

In₄Bi₂S₉, eine neue Verbindung im System In₂S₃—Bi₂S₃

In₄Bi₂S₉, a New Compound in the System In₂S₃—Bi₂S₃

V. KRÄMER und R. NITSCHKE

Kristallographisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. 26 b, 1074 [1971]; eingegangen am 17. Juli 1971)

Bei der Untersuchung des Subsolidusgebiets des quasibinären Systems In₂S₃—Bi₂S₃ mit Hilfe chemischer Transportreaktionen^{1,2} erhielten wir aus der Gasphase eine neue Verbindung in Form schwarz glänzender, im Durchlicht schwach rötlicher Einkristallnadeln (maximale Länge 50, Dicke 1 mm). Die Verbindung wurde in geschlossenen Quarzglasampullen in einem Temperaturgradienten von 680—600 °C nach der Jodtransportmethode (5 mg Jod/cm³) hergestellt. Die chemische Zusammensetzung ist 2 In₂S₃·Bi₂S₃ (Thermogravi-

metrie, Atomabsorptionsspektroskopie); ein Jodgehalt konnte nicht festgestellt werden (Röntgenfluoreszenz). In O₂-Atmosphäre erfolgt bei 550 °C Oxidation, in N₂-Atmosphäre beginnt bei 720 °C die Bi₂S₃-Verflüchtigung.

Die Verbindung kristallisiert im monoklinen System mit den Gitterkonstanten ($\pm 1\%$) $a=16,05 \text{ \AA}$, $b=3,93 \text{ \AA}$, $c=11,00 \text{ \AA}$, $\beta=94,0^\circ$. Mit der pyknometrisch bestimmten Dichte von 5,53 g/cm³ ergeben sich zwei Formeleinheiten in der Elementarzelle (Röntgendichte 5,60 g/cm³). Aus der systematischen Auslöschung $0k0: k=2n \pm 1$ folgt als mögliche Raumgruppe P2₁ oder P2₁/m. Die b -Achse ist die Nadelachse, an Pinakoidflächen sind {100}, {001}, {101}, {102} und {103} ausgebildet. Die Untersuchungen im System In—Bi—S werden fortgeführt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für ihre Unterstützung.

Sonderdruckanforderungen an Dr. V. KRÄMER, Kristallographisches Institut der Universität Freiburg, D-7800 Freiburg, Hebelstr. 25.

¹ H. SCHÄFER, Chemische Transportreaktionen, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

² R. NITSCHKE, J. Cryst. Growth 9, 238 [1971].

Uptake of Polynucleotides by Mouse Ascites Tumor Cells (X*)

pH-Dependent Uptake of Synthetic Homoribopolymers

P. L. SCHELL

Institut für Klinische Biochemie und Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover, 3000 Hannover/Germany (Direktor: Professor Dr. W. LAMPRECHT)

(Z. Naturforsch. 26 b, 1074—1076 [1971]; received March 16, 1971, revised July 27, 1971)

The uptake of RNA and synthetic polyribonucleotides into viable mammalian cells was previously reported by several authors¹⁻³. In this preliminary communication experiments are reported which demonstrate the pH-dependence of this uptake. Under conditions of reduced pH the uptake of polyribonucleotides by Ehrlich ascites tumor cells is increased. This pH-effect is reversible. It is independent from the structure and the type of the offered polyribonucleotide. These results indicate that a pH dependent reversible change of molecular structures of the cellular membrane, but not a lesion of the cell walls is responsible for the effect. The phenomenon is called pH-effect in the following.

The cells were incubated in media of defined pH-values which consisted of the labelled homoribopolymer

and modified Hanks solution³. The pH-values varied between pH 5—pH 7.8. The uptake of the polymers was measured and control experiments were carried out which make other possible interpretations of the uptake effects unlikely.

Actinomycine was added to prevent the possible reutilisation of fragmented labelled ribopolymers in cellular RNA synthesis. Cells exposed to labelled polynucleotides were washed carefully to remove excessive labelled material from the cells. Other control experiments show that the viability of ascites cells is maintained under our conditions of low pH. Cells incubated in a medium of pH 5 were compared with cells from a milieu of pH 7 by eosine staining⁴ and reimplantation of the cells.

