Kinetische Untersuchungen zur Gamma-Radiolyse von 5-Bromuracil in wäßriger Lösung

H. REUSCHL

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. **21 b**, 643—646 [1966]; eingegangen am 10. März 1966)

Es wurde die Kinetik des Abbaus von 5-Bromuracil in wäßriger Lösung bei $p_H=6,5$ durch Bestrahlung mit γ -Strahlen unter N_2 , O_2 und N_2O untersucht. Die Ergebnisse werden an Hand der Radikaltheorie wäßriger Lösungen diskutiert und eine Hypothese zur Ursache der Strahlensensibilisierung lebender Zellen durch Bromuracil abgeleitet.

Nach dem Einbau von 5-Bromuracil (BU) anstelle von Thymin (T) in die DNS von lebenden Zellen oder von Phagen wird die Inaktivierungsrate derselben nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen beträchtlich erhöht¹. Diese „Sensibilisierung“ könnte unter anderem durch die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit von BU und T in der DNS bedingt sein, aber auch durch die Natur der Radiolyseprodukte, die nicht in jedem Fall eine letale Wirkung haben und in unterschiedlichem Ausmaß eine Reaktivierung der geschädigten DNS zulassen werden. So erhält die Frage nach dem Mechanismus der Sensibilisierung durch BU ihr Interesse vor allem durch die Möglichkeit, allein durch den Vergleich des unterschiedlichen strahlenbiologischen Verhaltens zweier in gewissem Maß einander ersetzender Basen Einblicke in grundlegende strahleninduzierte chemisch-physikalische Reaktionen in der Zelle zu gewinnen.

Für den Fall der Strahlensensibilisierung von BU-haltigen *Enterococcus Stei* („schweren“ Zellen) durch Röntgenstrahlen wurde bereits von LOCHMANN² an Hand der Basen-Analyse von normalen und „schweren“ Zellen eine Erklärung dieser Erscheinung vorgeschlagen: Nach Verabreichung der gleichen Dosis (~ 1000 kr) war der prozentuale Abbau des BU in den schweren um das 5–10-fache höher als der des T in normalen Zellen; als Umwandlungsprodukt des BU wurde fast ausschließlich Uracil (U) gefunden. Die vorgeschlagene Erklärung für die Ursache der Sensibilisierung gründet sich auf die Annahme, die Bildung von U sei eine letale Mutation. Der Mechanismus, nach dem sich das U bildet, bleibt ungeklärt, ebenso wie es unbewiesen

bleibt, ob U in der DNS dieser Zellart letal wirkt.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch die Untersuchung der Kinetik des Abbaus von BU bei Bestrahlung unter N_2 , O_2 und N_2O mit den γ -Strahlen von ^{60}Co einen ersten globalen Überblick über die auftretenden strahlenchemischen Reaktionen zu gewinnen.

Experimenteller Teil

BU wurde in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ – $3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l in dreimal dest. Wasser gelöst und mit einer Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 -Pufferlösung von $p_H=6,5$ versetzt, so daß die Konzentration des Puffersalzes doppelt so hoch war wie die des BU. Zur Bestrahlung unter N_2 wurden die BU-Lösungen in Ampullen 20 Min. mit O_2 -freiem N_2 gespült und abgeschmolzen. Bei den Versuchen mit O_2 leiteten wir während der Bestrahlung O_2 durch die Lösungen, so daß die O_2 -Konzentration konstant und gleich der Sättigungskonzentration war: $1,3 \cdot 10^{-3}$ Mol/l. N_2O wurde durch Ausfrieren bei $-80^\circ C$ und Abpumpen der nicht kondensierten Gase (O_2) gereinigt und in einer geschlossenen Glasapparatur über die vorher durch freeze-pumping entgasten BU-Lösungen geleitet. Nach Abschmelzen der die Lösungen enthaltenen Ampullen und Einstellen des Gasgleichgewichts betrug der Partialdampfdruck des N_2O 350 ± 30 mm Hg, dies entspricht einer Konzentration des N_2O in der BU-Lösung von etwa $1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l³. Die Bestrahlung erfolgte in einer ^{60}Co -Quelle mit einer Dosisleistung von $6 \cdot 10^5$ r/Stunde.

