institut für Chemie, Reaktorzentrum Seibersdorf, durchgeführt.

Strahlendchemische Veränderung der 5-Halogen-Uracile in der DNS durch UV-Strahlen*

VON HANSWERNER DELLWEG und ADOLF WACKER

Aus dem Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main)
(Z. Naturforsch. **19 b**, 305—311 [1964]; eingegangen am 11. Oktober 1963)

Nach Kultivierung von *Enterococcus* Stei mit ^{14}C -markiertem 5-Chlor-, 5-Brom- oder 5-Jod-Uracil wurde aus den Zellen die DNS isoliert und hoch gereinigt. Durch UV-Bestrahlung dieser DNS in wässriger Lösung werden die eingebauten 5-Halogen-Uracile photochemisch verändert. Beim Abbau dieser bestrahlten DNS findet man neben geringen Mengen nicht-identifizierter Photoprodukte als überwiegendes Strahlenprodukt nach Hydrolyse mit Perchlorsäure Uracil und nach fermentativem Abbau Uracildesoxyribosid. Die Dehalogenierung von BU und JU in der DNS verläuft in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke etwa gleich schnell, während CU sehr viel langsamer dehalogeniert wird.

Die photochemische Dehalogenierung des BU erfolgt in der nativen DNS am leichtesten, weniger gut in der Hitze-denaturierten DNS und nur in geringem Maße in der Apurinsäure.

Abkürzungen: CU = 5-Chloruracil, CUdR = 5-Chloruracildesoxyribosid, BU = 5-Bromuracil, BUdR = 5-Bromuracildesoxyribosid, JU = 5-Joduracil, JUdR = 5-Joduracildesoxyribosid, DNS = Desoxyribonucleinsäure, DNase = Desoxyribonuclease, UV-Strahlen = In diesem Zusammenhang Licht eines Quecksilber-Niederdruckbrenners mit der Hauptemission bei 253,7 μ .

Wie früher gefunden wurde¹, kann man bei Bakterien Thymin durch 5-Bromuracil in der DNS ersetzen. ZAMENHOF und GRIBOFF bestätigten diesen Befund und dehnten ihn auf CU und JU sowie auch

auf Phagen aus². Wie GREER und ZAMENHOF später beobachteten³, sind BU-haltige Bakterien gegenüber UV-Strahlen sensibilisiert. Das gleiche gilt auch für Säugetierzellen⁴. Nach DJORDJEVIC und SCYBALSKI⁵ sind gegenüber UV-Bestrahlung die BU-haltigen Zellen am empfindlichsten, gefolgt von JU- und CU-haltigen. Auch gegenüber sichtbarem Licht sind Mikroorganismen (Phagen und Bakterien), die in ihrer DNS BU oder JU enthalten, sensibilisiert⁶.

* 14. Mitteilung der Reihe „Strahlendchemische Veränderung der Nucleinsäuren“. 13. Mitt.: H. DELLWEG u. A. WACKER, *Z. Naturforsch.* **17 b**, 827 [1962].

¹ F. WEYGAND, A. WACKER u. H. DELLWEG, *Z. Naturforsch.* **7 b**, 19 [1952].

² S. ZAMENHOF u. G. GRIBOFF, *Nature* [London] **174**, 307 [1954].

³ S. GREER u. S. ZAMENHOF, *Abstr. Papers 131th Meeting Amer. chem. Soc.* **3 c** [1957].

⁴ W. SCYBALSKI, *Ann. Cell Inform. Service* **1**, 5 [1959].

⁵ B. DJORDJEVIC u. W. SCYBALSKI, *J. exp. Medicine* **112**, 509 [1960].

⁶ F. W. STAHL, J. M. CRASEMAN, L. OKUN, E. FOX u. C. LAIRD, *Virology* **13**, 98 [1961]; A. WACKER, H. D. MENNIGMANN u. W. SCYBALSKI, *Nature* [London] **196**, 685 [1962].

Durch Verwendung von markiertem BU konnten wir kürzlich zeigen⁷, daß BU in der Bakterienzelle durch UV-Bestrahlung in Uracil umgewandelt wird. In geringer Menge entstehen aus BU außerdem noch weitere Fotoprodukte, die papierchromatographisch in n-Butanol/H₂O einen kleinen R_f -Wert haben. Im Gegensatz dazu wird BU bei UV-Bestrahlung in wäßriger Lösung kaum verändert. Wir berichten in dieser Arbeit über die Veränderungen von CU, BU und JU in Bakterien, in DNS, in denaturierter DNS und in Apurinsäure unter dem Einfluß von UV-Strahlen. Außerdem wurden die Untersuchungen auch auf die Bestrahlung mit „Tageslichtlampen“ ausgedehnt.

