

Strahlchemische Veränderungen von Thymin und Cytosin in der DNS durch UV-Licht*

VON HANSWERNER DELLWEG und ADOLF WACKER

Aus dem Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main)

(Z. Naturforschg. 17 b, 827—834 [1962]; eingegangen am 10. August 1962)

Die Einwirkung von UV-Strahlen (254 m μ) auf Bakterien und auf DNS führt zur Bildung einer Reihe von Photoprodukten. Thymin bildet ein Thymin-Dimeres und mindestens zwei weitere Photoprodukte. Aus Cytosin entstehen Uracil und ebenfalls mindestens zwei weitere Photoprodukte. Das Thymin-Dimere läßt sich durch Bestrahlung mit UV-Licht in wäßriger Lösung zu 87% wieder in Thymin zurückverwandeln. Bei den übrigen Photoprodukten gelingt diese Reaktion nicht.

Die durch UV-Strahlen verursachten biologischen Schäden in der Bakterienzelle dürften weitgehend auf die Bildung von dimerem Thymin zurückzuführen sein. Demgegenüber sind die übrigen Photoprodukte, die erst bei höherer UV-Dosis auftreten, nur von untergeordneter biologischer Bedeutung.

Die von der Strahlendosis abhängige Bildung der Thymin-Photoprodukte in Zellen von *E. coli* wurde quantitativ untersucht.

Eine Denaturierung der nativen DNS durch Erhitzen oder durch Abspalten der Purine zur Apurinsäure hat zur Folge, daß die Bildung des Thymin-Dimeren und eines der übrigen Thymin-Photoprodukte besonders stark begünstigt wird.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß bei UV-Bestrahlung von Bakterien-DNS Thymin photochemisch verändert wird. Durch Hydrolyse mit Säure ließ sich sowohl aus Bakterien als auch aus reiner Bakterien-DNS nach UV-Bestrahlung ein aus Thymin entstandenes Photoprodukt nachweisen¹. Nach seinem papierchromatographischen Verhalten ist dieses Thymin-Photoprodukt identisch mit dem von BEUKERS und BERENDS durch UV-Bestrahlung einer eingefrorenen Lösung von Thymin isolierten Thymin-Dimeren^{2, 4, 5, 6}. Auch in DNS und APS konnten BEUKERS und BERENDS eine photochemische Reaktion von Thymin nachweisen³.

Die Menge dieses Thymin-Photoproduktes in der DNS, die von der eingestrahlten Dosis UV-Licht abhängt, steigt bis zu einer Bestrahlungsstärke von 10⁵ erg/mm² rasch an und nähert sich oberhalb von etwa 5 · 10⁵ erg/mm² langsam einem Endwert¹. Dieser Maximalwert beträgt bei *Enterococcus* Stei etwa 16% des Thymin-Gehaltes in der DNS. Für verschiedene Mutanten von *E. coli* (untersucht wurden

die Mutanten *E. coli* B, B_r, 15 T⁻, 63—86, 113—3 und 9637), deren DNS weniger Thymin enthält, liegt dieser Wert bei 9,5—10 Prozent.

Das nach BEUKERS und BERENDS durch Bestrahlung von Thymin in Eis erhaltene Thymin-Dimere läßt sich durch erneute UV-Bestrahlung in wäßriger Lösung zu etwa 90% wieder in die monomere Verbindung aufspalten³. Auffallenderweise gelang uns die Rückverwandlung des aus der DNS isolierten Thymin-Photoproduktes nur zu etwa 40—50 Prozent*. Dieses unterschiedliche Verhalten der Thymin-Photoprodukte aus verschiedenen Quellen bei der Photoreaktivierung legte die Vermutung nahe, daß Thymin bei UV-Bestrahlung von DNS außer dem Dimeren noch weitere Verbindungen bildet, die photochemisch irreversibel sind. Papierchromatographisch lassen sich diese verschiedenen Thyminverbindungen nur sehr schwierig trennen. Mit Hilfe von Ionenaustauschern gelang uns jedoch die Fraktionierung dieser Verbindungen, worüber nachfolgend u. a. berichtet wird.

* 13. Mitteilung der Reihe „Strahlchemische Veränderung der Nucleinsäuren“. 12. Mitt.: A. WACKER, D. JACHERTS u. B. JACHERS, Angew. Chem. 74, 653 [1962].

Abkürzungen: DNS = Desoxyribonucleinsäure, APS = Apurinsäure, RNS = Ribonucleinsäure, EDTA = Äthylendiamin-Tetraacetat, UV-LICHT = In diesem Zusammenhang Licht eines Quecksilber-Niederdruckbrenners mit der Hauptemission bei 254 m μ .

¹ A. WACKER, H. DELLWEG u. D. WEINBLUM, Naturwissenschaften 47, 447 [1960].

² R. BEUKERS, J. YLSTRA u. W. BERENDS, Rec. Trav. chim. Pay-Bas 77, 729 [1958].

³ R. BEUKERS, J. YLSTRA u. W. BERENDS, Rec. Trav. chim. Pay-Bas 79, 101 [1960].

⁴ R. BEUKERS u. W. BERENDS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 41, 550 [1960].

⁵ R. BEUKERS u. W. BERENDS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 49, 181 [1961].

⁶ D. L. WULFF u. G. FRAENKEL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 51, 332 [1961].

* Unveröffentlichte Ergebnisse.

Methoden

Gewinnung der Bakterien: Zum Nachweis der Thymin-Photoprodukte in bestrahlten Bakterien wurde *E. coli* 15 T⁻ in Citratmedium⁷ in Anwesenheit von 2 µg/ml Thymin-[2-¹⁴C] (10 mC/mMol) kultiviert. Die Bakterien wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase abgeschleudert, 3-mal mit 0,15-m. Kochsalzlösung gewaschen und in der dem Nährmedium entsprechenden Menge Kochsalzlösung suspendiert. Die Zellkonzentration lag zwischen 2 und 4 · 10⁸ Zellen pro ml.

