UV-Photolyse von Joduracil, V
Reaktionen des Uracilradikals mit Cystamin und Cysteamin in wäßrigen Lösungen

Photochemistry of 5-Iodouracil in Aqueous Solution in Presence of Cystamine and Cysteamine

ERNST GILBERT

Institut für Strahlenchemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforsch. **28b**, 805–809 [1973]; eingegangen am 24. Juli 1973)

UV-photolysis, uracil radical, 5-S-cysteaminyluracil, iodouracil, cysteamine

UV-photolysis of aqueous solution of 5-iodouracil in presence of cystamine and oxygen leads to isodialuric acid and 5-S-cysteamine-uracil. The yields of these products were determined as a function of cystamine concentration. In absence of oxygen but in presence of low concentration of cystamine another competition reaction in addition to the formation of 5-S-cysteamine-uracil is observed which leads to the formation of uracil dimer. UV-photolysis of iodouracil in presence of cysteamine and oxygen leads to isodialuric acid, 5-S-cysteamine-uracil and uracil. The results suggest that cystamine accounts for the formation of 5-S-cysteamine-uracil and cysteamine for the occurrence of uracil. Iodouracil and cysteamine react at pH's between 7 and 12 in a dark reaction to give uracil.

Cystamin und Cysteamin sind für ihre strahlenschützende Wirkung in biologischen Systemen bekannt^{1,2}. Da sie sehr gute Radikalfänger sind, schien es uns von Interesse, die Reaktionen des Uracilradikals, das bei der UV-Photolyse des Joduracils entsteht³, mit Cystamin und Cysteamin zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird über die UV-Photolyse des künstlichen DNS-Bausteins Joduracil in Gegenwart von Cystamin und Cysteamin mit und ohne Sauerstoff, sowie die Reaktionen des Joduracils mit Cysteamin in Abhängigkeit vom pH-Wert berichtet.

Ergebnisse und Diskussion

a. UV-Photolyse in Gegenwart von Cystamin

Bei der UV-Photolyse von Joduracil ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in Gegenwart von Cystamin in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung (pH = 5) entstehen Isodialursäure (1) und 5-S-Cysteaminyluracil (2). Die Ausbeute an 2 nimmt bei konstanter

Sauerstoffkonzentration proportional der Cystaminkonzentration zu, während 1 abnimmt (Abb. 1).

Die Bildung der Photolyseprodukte läßt sich aus den Reaktionen des im Primärschritt der Photo-

Abb. 1. UV-Photolyse ($\lambda = 254$ nm) von Joduracil ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in Gegenwart von Cystamin in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung. Die aufgetragenen Werte der Produkte sind den Dosisabhängigkeitsdiagrammen bei jeweils 20% Umsatz an Joduracil entnommen. ● = Isodialursäure; ○ = 5-S-Cysteaminyluracil.

Sonderdruckanforderungen an Dr. E. GILBERT, Institut für Radiochemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, D-7500 Karlsruhe, Postfach 3640.

lyse gebildeten Uracilradikals (Gl. (1)) mit Sauerstoff bzw. Cystamin erklären.

Durch die Sauerstoffaddition an das Uracilradikal entsteht als stabiles Endprodukt **1**³. In Gegenwart von Cystamin bietet sich als Konkurrenzreaktion zur Sauerstoffaddition der Angriff des Uracilradikals an die Disulfidbindung an, unter Bildung von **2** (Gl. (2)).

Die Hydrierung von **2** mit Raney-Nickel zu Uracil weist darauf hin, daß es sich um 5-S-Cysteaminylluracil handelt. RUPP und PRUSOFF⁴ fanden ebenfalls **2** bei der Photolyse des Joduracils in Gegenwart von Cystamin. Ähnliche Reaktionen wie z.B. die des Phenylradikals mit Disulfiden unter Bildung eines Phenylalkylsulfids wurden bereits beschrieben⁵.

Bei der UV-Photolyse von Joduracil in Gegenwart von Cystamin unter Ausschluß von Sauerstoff entfällt die schnelle Sauerstoffaddition an das Uracilradikal und folglich erscheint **1** nicht als Photolyseprodukt. Das Uracilradikal kann also quantitativ mit Cystamin zu **2** abreagieren. Bei hohen Cystaminzusatzkonzentrationen ($C > 10^{-3}$ Mol/l) ist dies der Fall (Abb. 2).

