

ANGEWANDTE CHEMIE

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

HERAUSGEgeben von der GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

81. JAHRGANG 1969

HEFT 16

SEITE 581–632

Chemische Untersuchungen über die molekularen Ursachen biologischer Strahlenschäden

Von E. Fahr^[*]

Die bei der Einwirkung von UV- und ionisierender Strahlung an biologischen Objekten beobachteten Strahlenschäden werden in vielen Fällen durch Veränderungen der Nucleinsäuren verursacht. Bei der UV-Bestrahlung dieser Verbindungen in vitro und in vivo kommt es u.a. zur Dimerisierung der Pyrimidin-Basen zu Cyclobutan-Derivaten und zur Addition von Wasser an die 5,6-Doppelbindung der Pyrimidin-Basen unter Bildung von Derivaten des 6-Hydroxy-dihydropyrimidin-Systems. Die Struktur der Bestrahlungsprodukte konnte bewiesen werden. Die Dimerisierung behindert die Reduplikation der DNA, die Wasseraddition scheint Ursache der UV-Mutationen zu sein. Ionisierende Strahlung bewirkt in wäßriger Lösung u.a. Addition von H- und/oder HO-Radikalen an die 5,6-Doppelbindung der Pyrimidin-Basen und Spaltung des Imidazolringes der Purinbasen. Die durch ionisierende Strahlung ausgelösten Mutationen dürften zum Teil ebenfalls auf die Bildung von 6-Hydroxy-dihydropyrimidin-Derivaten zurückzuführen sein.

1. Einleitung

Die ersten – wissenschaftlich fundierten – Beobachtungen über die biologische Wirkung von Strahlung wurden in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts gemacht. Man fand, daß die UV-Strahlung des Quecksilberbrenners nicht nur die Haut bräunen, sondern auch Verbrennungen, Hautkrebs, Mutationen und Abtötung von Mikroorganismen verursachen kann. Die sehr ausgeprägten biologischen Wirkungen der ionisierenden Strahlung wurden unmittelbar nach der Entdeckung der Radioaktivität und der Röntgenstrahlung im letzten Jahrzehnt des 19. Jahrhunderts gefunden, allerdings nicht sofort in ihrer ganzen Gefährlichkeit erkannt. Detaillierte Kenntnisse über die biologischen und medizinischen Wirkungen der UV- und ionisierenden Strahlung wurden in den ersten Jahrzehnten dieses Jahrhunderts erhalten, nachdem die Medizin anfangs im Radium und seiner Strahlung eine Art „Wunderdroge“ gesehen hatte.

Nach dem II. Weltkrieg, dem Abwurf der ersten Atombomben, den Atombombenversuchen und der Verwendung von radioaktivem Material in Forschung

und Technik wurde die Frage nach den biologischen Wirkungen der Strahlung und besonders die nach den genetischen Effekten hochaktuell.

Obwohl diese Wirkungen der UV- und ionisierenden Strahlung seit mehr als einem Jahrhundert bekannt sind, waren die dabei ablaufenden chemischen Prozesse bis vor ca. 20 Jahren relativ unbekannt, weil sich die Strahlenbiologen und Biophysiker überwiegend auf die Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen der Strahlendosis sowie anderen physikalischen Parametern und dem biologischen und medizinischen Effekt beschränkten; die bei der Einwirkung von Strahlung auf biologisches Material ablaufenden chemischen Vorgänge konnten erst durch die in den letzten Jahrzehnten entwickelten Methoden der Trennung von Substanzgemischen untersucht werden. Da die Desoxyribonucleinsäure (DNA) Träger der genetischen Information ist, sollten die durch Strahlung ausgelösten Mutationen auf chemisch faßbare Veränderungen an der DNA zurückzuführen sein; da sich weiterhin das Aktionspektrum der Abtötung von Mikroorganismen durch UV-Strahlung sehr auffällig mit dem Absorptionspektrum der Nucleinsäure deckt, wurde besonders die Einwirkung von Strahlung auf Nucleinsäuren und deren Bestandteile bearbeitet. Bei UV- und ionisierender Bestrahlung (Röntgen-, γ -, Korpuskularstrahlung) biologischer Objekte kommt

[*] Prof. Dr. E. Fahr
Institut für Organische Chemie der Universität
87 Würzburg, Röntgenring 11

es zu einigen nacheinander geschalteten Prozessen, die von der Art der Strahlung, der Strahlungsdosis, der Natur des biologischen Objektes und anderen Faktoren abhängen. Dies sind:

Die primäre physikalische Wechselwirkung zwischen der Strahlung und den molekularen Bestandteilen des biologischen Objektes.

Der strahlungsschemische Prozeß des durch Wechselwirkung mit der Strahlung energiereichen Moleküls, der zu spezifischen chemischen Reaktionen (photochemische Prozesse bei der Bestrahlung mit UV- und/oder sichtbarem Licht, durch ionisierende Strahlung bewirkte Bildung von Ionen und/oder Radikalen) führt.

Der biologische Effekt, der durch diese Vorgänge bedingt ist.

Wir beschränken uns hier im wesentlichen auf die Darstellung der strahlungsschemischen Prozesse [1].

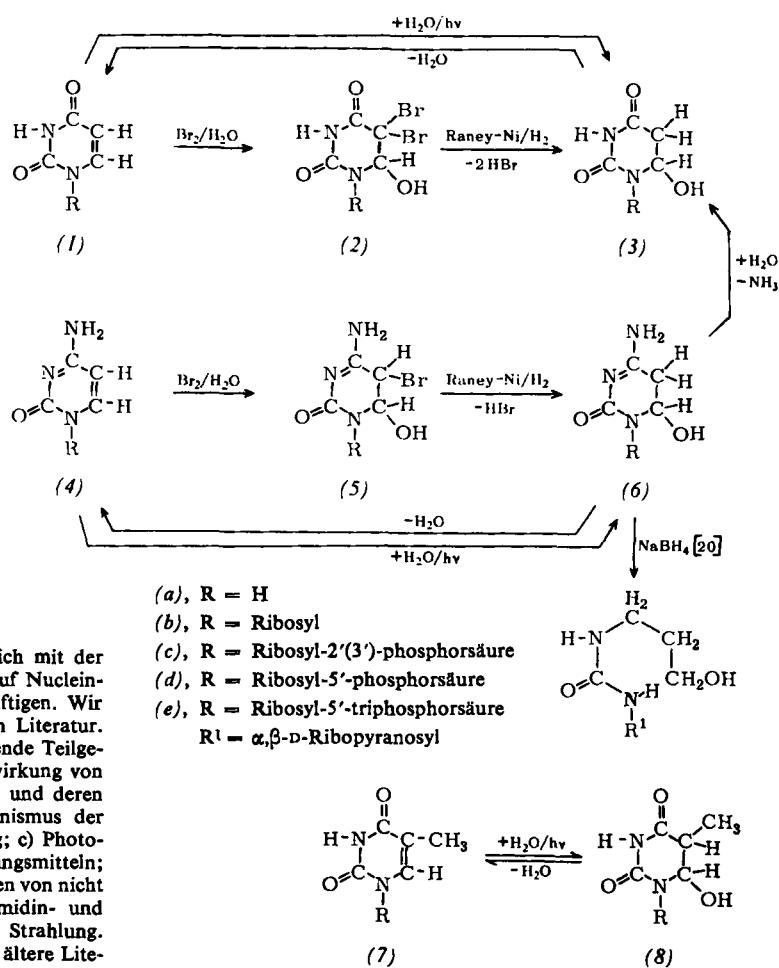
2. Einwirkung von UV-Strahlung auf Nucleinsäuren und deren Bestandteile [2]

2.1. Reversible Bestrahlungsprodukte

1949 publizierten Sinsheimer und Hastings [3], daß Uracil (1a) und Uridin (1b) bei UV-Bestrahlung in wäßriger Lösung Produkte bilden, die sich beim Stehenlassen, schneller beim Erwärmen, wieder in die Ausgangsprodukte umwandeln. Man bezeichnet deshalb diese Substanzen als *reversible Bestrahlungsprodukte*. Da sie im Bereich um 260 nm, in dem Uracil und Uridin ein charakteristisches Absorptionsmaximum haben, nicht absorbieren, läßt sich ihre Bildung sowie ihre Rückumwandlung quantitativ gut verfolgen. Mit der Struktur dieser Verbindungen beschäftigten sich Moore und Thomson [4] sowie Wang [5,6]. Sie

[1] Von uns wurden 520 Arbeiten registriert, die sich mit der Einwirkung von UV- und ionisierender Strahlung auf Nucleinsäuren sowie Pyrimidin- und Purin-Derivate beschäftigen. Wir bitten um Verständnis für die Auswahl der zitierten Literatur. Nicht berücksichtigt wurden in diesem Aufsatz folgende Teilgebiete: a) Physikalische Primärvorgänge bei der Einwirkung von UV- und ionisierender Strahlung auf Nucleinsäuren und deren Bestandteile; b) Untersuchungen über den Mechanismus der photochemischen Wasseraddition und Dimerisierung; c) Photochemische Dimerisierung in nicht-wäßrigen Lösungsmitteln; d) Sensibilisierte photochemische Prozesse; e) Verhalten von nicht in natürlichen Nucleinsäuren vorkommenden Pyrimidin- und Purin-Derivaten gegenüber UV- und ionisierender Strahlung. Hierüber informieren u.a. folgende Arbeiten, die auf ältere Literatur verweisen: Zu a) P. J. Wagner u. D. J. Bucheck, J. Amer. chem. Soc. 90, 6530 (1968); J. Eisinger, Photochem. and Photobiol. 7, 597 (1968). Zu b) S. Y. Wang, Photochem. and Photobiol. 1, 135 (1962); A. Wacker, A. Kornhauser u. L. Träger, Z. Naturforsch. 20b, 1043 (1965); S. Y. Wang u. J. C. Nnadi, Chem. Commun. 1968, 1160; A. A. Lamola, Photochem. and Photobiol. 7, 619 (1968); A. A. Lamola u. J. Eisinger, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 46 (1968); J. G. Burr, B. R. Gordon u. E. H. Park, Photochem. and Photobiol. 8, 73 (1968). Zu c) Siehe [1a] sowie H. Morrison u. R. Kleopfer, J. Amer. chem. Soc. 90, 5037 (1968). Zu d) J. D. Spikes u. R. Straight, Annu. Rev. physic. Chem. 18, 409 (1967). Zu e) Siehe [2a, b].

[2] D. Shugar in E. Chargaff u. J. N. Davidson: The Nucleic Acids. Academic Press, New York 1960, Bd. 3; A. Wacker in J. N. Davidson u. W. E. Cohn: Progress in Nucleic Acid Research, Academic Press, Inc., New York 1963, Bd. 1; E. Fahr, Biophysik 5, 2 (1968); sowie [104].



Schema 1.

[3] R. L. Sinsheimer u. R. Hastings, Science (New York) 110, 525 (1949).

[4] A. M. Moore u. C. H. Thomson, Science (Washington) 122, 594 (1955); Canad. J. Chem. 35, 163 (1957); 36, 281 (1958).

[5] S. Y. Wang, M. Apicella u. B. R. Stone, J. Amer. chem. Soc. 78, 4180 (1956); S. Y. Wang, ibid 80, 6196 (1958).

[6] Weitere Arbeiten, die sich mit der photochemischen Addition von Wasser an Uracil- und Cytosin-Derivate beschäftigen, siehe in [8c] und [9b].

konnten wahrscheinlich machen, daß bei der Bildung der reversiblen Bestrahlungsprodukte Wasser an die 5,6-Doppelbindung des Uracil-Systems addiert wird; isoliert wurden die reversiblen Bestrahlungsprodukte der in den Nucleinsäuren vorkommenden Basen nicht.

Wir konnten die reversiblen Bestrahlungsprodukte von (1a)–(1e) durch UV-Bestrahlung wäßriger Lösungen dieser Verbindungen darstellen und daraus abtrennen [8].

Führt man die Bestrahlung, um die thermische Rückreaktion zu unterdrücken, unter Eiskühlung und Verwendung von Hg-Niederdruckbrennern [7b] aus, so kann man bei den Uridylsäuren (1c)–(1e) auf eine säulenchromatographische Trennung der Bestrahlungslösung verzichten. Durch Gefriertrocknung der Lösungen erhält man die reversiblen Bestrahlungsprodukte (3c)–(3e) in ca. 90-proz. Reinheit [8c].

Die 6-Hydroxy-dihydrouracil-Struktur (3) der reversiblen Bestrahlungsprodukte konnte durch chemische Synthese [8] (1a)→(2a)→(3a) bewiesen werden. Die so dargestellte Verbindung (3a) ist nach IR-Spektrum und chromatographischen Daten mit dem reversiblen Bestrahlungsprodukt des Uracils identisch. Auf analogem Wege wurden von uns auch (3b)–(3e) hergestellt.

Das Verhalten von Cytosin (4a), Cytidin (4b) und Cytidylsäure (4c) bei UV-Bestrahlung in wäßriger Lösung ist wiederholt diskutiert worden [6]. Cytosin und Cytidylsäure bilden sehr instabile reversible Bestrahlungsprodukte, für die von einigen Autoren [6] in Analogie zum Uracil eine 6-Hydroxy-dihydrocytosin Struktur, von Wang [10] dagegen eine Photoisomerisierung des Cytosin-Ringes angenommen wurde. Durch Verwendung einer speziellen Bestrahlungsanordnung [7a, 9b] erhielten wir die reversiblen Bestrahlungsprodukte von (4a)–(4c) in so hoher Konzentration, daß sowohl die thermische Rückreaktion untersucht als auch das reversible Bestrahlungsprodukt der Cytidylsäure durch Dünnschichtchromatographie an gekühlter Polyäthylen-imin-Cellulose abgetrennt werden konnte [9]. Johns [11–13] gelang die Abtrennung des gleichen Bestrahlungsproduktes aus der Bestrahlungslösung durch Papierelektrophorese. Die 6-Hydroxy-dihydrocytosin-Struktur (6) dieser Bestrahlungsprodukte wurde durch die Reaktionsfolge (4c)→(5c)→(6c) bewiesen [9].

Die Produkte (6) gehen beim Stehenlassen (Dunkelreaktion) unter Desaminierung in die Verbindungen

[7] Für die UV-Bestrahlungen verwendeten wir folgende Brenner der Firma Original Hanau, Quarzlampengesellschaft, Hanau: a) Hg-Niederdruckbrenner, NK 25/7; b) Hg-Niederdruckbrenner, NK 6/20; c) Hg-Niederdruckbrenner der Spezialanalysenlampe (ohne Filter).

