

Photoreaktivierung von UV-inaktivierter Polyuridylsäure

VON ADOLF WACKER, MAKOTO ISHIMOTO *, PRAKASH CHANDRA ** und REINHOLD SELZER

Aus dem Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. **19 b**, 406—408 [1964]; eingegangen am 5. Februar 1964)

A study on the effect of UV-irradiated polyuridylic acid on the incorporation of phenylalanine into the polypeptide precipitable through trichloroacetic acid, in a cell-free system from *E. coli* was made. Attempts were made to reactivate the UV-inactivated polyuridylic acid through hydrogen peroxide, uranyl acetate and visible light. We could show that polyuridylic acid irradiated at a dose of 1.2×10^5 ergs/mm² could be completely reactivated, while the one irradiated at a higher dose of 2.4×10^5 ergs/mm² could not be completely reactivated under the conditions of our experiment. We have studied the effects of hydrogen peroxide and uranyl acetate on UV-irradiated polyuridylic acid chemically as well. Our results altogether show that the photoreactivating effect of uranyl acetate and hydrogen peroxide is due to their ability to split the uracil dimers formed during UV-irradiation.

Arbeiten aus unserem Laboratorium¹ und anderen² zeigten, daß die UV-Bestrahlung von Polyuridylsäure zu einer Hemmung der Polyphenylalansynthese im zellfreien Extrakt aus *E. coli* B führt. Auf Grund früherer Arbeiten ist bekannt, daß bei der Bestrahlung von Uracil und Uridin zwei Photoprodukte entstehen, ein Wasseranlagerungsprodukt³⁻⁶ und ein Dimeres⁷.

In einer Reihe von Experimenten zeigten WACKER und Mitarbb.⁷, daß die letale Wirkung des UV-Lichtes auf die Zelle überwiegend, wenn nicht ausschließlich, ihre Ursache in der strahlenchemischen Dimerisierung des Thymins in der DNS hat. Die Aufspaltung des Thymin-Dimeren durch Einwirkung von Uranylacetat und sichtbarem Licht *in vitro*⁸ und *in vivo*⁹ sind ebenfalls beobachtet worden. Kürzlich konnten WACKER und GERSTENBERGER¹⁰ zeigen, daß durch UV-Licht inaktivierte Bakterien durch Behandlung mit Wasserstoffperoxyd und sichtbarem Licht reaktiviert werden.

Ausgehend von diesen Beobachtungen war es nun von Interesse zu sehen, ob durch UV-Licht inaktivierte Polyuridylsäure unter den gleichen Bedingungen reaktivierbar ist.

Material und Methoden

Die Bakterien wurden, wie früher beschrieben¹¹, kultiviert, die Zellen während der log-Phase abzentrifugiert und 2-mal mit 0,01-*m*. Tris-Puffer, pH 7,8, der zusätzlich 0,01 mMol Magnesiumacetat und 0,06 mMol Kaliumchlorid pro ml enthielt, gewaschen. Die Bakterien wurden nochmals mit der gleichen Pufferlösung gewaschen, die jetzt außerdem 0,006 mMol/ml Mercaptoäthanol enthielt. Danach wurden die Bakterien im 2,5-fachen Volumen des zuletzt benutzten Puffers suspendiert und die 1,5-fache Gewichtsmenge Glasperlen hinzugefügt. Diese Suspension wurde 2 Min. im Vibrator (B. Braun & Co., Melsungen) bei 0° geschüttelt und danach die Zelltrümmer 20 Min. bei 30 000 *g* und 2°C abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde dekantiert, mit 3 µg/ml DN-ase versetzt und nochmals 20 Min. bei 30 000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde ein drittes Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die resultierende, sogenannte S-30-Fraktion wurde für die weiteren Versuche verwendet.

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von LOWERY et al.¹² durchgeführt.

In den Versuchen wurde Polyuridylsäure von Miles & Co., New Jersey, U.S.A., verwendet. Die Bestrahlung der Polyuridylsäure erfolgte in wäßriger Lösung mit einem Quecksilber-Niederdruckbrenner NN 30/89 (Quarzlampengesellschaft mbH, Hanau am Main), im Abstand von 6 cm von der Brennstabmitte. Die an der

* Stipendiat der Humboldt-Stiftung.

** Stipendiat des Akademischen Auslandsamtes der Universität Frankfurt am Main.

¹ A. WACKER, D. JACHERTS u. B. JACHERTS, *Angew. Chem.* **74**, 653 [1962].

² L. GROSSMAN, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **48**, 1609 [1962].

³ R. L. SINSHEIMER u. R. HASTINGS, *Science* [Washington] **110**, 525 [1949].

⁴ S. Y. WANG et al., *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4180 [1956].

⁵ A. M. MOORE, *Canad. J. Chem.* **36**, 281 [1958].

⁶ K. L. WIERZCHOWSKI u. D. SHUGAR, *Acta biochim. polon.* **6**, 313 [1959].