The experiment was carried out with poly A, poly U, poly C, poly A·U, and poly A·U₂.

In Fig. 1 the uptake values of labelled poly A and poly C were plotted against the pH values of the respective incubation medium. So curves were obtained, which were nearly identical. The pH dependence of the uptake of poly U fits well into the scheme of Fig. 1. The double helix poly A·U and the triple helix A·U₂ were prepared and the stability of these species in our acidic incubation media was demonstrated by isotope dilution experiments⁵. Therefore the same experiments were carried out with poly A·U and poly A·U₂. We

Reprint requests to Priv.-Doz. Dr. P. L. SCHELL, Medizinische Hochschule Hannover, Inst. für Klinische Biochemie u. Physiolog. Chemie, D-3000 Hannover-Kleefeld, Roderbruchstr. 101.

* No. IX of this series P. L. SCHELL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 240, 472 [1971].

¹ P. L. SCHELL, Z. Naturforsch. 22 b, 529 [1967].

² G. P. LAMPSON, A. A. TYTELL, A. K. FIELD, M. M. NEMES, and M. R. HILLEMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 58, 782 [1967].

³ P. L. SCHELL, Z. Naturforsch. 23 b, 1118 [1968].

⁴ W. MÜLLER and P. L. SCHELL, in preparation.

⁵ P. L. SCHELL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 240, 472 [1971].

found out that these composed polymers also follow the pH-pattern expressed by the curves of Fig. 1.

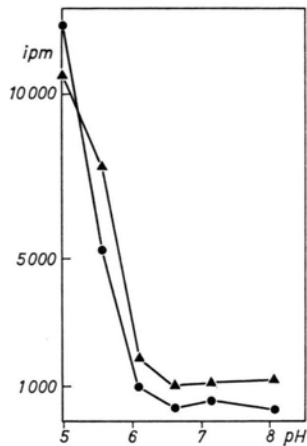


Fig. 1. pH-dependence of uptake of poly A and poly C: The incubation medium consisted of Hanks medium containing 0.08 M phosphate, 20 γ /ml actinomycin and ^3H -poly A (0.35 μ mole/ml, 3×10^5 ipm/ml). For each pH point the pH of the medium was adjusted by raising or lowering the pH of the pH 5, and the pH of the pH 7.8 medium respectively. The incubation was carried out with both pH-series (incubation time 30 min, incubation temperature 30 $^\circ$). The incubation was terminated by dilution of the incubation mixture in 2.5 ml 0.9% NaCl solution, 0 $^\circ$. The cells were separated from the medium by two sedimentations (20 \times g) in 0.9% NaCl solution at 0 $^\circ$ and several additional washings on a glasfiber filter. These filters were dried and counted in a liquid scintillation counter. The values obtained from corresponding pH-steps of the two series were nearly identical and their averages were recorded above. Analogous media were prepared for each pH point with poly C. Then the experiment was repeated under identical conditions. These curves are also representative for the uptake of poly U, poly A \cdot U and poly A \cdot U \cdot C.
 ●—●— poly A, —▲—▲— poly C.

At pH 5 radioactive polyribonucleotides taken up by the cells cannot be washed out again. This fact could be controlled in the following experiment. The cells were exposed to the polyribonucleotides at pH 5 and were subsequently incubated in a new medium of the same pH, but without the polymer. After an incubation time of 45 min only small amounts of polymer were lost by the cells. This control served as a basis for an experiment in which evidence was sought against the argument that at pH 5 irreversible damage of the cell walls had occurred which would render these membranes permeable for an influx of polymers.

