

Wirkung von Neocarzinostatin auf *E. coli*-Mutanten mit defekter DNA-Reparatur

The Influence of Neocarzinostatin on the Colony Forming Ability of *E. coli* Mutants Deficient in DNA Repair

D. Denklau, R. Stahl und W. Köhnlein

Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster, Hittorfstraße 17, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **44c**, 791–796 (1989); received April 14/May 24, 1989

Neocarzinostatin, DNA Repair, *E. coli*, Hypotonic Buffer, Survival Curves

The colony forming ability of *E. coli* mutants defective in DNA repair was compared to that of the parent strain AB 1157 after neocarzinostatin treatment. A *recA* and a *recB* mutant were most sensitive. The suppression of the *recB* mutation in the *recBC sbcBC* mutant, which is as sensitive as the parent strain, indicates that *recB* is not the primary pathway by which lesions after NCS treatment are repaired. The survival curve of the *recBC recF sbcBC* mutant, corresponding to that of the *recF* mutant, further supports this interpretation. The relative resistance of the *recBC recF sbcBC* mutant suggests that NCS lesions are not only repaired by the *recF* and *recB* pathway. An alternative pathway could be the SOS induction, as a *lexA* mutant also is sensitive to NCS. The sensitivity of the *uvrA* and *polA xthA* mutants, however is explained by the involvement of the *uvrA* and *polA* gene products in *rec* repair.

Einleitung

Das Antitumor-Antibiotikum Neocarzinostatin (NCS) induziert unter aeroben Bedingungen Strangbrüche und Basenabsaltungen in der DNA [1–4]. NCS besteht aus einem sehr reaktionsfähigen Chromophor ($M_r = 659$), der nicht kovalent an ein apo-Protein ($M_r = 11\,105$) gebunden ist, das den Chromophor vor Weiterreaktion und Inaktivierung schützt [5–7]. Der Chromophor kann von dem apo-Protein dissoziieren und in doppelsträngige DNA interkalieren [8, 9]. In Gegenwart von Thiolgruppen wird der Chromophor aktiviert und reagiert unter Radikalbildung mit der Desoxyribose [10, 11]. Dabei wird die Desoxyribose unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff am C5-Atom zum Aldehyd oxidiert, wodurch es zum Strangbruch kommt [1]. Die geschädigte Desoxyribose kann auch abgespalten werden, und es bleibt eine Lücke mit einem 3'-P- und 5'-P-Ende zurück, die nicht mehr durch eine Ligase geschlossen werden kann [2, 12].

Abkürzungen: DSB, Doppelstrangbruch; ESB, Einzelstrangbruch; GSH, Glutathion; NCS, Neocarzinostatin; PBS, phosphate buffered saline (Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,8) + 130 mM NaCl).

Reprint requests to Prof. Dr. W. Köhnlein.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/0900–0791 \$ 01.30/0

Die biochemische Wirkung des NCS ist mit der Wirkung ionisierender Strahlung verglichen worden [13, 14]. Im Hinblick auf die mutagene und cytotoxische Wirkung des NCS ist es von Interesse zu untersuchen, ob und über welche Wege die entstandenen DNA-Schäden in der Zelle repariert werden. In humanen Zelllinien wurden nach NCS-Einwirkung Reparatur von Chromosomen- und Strangbrüchen [15–17] und der Einbau von [^3H]Thymidin in geschädigte DNA [18, 19] nachgewiesen. Eine Untersuchung an *E. coli*-Mutanten, die in der DNA-Reparatur geschädigt waren, ergab, daß eine *rec*-Mutante, nicht aber eine *uvr*-Mutante empfindlicher gegen NCS ist als der Elternstamm [20]. Es war daher wünschenswert, an einer größeren Anzahl von reparaturdefekten Mutanten die Reparaturwege für NCS-Schäden genauer zu analysieren. Hier boten sich *E. coli*-Mutanten an. Sie sind zwar aufgrund ihrer Zellwand sehr resistent gegen NCS [21], können aber durch Inkubation in hypotonem Phosphatpuffer durchlässig für NCS gemacht werden [22, 23].