[8] a) H. Gattner u. E. Fahr, Liebigs Ann. Chem. 670, 84 (1963); b) Z. Naturforsch. 19b, 74 (1964); c) E. Fahr, H. Gattner, G. Dörrhöfer, R. Kleber u. H. Popp, Z. Naturforsch. 22b, 1256 (1967).

[9] a) R. Kleber, E. Fahr u. E. Boebinger, Naturwissenschaften 52, 513 (1965); b) E. Fahr, R. Kleber u. E. Boebinger, Z. Naturforsch. 21b, 219 (1966).

[10] S. Y. Wang, Nature (London) 184, 184 (1959).

[11] H. E. Johns, J. C. LeBlanc u. K. B. Freeman, J. molecular Biol. 13, 849 (1965).

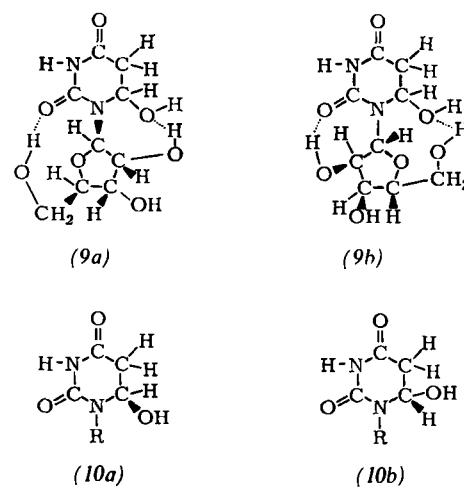
[12] K. B. Freeman, P. V. Hariharan u. H. E. Johns, J. molecular Biol. 13, 833 (1965).

[13] H. Becker, J. B. LeBlanc u. H. E. Johns, Photochem. and Photobiol. 6, 733 (1967).

(3) über, so daß auf dem Wege (4)→(6)→(3) das Cytosin- in das Uracil-System überführt werden kann [9, 11–14, 15].

Die Frage, ob Thymin, Thymidin und Thymidylsäure (7) ein reversibles Bestrahlungsprodukt (8) bilden können, ist bis heute nicht eindeutig entschieden worden. Wir konnten bei der UV-Bestrahlung von Thymin in wäßriger Lösung ein sehr instabiles reversibles Bestrahlungsprodukt (Halbwertszeit ca. 1–2 min) [9b] nachweisen [22]. Von uns ausgeführte Versuche, auf dem beim Uracil sowie beim Cytosin und ihren Derivaten angewandten Weg ein 6-Hydroxy-dihydrothymin (8) zu synthetisieren, verliefen negativ. Nofre [16] konnte dagegen (8) durch Debromierung der entsprechenden Thyminverbindung mit Zn/Eisessig erhalten [17].

Bei der säulenchromatographischen Trennung der bei der UV-Bestrahlung von Uridin in gefrorener wäßriger Lösung entstehenden Produkte erhielten wir zwei reversible Bestrahlungsprodukte des Uridins [21c]. Ob es sich hierbei entsprechend den Formulierungen (9a) und (9b) um zwei durch unterschiedliche H-Brücken bedingte Isomere [18] oder um die Diastereomere (10) [19] handelt, ist zur Zeit nicht sicher entschieden.



Die detaillierte kinetische Untersuchung [8b, 8c, 9b, 21a–d] des Zerfalls der reversiblen Bestrahlungsprodukte (3a)–(3e) und (6a)–(6c) ergab, daß die Beständigkeit

[14] H. Schuster, Z. Naturforsch. 19b, 815 (1964).

[15] Eine direkte photochemische Desaminierung des Cytosins diskutierten M. Daniels u. A. Grimson, Biochem. biophysic. Res. Commun. 16, 428 (1964).

[16] C. Nofre, Dissertation, Universität Lyon 1968.

[17] Möglicherweise führen photochemische Wasseraddition an Thymin sowie Debromierung des entsprechenden Thyminderivates zu verschiedenen Isomeren von (8); siehe dazu I. Pietrzakowska u. D. Shugar, Science (Washington) 161, 1248 (1968), dort Fußnote 9.

[18] Siehe dazu [8c].

[19] W. J. Wechter u. K. C. Smith, Biochemistry 7, 4064 (1968).

[20] Zum Mechanismus siehe N. Miller u. P. Cerutti, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 34 (1968); analog wurde auch (3b) abgebaut.

[21] a) H. Gattner, Dissertation 1964; b) R. Kleber, Dissertation 1966; c) G. Dörrhöfer, Dissertation 1966; d) H. Popp, Zulassungsarbeit 1966; e) G. Fürst, Dissertation 1968; f) B. Sojka, Dissertation 1969; g) R. Pastille, in Arbeit befindliche Zulassungsarbeit; h) P. Richter, in Arbeit befindliche Dissertation, alle Universität Würzburg; i) unveröffentlichte Versuche sowie K.-H. Dönges u. E. Fahr, Z. Naturforsch. 21b, 87 (1966).

des 6-Hydroxy-dihydropyrimidin-Systems sehr ausgeprägt vom Zucker- und Zucker-Phosphat-Rest am N-1-Atom beeinflußt wird; die Beständigkeit wächst in Richtung Base → Nucleosid → Nucleotid. Aus Untersuchungen von *Logan* und *Whitmore* [23] geht hervor, daß dieser Effekt nicht etwa beim Nucleotid endet, sondern daß die Beständigkeit des 6-Hydroxy-dihydrouracil-Systems in Polynucleotiden mit wachsender Kettenlänge – also in Richtung Nucleinsäure – zunimmt. Diese Beeinflussung der Reaktivität des Pyrimidin-Systems, die auch bei anderen Untersuchungen beobachtet wurde [24, 123b], ist vermutlich auf H-Brücken zwischen Teilen des Pyrimidinringes und den OH-Gruppen des Zuckerrests, auf „sterische Abschirmung“ der reaktiven Zentren am Pyrimidinring durch die Phosphat-Gruppe(n) und auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Pyrimidinring oder einzelnen Ringteilen und der (den) Phosphat-Gruppe(n) zurückzuführen [24]. Bei Polynucleotiden und Nucleinsäuren kommen noch andere sterische Einflüsse (z. B. die Abschirmung der Base durch einzelne Teile des Makromoleküls) und die elektrostatische Beeinflussung von angreifenden ioni-schen Reaktionspartnern durch das elektrische Feld der Nucleinsäure hinzu. Diese Effekte können die Reaktivität einer Pyrimidin-Base [25] so gravierend beeinflussen, daß sie als freie Base völlig anders reagiert als in Form ihres Nucleotids oder eingebaut in eine Nucleinsäure. Man kann also nicht ohne weiteres einen an einer Pyrimidin-Base [25] beobachteten Effekt in seiner Aussage auf das entsprechende Nucleosid, Nucleotid oder sogar auf eine Nucleinsäure ausdehnen [26].

2.2. Dimere Bestrahlungsprodukte

2.2.1. Struktur der dimeren Bestrahlungsprodukte

In den Jahren 1958–1960 publizierten *Rörsch*, *Beukers*, *Ijlstra* und *Berends* [27] sowie *Wang* [28] Beobachtungen, nach denen bei der UV-Bestrahlung von Thymin in gefrorener wäßriger Lösung (im folgenden als Eismatrix bezeichnet) ein *thermisch nicht-reversibles* Bestrahlungsprodukt gebildet wird. Die Autoren diskutierten dafür – ohne nähere Belege zu bringen – eine

[22] Das Verhalten von Thymidin bei der Reduktion mit NaBH_4 unter UV-Bestrahlung spricht für die intermediäre Bildung von (8), siehe *Y. Kondo u. B. Witkop*, J. Amer. chem. Soc. 90, 764 (1968), und [20].

[23] *D. M. Logan u. G. F. Whitmore*, Photochem. and Photobiol. 5, 143 (1966).

[24] Siehe dazu [8c].

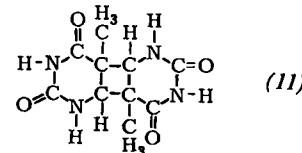
[25] Orientierende Versuche sprechen dafür, daß die obigen Annahmen auch für Purin-Basen gelten.

[26] Auf derartige Effekte dürfte auch das – verglichen mit „normalen“ organischen Radikalen – z. T. ungewöhnliche Verhalten der durch ionisierende Strahlung in Nucleinsäuren erzeugten Radikale [77b] zurückzuführen sein.

[27] a) *A. Rörsch, R. Beukers, J. Ijlstra u. W. Berends*, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 77, 423 (1958); b) *R. Beukers, J. Ijlstra u. W. Berends*, ibid. 78, 883 (1959); 79, 101 (1960); c) *R. Beukers u. W. Berends*, Biochim. biophysica Acta 41, 550 (1960).

[28] a) *S. Y. Wang*, Nature (London) 184, BA 59 (1959); b) *I88*, 844 (1960); c) *I90*, 690 (1961).

photochemische Dimerisierung zu einem tricyclischen Cyclobutan-Derivat [(11)], in der Formulierung von [27c, 28c]. Die Autoren wählten die Bestrahlung in der Eismatrix aufgrund von Beobachtungen *A. v. Szent-Györgyi*s, weil die Eismatrix den biologischen Bedingungen besser entsprechen sollte als eine wäßrige Lösung [27, 28]. Die Entdeckung dieser nicht-reversiblen Bestrahlungsprodukte, deren Bildung auch

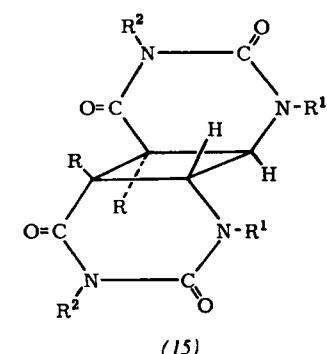
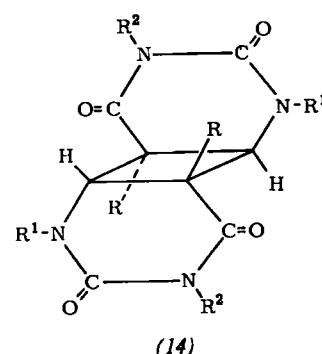
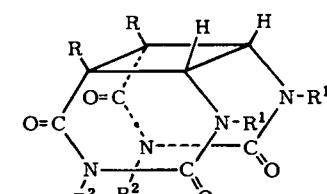
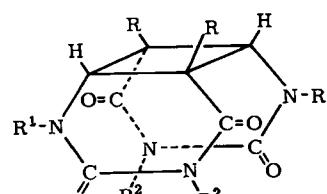


bei anderen Pyrimidin-Derivaten beobachtet wurde, löste sofort eine sehr intensive Bearbeitung dieses Gebietes aus. Folgende Fragen waren zu klären:

Sind diese Bestrahlungsprodukte entsprechend der Formulierung (11) wirklich Cyclobutan-Derivate?

Wenn ja, welche der vier möglichen Isomeren (12) bis (15) werden gebildet?

Entstehen derartige Bestrahlungsprodukte auch bei der UV-Bestrahlung von Nucleinsäuren?



(a), $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$

(b), $\text{R} = \text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$

(c), $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^1 = \text{Desoxyribosyl}$

(d), $\text{R} = \text{R}^2 = \text{H}$, $\text{R}^1 = \text{Ribosyl}$

(e), $\text{R} = \text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{CH}_3$

Die Cyclobutan-Struktur der nicht-reversiblen Bestrahlungsprodukte wurde von mehreren Arbeitskreisen bewiesen. *Anet* [29] sowie *Blackburn* und *Davies* [30a] konnten auf NMR-spektroskopischem Wege bzw. mit Hilfe eines neuartigen Abbaus (s. Abschnitt 2.2.2) zeigen, daß das in der Eismatrix entstehende dimere

[29] *R. Anet*, Tetrahedron Letters 1965, 3713.

[30] a) *G. M. Blackburn u. R. J. H. Davies*, Chem. Commun. 1965, 215; b) *Tetrahedron Letters* 1966, 4471.

Thymin die *cis/syn*-Struktur (13a) hat. Die Struktur (13b) des dimeren Uracils wurde von uns durch Abbau [21^f], von Blackburn und Davies [30^b] durch NMR-spektroskopische Untersuchung und von Adman, Gordon und Jensen [31] durch Röntgenstrukturanalyse bewiesen. Der Nachweis, daß das Eismatrix-Dimere des Thymins und Uracils auch bei der UV-Bestrahlung von Nucleinsäuren gebildet wird, konnte von mehreren Arbeitsgruppen (s. Abschnitt 4) erbracht werden.

Wesentlich schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob bei der UV-Bestrahlung von Thymin und Uracil sowie von deren Nucleosiden, Nucleotiden und von Nucleinsäuren nur die *cis/syn*-Isomeren (13) oder auch die anderen Isomeren (12), (14) und (15) gebildet werden. Einige Autoren nahmen an, daß sich die vier Isomeren des dimeren Thymins und des dimeren Uracils dünnenschicht- oder papierchromatographisch unterscheiden lassen. Wie wir jedoch an Gemischen dieser Isomeren zeigen konnten [21^e, 21^f], ist das nicht sicher der Fall. Auch durch fraktionierende Umkristallisation und ähnliche Operationen lassen sich die Isomeren nicht zuverlässig voneinander trennen. Eine Unterscheidung ist also nur mit anderen Methoden möglich.

Die für die Identifizierung kleiner Substanzmengen besonders geeignete *Massenspektrometrie* versagt hier völlig. Die Dimeren werden in der Ionenkammer sowohl thermisch als auch durch die Elektronen [12¹] der Ionenquelle gespalten. Wir erhielten mit verschiedenen Massenspektrometern und unter variablen apparativen Bedingungen nur die Massenspektren der Monomeren.

Die *NMR-Spektroskopie* erlaubt zwar eine Unterscheidung und damit eine Identifizierung der Dimeren [21^f], setzt aber zumindest mg-Mengen an Substanz voraus, die bei der Isolierung der Dimeren aus biologischen Systemen in der Regel kaum zur Verfügung stehen.

Eine zuverlässige Identifizierung der Dimeren ist mit Hilfe der *IR-Spektroskopie*, die sich ohne größere technische Schwierigkeiten auch im µg-Bereich anwenden läßt, möglich [32, 33, 59]. In einem Gemisch zweier isomerer Dimerer lassen sich noch bis zu 10% des einen Isomeren nachweisen [21^f, 32].