Bei niedrigeren Cystaminkonzentrationen ($C < 10^{-3}$ Mol/l) bilden sich neben **2** noch weitere Produkte, die sich dünnschichtchromatographisch analog den Photolyseprodukten verhalten, wie sie bei der UV-Photolyse des Joduracils unter Sauerstoffausschluß und ohne Zusätze gebildet werden (Abb. 3). Wir nehmen an, daß sich unter diesen Bedingungen Dimere bilden können, analog der Dimerenbildung bei der Photolyse des Bromuracils, wie sie von ISHIIHARA und WANG⁶ beschrieben wurden.

Die mögliche Bildung von Dimeren läßt den Schluß zu, daß das primär gebildete Uracilradikal nicht nur mit Cystamin sondern als Konkurrenzreaktion mit sich selbst oder zum Teil mit Joduracil

reagieren kann. Da die Dimerenbildung nur durch höhere Zusatzkonzentrationen an Cystamin ($C > 10^{-3}$ Mol/l) unterdrückt werden kann, muß sich diese Reaktion gegenüber der Bildung von **2** (Gl. (2)) durch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit auszeichnen.

Abb. 2. UV-Photolyse ($\lambda = 254$ nm) von Joduracil ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in Gegenwart von Cystamin in wäßriger Lösung unter Ausschluß von Sauerstoff. Die Werte wurden den Dosisabhängigkeitsdiagrammen bei 20% Joduracilumsatz entnommen.

○ = 5-S-Cysteaminylluracil; □ = Σ Dimere.

Abb. 3. — Radiochromatogramme einer unter Ausschluß von Sauerstoff in Gegenwart von Cystamin ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) belichteten Joduracillösung ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l); - - - Radiochromatogramme einer unter Ausschluß von Sauerstoff und ohne Zusätze belichteten Joduracillösung ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l); Cu = 5-S-Cysteaminylluracil, Ju = Joduracil. Belichtungszeit 6 min, entwickelt auf Cellulosedünnschicht mit Laufmittel I, II, III (siehe exp. Teil).

b. UV-Photolyse in Gegenwart von Cysteamin

Die UV-Photolyse des Joduracils in Gegenwart von Cysteamin in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung (pH = 1) liefert in Abhängigkeit von der Cysteaminkonzentration in wechselnden Mengen **1**, **2** und Uracil (**3**) (Abb. 4). Wir wählten pH = 1, um die Reaktion (siehe Abschnitt c.) des Joduracils mit Cysteamin zu vermeiden.

Abb. 4. UV-Photolyse von Joduracil in Gegenwart von Cysteamin in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung. ● = Isodialursäure; □ = Uracil; ○ = 5-S-Cysteaminyluracil.

Neben der Sauerstoffaddition bietet sich für das Uracilradikal die H-Atomabstraktion am sehr guten H-Donator Cysteamin an (Gl. (3)).

Die Bildung von **2** können wir darauf zurückführen, daß entweder das Cysteamin von vornherein mit Cystamin verunreinigt war, oder daß sofort in wäßriger, sauerstoffgesättigter Lösung ein Teil des Cysteamins zu Cystamin oxydiert wird. Der Anteil an Cystamin wird um so größer, je höher die Cysteaminausgangskonzentration ist, und folglich muß bei hohen Cysteaminkonzentrationen die Ausbeute an **2** stärker zunehmen. Dies kann aus Abb. 3 entnommen werden.

Unter Ausschluß von Sauerstoff sollte in Gegenwart von hohen Cysteaminkonzentrationen bei der UV-Photolyse nur Uracil gebildet werden, d.h. das Uracilradikal wird quantitativ nach Gl. (3) abgefangen.

Die zu diesem Versuch verwendete Cysteaminlösung wird zuvor 30 min mit naszierendem Wasserstoff behandelt. Die Ausgangskonzentration an Cysteamin wird so gewählt, daß nach Mischen mit einer vorher mit Argon begasten Joduracillösung eine Lösung mit 10^{-2} Mol/l Cysteamin und $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Joduracil bei pH = 1 vorliegt. Diese Lösung wird noch eine Stunde mit Argon weiter begast und anschließend belichtet. Als Photolyseprodukt entsteht im wesentlichen nur **3**. 5-S-Cysteaminyluracil (**2**) ist nicht nachweisbar.

