

Über Photoreaktionen und spektrale Veränderungen von 3.4-Benzopyren in wäßrigen Protein- und DNS-Lösungen

GÜNTER RESKE und JOACHIM STAUFF

Institut für physikalische Biochemie und Kolloidchemie im Institut für physikalische Chemie der Universität Frankfurt a. M.

(Z. Naturforschg. **20 b**, 15—20 [1965]; eingegangen am 10. Oktober 1964)

Ts'o and Lu have reported an anaerobic photoreaction of 3.4-benzopyrene in aqueous DNA-solutions, which was detected by the decrease of the characteristic UV-absorption of the hydrocarbon, when irradiated with long-wavelength-UV-light.

This photoreaction

1. is not specific for DNA-solutions as is shown by the same decrease of UV-absorption bands when ethanolic solutions of 3.4-benzopyrene are irradiated under anaerobic conditions with light of the same wavelengths (maximum intensity at 3650 Å),

2. is slower by order of magnitude under aerobic and anaerobic conditions than the aerobic photoreaction of 3.4-benzopyrene in aqueous solutions of β -lactoglobuline, which is observed by the decrease of absorption as well as fluorescence bands.

The relation of intensities required to obtain the same reaction rate in DNA as in protein solution is at least 100 : 1.

It is suggested, that the reported binding of radioactivity to DNA after applying labelled hydrocarbons in vitro (Ts'o and Lu) and in vivo (BROOKES and LAWLEY) is due to binding of metabolites, which are produced in primary hydrocarbon reactions most probably without DNA-participation.

The solutions of 3.4-benzopyrene under investigation in ethyl alcohol, cyclohexane, aqueous caffeine, aqueous trisbuffered DNA, β -lactoglobuline and bovine serum albumine are characterized by absorption and fluorescence spectra. While in caffeine (and DNA) the same shift to longer wavelengths, compared with ethanolic solutions, is observed in absorption and in fluorescence, in protein solutions a red shift of the same degree occurs only in absorption. A possible correlation between this finding and photodynamic reactions is discussed.

Ts'o und Lu¹ haben Lösungen von Tritium-markiertem 3.4-Benzopyren in DNS unter N₂ mit UV-Licht der Wellenlängen größer als 290 bzw. 340 m μ bestrahlt und beobachtet, daß die charakteristische UV-Absorption des Kohlenwasserstoffs mit der Bestrahlungszeit abnimmt und gleichzeitig die Kohlenwasserstoff-Radioaktivität mit der Dauer der Bestrahlung in zunehmendem Maße an die DNS gebunden wird.

Wir wollen in dieser Arbeit zeigen, daß die Abnahme der UV-Absorption von 3.4-Benzopyren bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht unter N₂ nicht spezifisch ist für Lösungen des Kohlenwasserstoffs in wäßrigen DNS-Lösungen, sondern bei vergleichbaren Bedingungen auch in seinen alkoholischen Lösungen beobachtet wird. Ferner wird gezeigt, daß die früher^{2,3} beschriebene aerobe Photoreaktion von 3.4-Benzopyren in wäßrigen β -Lactoglobulin-Lösungen auch in der Abnahme der UV-Absorption des Kohlenwasserstoffs zu beobachten ist

und die Ergebnisse der Bestimmungen ihrer Geschwindigkeit in Absorption und Fluoreszenz quantitativ übereinstimmen. Durch Parallelversuche und Vergleich mit den Daten von Ts'o und Lu¹ wird übereinstimmend nachgewiesen, daß für die aerobe Photoreaktion von 3.4-Benzopyren mit β -Lactoglobulin die Bestrahlungsintensität um Größenordnungen geringer ist als die für gleichen Umsatz bei der unspezifischen Photoreaktion von 3.4-Benzopyren in DNS-Lösungen oder in Äthanol erforderliche Intensität.

Die untersuchten Lösungen von 3.4-Benzopyren in Äthanol, Cyclohexan, Coffein, DNS und β -Lactoglobulin werden durch die Absorptions- und Fluoreszenzspektren des Kohlenwasserstoffs charakterisiert. Das Absorptionsspektrum von 3.4-Benzopyren in β -Lactoglobulin-Lösung stimmt in Bandenlage und Intensitätsverteilung mit dem in Coffeinelösung überein. Eine entsprechende Rotverschiebung der Banden des Fluoreszenzspektrums gegen die Bandenlage des

¹ PAUL O. P. TS'O u. PONZY LU, Proc. nat. Acad. Sci. USA **51**, 272 [1964].