Methoden

Isolierung der DNS

Die DNS wurde aus *Enterococcus* Stei^{**}, wie bereits beschrieben⁸, isoliert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in einem halbsynthetischen Nährmedium⁹ unter Zusatz von 5 bis 10 µg/ml 5-Halogenuracil-[2-¹⁴C] (Spez. Akt. 0,8–2 mC/mMol).

Die Bestrahlung der DNS

Sie erfolgte in wäßriger Lösung (0,9% Kochsalz und 0,19% EDTA, p_H 7,8, Schichtdicke 2 mm) mit einem Quecksilber-Niederdruckbrenner NN 30/89 [Quarzlampegesellschaft mbH, Hanau (Main)] im Abstand von 6 cm von Brennerstabmitte. Konzentration der DNS etwa 0,22 mg/ml, Gesamtmenge etwa 0,10–0,20 mg mit einer Aktivität von 0,08 µC. Die an der Oberfläche der Lösung innerhalb der Küvette wirksame Bestrahlungsstärke betrug $J_0 = 1,21 \cdot 10^4$ erg/min mm². Die mittlere Bestrahlungsstärke in der Küvette ist dann $J = 0,47 \cdot 10^4$ erg/min mm². Nach der Bestrahlung wurde die DNS nach Zusatz von inaktiver Bakterien-DNS mit Alkohol gefällt und getrocknet. Für die Bestrahlung mit sichtbarem Licht verwendeten wir eine „Quecksilberdampf Lampe für Reproduktionszwecke“ (Philips HPR, 125 Watt, Lichtstrom 2800 lm). Die Küvette mit der DNS-Lösung wurde in 7 cm Abstand vor dem Scheitelpunkt der Lampe aufgestellt. Zur Kühlung wurde zwischen Lampe und Küvette eine von kaltem Wasser durchflossene Quarzküvette (35 mm Schichtdicke) angebracht. Zusätzlich wurde mit einem Luftstrom gekühlt. Die DNS wurde mit 70-proz. Perchlorsäure (0,02–0,03 ml, 60 Min. 85 °C) hydrolysiert und anschließend mit 10-n. Kalilauge neutralisiert.

Fermentative Spaltung der DNS

In einigen Versuchen wurde die bestrahlte DNS fermentativ zu den Desoxyribonucleosiden gespalten. Hierfür wurde die DNS nach der Alkoholfällung mit 0,02 ml Wasser aufgenommen und mit 0,08 ml einer Mischung von 24 Tln. 0,05-m. Tris-Puffer (p_H 7,0), 43 Tln. 0,2-m. Magnesiumsulfatlösung und 33 Tln. einer 0,1-proz. wäßrigen Lösung von gereinigter Desoxyribonuclease (GEA, Kopenhagen) versetzt. Nach 90 Min. bei 37 °C wurde ein Gemisch von 80 Tln. einer 0,2-proz. wäßrigen Lösung von ungereinigtem Schlangengift (*Crotalus adamanteus*, Ross Allen, Silver Springs) und 20 Tln. 1-m. Ammoniak hinzugegeben. Nachdem diese Mischung nochmals drei Stdn. bei 37 °C (p_H 8,5) gestanden hatte, waren über 99,7% der unbestrahlten DNS in die Desoxyribonucleoside aufgespalten.

Papierchromatographie

Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen; Lösungsmittelsystem: n-Butanol/Wasser (87 : 13).

Radioaktivität

Die Radioaktivität der Chromatogramme wurde mit einem Radio-Papierchromatographen aufgezeichnet. Hierzu verwendeten wir ein einfaches Gerät eigener Bauart. Ein handelsüblicher Linienschreiber (PC 120, 6 V, 2,5 m Amp. der Firma Metrawatt AG, Nürnberg) wurde so verändert, daß das Registrierpapier sich nicht aufwickelt, sondern unten aus dem Schreiber herausgeführt wird. An dieses Registrierpapier wird der zu messende Chromatogramstreifen angehängt und unten beschwert. Unterhalb des Schreibers liegen ein oder auch zwei Methandurchflußzählrohre FH 407, an denen das Chromatogramm vorbeiläuft. Ein an dem Zählrohr befestigter Metallblock mit verstellbarem Spalt (0–4 mm) dient zur Durchführung des Chromatogramstreifens. Durch diese Anordnung wird eine vollkommene Synchronisation zwischen Chromatogramm und Registrierpapier erreicht.

