

Über die UV-Bestrahlung von Desoxyribonucleinsäure in Glykol

HANSWERNER DELLWEG und ADOLF WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main)

(Z. Naturforschg. 20 b, 141—143 [1965]; eingegangen am 5. Dezember 1964)

Glycol causes a denaturation of the DNA double helix structure in solution. As could be shown earlier, heat denaturation of DNA leads to an increased dimerization of thymine following uv-irradiation. In contrast to this, thymine dimer is not increased — but is even slightly decreased — when DNA is uv-irradiated in the presence of glycol. These results are discussed with regard to the distortion of the hydration layer and the hydrophobic stacking of bases, as influenced by glycol.

Die durch UV-Bestrahlung in der DNS hervorgerufene Dimerisierung von Thymin ist vom jeweiligen Zustand der DNS während der Bestrahlung abhängig. Diesen Effekt konnten wir in früheren Versuchen mit synchron wachsenden Kulturen von *E. coli* nachweisen. Im Verlauf eines Teilungszyclus von etwa 20 Min. durchlaufen die Zellen Phasen verschiedener UV-Empfindlichkeiten. Nach Beginn des synchronen Stoffwechsels steigt die Empfindlichkeit an, erreicht etwa in der Mitte eines Teilungszyclus ein Maximum und sinkt dann zum Ende der Teilungsperiode wieder ab. Die Dimerisierung von Thymin verläuft mit diesem periodischen An- und Abstieg der UV-Empfindlichkeit, den wir über drei Teilungszyklen verfolgen konnten, etwa parallel. Durch Bestrahlung einer Kultur in der Mitte des Teilungsrythmus wird mehr Thymin dimerisiert als durch eine Bestrahlung am Anfang oder am Ende des Teilungszyclus. Wir deuteten dieses Ergebnis so, daß die DNS in bestimmten Phasen der Zellvermehrung wenigstens teilweise in die Einzelstränge aufgespalten wird und in diesem Zustand gegenüber UV-Bestrahlung empfindlicher ist¹.

Auch bei der UV-Bestrahlung von isolierter DNS aus *Enterococcus* Stei erhielten wir ähnliche Ergebnisse. Nach Bestrahlung einer Lösung von nativer DNS dimerisierten 9% des Thymins. Nach Hitze-denaturierung der DNS (10 Min. bei 100 °C und rasches Abkühlen) stieg die Menge an dimerem Thymin bei der gleichen Bestrahlungsstärke auf 11,5% an (s. l. c.², Tab. 6).

Eine Auftrennung der Doppelhelix in die Einzelstränge findet auch in Gegenwart von nichtwäßrigen Lösungsmitteln statt. Von DUGGAN wurde 1961 der Hyperchromieeffekt einer Lösung von nativer DNS in Gegenwart von Glykol oder Glycerin beschrieben³. Danach wird in Glykol als Lösungsmittel die DNS vollständig denaturiert. Durch schrittweisen Ersatz des Wassers durch Glykol wurde festgestellt, daß oberhalb einer Konzentration von 93 Vol.-% Glykol bei 25 °C die Doppelhelix praktisch vollständig gespalten ist⁴. Auch andere nichtwäßrige Lösungsmittel, wie Formamid^{4,5}, Äthanol⁶ sowie verschiedene substituierte Amide, Carbamate, Harnstoffe usw.⁷ führen zur Denaturierung des DNS. An diese Beobachtungen schloß SINANOGLU⁸ einige physikalisch-chemische Betrachtungen über die Bindungskräfte in der Doppelhelix.

Wir hatten erwartet, daß bei UV-Bestrahlung einer DNS-Lösung in Gegenwart von Glykol ein höherer Prozentsatz Thymin dimerisieren würde als in Abwesenheit von Glykol. In einem ersten Bestrahlungsversuch von DNS in 86-proz. Glykol fanden wir aber einen viel geringeren Anstieg der Dimerisierung, als erwartet².