Die als Vergleichssubstanzen benötigten Dimeren können auf folgendem Wege dargestellt werden:

Die Dimerisierung von Thymidin in der Eismatrix und anschließende säulenchromatographische Trennung der Bestrahlungsprodukte liefern die drei dimeren Thymidine (12c), (13c) und (14c) [34], deren Hydrolyse die dimeren Thymine (12a), (13a) und (14a) er-

[31] E. Adam, M. P. Gordon u. L. H. Jensen, Chem. Commun. 1968, 1019.

[32] Siehe dazu E. Fahr u. W. Rohlfing, Z. analyt. Chem. 243, 43 (1968).

[33] Zur Erhöhung des Identifizierungsvermögens empfiehlt es sich, den Bereich bis ca. 35 µm zu vermessen [32].

[34] Die Dimeren (12a) und (12b) sowie (15a) und (15b) mit der Symmetriegruppe C₂ müssen sich in optische Antipoden aufspalten lassen. Dementsprechend fallen bei der Dimerisierung von Thymidin und Uridin die Dimeren (12c) und (12d) in je zwei diastereomeren Formen an, die bei der Hydrolyse die Dimeren (12a) und (12b) in optischen Antipoden liefern.

gibt [35]. Das vierte dimere Thymin (15a) wurde von Weinblum und Johns [35] durch UV-Dimerisierung von Thymidyl-(3'-5')-thymidin und anschließende Hydrolyse dargestellt [36].

Bei der Dimerisierung von Thymidin in tert.-Butanol mit Aceton als Sensibilisator wurden die vier dimeren Thymidine (12c) bis (15c) erhalten [37]. Bei Bestrahlung von Thymin in Gegenwart von Aceton, Benzophenon und anderen Ketonen als Sensibilisatoren entstehen die dimeren Thymine (14a) und (15a) [38].

Das dimere Uracil (12b) wurde von uns durch UV-Bestrahlung von Uridin in der Eismatrix [7c], säulenchromatographische Trennung der Bestrahlungslösung und Hydrolyse der entsprechenden dimeren Uridine in den beiden optisch aktiven Formen erhalten [21^e, 39]. Alle vier dimeren Uracile konnten wir durch Totalsynthese darstellen (s. Abschnitt 2.2.3) [21^b, 40].

Bei der Trennung der Uridin-Bestrahlungsprodukte (Eismatrix) erhielten wir zwei Fraktionen, die bei der Hydrolyse das gleiche dimere Uracil (13b) lieferten. Betrachtungen an Moleküllmodellen [41] ergaben, daß beim *cis/syn*-dimeren Uridin (13d) die Drehbarkeit der Ribose-Reste um die N-1/C-1'-Achse, die schon durch H-Brücken zwischen der 2-C=O-Gruppierung und den HO-Gruppen des Zucker-Restes eingeschränkt ist, durch die Raumerfüllung der beiden benachbarten Ribose-Reste aufgehoben sein muß. Entsprechend den Formeln (16), (17) und (18) können drei Isomere gebildet werden, von denen (18) mit *trans/trans*-Stellung der Ribose-O-Atome zu den H-Atomen des Cyclobutanrings aus sterischen Gründen wenig begünstigt ist. Wir vermuten, daß die beiden oben erwähnten Fraktionen die Uridin-Dimeren (16) und (17) sind [21e].

Die genaue Untersuchung der Dimerisierung zeigte, daß diese nicht auf die Eismatrix oder allgemein auf den festen Zustand [50] beschränkt ist, sondern auch – mit schlechter Ausbeute – in Lösung abläuft. Sie ist von der Wellenlänge der verwendeten Strahlung abhängig [47]; es bildet sich ein photochemisches Gleichgewicht mit einem Maximum an Dimeren bei ca. 275 nm. Durch kurzwellige UV-Strahlung (ca. 230 nm) werden auch Cyclobutan-Derivate mit nur einem Dihydropyrimidinring, z.B. (26), in Monomere gespalten.

Die Stabilität des Cyclobutanrings in den Dimeren wird ähnlich durch die an den N-1-Atomen befindlichen Zucker- oder Zuckerphosphatreste beeinflußt wie die der 6-Hydroxy-dihydropyrimidinringsysteme (3) und (6) (s. Abschnitt 2.1). Während das dimere

[35] D. Weinblum u. H. E. Johns, Biochim. biophysica Acta 114, 450 (1966).

[36] Zur Strukturaufklärung der dimeren Thymine siehe [35] und a) D. Weinblum, F. P. Ottensmeyer u. G. F. Wright, Biochim. biophysica Acta 155, 24 (1968); b) D. P. Hollis u. S. Y. Wang, J. org. Chemistry 32, 1620 (1967).

[37] E. Ben-Hur, D. Elad u. R. Ben-Ishai, Biochim. biophysica Acta 149, 355 (1967).

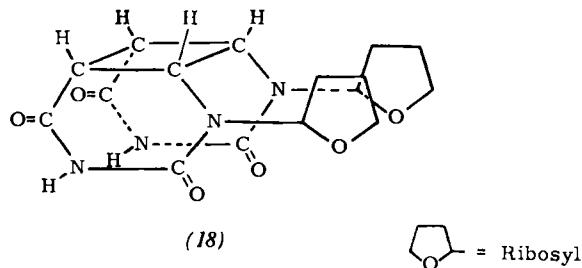
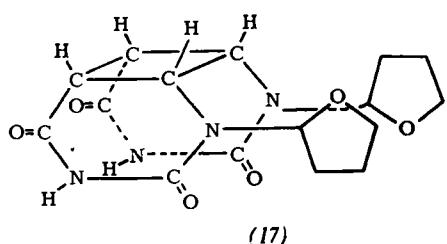
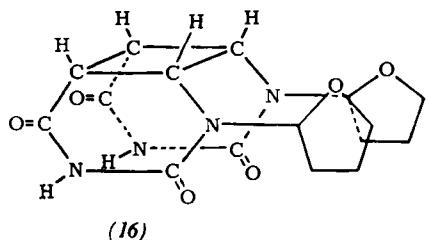
[38] I. v. Wilucki, H. Matthäus u. C. H. Krauch, Photochem. and Photobiol. 6, 497 (1967).

[39] E. Fahr, G. Fürst u. R. Pastille, Z. Naturforsch. 23b, 1387 (1968).

[40] a) P. Richter u. E. Fahr, Angew. Chem. 81, 188 (1969); Angew. Chem. internat. Edit. 8, 208 (1969); b) G. Dörhöfer u. E. Fahr, Tetrahedron Letters 1966, 4511.

[41] Von uns aus den Röntgenstruktur-Daten von [31] errechnete und gebaute Briegleb-Stuart-Kalottenmodelle [42] (s. [21g]).

[42] G. Briegleb, Fortschr. chem. Forsch. 1, 642 (1950).



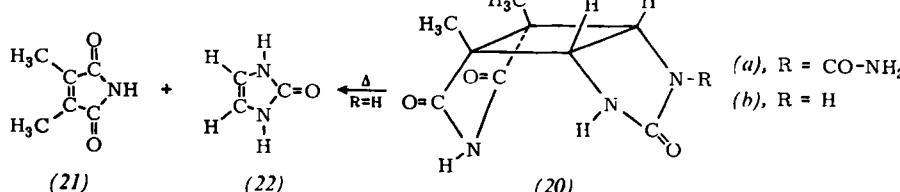
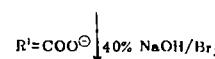
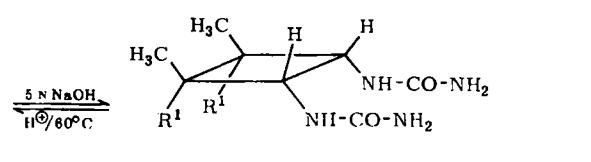
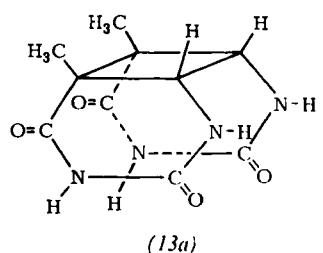
Uracil (13b) bei der Behandlung mit 6 N HCl völlig stabil ist, bildet das dimere Uridin (13d) unter den gleichen Bedingungen nicht nur durch Abspaltung des Zuckerrestes das dimere Uracil (13b), sondern auch Uracil [21e]; d.h. hier wie auch im Falle der 6-Hydroxy-

Untersuchungen mehrerer Arbeitskreise über den quantitativen Zusammenhang zwischen der eingeschalteten Strahlendosis und der durch saure Hydrolyse erhaltenen Menge an Dimerem (13a) oder (13b) müssen als unsicher angesehen werden, weil die Menge an isoliertem (13a) bzw. (13b) nicht der Menge des in der Nucleinsäure gebildeten Dimeren entspricht und auch Dimere entstehen können, die bei der Aufarbeitung in Monomere gespalten oder auf anderem Wege zerstört werden [43].

Die aus Nucleinsäuren isolierten Dimeren ausschließlich aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens zu identifizieren, muß in jedem Fall als unsicher angesehen werden. Es muß IR-spektroskopisch überprüft werden, ob nicht doch neben den Dimeren (13a) oder (13b) auch andere Dimere im isolierten Bestrahlungsprodukt enthalten sind [21e, 21f].

2.2.2. Reaktionen der dimeren Thymine und dimeren Uracile

Das dimere Thymin (13a) bildet beim Lösen in 0.1 N NaOH ein Di-Natriumsalz, das beim Erwärmen mit 5 N NaOH auf 60 °C in die Diureido-Verbindung (19a) übergeht [21f, 30a, 44a, 44b]. Analoge Diureido-Verbindungen geben die Dimeren (12a) und (14a) [38, 44a]. Behandelt man (19a) mit 40-proz. NaOH und Brom, so entsteht Verbindung (20a), die bei der Umsetzung mit HNO₂ (20b) bildet. (20a) und (20b) liefern beim Erhitzen auf 240 °C (21) und (22) [30a, 44b]. Die Überführung von (13a) in (21) und (22) zogen Blackburn und Davies [30a, 44b] zum Beweis für die Struktur von (13a) heran. Im Gegensatz zu den dimeren Uracilen (s. Abschnitt 2.2.3) lassen sich die dimeren Thymine mit Dimethylsulfat



dihydropyrimidin-Derivate kann aus dem Verhalten der Basen kein unmittelbarer Rückschluß auf das Verhalten der entsprechenden Nucleoside, Nucleotide sowie der entsprechenden Basenteile in den Nucleinsäuren gezogen werden. Aus diesen Befunden ergeben sich für die Untersuchung der UV-Bestrahlung von Nucleinsäuren folgende Schlüsse:

in die Tetramethyl-Derivate überführen [36a, 44c, 44d]. Bei der Umsetzung von (13a) mit NaBH₄ bildet sich

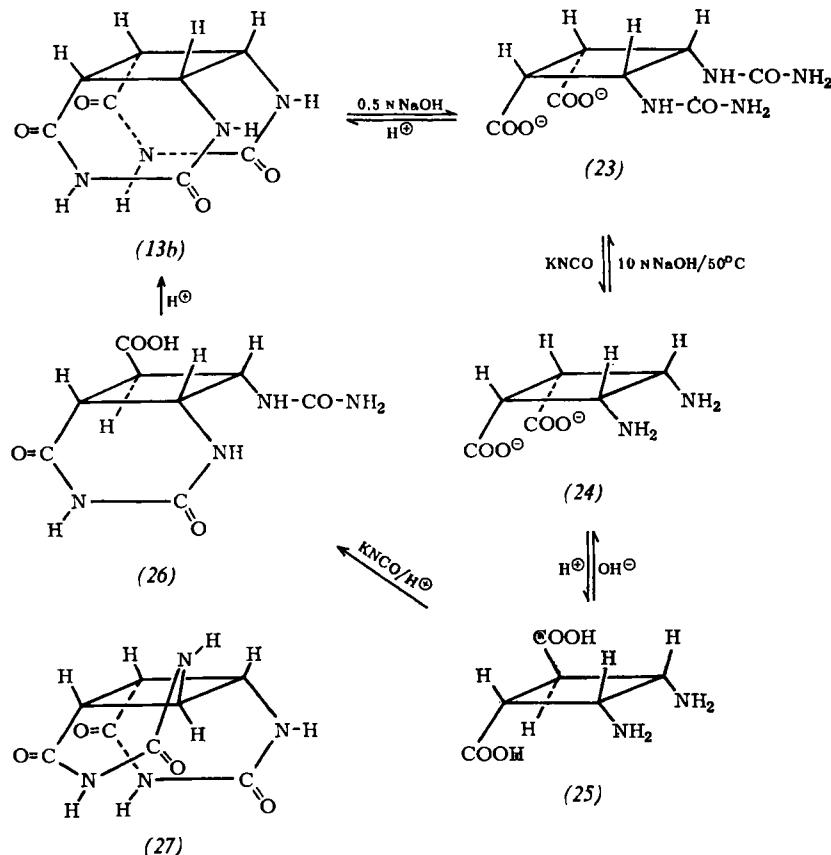
[43] Instabil gegen Säure sind die Dimeren (12b) und (14b) [21e, 21f] sowie (12a) und (14a) [35, 37, 21f].

[44] a) B. Witkop, Photochem. and Photobiol. 7, 813 (1968); b) G. M. Blackburn u. R. J. H. Davies, J. chem. Soc. (London) C 1966, 2239; c) 1966, 1342; d) R. Beukers u. W. Berends, Biochim. biophysica Acta 49, 181 (1961).

(19b), das bei der Oxidation mit KMnO_4 in (19a) übergeht^[44a]. Ähnlich verhalten sich die Dimeren (12a) und (14a) gegenüber NaBH_4 .

Auch das dimere Uracil (13b) gibt beim Lösen in verdünnter NaOH ein Di-Natriumsalz, das beim Erwärmen in 0.5 N NaOH auf 50 °C die Diureido-Verbindung (23) bildet; (23) läßt sich durch Erwärmen mit verdünnter Säure wieder in (13b) überführen^[21e, 30b].

Die Umwandlungen (13a) → (19a) → (13a) und (13b) → (23) → (13b) schließen die Möglichkeit einer durchaus diskutierbaren *trans*-Verknüpfung der heterocyclischen Ringe



[z.B. (27)] eindeutig aus. Ein derartig gespanntes Ringsystem könnte zwar bei der photochemischen Dimerisierung^[45], nicht dagegen bei Säurezugabe aus (19a) oder (23) gebildet werden.