Bestrahlung der Bakterien: Je 60 ml Bakterien-Suspension wurden in offenen Glasschalen in einer Schichtdicke von 1–2 mm mit einem Quecksilber-Niederdruckbrenner bestrahlt (Typ NN 30/89 Quarz-lampengesellschaft mbH, Hanau. Der Brenner sendet zu etwa 90% Licht der Quecksilber-Resonanzlinie von 253,7 mµ aus). Bei allen Bestrahlungen wurde ein Abstand von 6 cm von der Mitte der bestrahlten Lösung zur Mitte des Brennerstabes eingehalten. Nach Angaben der Herstellerfirma beträgt die Bestrahlungsstärke des Brenners in 6 cm Abstand 3,0 Milliwatt/cm². Berücksichtigt man nur den Strahlenanteil bei 254 mµ, so erhält man eine Bestrahlungsstärke in 6 cm Abstand von 1,73 · 10⁴ erg/min mm². Unsere eigenen Messungen mit einem Selen-Photoelement (Dr. B. Lange, Berlin) mit UV-Filter ergaben unter Berücksichtigung der Reflexion einen Wert von 1,67 · 10⁴ erg/min mm² für 254 mµ, der mit den Angaben der Firma recht gut übereinstimmt. Verschiedene aktinometrische Messungen mit Malachitgrün-Leucocyanid⁸ führten ebenfalls zu ähnlichen Werten. Bei der Bestrahlung von *Bacteriensuspensionen in offenen Schalen* ist die Bestrahlungsstärke an der Oberfläche der Flüssigkeit (Netzspannung 215 V) $J_0 = 1,61 \cdot 10^4$ erg/min mm². Die mittlere Bestrahlungsstärke in der Suspension wurde berechnet und beträgt $J = 1,50 \cdot 10^4$ erg/min mm². Nach der Bestrahlung wurden die Bakterien wieder abgeschleudert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute lag zwischen 10 und 20 mg.

Hydrolyse: Die so erhaltenen Bakterien wurden mit 0,03–0,05 ml 70-proz. Perchlorsäure 60 Min. auf 85 °C erhitzt. Nach Neutralisation mit 1-n. Natronlauge und Filtration wurde das Hydrolysat direkt auf die Säule gegeben.

Säulenchromatographie: Die chromatographische Trennung der Hydrolysen-Produkte erfolgte an Dowex 2×8, 100–200 mesh in der Formiat-Form. Eine Säule von 8 × 150 mm wurde mit 0,03-m. Ammoniumformiat-Puffer von p_H 10,1 gewaschen und mit dem Hydrolysat beschickt. Die Elution erfolgte mit einem weitgehend linearen p_H-Gradienten zwischen p_H 10 und 7. Der Gradient wurde aus 120 ml 0,03-m.

Ammoniumformiat-Puffer p_H 10,1 (100-ml-Erlenmeyer-Kolben) und 285 ml 0,12-m. Ammoniumformiat-Puffer p_H 4,5 (500-ml-Steilbrustflasche) bereitet. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 33 ml/Stde. wurden je 5 ml in 80 Röhrchen aufgefangen. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch Auftrocknen von je 0,2 ml auf Aluminium-Schälchen und Auszählung im Methandurchflußzähler FH 51 (Frieseke & Hoepfner). Entsprechend der Radioaktivität wurde der Inhalt zusammengehörender Röhrchen in Fraktionen vereinigt und die Gesamtaktivität in 3 unabhängigen Bestimmungen auf die gleiche Weise ermittelt.

Papierchromatographie: Gewaschenes Papier 2043 b (Schleicher & Schüll). Lösungsmittel-System 1: n-Butanol/Wasser (87 : 13), System 2: Isopropanol/konz. Salzsäure (68 : 16,4), mit Wasser auf 100 aufgefüllt⁹.

Isolierung der DNS: Thymin-[2-¹⁴C]-markierte DNS wurde aus *E. coli* 15 T⁻ und *Enterococcus* Stei gewonnen, nachdem die Organismen in einem Nährmedium mit 2 µg/ml Thymin-[2-¹⁴C] (10 mC/mMol) kultiviert worden waren. Zur Gewinnung einer in Cytosin und Thymin mit ¹⁴C markierten DNS wurde die Uracil-Mangelmutante *E. coli* 63–86 in Gegenwart von 5 µg/ml Uracil-[2-¹⁴C] (10 mC/mMol) in 450 ml Medium kultiviert. Eine DNS, die fast ausschließlich im Cytosin mit ¹⁴C markiert ist, wurde aus *Streptococcus faecalis* R gewonnen mit 2 µg/ml Uracil-[2-¹⁴C] (5 mC/mMol), 2 µg/ml Aminofolsäure und 20 µg/ml Thymin zur Unterbindung der Thymin-Eigensynthese aus Uracil. Die Bakterien wurden bei 20 000 g abgeschleudert und 2-mal mit einer wäßrigen Lösung von 0,9% Kochsalz und 0,19% EDTA (p_H 7,8) gewaschen¹⁰. Dann wurden die Bakterien in 2 ml Kochsalz-EDTA suspendiert, mit 4 mg/ml Penicillin G vier Stdn. und sodann mit 1 mg/ml Lysozym (Nutr. Biochem. Corp.) 18 Stdn. bei 37 °C stehen gelassen. Nach Zusatz von 2 ml einer 1-proz. Na-Dodecylsulfatlösung (p_H 7,8)¹¹ wurde 10 Min. auf 55 °C erwärmt, danach mit 0,4 g Kochsalz versetzt und 5 Stdn. bei 0 °C gehalten. Die Extraktion mit Detergenz wurde noch 1 bis 2-mal wiederholt. Nach Zentrifugieren erhielten wir einen hochviskosen Überstand, den wir durch mehrmaliges Schütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol von Eiweiß befreiten¹². Durch Zugabe von Alkohol zur wäßrigen Phase fallen die Nucleinsäuren aus. Sie wurden in 0,15-m. Kochsalz- + 0,015-m. Na-Citratlösung (p_H 7,0) aufgenommen und mit 0,2 mg/ml kristallisierter Ribonuclease (Sigma Chem. Corp.) 15 Stdn. bei 37 °C stehen gelassen. Danach wurde die Behandlung mit Chloroform/Isoamylalkohol noch einigemal wiederholt und die DNS durch 3-maliges Umfällen mit Alkohol von Ribonucleotiden befreit. Schließlich wurde der auf einen Glasstab gewickelte DNS-Faden in Kochsalz-EDTA gelöst und bei 2 °C aufbewahrt.