Zur quantitativen Bestimmung der Radioaktivität wurden die in n-Butanol/H₂O entwickelten Chromatogramme entsprechend der Aktivitätsverteilung zerschnitten und jeder Streifen mit 3 ml Wasser eluiert. Der erste Streifen (R_f 0 bis 0,06) enthält dimeres Uracil (R_f 0,04) und weitere nicht identifizierte, radioaktive Fotoprodukte, der zweite Streifen (R_f 0,06 bis 0,16) das Mischdimere aus Uracil und Thymin (R_f 0,09). Auf dem vierten Streifen (R_f 0,25 bis 0,36) sitzt Uracil (R_f 0,30) und auf dem fünften Streifen (R_f 0,36 bis 0,55) Bromuracil (R_f 0,46). Von den Eluatzen wurden je 0,1, 0,2 und 0,4 ml auf Aluminiumplättchen aufgetrocknet. Aktivitätsmessung im Methandurchflußzähler FH 51 (Friesseke & Hoepfner).

⁷ A. WACKER, H. DELLWEG u. D. WEINBLUM, J. molecular Biol. 3, 787 [1961]; A. WACKER, H. MENNIGMANN u. N. SCYBALSKI, Nature [London] 196, 685 [1962].

⁸ H. DELLWEG u. A. WACKER, Z. Naturforschg. 17b, 827 [1962].

⁹ A. WACKER, M. EBERT u. H. KOLM, Z. Naturforschg. 13b, 141 [1958].

** Herkunft des Stammes siehe: E. F. MÖLLER, F. WEYGAND u. A. WACKER, Z. Naturforschg. 5b, 18 [1950]. Der Stamm wurde in dieser Arbeit noch als *Staph. aureus* bezeichnet.

Apurinsäure

Sie wurde aus der DNS durch Dialyse gegen verdünnte Salzsäure (p_H 1,6)¹⁰ und anschließende Gefrier-trocknung gewonnen.

Ergebnisse

A. UV-Bestrahlung von BU-DNS

Bei der UV-Bestrahlung der DNS wird das ein-gebaute BU in Abhängigkeit von der Bestrahlungs-stärke dehalogeniert. Die entstandene Menge Uracil ist unabhängig von der Art der Hydrolyse (Perchlorsäure 1 Stde. 85 °C, Perchlorsäure 16 Stdn. Zimmer-

Bestrah- lungszeit <i>t</i> [Min.]	Bestrah- lungs- stärke <i>J</i> ₀ [erg/mm ²]	<i>R_f</i> -Wert				
		von 0 bis 0,06	0,06	0,16	0,25	0,36 Uracil
DNS	0	1,6	0	1,0	2,4	95,0
	4	4,84 · 10 ⁴	3,1	—	28,8	68,1
	12	14,5 · 10 ⁴	4,7	4,4	2,1	50,6
	26	31,4 · 10 ⁴	7,6	5,9	2,8	62,9
Bakterien	0	2,0	1,5	1,8	8,7	86,0
	32	51,5 · 10 ⁴	16,0	13,6	4,6	55,8

Tab. 1. UV-Bestrahlung von Bakterien (*Enterococcus* Stei) und von BU-[2-¹⁴C]-DNS aus *Enterococcus* Stei, Perchlorsäurehydrolyse, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

temperatur, Trifluoressigsäure 1 Stde. 155 °C, enzy-matischer Abbau). Die Dehalogenierung scheint auch nicht wesentlich von der in die DNS eingebau-ten Menge BU abzuhängen. Bakterien, die mit 1 µg/ml BU (20% Thyminersatz) und solche, die mit 66 µg/ml BU (70% Thyminersatz) gewachsen wa-ren, ergaben nach UV-Bestrahlung etwa den glei-chen Prozentsatz Uracil.

Bei der photochemischen Umwandlung von BU in Uracil entstehen, wie aus Tab. 1 hervorgeht, auch noch weitere, radioaktive Fotoprodukte, die nicht näher identifiziert wurden. Nach ihren *R_f*-Werten dürfte es sich hierbei u. a. um dimeres Uracil und das Mischdimere aus Uracil und Thymin handeln.

¹⁰ C. TAMM, M. E. HODES u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **195**, 49 [1952].

Bei der fermentativen Spaltung der UV-bestrahl-ten DNS mit DNase und Schlangengift-Phosphatase wird im Gegensatz zur unbestrahlten DNS nicht der gesamte Phosphor aus dem Molekül abgespalten (vgl. Tab. 2). Neben freien Desoxyribosiden fanden wir eine Fraktion, die in dem Lösungsmittelsystem n-Butanol/Wasser nicht abwandert. Wie die Spal-tung dieser Fraktion mit Perchlorsäure zeigte, ent-hielt sie radioaktives Uracil, dimeres Uracil und BU. Außerdem fanden wir noch die übrigen Purin- und Pyrimidinbasen sowie dimeres Thymin (vgl.