Beim Erwärmen mit 10 N NaOH auf 50 °C gehen (23) sowie (13b) in ein komplexes Substanzgemisch über, das u.a. die Diamino-dicarbonsäuren (24) und (25) enthält^[46]. Beim Umsetzen mit Kaliumcyanat liefert dieses neben wenig Dimerem (13b) vermutlich die Verbindung (26), die durch längeres Kochen mit konzentrierter HCl u.a. in (13b) umgewandelt werden kann^[21e]. Bei der Methylierung von (13b) mit Dimethylsulfat erhielten wir neben dem Dimethyl-Dimeren (13e)^[30b] etwas trimethyliiertes dimeres

[45] Siehe dazu die von E. J. Corey, J. D. Bass, R. LeMahieu u. R. B. Mitra, J. Amer. chem. Soc. 86, 5570 (1964), beobachtete Bildung eines *trans*-verknüpften Cyclobutan-Ringes bei der UV-Bestrahlung eines Gemisches von 2-Cyclohexenon und Isobutylen.

[46] Die Bildung von (25) und (26) sowie die Überführung von (26) in (13b) setzen die Isomerisierung einer COOH-Gruppe am Cyclobutan-Ring voraus. Derartige Isomerisierungen beschrieben E. R. Buchman, A. O. Reims, T. Skei u. M. J. Schlatter, J. Amer. chem. Soc. 64, 2696 (1942).

Uracil^[21e]. Auch mit Diazomethan gelang es uns nicht, das gesuchte tetramethyierte Dimeren zu erhalten.

2.2.3. Totalsynthese der dimeren Uracile^[21h, 40]

Alle vier dimeren Uracile konnten von uns durch sterisch übersichtliche Synthesen dargestellt werden. Das Dianhydrid (28) geht beim Sieden in Methanol in das Gemisch der beiden isomeren Halbester (29a)/

(30a) über, das durch fraktionierende Kristallisation getrennt werden kann. Die Struktur von (30a) wurde durch Ozonolyse des α -Truxilsäureesters (33) bewiesen. (29a) und (30a) werden über die Säurechloride (29b) bzw. (30b) in die Azide (29c) bzw. (30c) überführt, deren Curtius-Abbau die Isocyanate (31a) bzw. (32a) liefert. Die Umsetzung von (31a) und (32a) mit NH_3 ergibt die Diureido-Verbindungen (31b) bzw. (32b), die beim Behandeln mit Säure in die dimeren Uracile (15b) bzw. (14b) übergehen. Mit Methylamin setzen sich (31a) und (32a) zu (31c) bzw. (32c) um, deren Ringschluß die methylierten Dimeren (14e) bzw. (15e) ergibt.

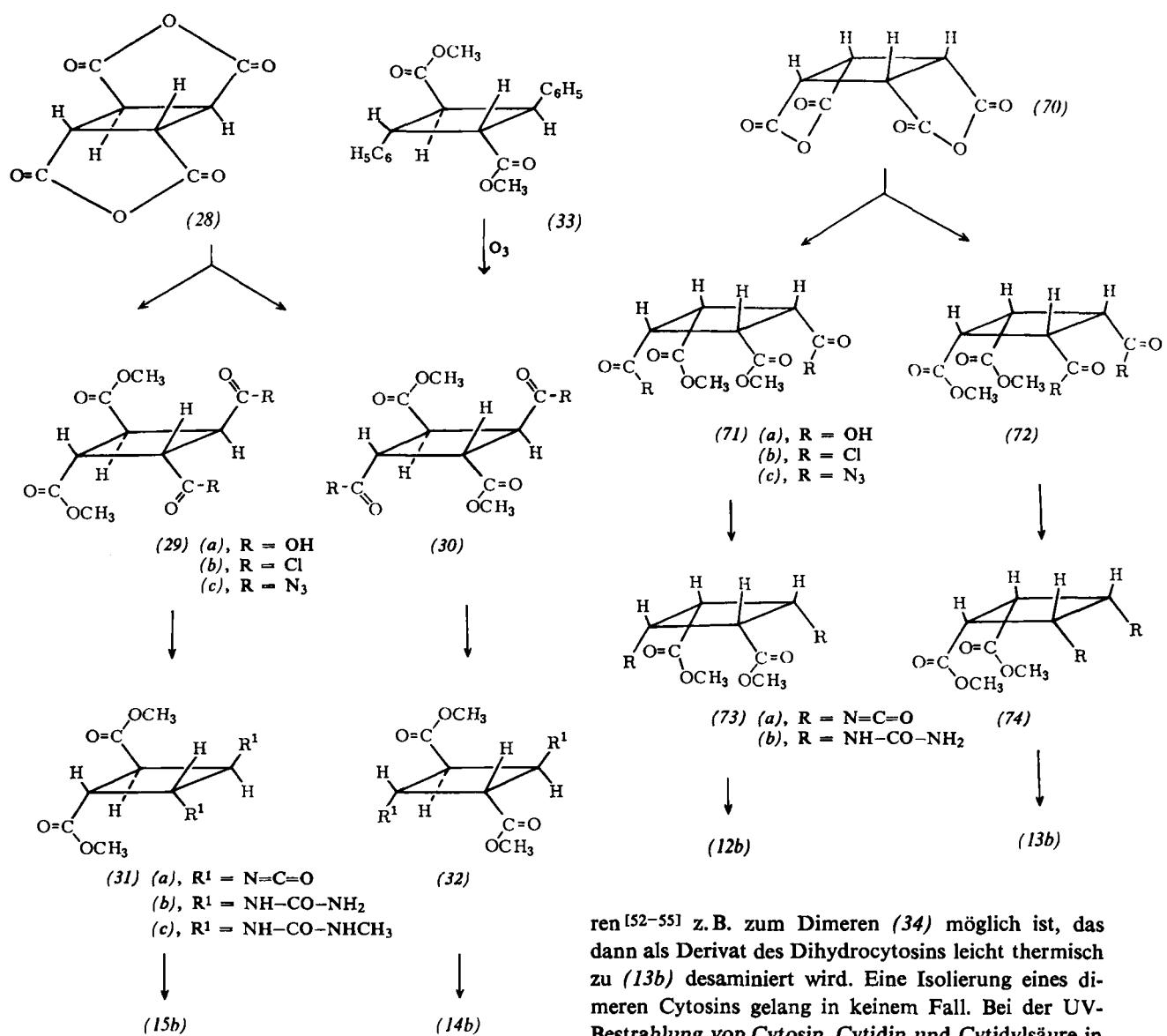
Die Synthese der *cis*-dimeren Uracile (12b) und (13b) gelang auf analogem Wege. Das Dianhydrid (70) er-

[47] a) R. B. Setlow, Biochim. biophysica Acta 49, 237 (1961) sowie [2a, 2b]; b) H. E. Johns, S. A. Rapaport u. M. Delbrück, J. molecular Biol. 4, 104 (1962).

[48] K. C. Smith, Photochem. and Photobiol. 2, 503 (1963).

[49] H. L. Günther u. W. H. Prusoff, Biochim. biophysica Acta 149, 361 (1967).

[50] H. Ishihara, Photochem. and Photobiol. 2, 455 (1963).



Schema 2.

gibt beim Sieden in Methanol das Gemisch der Halbester (71a) und (72a), die über die Reaktionsschritte (71a) \rightarrow (71b) \rightarrow (71c) \rightarrow (73a) \rightarrow (73b) bzw. (72a) \rightarrow (72b) \rightarrow (72c) \rightarrow (74a) \rightarrow (74b) in die *cis*-dimeren Uracile (12b) bzw. (13b) überführt wurden^[*]. Das so erhaltene *cis/anti*-dimere Uracil (12b) ist mit dem von uns bei der UV-Bestrahlung von Uridin erhaltenen Dimeren identisch^[21e, 39] (s. Abschnitt 2.2.1) und bestätigt damit dessen Struktur.

2.2.4. Dimere Cytosine und Mischdimere

Die Frage, ob Cytosin als Base oder als Bestandteil von Nucleinsäuren zur Dimerisierung befähigt ist und welche der vier möglichen Dimeren entstehen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die experimentellen Befunde sprechen dafür, daß eine Dimerisierung in Dinucleotiden^[12, 51, 105] und Nucleinsäur-

[*] Ergänzung bei der Korrektur.

[51] P. V. Hariharan u. H. E. Johns, Canad. J. Biochem. 46, 911 (1968).

ren^[52–55] z. B. zum Dimeren (34) möglich ist, das dann als Derivat des Dihydrocytosins leicht thermisch zu (13b) desaminiert wird. Eine Isolierung eines dimeren Cytosins gelang in keinem Fall. Bei der UV-Bestrahlung von Cytosin, Cytidin und Cytidylsäure in der Eismatrix bildet sich entweder gar kein dimeres Uracil-Derivat^[21f, 14, 50] oder nur so wenig^[48, 49], daß in diesen Fällen auch eine unmittelbare photochemische Desaminierung mit anschließender Dimerisierung in Betracht gezogen werden muß^[15].

Bestrahlt man Thymin/Uracil-Gemische in der Eismatrix mit UV-Strahlung, so erhält man neben demeren Thymin (13a) und dimerem Uracil (13b) ein Uracil/Thymin-Mischdimeres^[21f, 27c, 48, 56–58]. Es ist mit dem bei der Bestrahlung von DNA erhaltenen Mischdimeren identisch^[59], das vermutlich durch Des-

[52] a) R. B. Setlow u. W. L. Carrier, Nature (London) 213, 906 (1967); b) J. K. Setlow, M. E. Boling u. F. J. Bollum, Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, 1430 (1965).

[53] H. Dellweg u. A. Wacker, Z. Naturforsch. 17b, 827 (1962).

[54] V. Merriam u. M. P. Gordon, Photochem. and Photobiol. 6, 309 (1967).

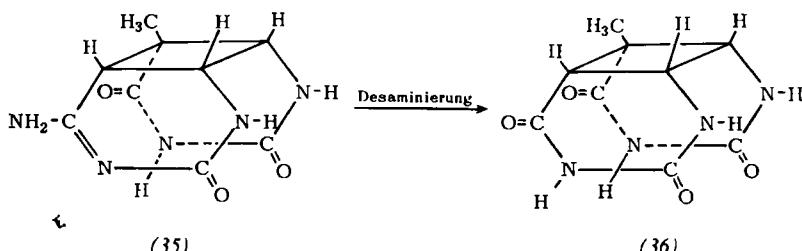
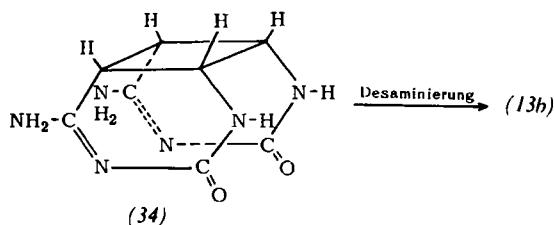
[55] R. B. Setlow u. W. L. Carrier, J. molecular Biol. 17, 237 (1966).

[56] K. C. Smith, Biochem. biophysic. Res. Commun. 25, 426 (1966).

[57] A. Wacker, D. Weinblum, L. Träger u. Z. H. Moustafa, J. molecular Biol. 3, 790 (1961).

[58] K. C. Smith [48] beschrieb die Bildung von zwei Mischdimeren.

[59] D. Weinblum, Biochem. biophysic. Res. Commun. 27, 384 (1967).



aminierung eines Cytosin/Thymin-Mischdimeren entsteht [52, 55, 59–64, 105]. Weinblum [59] diskutiert für das Uracil/Thymin-Mischdimere die Struktur (36), so daß dem Cytosin/Thymin-Mischdimeren die Struktur (35) zukommen muß. Bei der UV-Bestrahlung eines Gemisches von Uridin und Thymidin in der Eismatrix erhielten wir neben den dimeren Uridinen und Thymidinen mehrere Thymidin/Uridin-Mischdimere, die bei der Hydrolyse neben (36) drei weitere Thymin/Uracil-Mischdimere ergaben [21f, 21g].

2.3. Andere photochemische Reaktionen [65]

Von mehreren Autoren sind Hinweise erbracht worden, daß neben der photochemischen Wasseraddition an die 5,6-Doppelbindung und der Bildung von Dimeren bei der UV-Bestrahlung von Nucleinsäuren noch andere photochemische Reaktionen ablaufen. So werden bei der Bestrahlung von DNA, Dinucleotiden und Thymin in der Eismatrix Photoprodukte mit einem spezifischen Absorptionsmaximum um 320 nm gebildet [48, 66–70]. Wang und Varghese [67, 68] diskutier-

[60] A. Wacker, H. Dellweg u. E. Lodemann, Angew. Chem. 73, 64 (1961).

[61] G. M. Blackburn u. R. J. Davies, J. Amer. chem. Soc. 89, 5941 (1967).

[62] G. L. Whitson, A. A. Francis u. W. L. Carrier, Biochim. biophysica Acta 161, 285 (1968).

[63] A. J. Varghese u. S. Y. Wang, Science (Washington) 156, 955 (1967).

[64] K. C. Smith, B. Hodgkins u. M. E. O'Leary, Biochim. biophysica Acta 114, 1 (1966).

[65] Purine sind gegenüber UV-Strahlung wesentlich beständiger als Pyrimidine. Spezifische Reaktionen wurden nicht gefunden; siehe dazu die Lit.-Zitate bei J. S. Connolly u. H. Linschitz, Photochem. and Photobiol. 7, 791 (1968).

[66] M. L. Pearson, F. P. Ottensmeyer u. H. E. Johns, Photochem. and Photobiol. 4, 739 (1965).

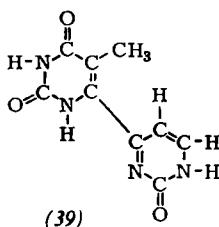
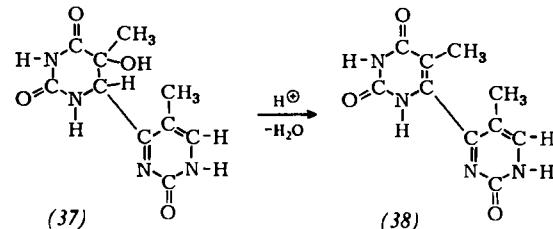
[67] A. J. Varghese u. S. Y. Wang, Science (Washington) 160, 186 (1968).

[68] S. Y. Wang u. A. J. Varghese, Biochem. biophysic. Res. Commun. 29, 543 (1967).