⁷ A. WACKER, in: *Progress of Nucleic Acid Research*, Vol. 1 [1963].

⁸ A. WACKER u. R. SELZER, unveröffentlichte Ergebnisse.

⁹ A. WACKER u. G. TÜRK, unveröffentlichte Ergebnisse.

¹⁰ A. WACKER u. A. GERSTENBERGER, *Angew. Chem.* **75**, 916 [1963].

¹¹ A. WACKER, M. EBERT u. H. KOLM, *Z. Naturforschg.* **13 b**, 141 [1958].

¹² O. H. LOWERY et al., *J. biol. Chemistry* **193**, 265 [1951].

Lösungsfläche wirksame Bestrahlungsstärke betrug $J_0 = 1,2 \cdot 10^4$ erg/mm².

Wir benutzen das Einbausystem von MATTHAEI und NIRENBERG¹³ aber ohne UTP und CTP im Reaktionsgemisch. Den Einbau des radioaktiven Phenylalanins in das mit Trichloressigsäure fällbare Polypeptid bestimmen wir nach MANS und NOVELLI¹⁴.

Die Polyuridyldsäure wurde vor und nach der UV-Inaktivierung sowie Photoreaktivierung mit 0,3-n. KOH gespalten und die Hydrolysenprodukte elektrophoretisch aufgetrennt. Die Flecken wurden mit 0,1-n. HCl eluiert und im Spektralphotometer quantitativ die Absorption bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, verliert die Polyuridyldsäure entsprechend der eingestrahlten Dosis UV-Licht ihre Fähigkeit, Phenylalanin einzubauen. Während der UV-Bestrahlung der Polyuridyldsäure wird

UV-Licht [erg/mm ² · 10 ⁵]	Hitze	% Inkorporation Phenylalanin-[1- ¹⁴ C] Ipm/mg Protein (S-30)
0	—	100
0	+	92
1,2	—	75,2
2,4	—	35,8
2,4	+	48,5
4,2	—	26,8
7,2	—	17,8

Tab. 1. Wirkung von Hitze auf UV-bestrahlte Polyuridyldsäure beim Einbau von Phenylalanin. Polyuridyldsäure wurde im Wasserbad auf 85 °C 15 Min. erhitzt. Das Reaktionsgemisch enthielt 80 µg/ml Polyuridyldsäure. 100% Einbau bedeutet 2780 Ipm/mg Protein der S-30-Fraktion.

Uracil vorzugsweise bei kleineren Dosen UV-Licht dimerisiert, bei höheren Dosen in das Wasseranlagerungsprodukt umgewandelt. Durch Hitze wird das Wasseranlagerungsprodukt wieder in Uracil umgewandelt, das Dimere dagegen nicht. Erhitzt man daher die auf 35,8% inaktivierte Polyuridyldsäure 15 Min. auf 85 °C, so steigt die Aktivität um 12,7% wieder an. Daraus kann man schließen, daß der durch Hitze nicht reaktivierbare Teil aus Uracil-Dimerem besteht.

In Tab. 2 ist die Reaktivierung der durch 2 verschiedene Dosen UV-Licht inaktivierten Polyuridyldsäure mit H₂O₂, Uranylacetat und sichtbarem Licht aufgezeichnet. Wie daraus hervorgeht, wird die bei der Phenylalanin-Inkorporation auf 75% inaktivierte Polyuridyldsäure allein durch Behandlung mit

UV-Licht [erg/mm ² · 10 ⁵]	H ₂ O ₂	Uranyl- acetat	Sichtbares Licht	Inkorporation [%]
0	—	—	—	100
0	+	—	+	108
1,2	—	—	—	75,2
1,2	+	—	—	104
1,2	+	—	+	109
1,2	—	+	—	86,8
1,2	—	+	+	107,8
2,4	—	—	—	35,8
2,4	+	—	—	76,5
2,4	+	—	+	87,4
2,4	—	+	—	73,7
2,4	—	+	+	90

Tab. 2. Photoreaktivierung von UV-bestrahlter Polyuridyldsäure mit H₂O₂, Uranylacetat und sichtbarem Licht. Polyuridyldsäure wurde in Gegenwart von 3 µg/ml H₂O₂ oder 5 µg/ml Uranylacetat mit 6,6 · 10⁶ erg/mm² Licht einer Quecksilberdampf Lampe HPR 125 W der Deutschen Philipps GmbH. bestrahlt. Die Polyuridyldsäure-Lösung, behandelt mit Uranylacetat, wurde nach der Belichtung dialysiert. Das Reaktionsgemisch enthielt 80 µg/ml Polyuridyldsäure. 100% Einbau bedeutet 2780 Ipm/mg Protein der S-30-Fraktion.

