

- [33] D. R. Hutton u. G. J. Troup, *Nature* (London) **211**, 621 (1966).
- [34] Siehe z. B.: J. P. Dahl u. C. J. Ballhausen, *Advan. Quantum Chem.* **4**, 170 (1968).
- [35] a) V. Oshima, H. Abe, N. Nagano u. M. Nagusa, *J. Chem. Phys.* **23**, 1721 (1955); b) A. A. Forrester u. E. E. Schneider, *Proc. Phys. Soc. London* **69 B**, 833 (1956); c) W. Low, *ibid.* **69 B**, 837 (1956); d) G. D. Watkins, *Phys. Rev.* **113**, 29 (1959); e) T. Thi u. G. Kuwabara, *J. Phys. Soc. Jap.* **23**, 536 (1967).
- [36] H. Rose u. J. Lietz, *Naturwissenschaften* **41**, 448 (1954).
- [37] G. O. Brunner, H. Wondratschek u. F. Laves, *Z. Elektrochem.* **56**, 735 (1961).
- [38] H. Schulz, W. Hoffmann u. G. M. Muchow, *Z. Kristallogr. Kristallgeometrie Kristallphys. Kristallchem.* **134**, 1 (1971).
- [39] G. Lehmann, *Habilitationsschrift*, Universität Münster 1970.
- [40] W. S. Mortley, *Nature* (London) **221**, 359 (1969).
- [41] J. v. Vultée, *Neues Jahrb. Mineral. Abh.* **87**, 389 (1955).
- [42] J. v. Vultée u. J. Lietz, *Neues Jahrb. Mineral. Monatsh.* **1956**, 49.
- [43] P. M. Wright, J. A. Weil, T. Buch u. J. H. Anderson, *Nature* (London) **197**, 246 (1963).
- [44] W. R. Hechler, *Dissertation*, Universität Hamburg 1962.
- [45] G. W. Arnold, *J. Phys. Chem. Solids* **13**, 306 (1960).
- [46] M. C. M. O'Brien, *Proc. Roy. Soc. London A* **231**, 404 (1955).
- [47] R. Schnadt u. J. Schneider, *Phys. Kondens. Mater.* **11**, 19 (1970).
- [48] E. W. J. Mitchell u. E. G. S. Paige, *Phil. Mag.* **1**, 1085 (1955); *Proc. Phys. Soc. London B* **67**, 262 (1954).
- [49] H. Weber, *Z. Phys.* **13**, 392 (1951); W. C. Dash, *Phys. Rev.* **92**, 68 (1953).
- [50] A. Kats, *Thesis*, Universität Delft 1961.
- [51] H. U. Bambauer, G. O. Brunner u. F. Laves, *Schweiz. Mineral. Petrogr. Mitt.* **42**, 221 (1962).
- [52] A. Halperin u. J. E. Ralph, *J. Chem. Phys.* **39**, 62 (1963).
- [53] P. Schindler, *Dissertation*, Universität Zürich 1964.
- [54] J. H. Mackey Jr., *J. Chem. Phys.* **39**, 74 (1963).
- [55] F. J. Feigl u. J. H. Anderson, *J. Phys. Chem. Solids* **31**, 575 (1970).
- [56] H. U. Bambauer, *Schweiz. Mineral. Petrogr. Mitt.* **41/2**, 335 (1961).
- [57] H. U. Bambauer, G. O. Brunner u. F. Laves, *Z. Kristallogr. Kristallgeometrie Kristallphys. Kristallchem.* **116**, 173 (1961).
- [58] H. U. Bambauer, G. O. Brunner u. F. Laves, *Amer. Mineral.* **54**, 718 (1969).
- [59] B. Poty, *Sci. Terre Mem.*, No. 17 (1969).
- [60] H. U. Bambauer, *Habilitationsschrift*, ETH Zürich 1961.
- [61] C. S. Brown u. L. A. Thomas, *J. Phys. Chem. Solids* **13**, 337 (1960).
- [62] F. Augustine u. D. R. Hale, *J. Chem. Phys.* **29**, 685 (1958).
- [63] A. J. Cohen u. E. S. Hodge, *J. Phys. Chem. Solids* **7**, 4, 361 (1958).
- [64] M. R. Weil, C. R. 1. Réunion Inst. Opt. (1931).

## Reparaturvorgänge an der Desoxyribonucleinsäure

Von Jürgen Berndt<sup>[\*]</sup>

Sehr vielen Zellen ist es möglich, Schäden auf ihrer DNA, speziell durch UV-Licht gebildete Thymin-Dimere, zu erkennen und zu entfernen. Dies kann gelingen durch eine enzymatische lichtabhängige Spaltung der Dimeren in die Monomeren (Photoreaktivierung) oder, weit häufiger, durch die Dunkel-Reparatur, wobei die schadhafte Stelle gänzlich aus der DNA entfernt wird. Bei diesem Reparaturprozeß wird die DNA in unmittelbarer Nähe der Thymin-Dimeren durch eine Endonuclease „eingeschnitten“ („incision“). Durch die 5'→3'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase I (Kornberg-Enzym) werden Oligonucleotide, die das Thymin-Dimere enthalten, aus der DNA heraushydrolysiert. Die entstandene Lücke wird durch eine de-novo-Synthese mit Hilfe derselben DNA-Polymerase I sofort wieder geschlossen, wobei der Komplementärstrang als Matrice dient („excision-repair“). Der letzte Reparaturschritt ist die Knüpfung der Phosphodiester-Bindung zwischen neu synthetisiertem DNA-Stück und altem DNA-Strang durch eine DNA-Ligase. – Xeroderma-pigmentosum-Kranken fehlt infolge eines genetischen Defektes die Endonuclease; sie können daher Thymin-Dimere aus ihrer DNA nicht entfernen und sind extrem empfindlich gegen Sonnenlicht. – Alle bisherigen Befunde deuten darauf hin, daß die genetische Rekombination durch dieselben Enzyme ermöglicht wird wie die DNA-Reparatur.

### 1. Einleitung

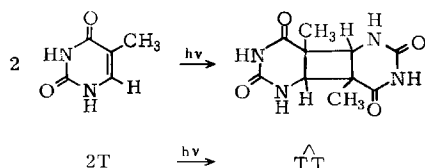
Das genetische Material aller Zellen besteht aus Desoxyribonucleinsäure (DNA). Zwei komplementäre DNA-Stränge sind durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden und bilden auf diese Weise eine DNA-Doppelhelix.

Die Komplementarität der beiden Stränge beruht darauf, daß die Adenin-Basen (A) des einen Stranges Wasserstoffbrücken zu den Thymin-Basen (T) des anderen ausbilden, ebenso bestehen Wasserstoffbrücken zwischen Guanin (G) und Cytosin (C). Bis vor kurzem nahm man an, daß irgendwelche Veränderungen an der DNA durch äußere Agentien (UV-Licht, Röntgen-Bestrahlung, mutagene Substanzen) zum Tod der Zelle oder in „günstigen“ Fällen zu mutierten Tochterzellen führen müßten. Das ist jedoch erstaunlicherweise nicht der Fall, sondern viele Zellen überleben solche Mißhandlungen ohne weiteres. Diese

[\*] Priv.-Doz. Dr. J. Berndt  
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH  
Institut für Biochemie, Zentralabteilung  
8 München 2  
Landwehrstraße 61

Zellen verfügen über eine Maschinerie, mit der Schäden an der DNA beseitigt und die ursprüngliche Form der DNA-Doppelhelix wieder hergestellt werden kann. Dieser Vorgang wird allgemein als DNA-Reparatur („DNA-repair“) bezeichnet.

Beukers und Berends<sup>[11]</sup> wiesen in UV-bestrahlten, gefrorenen Thymin-Lösungen Dimere des Thymins nach, in denen zwei Thymin-Moleküle unter Ausbildung eines Cyclobutanringes über C—C-Bindungen miteinander verknüpft



sind. Diese Dimere sind relativ stabil und können z. B. chromatographisch isoliert werden.

Auch bei der Bestrahlung von DNA mit UV-Licht (260 nm) kommt es innerhalb eines DNA-Stranges zur Ausbildung von Thymin-Dimeren, und zwar an Stellen, an denen zwei Thymin-Basen in einem DNA-Strang nebeneinander stehen<sup>[2]</sup>. Diese Dimere sind die wesentliche Ursache für die biologische Wirkung des UV-Lichts auf die DNA<sup>[2, 3]</sup>. Sie blockieren die DNA-Replikation in vitro<sup>[4]</sup> und in vivo<sup>[5]</sup>; sie sind hauptsächlich verantwortlich für die bakterizide Wirkung des UV-Lichtes. Je mehr Thymin-Basen in der DNA eines Bakterienstammes enthalten sind, um so empfindlicher ist dieser gegen UV-Licht.

Durch UV-Bestrahlung kann es außer zur Bildung von Thymin-Dimeren in der DNA auch zur Verknüpfung von zwei Cytosin-Molekülen und/oder einem Thymin- und einem Cytosin-Molekül kommen<sup>[6, 7]</sup>, jedoch in geringerem Ausmaß<sup>[6]</sup>. In *Escherichia coli* (*E. coli*) fanden Setlow und Carrier<sup>[8]</sup> folgende (relative) Mengen an Dimeren:  $\hat{\text{T}}\hat{\text{T}}$  50%,  $\hat{\text{C}}\hat{\text{T}}$  40%,  $\hat{\text{C}}\hat{\text{C}}$  10%. Nach hohen Bestrahlungsdosen ist die Menge an  $\hat{\text{T}}\hat{\text{T}}$  größer, speziell bei Anwendung kurzer Wellenlängen. Eine Dimerisierung von Thymin-Molekülen in gegenüberliegenden DNA-Strängen scheint nicht vorzukommen<sup>[9]</sup>.

Durch die DNA-Reparatur werden also Thymin-Dimere und ähnliche Veränderungen aus der DNA entfernt. Hierfür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Die Photoreaktivierung
2. Die Dunkel-Reparatur.

Diese Vorgänge werden im folgenden besprochen.