[69] A. Haug, Photochem. and Photobiol. 3, 207 (1964).

[70] H. E. Johns, M. L. Pearson, C. W. Helleiner u. D. M. Logan, Symp. Fundamental Cancer Res. 18, 29 (1964); Chem. Abstr. 63, 3213 (1965).

ten für das bei der UV-Bestrahlung von Thymin in der Eismatrix erhaltene Produkt ($\lambda_{\max} = 316$ nm) die Struktur (37) [71]. Beim Erwärmen mit Säure geht (37) in (38) über. Ein ähnliches Produkt der Struktur (39) wurde von ihnen [68] bei der Hydrolyse von UV-bestrahlter DNA nachgewiesen. Der Uracil-Rest der Substanz stammt vermutlich aus dem Cytosin-Teil der DNA [68].



Ein zu (38) analoges Produkt des Uracils haben wir möglicherweise bei der Dimerisierung von Uridin in der Eismatrix erhalten [21e, 76]. Bei der UV-Bestrahlung von Thymin wurde die Bildung von Dihydrothymin [73] und die Oxidation der CH₃-Gruppe [74, 75] beobachtet.

[71] Siehe [72].

[72] H. E. Johns, M. L. Pearson, J. C. LeBlanc u. C. W. Helleiner, J. molecular Biol. 9, 503 (1964).

[73] T. Yamane, B. J. Wyluda u. R. G. Shulman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 439 (1967).

[74] R. Alcántara u. S. Y. Wang, Photochem. and Photobiol. 4, 473 (1965).

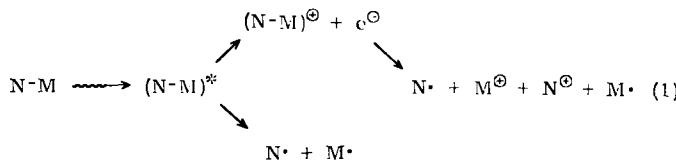
[75] S. Y. Wang u. R. Alcántara, Photochem. and Photobiol. 4, 477 (1965).

[76] Die Möglichkeit der Bildung von Dimeren ohne Cyclobutan-Ring diskutieren auch P. V. Hariharan u. H. E. Johns, Photochem. and Photobiol. 8, 11 (1968).

3. Einwirkung ionisierender Strahlung auf Nucleinsäuren und deren Bestandteile^[77]

Im Gegensatz zu Prozessen, die durch UV-Strahlung ausgelöst und durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung selektiv beeinflußt werden, verlaufen die durch ionisierende Strahlung verursachten Vorgänge wesentlich komplexer. Es müssen mehrere Reaktionsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden:

Die unmittelbare Wechselwirkung der Strahlung mit der Nucleinsäure ($N-M$). Sie führt zur Positivierung des Nucleinsäure-Stranges an der „getroffenen“ oder einer benachbarten Stelle und zur Bildung von Radikalen [Gl. (1)].



kalen [Gl. (1)]. Die Natur und das chemische Verhalten der Reaktionsprodukte $(N-M)^{\oplus}$, N^{\bullet} , M^{\bullet} , N^{\ominus} , M^{\oplus} hängen von der Stelle ab, an der die Nucleinsäure „getroffen“ worden ist, d.h. das Makromolekül der Nucleinsäure kann eine Vielzahl sehr verschiedener Spezies $(N-M)^{\oplus}$, N^{\bullet} , M^{\bullet} , N^{\ominus} , M^{\oplus} liefern. Die in Freiheit gesetzten Elektronen, die nun wiederum die Nucleinsäure angreifen können, komplizieren das Reaktionsgeschehen weiter.

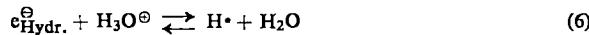
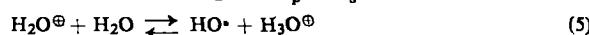
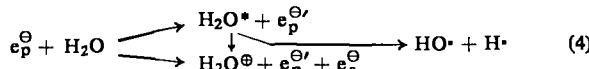
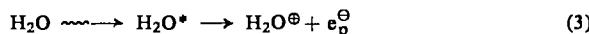
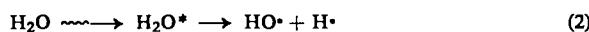
Die Wechselwirkung zwischen der Strahlung und anderen Zellbestandteilen. Entsprechend Gleichung (1) entstehen radikalische sowie ionische Teilchen, die ihrerseits die Nucleinsäure angreifen können.

Die Wechselwirkung zwischen der Strahlung und dem Wasser. Sie führt in geringem Ausmaß direkt zu HO- und H-Radikalen^[78], überwiegend zu H_2O^{\ominus} und Elektronen [Gleichungen (2) und (3)]. Die Elektronen können nun mit Wasser weitere H_2O^{\ominus} -Teilchen bilden, wobei sie in Elektronen geringerer Energie(e_p^{\ominus}) übergehen und weiter Elektronen (e_s^{\ominus}) freisetzen. Die Wechselwirkung zwischen der ionisierenden Strahlung und dem Wasser löst so eine Lawine von H_2O^{\ominus} -Teilchen und Elektronen verschiedener Energie aus. Die Reaktionsfolge kommt zum Stehen, wenn die Energie der Elektronen unter etwa 30 eV gesunken ist. Die Elektronen werden dann „eingefangen“ und als thermische Elektronen durch Hydratisierung stabilisiert (e_{hydr}^{\ominus}). Ihre Energie verlieren sie u.a. durch Bildung von H-Radikalen [Gl. (6)^[79]].

[77] a) Siehe J. J. Weiss in J. N. Davidson u. W. E. Cohn: Progress in Nucleic Acid Research. Academic Press, New York 1964, Bd. 3; b) Die Bestrahlung von Nucleinsäuren sowie deren Bestandteile im trockenen Zustand oder in der Eismatrix bei tiefer Temperatur und die ESR-spektroskopische Untersuchung der Bestrahlungsprodukte wurden hier nicht diskutiert, siehe dazu A. Müller: Progress in Biophysics and Molecular Biology, Pergamon Press, Oxford 1967, Bd. 17, S. 99; A. D. Lenherr u. M. G. Ormerod, Biochim. biophysica Acta 166, 298 (1968); W. Bernhard u. W. Snipes, Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 1038 (1968); J. chem. Physics 46, 2848 (1967).

[78] Siehe dazu E. J. Hart, Science (Washington) 146, 19 (1964); D. C. Walker, Quart. Rev. (chem. Soc., London) 21, 79 (1967).

[79] Vereinfachte Darstellung; Übersicht über Primärprozesse und Hinweise auf weitere Literatur siehe H. Heusinger, Chimia 22, 277 (1968).



Enthalten die bestrahlten Systeme Sauerstoff, so verlaufen zusätzlich die in Gleichung (7) bis (9) formulierten Reaktionen.



Insgesamt ergeben sich für die bei der Bestrahlung von Nucleinsäuren mit ionisierender Strahlung ablaufenden Prozesse folgende Möglichkeiten:

Der entsprechend Gl. (1) unspezifische, chemisch wegen seiner vielfältigen Möglichkeiten schwer zu erfassende „Treffer“ direkt an der Nucleinsäure.

Reaktionen der Nucleinsäure mit den aus Wasser entstehenden Teilchen H^{\bullet} , HO^{\bullet} , H_2O^{\ominus} , e_p^{\ominus} sowie mit aus anderen Zellbestandteilen entsprechend Gl. (1) erhaltenen reaktiven Partikeln.

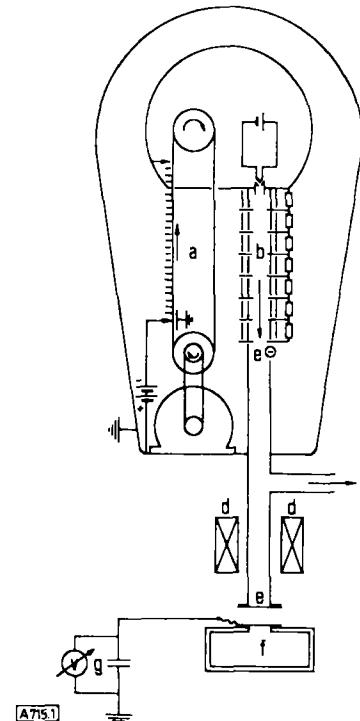
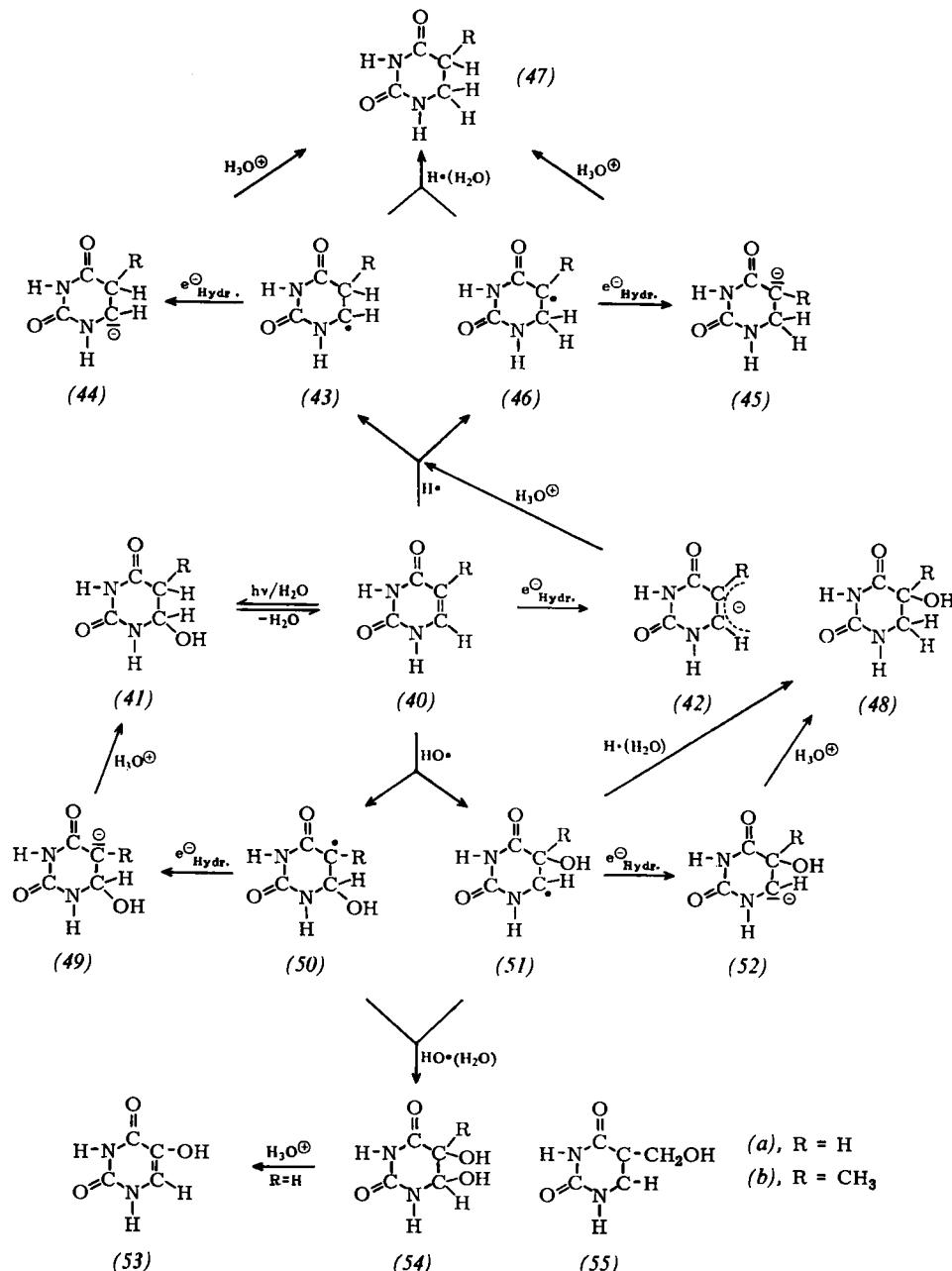


Abb. 1. Schematische Zeichnung der Bestrahlungsanlage (Physikalisches Institut der Universität Würzburg). Zeichnung nicht maßstabsgerecht.
a: Bandgenerator, b: Beschleunigungsrohr, c: Vakuumpumpen, d: Magnetische Strahlführungselemente, e: Austrittsfenster, f: Kuvette, g: Stromintegriator.

Die Einwirkung ionisierender Strahlung auf wässrige Nucleinsäurelösungen führt demnach zu einer Vielzahl von Reaktionen, die zudem noch von weiteren Faktoren wie Art der Strahlung, Strahlendosis und deren zeitlicher Verteilung, Konzentration und pH-Wert der Lösung abhängen und die bei der Bestrahlung von Zellen und größeren biologischen Objekten zunehmend komplizierter werden. Wir haben uns vor allem



Schema 3. Reaktionen bei der Bestrahlung von Uracil und Thymin [96] mit ionisierender Strahlung in entgaster wässriger Lösung [82].

mit den chemischen Vorgängen befaßt, die bei der Bestrahlung von Nucleinsäurebestandteilen in wässriger Lösung ablaufen [2c, 80]. Die Untersuchungen anderer Autoren hatten gezeigt, daß große Strahlendosen (über 10^6 rad) nötig sind, um mg-Mengen an Bestrahlungsprodukten zu erhalten. ^{60}Co -Quellen und Röntgenröhren liefern in der Regel jedoch kaum mehr als 1000 rad/min. Um die für die Strukturuntersuchungen benötigten Substanzmengen zu erhalten, sind also lange Bestrahlungszeiten nötig. Das hat zur Folge, daß die thermisch instabilen Bestrahlungsprodukte bereits während der Bestrahlung zerfallen und nicht isoliert werden können. Die bei der Bestrahlung in wässrigen Systemen nach den Gleichungen (4)–(6) ablauenden Vorgänge können auch unter Umgehung der Prozesse (2) und (3) durch direktes Einschießen von

Elektronen in das wässrige System [Primärvorgang entsprechend Gl. (4)] ausgelöst werden [81].