In this experiment the cells were treated in a series of two incubations. The first one was carried out to facilitate the pH-effect on the membrane in the absence of the polynucleotide. In a subsequent incubation in another medium this pH-effect was reverted and at the same time the cells were exposed to the polymer. This incubation was stopped by dilution, the cells were carried through several washing cycles and the radioactivity of the cells was measured. According to this

scheme three different pH-combinations were carried out (Fig. 2):

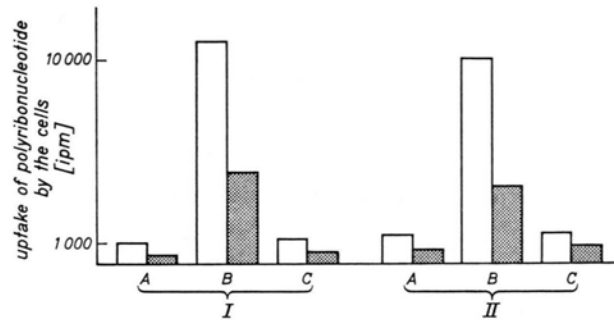


Fig. 2. Reversibility of the pH 5 effect demonstrated with poly A and poly C. I. ^3H -poly A. Column A: The cells were preincubated in medium without polymer at pH 5. The preincubation was terminated by dilution with 2.5 ml Hank solution pH 7.5 0 $^\circ$ and subsequent centrifugation. Afterwards these cells were incubated with ^3H -poly A at pH 7.5. The experimental conditions are those of Fig. 1. Column B: Preincubation of cells in medium without polymer at pH 5 followed by the incubation with ^3H -poly A at pH 5. The experimental conditions are those of column A. Column C: Preincubation of cells in medium without polymer at pH 7.5 followed by the incubation with ^3H -poly A at pH 7.5. The experimental conditions are those of column A. Black columns: Incubation at 0 $^\circ$ 30 min; White columns: Incubation at 30 $^\circ$ 30 min. II. ^3H -poly C. Columns A, B, C: The experiment was repeated with poly C on the same experimental conditions. These experiments are also representative for poly U.

Cells were incubated in a pH 5 medium and afterwards in a pH 7.5 medium containing the polyribonucleotide. The amount of poly A taken up by the cells is shown in Fig. 2, I, column A.

Cells were incubated at pH 5 and then incubated with poly A in a medium of pH 5 (column B of Fig. 2, I). Cells were preincubated at pH 7.5 and afterwards treated with poly A at pH 7.5 (column C of Fig. 2, I).

In Fig. 2, I the column A represents the actual reversal whereas columns B and C represent the control data. The value of column B demonstrates the pH-effect itself. Column C represents the case when the cells were exposed to pH 7.5 conditions in both incubations and when therefore, the pH-effect had never occurred. The identity of columns A and C demonstrates the identity of the final uptake situations. In column A this situation, however, had been intermediated by the uptake situation of column B.

The experiment was repeated using poly C and an identical result was obtained (Fig. 2, II).

Conclusion

The uptake of polyribonucleotides by ascites tumor cells is increased at conditions of decreased pH of the incubation milieu. This effect is identical for different species of the polynucleotides. We therefore conclude that the variety of pH dependent structural changes of the different polymers cannot be held responsible for

this effect. These data and the findings of the reversibility of the pH-effect and the non-reversibility of the uptake make the following hypothesis likely; the pH-effect, illustrated in Fig. 1, could demonstrate a pH-dependent change of those molecular structures of the cell membranewhich are responsible for the entry of

polyribonucleotides through the cell membrane. Further experiments are in progress to elucidate the nature of these structures. Full details of this work will be published elsewhere.

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Äthylierung von Guanin-N-7 in den Nucleinsäuren von Rattenleber und -embryonen durch Äthylnitrosoharnstoff

Ethylation of Guanine-N-7 in the Nucleic Acids of Rat Embryos and Liver by Ethylnitrosourea

R. GOTH und M. F. RAJEWSKY

Abteilung Physikalische Biologie, Max-Planck-Institut für Virusforschung, 7400 Tübingen, Germany

(Z. Naturforsch. 26 b, 1076—1077 [1971]; eingegangen am 16. Juli 1971)