## 2. DNA-Reparatur

### 2.1. Photoreaktivierung

Kelner beobachtete 1949, daß Kulturen von *Streptomyces griseus*<sup>[10]</sup>, *Penicillium notatum* sowie Hefezellen<sup>[11]</sup> nach einer UV-Bestrahlung weit besser überlebten, wenn sie

[\*]  $\hat{\text{T}}\hat{\text{T}}$ ,  $\hat{\text{C}}\hat{\text{T}}$  und  $\hat{\text{C}}\hat{\text{C}}$  werden in diesem Fortschrittsbericht zusammenfassend als „Dimere“ bezeichnet.

anschließend noch mit sichtbarem Licht bestrahlt wurden. Diese „Photoreaktivierung“ wurde dann bei einer großen Zahl von Mikroorganismen gefunden<sup>[12]</sup>. Für die UV-Bestrahlung (Dimeren-Bildung) ist Licht der Wellenlänge 220–300 nm am wirkungsvollsten, während für den Vorgang der Photoreaktivierung sichtbares Licht der Wellenlänge 310–440 nm erforderlich ist<sup>[13]</sup>.

Den ersten Beobachtungen über eine in-vitro-Photoreaktivierung von UV-bestrahlter, gereinigter DNA durch einen *E. coli*-Extrakt<sup>[14]</sup> folgten ähnliche Untersuchungen von Rupert<sup>[14–18]</sup> mit Hefeextrakten. Aus den Ergebnissen ging erstmals klar hervor, daß es sich bei der Photoreaktivierung um einen enzymatischen Vorgang handelt.

Extrakte mit photoreaktivierender Aktivität aus Hefe und *E. coli* haben sehr ähnliche Spektren mit Absorptionsmaxima bei 355 und 385 nm, jedoch war nicht klar, ob dies tatsächlich die Maxima der „photon-absorbing unit“ des Enzyms oder des Enzym-Substrat-Komplexes sind<sup>[19]</sup>.

Nachdem es kürzlich gelang<sup>[20]</sup>, ein DNA-photoreaktivierendes Enzym aus Hefe siebzigtausendfach anzureichern, konnten die Eigenschaften des Enzyms näher studiert werden. Es hat ein Molekulargewicht von 53000 und zwei spektrale Maxima: ein Anregungsmaximum bei 385 nm und ein Fluoreszenz-Emissions-Maximum bei 485 nm, die den chromophoren Gruppen zugeschrieben werden. Über diese Gruppen ist jedoch noch nichts Genaueres bekannt. Das Enzym hat offenbar keine sehr ausgeprägte Spezifität für die Spaltung von Dimeren, jedoch werden Thymin-Dimere am schnellsten gespalten<sup>[13]</sup>.

Das photoreaktivierende Enzym wirkt durch Übertragung von Energie, wobei die Nucleotid-Dimeren (speziell die des Thymins) in die Monomeren gespalten werden und die normale Adenin-Thymin-Paarung wieder möglich und die Funktionsfähigkeit der DNA wieder hergestellt ist.

UV-geschädigte RNA wird von dem photoreaktivierenden Enzym nicht angegriffen, dagegen können auch Dimere der einsträngigen DNA des Phagen  $\Phi\text{X174}$  in die Monomeren gespalten werden<sup>[13]</sup>. Die Doppelsträngigkeit der DNA scheint also keine notwendige Voraussetzung für die Wirksamkeit des Enzyms zu sein.

Die Photoreaktivierung ist vorwiegend im Reich der Mikroorganismen verbreitet, jedoch nicht auf diese beschränkt. Eine derartige Photoreaktivierung wurde auch in Säugetierzellen beobachtet<sup>[21–24]</sup>, und kürzlich konnte in Gewebekulturen von (Amerikanischem) Opossum und Ratten-Känguruh eine photoreaktivierende Enzymaktivität nachgewiesen werden<sup>[25]</sup>; das Enzym wurde jedoch nicht näher charakterisiert.

Da neuerdings ein einfacherer Test zur Aktivitätsbestimmung dieses Enzyms zur Verfügung steht<sup>[25a]</sup>, sollte es möglich sein, den Vorgang der Photoreaktivierung genauer zu studieren.

### 2.2. Die Dunkel-Reparatur („dark repair“)

Von weitaus größerer Bedeutung ist ein Reparaturvorgang, der als Dunkel-Reparatur bezeichnet wird – nicht etwa, weil er nur im Dunkeln vor sich geht, sondern weil Licht dabei keine Rolle spielt. Durch diese Art Reparatur

können nicht nur Dimere der Pyrimidin-Derivate – wie bei der Photoreaktivierung – sondern auch andere Schäden an der DNA beseitigt werden.

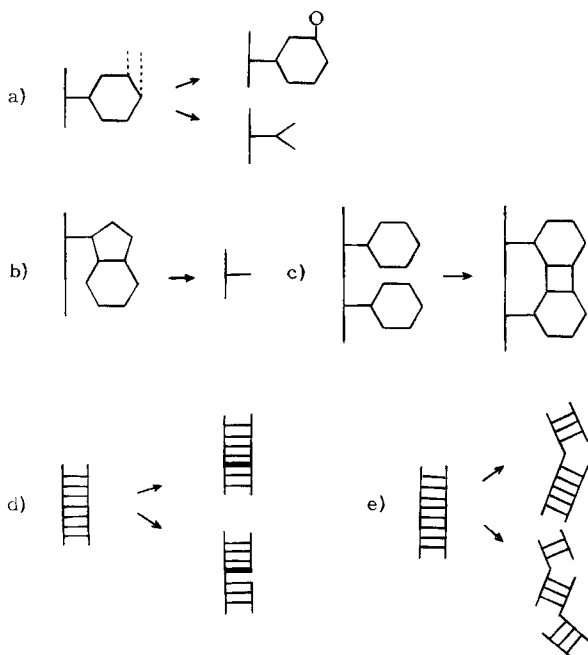


Abb. 1. Inaktivierende Veränderungen an der DNA (nach [26]). a) Basenveränderung, verursacht durch Hydroxylamin, Hydrazin, Methylenblau, Acridinorange. b) Basenabspaltung, verursacht durch Hydroxylamin, Hydrazin, hohe Temperatur, Alkylierung, Alkali. c) Dimerenbildung, verursacht durch UV-Licht. d) Vernetzung, verursacht durch salpetrige Säure, UV-Licht, Mitomycin, Stickstoff-Lost, niedrigen pH-Wert. e) Einzelkettenbrüche, verursacht durch  $^{32}\text{P}$ , Röntgen-Strahlen, Methyl-methansulfonat, Radikale allgemein.

In Abbildung 1 sind Veränderungen an der DNA aufgezeichnet, die eine Inaktivierung der DNA, d. h. die Unfähigkeit zur Reduplikation verursachen. Im Gegensatz zu den Wirkungen der mutagenen Substanzen können die inaktivierenden Veränderungen an der DNA letal sein, wenn sie nicht repariert oder sonstwie umgangen werden. Es sei in diesem Zusammenhang erwähnt, daß eine große Zahl der Substanzen, die inaktivierende Veränderungen an der DNA bewirken, als carcinogen bekannt sind.

Hill<sup>[27]</sup> isolierte 1958 aus dem strahlenresistenten *E. coli* B/r eine Mutante B<sub>s-1</sub>, die 50- bis 100-mal empfindlicher gegenüber UV-Licht ist (siehe Abb. 2) als der Elternstamm.

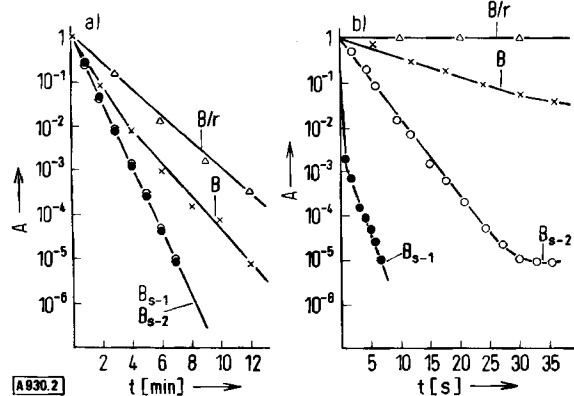


Abb. 2. Anteil A überlebender Bakterien mehrerer *E. coli*-Stämme a) nach Röntgen- und b) nach UV-Bestrahlung (nach [28]).

Einen anderen UV-empfindlichen Stamm isolierten Howard-Flanders et al.<sup>[29]</sup> aus *E. coli* K 12. Diesen Stämmen ist es nicht möglich, die durch das UV-Licht verursachten Schäden (Dimere) aus der DNA zu beseitigen. Die Natur der biochemischen Defekte in diesen UV-empfindlichen Mutanten klärten Setlow und Carrier<sup>[30]</sup> sowie Boyce und Howard-Flanders<sup>[31]</sup> unabhängig voneinander in ihren klassischen Experimenten: Die Bakterien wurden auf einem Nährmedium gezüchtet, das  $^3\text{H}$ -Thymin enthielt; dieses wurde in die DNA eingebaut. Die Zellen wurden dann mit UV-Licht bestrahlt, wobei in Wildtyp und Mutante gleich viel Thymin-Dimere entstanden. Bei weiterem Wachstum der Bakterien (nun auf  $^3\text{H}$ -Thymin-freiem) Medium zeigte sich, daß die Radioaktivität in der DNA des Wildtyps wieder abnahm und in niedermolekularen Fraktionen auftauchte. Hydrolyse und chromatographische Auftrennung dieser niedermolekularen Fraktionen führten zu Thymin-Dimeren. Bei den UV-empfindlichen Mutan-

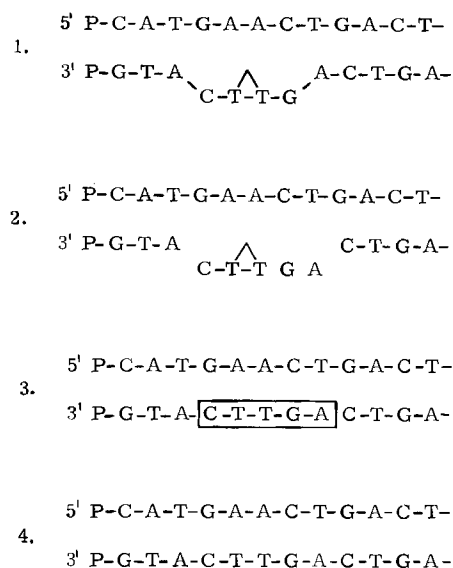


Abb. 3. Schema der Dunkel-Reparatur der DNA („cut and patch“-Mechanismus), Erklärungen siehe Text.

ten waren diese Thymin-Dimere nicht nachweisbar, d. h. den Mutanten fehlt das Enzym zum Entfernen der Thymin-Dimere aus der DNA.