Wir haben deshalb die Bestrahlungen auf folgendem Wege ausgeführt (s. Abb. 1) [80]: Die Elektronen werden in einem Beschleunigungsrohr mit der Spannung eines Bandgenerators (ca. 1 MV) beschleunigt und in einem System von magnetischen Linsen fokussiert. Am Ende des Systems treten sie durch ein Al-Fenster (ca. 0.33 mm stark) in die Luft aus (Energie der Elektronen nach dem Austritt ca. 800 keV; Durchmesser des Strahls ca. 1–2 mm). Einige Zentimeter hinter dem Austrittsfenster befindet sich die Bestrahlungsküvette aus Gerätglas ($3.5 \cdot 4.5 \cdot 10$ cm), in deren Breitseite ein 0.02 mm dicker Al-Fenster (Durchmesser 2.8 cm) eingesetzt ist, das als Sammelelektrode für die eingeschossene Ladung dient. Das Fenster ist mit einem elektronischen Stromintegrator verbunden, mit dem die Zahl der eingeschossenen Elektronen bestimmt werden kann. In der Regel verwenden wir Dosisleistungen von 8000 bis 9000 rad/s (Bestrahlungszeiten von ca. 1 bis 3 min). Die Lösungen

[80] a) B. Lösche, Diplomarbeit, Universität Würzburg 1966; b) G. Roos, Diplomarbeit, Universität Würzburg 1967; c) E. Fahr, W. Rohlfing u. B. Leitermeier, unveröffentlichte Versuche.

[81] Feinere Unterschiede der Wirkung können sich aus den Unterschieden in der Spektralverteilung der Elektronen bei Elektronen-, Röntgen- und γ -Strahlung ergeben. Wie die Durch-Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin

wurden während der Bestrahlung intensiv magnetisch gerührt und nach der Bestrahlung sofort eingefroren. Die Trennung der Bestrahlungslösungen erfolgte dünnenschicht-, papier- oder säulenchromatographisch; die Identifizierung der Bestrahlungsprodukte wurde in der Regel IR- und UV-spektroskopisch, z.T. auch NMR- und massenspektroskopisch ausgeführt.

3.1. Uracil, Thymin und Cytosin

Bei der Bestrahlung wässriger Lösungen von Uracil, Thymin und Cytosin in Abwesenheit von Sauerstoff bilden sich die in Schema 3 und 4 angegebenen Produkte, die vor allem durch den Angriff von H- und/oder HO-Radikalen sowie von $e_{\text{hydr}}^{\ominus}$ an der 5,6-Doppelbindung des Pyrimidin-Systems entstehen^[16, 80, 83-90].

Da die Bildung der reaktiven Teilchen und die Reaktivität der eingesetzten Pyrimidine gegenüber den Radikalen und dem $e_{\text{hydr}}^{\ominus}$ vom pH-Wert der Lösung abhängig sind, werden auch die in Schema 3 und 4 angegebenen Reaktionsabläufe zum Teil stark vom pH-Wert beeinflusst^[91]. Theoretisch lassen sich diese Reaktionen sowohl durch den Angriff von H- oder HO-Radikalen als auch unter Beteiligung von $e_{\text{hydr}}^{\ominus}$ formulieren. Da bis jetzt noch keine systematischen Untersuchungen vorliegen, die in allen Fällen eine Unterscheidung zwischen den beiden Möglichkeiten erlauben, haben wir für das Uracil und Thymin beide Möglichkeiten, für Cytosin der Übersichtlichkeit wegen nur die Reaktion über Radikale formuliert.

Bei der Bestrahlung von Uracil entstehen durch formale Addition von zwei H-Radikalen Dihydrouracil (47a)^[92], von zwei HO-Radikalen die instabilen Uracilglykole (54a), die leicht in Isobarbitursäure

rechnung der Elektronenspektren durch D. Harder, Intern. atomic Energy Agency, Wien Techn. Rep. Ser. 58, 140 (1966), zeigte, sind die Unterschiede zwischen der Bestrahlung mit Elektronen von 1 MeV Anfangsenergie und der mit $^{60}\text{Co}-\gamma$ -Strahlung sehr gering. Dagegen ergibt das Elektronen-Spektrum für Röntgenstrahlung mit 100 und 200 kV Röhrenspannung deutlich Abweichungen.

[82] In Schema 3 und 4 sind die wichtigsten bei der Bestrahlung entstehenden Substanzen angegeben; weitere Bestrahlungsprodukte siehe R. Pleticha-Lansky u. J. J. Weiss, Analyt. Biochem. 16, 510 (1966); K. C. Smith u. J. E. Hays, Radiat. Res. 33, 129 (1968).

[83] G. Scholes u. R. L. Willson, Trans. Faraday Soc. 63, 2983 (1967).

[84] M. N. Khattak u. J. H. Green, Int. J. Radiat. Biol. 11, 131 (1966); Chem. Abstr. 65, 20476 (1966); ibid. 11, 137 (1966); Chem. Abstr. 65, 20476 (1966); ibid. 11, 577 (1966); Chem. Abstr. 67, 50837 (1967).

[85] C. Nofre u. A. Cier, Bull. Soc. chim. France 1966, 1326.

[86] B. Ekert, Nature (London) 194, 278 (1962).

[87] B. Ekert u. R. Monier, Nature (London) 188, 309 (1960).

[88] G. Scholes u. J. Weiss, Nature (London) 185, 305 (1960).

[89] N. P. Krushinskaya, Radiobiologiya 5, 645 (1965); Chem. Abstr. 64, 3939 (1966).

[90] S. Apelgot, B. Ekert u. A. Bouyat, J. Chim. physique Physicochim. biol. 60, 505 (1963).

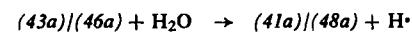
[91] Siehe dazu C. L. Greenstock, M. Ng u. J. W. Hunt, Advances Chem. Ser. 1968, Nr. 81, 397; D. Heitkamp u. O. Merwitz, Z. Naturforsch. 23b, 579 (1968).

[92] Bei der Bestrahlung von Dihydrouracil in wässriger Lösung mit $^{60}\text{Co}-\gamma$ -Strahlung in Gegenwart von Luft wurde die Bildung von Uracil sowie der Uracil-Bestrahlungsprodukte (41a), (48a), (53) und (54a) beobachtet, siehe G. Vincendon, A. Cier u. C. Nofre, Bull. Soc. chim. France 1965, 1997; W. Snipes u. W. Bernhard, Radiat. Res. 33, 162 (1968).

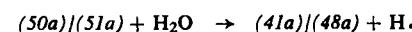
[93] Analoges gilt für die entsprechenden Verbindungen des Thymins und Cytosins.

(53) übergehen, und durch H- und HO-Addition 5- bzw. 6-Hydroxy-dihydrouracil (48a) bzw. (41a).

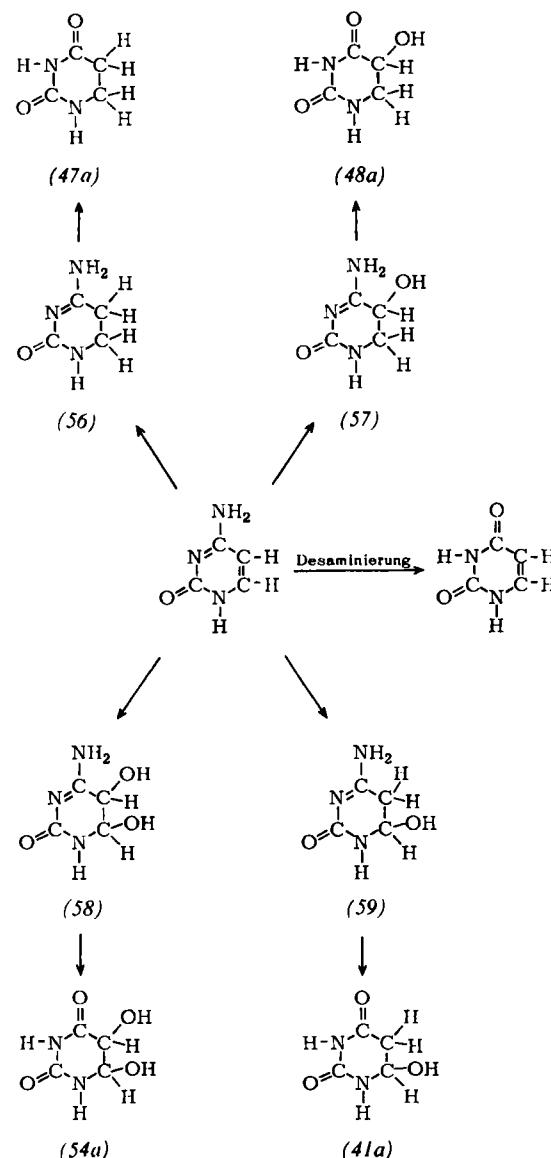
Der Mechanismus der Bildung der Hydroxyverbindungen (48a) und (41a)^[93] ist ungeklärt. Eine gleichzeitige Addition von H[•] und HO[•] erscheint uns wenig wahrscheinlich. Gegen eine sukzessive Addition der beiden Radikale spricht ihre geringe Lebensdauer. Eine Umsetzung entsprechend



und



dürfte wegen der Resonanzstabilisierung der Radikale (43a)/(46a) und (50a)/(51a) kaum möglich sein. Am wahrscheinlichsten erscheint uns die Umsetzung von



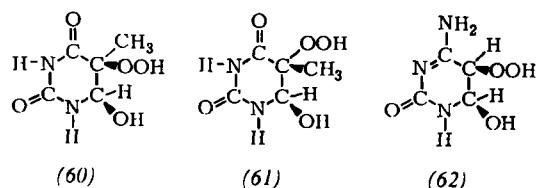
Schema 4. Reaktionen bei der Bestrahlung von Cytosin [96] mit ionisierender Strahlung in entgaster wässriger Lösung [82].

(50a) bzw. (51a) mit $e_{\text{hydr}}^{\ominus}$ zu den Anionen (49a) bzw. (52a), die dann zu (41a) bzw. (48a) protoniert werden.

Analog verlaufen die Umsetzungen beim Thymin. Hier lassen sich die stabilen *cis*- und *trans*-Thymin-glykole (54b) nachweisen. Bei sehr hohem pH-Wert überwiegt die Bildung von (55), vermutlich weil das resonanzstabilisierte System des bei diesem pH-Wert vorliegenden Thymin-Dianions dem Angriff an der 5,6-C=C-Bindung ausweicht [94].

Beim Cytosin führt die Addition von H- und/oder HO-Radikalen zu Derivaten des instabilen 5,6-Dihydrocytosin-Systems (56)–(59), die unter Desamidierung in die entsprechenden Dihydrouracil-Derivate (41a), (47a), (48a) und (54a) übergehen.

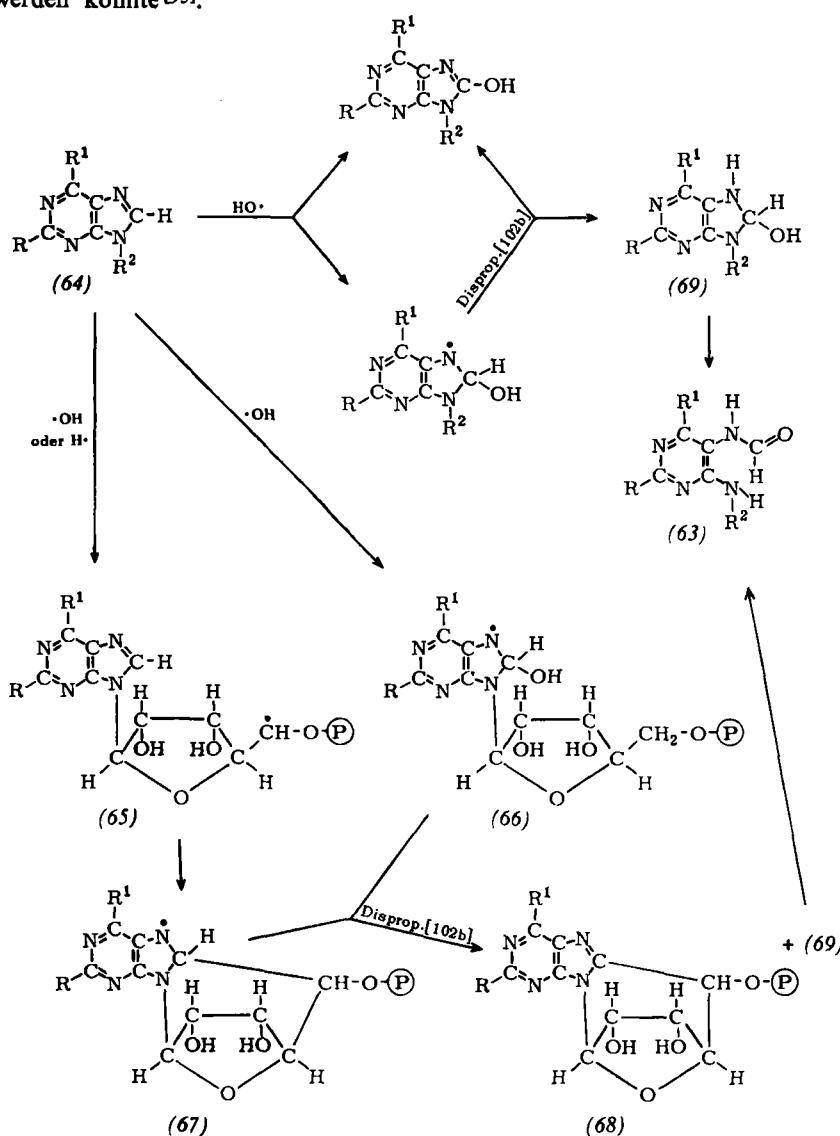
Wird in Gegenwart von Sauerstoff bestrahlt, so entstehen Peroxide [86–90,95]. Beim Thymid wurden die Peroxide (60) und (61) erhalten, deren Struktur durch unabhängige Synthese bewiesen werden konnte [95].



In analoger Weise liefert Cytosin das Peroxid (62), das in Cytosin- und Uracilglykole zerfällt [87].

3.2. Purine

Purine sind gegen ionisierende Strahlung beständiger als Pyrimidine [98a,99]. Der Angriff der Radikale er-



(a), R = H, R¹ = NH₂, R² = Ribosyl(Desoxyribosyl) oder Ribosyl(Desoxyribosyl)phosphat; (b), R = NH₂, R¹ = OH, R² = Ribosyl(Desoxyribosyl) oder Ribosyl(Desoxyribosyl)phosphat

Schema 5. Reaktionen bei der Bestrahlung von Purin-Nucleotiden mit ionisierender Strahlung in wässriger Lösung.

[94] L. S. Myers jr., J. F. Ward, W. T. Tsukamoto u. D. E. Holmes, Nature (London) 208, 1086 (1965).