Die Menge des nach Bestrahlung unzerstörten BU wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 274 m μ auf parallelem Wege direkt und nach erfolgter chromatographischer Isolierung des BU von den Radiolyseprodukten ermittelt. Es stellte sich heraus, daß bei Bestrahlung unter O_2 die direkt und die nach Chromatographie gefundenen Werte innerhalb der Fehlergrenze des letzten Verfahrens übereinstimmten, so daß es in

¹ B. DJORDJEVIC u. W. SZYBALSKI, J. exp. Medicine **112**, 509 [1960]; G. HOTZ u. K. G. ZIMMER, Int. J. Rad. Biol. **7**, 75 [1963]; F. W. STAHL et al., Virology **13**, 98 [1961].

² E. R. LOCHMANN, Naturwissenschaften **50**, 520 [1963].

³ K. D. ASMUS u. A. HENGLEIN, Ber. Bunsenges. physik. Chem. **68**, 348 [1964].

diesem Falle möglich war, die genauere direkte Messung anzuwenden; die Fehlerbreite beträgt etwa ± 3 Prozent. Wie der Vergleich der beiden Messungen zeigte, bilden sich dagegen bei Bestrahlung unter N_2 und N_2O UV-absorbierende Stoffe und man erhält erst nach chromatographischer Trennung gültige Werte für den Abbau des BU. Vor dem Auftragen auf das Chromatogramm mußten die Lösungen konzentriert werden; dies erfolgte durch Gefriertrocknung und Lösen der getrockneten Substanz in einem entsprechend kleineren Volumen Wassers. Zur chromatographischen Trennung wurden Kieselgelschichten verwendet, als Laufmittel diente ein Gemisch von Äthylacetat und 65-proz. wässrigem Isopropanol 75 : 25. Als Fehlerbreite für die Bestimmung des BU ergab sich etwa ± 8 Prozent.

Ergebnisse und Diskussion

Die Abnahme der BU-Konzentration in Abhängigkeit von der Dosis bei Bestrahlung in wässriger Lösung unter N_2 , O_2 , N_2O läßt sich bis zu einem Abbaugrad von etwa 50% in halblogarithmischer Auftragung als Gerade graphisch darstellen (Abb. 1, 2, 3). Die bei der Bestrahlung unter N_2 und N_2O erhaltenen initialen G -Werte sind innerhalb der Fehlergrenzen der BU-Bestimmung unabhängig von der Ausgangskonzentration des BU (Abb. 4) und betragen im Mittel

$$G_{-Bu}^{(N_2)} = 7,50 \quad \text{und} \quad G_{-Bu}^{(N_2O)} = 5,50.$$

Bei der Bestrahlung mit O_2 steigt dagegen der G -Wert mit der Anfangskonzentration des BU stark

Abb. 1. Strahlenchemischer Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von N_2 .

Abb. 2. Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von O_2 .

Abb. 3. Abbau des BU in wässriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen durch γ -Bestrahlung in Gegenwart von N_2O .

Abb. 4. Abhängigkeit der G -Werte des Abbaus des BU von der Konzentration bei γ -Bestrahlung wässriger BU-Lösungen in Gegenwart von N_2 , O_2 und N_2O .

an (Abb. 4); die extremen gemessenen Werte be-
tragen bei

$$(BU)_0 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l: } G_{-BU}^{(O_2)} = 3 \quad \text{und bei}$$

$$(BU)_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l: } G_{-BU}^{(O_2)} = 6,4.$$

Diese G -Werte lassen bei Berücksichtigung der zu-
letzt von HAYON⁴ für die Radiolyse wäßriger Lösun-
gen ermittelten G -Werte der „Wasserradikale“ eine
sehr einfache Deutung zu. Danach reagieren in ver-
dünnten wäßrigen Lösungen bei neutralem p_H -Wert
die bei der Radiolyse des Wassers gebildeten Spe-
cies $H^\cdot$, $OH^\cdot$, e_{aq} innerhalb eines definierten Kon-
zentrationbereichs entsprechend folgenden G -Wer-
ten mit dem gelösten Stoff (S)