Das alkylierende Nitrosamid *N*-äthyl-*N*-nitrosoharnstoff (ÄNH) ist in den letzten Jahren durch seine ausgeprägte transplacentare Cancerogenität bekannt geworden¹. Bereits eine einzige, an gravide Ratten verabreichte Dosis von ÄNH induziert bei deren Nachkommen in hoher Ausbeute Tumoren, die ganz überwiegend mit dem zentralen und peripheren Nervensystem assoziiert sind (s. l. c.²). Die Substanz ist unter angenähert physiologischen Bedingungen (M/15 Phosphatpuffer, pH 7,25; 37 °C) durch einen raschen heterolytischen Zerfall ($t_{1/2} \cong 8 \text{ min}$ ^{3,4}) charakterisiert, und daher als „Puls-Cancerogen“ besonders geeignet für Untersuchungen zur zeitlichen Aufeinanderfolge mit dem Prozeß der malignen Transformation verbundener molekularer und zellulärer Vorgänge³.

Eine hinsichtlich der Initiation der malignen Transformation möglicherweise wichtige Reaktion ist die nach Anwendung von *N*-Nitroso-Cancerogenen vielfach nachgewiesene Alkylierung von Nucleinsäurebasen, s. l. c.⁵. Die Arbeiten, über die im folgenden kurz berichtet wird, beschäftigen sich mit der Frage nach Auftreten und Grad einer Äthylierung am N-7 des Guanins in RNS und DNS von Leber und Embryonen nach *in vivo*-Appli-

kation von ÄNH bei Ratten des Stammes BD IX⁶ am 18. Tag der Gravidität.

Es wurde jeweils 2 oder 3 Tieren *N*-äthyl-*N*-nitrosoharnstoff-(Äthyl-1-¹⁴C) (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main), spez. Aktivität 5,6 mCi/mMol, in Form einer unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellten 0,1 M Lösung in Zitronensäure-Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 6,0⁷ intravenös injiziert. Die Dosierungen betragen 25 µg, bzw. 75 µg ÄNH-1-¹⁴C/g Körpergewicht. Dabei war in Kontrollversuchen die Überlebensrate der Jungtiere auch nach einer Dosis von 75 µg ÄNH-1-¹⁴C/g ($\cong 30\%$ der DL₅₀; l. c.¹) nicht reduziert, wenn die Würfe von unbehandelten Ammen aufgezogen wurden.

1 Stde. nach Injektion von ÄNH-1-¹⁴C wurden Lebern (nach portaler Perfusion mit kalter 0,9-proz. NaCl-Lösung) und Embryonen entnommen und in flüssigen N₂ gebracht. RNS und DNS wurden nach einer modifizierten KIRBY-Methode⁸⁻¹¹, s. l. c.¹², isoliert. Mit Hilfe des Orcin Tests¹³ wurde die RNS-Restkontamination der DNS-Proben zu $\leq 3,6\%$ bestimmt.

10–30-mg-Proben von RNS und DNS (10 mg/ml) wurden nach 1-stdg. Hydrolyse in N HCl bei 100 °C an Dowex 50 WX 12 (200–400 mesh; H⁺-Form) Kationenaustauschersäulen (10 cm · 1 cm) mit einem exponentiellen 1 N–4 N HCl-Gradienten chromatographiert, und das Eluat in 10-ml-Fractionen gesammelt. Nach Bestimmung der optischen Dichte ($E_{260 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$) wurden die Fraktionen bei 60 °C eingedampft, die Rückstände mit NCS-Solubilizer (Amersham/Searle Corp., USA) gelöst und die ¹⁴C-Aktivität der Proben im Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer gemessen. Bei den meisten Säulentrennungen wurde den Nucleinsäurehydrolysaten nicht-radioaktives „Marker“-7-Äthylguanin zugesetzt, das nach BROOKES und LAWLEY¹⁴ synthetisiert worden war.

Sonderdruckanforderungen an Dr. R. GOTH, Abt. f. Physikal. Biologie MPI für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstr.

¹ S. IVANKOVIC u. H. DRUCKREY, Z. Krebsforsch. 71, 320 [1968].