⁷ A. WACKER, M. EBERT u. H. KOLM, Z. Naturforschg. **13**, 141 [1958].

⁸ J. G. CALVERT u. H. J. RECHEN, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2101 [1952].

⁹ G. R. WYATT, Biochem. J. **48**, 584 [1951].

¹⁰ J. MARMUR, J. molecular Biol. **3**, 208 [1961].

¹¹ G. KIEFER, R. KIEFER, G. ZAHN u. R. K. ZAHN, Biochem. Z. **334**, 49 [1961].

¹² M. G. SEVAG, D. B. LACKMAN u. J. SMOLENS, J. biol. Chemistry **124**, 425 [1938].

Darstellung von Apurinsäure: APS wurde durch Dialyse einer verdünnten DNS-Lösung gegen Salzsäure von p_H 1,6 bei $37^\circ C$ ¹³ und anschließende Gefriertrocknung gewonnen.

Bestrahlung der Nucleinsäuren: Für die einzelnen Versuche wurden je nach der spezifischen Aktivität 0,15 bis 0,7 mg DNS mit einer Gesamtaktivität von etwa $0,76 \mu C$ ¹⁴C, entsprechend etwa 10^6 Ipm (FH 51), eingesetzt. Die DNS-Lösung wurde mit Kochsalz/EDTA verdünnt. Die Extinktion dieser Lösungen war in allen Versuchen etwa $D_{259}^{0,2 \text{ cm}} = 1,0$. Die UV-Bestrahlung wurde in Quarzküvetten von 2 mm Schichtdicke im Abstand von 6 cm von Brennerstabelle durchgeführt. Bei dieser Versuchsanordnung ist die Bestrahlungsstärke an der Oberfläche der Lösung innerhalb der Küvette $J_0 = 1,21 \cdot 10^4$ erg/min mm^2 . Die mittlere Bestrahlungsstärke in der Lösung wurde zu $0,472 \cdot 10^4$ erg/min mm^2 berechnet. Nach der Bestrahlung setzten wir noch 0,3 mg inaktive Bakterien-DNS zu. Die gesamte DNS wurde mit Äthanol gefällt, getrocknet, mit Perchlorsäure hydrolysiert und an Dowex 2x8 chromatographiert.

Ergebnisse und Diskussion

A) Versuche mit Thymin-[2-¹⁴C]-haltigen Bakterien

In Abb. 1 ist eine typische Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Röhrcchen nach der Trennung eines Hydrolysates von uv-bestrahlten Bakterien an der Ionenaustauscher-Säule dargestellt. *Fraktion 1* ist meist gelb gefärbt und besteht aus nicht näher identifizierten Produkten, die bei p_H 10 die Säule verlassen. *Fraktion 2* enthält das Thymin-Dimerisierungsprodukt mit den R_f -Werten 0,10 (System 1) bzw. 0,58 (System 2). Bestrahlt man dieses dimere Thymin erneut mit UV-Licht ($33,9 \cdot 10^4$ erg/ mm^2), so findet man papierchromatographisch (System 1), daß das Thymin-Dimere (R_f -Wert 0,10) bis auf einen Rest von etwa 2% umgewandelt wird. Etwa 87% der Aktivität befinden sich beim Thymin (R_f -Wert 0,47) und je etwa 5% auf der Startlinie und bei einem R_f -Wert von 0,22. *Fraktion 3* enthält das monomere Thymin, welches sich papierchromatographisch als einheitlich erwies. Anschließend folgen die Fraktionen 4 bis 6, die bei höheren Bestrahlungsstärken mehr oder weniger deutlich in Erscheinung treten. *Fraktion 4* hat die R_f -Werte 0,08 (System 1) bzw. 0,50 (System 2). *Fraktion 5* läuft im System 1 nicht ab

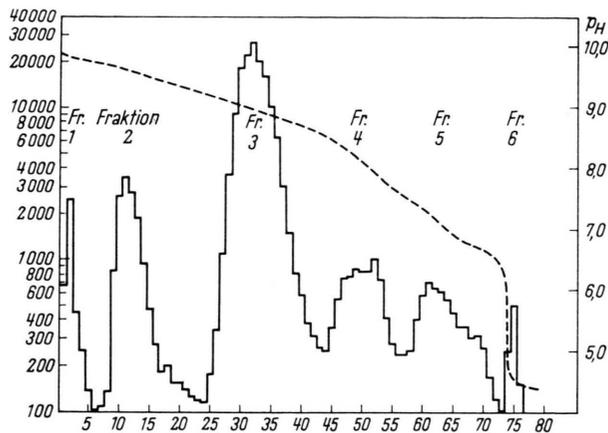


Abb. 1. Trennung eines Perchlorsäure-Hydrolysates von *E. coli* 15 T⁻ nach Wachstum mit Thymin-[2-¹⁴C] und UV-Bestrahlung mit $J_0 = 51,5 \cdot 10^4$ erg/ mm^2 an Dowex 2x8. Ordinate: links Ipm in 0,6 ml Eluat (—); rechts p_H -Wert des Gradienten (---). Abszisse: Nummer der Röhrcchen. Fraktion 2 = Thymin-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin, Fraktionen 1, 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert.

und bildet im System 2 zwei stark verwaschene Flecken mit den R_f -Werten 0,40 und 0,60. *Fraktion 6* erscheint immer an der Stelle, an der sich der p_H -Gradient sprunghaft von p_H 7 zu p_H 5 ändert. Wegen der geringen Menge konnte der R_f -Wert dieser Substanz nicht genau ermittelt werden. Die radioaktiven Verbindungen in den Fraktionen 4 und 5 verändern ihre R_f -Werte im System 1 nicht, wenn man sie in wäßriger Lösung mit UV-Licht bestrahlt. Eine Rückverwandlung in Thymin konnte in den Fraktionen 4, 5 und 6 nicht nachgewiesen werden.