² G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **18 b**, 774 [1963].

³ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **19 b**, 716 [1964].

Kohlenwasserstoffs in Äthanol oder Cyclohexan wird nur in der Coffeinlösung, nicht in der Proteinlösung⁴ beobachtet.

Substanzen und experimentelle Methodik

Die Lösungen von 3,4-Benzpyren (kommerzielles Produkt) in Äthanol (ca. 95%) und Cyclohexan wurden mit Uvasolen® der Firma Merck, Darmstadt, bereitet.

Zur Herstellung der Lösungen in Coffein (Merck, Darmstadt), β -Lactoglobulin (Pentex, Ill. USA) und Thyminucleinsäure aus Heringssamen, DNS-Na-Salz (Schuchardt, München) wurden früher³ beschriebene Suspensionen des Kohlenwasserstoffs in Wasser zur Erhöhung des Zerteilungsgrades in einer Reibschale verrieben, anschließend in 10-ml-Meßkolben mit Coffein-, Protein- oder DNS-Lösungen in Wasser (Coffein) bzw. Trispuffer, pH 7, gemischt (0,1-m. pro 0,1% Protein bzw. DNS) und mit Wasser auf die gewünschte Konzentration der Trägersubstanz eingestellt. Zur Einstellung des Solvations-Gleichgewichts wurden die Suspensionen dann durch mehrstündige Rotation der verschlossenen Kölbchen unter Lichtausschluß geschüttelt und schließlich, wie früher³ beschrieben, durch mehrfach wiederholte Dekantation und Zentrifugation in V2a-Stahlbehältern von der überschüssigen Suspension befreit. Bei einigen DNS-Versuchen wurden, wie von BOYLAND und GREEN⁵ beschrieben, die Kohlenwasserstoff-Suspensionen in Wasser mit der DNS-Lösung verrieben. Unterschiede zwischen diesen und den zuvor beschriebenen Proben wurden nicht beobachtet.

Die Abnahme der UV-Absorption von 3,4-Benzpyren unter Stickstoff in Lösungen des Kohlenwasserstoffs in Äthanol (ca. 95%) wurde in Quarzküvetten (Suprasil, Heraeus, Hanau) von 4,5 cm Höhe mit quadratischem Querschnitt von 1 cm Kantenlänge bestimmt. Den Küvetten waren mit Schlißverbindung Deckel aufgesetzt, die mit bis etwa 0,5 cm über den Boden der Küvetten reichenden Gaseinleitungsrohren (ca. 1 mm lichte Weite) und Austrittsrohren der gleichen Stärke für das entweichende Gas versehen waren. Der verwendete Reinstickstoff wurde durch ein mit BTS-Katalysator (BASF) beschicktes 70 cm langes Rohr geleitet und dabei (laut Firmenprospekt) auf weniger als 0,1 ppm vom Sauerstoff befreit. Zur Vermeidung von Verdunstung wurde das Gas vor Eintritt in die Reaktionsküvette noch in einer Waschflasche mit Alkoholdampf beladen. Vor jeder Bestrahlung wurde zuerst die Gasapparatur mit Waschflasche ohne Küvette über Nacht vorgespült. Dann wurde die Reaktionslösung in der Küvette durch mindestens 8-stdg. langsames (ca. 0,5 l/h) Durchleiten des hochgereinigten Stickstoffs vom Sauerstoff befreit. Während der anschließenden Bestrahlung wurde das Durchleiten von Stickstoff bis zu ihrem Ende fortgesetzt. Nach der Bestrahlung wurden die Verdunstungsverluste in der Reaktionslösung (weniger als 5%) durch Zusatz

einer entsprechenden Menge Lösungsmittel ausgeglichen.