Während bei der Photoreaktivierung die Dimere im Molekülverband in die Monomeren gespalten werden, wird durch die Dunkel-Reparatur die schadhafte Stelle aus der DNA gänzlich entfernt. Hierbei müssen folgende Schritte vollzogen werden (siehe Abb. 3):

1. Einschnitten des DNA-Stranges an der schadhaften Stelle (Endonuclease-Reaktion, „incision“),
2. Herausschneiden der schadhaften Stelle (Exonuclease-Reaktion, „excision“),
3. Einfügen von Nucleotiden in die entstandene Lücke, wobei der komplementäre ungeschädigte DNA-Strang als Matrize dient (Polymerase-Reaktion, „repair-replication“),
4. Zusammenfügen der Phosphodiester-Bindungen im reparierten DNA-Strang (Ligase-Reaktion, „joining“).

### 2.2.1. Endonuclease-Reaktion („incision“)

Extrakte aus *Micrococcus lysodeikticus* und *Neurospora crassa*<sup>[32]</sup> verursachen die Bildung von Einzelstrangbrüchen in DNA mit dimeren Pyrimidin-Derivaten, wobei die Zahl der neu gebildeten Kettenbrüche etwa der Zahl der Dimeren entspricht<sup>[33]</sup>. Inzwischen ist die Zahl der Endonucleasen, die allein aus *E. coli* isoliert wurden, auf fünf gestiegen<sup>[34–40a, 69]</sup>; sie sind jedoch nicht alle unbedingt spezifisch für eine DNA mit dimeren Pyrimidin-Derivaten.

Eine Endonuclease, die speziell bei Reparaturvorgängen an der DNA eine Rolle zu spielen scheint, isolierten Kaplan et al. aus *Micrococcus luteus* (*M. luteus*)<sup>[41]</sup> und untersuchten ihre Eigenschaften<sup>[41]</sup>. Das Enzym ist in in-vitro-Versuchen spezifisch für UV-bestrahlte doppelsträngige DNA und hat eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) für dieses Substrat von  $1,25 \times 10^{-5}$  mol/l. Native DNA, bestrahlte denaturierte und unbestrahlte denaturierte DNA werden von diesem Enzym nicht angegriffen. Jedoch kann eine native DNA, die mit  $\gamma$ -Strahlen ( $^{60}\text{Co}$ ) bestrahlt wurde, als Substrat dienen<sup>[41a]</sup>. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Endonuclease nicht absolut spezifisch für UV-Schäden ist. Das Molekulargewicht beträgt 15000. Im UV-Bereich von  $10^4$ – $10^5$  erg/mm<sup>2</sup> besteht eine lineare Beziehung zwischen der Zahl der gebildeten Dimeren und der Zahl der Einzelkettenbrüche, d.h. pro Dimeres entsteht ein Kettenbruch. Dabei ist der Kurvenverlauf bei DNA aus *E. coli* und *M. luteus* sehr ähnlich, lediglich die Geschwindigkeit der Reaktion ist verschieden (Abb. 4) – möglicherweise eine Folge geringeren Dimeren-Gehaltes der *M. luteus*-DNA.

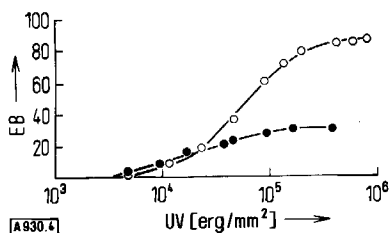


Abb. 4. Bildung von Einzelkettenbrüchen (EB) durch die Endonuclease aus *M. luteus*, angegeben als pmol gespaltene Phosphodiester-Bindungen. Als Substrat diente  $^{32}\text{P}$ -markierte, UV-bestrahlte *E. coli*- (○—○) und *M. luteus*-DNA (●—●) (nach [42]).

Diese UV-Endonuclease hydrolysiert eine einzelne Phosphodiester-Bindung in 5'-Position zum Photoprodukt. Dabei entsteht eine freie 3'-Phosphatgruppe an der DNA und eine 5'-OH-Gruppe entweder direkt am Photoprodukt oder ein Nucleotid von diesem entfernt. Es werden jedoch keine Nucleotide abhydrolysiert; hierfür ist eine UV-Exonuclease (siehe Abschnitt 2.2.2) erforderlich. Eine Anreicherung der UV-spezifischen *M. luteus*-Endonuclease beschrieben kürzlich auch Nakayama et al.<sup>[43]</sup>. Diese Befunde sind eine wesentliche Stütze für die geforderte Eigenschaft des Enzyms, daß es Veränderungen auf der DNA „erkennen“ können muß.

Sehr ähnliche Eigenschaften weist eine Endonuclease aus T4-infiziertem *E. coli* auf<sup>[39]</sup>. Dieses Enzym ist ebenfalls spezifisch für UV-bestrahlte DNA; native oder denaturierte

DNA wird nicht angegriffen. *E. coli*-Enzym und *M. luteus*-Enzym werden durch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aktiviert, sind aber nicht streng abhängig von ihnen<sup>[39, 42]</sup>.

Die UV-spezifische Endonuclease ist bei in-vivo-Reparaturvorgängen an der DNA erforderlich, wie kürzlich mit *M. luteus*-Mutanten gezeigt wurde<sup>[44]</sup>: Während der Wildtyp nach UV-Bestrahlung zu 100% überlebte, lag der Anteil bei der Mutante  $\text{Uvr}_7^- \text{end}^-$  bei 0,01%; in dieser Mutante war keine Endonuclease-Aktivität nachweisbar (Abb. 5). Allerdings gibt es auch Mutanten, die trotz niedriger

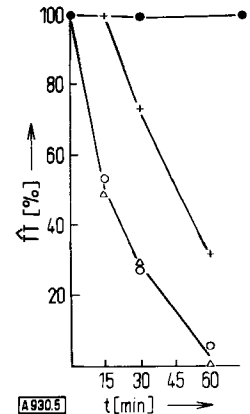


Abb. 5. Entfernung von Thymin-Dimeren aus der DNA der *M. luteus*-Mutanten  $\text{Uvr}_7^- \text{end}^-$  (●—●),  $\text{Uvr}_{70}^- \text{end}^+$  (△—△) und des Wildtyps (○—○). Der Stamm  $\text{Uvr}_7^- \text{end}^-$  hat keine Endonuclease und entfernt auch keine Dimeren, Wildtyp und  $\text{Uvr}_{70}^- \text{end}^+$  entfernen in 60 min praktisch alle Dimeren (nach [44]). t ist die Zeit nach der UV-Bestrahlung.

Endonuclease-Aktivität zu 100% überleben oder – bei anderen *M. luteus*-Mutanten<sup>[45]</sup> – geringe UV-Empfindlichkeit trotz gänzlich fehlender Endonuclease-Aktivität.

Obwohl die UV-Endonuclease spezifisch für UV-bestrahlte native DNA ist, weiß man noch nicht, welche spezielle Stelle der bestrahlten DNA vom Enzym erkannt wird. Wenn für die Aktivität des Enzyms Dimere unbedingt erforderlich sind, ist es unverständlich, wie die beobachteten Reparaturvorgänge nach Einwirkung von z. B. Methylmethansulfonat, Mitomycin und  $\text{HNO}_2$  erfolgen sollten, es sei denn, es gibt hierfür andere Endonucleasen. Eine Endonuclease II aus *E. coli*, die nur alkylierte DNA, nicht aber bestrahlte DNA angreift, konnte in der Tat nachgewiesen werden<sup>[46]</sup>. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Endonucleasen die durch die genannten Agentien verursachten räumlichen Deformationen an der DNA erkennen. Damit käme ihnen eine allgemeinere Funktion bei der Dunkel-Reparatur zu.

### 2.2.2. Exonuclease- und Polymerase-Reaktion („excision-repair“)

Nach dem Einzelkettenbruch („incision“) wird das Thymin-Dimere oder die veränderte Base durch eine exonucleolytische Reaktion herausgeschnitten. Aus *M. luteus* wurde eine Exonuclease isoliert<sup>[41, 42]</sup>, die speziell solche DNA-Abschnitte abbaut, an denen durch Endonucleasen Einzelkettenbrüche entstanden waren. Das Enzym hydrolysiert in vitro unbestrahlte und bestrahlte hitzedenaturierte DNA aus *E. coli*; native DNA, bestrahlte native DNA

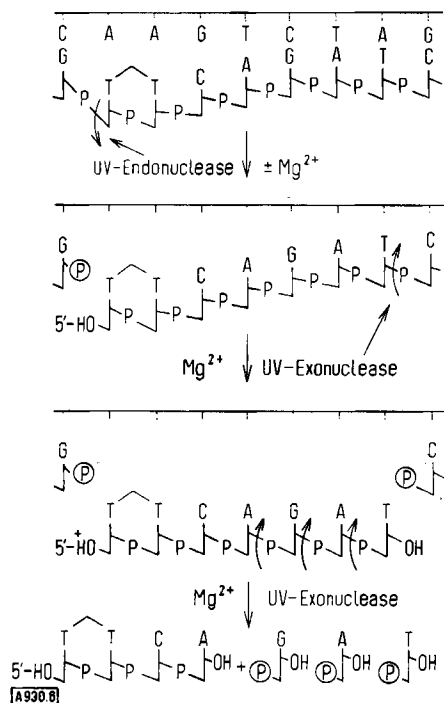


Abb. 6. Wirkungsweise der UV-spezifischen Endo- und Exonuclease aus *M. luteus* (nach [42]).

sowie RNA werden nicht angegriffen.  $K_m$  für bestrahlte denaturierte DNA beträgt  $4.5 \times 10^{-6}$  mol/l<sup>[42]</sup>. Im Gegensatz zur UV-Endonuclease ist die UV-Exonuclease abhängig von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Pro Einzelkettenbruch werden bei *E.-coli*-DNA etwa sieben, bei *M.-luteus*-DNA etwa zehn Nucleotide abhydrolysiert. Dabei werden zunächst Oligonucleotide freigesetzt, die dann durch dasselbe Enzym zu 5'-Mononucleotiden abgebaut werden (siehe Abb. 6). Solche Oligonucleotide, die die Thymin-Dimeren enthalten, wurden erstmals auch von *Setlow* und *Carrier*<sup>[30]</sup> in ihren grundlegenden Experimenten nachgewiesen.