In Tab. 1 ist die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach verschiedenen Bestrahlungszeiten aufgeführt. Die Zahlen beziehen sich jeweils auf die Gesamtaktivität = 100. Da die Fraktionen 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert werden konnten, sind sie in der Tabelle in einer Spalte zusammengefaßt. Aus den Zahlen geht hervor, daß die Menge an Thymin-Dimerem (Fraktion 2) mit steigender Bestrahlungsstärke zunimmt. Bei $J_0 = 2$ bis $3 \cdot 10^5$ erg/ mm^2 wird ein Maximalwert von 5,8% erreicht, der dann bei weiterer Bestrahlung wieder abnimmt. Offenbar wird das dimere Thymin bei höheren Dosen wieder zerstört*, unter Bildung von weiteren Folgeprodukten, die sich in den Frak-

¹³ C. TAMM, M. E. HODES u. E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **195**, 49 [1952].

* Vgl. hierzu auch die Strahlenempfindlichkeit des Photodimeren von 2-Cyclopentenon (P. E. EATON, J. Amer. chem. Soc. **84**, 2454 [1962]).

Bestrah- lungszeit [Min.]	Bestrah- lungs- stärke		Fraktion Nr.			
	J_0	J	1	2	3	4,5 u. 6
0	0	0	0,58	0,21	98,78	0,43
0,5	0,805	0,75	0,48	0,76	98,34	0,42
1	1,61	1,50	0,92	1,83	96,17	1,01
2	3,22	3,00	0,95	3,15	94,73	1,17
4	6,44	6,00	1,08	4,83	92,46	1,63
8	12,9	12,0	1,15	5,70	89,67	3,48
14	22,5	21,0	1,04	5,82	89,57	3,57
20	32,2	30,0	1,75	5,82	87,39	5,04
26	41,8	39,0	1,54	5,24	88,93	4,29
32	51,5	48,0	2,84	5,33	84,19	7,64
48	77,3	72,0	2,72	4,80	83,00	9,48
64	103,0	96,0	4,42	4,38	79,15	12,05

Tab. 1. Perchlorsäure-Hydrolysat von *E. coli* 15 T⁻, mit Thymin-[2-¹⁴C] markiert, nach Bestrahlung der Bakterien mit verschiedenen UV-Dosen an Ionenaustauscher Dowex 2×8 chromatographiert. Zahlenangaben: Radioaktivität der einzelnen Fraktionen, Gesamtaktivität = 100. J_0 = Bestrahlungsstärke an der Oberfläche der Bakteriensuspension. J = mittlere Bestrahlungsstärke in der Suspension. Fraktion 2 = dimeres Thymin, Fraktion 3 = Thymin, Fraktionen 1, 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert.

tionen 4, 5 und 6 befinden. Thymin-Dimeres bildet sich auch schon bei wesentlich niedrigeren Strahlendosen, wie wir früher bereits mitgeteilt haben. Bei einer Dosis von $1,9 \cdot 10^2$ erg/mm², bei der etwa 82% der Bakterien abgetötet worden waren, entstehen 0,059% und bei einer Dosis von $5,7 \cdot 10^2$ erg/mm², bei der etwa 99,5% der Bakterien abgetötet worden waren, 0,094% Thymin-Dimeres^{14, 15}. Auch die Menge der Photoprodukte in den übrigen Fraktionen 1, 4, 5 und 6 nimmt mit steigender Bestrahlungsstärke zu, anfangs jedoch wesentlich langsamer als die des Thymin-Dimeren. Aus der Kinetik der Bildung dieser Photoprodukte schließen wir, daß sie für die biologische Wirkung der UV-Strahlen unbedeutend sind, da sie erst bei so hohen Strahlendosen nachweisbar sind, bei denen die Bakterien schon weitestgehend abgetötet sind.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den auf papierchromatographischem Wege erhaltenen Werten, wenn man dabei berücksichtigt, daß wir auf dem Papierchromatogramm (System 1) keine Trennung des Thymin-Dimeren von der Fraktion 4 erhalten und nur die Aktivität zwischen den R_f -Werten 0,05 und 0,12 erfassen. Dadurch werden die Fraktionen 5 und 6, die in diesem System auf der Startlinie sitzen blei-

ben, nicht als dimeres Thymin bewertet (Abb. 2). Addiert man die Werte der Fraktionen 2 und 4 aus der Tab. 1 und vergleicht sie mit den Werten aus Papierchromatogrammen, so ergeben sich die in Tab. 2 aufgeführten Zahlen.

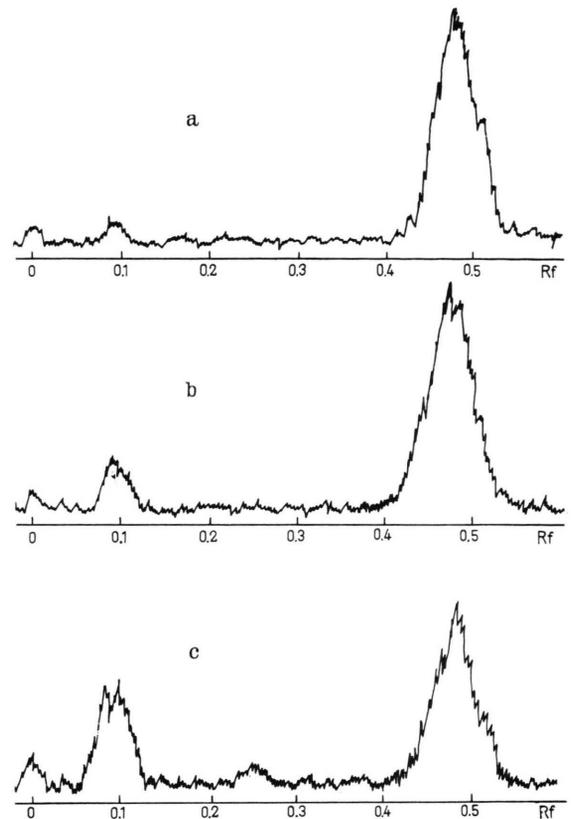


Abb. 2. Papierchromatogramm eines Perchlorsäurehydrolysates von uv-bestrahlten Bakterien mit Thymin-[2-¹⁴C]-markierter DNS. Lösungsmittelsystem 1. Ordinate: Ipm. a nach $3,2 \cdot 10^4$ erg mm², b nach $12,9 \cdot 10^4$ erg/mm², c nach $51,5 \cdot 10^4$ erg/mm².