Bestrahlt wurde mit Licht eines Hg-Brenners (St 41, Quarzlampengesellschaft, Hanau) im Zeiss-Fluoreszenzzusatz ZFM4 zum PMQ II mit serienmäßigem E-Filter. Der Durchlaßgrad des verwendeten Filters beträgt unterhalb 334 $m\mu$ weniger als 0,5 Prozent. Sein Durchlässigkeitsmaximum liegt bei 365 $m\mu$. Bei dieser Anordnung wird das Licht des Quecksilberbrenners von einem Quarzchromaten in der Küvette fokussiert. Durch die ungleichmäßige Ausleuchtung der Küvette dürfte der Wirkungsgrad geringer sein als bei gleichmäßiger Ausleuchtung mit der gleichen Lichtstärke. Wie der Vergleich der Apparaturdimensionen und der Fabrikdaten für die Brenner zeigt, ist beim Zeissgerät die eingestrahle Gesamtleistung etwa 10-mal so groß wie bei der Apparatur, die für die Vergleichsmessungen bei Luftzutritt verwendet wurde. Dazu diente die schon früher^{2,3} benutzte Anordnung, bei der das durch einen Quarzchromaten (Brennweite 9 cm) parallelisierte und durch ein Interferenzfilter für 366 $m\mu$ mit der Bandbreite 10 $m\mu$ gefilterte Licht des Hg-Brenners St 75 (Quarzlampenges., Hanau) eingestrahlt wird.

Nach Berechnung aus den Fabrikdaten des Brenners und den Apparatedimensionen ist die Leistung der in die Küvette einfallenden Strahlung hier für die Liniengruppe bei 366 $m\mu$ ca. 0,003 bis 0,005 Watt.

Die Absorptionsspektren wurden im Cary 14 und im Beckmann DK 2a aufgenommen. Zur Messung der Fluoreszenzspektren wurde wie früher²⁻⁴ der Zeiss-Fluoreszenzzusatz ZFM 4 zum Spektralphotometer PMQ II verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

I. Anaerobe Photoreaktion

Abb. 1 zeigt die Abnahme der UV-Absorption von 3,4-Benzpyren ($5 \cdot 10^{-6}$ -m.) in äthanolischer Lösung unter N_2 -Atmosphäre bei Bestrahlung mit Licht einer Hg-Dampflampe durch ein Filter mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 366 $m\mu$ (Zeiss ZFM4, s. o.).

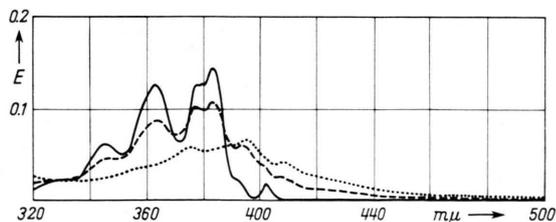


Abb. 1. Abnahme der UV-Absorption von 3,4-Benzpyren ($5 \cdot 10^{-6}$ -m.) in Äthanol (ca. 95%) unter Stickstoff bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda > 340$ $m\mu$, 0,03 bis 0,05 w). — unbestrahlt, — — 5 Stdn. bestrahlt, ···· 15 Stdn. bestrahlt.

⁴ G. RESKE u. J. STAUFF, Z. Naturforschg. **18b**, 773 [1963].

⁵ E. BOYLAND u. B. GREEN, Brit. J. Cancer **16**, 507 [1962].

Die eingestrahlt Leistung betrug ca. 0,03 bis 0,05 Watt. Von Ts'o und Lu¹ wurden in DNS-3,4-Benzpyrenlösungen höhere Intensitäten (1,5 w bzw. 0,75 w oberhalb 340 m μ) eingestrahlt und entsprechende Abnahmen der UV-Absorption bei kürzeren Bestrahlungszeiten erreicht. Für 15-stdg. Bestrahlung (s. Abb. 1) beträgt die eingestrahlt Energie ca. $15 \cdot 0,04 \text{ wStd} = 0,6 \text{ Wattstunden}$. Wie die spektrale Verteilung zeigt, ist die Absorption zum größten Teil durch die Photoprodukte gegeben. Eine Restkonzentration von nicht umgesetztem 3,4-Benzpyren kann aber nicht ausgeschlossen werden. Bei vorsichtiger Beurteilung dürfte der Zustand des Systems dem zu vergleichen sein, der von Ts'o und Lu¹ in den DNS-Lösungen durch 2-stdg. Bestrahlung erzeugt wurde. Dort war dann nach den Angaben von Ts'o und Lu¹ die eingestrahlt Energie 3 bzw. 1,5 Wattstunden. Selbst bei größerem Fehler in der Abschätzung der Lampenintensitäten folgt aus dem Vergleich der gegenübergestellten Daten, daß der anaerobe Photoreaktionsgrad von 3,4-Benzpyren in 95-proz. Äthanol mindestens genau so groß ist wie in den von Ts'o und Lu¹ untersuchten DNS-Lösungen.