In der durch die Exonuclease-Reaktion gebildeten DNA-Lücke steht auf einer Seite eine freie 3'-Phosphatgruppe (von der Endonuclease-Reaktion), auf der anderen Seite eine 5'-Phosphatgruppe. Der Grad des DNA-Abbaus ist bei verschiedenen Bakterien und deren Mutanten sehr unterschiedlich: Bei dem enorm strahlenresistenten *Micrococcus radiodurans* (nach 500 krad Röntgen-Strahlen überleben noch 100%!) können bis zu 20% der DNA abgebaut werden (vgl.<sup>[128]</sup>). Trotz dieses erheblichen Abbaus ist einsträngige DNA bei keinem Bakterienstamm nachgewiesen worden. Die durch die kombinierte Wirkung von Endo- und Exonuclease gebildete DNA-Lücke wird offenbar in vivo durch eine de-novo-DNA-Synthese sofort wieder geschlossen.

Es sind mehrere Exonucleasen bekannt<sup>[47, 69]</sup>, die DNA verschiedener Herkunft mehr oder weniger stark abbauen; aufgrund neuerer Untersuchungen über die DNA-Polymerase ist es aber fraglich, ob die Exonucleasen überhaupt eine von der Polymerase isolierte Wirkung beim Reparaturvorgang entfalten.

*Kelly et al.*<sup>[48]</sup> konnten nämlich zeigen, daß die DNA-Polymerase aus *E.coli* eine Exonuclease-Aktivität enthält, die ein integrierter Bestandteil der Polymerase und keine

Fremdaktivität einer begleitenden Exonuclease ist. Diese im Kornbergschen Laboratorium verwendete DNA-Polymerase entfaltete eine 5'→3'-Exonuclease-Aktivität mit bestrahlter Polydesoxythymidylsäure als Modell-Substrat, wobei die Thymin-Dimeren in Form von Oligonucleotiden entfernt wurden.

Oligonucleotide wurden auch nach Behandlung einer bestrahlten *E.-coli*-DNA mit DNA-Polymerase gefunden. Nach Einführung eines „nicks“ durch Pankreas-DNAse<sup>[48]</sup> wurden nach Einwirkung der DNA-Polymerase Oligonucleotide mit einer Kettenlänge von 3–8, die die Thymin-Dimeren enthielten, isoliert. Eine exonucleolytische Aktivität konnte auch in der *M.-luteus*-DNA-Polymerase nachgewiesen werden<sup>[49]</sup>, wobei die Exonuclease die DNA ebenfalls vom 5'-Ende her angreift und in diesem Fall Dinucleotide entstehen.

Durch teilweise Proteolyse hochgereinigter DNA-Polymerase aus *E.coli* konnte, wiederum hauptsächlich im Kornbergschen Laboratorium, die Exonuclease-Aktivität von der Polymerase abgetrennt werden<sup>[50–51b]</sup>. Die intakte Polymerase hat ein Molekulargewicht von 109000. Durch Proteolyse entstehen zwei Fragmente: ein großes Fragment (Mol.-Gew. 76000), das die Polymerase und eine 3'→5'-Exonuclease enthält, und ein kleineres Fragment (Mol.-Gew. 36000), das nur die 5'→3'-Exonuclease-Aktivität enthält<sup>[51a, 51b]</sup>.

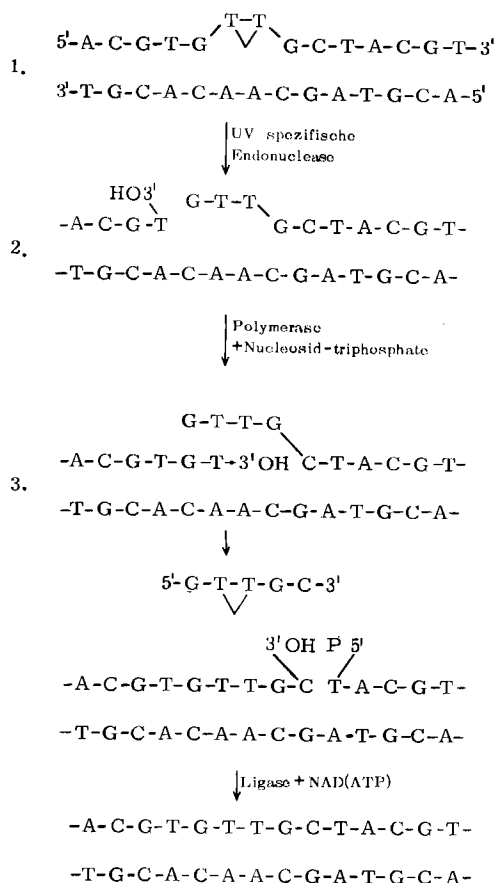
Das große Fragment ist in der Lage, die DNA-Synthese in eingeschnittener („nicked“), doppelsträngiger DNA durchzuführen, ohne den Strang oberhalb des Wachstumspunktes abzubauen. Es hat außerdem eine 3'→5'-Exonuclease-Wirkung auf einzel- und doppelsträngige DNA, wobei Mononucleotide entstehen. Dieses große Fragment hat also die für die Wieder-Schließung der Lücke („gap“) entscheidende Polymerase-Wirkung.

Das kleine Fragment hat die für die Bildung der Lücke erforderliche 5'→3'-Exonuclease-Aktivität. Durch das Enzym werden falsche DNA-Regionen (wie z.B. Thymin-Dimere) aus der DNA entfernt, es kann aber auch intakte DNA zu Mono- und Oligonucleotiden abbauen. Es wird durch Nucleosid-triphosphate, die die Polymerisation stimulieren, nicht aktiviert.

An der Stelle eines Einschnittes in der DNA binden sich die beiden Fragmente aneinander und können auf diese Weise die koordinierte Exonuclease-Polymerase-Wirkung des intakten Enzyms ausüben.

Die oben erwähnte 3'→5'-Exonuclease-Wirkung der DNA-Polymerase besteht offenbar darin<sup>[51c]</sup>, eventuell falsch in die reparierte DNA eingebaute Nucleotide wieder zu entfernen. Diese in der Polymerase enthaltene Exonuclease hat also eine „proofreading or error correcting function“<sup>[51a, 51c]</sup> und setzt damit wohl den i-Punkt auf dieses Wunderenzym.

Nach dem Herausschneiden des schadhafte DNA-Teils durch die Exonuclease werden in fast simultaner Reaktion<sup>[52]</sup> in die entstandene DNA-Lücke die geeigneten Nucleosid-triphosphate durch die DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung wieder eingefügt. Dabei dient der Komplementärstrang als Matrize. Dieser Replikations-Vorgang ist von *Kornberg* ausführlich beschrieben wor-



**Abb. 7. Schematische Darstellung des „patch and cut“-Mechanismus (vgl. auch Abb. 3). Die entstandene Lücke in der DNA wird sofort wieder geschlossen.**

den<sup>[52]</sup>; es soll hier nicht nochmals darauf eingegangen werden.

Der oben erwähnte Prozeß des nahezu gleichzeitigen Heraus-schneidens und Reparierens („excision-repair“, „patch and cut“<sup>[53, 54]</sup>, Abb. 7) scheint den Vorgängen bei der Reparatur *in vivo* am ehesten zu entsprechen und würde das Nicht-Auftreten von Einzelstrang-DNA bei diesem Vorgang erklären. Die von Kaplan et al.<sup>[41, 42]</sup> isolierte polymerase-freie UV-Exonuclease scheint *in vivo* ebenfalls Teil eines Exonuclease-Polymerase-Enzymkomplexes zu sein: Harwood et al.<sup>[49]</sup> konnten Dinucleotide als Produkte einer exonucleolytischen Aktivität der *M. luteus*-DNA-Polymerase nachweisen; auch Miller und Wells,<sup>[49a]</sup> konnten eine Exonuclease-Aktivität in der Polymerase aus *M. luteus* nachweisen und charakterisieren. Möglicherweise war dieser Komplex bei den früheren<sup>[41, 42]</sup> Isolierungs- und Reinigungsprozeduren in die Komponenten zerfallen.

Durch die Entdeckung von *DeLucia* und *Cairns*<sup>[55]</sup> sind erstmals Zweifel aufgetaucht, ob die Kornberg-Polymerase bei der genetischen Reduplikation eigentlich erforderlich ist und ob dieses Enzym nicht in vivo vielmehr die Funktion eines Reparatur-Enzyms hat. *DeLucia* und *Cairns*<sup>[55]</sup> und kurz darauf auch andere Gruppen<sup>[56-61]</sup> konnten Mutanten von *E.coli* isolieren, die überhaupt keine DNA-Polymerase-Aktivität (gemessen durch Nucleosid-triphosphat-Einbau in DNA) enthielten. Diese Mutanten (pol A<sup>-</sup>) wuchsen ohne DNA-Polymerase durch-

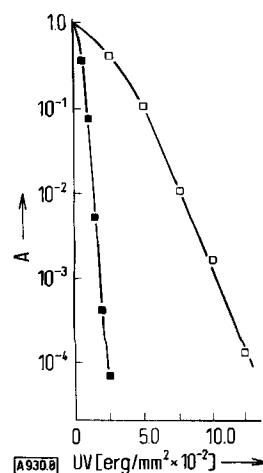


Abb. 8. Anteil A überlebender Bakterien vom *E.-coli*-Wildtyp W 3110 (—□—□—) und Polymerase-I-(=Kornberg-Enzym)-freier Mutante P 3478 (—■—■—) (nach [59]).

aus normal und reproduzieren ihre DNA auf normale Weise. Sie bewerkstelligen dies mit Hilfe der DNA-Polymerase II<sup>[62-64]</sup> oder DNA-Polymerase III<sup>[62, 65]</sup> ohne Polymerase I (Kornberg-Enzym). Diese Mutanten sind auffällig empfindlicher gegen UV-Licht als die Elternstämme<sup>[55, 58-60]</sup> (siehe Abb. 8). Diese höhere UV-Empfindlichkeit rührt – zumindest in einigen Fällen<sup>[58-60]</sup> – daher, daß diesen Mutanten Teile des Enzymsystems (speziell Polymerase I) fehlen, durch das Dimere aus der DNA entfernt werden. Es hat den Anschein, daß die DNA-Polymerase I bei der normalen DNA-Reduplikation entbehrlich ist und tatsächlich die Rolle eines Reparatur-Enzyms spielt.