[95] B. Ekert u. R. Monier, Nature (London) 184, BA 58 (1959).

[96] Die hier angegebenen Reaktionsabläufe gelten auch für die entsprechenden Nucleoside und Nucleotide [80]; jedoch kommt es hier wie bei den Purin-Nucleosiden und -Nucleotiden auch zur Abspaltung des Zuckers bzw. Zuckerphosphat-Restes [97].

[97] Der Ribose-Rest ist empfindlicher als der Desoxyribose-Rest [94].

[98] a) G. Hems, Nature (London) 186, 710 (1960); b) 181, 1721 (1958).

[99] J. J. Conlay, Nature (London) 197, 555 (1963).

folgt am Imidazolring und verläuft unter Bildung der Triamino-Derivate (63) ($R^2 = H$)^[98,99,101] (s. Schema 5). Weiter wurde auch Desaminierung beobachtet.

Bei der Bestrahlung von Purin-Nucleosiden und -Nucleotiden greifen die Radikale zum Teil am Zuckerrest^[97–100,102b] – wobei die Purinbase in Freiheit gesetzt wird – in der Hauptsache jedoch am Purin-System unter Bildung der Pyrimidin-Derivate (63) an^[98,102b]. (63b) konnte bei der Bestrahlung von DNA nachgewiesen werden. Peroxide wurden auch bei der Bestrahlung in Gegenwart von Sauerstoff nicht gefunden.

Keck und Hagen fanden bei der Bestrahlung von Purin-Nucleotiden^[102], daß durch primären Angriff von H- oder HO-Radikalen am C-5'- oder C-8'-Atom die Radikale (65), (66) und (67) entstehen. (66) und (67) disproportionieren jeweils unter Bildung von (68) und (69); (69) geht in (63) über (s. Schema 5).

4. Diskussion der molekularen Ursachen biologischer Strahlenschäden^[103]

Die in den Abschnitten 2 und 3 geschilderten Befunde wurden an den Basen sowie deren Nucleosiden und Nucleotiden gewonnen. Wir vermuteten, daß sich diese Aussagen nicht unbeschränkt auf Nucleinsäuren übertragen lassen (Abschnitt 2.1). Es ergeben sich damit die folgenden Fragen:

Sind die an den Basen sowie an deren Nucleosiden und Nucleotiden erzielten photochemischen und strahlungsschemischen Erkenntnisse nur für diese gültig oder laufen die Reaktionen auch bei der Bestrahlung der Nucleinsäuren ab?

Kann man diesen photochemischen und strahlungsschemischen Reaktionen bestimmte biologische Schäden zuordnen?

Beide Fragen sind vor allem für die UV-Strahlung eingehend bearbeitet^[104] und z.T. recht eindeutig beantwortet worden. Die Frage nach der Wirkung der

[100] G. Scholes, R. L. Willson u. M. Ebert, Chem. Commun. 1969, 17.

[101] C. A. Ponnamperuma, Dissertation, University of California 1962, zitiert nach [102b].

[102] a) K. Keck u. U. Hagen sowie H. Friebohm, Naturwissenschaften 53, 304 (1966); b) K. Keck, Z. Naturforsch. 23b, 1034 (1968).

[103] Im folgenden verwandte Abkürzungen: Dimere wurden mit einem Bogen [z.B. $\widehat{U}U$] – dimeres Uracil (Angabe ohne Aussage hinsichtlich der räumlichen Struktur des Dimeren)], Wasseradditionsprodukte mit * (z.B. C*) gekennzeichnet; Poly-U = Poly-Uridylsäure, Poly-C = Poly-Cytidylsäure; UpU = Uridyl-(3'-5')-uridin, TpT = Thymidyl-(3'-5')-thymidin, CpC = Cytidyl-(3'-5')-cytidin; ATP, GTP = Adenosin- bzw. Guanosin-triphosphat.

[104] Siehe dazu auch [2, 134] und a) E. M. Witkin, Science (Washington) 152, 1345 (1966); b) K. C. Smith, Proc. 3. Intern. Congr. Radiat. Res. Cortina d'Ampezzo, S. 756 (1966); c) K. C. Smith, Radiat. Res. Suppl. 6, 54 (1966); d) S. Y. Wang, Federat. Proc. 24, S-71 (1965); e) R. B. Setlow, Science (Washington) 153, 379 (1966); f) D. Shugar, Israel J. med. Sci. 1, 1347 (1965); g) W. Szybalski, J. Arkansas med. Soc. 62, 488 (1966).

ionisierenden Strahlung ist dagegen weitgehend unklärt.

Der Nachweis, daß einzelne Basen bei der UV-Bestrahlung von DNA^[105] in vitro und vivo dimerisieren, wurde bereits unmittelbar nach der Entdeckung der Dimerisierung in der Eismatrix erbracht. So konnten Wacker, Dellweg und Weinblum^[107] sowie andere Autoren^[53, 108, 109] nachweisen, daß eine Substanz im DNA-Hydrolysat UV-bestrahlter Bakterien die gleichen chromatographischen Eigenschaften wie dimeres Thymin hat.

Es wurde auch ein Mischdimeres $\widehat{U}T$, das durch Desaminierung von $\widehat{C}T$ entstehen soll, bei der Bestrahlung von Bakterien nachgewiesen^[60, 61].

Die Dimerisierung zum *cis/syn*-Dimeren (13a), die zwischen zwei benachbarten Basen des gleichen Einzelstranges erfolgt, verursacht eine Hemmung der DNA-Reduplikation^[111] und verändert das Verhalten der Nucleinsäure bei der enzymatischen Hydrolyse. Dabei entstehen enzymatisch nicht weiter zu spaltende, das Dimere enthaltende Oligonucleotide^[111–113, 123a], deren Art von der Basenzusammensetzung der DNA, der Wellenlänge und der Dosis der verwendeten Strahlung abhängig ist.

Die Bildung von Dimeren in der DNA erlaubt eine Deutung der bekannten Reaktivierungen UV-geschädigter Mikroorganismen (Reaktivierung durch kurzwellige UV-Strahlung, enzymatische „Dunkel“-Reaktivierung, Photo-Reaktivierung)^[114].

Bei der Reaktivierung durch Bestrahlen mit kurzwelliger UV-Strahlung (ca. 230 nm) werden die Dimeren in Monomere gespalten^[115]; dementsprechend ist die

[105] Die Vorgänge bei der UV-Bestrahlung von Dinucleotiden wurden von H. E. Johns et al. [12, 72, 51, 66, 76, 106] studiert und mit detaillierten kinetischen Messungen belegt. Sie konnten zeigen, daß TpT [103] zwei Dimere bildet. Beim UpU und CpC erfolgen Wasseraddition (z. B. zu C*pC, CpC* und C*pC*) und Dimerisierung nebeneinander. Die CpC-Dimeren desaminieren zu $\widehat{U}pU$ -Dimeren.

[106] I. H. Brown, K. B. Freeman u. H. E. Johns, J. molecular Biol. 15, 640 (1966).

[107] A. Wacker, H. Dellweg u. D. Weinblum, Naturwissenschaften 47, 477 (1960).

[108] a) D. L. Wulff, J. molecular Biol. 7, 431 (1963); b) E. Ben-Hur u. R. Ben-Ishai, Biochim. biophysica Acta 166, 9 (1968); c) A. Wacker, H. Dellweg u. D. Jacherts, J. molecular Biol. 4, 410 (1962); d) A. J. Varghese u. S. Y. Wang, Nature (London) 213, 909 (1967).

[109] Von E. Ben-Hur u. R. Ben-Ishai [108b] wurde nachgewiesen, daß bei der UV-Bestrahlung von DNA auch etwas *trans/anti*-dimeres Thymin (14a) gebildet wird; siehe G. M. Blackburn u. R. J. H. Davies, Biochem. biophysic. Res. Commun. 22, 704 (1966).

[110] M. Pearson, D. W. Whillans, J. C. LeBlanc u. H. E. Johns, J. molecular Biol. 20, 245 (1966).

[111] P. Howard-Flanders, Idengaku Zasshi, Suppl. 40, 256 (1965); Chem. Abstr. 65, 12536 (1966).

[112] R. B. Setlow, W. L. Carrier u. F. J. Bollum, Biochim. biophysica Acta 91, 446 (1964).

[113] H. Dellweg, Strahlentherapie 135, 504 (1968); Chem. Abstr. 69, 8449 (1968).

[114] Eine Reaktivierung nur durch Temperaturerhöhung beschrieben I. Pietrzykowska u. D. Shugar, Acta biochim. polon. 11, 79 (1964).

[115] R. B. Setlow u. J. K. Setlow, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1250 (1962).

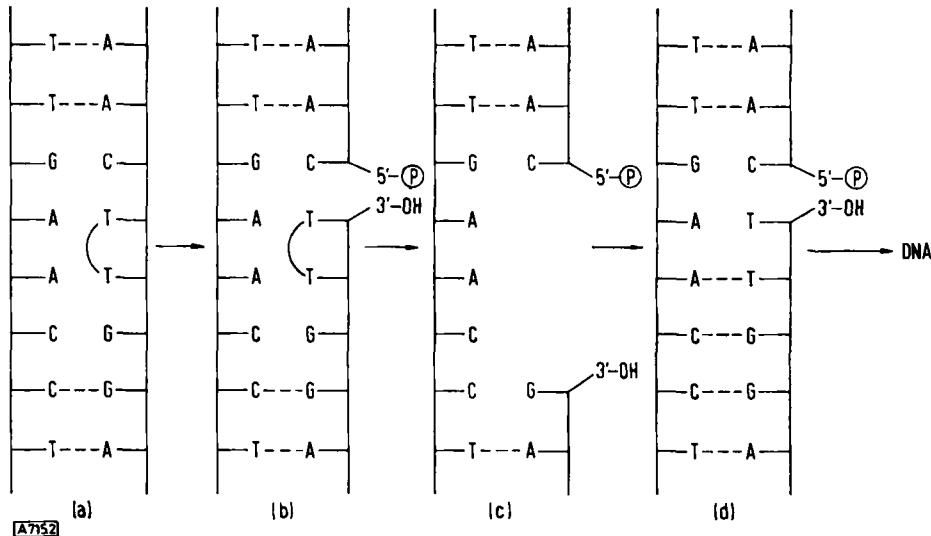


Abb. 2. Schema der enzymatischen Dunkel-Reaktivierung [(a)-(d) s. Text].

Menge an dimerem Thymin, die bei der UV-Bestrahlung in der DNA gebildet wird, von der Wellenlänge der Strahlung abhängig^[116, 132a] (s. Abschnitt 2.2.1).

Die *enzymatische Reaktivierung* (im Gegensatz zur Photo-Reaktivierung auch „Dunkel-Reaktivierung“ genannt) gehört zu den interessantesten Reaktivierungsphänomenen^[117] (Abb. 2).

Durch Angriff eines Enzyms wird eine Phosphatbindung des durch die Dimerisierung geschädigten DNA-Doppelstranges geöffnet [(a) und (b)]. Ein anderes Enzym schneidet das dimere Stück, beginnend an dem dimeren Nucleotid, mit einigen daranhängenden weiteren Nucleotiden aus [(c)]. Durch Resynthese (DNA-Polymerase) mit dem unbeschädigten DNA-Strang als Matrize wird die herausgeschnittene Stelle ersetzt [(d)]. Ein weiteres Enzym (Polynukleotid-Ligase) schließt dann die 3'-5'-Bindung.

Die enzymatische Dunkel-Reaktivierung erklärt auch die zum Teil sehr unterschiedliche Widerstandsfähigkeit von Bakterien gegen UV-Strahlung: Die strahlungsresistenten Bakterien enthalten Enzyme, die nach den obigen oder ähnlichen Mechanismen den durch die UV-Strahlung hervorgerufenen Schaden wieder beheben können.

Bei der *Photo-Reaktivierung* wird der Strahlenschaden durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (350–420 nm) repariert^[118], wobei photoreaktivierende Enzyme als Sensibilisatoren dienen und die photochemische Spaltung des Dimeren in Monomere bewirken^[119].

Ähnliche Reaktivierungen gelingen nach Wacker et al. mit sichtbarem Licht und Uranylacetat oder H₂O₂^[120]. Poly-U lässt sich auch mit H₂O₂ oder Uranylacetat ohne sichtbares Licht^[120b] reaktivieren^[121].

[116] D. L. Wulff, Biophysic. J. 3, 355 (1963).

[117] a) W. L. Carrier u. R. B. Setlow, Biochim. biophysica Acta 129, 318 (1966); b) M. E. Boling u. J. K. Setlow, ibid. 123, 26 (1966); c) R. Elder u. R. F. Beers Jr., Federat. Proc. 23, 373 (1964); d) S. Aoki, R. P. Boyce u. P. Howard-Flanders, Nature (London) 209, 686 (1966); e) P. T. Emmerson u. P. Howard-Flanders, Biochim. biophysic. Res. Commun. 18, 24 (1965).

[118] Siehe A. A. Lamola, J. Amer. chem. Soc. 88, 813 (1966), dort weitere Lit.

[119] Das *cis/syn*-Dimere (13a) wird dabei monomerisiert, nicht dagegen das Dimere (14a) [108b].

Ob und in welchem Ausmaß es zu einer photochemischen Wasseraddition bei der UV-Bestrahlung von Nucleinsäuren kommt, ist nicht sicher entschieden^[122]. Sie scheint nur an nicht-doppelsträngigen Nucleinsäuren vorzukommen^[110, 123], jedoch durch lokales Aufschmelzen des Doppelstranges und durch Dimerisierung (Spaltung des Doppelstranges am Ort der Dimerisierung, anschließende Wasseraddition an benachbarten Cytosin-Molekülen)^[123a] auch bei der DNA in geringem Maße möglich zu sein^[124].

Die mögliche biologische Bedeutung der photochemischen Wasseraddition wurde von Grossman, Ono und Wilson^[125], Ottensmeyer und Whitmore^[126b] sowie Wacker et al.^[126a] studiert.

Die Befunde lassen sich zum Teil dadurch deuten, daß sich 6-Hydroxydihydrouracil (U*) als Bestandteil eines RNA-Codons bei der enzymatischen Protein-

[120] a) A. Wacker u. A. Gerstenberger, Angew. Chem. 75, 916 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 689 (1963); b) A. Wacker u. P. Chandra, Studia biophysica 3, 239 (1967).