II. Aerobe Photoreaktion

Bei Bestrahlung von β -Lactoglobulin-Lösungen, in denen 3,4-Benzpyren solvatisiert ist, mit Licht der Wellenlänge 366 m μ beobachtet man eine irreversible Abnahme der Fluoreszenz des Kohlenwasserstoffs^{2, 3}. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt bei einer eingestrahlt Leistung von ca. 0,005 w 35 min (Schwankung ca. 15%)^{2, 3}. Die Reaktion läßt sich auch durch Messung der Absorption verfolgen. Abb. 2 zeigt die Abnahme der Absorptionsmaxima

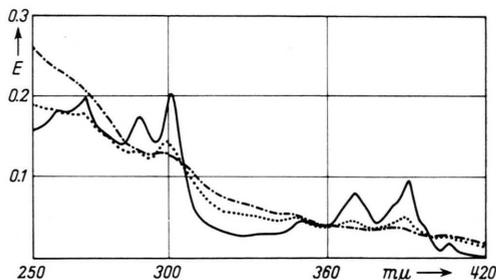


Abb. 2. Abnahme der UV-Absorption von 3,4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösung (0,2%, Trispuffer p_{H} 7, 0,2-m.) unter Luft bei Bestrahlung mit UV-Licht (365 m μ , 10 m μ Halbwertsbreite, 0,003 bis 0,005 w): Differenzspektren gegen eine Proteinlösung ohne 3,4-Benzpyren mit sonst gleicher Zusammensetzung. — unbestrahlt, \cdots nach 80 min Bestrahlung, $-\cdot-\cdot-$ nach 150 min Bestrahlung.

von 3,4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösung bei gleicher Behandlung. Berücksichtigt man die Absorption der Photoprodukte, so erhält man in guter Übereinstimmung mit den Fluoreszenzmessungen für die Halbwertszeit der Reaktion 40 Minuten. Vergleichbare Effekte wurden, ebenfalls in Übereinstimmung mit den Fluoreszenzmessungen, an Lösungen des Kohlenwasserstoffs in Äthanol, Cyclohexan, Coffein und DNS nicht beobachtet (Abb. 3). Ts'o und Lu¹ benötigen für eine vergleichbare Abnahme der UV-

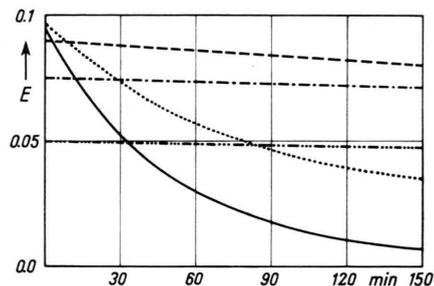


Abb. 3. Abnahme der UV-Absorption von 3,4-Benzpyren in verschiedenen Lösungsmitteln unter Luft bei Bestrahlung mit UV-Licht 365 m μ , 10 m μ Halbwertsbreite, 0,003 bis 0,005 w). $-\cdot-\cdot-$ ca. $2,8 \cdot 10^{-6}$ -m. 3,4-Benzpyren in Cyclohexan, $-\cdot-\cdot-$ $2,5 \cdot 10^{-6}$ -m. 3,4-Benzpyren in Äthanol, $-\cdot-\cdot-$ 3,4-Benzpyren in wäßriger Lösung von DNA aus Heringssamen, 0,5% Trispuffer p_{H} 7, 0,5-molar, \cdots 3,4-Benzpyren in wäßriger Lösung von β -Lactoglobulin, 0,2%, Trispuffer p_{H} 7, 0,2-m., nicht korrigiert, — idem, korrigiert durch Abzug der Extinktion der Photoprodukte.