Ergebnisse und Diskussion

Wir haben nun nochmals eine Reihe von Bestrahlungsversuchen in Gegenwart verschiedener Mengen Glykol im Konzentrationsbereich von 90 bis 100% durchgeführt. Tab. 1 enthält den durch Glykol ver-

¹ A. WACKER, H. DELLWEG u. D. JACHERTS, J. molecular Biol. 4, 410 [1962].

² H. DELLWEG u. A. WACKER, Z. Naturforschg. 17 b, 827 [1962].

³ E. L. DUGGAN, Biochem. biophysic. Res. Commun. 6, 93 [1961].

⁴ T. T. HERSKOVITS, Arch. Biochem. Biophysics 97, 474 [1962].

⁵ P. O. P. Ts'o, G. K. HELMKAMP u. C. SANDER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 55, 584 [1962].

⁶ J. H. COATES u. D. O. JORDAN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 44, 214 [1960].

⁷ L. LEVINE, J. A. GORDON u. W. P. JENCKS, Biochemistry 2, 168 [1963].

⁸ O. SINANOGLU u. S. ABDULNUR, Photochemistry Photobiology, im Druck.

Glykol [%]	0	25	50	70	80	85	90	94	96	98	0 ^a	0 ^b
NaCl mMol/L	150	112	75	37,5	30	22,5	15	9	6	3	150	5
D/D_0	1,00	1,00	1,07	1,11	1,18	1,19	1,17	1,18	1,27	1,49	1,15	1,44
D/D_0^c	1,00	1,03	1,07	1,10	1,26	1,42	1,40	1,39	1,38	1,45	—	—

Tab. 1. Extinktionszunahme einer DNS-Lösung in Abhängigkeit von der Glykol-Konzentration. 0,1 ml einer Lösung von 0,25 mg DNA aus Lachs-Sperma (A grade, Cal. Corp. Biochem. Research) wurden mit der entsprechenden Menge Glykol (über Aktivkohle gereinigt) versetzt und mit 0,15-m. Kochsalzlösung (pH 7,2) auf 5 ml aufgefüllt. Messung der Extinktion (259 $m\mu$) nach etwa 2 Stdn. bei Zimmertemperatur (= D). Danach wurden die Proben mit Kochsalzlösung auf das Vierfache verdünnt und erneut ausgemessen (= D_0). Der hyperchrome Effekt ist durch das Verhältnis D/D_0 ausgedrückt. Beim Verdünnen der 98% Glykol enthaltenden Lösung sank das Extinktionsverhältnis von 1,49 auf 1,14, in allen anderen Fällen sank es auf 1,00 innerhalb einer Fehlergrenze von 1% zurück. ^a und ^b: Denaturierung durch Erhitzen (10 Min. 100°C) und rasches Abkühlen in Abwesenheit von Glykol. ^c: In Abwesenheit von Kochsalz.

ursachen Extinktionsanstieg einer DNS-Lösung, ausgedrückt durch das Verhältnis der Extinktionen in Gegenwart (D) und in Abwesenheit (D_0) von Glykol. Es hat den Anschein, als sei die Denaturierung durch Glykol in Konzentrationen unter 95% nicht so vollständig wie durch Erhitzen in der niedrigen Salzkonzentration. Das geht einerseits aus dem relativ geringen hyperchromen Einfluß des Glykols, andererseits aus dem vollständigen Abfall der Extinktion auf den Normalwert nach Verdünnen der Glykol-haltigen Lösungen hervor. In einer durch Hitze denaturierten DNS wird durch langsames Abkühlen und längeres Tempern bei 60 °C der hyperchrome Effekt nur zu etwa 25% wieder rückgängig gemacht.