² W. WECHSLER, P. KLEIHUES, S. MATSUMOTO, K. J. ZÜLCH, S. IVANKOVIC, R. PREUSSMANN u. H. DRUCKREY, Ann. N. Y. Acad. Sci. 159, 360 [1969].

³ M. F. RAJEWSKY, Proc. Xth Int. Cancer Congress, Houston, Texas, 1970, Vol. I, p. 394.

⁴ R. GOTH u. M. F. RAJEWSKY, in Vorbereitung.

⁵ P. N. MAGEE, in: Physico-chemical mechanisms of carcinogenesis, Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry, p. 298, Vol. I, E. D. BERGMANN and B. PULLMAN, Eds., The Israel Academy of Sciences and Humanities, 1969.

⁶ H. DRUCKREY, P. DANNEBERG, W. DISCHLER u. D. STEINHOFF, Arzneimittel-Forsch. 12, 911 [1962].

⁷ T. C. McILVAINE, J. biol. Chemistry 49, 183 [1921].

⁸ K. S. KIRBY, Biochem. J. 64, 405 [1956].

⁹ K. S. KIRBY, Biochem. J. 66, 495 [1957].

¹⁰ K. S. KIRBY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 55, 545 [1962].

¹¹ C. S. KIDSON, R. K. RALPH u. K. S. KIRBY, J. molecular Biol. 7, 312 [1963].

¹² V. M. CRADDOCK, S. VILLA-TREVINO u. P. N. MAGEE, Biochem. J. 107, 179 [1968].

¹³ Z. DISCHE u. K. SCHWARZ, Mikrochim. Acta [Wien] 2, 13 [1937].

¹⁴ P. BROOKES u. P. D. LAWLEY, J. chem. Soc. [London] 1961, 3923.

Der Anteil äthylierter Guaninmoleküle (ÄG) am Gesamtguanin (G), ÄG/G, wurde aus der integralen ^{14}C -Aktivität der chromatographisch erhaltenen ÄG-Peaks sowie der Guaninmenge bestimmt, die sich aus der Extinktion des Guaninpeaks (molarer Extinktionskoeffizient in Säure $\epsilon_{260} = 8000$) ergab. Dabei wurde die Annahme zugrundegelegt, daß die spez. ^{14}C -Aktivität des ÄG derjenigen des verwendeten ÄNH-1- ^{14}C entsprach.

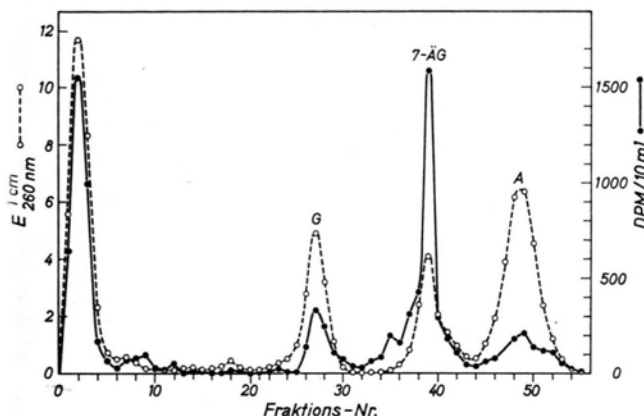


Abb. 1. Ionenaustauscher-Radiochromatogramm der DNS aus Rattenembryonen (BD IX Ratte, 18. Tag der Gravidität), 1 Stde. nach i.v. Injektion von $75 \mu\text{g}$ ÄNH-1- ^{14}C /g. G = Guanin; 7-ÄG = 7-Äthylguanin; A = Adenin. Die unmittelbar nach dem Start erscheinenden Peaks enthalten die Pyrimidine. Dem RNS-Hydrolysat wurde nicht-radioaktives „Marker“-7-ÄG zugesetzt.