Wir haben die abtötende Wirkung von NCS auf *E. coli*-Mutanten, deren Rekombinations- und Exzisionsreparaturvermögen und deren Polymerase I und SOS-System geschädigt sind, untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, daß ein beträchtlicher Teil der DNA-Schäden repariert werden kann. Alle in *E. coli* bekannten Reparatursysteme sind daran beteiligt. Die Ergebnisse lassen sich mit neuesten Erkenntnis-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

sen über die Reparaturwege und deren wechselseitigen Beziehungen interpretieren.

Material und Methoden

Neocarzinostatin

Klinisches NCS wurde von der Firma Kayaku Antibiotics Inc. hergestellt und uns vom Investigational Drug Branch of the National Cancer Institute Bethesda, Md, USA, zur Verfügung gestellt. Es wurde in Na-Acetatpuffer (15 mM, pH 5) bei 4 °C gelagert und hatte laut Hersteller eine Konzentration von 660 µg/ml. Der Chromophor wird durch seine starke Bindung an das apo-NCS weitgehend vor Inaktivierung geschützt. Jedoch lagert sich der durch Dissoziation frei werdende Chromophor in wäßriger Lösung sehr schnell um [8]; deshalb nimmt selbst unter den oben genannten günstigen Lagerbedingungen die biologische Aktivität des NCS langsam ab. Sie entsprach jedoch während der gesamten Versuchsdauer annähernd 250 µg NCS/ml. Dieser Wert diente als Grundlage für die Berechnung der NCS-Konzentration in den Versuchsansätzen.

Bakterienstämme

Die in Tab. I aufgeführten *E. coli* K12-Stämme wurden von Dr. Barbara J. Bachmann, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, zur Verfügung gestellt. Sie sind alle Abkömmlinge von AB 1157, der die folgenden genetischen Merkmale besitzt:

thr-1, ara-14, leuB6, Δ(gpt-proA)62, lacY1, tsx-33, supE44, galK2, λ⁻ rac⁻, hisG4, rfbD1, mgl-51, rpsL31, kdgK51, xyl-5, mtl-1, argE3, thi-1.

AB 2494 ist zusätzlich auxotroph für Methionin.

AB 2480 ist durch mehrere Kreuzungen aus AB 2463 und AB 1886 entstanden und hat nur noch folgende Mutationen:

Δ(gpt-proA)62, lacY1, tsx-33?, supE44?, galK2, λ⁻, rpsL8 oder rpsL31, xyl-5, mtl-1, thi-1.

Die Mutationen der Stämme bezüglich der DNA-Reparatur sind gesondert in Tab. I aufgelistet.

Medien und Puffer

Die Zellen wurden in einem M9-Medium kultiviert mit folgenden Zusätzen (µg/ml): Threonin 100, Leucin 200, Prolin 100, Histidin 40, Arginin 200, Thiamin 1. NCS reagiert in den Zellen nur in Gegenwart von Glutathion (GSH) mit der DNA, wie die NCS-Resistenz von GSH-Mangelmutanten zeigt (eigene Untersuchungen). Deshalb und um einen ausreichenden GSH-Vorrat in den Zellen zu garantieren, wurden dem Medium 0,27 mM GSH zugesetzt. (Die Zellen können neben der Eigenproduktion auch angebotenes GSH speichern [24].)

Das Agarmedium für den Koloniebildungstest enthielt: Trypton (Difco) 1,0%, Hefeextrakt (Difco) 0,3%, NaCl 0,5%, Agar 1,5%.

Während der NCS-Behandlung waren die Zellen in hypotonem Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,8: 1,78 g Na₂HPO₄ × 2 H₂O + 1,36 g KH₂PO₄ pro l) resuspendiert.