DNS	<i>R_f</i> -Wert			
	0— 0,05	0,05— 0,20	0,20— 0,34	0,34— 0,52
			UdR	BUdR
1 unbestrahlt	0,8	0,6	1,2	97,4
2 nach 9,68 · 10 ⁴ erg/mm ²	18,0	0,4	35,9	45,7
3 Startfraktion (0—0,05) Zeile 2, mit HClO ₄ hydrolysiert	27,5	4,3	40,3	27,6
4 Zusammen- fassung aus Zeile 2+3	4,9	1,2	43,2	50,7
5 Startfraktion Zeile 2 nochmals mit 9,68 · 10 ⁴ erg/mm ² bestrahlt	100,0	0	0	0
6 Zeile 5 enzymatisch gespalten	74,6	1,9	14,0	9,5

Tab. 2. UV-Bestrahlung von BU-[2-¹⁴C]-DNS aus *Enterococ-cus* Stei, enzymatische Spaltung mit DNase und Schlangen-gift-Phosphatase, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

hierzu BOLLUM und SETLOW¹¹). Über die Zusammen-setzung dieser Fraktion wird später ausführlicher berichtet werden. Wird der Nuclease-resistente An-teil nochmals bestrahlt und danach erneut fermenta-tiv gespalten, so erscheinen im Chromatogramm (n-Butanol/Wasser) etwa 10% der Radioaktivität als BU-Desoxyribosid und 14% als Uracil-Desoxyribo-sid, 75% der Aktivität bleiben ungespalten auf der Startlinie zurück.

B. Bestrahlung von BU-DNS mit sichtbarem Licht

Zur Prüfung der Frage, ob auch durch sichtbares Licht eine Veränderung des in die DNS eingebauten

¹¹ F. J. BOLLUM u. R. B. SETLOW, Federat. Proc. **21**, 374 c [1962].

BU hervorgerufen wird, bestrahlen wir die DNS-Lösung mit einer „Tageslichtlampe“ (HPR-125 W). Die Wärmestrahlen wurden durch ein Wasserfilter zurückgehalten. Wir fanden (Tab. 3), daß nach einer Bestrahlungsdauer von 22 Std. etwa die gleiche Menge BU dehalogeniert worden war, wie nach einer UV-Bestrahlung mit $4,84 \cdot 10^4$ erg/mm² (4 Min.). Da die Tageslichtlampe vermutlich auch etwas UV-Licht unterhalb 300 m μ aussendet, wurden die Versuche wiederholt unter Vorschalten eines geeigneten Filters, das unterhalb von 305 m μ eine

Bestrahlungsdauer	R_f -Wert				
	0—0,05	0,05—0,17	0,17—0,28	0,28—0,40	0,40—0,60
				UdR	BUdR
unbestrahlt 22 Std.	1,6	0	1,0	2,4	95,0
ohne Filter 25 Std.	2,9	2,4	3,8	21,6	69,3
mit Filter 48 Std.	1,1	0,8	1,3	3,2	93,6
mit Filter	1,5	0,2	—	4,3	94,0

Tab. 3. Bestrahlung von BU-[2-¹⁴C]-DNS aus *Enterococcus* Stei mit sichtbarem Licht, Hydrolyse mit Perchlorsäure, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

Durchlässigkeit von weniger als 0,1% und über 360 m μ eine Durchlässigkeit von 85–92% hatte. Unter diesen Bedingungen wurde nur noch sehr wenig BU in Uracil umgewandelt. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, steigt der Prozentsatz Uracil von 2,4% vor der Bestrahlung auf 3,2% nach 25 Std. und auf 4,3% nach 48 Std. Bestrahlung an. Interessant ist, daß sich dabei die Menge der Fotoprodukte mit einem kleinen R_f -Wert innerhalb der Fehlergrenzen nicht ändert.

C. UV-Bestrahlung von denaturierter BU-DNS und BU-Apurinsäure

Wir haben früher schon darauf hingewiesen, daß die Abspaltung von Brom aus BU in der DNS einen Sonderfall darstellt⁷, da sowohl BU als auch BU-Desoxyribosid und das Dinucleotid Thymidyl-BU-Desoxyribosid (TpBU) durch UV-Strahlen nur sehr wenig dehalogeniert werden (Abb. 1). Zur Vervollständigung dieser Reihe haben wir jetzt noch eine durch Erhitzen denaturierte BU-DNS (100°, 10 Min.) und die aus BU-DNS gewonnene Apurinsäure UV-bestrahlt. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, entstehen bei Bestrahlung mit $4,8 \cdot 10^4$ erg/mm² in der

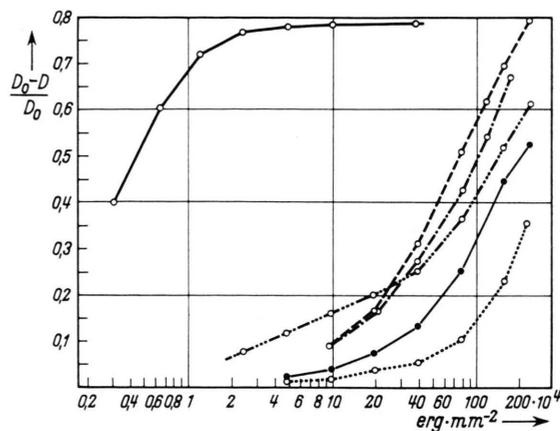


Abb. 1. UV-Bestrahlung (253,7 m μ) von Pyrimidin-Derivaten in Wasser. Konzentration ca. 10^{-4} M., pH 7,0. Schichtdicke 1 Zentimeter. Ordinate: relative Extinktionsabnahme beim Maximum. Abszisse: Bestrahlungsstärke. —○—○— Thymin (bei -10°), — — — BUdR, — · — · — TpBU, ····· TpT, —●—●— TdR+BUdR, ····· TdR.