(Die Kurven beziehen sich auf die langwelligen UV-Absorptionsmaxima des Kohlenwasserstoffs, s. Abb. 4; im Bereich unterhalb 320 m μ sind Messungen durch Photoprodukte stark gestört, s. Abb. 2)

Absorption von 3,4-Benzpyren in DNS-Lösung unter N₂ in vergleichbaren Zeiten eine Bestrahlungsleistung von ca. 0,75 Watt. In Übereinstimmung mit unseren Vergleichsuntersuchungen unter Luft (s. Abb. 3) ist demnach der aerobe Photoreaktionsgrad von 3,4-Benzpyren in β -Lactoglobulin-Lösung mindestens 100-mal so groß wie der anaerobe Photoreaktionsgrad des Kohlenwasserstoffs in DNS-Lösung (Ts'o und Lu¹), für die die Reaktion, wie oben gezeigt wurde, (I.) nicht spezifisch ist.

III. Absorptions- und Fluoreszenzspektren

a) 3,4-Benzpyren-DNS-Lösungen

Aus dem Vergleich der Intensitäten der Absorptionsbanden von 3,4-Benzpyren in Äthanol und in wäßriger Lösung von Heringssamen-DNS (0,5% Trispuffer p_{H} 7, 0,5-m.) (s. Abb. 4) resultiert eine

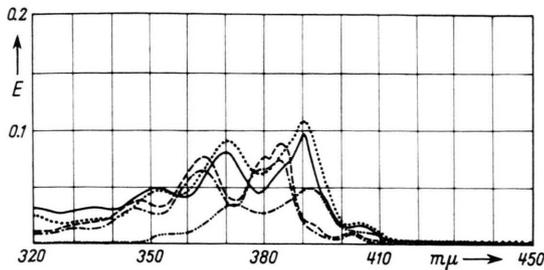


Abb. 4. UV-Absorptionsspektren von 3,4-Benzpyren in verschiedenen Lösungsmitteln, Differenzspektren gegen die jeweiligen Lösungsmittel $\cdots\cdots$ 3,4-Benzpyren in wäßriger Coffeinelösung, 0,2%, Zusammensetzung und Bezeichnung der Lösungen in Äthanol ($-\cdot-\cdot-$), Cyclohexan ($-----$), DNA ($-\cdot-\cdot-\cdot-$) und β -Lactoglobulin ($-----$) wie in der Legende zu Abb. 3.

Löslichkeit von 1 Mol 3,4-Benzpyren auf ca. 10 000 Mole Nucleotidreste. Soweit untersucht (0,2, 0,5% DNS) waren die Löslichkeiten proportional der Nucleinsäure-Konzentration. Von BOYLAND und GREEN⁵ wurde die Löslichkeit mit 1 Mol Bp auf 180 und von Ts'o und LU¹ und LIQUORI et al.⁶ mit 1 Mol Bp auf 1000 Mole Nucleotide angegeben. Diese Unterschiede dürften durch Unterschiede der DNS-Präparate und Pufferzusammensetzungen bedingt sein. Wahrscheinlich lieferte bei unseren Versuchen Denaturierung durch halbstündiges Erhitzen auf 100 °C aus dem gleichen Grunde keine wesentlich verschiedenen Ergebnisse.

BOYLAND und GREEN⁵ haben gefunden, daß 3,4-Benzpyren in DNS-Lösungen nur sehr schwach fluoresziert, obwohl durch Messung der UV-Absorption eine beträchtliche Solubilisation nachgewiesen wird. Das wurde auch in den hier untersuchten DNS-Lösungen beobachtet (Abb. 5, Abb. 6)*. Wie der Vergleich der Absorptions- und Fluoreszenzspektren in DNS- und Coffeinelösungen (Abb. 4 und 5) zeigt, werden in den hier untersuchten DNS-Lösungen nur ca. 3% der Intensität des Fluoreszenzlichts gemessen, die von einer Lösung des Kohlenwasserstoffs in Coffeinelösung bei gleich großer charakteristischer Extinktion geliefert wird.

Soweit die beobachtete schwache Fluoreszenz diesen Schluß zuläßt – die Kohlenwasserstoff-Fluoreszenz ist kleiner als das ihr überlagerte Streulicht der DNS-Lösung (s. Abb. 6) – sind in Übereinstim-

⁶ A. M. LIQUORI, B. DE LERMA, F. ASCOLI, C. BOTRÉ u. M. TRACIATTI, *J. molecular Biol.* **5**, 521 [1962].

* In einer früheren Arbeit⁷ ist uns dieser Effekt entgangen, weil uns geeignete Absorptionsspektrographen noch nicht zur Verfügung standen.