Inkubation der Zellen mit NCS

Zellen aus einer log-Phase-Kultur (inkubiert bei 37 °C in M9-Medium mit Zusätzen) wurden zentrifugiert, in Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,8) resuspendiert und auf eine Zelldichte von 2 × 10⁸/ml verdünnt. Die Zellen wurden dann 10 min lang bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert, um die Zellwand für NCS durchlässig zu machen. Zu den permeabilisierten Zellen wurde NCS-Lösung (Endkonzentration 20 µg/ml) bzw. das entsprechende Volumen Na-Acetatpuffer (15 mM, pH 5) gegeben. Da der Chromophor des NCS leicht durch UV-Strahlen inaktiviert wird [25], wurden die Versuche bei gelbem Licht durchgeführt.

Um die DNA degradierende Wirkung des NCS zu einem möglichst definierten Zeitpunkt zu beenden, wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten 10 µl Probe sofort 1:100 mit isotonem Phosphatpuffer (20 mM, pH 6,8 + 130 mM NaCl + 5 mM MgCl₂) verdünnt. Weitere erforderliche Verdünnungsschritte erfolgten in obigem Puffer ohne MgCl₂ (PBS).

Tab. I. Verwendete *E. coli* K12-Stämme.

Stamm	Die DNA-Reparatur betreffende genetische Defekte
AB 1157 (Elternstamm)	–
AB 1886	uvrA6
AB 3027	polA20 xthA14
AB 2470	recB21
AB 2463	recA13
AB 2480	recA13 uvrA6
JC 8111	sbcC201 sbcB15 recB21 recC22 recF143
JC 7623	sbcC201 sbcB15 recB21 recC22
JC 9239	recF143
AB 2494	lexA1

Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert, um die Anzahl der überlebenden, koloniebildenden Zellen zu bestimmen. Die erhaltenen Daten wurden als % Überlebende (N/N_0) aufgetragen, dabei ist N die Anzahl der Überlebenden nach NCS-Behandlung und N_0 die Zellzahl in der Kontrolle.

Beendigung der NCS-Aktivität

Da die *E. coli*-Zellen in isotonem Medium sehr resistent gegen NCS sind, wurde zunächst davon ausgegangen, daß in den Versuchen die Einwirkung des NCS auf die Zellen durch 100fache Verdünnung in 20 mM Phosphatpuffer mit 130 mM NaCl (PBS) beendet werden konnte.

Es zeigte sich jedoch, daß die Koloniebildung auf den Platten durch die verbleibenden geringen NCS-Konzentrationen (2×10^{-2} µg NCS pro Platte in der 1. Verdünnungsstufe) stark beeinträchtigt wird. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die Koloniebildungsfähigkeit der in den Versuchen verwendeten Kontrollzellen ebenfalls durch diese geringen NCS-Konzentrationen, die direkt auf die Agarplatten aufgetragen wurden, herabgesetzt war.

Aus der Literatur ist bekannt, daß 5 mM $MgCl_2$ die Wirkung des NCS auf DNA *in vitro* zu 85% hemmt [10]. Daher wurde der ersten Verdünnungsstufe 5 mM $MgCl_2$ zugesetzt und somit ein Weiterwirken des NCS auf den Agarplatten unterbunden.

Ergebnisse

An 9 reparaturdefekten Mutanten von *E. coli* und dem Elternstamm AB 1157 wurde die Koloniebildungsfähigkeit in Abhängigkeit von der NCS-Einwirkungszeit untersucht. Die Versuche für jede Mutante wurden mindestens dreimal durchgeführt. Die erhaltenen Mittelwerte sind in halblogarithmischer Darstellung als Dosiswirkungskurven aufgetragen.