Bestrahlungs- zeit	[Min.]	4	8	14	32
	Bestrahlungs- stärke J_0	[10 ⁴ erg/ mm ²]	6,44	12,9	22,5
Fraktion 2 + 4	[%]	5,52	7,64	9,04	9,36
Thymin-Photo- produkte	[%]	5,6	7,3	9,2	9,5

Tab. 2. Obere Zeile: Summe der Aktivitäten der Fraktionen 2+4 aus Tab. 1. Untere Zeile: im Vergleich dazu Aktivitäten der Thymin-Photoprodukte in % der Gesamtaktivität aus papierchromatographischen Untersuchungen.

¹⁴ A. WACKER, H. DELLWEG U. D. JACHERTS, J. molecular Biol. 4, 410 [1962].

¹⁵ A. WACKER, J. Chim. physique 58, 1041 [1961].

B) Versuche mit Cytosin-[2-¹⁴C]-markierter DNS

Die Fraktionen 4 und 5 enthalten kein dimeres Thymin, da durch erneute UV-Bestrahlung der wäßrigen Lösungen kein Thymin entsteht. Es erhob sich daher die Frage, ob die Photoprodukte dieser beiden Fraktionen unter Beteiligung von Cytosin entstanden sein könnten. Um dies nachzuprüfen, isolierten wir zunächst eine mit Cytosin-[2-¹⁴C] und Thymin-[2-¹⁴C] markierte DNS. Hierfür wurde die Uracil-Mangelmutante *E. coli* 63–86 in Gegenwart von Uracil-[2-¹⁴C] kultiviert. Dabei wird Uracil zum Teil in Cytosin und in Thymin umgewandelt. Die aus diesem Ansatz gewonnene DNS hatte folgende Aktivitätsverteilung (Papierchromatogramm, System 2): Cytosin: 51,4%; Thymin: 48,4%; Uracil: 0,12 Prozent. Nach der UV-Bestrahlung der DNS ($J_0 = 38,7 \cdot 10^4$ erg/mm²) und Hydrolyse mit Perchlorsäure wurden die Spaltprodukte an Dowex 2 × 8 getrennt (Tab. 3).

Bestrahlungsstärke [erg/mm ²]	Fraktion Nr.					
	1	2	3	4	5	6
unbestrahlt	50,95	0,16	48,63	0,07	0,06	0,13
38,7 · 10 ⁴ (32 Min.)	46,78	3,27	44,43	0,82	2,42	2,29

Tab. 3. Perchlorsäurehydrolysat von DNS aus *E. coli* 63–86, mit Thymin-[2-¹⁴C] und Cytosin-[2-¹⁴C] markiert, an Dowex 2 × 8 chromatographiert. Gradient: Ammoniumformiat-Puffer pH 10,0–5,0 (0,03–0,12-m.). Gesamtaktivität = 100. Fraktion 1 = Cytosin, Fraktion 2 = Thymin- und Uracil-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin+Uracil. Fraktionen 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert.

Fraktion 1 besteht aus Cytosin, dessen Aktivität durch die Bestrahlung um 8,2% des ursprünglichen Wertes abgenommen hat. *Fraktion 2* enthält Thymin-Dimeres; Anstieg von 0,16 auf 3,27% der Gesamt-Aktivität. Dieser Anstieg entspricht einer Erhöhung der Aktivität der Fraktion 2 um 6,4% der ursprünglichen Aktivität der Fraktion 3. In Tab. 1 beträgt der Anstieg der Fraktion 2 nach 32 Min. Bestrahlung demgegenüber nur 5,2% der ursprünglichen Aktivität der Fraktion 3. Aus dieser unterschiedlichen Aktivitätszunahme der Fraktionen 2 schließen wir, daß im Falle der mit Cytosin-[2-¹⁴C]

markierten DNS bei der Bestrahlung aus Cytosin ein Photoprodukt entstanden ist, das sich von dimerem Thymin in seinem p_K -Wert nicht unterscheidet. Da bei der Bestrahlung von Cytosin in Eis mit hohen Dosen UV-Licht unter anderem auch dimeres Uracil entsteht¹⁶, enthält die Fraktion 2 offenbar zusätzlich noch etwas Uracil-Dimeres.

Die Aktivität der *Fraktion 3* (Thymin und Spuren von Uracil) ist um 8,6% des Ausgangswertes gesunken. In Tab. 1 ist die entsprechende Abnahme der Fraktion 3 14,6 Prozent. Es ist daher anzunehmen, daß bei Bestrahlung von Cytosin-¹⁴C-haltiger DNS und anschließender Hydrolyse mit heißer Perchlorsäure radioaktives Uracil entsteht.

Die Aktivität der *Fraktionen 4 bis 6* ist insgesamt von 0,26 auf 5,53% der Gesamt-Aktivität angestiegen und liegt damit wesentlich höher als in Vergleichsversuchen mit Thymin-[2-¹⁴C]-markierter DNS. Aus diesen Zahlen wird deutlich, daß das Cytosin ebenfalls an der Bildung der Photoprodukte in den Fraktionen 4 bis 6 beteiligt ist.

Zum besseren Studium der Cytosin-Photoprodukte bestrahlten wir eine DNS, die überwiegend mit Cytosin-[2-¹⁴C] markiert war. Zur Gewinnung dieser DNS wurde *Streptococcus faecalis* R in Gegenwart von Uracil-[2-¹⁴C] kultiviert, wobei der Organismus Uracil in Cytosin und zu einem geringen Teil auch in Thymin umwandelt. Zur Herabsetzung der Thymin-Eigensynthese wurden noch Aminofolsäure¹⁷ und inaktives Thymin zugesetzt. Offenbar wird bei *Streptococcus faecalis* R unter diesen Bedingungen die RNS besonders hoch markiert, denn die ¹⁴C-Ausbeute in der DNS betrug nur 6,7% der in die Bakterienzellen eingebauten Menge ¹⁴C. Auch durch Abbau der RNS mit RNase und durch anschließende Hydrolyse mit 1-n. Kalilauge (17 Stdn. 37 °C)¹⁸ gelang es nicht, die RNS, die wir durch den Gehalt an Uracil-¹⁴C bestimmten, vollständig von der DNS abzutrennen. Die nach UV-Bestrahlung dieser DNS gebildeten Photoprodukte wurden an der Ionenaustauscher-Säule getrennt. Das Ergebnis ist in Tab. 4 zusammengestellt (vgl. Abb. 3).