Die Bildung von dimerem Thymin durch UV-Bestrahlung von DNS in verschiedenen Konzentrationen an Glykol ist aus Tab. 2 zu ersehen. In Abwesenheit von Glykol werden 9,5% des Thymins dimerisiert. Dieser Wert steigt nach Hitzedenaturierung auf 12% an. Auch in Gegenwart von 90% Glykol, wo offenbar noch keine vollständige Strangtrennung stattgefunden hat, ist die Dimerisierung mit 10,4% deutlich erhöht. Wider Erwarten steigt jedoch die Dimerisierung nach Bestrahlung bei höheren Glykol-Konzentrationen nicht weiter an, sondern sinkt wieder ab. Nimmt man an, daß die Werte zwischen 96 und 100% Glykol um einen Mittelwert schwanken, so ergibt sich in diesem Bereich eine Dimerisierungsrate von 8,7%, das heißt, eine geringere Dimerisierung, als bei Bestrahlung der DNS in wäßriger Lösung. Ähnliche Ergebnisse über die verminderte Dimerisierung von Thymidyl-thymidin (TpT) nach Bestrahlung bei 280 $m\mu$ in Gegenwart verschiedener organischer Lösungsmittel liegen vor⁹.

Glykol [%]	NaCl mMol/l	$T_{dim.} \cdot 100$ $T + T_{dim.}$	Mittlerer Fehler d. Mittelw.	Anzahl d. Bestimmungen
0	150	9,5	± 0,08	4
0	150	12,0	—	1*
90	15	10,4	± 0,3	2
96	6	8,6	—	1
97	4,5	9,0	± 0,2	2
98	3	8,4	—	1
99	1,5	8,5	—	1
100	0	8,7	± 0,3	2
Mittelwert aus 96—100%				
	—	8,7	± 0,12	7

Tab. 2. Dimerisierung von Thymin nach UV-Bestrahlung von DNS in Glykol. Eine Lösung von DNS (aus *E. coli* 15 T⁺, mit Thymin-[2-¹⁴C] markiert) wurde mit Glykol (über Kohle gereinigt) und 0,15-m. Kochsalzlösung im entsprechenden Verhältnis gemischt. Konzentration: 0,058 mg DNS mit etwa 60 000 Imp./Min. pro ml. Bestrahlung mit einem Quecksilber-Niederdruckbrenner in 0,5 cm Schichtdicke mit $9,7 \cdot 10^4$ erg/ mm^2 . Durchlässigkeitsgrad von Glykol (0,5 cm, 254 $m\mu$): 79 Prozent. Fällung der DNS unter Zusatz von 0,4 mg inaktivem Material mit Aceton; Spaltung mit Perchlorsäure (60 Min. bei 85 °C). Papierchromatographische Trennung der Basen nach l. c.¹¹. Bestimmung der Radioaktivität von Thymin (R_f 0,58) im Methandurchflußzähler. *: Nach Hitzedenaturierung der DNS (10 Min. 100 °C) und Abkühlung in Eis.

Inzwischen haben SINANOGLU und ABDULNUR⁸ eine Berechnung der Bindungskräfte in der DNS-Doppelhelix und ihrer Beeinflussung durch verschiedene Lösungsmittel angestellt. Diese Überlegungen sind vielleicht geeignet, auch unsere Ergebnisse zu erklären: Nach unseren Vorstellungen können zwei Thymin-Moleküle nur dann dimerisieren, wenn sie in einer richtigen Lage zueinander festgehalten werden. Dies geschieht in der Doppelhelix der DNS durch die Anordnung der nahezu ebenen Basen in Schich-

¹¹ G. R. WYATT, Biochem. J. **48**, 584 [1951].

⁹ A. WACKER u. E. LODEMANN, Angew. Chem. **77**, 133 [1965].

ten mit einem Abstand von 3,4 Å (s. z. B. l. c.¹⁰). In wäßriger Lösung werden im Einzelstrang, nach SINANOGLU, vermöge der großen Grenzflächenenergie des Wassers, mehrere aufeinanderfolgende Basen innerhalb einer Hydrathülle „gestapelt“ (stacking of bases), und zwar in einer Weise, in der offenbar der Elektronenübergang zwischen zwei Basen, wie er für die Thymin-Dimerisierung Voraussetzung ist, hier leichter erfolgen kann, als in der Doppelhelix. Daraus erklärt sich die bessere Dimerisierung des Thymins in der einzelsträngigen DNS in Wasser. Die Hydrathülle, die einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität der Doppelhelix liefern soll, wird in Anwesenheit von nichtwäßrigen Lösungsmitteln zerstört. Dabei zerfällt die Doppelhelix in die Einzelstränge, in denen aber jetzt der Stapeleffekt einzelner Basen durch das Fehlen der Hydrathüllen reduziert ist. Die