### 2.2.3. Ligase-Reaktion („joining“)

Letzter Schritt des Reparatur-Prozesses ist die Knüpfung einer Phosphodiester-Bindung zwischen neu eingesetztem DNA-Teilstück und altem DNA-Strang (siehe Abb. 7). Ein Enzym, das vorgebildete Polynucleotide durch Phosphodiester-Bindung miteinander verknüpft, wurde 1967 fast gleichzeitig von mehreren Arbeitsgruppen in Bakterien entdeckt: Knüpfung einer kovalenten Bindung und dadurch Bildung von circularer DNA in  $\lambda$ -Phagen-infiziertem *E.coli*<sup>[66]</sup>, Heilung von Einzelkettenbrüchen in T4-infiziertem *E.coli*<sup>[67]</sup>, schließlich Anreicherung eines „polynucleotide-joining enzym“ aus *E.coli*<sup>[68]</sup>. Dieses Enzym, meist als DNA-Ligase bezeichnet, wurde inzwischen in mehreren Organismen nachgewiesen und angereichert<sup>[69]</sup> und seine Wirkungsweise aufgeklärt. Während alle bisher untersuchten Ligasen spezifisch für dieselben DNA-Substrate sind und dieselben DNA-Endprodukte bilden, besteht zwischen dem Enzym aus *E.coli* und den anderen Ligasen ein interessanter Unterschied bezüglich ihres Cofaktor-Bedarfes: Während das *E.coli*-Enzym Nicotinamid-adenindinucleotid (NAD) benötigt<sup>[70, 71]</sup>, brauchen die phageninduzierten Ligasen und die Säugetierligasen Adenosintriphosphat (ATP) als Cofaktor<sup>[72-74]</sup>.

Die Wirkungsweise der DNA-Ligase ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. Im ersten Reaktionsschritt reagiert das Enzym mit ATP oder NAD, wobei der Enzym-Adenosinmonophosphat-Komplex (E-AMP) und anorganisches Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) bzw. Nicotinamid-mononucleotid

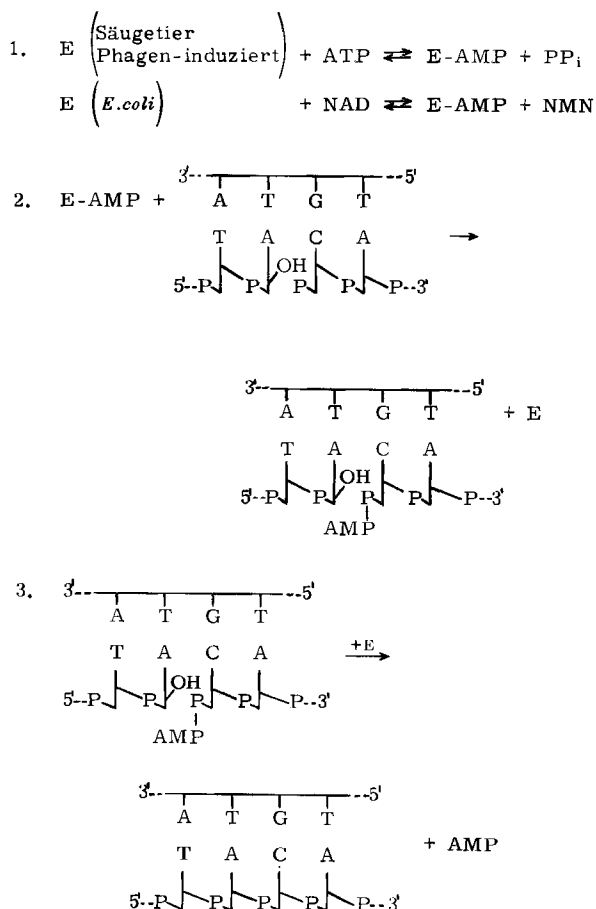


Abb. 9. Wirkungsweise der DNA-Ligase (nach [69]).

(NMN) entstehen. Im zweiten Reaktionsschritt reagiert E-AMP mit einer DNA-Kette unter Bildung einer Pyrophosphatbindung, wobei sich die 5'-Phosphatgruppe der DNA mit der Phosphatgruppe des AMP umsetzt. Im letzten Schritt schließlich wird die Bindung durch das Enzym geknüpft und dabei AMP wieder in Freiheit gesetzt.

Der Ligase-AMP-Komplex (E-AMP in Abb. 9) konnte in *E.coli* sowie in T4-infizierten *E.coli* durch übliche Trennungsmethoden nachgewiesen und identifiziert werden<sup>[73, 75–77]</sup>. Die Bindung zwischen Enzym und AMP ist kovalent: *Gumport* und *Lehman*<sup>[78]</sup> konnten kürzlich nachweisen, daß das AMP über seine Phosphatgruppe an eine ε-Aminogruppe des Lysins an das Ligasemolekül (aus *E.coli*) gebunden ist.

In einem *E.coli*-Stamm, der NAD zum Wachstum benötigt, jedoch zeitweilig (2.5 Std.) ohne NAD weitergezüchtet wird, ist die Ligase-Aktivität zwar normal<sup>[78a]</sup>, die DNA-Synthese jedoch gestört. Ein Zusatz von NAD zum Nährmedium normalisiert die DNA-Synthese wieder.

Auch das DNA-AMP-Zwischenprodukt konnte, wenn auch mit einigen Schwierigkeiten, nachgewiesen werden<sup>[79]</sup>.

Für die enzymatische Wirksamkeit der Ligase ist eine Doppelhelix-Struktur der DNA mit einem Einzelkettenbruch erforderlich, wobei 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen nebeneinander stehen müssen<sup>[68, 71, 73]</sup>. Eine Spezifität für ein spezielles Nucleotid besteht anscheinend nicht<sup>[80]</sup>.

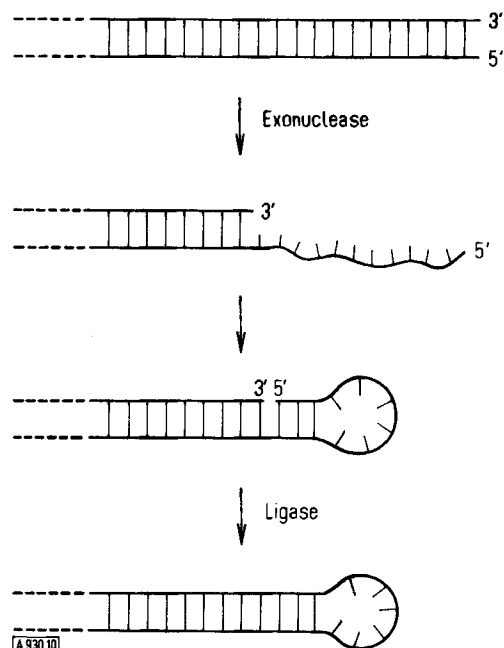


Abb. 10. Bildung von circularer DNA durch Exonuclease und Ligase in T4-Phagen-infiziertem *E. coli*.

Das Enzym kann alle Arten von Einzelkettenbrüchen, gleichgültig wie sie entstanden sind, heilen<sup>[69]</sup>; Voraussetzung ist die Erfüllung der obigen Bedingungen. Diese sind anscheinend auch dann erfüllt, wenn zwei komplementäre DNA-Stränge zu einer circularen DNA verknüpft werden<sup>[66, 81, 81a]</sup>, wie es in Abbildung 10 dargestellt ist. Schließlich spielte die Ligase eine hervorragende Rolle bei den großartigen Synthesen der Alanin-Transfer-RNA (t-RNA<sup>Ala</sup>) im Laboratorium *Khoranas* (vgl.<sup>[82]</sup>).

In neuerer Zeit konnten eine Reihe von Mutanten mit mehr oder weniger stark veränderter Ligase-Aktivität isoliert werden. *Pauling* und *Hamm*<sup>[83, 84]</sup> isolierten eine wärme- und strahlenempfindliche *E.coli*-Mutante, die Dimere aus ihrer DNA entfernen und die Lücke wieder füllen kann; dabei entsteht aber keine normale DNA, sondern relativ kleine DNA-Fragmente<sup>[84]</sup>. Dieser Mutante fehlt die DNA-Ligase. Drei andere *E.coli*-Mutanten<sup>[85]</sup> enthalten Ligase-Aktivitäten von 40–150% bei 30°C, jedoch nur 4–14% bei 42°C. In zwei dieser Mutanten war die Menge an Enzym-AMP-Komplex (siehe Abb. 9) verringert, die dritte Mutante (150% Aktivität bei 30°C, 4% bei 42°C) wurde bei 42°C UV-empfindlich. Wie *Modrich* und *Lehman*<sup>[86]</sup> nachwiesen, wird bei wärmeempfindlichen Mutanten eine thermolabile Ligase gebildet. Es ist also nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität des Enzyms verändert.

#### 2.2.4. In-vitro-Reparatur einer DNA

Zu den (seltenen) Höhepunkten im Leben des Biochemikers gehört die vollständige in-vitro-Nachahmung eines in-vivo-Vorganges. Einer holländischen Arbeitsgruppe<sup>[87]</sup> ist es kürzlich gelungen, den gesamten Reparaturprozeß mit Hilfe der gereinigten Enzyme in vitro nachzuvollziehen: <sup>3</sup>H-markierte DNA aus *Bacillus subtilis* wurde in vitro UV-bestrahlt, wobei Dimere in der DNA entstehen. Diese geschädigte DNA wurde mit UV-spezifischer Endonuclease aus *M. luteus* (siehe Abschnitt 2.2.1) inku-

biert, wobei die DNA auf der 5'-Seite der Dimeren eingeschnitten wurde. Anschließend wurde die DNA mit DNA-Polymerase aus *E.coli*, den Triphosphaten der vier DNA-Basen sowie DNA-Ligase aus *E.coli* inkubiert. Die DNA wurde sodann entweder auf ihre biologische Wirksamkeit („transforming ability“) getestet oder sie wurde hydrolysiert und die Menge der durch den Reparaturvorgang entfernten Dimeren chromatographisch bestimmt.