In einem Parallelversuch wird ein Teil der obigen Lösung eine Stunde mit Sauerstoff begast und anschließend belichtet. Neben **3** kann nun als zweites Photolyseprodukt **2** wieder nachgewiesen werden. Daraus ist zu schließen, daß ein Teil des Cysteamins wieder zu Cystamin oxidiert wird und dieses nun mit dem Uracilradikal zu **2** abreagieren kann (Gl. (2)). Für die Bildung von **3** können wir allein das Cysteamin und für die Bildung von **2** ausschließlich das Cystamin verantwortlich machen. Eine Reaktion des Uracilradikals mit Cysteamin unter Bildung von **2** ist somit auszuschließen. Zu klären ist noch die Möglichkeit einer photolytischen Addition des Cysteamins an das primär gebildete Uracil (**3**). Ein Photolyseprodukt aus **3** und Cystein wurde von SMITH und APLIN⁷ beschrieben. Das Additionsprodukt aus **3** und Cysteamin, das 5-S-Cysteaminyl-6-hydrouracil sollte durch Hydrierung mit Raney-Nickel in Dihydrouracil überführt werden können⁷. In den belichteten und anschließend hydrierten Joduracil-Cysteaminlösungen ist jedoch dünnstschichtchromatographisch nur Uracil, das Hydrierungsprodukt von **2** nachweisbar. Ein Peak mit dem R_f -Wert des Dihydrouracils kann nicht beobachtet werden.

Aus dem Vergleich der Ausbeuten an Photolyseprodukte in Abhängigkeit von den Konzentrationen der zugesetzten Radikalfänger bzw. H-Donatoren (Abbn. 1, 2 und 4) läßt sich für die Größe der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen des Uracilradikals mit den besprochenen Verbindungen qualitativ folgende Reihenfolge aufstellen:

wobei $k_1 > k_2 > k_3 > k_4 > k_5$ ist.

c. Reaktion des Joduracils mit Cysteamin, pH-Abhängigkeit

Läßt man eine mit Stickstoff begaste Joduracil-lösung ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) in Gegenwart von Cysteamin ($C = 10^{-1}$ Mol/l) bei 25 °C im Tageslicht oder im Dunkeln stehen, so findet eine Reaktion statt, die ausschließlich zu Uracil (3) führt. Die Ausbeute an 3 ist pH-abhängig und erreicht ihren Höchstwert bei pH = 8,5 (Abb. 5).

Abb. 5. Reaktion des Joduracils ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) mit Cysteamin ($C = 10^{-1}$ Mol/l) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Aufgetragen sind die Uracilausbeuten nach 3 Std. Reaktionszeit bei 25 °C.

Nach 3 Std. Reaktionszeit bei verschiedenen pH-Werten und bei 25 °C wird jeweils die Lösung auf pH = 1 gebracht und damit die Uracilbildung abgestoppt. Auf den Radiochromatogrammen der Lösungen erscheint neben dem nicht umgesetzten Joduracil nur noch ein Peak mit dem R_f -Wert von 3. Die Isolierung und Identifizierung von 3 wird im experimentellen Teil beschrieben. Die Bildung von 3 ist nur bei einem großen Überschuß von Cysteamin zu beobachten. Bei einer Cysteaminkonzentration $C < 10^{-3}$ Mol/l ist nach 3 Std. Reaktionszeit (25 °C) noch kein 3 nachzuweisen (Abb. 6).

Abb. 6. Reaktion des Joduracils ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) mit Cysteamin; Cysteaminkonzentrationsabhängigkeit bei pH = 8,5; aufgetragen sind die Ausbeuten des Uracils nach 3 Std. Reaktionszeit bei 25 °C.

Für die Temperaturabhängigkeit bei pH = 8,5 wird eine Lösung mit Joduracil $C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l und Cysteamin $C = 5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l verwendet (Abb. 7).

Abb. 7. Reaktion des Joduracils ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) mit Cysteamin ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l); Temperaturabhängigkeit bei pH = 8,5; □ = Uracil.

Die Bildung von 3 ist stark temperaturabhängig und kann durch Abkühlen auf 0 °C abgestoppt werden.