Bestrahlung J_0 [erg/mm ²] · 10 ⁴	R_f -Wert				
	0—0,06	0,06—0,17	0,17—0,33	0,33—0,48	
			Uracil	BU	
DNS	0	1,5	1,1	2,5	94,9
DNS	4,84	3,1	—	28,8	68,1
DNS 10 Min.					
100 °C	4,84	3,9	1,7	13,0	81,4
APS	4,84	2,1	1,8	4,4	91,7
APS bei -5 °C	4,84	3,5	4,9	6,7	84,9
APS	14,5	9,4	1,9	7,3	81,3

Tab. 4. UV-Bestrahlung von BU-[2-¹⁴C]-markierter DNS, denaturierter DNS und Apurinsäure (APS) aus *Enterococcus* Stei. Perchlorsäurehydrolyse, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

nativen DNS 26,4% Uracil, in der denaturierten dagegen nur 10,6 Prozent. Entfernt man aus der DNS die Purine durch Hydrolyse, so sinkt die photochemische Dehalogenierung des BU auf 2–4% ab. Dies ist etwa die gleiche Menge, die auch bei der Bestrahlung einer wäßrigen Lösung von BU-Desoxyribosid oder TpBU auftritt.

D. UV-Bestrahlung von BU-haltigen Bakterien vor und nach Erhitzen

Da bekanntlich durch Erhitzen und rasches Abkühlen die DNS in den einsträngigen Zustand überführt wird, war es von Interesse festzustellen, in welchem Ausmaß bei erhitzten Bakterien die Dehaloge-

nierung des BU bei UV-Bestrahlung erfolgt. Wie aus Tab. 5 hervorgeht, ist die Dehalogenierung von BU in den erhitzten Bakterien stark vermindert. Im Vergleich zur Thymindimerisierung, die ebenfalls in unterschiedlicher Ausbeute in nativer und denaturierter DNS verläuft, ist die Dehalogenierungsrate von BU in der doppel- und einsträngigen DNS eine weit bessere chemische Ausgangsbasis, um den molekularen Zustand der DNS zu erfassen.

Enterococcus Stei, mit Thymin-[2- ¹⁴ C] kultiviert				
Bestrahlungsstärke J_0 [erg/mm ²] · 10 ⁴	Erhitzt auf 98 °C	Startfraktion	Thymin-Dimeres	Thymin
9,7	—	6	10	84
9,7	20 Min.	6	11	83
12,9	—	2,5	11,5	86
12,9	20 Min.	3,5	12,5	84
Enterococcus Stei, mit 5-Bromuracil-[2- ¹⁴ C] kultiviert				
		Startfraktion	Uracil	5-Bromuracil
9,7	—	16,5	37,5	46
9,7	20 Min.	17,5	15,5	67
12,9	—	13,5	42,5	44
12,9	20 Min.	17,5	28,0	54,5

Tab. 5. UV-Bestrahlung von Bakterien nach Erhitzen im siedenden Wasserbad, Perchlorsäurehydrolyse, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

E. UV-Bestrahlung von JU-DNS

Die mit BU-DNS ausgeführten Versuche wurden mit einer DNS wiederholt, die mit 5-Joduracil-[2-¹⁴C] markiert war. Auch JU wird in der DNS durch UV-Strahlen dehalogeniert (Tab. 6). Es sei jedoch erwähnt, daß im Gegensatz zu BU eine Dehalogenierung auch schon bei der UV-Bestrahlung einer