[121] Die Spaltung von Dimeren in vitro und vivo mit schnellen Elektronen oder γ -Strahlung wiesen nach: V. Greulich, D. Hartmann u. B. Schmidt, Z. Naturforsch. 23b, 755 (1968); D. Barszcz, Z. Tramer u. D. Shugar, Acta biochim. polon. 10, 9 (1963); B. Schmidt, D. Hartmann, K. Grossgebauer u. W. Schumacher, Nature (London) 199, 504 (1963); Naturwissenschaften 50, 473 (1963); E. R. Lochmann, ibid. 50, 474 (1963); R. A. Deering u. W. Snipes, Biophysic. J. 8, 326 (1968).

[122] Siehe die Diskussion bei a) L. Grossman, Photochem. and Photobiol. 7, 727 (1968); b) G. D. Small, M. Tao u. M. P. Gordon, J. molecular Biol. 38, 75 (1968).

[123] a) M. Pearson u. H. E. Johns, J. molecular Biol. 20, 215 (1966); b) P. V. Hariharan u. H. E. Johns, Photochem. and Photobiol. 7, 239 (1968).

[124] Da bei der Reduplikation der DNA kurzzeitig Einzelstrangstücke auftreten, besteht die Möglichkeit der Wasseraddition in dieser Phase.

[125] a) L. Grossman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 657 (1963); b) J. Ono, R. G. Wilson u. L. Grossman, J. molecular Biol. 11, 600 (1965); c) L. Grossman, J. Ono u. R. Wilson, Symp. Fundamental Cancer Res. 18, 107 (1964); Chem. Abstr. 63, 3221 (1965); Federat. Proc. 24, S-80 (1965).

[126] a) A. Wacker, M. Ishimoto, P. Chandra u. R. Selzer, Z. Naturforsch. 19b, 406 (1964); siehe auch A. Wacker, P. Chandra, P. Mildner u. H. Feller, Biophysik 4, 283 (1968); b) F. P. Ottensmeyer u. G. F. Whitmore, J. molecular Biol. 38, 1 (1968); ibid. 38, 17 (1968); c) Das $\widehat{U}U$ codiert wie das Basenpaar GU sowie unverändertes UU.

synthese in vitro wie Cytosin verhält [126c]. In Übereinstimmung hiermit wurde bei der enzymatischen Poly-Adenylsäure-Synthese mit UV-bestrahlter Poly-U als Matrize der Einbau von GTP außer ATP beobachtet [125b] (s. Abb. 3).

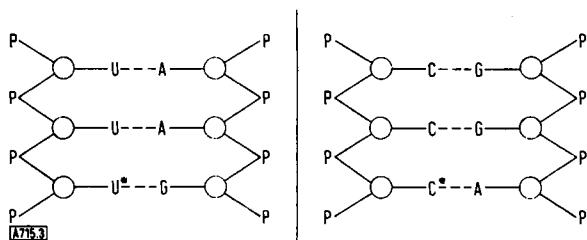


Abb. 3. Schema der Auswirkung der Wasseraddition an Uracil und Cytosin im Nucleinsäure-Doppelstrang.

Analog bewirkt der 6-Hydroxy-dihydrocytosin-Teil (C^*) [125b, 125c] der UV-bestrahlten Poly-Cytidylsäure bei der enzymatischen Poly-Guanylsäure-Synthese den Einbau von ATP; d.h. der C^* -Teil codiert wie Uracil. Daß der Effekt nicht etwa durch eine Überführung von Cytosin in Uracil entsprechend der Reaktionsfolge (4) \rightarrow (6) \rightarrow (3) \rightarrow (1) (s. Abschnitt 2.1) bedingt wird, beweist die Reversibilität der Befunde: Beim Erwärmen auf 37 °C geht die Poly- C^* wieder in eine Poly-C über [127], die nur den Einbau von GTP bewirkt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die eventuell in der DNA gebildeten 6-Hydroxy-dihydrocytosin-Teile bei der Reduplikation der DNA den Einbau von Adenin an Stelle von Guanin in den komplementären Strang auslösen und damit zu „Fehl-Signalen“ beim Ablesen des genetischen Codes führen [128].

Mehrere experimentelle Befunde weisen darauf hin, daß durch die UV-Strahlung an den Nucleinsäuren neben Dimerisierung und Wasseraddition noch andere Effekte ausgelöst werden, deren Natur zur Zeit noch weitgehend unbekannt ist. Beobachtet wurden z.B. das Zerbrechen des Nucleinsäure-Stranges, zwischen- und innermolekulare Hauptvalenz-Verbrückungen zwischen Nucleinsäure-Strängen und Veränderungen der Sekundärstruktur [129]. Während die Brüche eines Stranges im Doppelstrang der DNA vermutlich wie bei der Dunkel-Reaktivierung repariert werden können, sind Brüche des Doppelstranges und Hauptvalenz-Brücken zwischen den Strängen wahrscheinlich irreparabel.

Von K. C. Smith et al. [64, 130] ist die photochemische Addition von Aminosäuren an die Pyrimidin-Teile von Nucleinsäuren untersucht worden. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Deutung der UV-Strahlenschäden auch eine photochemische Verbrückung zwischen Nucleinsäure und Protein berücksichtigt werden muß [131]. Die Bildung von UV-Produkten mit dem charakteristischen Maximum bei ca. 320 nm (s. Abschnitt 2.3) bei der Bestrahlung von Nucleinsäuren wurde verschiedentlich nachgewiesen. Bakteriensporen liefern bei der UV-Bestrahlung nur wenig Dimeren [132a, b]. Hier entstehen Bestrahlungsprodukte unbekannter Struktur, die in ihrem chromatographischen Verhalten denen entsprechen, die bei der UV-Bestrahlung von DNA im getrockneten Zustand oder in der Eismatrix erhalten wurden [132].

Aus allen zur Zeit bekannten chemischen, physikalischen und biologischen Befunden hinsichtlich der molekularen Deutung biologischer UV-Bestrahlungsschäden ergibt sich folgendes Gesamtbild:

Dimerisierung und Wasseraddition spielen in vielen Fällen eine entscheidende Rolle. Ihr Anteil am Schaden ist von der Natur der Nucleinsäure, den Bestrahlungsbedingungen, der Wellenlänge und der Dosis der Strahlung abhängig [133]. Außer diesen beiden Prozessen müssen noch photochemische Kettenbrüche, Hauptvalenz-Verknüpfungen zwischen Nucleinsäure-Strängen, Reaktionen zwischen Nucleinsäuren und Proteinen sowie noch unbekannte Reaktionen der Pyrimidin-Basen in Betracht gezogen werden.

Die Dimerisierung verhindert die DNA-Reduplikation; Wasseraddition (und möglicherweise auch die Dimerisierung [134]) bedingen u.a. die UV-Mutationen. Die Kenntnisse über die molekularen Ursachen der durch ionisierende Strahlung ausgelösten biologischen Schäden sind – verglichen mit denen der UV-Strahlung – noch recht lückenhaft, weil die ionisierende Strahlung verschiedenartige Schäden nebeneinander verursachen kann [135]. Aus den im Abschnitt 3 geschilderten Befunden, nicht publizierten Versuchen [80] und den Erfahrungen bei der UV-Bestrahlung ergeben sich folgende Möglichkeiten [136]:

[131] J. Goddard, D. Streeter, C. Weber u. M. P. Gordon, Photochem. and Photobiol. 5, 213 (1966); ibid. 8, 81 (1968), beobachteten bei der UV-Bestrahlung von Tabak-Mosaik-Viren die Bindung von Proteinuntereinheiten an RNA.

[132] a) J. E. Donnellan jr. u. R. B. Setlow, Science (Washington) 149, 308 (1965); b) K. C. Smith u. H. Yoshikawa, Photochem. and Photobiol. 5, 777 (1966); c) R. S. Stafford u. J. E. Donnellan jr., Proc. nat. Acad. Sci. USA 59, 822 (1968); siehe auch J. W. Longworth, ibid. 59, 829 (1968); d) R. O. Rahn u. J. L. Hosszu, Photochem. and Photobiol. 8, 53 (1968); 7, 637 (1968); e) R. B. Setlow, ibid. 7, 643 (1968).

[133] Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, daß bei kleinen Strahlungsmengen 90%, bei großen Dosen nur ca. 50% des UV-Schadens durch Dimerenbildung verursacht wird.

[134] Siehe dazu E. M. Witkin, Radiat. Res. Suppl. 6, 30 (1966).

[135] Die Polymerisation von Nucleotiden zu Polynucleotiden durch ionisierende Strahlung wurde verschiedentlich beobachtet, z. B. S. Fischer u. A. Ohlbaum, Inter-Amer. Symp. Peaceful Appl. Nucl. Energy 5, 19 (1965); Chem. Abstr. 63, 11967 (1965); A. Aguilera, E. Colombara, R. Jiménez u. J. Tohá, Biochim. biophysica Acta 95, 569 (1965); A. Aguilera, Z. Gampel, M. Pieber u. J. Tohá, Photochem. and Photobiol. 7, 711 (1968).

[136] Siehe dazu W. C. Summers u. W. Szybalski, J. molecular Biol. 26, 227 (1967); A. Rafi, J. J. Weiss u. C. M. Wheeler, Biochim. biophysica Acta 169, 230 (1968); M. Ullrich u. U. Hagen, Z. Naturforsch. 23b, 1176 (1968), sowie [16].

Der unmittelbare „Treffer“ der Strahlung kann zu irreparablen Zerbrechen des Nucleinsäuremoleküls führen.

Das Zerbrechen eines Stranges des DNA-Doppelstranges kann unter Umständen (abhängig von der Natur des Bruches) nach einem der enzymatischen Reaktivierung entsprechenden Mechanismus behoben werden. Die Wasseraddition (über H- und HO-Radikale) an den Cytosin-Teil der DNA führt zu einer Veränderung der Basenpaarung bei der Reduplikation der DNA, was u.a. die durch ionisierende Strahlung ausgelösten Mutationen bedingen könnte.

Die biologische Bedeutung anderer bei der Bestrahlung entstehender Produkte [Peroxide, Dihydrothymin, Dihydouracil, Thyminglykole u.ä. (siehe dazu Schema 3 und 4)] ist weitgehend unbekannt. In Betracht gezogen werden müssen sowohl die Blockierung der Reduplikation der DNA an der veränderten Base als auch die Veränderung des genetischen Codes^[137]. Ob und in welcher Weise die Zelle imstande ist, derartig „modifizierte“ Basen zu erkennen und zu eliminieren, ist völlig offen.

[137] Vgl. dazu [122a].

An unseren Untersuchungen waren die Herren Dr. G. Dörhöfer, Dr. G. Fürst, Dr. H. Gattner, Dr. R. Kleber, B. Lösche, R. Pastille, H. Popp, P. Richter, Dr. W. Rohlfing, G. Roos, Dr. B. Sojka und H. Wieser sowie Frau B. Leitermeier und Fräulein E. Boebinger beteiligt, denen ich auch hier für ihre Mitarbeit danken möchte. Herr Professor M. Scheer, Physikalisches Institut der Universität Würzburg, hat die Ausführung der Bestrahlungen mit ionisierender Strahlung ermöglicht. Wir danken ihm für die großzügige Förderung, den Herren Dr. T. Nowak und Dr. W. Järisch für die Ausführung der Bestrahlungen sowie den Herren Dozent Dr. D. Harder und Dr. A. Przybylski für beratende Hilfe. Zu besonderem Dank sind wir Herrn Professor G. Hartmann, Institut für Biochemie der Universität Würzburg, für vielfältige Hinweise und Anregungen verpflichtet. Die Untersuchungen wurden in großzügiger Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie (Fonds der Chemischen Industrie) unterstützt. Auch an dieser Stelle sei dafür gedankt.

Eingegangen am 27. März 1969 [A 715]

Die En-Reaktion

Von H. M. R. Hoffmann^[*]

Unter „En-Reaktionen“ versteht man die indirekte substituierende Addition einer Verbindung mit Doppelbindung (Enophil) an ein Olefin mit allylischem Wasserstoff (En). Lange Zeit stand die En-Reaktion im Schatten der verwandten Diels-Alder-Addition. In diesem Aufsatz wird gezeigt, daß das Anwendungsbereich der En-Reaktion von industriellen bis zu biosynthetischen Prozessen reicht. Einer Zusammenstellung der präparativen Aspekte folgte eine Diskussion des Reaktionsmechanismus.

1. Einleitung

Obwohl die En-Reaktion zu den einfachsten und vielseitigsten Reaktionen der organischen Chemie gehört, ist sie überraschend wenig bekannt. Einzelne Beispiele wie gewisse Reaktionen von Olefinen mit Formaldehyd (Prins-Reaktion^[1], s. auch Abschnitt 3.4) sowie Beispiele für Retro-En-Reaktionen wie die Decarboxylierung von β -Oxosäuren und die Bildung von Olefinen durch Esterpyrolyse kennt man mindestens seit Anfang des Jahrhunderts; viele andere Beispiele sind aber in der Patentliteratur^[2] oder in schwer

zugänglichen Zeitschriften vergraben. Erst nach einer Veröffentlichung von Alder^[3] im Jahre 1943 begann man sich des Umfangs der En-Reaktion bewußt zu werden. Trotzdem blieb die „En-Synthese“ bis heute „unmodern“ und im Schatten der verwandten Diels-Alder-Addition („Dien-Synthese“). Außerdem sind viele der frühen Ergebnisse nur ungenügend gesichert, weil die heute üblichen analytischen und spektroskopischen Hilfsmittel fehlten.

Die En-Reaktion ist die „indirekte substituierte Addition“^[3] einer Verbindung mit Doppelbindung (Enophil) an ein Olefin mit allylischem Wasserstoff (En); sie umfaßt die Allylwanderung einer Doppelbindung, den Übergang des Allylwasserstoffs zum Enophil und die Bildung einer Bindung zwischen den Termini der beiden ungesättigten Komponenten (Schema 1). For-

[*] Dr. H. M. R. Hoffmann
William Ramsay and Ralph Forster Laboratories,
University College,
Gower Street, London W. C. 1 (England)

[1] H. J. Prins, Chem. Weekblad 16, 1510 (1919); s. auch [83].
[2] Siehe C. P. A. Kappelmeier, J. H. van der Neut u. W. R. van Goor, Kunststoffe 40, 81 (1950); s. auch [3], dort Fußnoten 1 u. 2.

[3] K. Alder, F. Pascher u. A. Schmitz, Ber. dtsch. chem. Ges. 76, 27 (1943).