Durch diese in-vitro-Reparatur konnte die biologische Wirksamkeit der bestrahlten DNA zu 50% wieder hergestellt werden; von den Dimeren wurden unter diesen Bedingungen etwa 25% aus der DNA entfernt. Trotz verschiedener Herkunft der Komponenten dieses in-vitro-Reparatursystems (*B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*) lief der gesamte Prozeß ab. Wenn für die Endonuclease-Reaktion statt der UV-spezifischen Endonuclease Pankreas-DNase eingesetzt wurde, erfolgte keine biologische Reaktivierung der DNA, d. h. es wurden keine Dimeren aus der DNA entfernt – ein Zeichen für die Spezifität der Endonuclease.

### 2.3. DNA-Reparatur in Säugetierzellen

Selbstverständlich wurden auch Säugetierzellen auf ihre Fähigkeit zur DNA-Reparatur getestet. Wenn auch die Zahl der entsprechenden Untersuchungen nicht sehr groß ist, lassen doch die bisherigen Befunde keinen Zweifel, daß auch in Zellen höherer Organismen dieser Prozeß stattfindet.

Durch Röntgen-Strahlen induzierte DNA-Brüche in Leukämiezellen<sup>[88, 88a]</sup>, UV-bedingte DNA-Veränderungen in „chinese hamster cells“<sup>[89, 90, 92]</sup>, durch UV- und Röntgen-Strahlen induzierte DNA-Schäden in HeLa-Zellkulturen<sup>[93]</sup>, Maus-Fibroblasten<sup>[94]</sup>, Lymphomazellen<sup>[95]</sup> und menschlichen Zellkulturen<sup>[96, 97–97b]</sup> werden repariert. Auch alkylierte DNA aus HeLa-Zellen kann repariert werden<sup>[91]</sup>. Bei diesen Reparaturvorgängen an Säugerzellen finden offenbar prinzipiell dieselben Vorgänge statt wie bei Mikroorganismen: Mit Hilfe von DNA-Exonuclease III und IV aus Kaninchenzellkernen wurden Dimere aus UV-bestrahlter DNA entfernt<sup>[98]</sup>. ATP-abhängige Ligase aus Lymphomazellen<sup>[74]</sup> repariert die DNA in gleicher Weise wie das *E.-coli*-Enzym.

### 2.4. DNA-Reparatur beim Menschen (Xeroderma pigmentosum)

Von besonderem Interesse ist naturgemäß die DNA-Reparatur beim Menschen. Daß dieser Vorgang beim Menschen tatsächlich stattfindet, wurde am Beispiel einer seltenen Krankheit, Xeroderma pigmentosum, indirekt nachgewiesen. Diese Krankheit ist erblich; Xeroderma-pigmentosum-Kranke sind extrem empfindlich gegenüber Sonnenlicht oder UV-Licht. Nach kurzer Sonneneinwirkung treten Symptome auf, wie sie bei normaler Haut nach starker Röntgen-Bestrahlung vorkommen, sehr häufig verbunden mit Hauttumoren. Die Krankheit wird nicht durch Anhäufung von lichtempfindlichen Produkten wie Hämatoporphyrinen in der Haut verursacht. Es handelt sich dabei, wie man heute weiß, um einen genetischen Defekt im DNA-reparierenden Apparat.

Die Natur des biochemischen Schadens bei Xeroderma pigmentosum wurde insbesondere durch die Untersuchungen von Cleaver<sup>[99–101]</sup> geklärt. Beim entscheidenden Experiment<sup>[100]</sup> wurde die DNA-Reparatur in Hautfibroblasten von Xeroderma-pigmentosum-Patienten nach zwei DNA-Schädigungen untersucht:

1. Die Fibroblasten wurden mit UV-Licht bestrahlt; dabei entstehen Dimere, speziell Thymin-Dimere, aber keine Kettenbrüche.
2. Die Fibroblasten wurden erst mit Röntgen-Strahlen bestrahlt, dabei entstehen Kettenbrüche (aber keine Dimere), und anschließend mit UV-Licht; dabei entstehen zusätzlich Dimere.

Zur Reparatur dieser Schäden sind im ersten Fall alle drei Reparaturschritte erforderlich: Einschneiden der DNA (Abschnitt 2.2.1), Exonuclease- und Polymerase-Reaktion (Abschnitt 2.2.2), Ligase-Reaktion (Abschnitt 2.2.3). Im zweiten Fall entfällt der erste Reparaturschritt, da das Einschneiden (= Kettenbruch) durch die Röntgen-Strahlen bereits besorgt wurde.

Es zeigte sich, daß nur solche Fibroblasten eine DNA-Reparatur ausführen können, bei denen zusätzlich zu den Thymin-Dimeren auch Kettenbrüche erzeugt worden waren (Fall 2). Fibroblasten, bei denen nur Dimere erzeugt worden waren (Fall 1), konnten ihre DNA nicht reparieren.

Damit wurde 1. (indirekt) bewiesen, daß es beim Menschen eine DNA-Reparatur gibt und 2. direkt bewiesen, daß Xeroderma-pigmentosum-Kranken die UV-spezifische Endonuclease fehlt.

Zu denselben Ergebnissen kamen wenig später Setlow et al.<sup>[102]</sup> Sie konnten nachweisen, daß normale Fibroblasten 70% der Dimeren in 24 Std. aus der DNA entfernen, zugleich erscheinen Einzelkettenbrüche, die dann wieder verschwinden. Bei Fibroblasten von Xeroderma-pigmentosum-Patienten werden weniger als 10% Dimere aus der DNA entfernt; es kam hier nicht zum Erscheinen und Verschwinden von Einzelkettenbrüchen. Inzwischen ist die Technik zur Messung der DNA-Reparatur in menschlichen Zellen zu erheblicher Perfektion weiterentwickelt worden<sup>[103]</sup>.

Es war erwähnt worden, daß bei Xeroderma-pigmentosum-Patienten sehr leicht Hautkrebs auftritt. Es ist möglich, daß die Anhäufung von Dimeren und anderen Produkten in der DNA der Hautzellen direkt oder indirekt die Transformation dieser Zellen zu Krebszellen verursacht oder sie dazu prädisponiert<sup>[102]</sup>. Jedenfalls konnte hier zum ersten Male gezeigt werden, daß Dimere per se etwas mit der Carcinogenese zu tun haben.

## 3. Genetische Rekombination

Das Studium von Reparaturvorgängen an der DNA ist nicht nur ein Hobby für Radiologen, sondern dieser Prozeß scheint einen anderen, in der Natur weit verbreiteten Vorgang zu ermöglichen: die genetische Rekombination. Hierbei „brechen“ zwei Chromosomen durch und wachsen über Kreuz wieder zusammen (siehe Abb. 11). Dazu müssen



Kettenbrüche erzeugt, Teile der DNA abhydrolysiert oder neu synthetisiert und Phosphodiester-Bindungen geknüpft werden. Es spielen sich also prinzipiell dieselben Vorgänge wie beim Reparaturprozeß ab, natürlich ohne Entfernung von Dimeren.

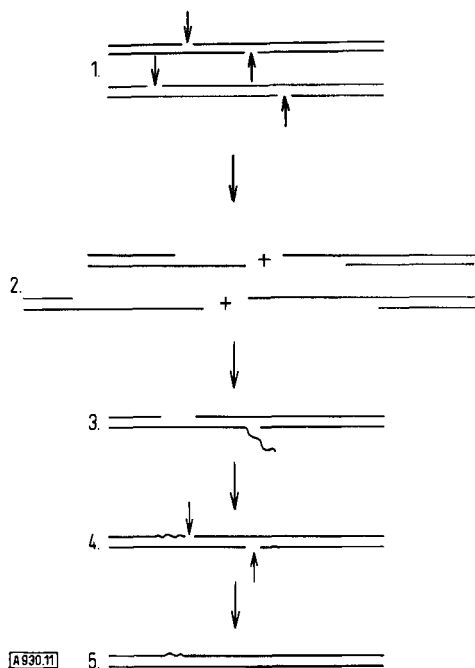


Abb. 11. Schema der genetischen Rekombination. Im 1. Schritt entsteht ein Kettenbruch (Ursache unbekannt). Im 2. Schritt wickelt sich die Doppelhelix ab, wobei komplementäre Nucleotidsequenzen frei werden. Im 3. Schritt treten homologe Regionen der beiden DNAs zusammen; es bilden sich rekombinierte Doppelstränge, die noch Lücken bzw. überlappende Segmente enthalten. Diese werden im 4. Schritt geschlossen („repair replication“) bzw. abhydrolysiert (Exonuclease). Die verbleibenden Einzelkettenbrüche werden im 5. Schritt durch Knüpfung einer Phosphodiester-Bindung (Ligase) verbunden. Das rekombinierte Molekül ist eine DNA-Doppelhelix, die aus Teilen der beiden Eltern-DNAs besteht.

Es ist unklar, wie bei der Rekombination die Brüche in der DNA (Chromosom) entstehen. Offenbar können derartige Brüche durch die Ligase nicht gleich wieder geschlossen werden. Möglicherweise spielen hierbei Endonucleasen eine Rolle<sup>[104]</sup>. Dagegen konnte die Beteiligung einer Exonuclease (Phage  $\lambda$ ) beim Rekombinationsprozeß nachgewiesen werden<sup>[69, 105]</sup>. Ebenso sprechen alle bisherigen Befunde<sup>[69]</sup> dafür, daß beim Rekombinationsvorgang die entstandenen Lücken (siehe Abb. 11) durch DNA-Neusynthese (am Komplementärstrang) geschlossen werden. Für die Knüpfung der Phosphodiester-Bindung als letzten Schritt des Rekombinationsprozesses ist offenbar dieselbe DNA-Ligase verantwortlich wie bei der Reparatur UV-geschädigter DNA<sup>[69]</sup>. Es gibt bisher zwar nur wenige experimentelle Ergebnisse, die für die Annahme sprechen, daß DNA-Reparatur und genetische Rekombination durch dasselbe Enzymsystem katalysiert werden, es gibt bis jetzt aber keines, das dieser Annahme grundsätzlich widerspricht. Zusätzlich werden diese Vorstellungen durch die Tatsache gestützt, daß rekombinations-negative Mutanten ( $rec^-$ ) zugleich weit empfindlicher gegenüber UV-Licht sind<sup>[7]</sup> als die Elternstämme.