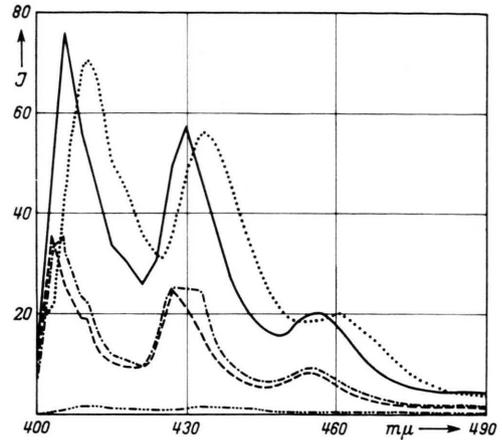


Abb. 5. Fluoreszenzspektren von 3,4-Benzpyren in Äthanol ($-\cdot-\cdot-$), Cyclohexan ($-----$), Coffein ($\cdots\cdots$), DNA ($-\cdot-\cdot-$) und β -Lactoglobulin ($-----$) unter Luft bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 365 m μ (Halbwertsbreite 10 m μ). Zusammensetzung der Lösungen wie in Abb. 4. Sauerstofflöschung der Fluoreszenz in Äthanol ca. 60%, in Cyclohexan ca. 70 bis 75 Prozent. Die Streulichtintensitäten der Blindlösungen von Äthanol, Cyclohexan, Coffein und β -Lactoglobulin sind im gesamten Meßbereich kleiner als 0,5 Einheiten (J). Die Streulichtintensitäten der DNA-Lösungen sind in Abb. 6 dargestellt.

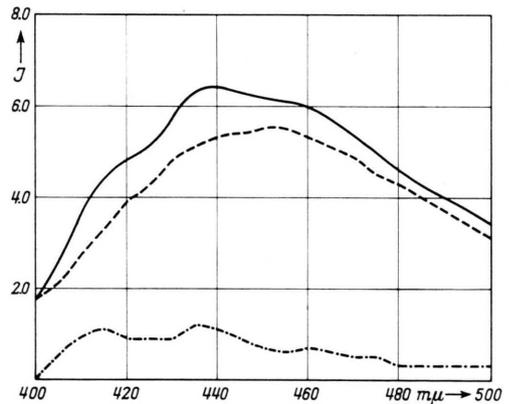


Abb. 6. Fluoreszenz und Streulicht wäßriger Lösungen von 3,4-Benzpyren in DNA bei Anregung mit 365 m μ (Halbwertsbreite 10 m μ). Zusammensetzung wie in Abb. 3 bis 5. $-\cdot-\cdot-$ Differenzspektren (vgl. Abb. 5) aus Bp-DNA-Spektrum ($-----$) und DNA-Streulicht ($-----$).

mung mit LIQUORI et al.⁶ und BOYLAND und GREEN⁸ die Banden des Fluoreszenzspektrums (z. B. 405 m μ in Äthanol \rightarrow ca. 415 m μ) ebenso wie im Absorptionsspektrum (z. B. 384 m μ in Äthanol \rightarrow 393 m μ)

⁷ J. STAUFF u. G. RESKE, *Z. Naturforsch.* **15b**, 578 [1960].

⁸ E. BOYLAND u. B. GREEN, *J. molecular Biol.* **9**, 589 [1964].

des Kohlenwasserstoffs in DNS-Lösungen noch weiter nach längeren Wellenlängen verschoben als in Coffeinlösungen.

Die Ursache der fehlenden Fluoreszenz ist umstritten. GIOVANELLA, MCKINNEY und HEIDELBERGER⁹ haben auf Grund von Sedimentations- und Filtrationsversuchen postuliert, daß 3.4-Benzopyren in wäßrigen DNS-Lösungen in kolloidalem Zustand solubiliert ist. Von BOYLAND und GREEN⁸ wurde diese Auffassung bestritten und gezeigt, daß der Kohlenwasserstoff aus der wäßrigen DNS durch die verwendeten Gefäß- und Filtermaterialien adsorbiert wird*. Die von GIOVANELLA, MCKINNEY und HEIDELBERGER⁹ vorgebrachten Argumente sind demnach kein Beweis für die kolloidale Solubilisation. Andererseits wird diese Möglichkeit durch die Gegenargumente von BOYLAND und GREEN⁸ nicht ausgeschlossen. BOYLAND und GREEN⁸ selbst bezeichnen die von ihnen vertretene Hypothese einer Sandwichkonfiguration von Kohlenwasserstoff und DNS-Basenpaaren nur als eine „attraktive Theorie“.