Die Aktivität der *Fraktion 1* (Cytosin) nimmt durch die Bestrahlung um 12,7% ihres ursprünglichen Wertes ab. Die Aktivität der *Fraktionen 4–6*

¹⁶ D. WEINBLUM, Dissertation, Technische Universität Berlin, D 83 [1961].

¹⁷ F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **9b**, 764 [1954].

¹⁸ E. CHARGAFF, B. MAGASANIK, E. VISCHER, C. GREEN, R. DONINGER u. D. ELSON, J. biol. Chemistry **186**, 51 [1950].

Bestrahlungsstärke J_0 [erg/mm ²]	Fraktion Nr.					
	1	2	3	4	5	6
unbestrahlt	95,71	0,55	3,28	0,13	0,02	0,31
$38,7 \cdot 10^4$ (32 Min.)	83,52	1,30	9,32	1,51	2,12	2,23

Tab. 4. Perchlorsäurehydrolysat von DNS aus *Streptococcus faecalis* R, mit Cytosin-[2-¹⁴C] markiert, an Dowex 2×8 chromatographiert. Gradient: Ammoniumformiat-Puffer p_H 10,0 bis 5,0 (0,03–0,12-m.). Gesamtaktivität = 100. Fraktion 1 = Cytosin, Fraktion 2 = Uracil-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin + Uracil. Fraktionen 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert.

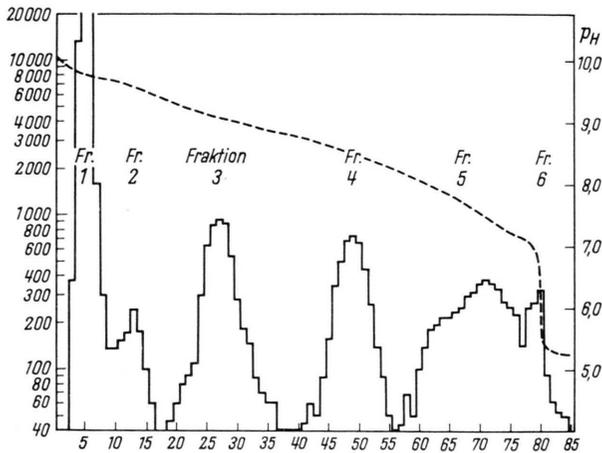


Abb. 3. Trennung eines Perchlorsäure-Hydrolysates von DNS-Cytosin-[2-¹⁴C] aus *S. faecalis* R nach UV-Bestrahlung mit $38,7 \cdot 10^4$ erg/mm² an Dowex 2×8. Ordinate: links Ipm in 0,6 ml Eluat (—); rechts p_H -Wert des Gradienten (---). Abszisse: Nummer der Röhrchen. Fraktion 1 = Cytosin, Fraktion 2 = Uracil-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin + Uracil, Fraktionen 4, 5 und 6 nicht näher identifiziert.

ist von 0,46 auf 5,86% der Gesamt-Aktivität angestiegen. Durch Bestrahlung dieser Fraktionen in wäßriger Lösung gelang es nicht, Cytosin zurückzugewinnen. Die Zahlen der Tab. 3 und 4 können nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Nucleinsäuren aus verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung stammen (*E. coli*: $\frac{A+T}{G+C} = 0,94$ bis 1,02; *S. faecalis* R: $\frac{A+T}{G+C} = 1,59 - 1,89$ ¹⁹). Auch dieser Versuch macht deutlich, daß das Cytosin der DNS an der Bildung der in den Fraktionen 4 bis 6 enthaltenen Photoprodukte beteiligt ist.

¹⁹ A. N. BELOZERSKY u. A. S. SPIRIN, in: „The Nucleic Acids“ Band 3, S. 168 [1960].

Von besonderem Interesse ist in diesem Versuch der Anstieg der Aktivität in Fraktion 3 von 3,28 auf 9,32% der Gesamt-Aktivität. Die Möglichkeit einer Desaminierung von Cytosin zu Uracil in der DNS durch die Einwirkung von UV-Strahlen ist bereits diskutiert worden²⁰ (vgl. hierzu auch l. c.¹⁶). Durch papierchromatographische Untersuchung der Fraktionen 3 vor und nach der Bestrahlung fanden wir, daß die Menge Uracil-[2-¹⁴C] (R_f -Wert 0,33, System 1) in dieser Fraktion auf den dreifachen Wert angestiegen war. Damit dürfte der Beweis für die Umwandlung von Cytosin in Uracil in der DNS durch UV-Bestrahlung erbracht sein. Etwa 6 bis 7% des Cytosins wurden in diesem Experiment mit einer Dosis von $38,7 \cdot 10^4$ erg/mm² in Uracil und Uracil-Dimeres verwandelt.

Ähnlich wie bei Thymin hat auch bei Uracil die Dimerisierung durch UV-Licht eine Enolisierung der Carbonylgruppe in 4-Stellung zur Folge, wodurch der p_K -Wert ansteigt und die dimeren Verbindungen zwischen Cytosin und Thymin eluiert werden. Die Radioaktivität der Fraktion 2, die in den vorhergehenden Versuchen aus dimerem Thymin stammt, ist daher im vorliegenden Versuch auf Uracil-Dimeres zurückzuführen. Papierchromatographisch hat diese Fraktion den gleichen R_f -Wert (0,08, System 1) wie Uracil-Dimeres. Zusammenfassend ergibt sich daher angenähert, daß bei der Bestrahlung von DNS aus *E. coli* ($38,7 \cdot 10^4$ erg/mm²) etwa 8% des Cytosins durch UV-Licht umgewandelt werden, davon etwa die Hälfte in monomeres und dimeres Uracil. Thymin wird zu etwa 12% photochemisch umgewandelt, davon etwa 6% in das Dimere. Die Photoprodukte in den Fraktionen 4 bis 6 sind zu etwa 40% aus Cytosin und zu etwa 60% aus Thymin entstanden.