Lösungen mit Joduracil ($C = 5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) und Cysteamin ($C = 10^{-3}$ – 10^{-1} Mol/l) zwischen pH = 7 und 12, die bis zu 10 Std. bei 0 °C gehalten wurden, zeigen auf ihrem Radiochromatogramm nur den unverändert vorliegenden Joduracilpeak. Vor dem Chromatographieren werden die Lösungen auf pH = 1 gebracht, da beim Auftragen auf die Dünnschichtplatte Erwärmung erfolgt und die Uracilbildung ausgelöst werden würde.

Über den Bildungsmechanismus von 3 unter diesen Bedingungen können bei dem jetzigen Stand der

Untersuchungen noch keine Aussagen gemacht werden.

Experimenteller Teil

Die Belichtungsbedingungen sind die gleichen wie in einer vorangegangenen Arbeit³.

Das 5-Joduracil-2-¹⁴C wurde von Dr. SCHWEER, Institut für Radiochemie, Kernforschungszentrum Karlsruhe, dargestellt. Cystamin und Cysteamin stammte von der Firma Merck, Darmstadt.

5-S-Cysteaminylluracil (2)

Die R_f -Werte von **2** auf Cellulosedünnschicht sind in Tab. I für verschiedene Laufmittel aufgeführt.

Tab. I. R_f -Werte für 5-S-Cysteaminylluracil auf Cellulosedünnschicht.

Nr. Laufmittel		R_f -Wert
I	Essigester/Ameisensäure/ Wasser	10/2/3 0,39
II	Aceton/Äther/Wasser	6/3/1 0,05
III	tert-Butanol/Wasser/Eisessig	44/11/0,3 0,1
IV	tert-Butanol/Methyläthyl- keton/Wasser/Ammoniak	40/30/20/10 0,32

2 Wurde durch Belichtung einer Lösung, die $5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l Joduracil und 10^{-2} Mol/l Cystamin enthielt, dargestellt. Zur Hydrierung wurden 3 ml dieser belichteten Lösung mit einer Spatelspitze Raney-Nickel versetzt und zwei Stdn. Wasserstoff durchgeperlt. Nach Abfiltrieren des Raney-Nickels wurden Radiochromatogramme angefertigt und mit den Radiochromatogrammen einer belichteten, nicht hydrierten Lösung verglichen.

Der Peak von **2** war nach dem Hydrieren verschwunden und nur noch ein Peak mit dem R_f -Wert von **3** nachweisbar. Die R_f -Werte für **3** in verschiedenen Laufmitteln wurden bereits beschrieben⁹.

Uracil

Eine Lösung mit Joduracil ($5 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) und Cysteamin ($5 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, pH = 8,5) wurde 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt, dabei wurde Stickstoff durchgeperlt. Anschließend wurde jeweils 1 l dieser Lösung mit 12 g Ionenaustauscher I (Firma Merck) eine Std. behandelt. Nach Abfiltrieren des Ionenaustauschers wurde bei 30 °C eingengt. Das zurückbleibende weiße Produkt wurde umkristallisiert und als Uracil identifiziert. IR- und UV-Spektren sowie R_f -Werte stimmten mit den Spektren und R_f -Werten von käuflichem Uracil überein.

Die pH-Werte der Lösungen wurden ohne Zusatz von Puffergemischen eingestellt. Die pH-Messungen erfolgten mittels einer Glaselektrode.

¹ G. HOTZ u. R. WALSER, Photochem. Photobiol. **12**, 207 [1970].

² G. NUCIFERA u. B. SMALLER, R. Remko, Rad. Res. **49**, 96 [1972].

³ E. GILBERT u. D. SCHULTE-FROHLINDE, Z. Naturforsch. **25b**, 492 [1970].

⁴ W. D. RUPP u. W. H. PRUSOFF, Biochem. biophys. Res. Commun. **18**, 158 [1965].

⁵ W. R. PRYOR u. P. R. PLATT, J. Amer. chem. Soc. **85**, 1496 [1963].

⁶ H. ISHIHARA u. S. Y. WANG, Biochemistry **5**, 2302 [1966].

⁷ K. C. SMITH u. R. T. APLIN, Biochemistry **5**, 2125 [1966].

⁸ E. GILBERT u. C. CRISTALLINI, Z. Naturforsch., im Druck.

⁹ E. GILBERT, G. WAGNER u. D. SCHULTE-FROHLINDE, Z. Naturforsch. **26b**, 209 [1971].