b) 3.4-Benzopyren- β -Lactoglobulin-Lösungen

Wie Abb. 4 zeigt, sind Bandenlage und Intensitätsverteilung der Absorptionsspektren von 3.4-Benzopyren in β -Lactoglobulin- und Coffein-Lösungen gleich. Der gleiche Verlauf wird in Rinderserumalbumin-Lösungen beobachtet. So ist z. B. das Absorptionsmaximum des Kohlenwasserstoffs in Äthanol bei 384 $m\mu$ in diesen Lösungen nach 389 bis 391 $m\mu$ verschoben. In den Fluoreszenzspektren (s. Abb. 5) wird, wie früher schon gezeigt wurde⁴, eine entsprechende Verschiebung von 405 nach 410 $m\mu$ nur in Coffeinlösung (ebenso wie im Rahmen der Meßgenauigkeit in DNS-Lösung), in der Proteinlösung hingegen nur eine schwache Verschiebung von 1 bis 2 $m\mu$ beobachtet, die wegen der Meßwertschwankungen von ca. 1 $m\mu$ nicht sicher zu bestimmen ist*. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist in Abb. 7 skizziert. Einer gleichzeitigen Verschiebung von Absorption und Fluoreszenz nach längeren Wellenlängen entspricht eine relative Verschiebung des Grundzustandes gegen den angeregten und den fluoreszierenden Zustand. Dieser

Grenzfall ist in Schema II dargestellt. Über die absolute Höhe des Grundniveaus soll damit nichts ausgesagt sein. Einer Verschiebung der Absorption allein nach längeren Wellenlängen entspricht eine relative Verschiebung des jeweils angeregten Zustandes gegen den fluoreszierenden und den Grund-

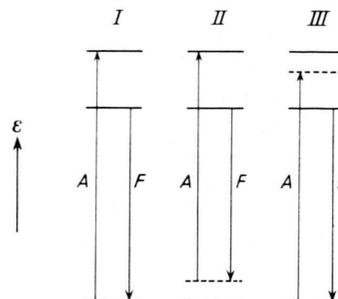


Abb. 7. Schematische Darstellung der Fluoreszenz- und Absorptionsbandenverschiebung von 3.4-Benzopyren in Protein-, Coffein- und DNA-Lösungen am Beispiel der energiereichsten Fluoreszenzbande. ϵ : Energie, nicht maßstäblich; A Absorption, F Fluoreszenz, in Äthanol (I), in Coffein (DNA) (II) und in β -Lactoglobulin (III).

zustand (Schema III). Wenn Schema I die Energiezustände des Kohlenwasserstoffs in Äthanol symbolisiert, werden die spektralen Verschiebungen in Coffein- und, soweit meßbar, in DNS-Lösungen überwiegend durch Schema II, die Verhältnisse in Proteinlösung überwiegend durch Schema III qualitativ beschrieben.

In Coffein- (und DNS-)Lösung sollte demnach im wesentlichen der Grundzustand des Kohlenwasserstoffs verändert bzw. verschoben, der angeregte Zustand unverändert, in Proteinlösung der Grundzustand unverändert und der angeregte Zustand verändert sein. Diese Hypothese steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß bei der gleichen Anregung (365 $m\mu$), für die die unterschiedliche Verschiebung der Fluoreszenzspektren beobachtet wird, 3.4-Benzopyren in Proteinlösung eine um Größenordnungen stärkere Photoreaktion zeigt als in Coffein- und DNS-Lösungen. Die Darstellung in Abb. 7 ist stark vereinfacht. Eine genauere Diskussion unter Berücksichtigung aller beteiligten Kernschwingungszustände im angeregten und im

⁹ B. C. GIOVANELLA, L. E. MCKINNEY u. C. HEIDELBERGER, J. molecular Biol. **8**, 20 [1964].

* Ähnliche Beobachtungen haben wir mit Lösungen von 3.4-Benzopyren in wäßrigen β -Lactoglobulin-Lösungen an engporigen Glasfritten⁷ und in Kunststoffbechern³ gemacht.