C) Versuche mit Thymin-[2-¹⁴C]

Zur Vervollständigung der Versuche mit DNS war es notwendig, auch die freie Base Thymin vor und nach Bestrahlung ebenfalls an der Ionenaustauscher-Säule zu chromatographieren. Zunächst wurden etwa 11 μ g Thymin-[2-¹⁴C] (10 mC/mMol) zusammen mit 100 μ g inaktivem Thymin ohne vorherige Bestrahlung und ohne Behandlung mit Perchlorsäure an der Säule mit dem üblichen Gradienten

²⁰ A. WACKER, Vortrag gehalten am 23. Nov. 1961, McArdle Memorial Laboratory, University of Wisconsin, Madison/Wisc.

ten chromatographiert. Dabei wurde die Radioaktivität in einer einzigen Bande an der Stelle der *Fraktion 3* gefunden (Tab. 5).

Für den 2. Versuch verwendeten wir eine Lösung von 11 µg Thymin-[2-¹⁴C] in 3 ml Wasser. Die Hälfte dieser Lösung wurde in gefrorenem Zustand mit 38,7 · 10⁴ erg/mm² bestrahlt, mit der unbestrahlten Hälfte vereinigt und an der Ionenaustauscher-Säule chromatographiert. Überraschenderweise zeigte sich dabei, daß neben der erwarteten Radioaktivität in den Fraktionen 3 (Thymin) und 2 (dimeres Thymin) weitere radioaktive Verbindungen

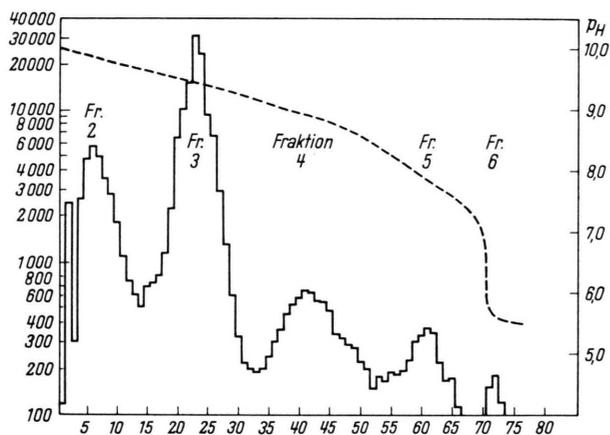


Abb. 4. Trennung einer Mischung von 5,5 µg unbestrahltem und 5,5 µg uv-bestrahltem (38,7 · 10⁴ erg/mm²) Thymin-[2-¹⁴C] an Dowex 2x8. Ordinate: links Ipm in 0,6 ml Eluat (—); rechts pH-Wert des Gradienten (---). Abszisse: Nummer der Röhrcchen. Fraktion 2 = Thymin-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin, Fraktionen 4, 5 und 6 nicht identifiziert.

	Fraktion Nr.					
	1	2	3	4	5	6
un- bestrahlt	460	1000	1150000	zusammen		1200
32 Min. in Eis bestrahlt	18000	240000	788000	54400	15400	3900

Tab. 5. Ionenaustausch-Chromatographie von Thymin-[2-¹⁴C] (10 mC/mMol). Obere Zeile: 11 µg unbestrahlt, untere Zeile: 5,5 µg in Eis mit 38,7 · 10⁴ erg/mm² bestrahlt + 5,5 µg unbestrahlt. Zahlenangaben: Radioaktivität der Fraktionen in Ipm. Fraktion 2 = Thymin-Dimeres, Fraktion 3 = Thymin, Fraktionen 1, 4, 5 und 6 nicht identifiziert.

(Fraktionen 1, 4, 5 und 6) entstanden sind. (Abb. 4 und Tab. 5). Während bei der Bestrahlung von DNS mit der angegebenen Dosis die aus Thymin entstandenen Photoverbindungen zu einem Drittel aus dimerem Thymin bestehen, beträgt die Menge des bei der Bestrahlung von Thymin in Eis gebildeten Thymin-Dimeren drei Viertel der insgesamt entstandenen Photoprodukte. Die Verbindungen 1, 4, 5 und 6, die nicht identifiziert wurden, lassen sich durch erneute UV-Bestrahlung nicht mehr in Thymin zurückverwandeln.

D) Versuche mit denaturierter DNS und Apurinsäure

Kürzlich konnten wir zeigen, daß in hitzedenaturierter, einsträngiger DNS bei der gleichen Strahlendosis mehr Thymin dimerisiert als in der nativen, doppelsträngigen DNS¹⁴. Dieser Befund erklärt möglicherweise auch die unterschiedliche UV-Empfindlichkeit synchronisierter Bakterienkulturen und die des Phagen Φ X 174. Ebenso ist die Ausbeute an Thymin-Bestrahlungsprodukten wesentlich höher, wenn man vor der Bestrahlung aus der DNS die Purine auf hydrolytischem Wege entfernt^{21, 22}. Es war deshalb von Interesse, noch einmal mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie quantitativ die Mengen der Thymin-Photoprodukte in der durch Erhitzen und rasches Abkühlen^{23, 24} denaturierten DNS und der Apurinsäure im Vergleich zu nativer DNS zu bestimmen. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, steigt die Menge an dimerem Thymin in der hitzedenaturierten DNS von 9% auf 11,5% und in

Fraktion	1	2	3	4	5	6
DNS	0,76	9,01	87,09	1,89	1,01	0,24
DNS, denaturiert (100°, 15')	1,15	11,49	82,13	1,87	2,97	0,57
Apurinsäure	1,07	20,80	71,68	1,96	3,90	0,59
DNS in Glykol	1,86	9,40	86,04	1,20	1,21	0,29

Tab. 6. Aktivitätsverteilung nach Bestrahlung von nativer DNS (aus *Enterococcus* Stei mit Thymin-[2-¹⁴C]), einsträngiger DNS und Apurinsäure mit 19,4 · 10⁴ erg/mm², Säure-Hydrolyse und Ionenaustausch-Chromatographie. Gradient: Ammoniumformiat pH 10,0–5,0 (0,03–0,12-m.). Gesamtaktivität = 100.