Um die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf das Überleben der Zellen besser miteinander vergleichen zu können, sind die Kurven gruppenweise in 3 Abb. dargestellt (Abb. 1–3). In jeder Abbildung sind die Kurven für den Elternstamm und die am stärksten geschädigte *recA*-Mutante als Referenzkurven mit eingetragen. Das NCS wirkt zunächst mit einer sehr hohen Abtötungsrate, die mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt. Dieser Kurvenverlauf läßt sich nicht durch eine einfache Exponentialfunktion (Eintreffer-Kurve) beschreiben. Er könnte darauf beruhen, daß die Konzentration des

aktiven Chromophors durch die Reaktion mit der Bakterien-DNA abnimmt. Obwohl der Chromophor unter den gewählten Versuchsbedingungen (pH 6,8; 37 °C) labil ist, blieb seine biologische Aktivität in einem Kontrollversuch ohne Zellen während der gesamten Versuchsdauer konstant.

Im Verlauf der Reaktion des Chromophors mit der DNA werden aber auch 2 Moleküle Thiol pro Chromophormolekül oxidiert [1]. Die Reaktionsgeschwindigkeit des NCS wird also auch stark von der Verfügbarkeit an reduzierten Thiolgruppen in der Zelle bestimmt.

Die DNA-Reparatur, die den Kurvenverlauf ebenfalls beeinflusst, kann bereits während des Versuchs, aber auch später während des Wachstums der Zellen auf dem Agarmedium stattfinden. Da in den

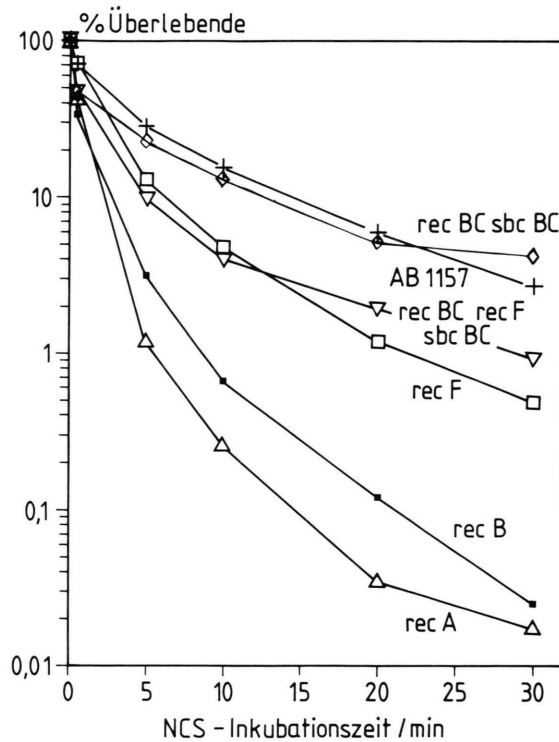


Abb. 1. Wirkung von 20 µg NCS/ml auf verschiedene *rec*-Mutanten von *E. coli*. Log-Phase-Zellen (2×10^8 /ml) wurden in hypotonem Phosphatpuffer bei 37 °C unter aeroben Bedingungen mit NCS inkubiert. Die Wirkung des NCS wurde zu den angegebenen Zeiten durch Verdünnung von Proben mit isotonem Phosphatpuffer (20 mM + 130 mM NaCl, pH 6,8) mit 5 mM $MgCl_2$ -Zusatz beendet. Die Koloniebildungsfähigkeit wurde auf Vollmedium-Agar bestimmt. Die experimentellen Punkte sind Mittelwerte von mindestens 3 Versuchen.