wäßrigen Lösung von JU zu beobachten ist. Da JU gegen heiße Perchlorsäure nicht beständig ist, wurde die bestrahlte JU-DNS entweder enzymatisch oder mit kalter Perchlorsäure gespalten. Bei der fermentativen Spaltung der unbestrahlten DNS mit DNase und Schlangengift-Phosphatase erhielten wir außer radioaktivem Joduracildesoxyribosid auch radioaktives Cytosindesoxyribosid, Uridin und Thymin. Um die noch vorhandene RNS vollständig zu entfernen, wurde die DNS 16 Stdn. mit 1-n. Kalilauge bei 37 °C behandelt. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, daß etwas JU in Uracil umgewandelt wird. Nach der Behandlung mit Kalilauge wurde die DNS umgefällt, bestrahlt und fermentativ gespalten. Die Radioaktivität im Thyminid und Cytosindesoxyribosid erklärt sich dadurch, daß ein Teil des angebotenen radioaktiven JU von den Bakterien dehalogeniert wurde, und damit radioaktives Uracil für die Biosynthese des Cytosins und Thymins zur Verfügung stand. Es zeigte sich (Tab. 6), daß durch die Behandlung mit Kalilauge auch die molekulare Struktur der DNS verändert wurde, denn die Ausbeute an UdR ist niedriger und der fermentativ nicht spaltbare Anteil ist höher als vor der Behandlung mit Kalilauge. Der Versuch, die durch UV-Bestrahlung der JU-haltigen Apurinsäure entstandenen Spaltprodukte nachzuweisen, gelang nicht, weil Apurinsäure von dem verwendeten Fermentsystem nur unvollständig abgebaut wird. Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stdn. für DNase und drei Stdn. für Phosphatase waren aus der unbestrahlten Apurinsäure nur etwa 20% Desoxyribonucleoside und nach einer Reaktionszeit von 20 Stdn. für DNase und von 3 – 8 Stdn. für Phosphatase etwa 32 – 34% Desoxyribonucleoside freigesetzt worden. Nach UV-Bestrahlung wird die Apurinsäure durch das Fermentsystem noch schlechter gespalten (Tab. 7).

	Bestrahlungs-		R_f -Wert				
	Zeit t [Min.]	Stärke J_0 [erg/mm ²] · 10 ⁴	0—0,04	0,04—0,13	0,13—0,25	0,25—0,38	0,38—0,58
DNS	0	0	2,2	1,0	7,4	7,1	82,3
	4	4,84	12,5	3,0	7,2	28,4	48,9
	12	14,5	13,8	1,5	7,9	51,3	25,5
DNS nach Behandlung mit 1-n · KOH, 16 Std. 37 °C	0	0	3,7	0,1	4,4	3,1	88,7
	2	2,42	11,4	0,1	3,8	7,3	77,4
	8	9,68	23,4	0,1	3,7	11,2	61,6

Tab. 6. UV-Bestrahlung von JU-[2-¹⁴C]-DNS aus *Enterococcus* Stei, enzymatische Spaltung mit DNase und Schlangengift-Phosphatase, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. R_f 0—0,04 = der vom Fermentsystem nicht angreifbare phosphorhaltige Anteil, R_f 0,13—0,25 = Desoxycytidin, R_f 0,25—0,38 = Desoxyuridin, R_f 0,38—0,58 = Joddesoxyuridin und Thyminid. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

Bestrahlungs- Zeit t [Min.]	-Stärke J_0 [erg/mm ²]	R_f -Wert			
		0— 0,06	0,06— 0,24	0,24— 0,41	0,41— 0,61
0	0	80,5	1,2	0,5	17,8
12	$14,5 \cdot 10^4$	86,5	1,1	1,2	11,2

Tab. 7. UV-Bestrahlung von Apurinsäure aus JU-[2-¹⁴C]-DNS, enzymatische Spaltung mit DNase und Schlangengift-Phosphatase, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

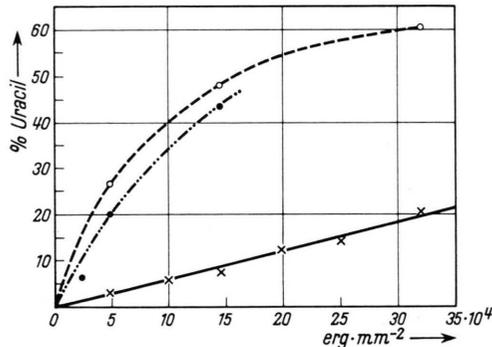


Abb. 2. Dehalogenierung von Halogenuracilen in DNS aus *Enterococcus* Stei durch UV-Bestrahlung (253,7 m μ). Ordinate: % Dehalogenierung, Abszisse: Bestrahlungsstärke. —x—x— CU-DNS, ---○---○ BU-DNS, ---●---● JU-DNS.

Zusammenfassend ergibt sich aus den vorstehenden Ergebnissen, daß die photochemische Dehalogenierung von BU und JU in der DNS mit etwa der gleichen Geschwindigkeit und mit der gleichen Ausbeute verläuft (Abb. 2).