$$G_H = 0,55; \quad G_{OH} = 2,25; \quad G_{e_{aq}} = 2,30.$$

Die Grenzen dieses Konzentrationsbereichs sind
abhängig von der Geschwindigkeitskonstanten der
Reaktion eines „Wasserradikals“ (R) mit dem ge-
lösten Stoff $k_{(R+S)}$ und durch die Beziehungen
 $k_{(R+S)}C_S \cong 10^5$ als untere und $k_{(R+S)}C_S \geq 10^7$ als
obere Grenze definiert. Während bei Konzentrationen
 $C_S < 10^5/k_{(R+S)}$ die Radikalreaktionen mit dem
gelösten Stoff zugunsten der Radikalrekombination
abnehmen, erhöht sich ihr Ausmaß bei $C_S > 10^7/k_{(R+S)}$
auf Kosten der Rekombination der in der „spur“
gebildeten Radikale. Bei einer Geschwindigkeitskon-
stante $k_{R+S} = 1 \cdot 10^{10} \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ steigt da-
bei der G -Wert von $OH^\cdot$ und e_{aq} um etwa 0,3 bei
einer Erhöhung der Konzentration um das 10-fache.
Im Falle der Bestrahlung von wäßrigen N_2O -Lösun-
gen reagiert das hydratisierte Elektron mit N_2O
unter Bildung von $OH^\cdot$ Radikalen: $N_2O + H_2O^\ominus \rightarrow$
 $N_2 + OH^\cdot + OH^\ominus$ mit einer Geschwindigkeitskonstan-
ten von $8,7 \cdot 10^9 \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Bei der von uns ange-
wandten N_2O -Konzentration $C_{N_2O} = 1 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ be-
tragen daher die G -Werte von e_{aq} und $OH^\cdot$: $G_{e_{aq}} =$
2,55; $G_{OH^\cdot} = 2,50$.

Für unsere Versuche unter N_2 können wir in
erster Annäherung annehmen, daß die untersuchten
BU-Konzentrationen im Bereich der oben definier-
ten verdünnten Lösungen liegen und daher die an-
gegebenen G -Werte gelten. Würden die Wasser-
radikale, ohne miteinander zu interferieren, jeweils
ein BU-Molekül abbauen, so wäre bei Bestrahlung
unter N_2 der G -Wert des BU-Abbaus gleich der
Summe $G_H + G_{OH^\cdot} + G_{e_{aq}} = 5,10$. Wir finden $G_{-BU}^{(N_2)} =$
7,50. Man kommt nun diesem experimentellen
 G -Wert sehr nahe, wenn man in diese Summe die
 G -Werte von entweder $OH^\cdot$ oder e_{aq} mit dem Fak-

tor 2 einsetzt:

$$G_H + 2 G_{OH} + G_{e_{aq}} = 7,35 \quad \text{oder} \quad G_H + G_{OH} + 2 G_{e_{aq}} = 7,40.$$

Folglich sollte entweder das $OH^\cdot$ -Radikal oder das
hydratisierte Elektron eine Zweistufenreaktion aus-
lösen. Diese Frage konnte durch die Versuche mit
 N_2O entschieden werden. Die Konzentration des
 N_2O war im ungünstigsten Falle etwa sechsmal
höher als die des BU und man kann daher bei der
hohen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion
 $N_2O + e_{aq}$ erwarten, daß sämtliche e_{aq} von N_2O ab-
gefangen werden, bevor sie mit dem BU reagieren.
Bei der angewandten Konzentration und unter der
Annahme, daß je ein $OH^\cdot$ -Radikal mit einem BU
reagiert, wäre für den Abbau des BU ein G -Wert
 $G_{-BU}^{(N_2O)} = 0,55 + 2,50 + 2,55 = 5,6$ zu erwarten. Ge-
funden wurde $G_{-BU}^{(N_2O)} = 5,4$. Es ist somit gezeigt, daß
bei der Radiolyse wäßriger BU-Lösungen die Radi-
kale $H^\cdot$ und $OH^\cdot$ je ein, das hydratisierte Elektron
jedoch in einer Folgereaktion zwei BU-Moleküle
chemisch umwandeln.