Als Beispiel für die erhaltenen Radiochromatogramme ist in Abb. 1 die Säulentrennung eines Hydrolyсата aus embryonaler DNS dargestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zeigen, daß die Injektion von ÄNH-1- ^{14}C sowohl in den Embryonen als auch in der Leber der graviden Ratte zur Bildung von 7-Äthylguanin in RNS und DNS führt. Dabei liegen die gemessenen Guanin-Äthylierungsausbeuten (ÄG/G) für beide Nucleinsäuren in der Größenordnung von 10^{-5} (s. Tab. 1).

Bezogen auf die Leber-DNS der adulten Ratte und bei Umrechnung der Äthylierungsausbeuten auf äquimolaren Dosen entsprechende Werte (Annahme: direkte Proportionalität zwischen Äthylierungsausbeute und Dosis) liegt die Guanin-Äthylierungsausbeute 1 Stde. nach Gabe von ÄNH damit um etwa einen Faktor 30 niedriger als ein von SWANN und MAGEE¹⁵ 4 Stdn. nach Gabe von *N*-methyl-*N*-nitrososoharnstoff (MNH) gemessener Wert. Entsprechend unterscheiden sich die Guanin-Äthylierungsausbeuten für die Leber-RNS nach Gabe von ÄNH bzw. MNH um einen Faktor der gleichen Größenordnung⁴. Dies bestätigt die Erfahrung,

Gewebe	Dosis (μg ÄNH-1- ^{14}C /g K.-Gew., i.v.)	Anteil äthylierter Guanin- moleküle (ÄG/G)	
		RNS	DNS
Leber, Adulte BD IX Ratte	25	$0,8 \cdot 10^{-5}$	nicht gemessen
Leber, Adulte BD IX Ratte	75	$1,2 \cdot 10^{-5} *$	$3,4 \cdot 10^{-5}$
Embryo, BD IX Ratte, 18. Tag d. Gravidität	25	$0,4 \cdot 10^{-5}$	$< 0,3 \cdot 10^{-5}$
Embryo, BD IX Ratte, 18. Tag d. Gravidität	75	$0,6 \cdot 10^{-5} *$	$1,7 \cdot 10^{-5} *$

Tab. 1. Grad der Äthylierung von Guanin-N-7 in RNS und DNS von Embryonen und Leber der BD IX-Ratte, 1 Stde. nach Applikation von ÄNH-1- ^{14}C . * Mittelwerte aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 Versuchstieren. Maximale Abweichungen der Meßwerte von den Mittelwerten $\leq \pm 30$ Prozent.

daß die Äthylierungsausbeuten nach Anwendung methylierender Verbindungen die nach Behandlung mit den entsprechenden Äthyl-Homologen beobachteten im allgemeinen deutlich übersteigen¹⁵.

Auf der Basis äquimolarer Dosen ist demgegenüber die relative Toxizität (in % der DL_{50} ; s. l. c.^{16, 1}) von MNH nur um etwa das 2-fache höher als diejenige von ÄNH. Sie ist demnach mit den für die Nucleinsäuren der Leber gemessenen Guanin-Äthylierungsausbeuten nicht direkt korreliert.

Eine relevante Diskussion der Frage nach der Bedeutung der Äthylierung von Nucleinsäurebasen für den Prozeß der malignen Transformation setzt die Klärung einer Reihe noch offener Probleme voraus. Dies betrifft u. a. die möglicherweise unterschiedlichen genetischen Konsequenzen einer Äthylierung gegenüber einer Methylierung, die Depurinierungsraten der DNS nach Äthylierung bzw. Methylierung, die ungeklärte Rolle von Repair-Prozessen bei der malignen Transformation, sowie die Frage, ob und in welcher Weise bei Säugerzellen in Abhängigkeit von ihrem proliferativen und funktionellen Zustand eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung äthylender Cancerogene vorliegt³.

Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft in großzügiger Weise unterstützt.

¹⁵ P. F. SWANN u. P. N. MAGEE, *Biochem. J.* **110**, 39 [1968].

¹⁶ H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC u. D. SCHMÄHL, *Z. Krebsforsch.* **69**, 103 [1967].