Bestrahlungs- Zeit t [Min.]	-Stärke J_0 [erg/mm ²] $\cdot 10^4$	R_f -Wert				Uracil	CU
		0— 0,07	0,07— 0,18	0,18— 0,29	0,29— 0,40		
0	0	0,4	0	1,0	0,8	97,8	
4	4,84	1,4	1,0	3,0	4,0	90,6	
8	9,68	2,4	3,2	2,4	7,5	84,5	
12	14,5	4,5	2,8	2,7	8,2	81,8	
16	19,4	6,1	6,6	3,6	13,0	70,7	
21	25,4	5,7	7,6	2,7	13,3	70,7	
32	38,7	15,0	3,7	4,0	32,3	45,0	

Tab. 8. UV-Bestrahlung von CU-[2-¹⁴C]-DNS aus *Enterococcus* Stei, Spaltung mit Perchlorsäure, Papierchromatographie, System n-Butanol/Wasser. Zahlenangaben: Radioaktivität in %, Gesamtaktivität = 100.

F. UV-Bestrahlung von CU-DNS

Aus einer DNS, in die CU eingebaut wurde, wird ebenfalls das Halogenatom bei UV-Bestrahlung ab-

gespalten; die Kinetik der Dehalogenierung von CU ist jedoch völlig verschieden von der von BU und JU. Bei niedrigen Bestrahlungsstärken wird wesentlich weniger Chlor abgespalten als Brom und Jod, bei höheren Bestrahlungsstärken steigt die Chlorabspaltung stark an (Tab. 8). In Abb. 2 ist die Dehalogenierung von CU, BU und JU in der DNS graphisch dargestellt. Wie im Falle des BU ist auch in einer mit CU markierten Apurinsäure die Dehalogenierung durch UV-Strahlen wesentlich geringer als in der entsprechenden DNS.

Diskussion

Nach SMITH^{12, 12a} entstehen bei der UV-Bestrahlung von BU-haltigen Bakterien (*E. coli* B/r) 5 verschiedene Fotoprodukte aus BU. Wir konnten dieses Ergebnis bei *Enterococcus* Stei nur z. T. bestätigen. Wie aus den vorstehenden Versuchen hervorgeht, ist die Dehalogenierung unter Entstehung von Uracil die vorherrschende Reaktion bei der UV-Bestrahlung von 5-Halogen-Uracil enthaltender DNS. So wird bei einer Bestrahlung von BU-DNS mit $4,5 \cdot 10^4$ erg/mm² beispielsweise 29% der Radioaktivität beim Uracil und nur etwa 3% in Form von anderen Fotoprodukten mit niedrigerem R_f -Wert gefunden. Die letzteren dürften im wesentlichen dimeres Uracil und das Mischdimere aus Thymin und Uracil enthalten. Nach HAUG¹³ bildet sich bei der UV-Bestrahlung von Thymidyl-brom-desoxyuridin (TpBU) in Lösung eine bromfreie, gemischte dimere Verbindung mit einem Cyclohexenring zwischen den beiden Basen. Möglicherweise befindet sich auch diese Verbindung unter den Fotoprodukten mit niedrigerem R_f -Wert.

Wir können daher die sensibilisierende Wirkung der drei Halogen-Uracile gegenüber UV-Strahlen qualitativ auf eine gemeinsame Basis zurückführen, nämlich auf die Entstehung von Uracil in der DNS. In BU- und JU-haltiger DNS wird bei gleicher Bestrahlungsstärke etwa die gleiche Menge Uracil gebildet; dagegen ist die Uracil-Bildung in der CU-haltigen DNS wesentlich geringer. Dies ist ein Grund dafür, daß CU-haltige Zellen weniger empfindlich sind als BU- oder JU-haltige. Die Beobachtung, daß BU am stärksten sensibilisierend wirkt, ist darauf zurückzuführen, daß bei gleicher Halogen-

¹² K. C. SMITH, Biochem. biophysic. Res. Commun. **6**, 458 [1961].

^{12a} K. C. SMITH, Photochem. Photobiol., im Druck.

¹³ A. HAUG, persönliche Mitteilung.

uracil-Konzentration im Medium mehr BU an Stelle von Thymin in die DNS eingebaut wird als JU. Daher entsteht durch UV-Bestrahlung in einer BU-haltigen Zelle mehr Uracil als in einer Zelle mit JU-DNS. Durch Vergleich der Empfindlichkeiten von Halogenuracil enthaltenden Gewebezellen gegenüber UV-Bestrahlung, wurde die gleiche Reihenfolge festgestellt¹⁴.

Wir können annehmen, daß zumindest einer der Gründe für die Abtötung einer Zelle durch UV-Strahlen in der Dimerisierung zweier Thymin-Moleküle auf dem DNS-Strang zu suchen ist. Die Annahme, daß die Schädigung einer Zelle durch Thymindimerisierung nur dort auftreten kann, wo 2 Thyminbasen in geeigneter Beziehung zueinander stehen, während eingebautes BU praktisch an jeder Stelle dehalogeniert werden kann, reicht für die Erklärung des Phänomens der Strahlensensibilisierung durch Halogenuracil nicht aus.