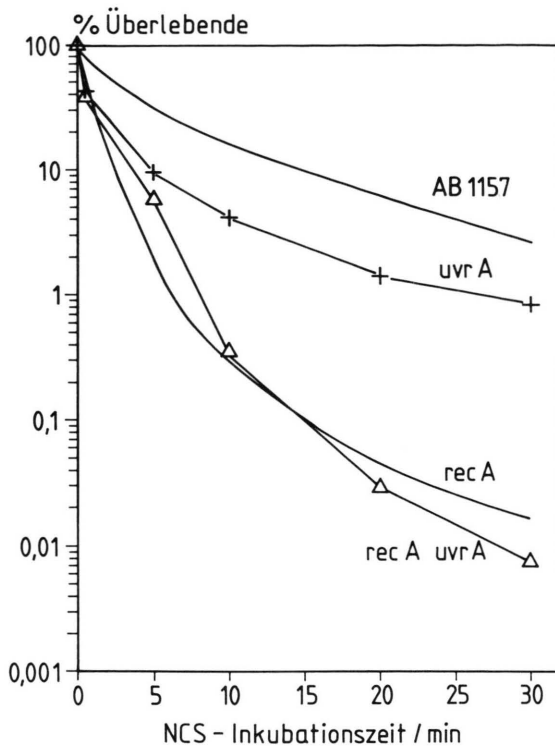


Abb. 2. Inaktivierung einer *uvrA*- und *recA uvrA*-Mutante von *E. coli* durch Inkubation mit 20 µg NCS/ml. Zum Vergleich sind die Inaktivierungskurven für den Elternstamm und die *recA*-Mutante ebenfalls dargestellt. Näheres siehe Legende zu Abb. 1.

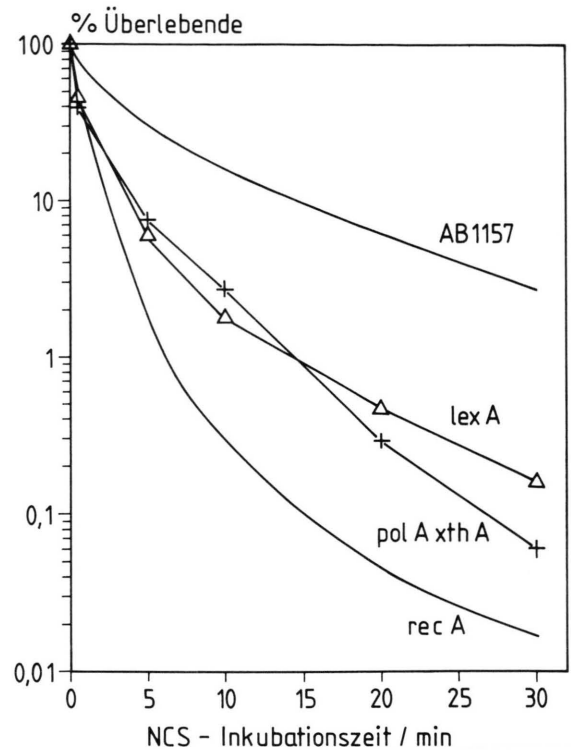


Abb. 3. Inaktivierung einer *lexA*- und *polA xthA*-Mutante von *E. coli* durch Inkubation mit 20 µg NCS/ml. Die Kurven für den Elternstamm und die *recA*-Mutante aus Abb. 1 sind zum Vergleich mit eingetragen. Näheres siehe Legende zu Abb. 1.

Zellen in Puffer andere Reparaturprozesse ablaufen als auf dem nährstoffreichen Agarmedium [26–28], wurden die Zellen nicht später als 45 min nach Beendigung der NCS-Einwirkung plattiert.

Bis auf die *recBC sbcBC*-Mutante (Abb. 1) werden alle Mutanten stärker als der Elternstamm durch NCS abgetötet. Sowohl das *rec*-System (Abb. 1) als auch das SOS-System und die Polymerase I (Abb. 3) sind an der Reparatur von DNA-Schäden nach NCS-Einwirkung beteiligt. Auch das *uvr*-System beeinflusst diese Reparatur (Abb. 2).