#### 4. Schlußbetrachtungen

Die meisten der hier beschriebenen Befunde wurden durch in-vitro-Experimente erhalten, es bestehen aber keine Zweifel, daß die DNA-Reparatur in vivo prinzipiell gleich verläuft. Allerdings scheint es, zumindest in *E. coli*, zwei DNA-Reparatursysteme zu geben, von denen nur eines die Polymerase I (Kornberg-Enzym) benötigt<sup>[106]</sup>. Die von DeLucia und Cairns isolierten *E. coli*-Mutanten (pol A 1), die keine DNA-Polymerase I haben, sind zwar empfindlicher gegenüber UV-Licht als der Elternstamm, überleben die Bestrahlungsprozedur jedoch zu einem erheblichen Teil. Diese Mutanten verfügen über ein zweites Reparatursystem, das genetisch als „recA-pathway“ definiert und auch für die genetische Rekombination erforderlich ist<sup>[7]</sup>. Mit Hilfe dieses Systems können pol-A 1-Mutanten UV-induzierte Dimere aus ihrer DNA entfernen. Die Natur dieses Genproduktes ist nicht bekannt; es wird ein Enzym sein, das sich von der Polymerase I unterscheidet.

Nach Untersuchungen von Cooper und Hanawalt<sup>[108]</sup> wirkt die Polymerase I (Kornberg-Enzym) bei der Reparatur kleinerer Lücken, während das rec-System hauptsächlich zur Füllung größerer Lücken erforderlich ist. Jedes der beiden Reparatursysteme soll in der Lage sein, den Reparaturprozeß in Abwesenheit des anderen zu vollenden – was die Resistenz einiger polA 1-Stämme gegen UV-Bestrahlung erklären würde.

Natürlich versuchten Genetiker, eine Doppelmutante, pol A 1  $rec^-$ , zu produzieren<sup>[107]</sup>; ohne Erfolg; diese Mutante ist nicht lebensfähig. Es ist also entweder Polymerase I oder das rec-A-Genprodukt für das Wachstum unbedingt erforderlich. Dies bedeutet<sup>[107]</sup>, daß Lücken („gaps“) in DNA-Strängen während des normalen Wachstums und der normalen Teilung von *E. coli* auftreten und gleich wieder geschlossen werden.

Neben Fragen der genetischen Regulation ist unklar, wie das DNA-reparierende System „erkennt“, daß auf dem großen DNA-Molekül Schäden zu reparieren sind. Vermutlich geschieht dies aufgrund der Deformation der DNA. Gibt es eine Möglichkeit, daß das Reparaturenzym auf der DNA hin und her transportiert wird? Bei der starken Knäuelung der DNA in der Zelle wird allerdings bei dieser Vorstellung selbst die Phantasie der Molekularbiologen stark strapaziert.

Das Reparatursystem arbeitet mit einem sehr hohen Grad an Genauigkeit, doch besteht offenbar eine gewisse Toleranzbreite – sonst gäbe es keine Mutationen, und dies würde in eine evolutionäre Sackgasse führen. Anscheinend unterliegt auch der Reparaturvorgang an der DNA der Selektion während der Evolution.

Eingegangen am 27. März 1972 [A 930]

- [1] R. Beukers u. W. Berends, *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 550 (1960).
- [2] A. Wachter, *Progr. Nucl. Acid Res.* **1**, 369 (1963).
- [3] R. B. Setlow u. J. K. Setlow, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **48**, 1250 (1962).
- [4] F. J. Bollum u. R. B. Setlow, *Biochim. Biophys. Acta* **68**, 599 (1963).
- [5] R. B. Setlow, P. A. Swenson u. W. L. Carrier, *Science* **142**, 1464 (1963).
- [6] R. B. Setlow, W. L. Carrier u. F. J. Bollum, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **53**, 1111 (1965).

- [7] P. Howard-Flanders, *Annu. Rev. Biochem.* 37, 175 (1968).
- [8] R. B. Setlow u. W. L. Carrier, *J. Mol. Biol.* 17, 237 (1966).
- [9] D. Freifelder u. P. F. Davison, *Biophys. J.* 3, 97 (1963).
- [10] A. Kelner, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 35, 73 (1949).
- [11] A. Kelner, *J. Bacteriol.* 58, 511 (1949).
- [12] J. Jagger, *Bacteriol. Rev.* 22, 99 (1958).
- [13] J. K. Setlow, *Radiat. Res. Supplement* 6, 141 (1966).
- [14] S. H. Goodgal, C. S. Rupert u. R. M. Herriott in W. D. McElroy u. B. Glass: *The Chemical Basis of Heredity*. John Hopkins Press, Baltimore 1957, S. 341.
- [15] C. S. Rupert, *J. Gen. Physiol.* 43, 573 (1960).
- [16] C. S. Rupert, *J. Cellular Comp. Physiol. (Suppl. 1)* 58, 57 (1961).
- [17] C. S. Rupert, *J. Gen. Physiol.* 45, 703 (1962).
- [18] C. S. Rupert, *J. Gen. Physiol.* 45, 725 (1962).
- [19] D. L. Wulf u. C. S. Rupert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 237 (1962).
- [20] S. Minato u. H. Werbin, *Biochemistry* 10, 4503 (1971).
- [21] A. F. Rieck u. S. D. Carlson, *J. Cell. Comp. Physiol.* 46, 301 (1955).
- [22] E. M. F. Roe u. G. H. Stevens, *Photochem. Photobiol.* 4, 759 (1965).
- [23] B. E. Johnson, F. Daniels, jun., u. I. A. Magnus in A. C. Giese: *Photophysiology*. Academic Press, New York 1968, Bd. 4, S. 139.
- [24] J. S. Cook u. J. R. McGrath, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1359 (1967).
- [25] J. S. Cook u. I. D. Regan, *Nature* 223, 1066 (1969).
- [25a] J. S. Cook u. T. E. Worthy, *Biochemistry* 11, 388 (1972).
- [26] E. Freese u. E. B. Freese, *Radiat. Res. Supplement* 6, 97 (1966).
- [27] R. F. Hill, *Biochim. Biophys. Acta* 30, 636 (1958).
- [28] C. Streffer: *Strahlen-Biochemie*. Springer-Verlag, Berlin 1969, S. 37.
- [29] P. Howard-Flanders, R. P. Boyce u. L. Theriot, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 48, 2109 (1962).
- [30] R. B. Setlow u. W. L. Carrier, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51, 226 (1964).
- [31] R. P. Boyce u. P. Howard-Flanders, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 51, 293 (1964).
- [32] S. Linn u. J. R. Lehmann, *J. Biol. Chem.* 240, 1287, 1294 (1965).
- [33] B. Strauss, T. Seraski u. M. Robbins, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 56, 932 (1966).
- [34] J. R. Lehmann, G. G. Roussos u. E. A. Pratt, *J. Biol. Chem.* 237, 819 (1962).
- [35] F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* 11, 373 (1965).
- [36] E. C. Friedberg u. D. A. Goldthwait, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 62, 934 (1969).
- [37] M. Meselson u. R. Yuan, *Nature* 217, 1110 (1968).
- [38] P. D. Sadowsky u. J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* 244, 6182 (1969).
- [39] S. Yasuda u. M. Sekiguchi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1839 (1970).
- [40] P. J. Goldmark u. S. Linn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 434 (1970).
- [40a] M. S. Center, *J. Biol. Chem.* 247, 146 (1972).
- [41] J. C. Kaplan, S. R. Kushner u. L. Grossman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 144 (1969).
- [41a] M. C. Paterson u. R. B. Setlow, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2927 (1972).
- [42] J. C. Kaplan, S. R. Kushner u. L. Grossman, *Biochemistry* 10, 3315, 3325 (1971).
- [43] H. Nakayama, S. Okubu u. Y. Takagi, *Biochim. Biophys. Acta* 228, 67 (1971).
- [44] J. Mahler, S. R. Kushner u. L. Grossman, *Nature New Biol.* 234, 47 (1971).
- [45] S. Okubu, H. Nakayama, M. Sekiguchi u. Y. Takagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 973 (1970).
- [46] E. C. Friedberg, S. H. Hadi u. D. A. Goldthwait, *J. Biol. Chem.* 244, 5879 (1969).
- [47] J. R. Lehman, *Annu. Rev. Biochem.* 36, 645 (1967).
- [48] R. B. Kelly, M. R. Atkinson, J. A. Huberman u. A. Kornberg, *Nature* 224, 495 (1969).
- [49] S. J. Harwood, P. F. Schendel, L. K. Miller u. R. D. Wells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 595 (1970).
- [49a] L. K. Miller u. R. D. Wells, *J. Biol. Chem.* 247, 2667 (1972).
- [50] H. Klenow u. J. Henningsen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65, 168 (1970).
- [51] D. Brutlag, M. R. Atkinson, P. Setlow u. A. Kornberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 982 (1969).
- [51a] P. Setlow, D. Brutlag u. A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 247, 224 (1972).
- [51b] P. Setlow u. A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 247, 232 (1972).
- [51c] D. Brutlag u. A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* 247, 241 (1972).
- [52] A. Kornberg, *Science* 163, 1410 (1969).
- [53] R. H. Haynes, *Radiat. Res. Suppl.* 6, 8 (1966).
- [54] P. C. Hanawalt u. R. H. Haynes, *Sci. Amer.* 216, Nr. 2, S. 36 (1967).
- [55] P. DeLucia u. J. Cairns, *Nature* 224, 1164 (1969).
- [56] D. W. Smith, H. E. Schaller u. H. I. Bonhoeffer, *Nature* 226, 711 (1970).
- [57] R. Knippers u. W. Strätling, *Nature* 226, 713 (1970).
- [58] L. Kanner u. P. Hanawalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39, 149 (1970).
- [59] J. M. Boyle, M. C. Paterson u. R. B. Setlow, *Nature* 226, 708 (1970).
- [60] E. M. Witkin, *Nature New Biol.* 229, 81 (1971).
- [61] A. Klein u. U. Niebsch, *Nature New Biol.* 229, 82 (1971).
- [62] T. Kornberg u. M. L. Gefter, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 761 (1971).
- [63] R. Kreippen, *Nature* 228, 1050 (1970).
- [64] R. Moses u. C. Richardson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1565 (1970).
- [65] M. L. Gefter, Y. Hirota, T. Kornberg, J. A. Wechsler u. C. Barnoux, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 3150 (1971).
- [66] M. Gellert, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 148 (1967).
- [67] B. Weiss u. C. C. Richardson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1021 (1967).
- [68] B. M. Olivera u. J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1426 (1967).
- [69] Zusammenfassende Übersicht: C. C. Richardson, *Annu. Rev. Biochem.* 38, 795 (1969).
- [70] B. M. Olivera u. J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1700 (1967).
- [71] S. B. Zimmerman, J. W. Little, C. K. Oshinsky u. M. Gellert, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1841 (1967).
- [72] B. Weiss u. C. C. Richardson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1021 (1967).
- [73] A. Becker, G. Lynn, M. Gefter u. J. Hurwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1996 (1967).
- [74] T. Lindahl u. G. M. Edelman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 680 (1968).
- [75] B. M. Olivera, Z. W. Hall, Y. Anraku, J. R. Chien u. J. R. Lehman, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 33, 27 (1968).
- [76] B. Weiss u. C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 242, 4270 (1967).
- [77] B. Weiss, A. Thompson u. C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 243, 4556 (1968).
- [78] R. J. Gumport u. J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2559 (1971).
- [78a] R. Nozowa u. D. Mizuno, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 904 (1969).
- [79] B. M. Olivera, Z. W. Hall u. J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 237 (1968).
- [80] B. Weiss, A. Jaquemin-Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed u. C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 243, 4543 (1968).
- [81] B. Weiss, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65, 652 (1970).
- [81a] R. Silber, V. G. Malati u. J. Hurwitz, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 3009 (1972).
- [82] V. Sgaramella, J. H. van de Sande u. H. G. Khorana, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1468 (1970).
- [83] C. Pauling u. L. Hamm, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 1495 (1968).
- [84] C. Pauling u. L. Hamm, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1195 (1969).
- [85] M. Gellert u. M. L. Bullock, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 1580 (1970).
- [86] P. Modrich u. J. R. Lehman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1002 (1971).
- [87] H. L. Heijneker, H. Pannekoek, R. A. Oosterbaan, P. H. Pouwels, S. Bron, F. Arwert u. G. Venema, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 2967 (1971).
- [88] J. T. Lett, J. Caldwell, C. I. Dean u. P. Alexander, *Nature* 214, 790 (1967).
- [88a] A. T. Huang, W. B. Kremer, J. Lazlo u. R. B. Setlow, *Nature New Biol.* 240, 114 (1972).
- [89] J. E. Cleaver, *Int. J. Radiat. Biol.* 16, 277 (1969).