* Wegen der Ähnlichkeit der Fluoreszenzspektren von 3.4-Benzopyren in Äthanol und Proteinlösungen erscheint die Konzentrationsbestimmung durch Intensitätsvergleich der Fluoreszenz³ zuverlässiger als durch Vergleich der Intensitäten der nicht übereinstimmenden Absorptionsmaxima, der um ca. 20% höhere Werte liefert.

Grundzustand der Elektronen ist erst sinnvoll, wenn genauere Daten aus Messungen mit größerer Auflösung vorliegen.

Schluß

Ts'o und LU¹ haben nachgewiesen, daß die Radioaktivität von Tritium-markiertem 3.4-Benzopyren bei Bestrahlung seiner Lösungen in wäßrigen DNS-Lösungen mit langwelligem UV-Licht mit der Bestrahlungsdauer in zunehmendem Maße an die DNS gebunden erscheint. Die durch Absorptionsmessungen nachweisbare anaerobe Photoreaktion ist, wie von uns in dieser Arbeit gezeigt wurde, nicht spezifisch für DNS-Lösungen von 3.4-Benzopyren. Die Bindung der Radioaktivität an die DNS durch ein primäres Photoaddukt DNS-3.4-Benzopyren erscheint deshalb weniger wahrscheinlich als eine sekundäre Bindung des Photoabbauprodukts aus dem Kohlenwasserstoff an die DNS.

Was für die „in vitro“-Ergebnisse von Ts'o und LU¹ gilt, gilt entsprechend für die Resultate, die BROOKES und LAWLEY¹⁰ aus Experimenten „in vivo“ gewonnen haben. BROOKES und LAWLEY¹⁰ haben DNS aus der Haut von Mäusen untersucht, die mit verschiedenen ¹⁴C- und ³H-markierten, polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen gepinselt worden waren. Nach gleichen Inkubationszeiten entsprach die auf die DNS übergegangene Radioaktivität der carcinogenen Aktivität der eingesetzten Kohlenwasserstoffe, während eine Gesetzmäßigkeit zwischen

Proteinbindung der Kohlenwasserstoffe und ihrer Carcinogenität nicht beobachtet werden konnte. BROOKES und LAWLEY¹⁰ haben nicht angegeben, daß unter Tageslichtausschluß gearbeitet wurde. Deshalb lassen sich ihre Befunde auch durch eine Bindung der Kohlenwasserstoff-Photoprodukte an die DNS erklären, wenn man annimmt, daß die „in vivo“ gebildeten Photoprodukte der verschiedenen Kohlenwasserstoffe etwa gleiche Affinität zur DNS besitzen, und die Geschwindigkeit der Photoreaktion (oder einer analogen Reaktion mit strahlungsloser Energieübertragung) ein Maß für die carcinogene Aktivität darstellt. Diese Frage muß noch untersucht werden. Daß eine Photoreaktion an der Kohlenwasserstoff-Carcinogenese wesentlich beteiligt sein kann, wurde in tierexperimentellen Arbeiten gezeigt (z. B. MAISIN und DE JONGHE¹¹, s. auch SANTAMARIA¹²). Der Intensitätsvergleich der Photoreaktionen von 3.4-Benzopyren mit DNS und Protein in dieser Arbeit zeigt, daß eine primäre Reaktion von 3.4-Benzopyren mit Zellproteinen bei der Carcinogenese mindestens für den Fall der Photoreaktion sehr viel wahrscheinlicher ist als eine Primärreaktion des Kohlenwasserstoffs mit DNS⁸. Es ist experimentell wohlbegründet, eine Primärreaktion von 3.4-Benzopyren mit Zellproteinen bei der Carcinogenese mindestens als eine zu weiteren Untersuchungen verlockende „attraktive Theorie“ zu werten.

Fräulein KARIN HEIN danken wir technische Assistenz, dem Herrn Bundesminister für wissenschaftliche Forschung für finanzielle Unterstützung.

¹⁰ P. BROOKES u. P. D. LAWLEY, Nature [London] **202**, 781 [1964].

¹¹ J. MAISIN u. A. DE JONGHE, C. R. Séances Soc. Biol. **117**, 111 [1934].

¹² L. SANTAMARIA, Univ. int. Cancrum, Acta (Louvain) **19**, 591 [1963].