Eine Reihe von Untersuchungen deutet auf die Wirkung von photoreaktivierenden Enzymen in der Zelle hin. In vitro-Versuche mit UV-bestrahlter DNS¹⁵ haben ergeben, daß die Thymindimerisierung durch ein aus Bäckerhefe extrahiertes Enzym unter Einwirkung von sichtbarem Licht nahezu vollständig wieder rückgängig gemacht werden kann¹⁶. Ergebnisse mit T₁-Phagen, die mit und ohne BU einmal auf *E. coli* B und einmal auf dessen strahlenempfindlicher Mutante *E. coli* B_s wachsen gelassen wurden, lassen ebenfalls auf eine enzymatische Reaktivierung von UV-Schäden schließen¹⁷. Man muß daher annehmen, daß die normale Zelle befähigt ist, ihre UV-Schäden selbst zu reparieren und daß die strahlenempfindlichen Mutanten diese Fähigkeit verloren haben. Daher bewirkt der Einbau von BU in diese Mutanten nur noch eine sehr geringe, zusätzliche Sensibilisierung. Offenbar hat dieses im Dunkeln wirkende reaktivierende Enzymsystem keine Wirkung auf Halogenuracil enthaltende DNS¹⁷, wodurch sich die strahlensensibilisierende Wirkung der Halogenuracile erklären ließe. Das durch Dehalogenierung in der DNS gebildete Uracil bildet offenbar ebenso eine Fehlstelle in der Doppel-Helix wie das dimere Thymin. Im Gegensatz zu Thymindimerem, das durch die reaktivierenden Enzyme

wieder zu Thymin aufgespalten werden kann, bildet Uracil in der DNS einen irreparablen Schaden.

Wie die Versuche mit sichtbarem Licht zeigen (Tab. 3), beruht die durch eine Tageslichtlampe verursachte Abspaltung von Brom aus BU-haltiger DNS auf dem in dieser Lichtquelle enthaltenen geringen Anteil UV-Strahlen. Bei Vorschalten eines geeigneten Filters ist keine nennenswerte Abspaltung von Halogen mehr nachweisbar.

Ein weiterer, interessanter Befund scheint uns die unterschiedliche Dehalogenierung einmal in der nativen und zum anderen in der einsträngigen DNS zu sein. Wie wir gesehen haben, erhält man das gleiche Ergebnis bei Bestrahlung der isolierten DNS wie auch der ganzen Bakterienzellen. Dadurch bietet sich eine Möglichkeit, bei Verwendung von radioaktivem BU den molekularen Zustand der DNS in *Enterococcus* Stei in verschiedenen Stoffwechselphasen zu ermitteln. Im Gegensatz zu der kleinen Differenz, die sich bei der Bestimmung der Menge Thymindimeres ergibt, lassen sich die großen Unterschiede im Uracilgehalt wesentlich besser ermitteln. Wie wir bereits mitgeteilt haben¹⁸, sind die unterschiedlichen Mengen Thymindimeres bei Bestrahlung in verschiedenen Zellteilungsphasen ein Hinweis für eine Trennung der Doppel-Helix. Man kann daher erwarten, daß die Bestimmung der durch photochemische Dehalogenierung gebildeten Menge Uracil weitere Aufschlüsse über das molekulare Verhalten der DNS gibt.

Aus den Versuchen (Tab. 2) geht weiterhin hervor, daß die UV-Bestrahlung einer Halogenuracil-enthaltenden DNS dazu führt, daß Teile des Moleküls durch DNase und Phosphatase nicht mehr oder nur sehr viel schwerer angegriffen werden. Der von den Enzymen nicht aufgespaltene Anteil enthält neben den üblichen Basen auch noch Uracil, Halogenuracil und dimeres Thymin. Eine Arbeit über den enzymatisch nicht spaltbaren Anteil von Thymin-[2-¹⁴C]-markierter DNS ist in Vorbereitung.

Herrn Dr. D. WEINBLUM danken wir für die Synthese der markierten Verbindungen, Fräulein U. GÜNGERICH und Fräulein A. GERSTENBERGER für ausgezeichnete technische Assistenz. Die Arbeit wurde durch den Verband der Chemischen Industrie - Fonds der Chemie - unterstützt.

¹⁴ R. L. ERIKSON u. W. SCYBALSKI, Biochem. biophysic. Res. Commun. **4**, 258 [1961].

¹⁵ D. L. WULFF u. C. S. RUPERT, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7**, 237 [1962].

¹⁶ A. WACKER, J. Chim. physique **58**, 1041 [1961].

¹⁷ P. HOWARD-FLANDERS, R. P. BOYCE u. L. THERIOT, Nature [London] **195**, 51 [1962].

¹⁸ A. WACKER, H. DELLWEG u. D. JACHERTS, J. molecular Biol. **4**, 410 [1962].