Die hohe Empfindlichkeit der *recA*-Mutante entspricht der regulierenden Funktion des *recA*-Proteins im *rec*- und SOS-Reparaturweg [29–31]. Der *recF*-Weg hat nur eine untergeordnete Bedeutung für die Reparatur von DNA-Schäden nach NCS-Einwirkung. Dagegen wirkt sich das Fehlen des *recB*-Gens fast so stark aus wie die *recA*-Mutation. Dieses Ergebnis entspricht Befunden nach Bestrahlung, aus

denen geschlossen wurde, daß 99% der Rekombinationsreparatur über den *recBC*-Weg und 1% über den *recF*-Weg läuft [32, 33]. Die *recBC sbcBC*-Mutante, in der die *sbcBC*-Mutation den Defekt in der *recBC*-Reparatur kompensiert [34], wird durch NCS nur so stark abgetötet wie der Elternstamm. Obwohl dieser Mutante der *recBC*-Reparaturweg fehlt, wird sie durch eine zusätzliche Mutation im *recF*-Gen nicht empfindlicher gegen NCS als die *recF*-Mutante: Die Überlebenskurven der *recBC recF sbcBC*- und *recF*-Mutante haben etwa den gleichen Verlauf.

Diskussion

Die stark abtötende Wirkung des NCS beweist, daß der GSH-Gehalt der Zellen ausreicht, um das NCS zu aktivieren. Dies ist bemerkenswert, da in hypotonem Puffer kleine Moleküle aus den Zellen in das Medium diffundieren. Boye wies nach, daß über

50% der niedermolekularen Zellthiole freigesetzt werden, wodurch die Zellen empfindlicher gegen ionisierende Strahlung sind [22]. GSH bindet in *E. coli* K12 mit großer Affinität an ein Protein [35]. Möglicherweise wird es dadurch in den Zellen zurückgehalten. Es ist nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich, daß die Mutanten in den Versuchen einen anderen GSH-Gehalt als der Elternstamm haben. Eine gegenüber dem Elternstamm veränderte Schutzwirkung des GSH nach Einwirkung ionisierender Strahlung in reparaturdefekten Mutanten ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Zu beachten ist auch, daß "liquid holding recovery" in hypotonem Puffer nur begrenzt ablaufen kann, da den Zellen niedermolekulare Substanzen und Ionen fehlen, die sie für die DNA-Reparatur benötigen. In 20 mM Phosphatpuffer wurden durch ionisierende Strahlung induzierte Strangbrüche zwar noch repariert, jedoch langsamer und mit geringerer Effizienz als in PBS [22].

Die untersuchten Mutanten haben Defekte, die die Reparatur von DNA-Schäden betreffen, die von UV- und ionisierender Strahlung verursacht werden. Mutanten, die empfindlich gegen ionisierende Strahlung sind, werden, wie erwartet, auch besonders stark durch NCS abgetötet, da NCS wie ionisierende Strahlung Strangbrüche und Basenabspaltungen induziert. Die geringe Empfindlichkeitssteigerung der *uvrA*-Mutante, die von Tatsumi und Nishioka [20] nicht gefunden wurde, ist zunächst schwer verständlich, da die Mutation die Excision der Thymindimere nach UV-Bestrahlung regelt. Der Befund könnte jedoch darauf beruhen, daß die *uvrA*- und *uvrB*-Gene modifizierend auf das Rekombinationssystem wirken [36, 37].

Obwohl Doppelstrangbrüche (DSB) durch NCS nur nach quadratischer Kinetik induziert werden [23, 38, 39], hat der *recB*-Weg, über den DNA-DSB repariert werden [40], eine große Bedeutung für die Reparatur der DNA-Schäden. Durch Suppression der *recBC*-Mutation in der *recBC sbcBC*-Mutante können die Schäden auch über den *recF*-Weg repariert werden, denn eine zusätzliche Mutation des *recF*-Gens in dieser Mutante bewirkt eine Zunahme

der Empfindlichkeit, wie die Kurve der *recBC recF sbcBC*-Mutante zeigt. Über den *recF*-Weg werden einsträngige DNA-Bereiche in doppelsträngiger DNA und DSB, die in diesem Bereich spontan entstehen können [40], repariert. Werden die einsträngigen DNA-Bereiche an den DSB durch die Exonuklease I, dem Produkt des *sbcBC*-Gens, abgebaut, können die DSB nur von dem *recBC*-System erkannt werden [41, 42]. Wenn das *recB*-Gen mutiert ist, wird die Aktivität der Exonuklease I sinnlos. Damit kann die starke Abtötung der *recB*-Mutante und die Aufhebung dieses Effekts in der *recBC sbcBC*-Mutante erklärt werden.