Bei den Versuchen mit O_2 bleibt es wegen der
relativ niedrigen O_2 -Konzentration unsicher, in
welchem Ausmaß die Reaktionen $e_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^\ominus$
 $H^\cdot + O_2^\ominus \rightarrow HO_2^\cdot \rightleftharpoons O_2^\ominus + H^\oplus$ mit den entsprechen-
den Reaktionen des BU konkurrieren. Die Tatsache,
daß bei einer Konzentration des BU = $3 \cdot 10^{-3}$ der
 G -Wert des BU-Abbaus mit 6,4 höher liegt als der
der einfachen Summe der G -Werte der Wasserradi-
kale zeigt jedoch, daß bei dieser Konzentration in
gewissem Umfang noch eine Zweistufenreaktion
stattfindet. Da bei kleiner BU-Konzentration das
Ausmaß des Abbaus sich stark verringert, wird
diese Zweistufenreaktion nicht durch das $O_2^\ominus$ aus-
gelöst, sondern durch die von der Konkurrenzreak-
tion des O_2 nicht abgefangenen e_{aq} . Dieser Befund
spricht für eine große Reaktivität des e_{aq} mit dem
BU, da die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion
 $O_2 + e_{aq}$ mit $k_{O_2 + e_{aq}} = 2 \cdot 10^{10} \text{ Mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ sehr
hoch liegt. Die Frage, ob das BU von $O_2^\ominus$ ange-
griffen wird, kann durch diese Versuche nicht be-
antwortet werden.

Aus unseren Untersuchungen ist bei Berücksichti-
gung des strahlenchemischen Verhaltens von Pyri-
midin-Verbindungen einerseits und Halogenverbin-
dungen andererseits ein allgemeines Schema für den
Reaktionsablauf bei der Radiolyse wäßriger BU-

⁴ E. HAYON, Trans. Faraday Soc. **61**, 723 [1965].

⁵ F. S. DAINTON u. D. C. WALKER, Proc. Roy. Soc. [London],
Ser. A **285**, 339 [1964].

Lösungen in Anwesenheit von Radikalfängern zwanglos abzuleiten. Ausgangspunkt ist dabei der Befund, daß die Radikale $H^\cdot$ und $OH^\cdot$ mit dem BU ein relativ stabiles Radikal bilden, das sich durch Reaktionen mit anderen Radikalen zu einem neutralen Molekül umwandelt, während sich mit dem hydratisierten Elektron ein sehr reaktives Radikal bildet, das ein weiteres BU-Molekül angreift. Von Uracil-Derivaten (z. B. Thymin) ist bekannt, daß sie bei Bestrahlung in wäßriger Lösung vorzugsweise $H^\cdot$ und $OH^\cdot$ an die 5.6-Doppelbindungen addieren⁶; das gebildete Hydrouracilradikal

ist relativ stabil. Halogen-Derivate reagieren im allgemeinen sehr schnell mit dem hydratisierten Elektron unter Abspaltung des Halogens als Anion und Bildung eines Radikals. Im Falle von Bromuracil würde sich also das Uracil-Radikal bilden

von dem eine hohe Reaktivität zu erwarten ist. Vergleicht man, im Hinblick auf die Strahlensensibilisierung BU-haltiger Zellen, das strahlenchemische Verhalten in wäßriger Lösung von T^6 und BU, so ist wohl der wichtigste Unterschied darin zu suchen, daß nur im Falle von BU ein sehr reaktives Radikal entsteht, das Uracilradikal, das fähig ist, ein weiteres neutrales Molekül abzubauen. Thymin addiert an die 5.6-Doppelbindung nicht nur $H^\cdot$ - und $OH^\cdot$ -Radikale, sondern auch das hydratisierte Elektron⁷; es wurde aber bisher keine Reaktion zwischen einem Thyminradikal und einem neutralen Molekül nachgewiesen. Daher scheint die Hypothese berechtigt, als eine der Ursachen der Strahlensensibilisierung durch BU die Bildung des Uracilradikals in der Zelle anzusehen: Dieses Radikal könnte durch Reaktion mit neutralen Molekülen oder durch Zerfall diffusible Radikale erzeugen, die die Zelle über das in normalen Zellen festgestellte Ausmaß hinaus schädigen.

⁶ G. SCHOLES, Progr. Biophysics molecular Biol. **13**, 60 [1963].

⁷ A. KAMAL u. W. M. GARRISON, Nature [London] **206**, 1315 [1965].