²¹ R. BEUKERS, J. YLSTRA u. W. BERENDS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **78**, 247 [1959].

²² A. WÄCKER, H. DELLWEG u. E. LODEMANN, Angew. Chem. **73**, 64 [1961].

²³ P. DOTY, H. BOEDTKER, J. R. FRESKO, R. HASELKORN u. M. LITT, Proc. nat. Acad. Sci. USA. **45**, 482 [1959].

²⁴ J. MARMUR u. P. DOTY, Nature [London] **183**, 1427 [1959].

der APS auf 20,8% an. Dieser beträchtliche Anstieg in Abhängigkeit vom Zustand der DNS zeigt sich außer beim Thymin-Dimeren (Fraktion 2) nur noch beim Thymin-Photoprodukt der Fraktion 5. (Fraktion 6, die bei dem Sprung des Gradienten von p_H 6,5 auf 4,5 von der Säule eluiert wird, möchten wir in diesem Zusammenhang nicht berücksichtigen.) Bei einer geringeren Bestrahlungsstärke ist das Verhältnis der Ausbeute an Thymin-Dimerem zwischen nativer und denaturierter DNS größer als bei höheren Bestrahlungsintensitäten. Mit diesem Versuch konnten wir somit bestätigen, daß man aus der Menge an Thymin-Dimerem Rückschlüsse auf die ein- oder zweisträngige Form der DNS ziehen kann.

Kürzlich hat DUGGAN eine neue Methode zur Trennung der DNS-Doppelhelix vorgeschlagen²⁵, nachdem er beobachtet hatte, daß eine DNS-Lösung nach Zusatz von Glykol einen starken hyperchromen

²⁵ E. L. DUGGAN, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **6**, 93 [1961].

Effekt zeigt. Es war interessant, auch im Glykol die Menge an Thymin-Dimerem zu bestimmen. Wie aus Tab. 6 hervorgeht, verändert sich die Menge Thymin-Dimeres bei Zusatz von Glykol von 9 auf 9,4 Prozent. Da gleichzeitig die Menge Thymin nur um 1% abnimmt, im Gegensatz zu 5% in der denaturierten DNS, ist eine vollständige Trennung der beiden DNS-Fäden vermutlich nicht eingetreten, wenn auch die Extinktion der DNS-Lösung um etwa 20% zugenommen hat. Vielleicht ist es möglich, durch Erhöhung der Glykolkonzentration die Menge an Thymin-Dimerem zu erhöhen.

Fräulein UTE GÜNGERICH sind wir zu besonderem Dank verpflichtet für die hervorragende technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche. Ferner danken wir Herrn Priv.-Doz. Dr. D. JACHTERS und Fräulein ANDREA GERSTENBERGER für die Kultivierung der Bakterien, Herrn Dr. D. WEINBLUM für die Synthese von markiertem Thymin und Uracil und Herrn Dr. D. LANG für die Eichung des UV-Brenners. Wir danken weiterhin dem Verband der chemischen Industrie — Fonds der Chemie — für die Unterstützung der Arbeit.

Sind die Neurohormone der Arthropoden identisch mit fluoreszierenden Substanzen aus dem Nervensystem?

Von F. FISCHER, W. KAPITZA

Aus dem Institut für Pflanzenchemie und Holzforschung Tharandt und

M. GERSCH und H. UNGER

dem Zoologischen Institut der Universität Jena

(*Z. Naturforsch.* **17 b**, 834—836 [1962]; eingegangen am 7. Juni 1962)

Von den neurohormonalen Faktoren des Nervensystems verschiedener Arthropoden (Insekten, Krebse) lassen sich mittels sorgfältiger Trennungsvorgängen neben den Neurohormonen fluoreszierende Substanzen isolieren: Isoxanthopterin, Xanthopterin und 2-Amino-6-hydroxypteridin. Es wird gezeigt, daß die Neurohormone mit den fluoreszierenden Pterinen nicht identisch sind.

Bei den aus dem Nervensystem von Insekten und Decapoden abgetrennten Faktoren hormonaler Wirkung wurde von verschiedenen Autoren und Arbeitsgruppen weitgehend übereinstimmend eine Fluoreszenz beobachtet¹⁻⁶. Da verschiedentlich die physiologisch aktiven Substanzen mit den fluoreszie-

renden identifiziert worden sind und daraus grundlegende Schlußfolgerungen über die angeblich chemische Natur der Neurohormone abgeleitet wurden, erscheint eine Klärung der Verhältnisse wichtig. Denn, abgesehen von diesen Erwägungen, ist bisher in noch keinem Falle eine eindeutige chemische

¹ D. B. CARLISLE, M. DUPONT-RAABE u. F. KNOWLES, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **240**, 665 [1955].

² F. G. W. KNOWLES, D. B. CARLISLE u. M. DUPONT-RAABE, *J. Marine biol. Assoc. United Kingdom* **34**, 611 [1955].

³ M. GERSCH, H. UNGER u. F. FISCHER, *Wiss. Z. Friedrich-Schiller-Univ. Jena/Thür., math.-naturwiss. R.* **6**, (3/4) 125 [1957].

⁴ M. GERSCH, F. FISCHER, H. UNGER u. H. KOCH, *Z. Naturforsch.* **15 b**, 319 [1960].

⁵ I. KONOK, *Acta biol. Acad. Sci. hung., Suppl.* **9**, 181 [1958].

⁶ C. L'HÉLIAS, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **241**, 770 [1955]; **240**, 1141 [1955]; C. L'HÉLIAS, *Ann. Sci. natur. Zool. Biol. animale* **18**, 275 [1956]; C. L'HÉLIAS, *Ann. biol.* **32**, 203 [1956]; C. L'HÉLIAS, *Bull. biol. France Belgique Suppl.* **44**, 1 [1957]; C. L'HÉLIAS, *2. Intern. Symp. über Neurosekretion, Lund 1957*, S. 91 [1958]; C. L'HÉLIAS, *Ann. Biol.* **37**, 9 [1961]; *C. R. Acad. Sci.* **253**, 1353 [1961].