Wenn Schäden nur über den *recF*- und *recBC*-Weg repariert werden können, sollte die *recBC recF sbcBC*-Mutante stärker abgetötet werden als die *recF*-Mutante. Dies wurde auch nach UV-Bestrahlung gefunden [32]. In unserer Untersuchung verläuft die Überlebenskurve der *recBC recF sbcBC*-Mutante etwa so wie die der *recF*-Mutante; das entspricht dem Ergebnis nach Röntgenbestrahlung (s. Tab. IV in [32]). Daraus kann geschlossen werden, daß es noch alternative Wege geben muß, NCS-Schäden zu reparieren. Diese können bestimmte Abschnitte der Rekombinationsreparatur sein [43–45]. Die Kurve der *lexA*-Mutante zeigt, daß ein erheblicher Teil der Reparatur auch über die Induktion des SOS-Systems läuft. Eine SOS-abhängige Mutationsauslösung nach NCS-Behandlung wurde bei *E. coli* [46] und *Salmonella* [47] beobachtet.

Inwieweit die starke Abtötung der *polA xthA*-Mutante durch die *polA*- bzw. *xthA*-Mutation bewirkt wird, müßte noch untersucht werden. Boye *et al.* [23] zeigten in einem Hemmhoftest, daß nur die *polA*-Mutante, nicht aber die *xthA*-Mutante empfindlicher gegen NCS ist als der Elternstamm. Die in unseren Versuchen gefundene Empfindlichkeit der *polA xthA*-Mutante mag darauf beruhen, daß die Polymerase I an der Replikationsreparatur beteiligt ist. Dafür spricht auch der Befund von Boye *et al.* [23], daß eine frühe Reparatur von DNA-Strangbrüchen, wie sie nach Einwirkung ionisierender Strahlung beobachtet wurde, nach NCS-Behandlung nicht stattfindet.