- [90] R. M. Humphray, B. A. Sedita u. R. E. Meyer, *Int. J. Radiat. Biol.* 18, 61 (1970).  
 [91] J. J. Roberts, A. R. Crathorn u. T. P. Brent, *Nature* 218, 970 (1968).  
 [92] J. A. Belli u. M. Shelton, *Science* 165, 490 (1969).  
 [93] R. B. Painter u. J. E. Cleaver, *Nature* 216, 369 (1967).  
 [94] M. Horikawa, O. Nikaido u. T. Sigakava, *Nature* 218, 489 (1968).  
 [95] M. Fox, S. R. Ayad u. B. W. Fox, *Int. J. Radiat. Biol.* 18, 101 (1970).  
 [96] J. B. Little, *Nature* 224, 804 (1969).  
 [97] R. B. Painter, J. S. Umber u. R. B. Young, *Radiat. Res.* 44, 133 (1970).  
 [97a] S. N. Buhl, R. B. Setlow u. J. D. Regan, *Int. J. Radiat. Biol.* 22, 417 (1972).  
 [97b] S. Bacchetti, A. van der Plas u. G. Valdhuisen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 662 (1972).  
 [98] T. Lindahl, *Eur. J. Biochem.* 18, 407 (1971).

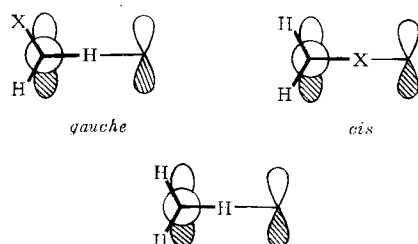
- [99] J. E. Cleaver, *Nature* 218, 652 (1968).  
 [100] J. E. Cleaver, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 63, 428 (1969).  
 [101] J. E. Cleaver, *Int. J. Radiat. Biol.* 18, 557 (1970).  
 [102] R. B. Setlow, J. D. Regan, J. German u. W. L. Carrier, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1035 (1969).  
 [103] J. D. Regan, R. B. Setlow u. R. D. Ley, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 708 (1971).  
 [104] P. J. Goldmark u. S. Linn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 434 (1970).  
 [105] E. Cassuto, T. Lash, K. S. Sriprakash u. C. M. Radding, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1639 (1971).  
 [106] M. Monk, M. Peacey u. J. D. Gross, *J. Mol. Biol.* 58, 623 (1971).  
 [107] J. D. Gross, J. Grunstein u. E. M. Witkin, *J. Mol. Biol.* 58, 631 (1971).  
 [108] P. K. Cooper u. P. C. Hanawalt, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1156 (1972).

## ZUSCHRIFTEN

### Halbquantitativer Beweis der Hyperkonjugation<sup>[1]</sup>

Von Hartmut Schmidt und Armin Schweig<sup>[\*]</sup>

In den letzten Jahren ist die Hyperkonjugation<sup>[2]</sup> wieder stark in den Blickpunkt chemischer Forschung gerückt<sup>[3]</sup>. Wir beschreiben, ausgehend von den Photoelektronen(PE)-Spektren der Allylhalogenide, erstmals einen halbquantitativen Beweis der Hyperkonjugation.



Die Allylhalogenide  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{X}$  ( $\text{X} = \text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{J}$ ) liegen als *gauche*- und *cis*-Konformere vor<sup>[4]</sup>. Aufgrund unterschiedlicher Population der beiden Isomere kann jedoch nur die *gauche*-Form in den PE-Spektren beobachtet werden<sup>[4d, e]</sup>.

Abbildung 1 zeigt die PE-Spektren der Allylhalogenide, Abbildung 2 das daraus und aus dem PE-Spektrum von Propen<sup>[3c]</sup> abgeleitete Korrelationsdiagramm.  $\pi_1$  ist das oberste besetzte  $\pi$ -MO (antibindende Kombination von Vinyl- $\pi$ -MO und einer  $\pi$ -Kombination der  $\text{CH}_2\text{X}$ -Bindungen).  $\sigma_1$  koppelt den Vinyl-Teil mit dem Substituenten  $\text{CH}_2\text{X}$ .  $\sigma_2$  und  $\sigma_3$  sind vorwiegend in  $\text{CH}_2\text{X}$  lokalisiert, wobei  $\sigma_3$  das C—X-bindende MO ist.  $n_1$  und  $n_2$  sind die MOs der einsamen Elektronenpaare der Halogenatome; sie sind durch Spin-Bahn-Kopplung aufgespalten<sup>[5]</sup>.

Wir betrachten nun die  $\pi_1$ -MOs. Die elektronischen Wechselwirkungen zwischen dem Vinyl- $\pi$ -MO und dem Substituenten  $\text{CH}_2\text{X}$  können modellmäßig durch den hyper-

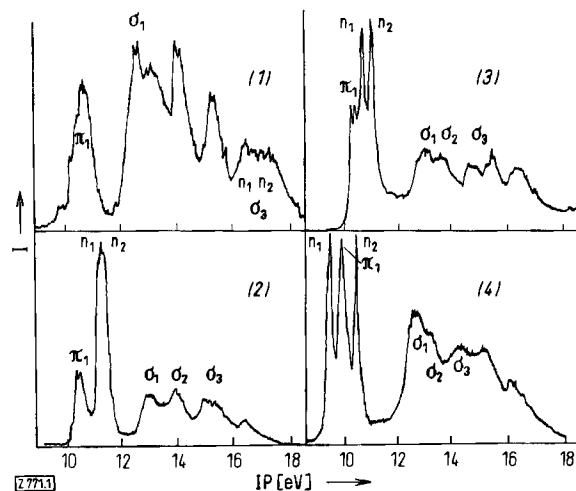


Abb. 1. Photoelektronenspektren von Allylfluorid (1), Allylchlorid (2), Allylbromid (3) und Allyljodid (4).

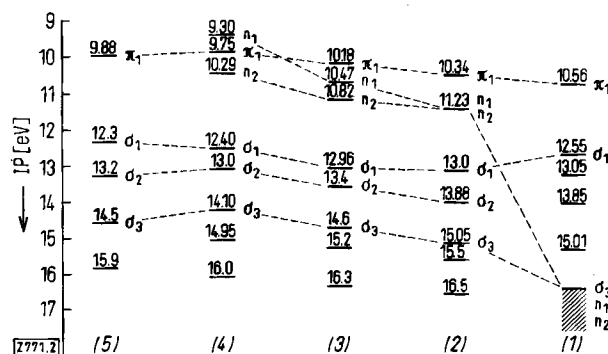


Abb. 2. Korrelationsdiagramm der obersten besetzten MOs von Propen (5) sowie der Allylhalogenide (1) bis (4). Die Zahlen über den Niveaus bedeuten vertikale Ionisierungspotentiale.

konjugativen Effekt der C—X- und C—H-Bindungen (in der *cis*-Konformation nur der C—H-Bindungen) und durch den induktiven Effekt der Halogenatome beschrie-

[\*] Prof. Dr. A. Schweig und cand. rer. nat. H. Schmidt  
 Fachbereich Physikalische Chemie der Universität  
 355 Marburg, Biegenstraße 12