Folge ist eine Verminderung der Thymin-Dimerisierung im Einzelstrang in Gegenwart von nichtwäßrigen Lösungsmitteln. Offenbar wirken hier die beiden Effekte der vermehrten Dimerisierung, bedingt durch den Helix-Knäuel-Übergang und der verminderten Dimerisierung, bedingt durch die verminderte Hydratisierung in entgegengesetzter Richtung, so daß in Konzentrationen über 96% Glykol eine Dimerisierungsrate zu beobachten ist, die nur wenig, aber signifikant unter dem Wert in der Doppelhelix liegt.

Wir danken Herrn Prof. Dr. O. SINANOGLU für anregende Diskussionen und Fräulein U. GÜNGERICH für die ausgezeichnete Hilfe bei den Versuchen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung danken.

¹⁰ R. LANGRIDGE, W. E. SEEDS, H. R. WILSON, C. W. HOOPER, M. H. F. WILKINS u. L. D. HAMILTON, J. biophysic. biochem. Cytol. 3, 767 [1957].

Zum Mechanismus des photosynthetischen Elektronentransportes in isolierten Chloroplasten

Substituierte *p*-Phenylendiamine als Elektronendonatoren (II)*

ACHIM TREBST und ELFRIEDE PISTORIUS

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, Abt. Biochemie der Pflanzen

(Z. Naturforschg. 20 b, 143—147 [1965]; eingegangen am 30. Oktober 1964)

The behavior of 2,3,5,6-tetramethyl-*p*-phenylendiamine (DAD) in photosynthetic reactions of isolated chloroplast fragments was compared with that of *N*-tetramethyl-*p*-phenylendiamine (TMPD). Both reverse the DCMU-inhibition of photosynthetic NADP-reduction. The DAD-system (at high concentrations of DAD), is coupled to a stoichiometric ATP-formation, whereas the TMPD-system is not. This shows that *p*-phenylendiamines, depending on their constitution, may react with components of the electron transport chain of chloroplasts before or after the phosphorylation site, and locates the phosphorylation step of photosynthetic phosphorylation between two endogenous compounds in that part of the electron transport chain, which connects the two light reactions of photosynthesis.

At lower concentrations of DAD the diminished NADP-reduction is no longer coupled to ATP-formation, indicating a second point of entry of electrons from DAD into the electron transport chain. DAD, furthermore, is a cofactor of cyclic photophosphorylation. It therefore behaves like DCPIP, but the rates of the DAD-system are higher.

Die HILL-Reaktion, d. h. die photosynthetische O₂-Entwicklung unter Reduktion eines Elektronenakzeptors, wird durch das Herbizid DCMU gehemmt¹. Die DCMU-Hemmung der photosyntheti-

schen NADP-Reduktion in isolierten Chloroplasten kann durch DCPIP/Ascorbat wieder aufgehoben werden, wobei NADP jetzt ohne O₂-Entwicklung auf Kosten der Oxydation von Ascorbat, vermittelt durch

* I. Mitt. s. l. c.³.

Folgende Abkürzungen werden verwendet: ATP = Adenosin-triphosphat; NADP = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat; DAD = Diaminoduroil (2,3,5,6-Tetramethyl-*p*-phenylendiamin); TMPD = *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*p*-phe-

nylendiamin; DCMU = Dichlorphenyldimethylharnstoff; DCPIP = Dichlorphenolindophenol.

¹ J. S. C. WESSELS u. R. VAN DER VEEN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 19, 548 [1958]; N. I. BISHOP, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 27, 205 [1958].