- [1] I. H. Goldberg, *Free Radical Biology & Medicine* **3**, 41–54 (1987).
- [2] L. S. Kappen und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **22**, 4872–4878 (1983).
- [3] L. F. Povirk und C. W. Houlgrave, *Biochemistry* **27**, 3850–3857 (1988).
- [4] L. F. Povirk, C. W. Houlgrave und Y.-H. Han, *J. Biol. Chem.* **263**, 19263–19266 (1988).
- [5] S. H. Lee und I. H. Goldberg, *Molecular Pharmacology* **33**, 396–401 (1988).
- [6] O. D. Hensens, R. S. Dewey, J. M. Liesch, M. A. Napier, R. A. Reamer, J. L. Smith, G. Albers-Schönberg und I. H. Goldberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 538–547 (1983).
- [7] B. W. Gibson, W. C. Herlihy, T. S. Anantha Samy, K.-S. Hahm, H. Maeda, J. Meienhofer und K. Biekmann, *J. Biol. Chem.* **259**, 10801–10806 (1984).
- [8] L. F. Povirk und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **19**, 4773–4780 (1980).
- [9] L. F. Povirk, N. Dattagupta, B. C. Warf und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **20**, 4007–4014 (1981).
- [10] L. S. Kappen und I. H. Goldberg, *Nucleic Acids Research* **5**, 2959–2967 (1978).
- [11] R. S. Lewis, G. Jung und W. Köhnlein, *Biochim. Biophys. Acta* **608**, 138–146 (1980).
- [12] L. S. Kappen und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **17**, 729–734 (1978).
- [13] I. H. Goldberg, L. F. Povirk, L. S. Kappen und D.-H. Chin, in: *Cellular Regulation and Malignant Growth* (Hrsg. S. Ebashi), S. 482–491, Springer Verlag, Berlin 1985.
- [14] M. Lennartz, T. Coquerelle, A. Bopp und U. Hagen, *Int. J. Radiat. Biol.* **27**, 577–587 (1975).
- [15] W. N. Hittelman und M. Pollard, *Cancer Res.* **42**, 4584–4590 (1982).
- [16] T. Hatayama und I. H. Goldberg, *Biochim. Biophys. Acta* **563**, 59–71 (1979).
- [17] K. Tatsumi, K. K. Bose, K. Ayres und B. S. Strauss, *Biochemistry* **19**, 4767–4772 (1980).
- [18] K. Tatsumi, T. Sakane, H. Sawada, S. Shirakawa, T. Nakamura und G. Wakisaka, *Gann* **66**, 441–444 (1975).
- [19] L. S. Kappen und I. H. Goldberg, *Biochem. Biophys. Acta* **520**, 481–489 (1978).
- [20] K. Tatsumi und H. Nishioka, *Mutation Res.* **48**, 195–204 (1977).
- [21] N. Ishida, K. Miyazaki, K. Kumagai und M. Rikimura, *J. Antibiotics, Ser. A* **18**, 68–76 (1965).
- [22] E. Boye, *Radiation Res.* **84**, 35–45 (1980).
- [23] E. Boye, W. Köhnlein und K. Skarstad, *Nucleic Acids Res.* **12**, 8281–8291 (1984).
- [24] P. Apontoweil und W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **399**, 1–9 (1975).
- [25] L. S. Kappen und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **19**, 4786–4790 (1980).
- [26] M. Frankenberg-Schwager, D. Frankenberg und R. Harbich, *Radiation Res.* **111**, 192–200 (1987).
- [27] D. Billen, *Radiation Res.* **111**, 354–360 (1987).
- [28] G. Iliakis, *Int. J. Radiat. Biol.* **53**, 541–584 (1988).
- [29] L. J. Gudas und A. B. Pardee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2330–2334 (1975).
- [30] L. J. Gudas, *J. Molecular Biol.* **104**, 567–587 (1976).
- [31] K. McEntee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5275–5279 (1977).
- [32] Z.-J. Horii und A. J. Clark, *J. Molecular Biol.* **80**, 327–344 (1973).
- [33] T.-C. V. Wang und K. C. Smith, *J. Bact.* **170**, 2555–2559 (1988).
- [34] S. R. Kushner, H. Nagaishi und A. J. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1366–1370 (1972).
- [35] J. Meury und A. Robin, *Eur. J. Biochem.* **148**, 113–118 (1985).
- [36] A. K. Ganesan, P. C. Seawell und D. W. Mount, *J. Bact.* **135**, 935–942 (1978).
- [37] R. H. Rothman und A. J. Clark, *Mol. gen. Genet.* **155**, 279–286 (1977).
- [38] A. D. D'Andrea und W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3608–3612 (1978).
- [39] W.-L. Kuo, R. E. Meyn und C. W. Haidle, *Cancer Res.* **44**, 1748–1751 (1984).
- [40] T.-C. V. Wang und K. C. Smith, *J. Bact.* **156**, 1093–1098 (1983).
- [41] T.-C. V. Wang und K. C. Smith, *Mol. gen. Genet.* **201**, 186–191 (1985).
- [42] I. R. Lehman und A. L. Nussbaum, *J. Biol. Chem.* **239**, 2628–2636 (1964).
- [43] R. C. Sharma und K. C. Smith, *Mutation Res.* **146**, 169–176 (1985).
- [44] D. A. Youngs und K. C. Smith, *J. Bact.* **125**, 102–110 (1976).
- [45] A. J. Clark, S. J. Sandler, D. K. Willis, C. C. Chu, M. A. Blamar und S. T. Lovett, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **49**, 453–462 (1984).
- [46] P. L. Foster und E. Eisenstadt, *J. Bact.* **153**, 379–383 (1983).
- [47] D. E. Levin, M. Hollstein, M. F. Christman, E. A. Schwiers und B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7445–7449 (1982).