H₂O₂ oder Uranylacetat vollständig, bzw. beträchtlich reaktiviert. Zusätzliche Behandlung mit sichtbarem Licht verstärkt den Effekt sowohl des H₂O₂, als auch des Uranylacetats. In beiden Fällen erhält man überraschenderweise die Ausgangsaktivität nicht nur zurück, sondern überschreitet sie noch. Merkwürdigerweise läßt sich auch die Aktivität der nicht bestrahlten Polyuridyldsäure durch Behandlung mit H₂O₂ und Bestrahlung mit sichtbarem Licht etwa um 10% verbessern. Dieses Ergebnis wurde in wiederholten Versuchen immer wieder erhalten. Eine Erhöhung der Aktivität erreicht man mit H₂O₂ auch ohne Bestrahlung. Wird die Polyuridyldsäure auf 35,8% inaktiviert, so läßt sich dies zu etwa 13% auf das Wasseranlagerungsprodukt zurückführen (s. Tab. 1) und zum überwiegenden Teil auf das Uracil-Dimere. Behandlung mit H₂O₂ oder Uranylacetat alleine, läßt die Aktivität in beiden Fällen um etwa 40% ansteigen. Zusätzliche Behandlung mit sichtbarem Licht bewirkt eine weitere Reaktivierung; der photochemisch nicht reaktivierbare Teil in diesem Experiment ist auf das Wasseranlagerungsprodukt zurückzuführen, was mengenmäßig gut mit dem in Tab. 1 angegebenen Wert übereinstimmt.

Spaltet man UV-bestrahlte Polyuridyldsäure mit 0,3-n. KOH und isoliert elektrophoretisch quantitativ die Uridyldsäure, so erhält man die in Tab. 3 auf-

¹³ J. MATTHAEI u. M. W. NIRENBERG, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1580 [1961].

¹⁴ R. J. MANS u. G. D. NOVELLI, Arch. Biochem. Biophysics 94, 48 [1961].

UV-Licht [erg/mm ² · 10 ⁵]	H ₂ O ₂	Uranyl- acetat	Sichtbares Licht	UMP [%]
0	—	—	—	100
1.8	—	—	—	80
1.8	+	—	+	90
1.8	—	+	+	93

Tab. 3. Menge UMP in % nach Spaltung von Polyuridylsäure vor und nach Behandlung mit den aufgezeichneten Agentien. 100 $\mu\text{g/ml}$ H₂O₂ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ Uranylacetat enthaltende Polyuridylsäure-Lösung (3 mg/ml) wurde behandelt, wie Tab. 2 zeigt.

geführten Werte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Wasseranlagerungsprodukt des Uracils in Uracil überführt wird und das Dimere gegen KOH nicht vollkommen resistent ist und teilweise zur monomeren Verbindung aufgespalten wird. Trotz dieser Einschränkung zeigt Tab. 3 eindeutig, daß die Zusammenwirkung von H₂O₂ oder Uranylacetat und Bestrahlung mit sichtbarem Licht wesentlich mehr von der dimeren Verbindung zur monomeren Verbindung aufspaltet.

Wie wir kürzlich zeigten, können durch UV-Licht inaktivierte Bakterien durch Behandlung mit H₂O₂ allein oder in verstärktem Maße durch H₂O₂ und sichtbares Licht reaktiviert werden. Wie aus den vorstehenden Versuchen hervorgeht, trifft dies ebenfalls für mit hohen UV-Dosen inaktivierte Polyuridylsäure zu, in bezug auf ihre Fähigkeit, Phenylalanin in das Polypeptid einzubauen. Während die

Reaktivierungsaktivität des Uranylacetats bei Bakterien infolge seiner Toxizität wesentlich geringer ist, ist die Wirkung bei der Polyuridylsäure etwa die gleiche, wie die mit Wasserstoffperoxyd. In beiden biologischen Systemen – Bakterienzelle und Proteinsynthese – läßt sich die UV-inaktivierende Wirkung auf die chemische Veränderung der Basenbausteine der Nucleinsäuren zurückführen, nämlich auf die Dimerisierung des Thymins oder auf die Dimerisierung und Wasseranlagerung des Uracils. Wie aus dem chemischen Modellversuch an UV-bestrahlter Polyuridylsäure hervorgeht, führt die Einwirkung von H₂O₂ oder Uranylacetat und Bestrahlung mit sichtbarem Licht, gemessen an der Ausbeute der Uridylsäure, zu einer Aufspaltung der dimeren Verbindung. Das überraschende Ergebnis, daß man durch H₂O₂ die Phenylalanin-Inkorporation steigern kann, läßt sich vielleicht auf die Einwirkung des in der Reaktivierungslösung noch vorhandenen H₂O₂ auf die Enzymsysteme, zurückzuführen. Der Molekulare Mechanismus der Dimeren-spaltenden Wirkung des H₂O₂ und Uranylacetats, dürfte in der Bildung von Radikalen zu suchen sein, wobei sichtbares Licht die Radikalbildung verstärkt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie – Fonds der Chemie – für die Unterstützung; Frau HANSI FELLER für ausgezeichnete technische Assistenz.